

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät der Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung der molekularen Wirkungen des *Y. enterocolitica*
Effektorproteins YopP auf die Wirtszelle

vorgelegt von
Dipl. Biol. Kathleen Richter
aus Bautzen
eingereicht am 26. Mai 2004

München 2004

Gutachter:

Erstgutachter: Prof. Dr. E. Weiß

Zweitgutachter: PD Dr. A. Böttger

Sondergutachter: Dr. K. Ruckdeschel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07. 2004

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kathleen Richter

für Henry Ottomar Richter
in liebevoller Erinnerung

Aus dieser Arbeit gingen folgende Publikationen hervor

Ruckdeschel, K. and Richter K. (2002). "Lipopolysaccharide desensitization of macrophages provides protection against *Yersinia enterocolitica*-induced apoptosis." Infect. Immun. **70**:5259-64.

Ruckdeschel, K., Richter, K., Mannel, O. and Heesemann J. (2001). " Arginine-143 of *Yersinia enterocolitica* YopP crucially determines isotype-related NF-kappaB suppression and apoptosis induction in macrophages." Infect. Immun. **69**:7652-62.

weitere Publikationen

Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C.A., Trulzsch, K., Rouot, B. and Heesemann J. (2001). "Yersinia outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages." J. Immunol. **166**:1823-31.

Ruckdeschel, K., Richter, K. and Aepfelbacher M. (2003). "Yersinia outer proteins (Yop`s)- versatile modulators of host cell signalling during bacterial infection." Biomedical Progress **16**:15-19

Ruckdeschel, K., Richter, K. and Aepfelbacher M. „Bakterielle Virulenzfaktoren: *Yersinia* outer proteins (Yop`s)." Die Gelben Hefte

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	1
1. Einleitung	8
1.1. Die Gattung <i>Yersinia</i>	8
1.2. Krankheitsbilder	9
1.2.1. <i>Yersinia pestis</i>	9
1.2.2. Enteropathogene <i>Yersinien</i>	10
1.3. Virulenzfaktoren	10
1.3.1. Das <i>Yersinia</i> Typ III-Proteinsekretionssystem	11
1.3.2. Effektor-Yops	12
1.3.3. Regulation der Yop-Expression und Sekretion/Translokation	14
1.3.4. Invasion und Adhäsion	15
1.3.5. Das Yersiniabaktin Eisenaufnahmesystem	17
1.4. Immunmodulation durch YopP/YopJ	17
1.4.1. Die Immunantwort der Wirtszelle bei der bakteriellen Infektion	17
1.4.1.1. „Toll-like“ Rezeptoren	17
1.4.1.2. TLR4-abhängige Signalwege	19
1.4.1.3. IKK- und NF-κB-Aktivierung	20
1.4.1.4. MAPK-Aktivierung	21
1.4.2. Inhibition der unspezifischen Immunantwort durch YopP/YopJ	21
1.5. Apoptoseinduktion durch <i>Yersinien</i>	23
1.5.1. Apoptose	23
1.5.2. Apoptose bei der bakteriellen Infektion	24
1.5.3. <i>Yersinien</i> induzierte Apoptose	24
1.6. Zielsetzung der Arbeit	27
2. Materialien und Methoden	28
2.1. Chemikalien, Verbrauchsgegenstände, Geräte, Enzyme, Kits	28
2.2. Bakterien- und Hefe-Stämme, Zellkulturzellen und Vektoren	30
2.3. Anzucht von Bakterien und Hefen	33
2.3.1. <i>Escherichia coli</i> - und <i>Yersinien</i> -Kulturen	33
2.3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Kulturen	34

2.4.	Molekularbiologische Methoden	35
2.4.1.	Isolierung von DNA	35
2.4.1.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus kleinen Volumina	35
2.4.1.2.	Isolierung von DNA aus großen Volumina	36
2.4.2.	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	36
2.4.3.	Molekulargenetische Methoden	37
2.4.3.1.	Restriktionsverdau von DNA	37
2.4.3.2.	DNA-Phosphatase-Behandlung	37
2.4.3.3.	Agarosegelelektrophorese	38
2.4.3.4.	Ligation	38
2.4.3.5.	Standart-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.4.3.6.	PCR-Fusions-Technik	39
2.4.3.7.	verwendete Primer für PCR und Sequenzierung	40
2.4.3.8.	Zielgerichtete Mutagenese mittels QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	41
2.4.3.9.	Reinigung von PCR-Produkten	42
2.4.3.10.	DNA-Sequenzierung	43
2.4.3.11.	Herstellung und Transformation RbCl-kompetenter <i>Escherichia coli</i> DH5 α -Bakterien	43
2.4.3.12.	Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>Yersinia</i> - und <i>Escherichia coli</i> -Bakterien	44
2.5.	Das Hefe-2-Hybrid-System	45
2.5.1.	Grundlagen	45
2.5.2.	Herstellung und Transformation kompetenter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen	46
2.5.3.	β -Galaktosidase <i>in vivo</i> Test	47
2.5.4.	cDNA-Genbank-Beschreibung	48
2.5.5.	Transformation der cDNA-Genbank in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EGY48	48
2.5.6.	Identifizieren von potentiell positiven Hefe-Transformanten	49
2.5.6.1.	Bestimmung der Anzahl von transformierten Hefezellen	50

2.5.6.2.	Glucose/Galaktose-Selektion der transformierten Hefezellen	50
2.5.6.3.	Plasmid-DNA-Isolierung aus potentiell positiven <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen	50
2.5.6.4.	Fusionstest von potentiell positiven Hefe-Transformanten	52
2.6.	Proteinchemische- und Immunologische Methoden	53
2.6.1.	Proteinexpression und Reinigung rekombinanter Proteine	53
2.6.2.	Herstellung eines polyklonalem Kaninchen-Antikörper gegen YopP	54
2.6.3.	Proteinbestimmung nach Bradford	54
2.6.4.	Protein-Expression im Hefe-2-Hybrid-System	55
2.6.5.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.6.6.	Proteintransfer (Western-Blot)	56
2.6.7.	Proteinfärbung (Coomassie-Blaufärbung)	57
2.6.8.	Proteindetektion mittels Immunoblot	58
2.7.	Zellkultur	59
2.7.1.	Kultur- und Infektionsbedingungen	59
2.7.2.	Transfektion von HEK-293-Zellen mittels Kalziumphosphat	60
2.7.3.	<i>in vitro</i> -Präzipitation von Zellproteinen mit GST-YopP	61
2.7.4.	Koimmunopräzipitation von Zellproteinen mit YopP	61
2.7.5.	Untersuchungen der NF- κ B-Aktivierung bei Yersinieninfektionen mittels EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)	62
2.8.	Sequenzanalysen	62
3.	Ergebnisse	64
3.1.	Vorversuche	64
3.2.	Homologievergleich von <i>Y. enterocolitica</i> YopPO8 mit Proteindatenbanken	67
3.3.	Homologievergleich zwischen YopPO8 und YopPO9	68
3.4.	Charakterisierung der YopPO8-Effektordomäne durch Herstellung von YopPO8/YopPO9-Hybridproteinen	69
3.4.1.	YopP Aktivität nach Austausch eines internen <i>yopP</i> - <i>Bam</i> HI-Fragmentes	69
3.4.2.	YopP Aktivität nach Austausch von RA und ST an den YopP-Positionen 143 und 144	71

3.4.3.	Analyse der Interaktion von YopP mit IKK β in Kopräzipitationsexperimenten	73
3.5.	Untersuchung der Interaktion von YopP mit IKK β mittels des Hefe-2-Hybrid-System	75
3.6.	Bestimmung potentieller zellulärer Interaktionspartner von <i>Yersinia enterocolitica</i> YopPO8 mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-System	77
3.6.1.	Durchsuchung der cDNA-Genbank	77
3.6.2.	Identifikation der potentiellen Interaktionspartner von YopPO8	79
3.7.	Herstellung von eukaryontischen Expressionsvektoren von potentiellen Interaktionspartnern von YopP	80
3.7.1.	Potentieller Interaktionspartner Translations-Elongations-Faktor 1, beta 2	81
3.7.2.	Potentieller Interaktionspartner Mothers against decapentaplegic (dpp) homolog 1 (SMAD1)	82
3.7.3.	Protein-Phosphatase 2A	82
3.7.4.	Potentieller Interaktionspartner F-box- and WD40-domain protein2 (FWD2)	83
3.8.	Herstellung des YopP-AK	84
3.9.	Vergleich der YopP-Expression in verschiedenen Organismen	85
3.10.	Identifizierung der Bindungsdomäne von IKK β an YopPO8 mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-System	86
3.10.1.	Gezielter AS-Austausch von IKK β nach IKK α	87
3.10.2.	Analyse der Interaktion von YopPO8 mit IKK β -Deletions- und IKK β -Punktmutanten	89
3.10.3.	Quantifizierung der Interaktion von YopPO8 mit IKK β -Deletions- und IKK β -Punktmutanten	90
3.10.4.	<i>in vitro</i> -Charakterisierung der Interaktionen zwischen IKK β 120 und YopPO8	92
4.	Diskussion	94
4.1.	Aktivitäten verschiedener YopP-Isotypen	94
4.2.	Identifizierung potentieller YopP-Interaktionspartner mit Hilfe des	96

Hefe-2-Hybrid-System	
4.2.1. F-box/WD40-repeat protein 2 (FWD2)	97
4.2.2. PP2A	98
4.2.3. Translation-Elongation-Faktor 1 beta 2 (eEF1B β)	99
4.2.4. Mothers against decapentaplegic (dpp) homolog 1 (Smad1)	100
4.3. Charakterisierung der Interaktion zwischen YopPO8 und IKK β -Derivaten	101
4.4. Ausblick	103
5. Zusammenfassung	105
6. Literaturangaben	107
7. Lebenslauf	133
8. Danksagung	134

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bidest.	doppelt destilliert (Reinstwasser)
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
DD	death domain
DMFO	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-desoxy-Nukleosidtriphosphat
ddNTP	2'3'-desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gal	Galaktose
Glu	Glucose
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
IKK α , β	I κ B Kinase α , β (IKK1, IKK2)
I κ B	Inhibitor von κ B
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiagalactosid
LB	Luria-Bertani Medium
LiOAc	Lithiumacetat
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MA	Milliampere

MEKK1	extracellular signal-regulated kinase kinase 1
min	Minuten
MOPS	3-Morpholio-propansulfonsäure
MyD88	myeloid differentiation protein
NaAc	Natriumacetat
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	nuclear factor κ B
NLS	nuclear localisation site
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	phosphat-gepufferte Saline
Raf	Raffinose
RNaseA	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TRADD	TNF-R1-associated death domain protein
TRAF	TNF receptor associated Factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
YPD	Hefe-Vollmedium
YNB	Hefe-Mangelmedium

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Yersinia*

Yersinien sind gram-negative Stäbchenbakterien, die seit 1964 der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet werden (Frederiksen, 1964). Die inzwischen 11 Arten (*Y. enterocolitica*; *-pseudotuberculosis*; *-pestis*; *-fredericksonii* *-intermedia*; *-kristensii*; *-mollaretii*; *-bercovieri*; *-aldovae*; *-rhodei*; *-ruckeri*) umfassende Gattung *Yersinia* trägt den Namen zu Ehren des Entdeckers des Pesterregers Alexandre J. Yersin, der 1894 den Pestbazillus in Menschen und in Ratten beschrieb. Von den 11 bekannten Arten sind *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* humanpathogen, wobei *Yersinia pestis* unterschiedliche Nomenklaturen durchlief: bis 1900 *Bacterium pestis*, zwischen 1900 und 1923 *Bacillus pestis*, seit 1923 *Pasteurella pestis* (nach Louis Pasteur) und ab 1970 *Yersinia pestis* (Butler 1983; Perry and Fetherston, 1997).

Y. pseudotuberculosis und *Y. enterocolitica* sind im Gegensatz zu *Y. pestis* bei 25 °C beweglich, synthetisieren jedoch bei 37 °C keine Flagellen mehr. Yersinien können sich in einem Temperaturbereich von 4-43 °C vermehren, die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 28-30 °C. *Y. pestis* besitzt ein antiphagozytäres Carbohydrat-Protein (F1-Antigen), welches bei einer Temperatur ab 33°C gebildet wird (Brubaker, 1972). Die Ähnlichkeit (90 %) des Chromosoms und identische 16S rDNA-Sequenzen zeigen die Abstammung von *Y. pestis* von *Y. pseudotuberculosis* (Ibrahim *et al.*, 1993; Brubaker, 1991). Während *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* nur je ein Virulenzplasmid (pYV) aufweisen, besitzt *Y. pestis* deren drei (pYV, pTOX, pCPC). pYV kodiert für ein Typ III-Sekretionssystem, pTOX ist für das Überleben und Vermehren im Rattenflohmagen und pCPC für die Dissemination der Pesterreger nach Inokulation durch Flohbiss verantwortlich (Ferber and Brubaker, 1981; Heesemann 1994).

Für *Y. pseudotuberculosis* wurden 8 Serogruppen beschrieben (I-VIII), die in Untergruppen (1A, 1B...) weiter differenziert werden. Bei *Y. enterocolitica* wurden von Wauters *et al.* (1987) sechs Biovarietäten definiert. Die Biovarietäten 1B ist medizinisch in Nordamerika bedeutsam, 2 und 4 in Europa. Die Biovarietäten 3 und 5 sind in der Regel tierpathogen (Chinchilla, Ziege, Hase). Die Einteilung von *Y. enterocolitica* in verschiedene Serotypen geschieht nach den Oberflächen- (O-) und Geißel- (H-) Antigenen, wobei die Kapsel- (K-) -Antigene heute keine diagnostische Relevanz mehr besitzen (Aleksic and Bockemuhl, 1990).

1.2. Krankheitsbilder

1.2.1. *Y. pestis*

Bis heute konnten drei Pestpandemien nachgewiesen werden. Die erste Pandemie im 6. Jahrhundert breitete sich von Ägypten nach Europa aus und dauerte über 50 Jahre. Im Jahr 1347 entwickelte sich die zweite Pandemie von Zentralasien über die Halbinsel Krim und erfasste fast alle Teile Europas und Nordafrikas. Ein Viertel der Bevölkerung erlag dem „Schwarzen Tod“. Nach zwei Jahrhunderten der Erholung führte die um 1860 beginnende Pestepidemie in China zur dritten Pandemie, wobei während der Pandemie der Erreger global nach Südamerika (1899), Nordamerika (1900) und Südafrika (1900) verbreitet wurde. Während dieser Pandemie wurde der Pesterreger 1894 von A. Yersin in Hongkong entdeckt und charakterisiert (Gottfried, 1983; Ziegler, 1991; Butler, 1983; Heesemann 1994).

Y. pestis ist der Erreger der Pest, während *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* als enteropathogene Keime gastrointestinale Krankheitsbilder verursachen. Die Hauptwirte des Pesterregers sind Wildnagetiere, die durch Flöhe, vor allem den Rattenfloh, mit *Y. pestis* infiziert werden. Infizierte Flöhe übertragen *Y. pestis* durch Regurgitation des Vormageninhaltes beim Saugversuch auch auf den Menschen. Die Pest hat eine hohe Letalität (30-60 %). Nachdem der Erreger von Phagozyten internalisiert wurde, aktiviert der Temperaturwechsel vom Floh zum Mensch Plasmidgene, was zur Zerstörung der Phagozyten führt (Bacot and Martin, 1914; Cavanaugh and Randall, 1959). Der jetzt extrazellulär lokalisierte Erreger wird phagozytoseresistent durch die Produktion des F1-Kapselproteins. Schnelle extrazelluläre Vermehrung und Produktion des Plasminogen Pla (plasminogen activator) begünstigen eine lymphogene Dissemination bis hin zur Septikämie. Die häufigste Form der Pesterkrankung (80-90 %) ist die Beulenpest (Bubonenpest), wobei bei Erwachsenen besonders inguinale und axilläre Lymphknoten betroffen sind, während Kleinkinder häufiger eine zervikale Lymphadenopathie entwickeln. Unbehandelt entwickelt sich die Beulenpest häufig zur Lungenpest, bei der die Bakterien die Atemorgane angreifen, indem sie in die Lunge disseminieren. Die Lungenpest ist besonders gefährlich (circa 95 % Letalität), zeigt einen fulminanten Verlauf und ist hoch infektiös (primäre Lungenpest, Ausbreitung über Aerosole) (Poland and Barnes , 1979; Heesemann 1994).

1.2.2. Enteropathogene Yersinien

Die enteropathogenen Stämme *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* haben in Europa an medizinischer Bedeutung gewonnen. Sie gehören nach *Salmonella* und *Campylobacter* zu den dritthäufigsten bakteriellen Enteritisserregern. Trotz der nahen Verwandtschaft von *Y. pseudotuberculosis* zu *Y. pestis* verläuft die Übertragung nicht über Flöhe, sondern wie bei *Y. enterocolitica* über die mit Exkrementen von infektiösen Tieren kontaminierte Nahrung (Black *et al.*, 1978). Neben den Haus- und Wildnagetieren können auch Vögel zum natürlichen Wirt von *Y. pseudotuberculosis* gehören.

Nach der oralen Aufnahme wandern die Yersinien durch die M-Zellen (microfold-cells, die zur Mukosa der Peyerschen Plaques gehören) in die Lymphfollikel (Peyersche Plaques). Die Durchwanderung der M-Zellen ermöglicht das chromosomal kodierte 130 kDa große Invasin-Außenmembranprotein (Inv) (Cornelis *et al.*, 1998; Isberg and Leong, 1990; Bliska *et al.*, 1993). In den Peyerschen Plaque vermehren sich Yersinien extrazellulär und bilden Abszesse, die sich einerseits in das Darmlumen entleeren und andererseits die Dissemination der Yersinien in mesenteriale Lymphknoten, Milz, Leber und Blutbahn verursachen können. *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*-Infektionen (Yersiniosen) können ein breites Spektrum von klinischen Symptomen auslösen, die vom Alter, Abwehrzustand und Geschlecht des Patienten abhängen (Heesemann 1994). So äußert sich die Yersiniose als akute Enteritis sowie terminale Ileitis, Enterokolitis, akute Pseudoappendizitis sowie mesenteriale Lymphadenitis.

1.3. Virulenzfaktoren

Der menschliche Organismus verfügt über eine Reihe von Abwehrmechanismen gegen bakterielle Erreger, darunter die angeborene und adaptive Immunantwort. Das angeborene Immunsystem stellt die vorderste Linie der Wirtsabwehr dar und wirkt unmittelbar gegen die eindringenden Mikroorganismen (Medzhitov and Janeway, 2000). Über Membranrezeptoren erkennen hauptsächlich spezialisierte Phagozyten wie Neutrophile und ortständige Makrophagen mikrobielle Zucker- oder Peptidmuster und leiten Signale für Zellreaktionen (Zytokinproduktion, Ausschüttung von Defensinen und reaktiven Sauerstoffspezies) weiter. Um das eigene Überleben zu sichern haben Yersinien Strategien entwickelt, mit denen sie den Abwehrmechanismen des

Wirtes entgegenwirken. Durch die Translokation von Effektorproteinen (*Yersinia* outer proteins Yops) können Yersinien Zellreaktionen inhibieren. Heesemann *et al.*, (1986) zeigte, dass diese Proteine auch aus dem Überstand von *Yersinia*-Kulturen gewonnen werden können, wenn sie bei 37 °C unter Kalziumionen-Mangel angezüchtet werden. Die Yops werden durch ein spezifisches Typ III Proteinsekretionssystem (TTSS) direkt in das Innere der Wirtszelle injiziert. Die Translokation der Yops führt zur Zellparalyse und bei Makrophagen zur Apoptose und ermöglicht den Yersinien so den extrazellulären Verbleib (Cornelis *et al.*, 1998; Heesemann 1994).

1.3.1. Das *Yersinia* Typ III-Proteinsekretionssystem

Eine Vielzahl von gram-negativen-, tier- und menschenpathogenen Bakterien (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Pseudomonas* spp., *Bordetella* spp., *Chlamydia* spp. und *E. coli*) bzw. pflanzenpathogenen Bakterien (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* und *Ralstonia solanacearum*) nutzen das Typ III-Sekretionssystem (TTSS) mit dem Ziel, bakterielle Virulenzproteine in die eukaryontische Wirtszelle zu transportieren (Hueck, 1998; Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Viprey *et al.*, 1998). Die Gene, die die sekretierenden und strukturellen Komponenten der verschiedenen Typ III-Sekretionssysteme kodieren, befinden sich in der Regel auf einem einzelnen Plasmid oder innerhalb einer abgetrennten Pathogenitätsinsel auf dem Bakterienchromosom. Das lässt darauf schließen, dass die Bakterien diese Gene als eine separate Einheit aufnehmen. Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen Bakterien ergaben eine hohe Ähnlichkeit innerhalb der Strukturkomponenten der einzelnen TTSS (Galan and Collmer, 1999).

Der Sekretionsprozess dieser Systeme wird bei Kontakt des Bakteriums mit der eukaryontischen Wirtszelle „angeschaltet“ und deshalb als „Kontakt-abhängige Sekretion“ bezeichnet (Cornelis and Van Gijsegem, 2000).

Die Pathogenität der Yersinien wird von einem 70 kb großen Virulenzplasmid (pYV) determiniert. Circa 50 % der genetischen Information des vollständig sequenzierten pYV-Plasmides dienen dem Aufbau des Typ III-Sekretions/Translokationssystem. Dies beinhaltet Gene für Effektorproteine, Translokationsproteine, expressionsregulierende Proteine und Proteine für den Typ III-Sekretionsapparat selbst (Heesemann 1994).

Der Typ III-Sekretionsapparat, der bei Kontakt mit eukaryontischen Zellen unter Infektionsbedingungen ausgebildet wird, ähnelt einem nadelartigen Komplex, der von der Bakterienoberfläche durch die Bakterienmembran bis zur eukaryontischen Zelle reicht. Dieser Komplex setzt sich aus 27 Proteinen zusammen, wobei 10 Proteine (YscC, -J, -N, -O, -Q, -R, -S, -T, -U und -V) Homologien zu Proteinen in nahezu allen Typ III- Sekretionsapparaten aufweisen (Cornelis *et al.*, 1998; Payne and Straley, 1998) (Abb.1).

1.3.2. Effektor-Yops

Bei diesen Pathogenitätsfaktoren handelt es sich um 6 Effektorproteine (YopH, YopE, YopO/YpkA, YopP/J, YopT und YopM), die durch den Typ III-Sekretionsapparat in die Wirtszelle transloziert werden. Die Proteine wirken modulierend (aktivierend oder inaktivierend) auf Signaltransduktionskaskaden, Zytoskelettlagerungen und Regulation von Genen der Wirtszelle (Moduline) (Rosqvist *et al.*, 1990; Heesemann 1994; Fallman *et al.*, 1995; Gosdent *et al.*, 2002) (Abb.1). Die Effektorproteine weisen keine klassische Signalsequenz auf. Jedoch ist in der Regel ein Minimum von 15 AS im N-terminalen Proteinbereich oder eine Signalsequenz am 5'-Ende der mRNA wesentlich für die Sekretion der Yops und deren Interaktion mit dem Translokationsapparat (Anderson and Schneewind, 1997).

YopH

YopH ist eine 51 kDa große Tyrosin-Phosphatase. Sie katalysiert die Hydrolyse von Phosphatresten an Tyrosin-phosphorylierten Proteinen (Guan and Dixon, 1990). YopH dephosphoryliert die Adhäsionsregulatorproteine FAK (focal adhesin kinase), p130^{Cas} und Paxillin, wodurch die fokalen Adhäsionsregionen und Adhäsionskomplexe zerstört werden und somit die Phagozytosefähigkeit von infizierten Zellen inhibiert wird (Persson *et al.*, 1997; Black and Bliska, 1997). Gleichzeitig wirkt die Phosphatase auf noch nicht bekannte Weise der Fc- und Komplementrezeptor-vermittelten Bildung bakterizider reaktiver Sauerstoffspezies („oxidativer Burst“) bei Makrophagen und neutrophilen Granulozyten entgegen (Bolin and Wolf-Watz, 1988; Rosqvist *et al.*, 1988).

YopE

YopE ist ein 23 kDa großes Virulenzmolekül, das als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) auf die Rho-GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 einwirkt (Sory *et al.*, 1995; Andor *et al.*, 2001). Rho, Rac und Cdc42 spielen eine zentrale Rolle bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts der Wirtszelle. Sie werden durch die YopE verursachte GTP-Hydrolyse inaktiviert. Dadurch wird die Ausbildung von Aktinmikrofilamenten gestört und trägt zur Phagozytoseresistenz von *Yersinia* bei (Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Black and Bliska, 2000).

YopO /YpkA

YopO (*Y. enterocolitica*) bzw. YpkA (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*) ist eine 80 kDa große Serin/Threonin-Proteinkinase mit einer Autophosphorylierungs- und einer RhoA- und Rac-bindenden Domäne (Galyov *et al.*, 1993; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). Die Kinaseaktivität wird durch Wirtszellproteine, z.B. Aktin, induziert. Eine YopO/YpkA vermittelte Zerstörung des Aktinzytoskeletts ist vermutlich auf die RhoA- und Rac-Bindung zurückzuführen und trägt zur Phagozytoseresistenz von *Yersinia* bei (Juris *et al.*, 2000; Barz *et al.*, 2000).

YopT

YopT ist eine 35,5 kDa große RhoA-, Rac- und Cdc42-modifizierende Cysteinprotease. Durch Abspaltung der C-Termini der Rho-GTPasen lösen sich die aktivierten Rho-Moleküle von der Zellmembran und werden dadurch inaktiviert. Die YopT-induzierte Modifikation der Rho-GTPasen führt auch zur Zerstörung der Aktinzytoskelettstruktur (Iriarte M. and Cornelis G.R. 1998; Zumbihl *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2002).

Gemeinsam vermitteln YopT, YopH, YopE und YopO/YpkA das extrazelluläre Überleben der Yersinien im Wirt.

YopM

YopM ist ein circa 42 kDa großes, aus Leucin-reichen Sequenzen bestehendes Protein, das unter Verwendung eines Vesikel-assoziierten Transportweges in den Zellkern gelangt. YopM aktiviert die Serin/Threonin-Kinasen PRK2 (protein kinase C-like 2) und RSK1 (ribosomal S6 protein kinase 1) (McDonald *et al.*, 2003), deren zelluläre Zielproteine in die Regulation von Zellwachstum, Apoptose und Translationsvorgängen involviert sind (Sun *et al.*, 2000; Koh *et al.*, 2000). Die genaue Funktion und Wirkungsweise von YopM ist noch nicht bekannt.

YopP

YopP (*Y. enterocolitica*) bzw. YopJ (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*) ist ein 32,5 kDa großes Yersinien-Effektorprotein, das die Zytokinproduktion von Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen inhibiert. Zudem vermittelt YopP/J den Zelltod von Makrophagen durch Apoptose. Es wird vermutet, das YopP/J zur Familie der Cysteinproteasen zählt (Orth 2000; Boland and Cornelis, 1998). YopP/J weist Homologien zu AvrRxv und AvrBst von *Xanthomonas campestris* auf, die eine, dem apoptotischen Zelltod bei Eukaryonten vergleichbare, sogenannte „Hypersensitive Reaktion (HR)“ bei Pflanzen auslösen kann (Cornelis *et al.*, 1998). Der vermutete Wirkmechanismus von YopP/J wird unter 1.4.2. und 1.4.5.3. beschrieben.

Der direkte zytokininhibitorische Effekt von YopP/J muss von der indirekten, zytokinsupprimierenden Aktivität von LcrV (V-Antigen) abgegrenzt werden. LcrV ist ein regulatorisches Protein des Typ III-Sekretions- und Translokationsapparates, das von den Yersinien sezerniert wird. Freigesetztes LcrV induziert bei Makrophagen über TLR2 (Toll-like receptor 2) die Produktion von IL-10, welches die TNF- α -Synthese bei Makrophagen in der Umgebung reprimiert (Sing *et al.*, 2003).

1.3.3. Regulation der Yop-Expression und Sekretion/Translokation

Yersinia reguliert die Expression ihrer Typ III-Gene in Abhängigkeit von Umgebungseinflüssen z.B. Temperatur, pH-Wert, Osmolarität, Sauerstoff- und Salzkonzentration. Die Transkription wird dabei durch ein komplexes Netzwerk von regulatorischen Komponenten kontrolliert, die

sowohl von aktivierender (z.B. 37 °C, Transkriptionsaktivator VirF) als auch reprimierender (z.B. erhöhte Ca²⁺-Konzentration, VirF-transkriptionsreprimierende Proteine LcrQ und YmoA) Natur sein können (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992; Sarker *et al.*, 1998; Cornelis *et al.*, 1998).

Die Sekretion der Effektor-Yops ist kein konstitutiver Prozess und wird vor dem Kontakt mit der Wirtszelle durch YopN an der Bakterienoberfläche und durch LcrG an der inneren Zytoplasmamembran blockiert (Forsberg *et al.*, 1991; Iriarte *et al.*, 1998; Nilles *et al.*, 1998). In diesem Stadium liegen manche Effektor-Yops (YopH, YopE, YopT) in *Yersinia* an ihre spezifischen Chaperone (specific Yop chaperone=Syc) gebunden vor. Die Chaperone verhindern vermutlich die vorzeitige Sekretion der Effektor-Yops sowie deren Degradation (Hueck, 1998; Perry *et al.*, 1998; Cornelis 2000). Nach dem Bakterien-Wirtszell-Kontakt setzt die Translokation der Effektor-Yops die Sekretion der sogenannten Translokator-Yops LcrV, YopB und YopD voraus. Durch ihre hydrophoben Proteindomänen fungieren YopB und YopD als Transmembranproteine, die eine 1,2-3,5 nm große Pore in der eukaryontischen Zellmembran formen und diese, im Zusammenwirken mit LcrV, stabilisieren (Cornelis and Wolf-Watz, 1997; Neyt and Cornelis, 1999; Boland *e al.*, 1996). Durch diese Pore werden die Effektor-Yops in die Wirtszelle eingeschleust.

1.3.4. Invasion und Adhäsion

In Korrelation mit den unterschiedlichen Übertragungswegen unterscheiden sich die enteropathogenen Yersinien-Spezies von *Y. pestis* hinsichtlich ihrer Adhäsine und Invasine. Diese können sowohl chromosomal als auch Plasmidkodiert sein.

Invasin

Das *invA*-Gen ist auf dem Yersinien-Chromosom lokalisiert und kodiert für ein 92 kDa und 103 kDa großes äußeres Membranprotein bei *Y. pseudotuberculosis* bzw. *Y. enterocolitica*. Beide Yersinien exprimieren dieses Protein bei 28°C (Isberg and Leong, 1988). Invasin bindet an β 1-Integrine der Wirtszelle und induziert dadurch eine Endozytose der Yersinien. Invasin ist essentiell für die Translokation des Erregers durch die M-Zellen und ermöglicht so die Invasion

der intestinalen Mukosa. Bei *Y. pestis* ist das Gen zwar im Chromosom vorhanden, jedoch durch eine Insertion inaktiviert (keine Darminvasivität).

YadA

Neben dem Invasin produzieren enteropathogene Yersinien bei 37°C ein zusätzliches plasmidkodiertes Virulenz-Außenmembranprotein, das oligomere Fibrillen mit Köpfchenstrukturen bildet (Lollipop) und für die volle Mausvirulenz von *Y. enterocolitica* essentiell ist. Dieses 41-44 kDa große Yersinia-Adhäsin (YadA) vermittelt Zelladhäsionsfunktionen durch Bindung diverser extrazellulärer Matrixproteine und schützt die Bakterienzelle von Komplementlyse, Defensinen und LPS-Erkennungsproteinen (Heesemann and Grüter, 1987; Heesemann 1994; Roggenkamp *et al.*, 1996; Hoiczky *et al.*, 2000).

Das *Y. pestis*-pYV-Plasmid trägt zwar das *yadA*-Gen, wird aber auf Grund einer Punktmutation nicht exprimiert. Der Pesterreger bildet statt dessen eine Proteinkapsel aus, die aus dem Fraktion 1 (F1)-Protein besteht, das nicht in der äußeren Membran verankert ist. Wahrscheinlich schützt F1 *Y. pestis* vor Phagozytose.

Ail

Ähnlich wie *invA* ist das *ail*-Gen auf der chromosomalen DNA lokalisiert, wird aber bei 37°C exprimiert. Bei *Y. enterocolitica* ist Ail (attachment invasion locus) 17 kDa groß und spielt bei der Vermittlung von Serum-Resistenz sowie bei der Anlagerung an verschiedene Zelllinien eine Rolle. Das Protein verhindert die Lyse der Bakterienzelle durch die Bindung an einen Serum-Faktor oder eine Komplement-Komponente. Dadurch wird die Bildung von aktiven Membranangriffskomplexen durch die Wirtszelle inhibiert (Bliska and Falkow, 1992).

Das *ail*-Gen bei *Y. pseudotuberculosis* vermittelt ebenfalls Serum-Resistenz (Yang *et al.*, 1996). Obwohl *Y. pestis* einen zu *ail* homologen DNA-Bereich aufweist, kann es durch die Insertion eines zusätzlichen DNA-Fragmentes nicht exprimiert werden .

pH6 und MyfA

Y. pestis und *Y. pseudotuberculosis* exprimieren ein chromosomal-kodiertes pH6 Außenmembranprotein (PsaA, das einzige bis jetzt bekannte *Y. pestis*-Adhäsion), *Y. enterocolitica* ein zu 44 % homologes MyfA-Protein (Lindler *et al.*, 1990; Iriarte and Cornelis, 1995). pH6 formt eine fibrillenartige Struktur an der *Y. pestis*-Oberfläche und wird erst exprimiert, wenn sich das Bakterium in Phagolysosomen mit erniedrigtem pH befindet. Die genaue biologische Funktion ist noch unbekannt (Lindler and Tall, 1993; Payne *et al.*, 1998).

1.3.5. Das Yersiniabaktin Eisenaufnahmesystem

Y. pestis, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* haben ein fast identisches Eisenaufnahmesystem, das Yersiniabaktinsiderophorsystem. Über das Siderophor-System versorgen sich die Bakterien mit Eisenionen aus der Umgebung. Bei *Y. enterocolitica* bestimmt dieses Eisenaufnahmesystem die Virulenz im Mausinfektionsmodell. Yersinien der Serogruppe O8 exprimieren ein funktionelles Eisenaufnahmesystem, während Yersinien der Serogruppe O3 und O9 zwar den Siderophorrezeptor (FyuA), nicht aber das Siderophor selbst synthetisieren und somit eine verminderte Mausvirulenz aufweisen (Jurado, 1997).

1.4. Immunmodulation durch YopP/YopJ

1.4.1. Die Immunantwort der Wirtszelle bei der bakteriellen Infektion

1.4.1.1. „Toll-like“ Rezeptoren

Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie gegen Infektionen (Janeway and Medzhitov, 2002). Es ist in der Lage, den Invasionsort von Mikroorganismen über chemotaktisch wirkende Botenstoffe zu lokalisieren, um eine gezielte Einwanderung von professionellen Phagozyten zu veranlassen. Dies geschieht durch die Aktivierung von Makrophagen, die die eindringenden Krankheitserreger abtöten und gleichzeitig Zytokine sezernieren, welche anschließend eine proinflammatorische Immunantwort initiiert. Die Erkennung der eindringenden Mikroorganismen durch den Wirtsorganismus ist dabei essentiell für die Entwicklung einer

protektiven Immunantwort. Die Identifizierung von pathogenen Keimen erfolgt vor allem durch sogenannte TLR-Rezeptoren („Toll-like“ Rezeptoren), die von Immunzellen exprimiert werden (Muzio *et al.*, 2000). Die TLR besitzen Homologien zu den *Drosophila toll*-Genen und erkennen konservierte, strukturelle von pathogenen Mikroorganismen exprimierte Komponenten. Von den 10 identifizierten TLR interagieren 7 mit mikrobiellen Motiven (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die TLR und deren bakterielle Erkennungsmotive (Bochud and Calandra, 2003)

Rezeptor	mikrobieller Ligand	Mikroorganismus
TLR2	Lipoproteine Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Phosphatidylinositol-Dimannoside Glycosylphosphatidylinositol-Ketten (GPI) Endotoxine (LPS)	verschieden Bakterien <i>S. aureus</i> Mycobakterien <i>S. aureus</i> <i>T. cruzi</i> <i>L. interrogans</i> , <i>P. gingivalis</i>
TLR2, TLR6	Peptidoglykan (G+) lösliche Phenolmoduline Zymosan Macrophage aktivating lipopeptide-2 (MALP-2)	<i>S. aureus</i> Hefen <i>M. fermentans</i>
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	Endotoxine (LPS) Taxol	gram-negative Bakterien Pflanzen
TLR5	Flagelline	Bakterien mit Flagellen
TLR7	Imidazoquinoline antivirale Komponenten (Imiquimod und R-848)	chemische Komponenten
TLR9	unmethylierte CpG DNA	Bakterien

Die TLR zählen zur Gruppe der Typ1-Transmembranrezeptoren. Sie sind durch eine Abfolge leucinreicher Sequenzen (LRR) in der extrazellulären Domäne und durch eine Toll/Interleukin-1 (IL-1)-Rezeptordomäne (TIR) in ihrem zytosolischen Bereich gekennzeichnet. Proteine mit einer TIR-Domäne spielen sowohl bei Säugetieren als auch bei Pflanzen eine Rolle in der Wirtzellabwehr. Die TIR-Domäne ist essentiell für die Aktivierung intrazellulärer Signalwege (Medzhitov 2001).

1.4.1.2. TLR4-abhängige Signalwege

Die effiziente Erkennung von LPS (Hauptkomponente der Außenmembran gram-negativer Bakterien) durch TLR4 setzt die Anwesenheit einer Reihe von Co-Rezeptoren und Helfermolekülen voraus. LPS bindet durch seine LipidA-Domäne an das LPS-bindende Serumprotein (LBP) (Wright *et al.*, 1989). Der LPS-LBP-Komplex interagiert anschließend mit dem GPI-verankerten Glykoprotein CD14. Dieses Protein stellt einen Co-Rezeptor für TLR4 und TLR2 dar (Wurfel *et al.*, 1997). Allerdings besitzt CD14 keine Transmembran-Domäne und ist somit alleine nicht in der Lage, Signale in das Zellinnere weiterzuleiten. Ein anderes wichtiges, mit der extrazellulären TLR4-Domäne assoziiertes Protein, ist MD-2. Wie CD14 hat MD-2 keine Transmembranregion, kann aber die Sensitivität von TLR4 bezüglich der Erkennung von LPS erhöhen (Shimazu *et al.*, 1999).

Die intrazelluläre Induktion TLR4-abhängiger-Signalkaskaden beginnt mit der Ausbildung eines Rezeptor-Proteinkomplexes zwischen der TIR (Toll/IL-1-Rezeptor)-Domäne von TLR4 und der eines Adapterproteins. Ein universeller Adapter für alle bisher bekannten TLR ist MyD88, das über seine TIR-Domäne an die TLR bindet und anschließend über seine N-terminale „Death“-Domäne IRAK-Moleküle (IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinasen) rekrutiert. IRAK4 phosphoryliert und aktiviert hierbei in einem Multiprotein-Komplex IRAK1 (Jiang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002; Born *et al.*, 1998). Zur IRAK-Proteinfamilie gehören neben den aktiven Kinasen IRAK-1 und IRAK-4 noch zwei weitere Moleküle ohne Kinaseaktivität, IRAK-2 und IRAK-M. IRAK-M wird vor allem von Monozyten und Makrophagen exprimiert. Es fungiert als ein negativer Regulator des TLR-Signalweges (Kobayashi *et al.*, 2002).

Nach der Phosphorylierung von IRAK-1 durch IRAK-4 an Ser³⁷⁶ und Thr³⁸⁷ dissoziiert das phosphorylierte Protein in das Zytosol und bindet an TRAF-6 (tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor-6) (Cao *et al.*, 1996). TRAF-6 wird daraufhin polyubiquitiniert und rekrutiert die Adapter-Proteine TAB-1 (TAK-1 binding protein 1) und TAB-2 (TAK-1 binding protein 2), die die Aktivierung und Phosphorylierung von TAK-1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1) katalysieren. Der aktive TRAF-6/TAK-1-Komplex kann sowohl den I κ B-Kinase-Komplex, als auch die MAPK-Signalwege aktivieren (Wang *et al.*, 2001) und agiert somit als ein zentraler Induktor verschiedener TLR4-abhängiger Signalkaskaden. Das zu MyD88 verwandte Adaptermolekül TIRAP/Mal (TIR domain containing adaptor protein/ MyD88-

adaptor-like) kooperiert mit MyD88 bei der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges nach Stimulation von TLR2 oder TLR4 (Jiang *et al.*, 2003). Eine MyD88-unabhängige NF- κ B-Aktivierung erfolgt über den Adapter TRIF/TICAM-1/LPS2(TIR domain-containing adaptor inducing IFN-beta/TIR-containing adaptor molecule-1) nach TLR3 oder TLR4-Stimulation. Neben der NF- κ B-Aktivierung kontrolliert TRIF die Produktion von IFN- β durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 (Yamamoto *et al.*, 2002). Ein kürzlich nachgewiesenes viertes Adapterprotein mit TIR-Domäne, TRAM/TICAM-2/TIRP, scheint eine spezifische Rolle bei der TLR4-abhängigen Induktion des TRIF-Signalweges zu spielen (Yamamoto *et al.*, 2003) (Abb1).

1.4.1.3. IKK- und NF- κ B-Aktivierung

Die Induktion von TRAF6 und TAK1 nach TLR-Stimulation initiiert die Aktivierung des circa 700 kDa großen I κ B-Kinase-Komplexes (IKK-Signalosom). An diesem Prozess sind möglicherweise noch andere nachgeschaltete Kinasen beteiligt, z.B. NIK und MEKK1. Das IKK-Signalosom setzt sich aus zwei, durch Phosphorylierung aktivierte, enzymatisch aktive Kinasen (IKK α (85 kDa)/IKK β (87 kDa)), sowie aus mehreren Gerüstproteinen (NEMO(NF- κ B essential modulator), IKK γ und IKAP (IKK-complex-associated protein) zusammen. Die katalytische Aktivität des IKK-Komplexes vermittelt die Phosphorylierung der NF- κ B-inhibitorischen I κ B-Proteine (Hatada *et al.*, 2000; Yaron *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1998), die NF- κ B in nicht stimulierten Zellen im Zytoplasma komplexieren. Die Moleküle der NF- κ B-Familie (Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p50 und Vorläuferprotein p105) und NF- κ B2 (p52 und Vorläuferprotein p100) liegen als Homo- oder Heterodimere im Zytoplasma vor. Sie weisen eine für die DNA-Bindung, Dimerisation und Assoziation mit zusätzlichen zellulären Proteinen verantwortliche konservierte N-terminale Rel-Homologie-Domäne (RHD) auf. Die Bindung der I κ B-Proteine an NF- κ B-Dimere maskiert deren Signalsequenzen, die die Translokation in den Zellkern vermittelt. Dadurch wird NF- κ B in einem inaktiven Zustand gehalten (Chen *et al.*, 1999). Die I κ B-Phosphorylierung nach Stimulation führt zur Ubiquitinierung und Degradation der I κ B-Proteine über das 26S-Proteasom, wobei die NF- κ B-Dimere freigesetzt werden, in den Zellkern wandern und ihre Transkriptionsaktivität entfalten. Der NF- κ B-Signalweg weist deutliche Homologien bei wirbellosen Tieren und Pflanzen auf. Er ist essentiell für die

Entwicklung einer protektiven Immunantwort bei der bakteriellen Infektion. NF- κ B (RelA) kontrolliert die Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 und IL-6) und von Chemokinen (IL-8) und Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und ICAM-1 (host intercellular adhesion molecule 1) (Ghosh *et al.*, 1998; Karin and Neriha, 2000). Zusätzlich verhindert NF- κ B (RelA) die Apoptose von stimulierten Zellen und ist dadurch an der Regulation zellulären Überlebens beteiligt (Abb.1).

1.4.1.4. MAPK-Aktivierung

Neben dem NF- κ B-Signalweg bestimmen die Signalkaskaden der „Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) entscheidend die Immunfunktionen des Wirts. Zur Familie der MAPK zählen die Serin/Threonin-Kinasen ERK, JNK/SAPK und p38. Sie kontrollieren die zelluläre Stressantwort, den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung. Im Rahmen der Immunantwort bei bakteriellen Infektionen regulieren sie die Aktivität verschiedener proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und CREB. Diese wiederum koordinieren zusammen mit NF- κ B die Synthese von Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-1, IL-6, NO und Cyclooxygenase 2. Die Aktivierung der MAPK erfolgt durch eine Phosphorylierungskette, die wenigstens zwei Kinaseebenen umfasst (MAPKK-Kinasen, MAPK-Kinasen, MAP-Kinasen). Bei der bakteriellen Infektion wird die Aktivierung der MAPKK (MKK1-7), vermutlich durch den TRAF6/TAK1-Komplex induziert. Durch die Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung aktivieren MKK1/2 ERK, MKK 3/4/6 p38 und MKK 4/7 JNK (Huwiler *et al.*, 1996; Derijard *et al.*, 1996; Finch *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung induziert eine Konformationsänderung und eine drastische Erhöhung der MAPK-Enzymaktivitäten, was die Aktivierung der verschiedenen MAPK-Zielmoleküle bestimmt (Yordy and Muise-Helmericks, 2000) (Abb.1).

1.4.2. Inhibition der unspezifischen Immunantwort durch YopP/YopJ

Yersinien haben einen effizienten Mechanismus entwickelt, die Signalwege der unspezifischen Immunantwort zu modulieren. Das hat eine Suppression der Zytokinproduktion der infizierten Zelle zur Folge. *In vivo* Studien mit infizierten Mäusen konnten zuerst zeigen, dass Yersinien die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ beeinträchtigen. Dies trägt

entscheidend zum Krankheitsbild der Yersiniose bei. Eine Inhibition der Zytokinproduktion durch *Yersinia*-Infektion konnte später auch bei kultivierten Zellen *in vitro* nachgewiesen werden. Am besten charakterisiert ist hierbei die Unterdrückung der TNF- α -Produktion bei Makrophagen, die die primäre Quelle für TNF- α im infizierten Wirtsorganismus darstellt. Yersinien blockieren die TNF- α -Produktion innerhalb der ersten 120 min nach Infektionsbeginn (Ruckdeschel 2002).

Da die TNF- α -Produktion sowohl durch NF- κ B, als auch durch die MAPK kontrolliert wird (Guha and Mackman, 2001), hat sich eine Reihe unterschiedlicher Studien mit dem Einfluß von Yersinien auf diese Signalwege befasst. Es konnte gezeigt werden, dass Yersinien nach einer anfänglichen Aktivierung sowohl die NF- κ B- als auch die MAPK-Signalwege blockieren, ein Effekt, der auf die Translokation von YopP (*Y. enterocolitica*), bzw. YopJ (*Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) durch das Typ III-Proteinsekretionssystem zurückzuführen ist (Boland and Cornelis, 1998; Ruckdeschel *et al.*, 1998). YopP/J verhindert die Phosphorylierung und Degradation der I κ B's und damit die nukleäre Translokation von NF- κ B. Zudem blockiert YopJ/P die Aktivierung der MAPK durch oberhalb gelegene Aktivatoren. Die Inhibition dieser Signalwege führt zur Unterdrückung der Zytokinproduktion. Im Hefe-2-Hybrid-System konnten mehrere zelluläre YopP/J Interaktionspartner identifiziert werden, deren Inaktivierung die durch YopP verursachten Effekte erklären könnte. So bindet und inhibiert YopP/J Moleküle der MAPK-Familie (MKK1-5). Da die MKK's die direkt über den MAPK geschalteten Aktivatoren darstellen, führt die Inhibition dieser Moleküle vermutlich zur Suppression der ERK, JNK und p38-Aktivitäten (Orth *et al.*, 1999; Ruckdeschel *et al.*, 2001). Die Inhibition des NF- κ B-Signalweges durch YopP/J ist wahrscheinlich auf die Bindung und Hemmung von IKK β zurückzuführen, das innerhalb der Aktivierungsdomäne Homologien zu den MKK's aufweist. IKK β stellt eine katalytische Untereinheit des IKK-Signalsoms dar und ist hauptverantwortlich für die I κ B-Phosphorylierung und NF- κ B-Aktivierung in Monozyten und Makrophagen nach LPS-Stimulation (O'Connell *et al.*, 1998). Eine neuere Studie von Orth *et al.*, (2000) postuliert eine mögliche Cystein-Protease-Aktivität von YopP/J, das das ubiquitinähnliche Molekül SUMO-1 von zellulären Proteinen abspalten soll. Die Zielmoleküle dieser möglichen De-SUMOylierung und ein Zusammenhang mit der Inhibition der MAPK- und IKK β -Inaktivierung sind noch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass YopP/J IKK β und die MKK als Vehikel benutzt, um an seine eigentlichen Zielmoleküle zu gelangen. Dort könnte YopP/J durch die Abspaltung

von SUMO-1 essentielle posttranslationale Prozesse modifizieren, die für eine effiziente Signaltransduktion notwendig sind.

1.5. Apoptoseinduktion durch Yersinien

1.5.1. Apoptose

Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein hochkonservierter, physiologischer aktiver Zelltodmechanismus, der dazu beiträgt, unerwünschte Zellen im Organismus ohne Entzündungsreaktionen und Schädigung umliegender Zellen zu beseitigen. Apoptose dient der Erhaltung des Gleichgewichtes zwischen Proliferation und Apoptose und ist essentiell für Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von Geweben und Organismen. Fast jede Zelle eines vielzelligen Organismus kann durch Apoptose sterben. Sie kann durch unterschiedliche Signale ausgelöst werden und ist nach Zelltyp, Differenzierungszustand der Zelle, sowie zellulärer Umgebung differenzierbar. Apoptose ist durch morphologische Kriterien gekennzeichnet und kann so deutlich von der Nekrose unterschieden werden, z.B. Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung, Ausstülpungen der Plasmamembran („membrane blebbing“), Umbau des Zytoskeletts und Zellschrumpfung. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Molekülen identifiziert, die an der Regulation des programmierten Zelltods beteiligt sind. Die zentralen Effektorproteine stellen hochkonservierte Cysteinproteasen, die sogenannten Caspasen, dar. Von den 14 bekannten humanen Caspasen spalten Caspase-1 und -11 Vorläufermoleküle, aus denen dann reife Zytokine (z.B. pro-inflammatorisches IL-1 β) hervorgehen. Die Caspasen 8, -9, und -10 (Initiator-Kaspasen) vermitteln die Weiterleitung initialer Apoptosesignale zu unterhalb geschalteten proapoptotischen Molekülen. Caspase-3, -6 und -7 fungieren als Effektorcaspasen, indem sie eine Reihe von spezifischen Substraten spalten, u.a. anti-apoptotische Proteine der IAP-, TRAF- und Bcl-2-Familien (Ashkenazi and Dixit, 1998; Rathmell and Thompson, 1999; Sakahira *et al.*, 1998). Die Caspasen-Aktivierung kann sowohl durch externe Stimuli über Zelloberflächenrezeptoren (Todesrezeptoren, z.B. TNF-Rezeptor, Fas), als auch durch einen mitochondrialen Signalweg durch Freisetzung von Cytochrom-c ausgelöst werden. Dieser Prozess wird durch die Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. In der Exekutionsphase der Apoptose wird der morphologische und biochemische Zelltod durch Effektorcaspasen vermittelt (Kaufmann and Hengartner, 2001; Zimmermann *et al.*, 2001).

1.5.2. Apoptose bei der bakteriellen Infektion

Eine Vielzahl pathogener Mikroorganismen entwickelten Mechanismen, die Signalwege der Wirtszelle entscheidend zu modulieren, um so den Infektionsprozess zu beeinflussen. Shigellen und Salmonellen beispielsweise sind in der Lage, Komponenten apoptotischer Signalwege direkt zu aktivieren. Sie sezernieren über ihr Typ III-Proteinsekretionssystem Virulenzfaktoren (IpaB bzw. SipB) in das Wirtszellzytoplasma, die direkt an pro-apoptotisches ICE1 (IL-1 β converting enzyme oder Caspase-1) binden, sowie dieses aktivieren, was anschließend Apoptose von Makrophagen herbeiführt (Gao and Kwaik, 2000). Pathogene Mykobakterien begünstigen die Sekretion von löslichem TNFR2 (TNF-Rezeptor 2) bei Makrophagen, die die pro-apoptotische Wirkung von TNF- α neutralisiert und dadurch Zelltod der Wirtszell verhindert (Kornfeld *et al.*, 1999). Bei Infektion mit apathogenen Mykobakterien wird die Expression des anti-apoptotischen Protein Bcl-2 herunterreguliert. Dies fördert die Apoptose und führt zur Eliminierung der Bakterien. Pathogene Mycobakterien können diesem Prozess entgegenwirken (Klinger *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 1999). Auch andere intrazelluläre Bakterien versuchen Apoptose ihrer Wirtszelle zu verhindern. Chlamydien beispielsweise sezernieren Proteine, die die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom-c blockieren und somit Caspase-3-Aktivierung hemmen (Fan *et al.*, 1998). Die Insertion bakterieller Exotoxine, sezerniert von extrazellulären Keimen in die Wirtszellmembran, führt hingegen häufig zur Apoptose. Das α -Toxin von *S. aureus* oder PorB von *N. gonorrhoeae* verursachen eine Porenbildung in der eukaryontischen Zellmembran. Das führt zu einem Verlust von monovalenten Ionen und zur DNA-Fragmentierung (Bantel *et al.*, 2001). Die A-Untereinheit des Diphtherietoxins von Clostridien ADP-ribosyliert nach Translokation durch die Zytoplasmamembran den Elongationsfaktor 2. Dies inhibiert die Proteinsynthese der Wirtszelle und kann Apoptose auslösen.

1.5.3. Yersinien induzierte Apoptose

Die Modulation der zellulären Signalwege durch YopP verursacht neben der Inhibition der Zytokinproduktion einen weiteren tiefgreifenden Effekt bei Makrophagen. Innerhalb von 5-20 h nach Infektionsbeginn weisen *Yersinia*-infizierte Makrophagen deutliche Ausstülpungen der Plasmamembran, eine Chromatin-Kondensierung und DNA-Fragmentierung auf, und sterben

schließlich durch Apoptose. Im Mausinfektionsmodell begünstigt die Apoptose von Makrophagen die Wanderung der Bakterien in tiefergelegenes lymphatisches Gewebe, sowie Leber und Milz, und eine systematische Ausbreitung der Bakterien (Monack *et al.*, 1997). Die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch Yersinien ist offenbar auch für die Apoptoseinduktion verantwortlich (Ruckdeschel *et al.*, 1998; Ruckdeschel *et al.*, 2001). NF- κ B spielt nicht nur eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Immunantwort, sondern vermittelt auch zelluläres Überleben in verschiedenen Stresssituationen. So induziert NF- κ B-Aktivierung die Synthese von anti-apoptotischen Proteinen der IAP-, TRAF- und Bcl-2-Familie, was die Induktion des Apoptoseprogramms durch verschiedene extrazelluläre, pro-apoptotische Signale verhindert und so das Überleben der Zelle ermöglicht (Perkins, 2000). Die Überexpression der transkriptionell aktiven RelA-Untereinheit von NF- κ B hat einen schützenden Einfluss auf die Yersinien-induzierte Apoptose (Ruckdeschel *et al.*, 2001). Dies zeigt, dass die Hemmung des NF- κ B-Signalweges durch YopP/J einen essentiellen Bestandteil des Mechanismus der Apoptosevermittlung durch Yersinien darstellt. Darüberhinaus sind auch pro-apoptotische Signale an der Apoptoseinduktion beteiligt. Sie werden ebenfalls bei bakterieller Infektion von Makrophagen aktiviert. So verstärken LPS-abhängige Signalprozesse die Auslösung von Apoptose bei mit YopP transfizierten Makrophagen. In der Tat sind TLR4-defiziente Makrophagen partiell gegen Apoptoseinduktion durch Yersinien geschützt. Yersinien nutzen also die Reaktivität von Makrophagen auf LPS aus, um bei Anwesenheit von YopP/J Zelltod zu induzieren. Die TLR4-abhängigen pro-apoptotischen Signale werden über TLR-Adapterproteine weitergeleitet und initiieren vermutlich über FADD (Fas-associated death domain protein)/ und Caspase-8 das Apoptoseprogramm. Caspase-8 prozessiert und aktiviert das pro-apoptotische Bcl-2-Signalmolekül Bid. Möglicherweise trägt auch eine direkte Aktivierung des Caspase-8/Bid-Signalwegs durch YopP/J zur Apoptoseinduktion durch Yersinien bei (Denecker *et al.*, 2001).

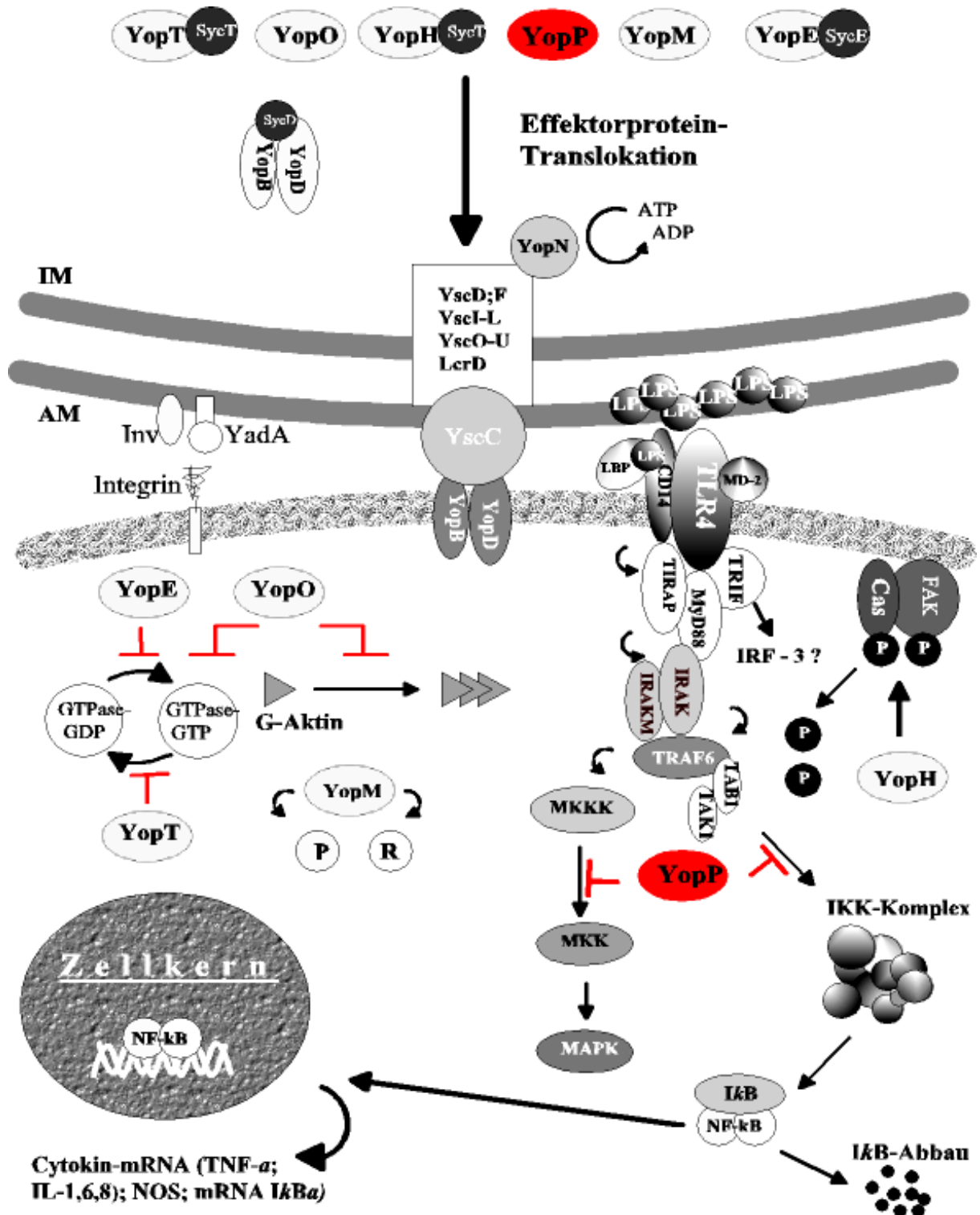


Abb. 1: Übersicht über die durch Yersinien induzierte TLR4-Signalkaskade und die Modulation zellulärer Signaltransduktionsprozesse durch die *Yersinia*-Yop-Effektoren (IM=Innenmembran, AM=Außenmembran)

1.6. Zielsetzung der Arbeit

YopP (*Y. enterocolitica*) bzw. YopJ (*Y. pseudotuberculosis*; *Y. pestis*) sind 32,5 kDa große Yersinien-Effektorprotein, das die Signalwege der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) und des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Wirtszelle inhibiert. Dies blockiert die Zytokinproduktion der Wirtszelle und induziert Apoptose in Makrophagen. In Vorarbeiten wurde festgestellt, dass sich einzelne *Y. enterocolitica* Serotypen in ihrer Fähigkeit unterscheiden, Apoptose auszulösen. Ziel dieser Arbeit war, die molekularen Grundlagen der unterschiedlichen Apoptoseinduktion durch *Y. enterocolitica* Serogruppen zu ermitteln. Darüberhinaus sollte mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems nach spezifischen zellulären Interaktionspartnern des YopP-Proteins gefahndet werden. Diese Untersuchungen sollten zu einem besseren Verständnis der Wirkungsweise von YopP und der Modulation intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse durch das bakterielle Virulenzprotein beitragen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Enzyme, Kits

Tab. 2: verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	Firma
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid), Phenol/Chloroform, β -Mercaptoethanol, X-Gal	AppliChem
Bacto-Agar, Hefeextrakt, Yeast Nitrogen Base	BD/Difco
Ammoniumpersulfat, BSA (Rinderserumalbumin für Protein-Analyse), Coomassie Brilliant Blue R250, EDTA, LB, SDS, TEMED	BIOMOL
Elektroporationsküvetten, Protein-Assay (Bradford)	Bio-Rad
30 % Acryl-/Bisacrylamid (Protogel 30:0,8)	Biozym
Einwegküvetten, Pipettierspitzen	Brand
DTT (1,4-Dithiothreitol), Natriumchlorid	Diagonal
Röhrchen 50ml	Falkon
DNA- λ -HindIII-Längenstandard	Fermentas
Magnesiumchlorid	Fluka
RPMI-, DMEM- Medium, Herings sperma-DNA	Gibco
Quarzküvette	Hellma (10mm)
NP-40 (Ethylphenylpolyethylenglycol), Tris Base	ICN
Sterilfilter	Josef Peske oHG
Entwickler, Fixierer, Röntgen-Filme	Kodak
Calciumchlorid, Dimethylformamid, DMSO, Glycerin, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Natriumacetat, Rubidiumchlorid	Merck
Oligonukleotide	Metabion
Centricon, Dialysemembranen, PVDF-Membran	Millipore
Zellkulturflaschen, Zellkulturschaber	Nunc
dNTP, SDS-PAGE Protein-Standard (prestain)	PeQlab
BSA (Rinderserumalbumin für DNA-Analyse)	Promega
Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Essigsäure, Ethanol, Glasperlen, Methanol	Roth
ProteinA-Agarosebeads	Santa Cruz
Eppendorfreaktionsgefäße	Schubert/Weiss
Agarose, Aminosäuren, Antibiotika, Bromphenolblau, Ethidiumbromid, Galaktose, Glucose, MOPS, Raffinose	Sigma
3MM Filterpapier	Whatman

Tab. 3: verwendete Geräte und Apparaturen

Geräte und Apparaturen	Firma
Mikrowellengerät	AEG
Inkubationsschüttler	B. Braun Biotech International, <i>Certomat</i>
Ultrazentrifuge	Beckmann, <i>Optima T2 Ultracentrifuge</i>
Agarose-Elektrophoresekammern	Biometra, <i>Agagel</i>
Gene-Pulser, Elektroporationsgerät, Spannungsquelle	Bio-Rad, <i>Gen Pulser II/ Power Pac 200</i>
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, <i>Axiovert 25</i>
Pipetten, Tischzentrifuge, Tischzentrifuge/Kühlzentrifuge	Eppendorf/ <i>5417 C/ 5417 R</i>
Entwicklungsgerät	Fuji, <i>FPM-100A</i>
Wasserbad	GFL Typ 1013
Brutschrank für <i>E. coli</i> -, <i>Yersinien</i> -, Hefe- und Zell-Kulturen	Heraeus, <i>BBD 6220</i>
Gel-Dokumentationsgerät, UV-Transilluminator	Herolab, <i>E.A.S.Y., UVT-20M/W</i>
SDS-PAGE Gelplatten, Spacer, Kämme, Blotsystem	Hoefer, <i>Mighty Small</i>
Waage	Kern <i>510</i> , Sartorius
Kühlschrank	Liebherr, <i>profi line</i>
Heizblock	Liebisch
pH-Meter	Mettler Toledo, <i>InLab 419</i>
Sequenziermaschine	PE Applied Biosystem, <i>ABI 377 DNA Sequenzer</i>
Thermocycler	Perkin Elmer, <i>Gene Amp PCR System 2400</i>
DNA-Meßgerät/Photometer	Pharmacia Biotech, <i>Ultraspec 3000</i>
Filmkassette	Rego
Vortexer	Scientific
French-Press	SLM Aminco
Sterilbank	Sonnenbühl, <i>BDK</i>

Tab. 4: verwendete Enzyme und Kits

Enzyme	Firma
Taq- Pfu-DNA-Polymerase	NEB
Alkalische Phosphatase, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase	Gibco
Kits	
ECL, GST-Reinigungskit	Amersham
PCR-Purification Kit	peQlab
Gel Extraktion Kit, Plasmid Kit	QIAGEN
QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

2.2. Bakterien- und Hefe-Stämme, Zellkulturzellen und Vektoren

Tab. 5: verwendete *E. coli*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp/Charakteristika	Referenzen
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44, Δlac U169 (80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> KC8	<i>pyrF, leuB600, trpC, hisB463</i>	Clontech; Hanahan, 1983

Tab. 6: verwendete Yersinien-Stämme

Yersinienstamm	Genotyp/Charakteristika	Referenzen
WA-314	Wildtyp WA-314 Serotyp O8, besitzt Virulenzplasmid pYVO8	Heesemann and Laufs, 1983
WA- Δ pYV	plasmidloser Stamm von WA-314	Heesemann and Laufs, 1983
WA- Δ yopP	Inaktivierung von <i>yopP</i> durch Insertion einer Antibiotika-Kassette	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 2001
WA- Δ yopP/+yopPO8	WA- Δ yopP wurde komplementiert mit <i>yopPO8</i>	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 2001
WA- Δ yopP/+yopPO9	WA- Δ yopP wurde komplementiert mit <i>yopPO9</i>	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 2001
WA- Δ Σ yop	Yersinien-Stamm mit pLCR-Plasmid, welches für den Sekretions/Translokationsapparat des WA-314 kodiert, nicht aber für Yop-Effektor-Gene	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 2001
WA- Δ Σ yopP/+yopPO8	WA- Δ Σ yop wurde komplementiert mit <i>yopPO8</i>	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 2001
WA- Δ Σ yopP/+yopPO9	WA- Δ Σ yop wurde komplementiert mit <i>yopPO9</i>	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 2001
E40	Wildtyp der Serogruppe O9, besitzt Virulenzplasmid pYVO9	Mills <i>et al.</i> , 1997
E40- Δ yopP	<i>yopP</i> -Mutante des Stammes E40, Inaktivierung von <i>yopP</i> durch Deletion	Mills <i>et al.</i> , 1997
E40- Δ yopP/+yopPO8	E40- Δ yopP wurde komplementiert mit <i>yopPO8</i>	diese Arbeit
E40- Δ yopP/+yopPO9	E40- Δ yopP wurde komplementiert mit <i>yopPO9</i>	diese Arbeit
E40- Δ yopP/+yopPO8 (44-214yopPO9)	E40- Δ yopP wurde komplementiert durch <i>yopPO8</i> mit internem <i>Bam</i> HI-Fragment von <i>yopPO9</i>	diese Arbeit
E40- Δ yopP/+yopPO9 (44-214yopPO8)	E40- Δ yopP wurde komplementiert durch <i>yopPO9</i> mit internem <i>Bam</i> HI-Fragment von <i>yopPO8</i>	diese Arbeit
E40- Δ yopP/+yopPO8 (R143S)	E40- Δ yopP wurde komplementiert durch <i>yopPO8</i> mit internem Austausch der AS 143 Arg nach Ser	diese Arbeit
E40- Δ yopP/+yopPO9 (S143R)	E40- Δ yopP wurde komplementiert durch <i>yopPO9</i> mit internem Austausch der AS 143 Ser nach Arg	diese Arbeit

Tab. 7: verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Hefestamm	Genotyp/Charakteristika	Referenzen
EGY48	MATα , <i>trp1 his3 ura3 leu2::6 LexAop(x6)-LEU2</i> (high sensitiv)	Estojak <i>et al.</i> , 1995
RFY206	MATa , <i>trp1Δ::hisG his3Δ200 ura3-52 lys2Δ201 leu2-3</i>	Invitrogen, Groningen

Tab. 8: verwendete Zelllinien

Zellkulturlinien	Charakteristika
J774	Maus-Makrophagen
HEK 293-Zellen	“human embryonic kidney cells”, menschliche embryonale Nierenepithelzellen

Tab. 9: verwendete Ausgangsvektoren

Vektoren	Größe	Genotyp/Charakteristika	Referenzen
pCJYE138-G3	4,7 kbp	low copy, Cm ^R , Tet ^R	Jacobi <i>et al.</i> , 1998
pCDNA3.1. (-)	5,4 kbp	CMV-Promotor, Amp ^R	Invitrogen, Groningen
pCIneo	5,5 kbp	CMV-Promotor, Amp ^R	Promega, Mannheim
pCMV-Tag 2B	4,3 kbp	Neo/Kan ^R , CMV-Promotor, FLAG-Tag, fl	Stratagene, LaJolla, CA, USA
pCMV-Tag 3B	4,3 kbp	Neo-/Kan ^R , CMV-Promotor, c-myc-tag, fl	Stratagene, LaJolla, CA, USA
pEG202	10,2 kbp	<i>HIS3</i> , 2 μ m, Amp ^R , LexA ₍₁₋₂₀₂₎ , DNA-BD, GenBank Accession U89960	Gyuris <i>et al.</i> , 1993; Estojak <i>et al.</i> , 1995
pET-21	5,3 kbp	His-Tag, T7 <i>lac</i> , Amp ^R	Novagen, Wi
pGEX4T-3	4,9 kbp	prokaryontischer Expressions-Vektor, <i>tac</i> -Promotor, Gluthadion S-transferase, Amp ^R	Pharmacia
pJG4-5	6,45 kbp	<i>TRP1</i> , 2 μ m, Amp ^R , HA epitope tag, DNA-AD, GenBank Accession U89961	Gyuris <i>et al.</i> , 1993; Estojak <i>et al.</i> , 1995
pJK101	10,3 kbp	<i>URA3</i> , 2 μ m, Amp ^R , <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>lexA_{op(x8)}</i>	Estojak <i>et al.</i> , 1995
pWSK	5,4 kbp	low copy, Amp ^R	Wang and Kushner, 1991

In der folgenden Tabelle werden Plasmide aufgezählt, die Derivate der Ausgangsvektoren pCJVE138-G3, pJG4-5, pEG202, pCMV2B, pCDNA3.1(-) sowie pGEX4T-3 darstellen und im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind.

Tab. 10: Derivate der Ausgangsplasmide

Plasmid	Größe	Größe des Inserts/ verwendete Restriktionsschnittstellen
pCJYE138-G3yopPO8	5,6 kbp	867 bp, yopPO8, BgIII/XhoI-Fragment
pCJYE138-G3yopPO9	5,6 kbp	yopPO9, BgIII/XhoI-Fragment
pCJYE138-G3yopPO8(44-214yopPO9)	5,6 kbp	yopPO8 mit internem BamHI-Fragment von yopPO9
pCJYE138-G3yopPO9(44-214yopPO8)	5,6 kbp	yopPO9 mit internem BamHI-Fragment von yopPO8
pCJYE138-G3yopPO8 (R143S)	5,6 kbp	yopPO8 mit internem Austausch der AS 143 Arg nach Ser
pCJYE138-G3 yopPO9 (S143R)	5,6 kbp	yopPO9 mit internem Austausch der AS 143 Ser nach Arg
pJG4-5 yopPO8	7,3 kbp	867 bp, EcoRI/XhoI-Schnittstelle
pJG4-5 yopPO8 (R143S)	7,3 kbp	yopPO8 wurde durch Austausch der AS 143 Arg nach Ser modifiziert
pJG4-5 yopPO9	7,3 kbp	867 bp, EcoRI/XhoI-Schnittstelle
pJG4-5 yopPO9 (S143R)	7,3 kbp	yopPO9 wurde durch Austausch der AS 143 Ser nach Arg modifiziert
pJG4-5 IKK β Maus	8,7 kbp	2,274 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment
pJG4-5 IKK α	8,7 kbp	2,271 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment
pJG4-5 IKK β Maus Δ 10 AS	8,6 kbp	2,244 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment, Deletion der ersten N-terminalen 10 AS
pJG4-5 IKK β Maus Δ 20 AS	8,6 kbp	2,214 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment, Deletion der ersten N-terminalen 20 AS
pJG4-5 IKK β Maus Δ 40 AS	8,5 kbp	2,154 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment, Deletion der ersten N-terminalen 40 AS
pJG4-5 IKK β Maus Δ 100 AS	8,3 kbp	1,974 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment, Deletion der ersten N-terminalen 100 AS
pJG4-5 IKK β Maus Δ 190 AS	8,0 kbp	1,674 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment, Deletion der ersten N-terminalen 190 AS
pJG4-5 IKK β Maus 101	8,7 kbp	2,274 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment, Mutation der AS 101 Q-S
pJG4-5 IKK β Maus 120	8,7 kbp	2,274 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment, Mutation der AS 120 A-Q
pJG4-5 IKK β Maus 152	8,7 kbp	2,274 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment, Mutation der AS 152 KR-GK
pJG4-5 IKK β Maus 166	8,7 kbp	2,274 kbp, EcoRI/XhoI-Fragment, Mutation der AS 166 EL-DV
pJG4-5 MAPKK3 Human	7,4 kbp	957 bp, EcoRI/XhoI-Fragment
pEG202 IKK β Maus	12,4 kbp	2,274 kbp, EcoRI/SalI/XhoI-Fragment
pEG202 yopPO8	11 kbp	867 bp, EcoRI/SalI-Fragment
pCMV2B -Flag IKK β Maus	12,4 kbp	2,274 kbp, EcoRI/SalI/XhoI-Fragment
pCMV2B -Flag IKK β Maus120	12,4 kbp	2,274 kbp, EcoRI/SalI/XhoI-Fragment
pCMV2B-Flag yopPO8(R143S)	11 kbp	867 bp, EcoRI/SalI-Fragment
pCIneo-Flag-Fwd2	6,8 kbp	1,3 kbp (Kei-ichi Nakayama; Kyushu University, 3-1-1, Maidashi)

pCDNA3.1(-)-HA- <i>eEf1Bβ</i>	6,1 kbp	717 bp, <i>NheI/XhoI</i> -Fragment
pCDNA3.1(-)-HA- <i>Smad1</i>	6,6 kbp	1,2 kbp, <i>NheI/XhoI</i> -Fragment
pCDNA3.1(-)-HA- <i>Pp2Ac</i>	5,9 kbp	539 kbp, <i>NheI/XhoI</i> -Fragment
pGEX4T-3 <i>yopPO8</i>	5,7 kbp	867 bp, <i>BglIII/EcoRI</i> -Schnittstelle

Das Plasmid pCIneo-Flag-*Fwd2* wurde freundlicherweise von Kei-ichi Nakayama, Department of Molecular and Cellular Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi zur Verfügung gestellt.

2.3. Anzucht von Bakterien und Hefen

2.3.1. *Escherichia coli*- und Yersinien-Kulturen

LB Medium (11)
(Sambrook *et al.*, 1989)

10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl (pH 7,5, autoklaviert)

LB-Agar

LB Medium + 1,5 % Agar

Die Bakterienstämme wurden im Schüttelinkubator unter Zugabe von entsprechenden Antibiotika angezüchtet. *E. coli*-Stämme wurden bei 37° C, Yersinien bei 27° C inkubiert.

Für die Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. 0,4 ml 99 % Glycerin wurden mit 0,8 ml Bakterienkultur vermischt und bei -72 °C eingefroren.

Tab. 11: verwendete Antibiotika (bei -20° C lagern)

Antibiotika	Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin	10 mg/ml	Wasser	100 µg/ml
Carbenicillin	50 mg/ml	50 % Ethanol	250 µg/ml
Chloramphenicol	2 mg/ml	70 % Ethanol	20 µg/ml
Gentamycin	10 mg/ml	Wasser	100 µg/ml
Kanamycin	5 mg/ml	Wasser	50 µg/ml
Spectinomycin	5 mg/ml	Wasser	50 µg/ml
Tetracyclin	2 mg/ml	70 % Ethanol	20 µg/ml

2.3.2. *Saccharomyces cerevisiae*-Kulturen

YPD Medium (1 l) Vollmedium	20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 20 g Glucose (autoklaviert)
YPD-Agar	YPD Medium mit 2 % Agar und 1 NaOH-Plättchen versetzt, nach dem Gießen der Platten wurden diese 3 Tage bei RT oder 3 h bei 30 °C getrocknet
YNB Medium (1 l)	1,7 g YNB, 0,6 g his-ura-trp-leu (dropout mix), 5 g Ammoniumsulfat (autoklaviert)
YNB Agar	YNB flüssig mit 2 % Agar versetzt, nach dem Gießen der Platten wurden diese 3 Tage bei RT oder 3 h bei 30°C getrocknet
Tryptophan, Urazil, Histidin Leucin	4 mg/ml (Endkonz. 0,04 mg/ml) 4 mg/ml (Endkonz. 0,06 mg/ml) Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.
X-Gal	100 mg/ml (Endkonz. 0,08 mg/ml)
Phosphatlösung (100 ml)	7 g Natriumphosphat (dibasic), 3 g Natriumphosphat (monobasic), autoklaviert und 900 ml YNB-Agar hinzugefügt

Tab. 12: Zusammensetzung von *S. cerevisiae*-Selektionsmedien (1l)

Selektionsmedium/ Reagenzien	YNB/+Leu	YNB/+Leu+His oder Trp	YNB/Gal+Raf	YNB+Gal+Raf+X-Gal
YNB	905 ml	885 ml	720 ml	720 ml
25 % Glucose	80 ml	80 ml		
25 % Galaktose			80 ml	80 ml
10 % Raffinose			100 ml	100 ml
100× AS	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
10× Phosphatlösung			100 ml	100 ml
Leucin	15 ml	15 ml		
Histidin		10 ml		
Tryptophan		10 ml		
X-Gal (100 mg/ml)				800 µl

Mit Hilfe eines sterilen Glasstabes wurden die Hefen von einer Flüssigkultur bzw. einer älteren Stamm-Platte auf eine neue Stamm-Platte überimpft, 3 Tage bei 27 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

Für Flüssigkulturen wurden die Hefen mit einem sterilen Glassstab in Flüssigkultur-Medium überführt und bei 30 °C geschüttelt. Die jeweilige Auxotrophie wurde durch die Zugabe der entsprechenden Aminosäuren komplementiert.

Für die Langzeitaufbewahrung von Hefestämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. 1 ml 50 %-iges Glycerin wurde mit 1 ml Hefekultur vermischt und bei -72 °C/-192 °C eingefroren. Die Zugabe von Glycerin verhindert die Bildung von Kristallen, die eine Zellzerstörung induzieren könnte.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Isolierung von DNA

2.4.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus kleinen Volumina

Die Isolierung erfolgte nach 2 verschiedenen Protokollen.

Protokoll 1: (nach QIAGEN, Hilden, Deutschland)

1,5 ml einer *E. coli*- Übernachtskultur wurden 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Zugabe von 0,25 ml kalter Lösung P1 zum Bakterienpellet wurde die Suspension 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 0,25 ml Lösung P2 hinzugegeben, durch vorsichtiges Schütteln gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,35 ml kalter Lösung P3 inkubierte der Ansatz abermals 5 min auf Eis, bevor dieser 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und anschließend der Überstand in eine DNA-Reinigungs-Säule überführt wurde. Die Säule wurde 1 min bei 8000 rpm und RT zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die Säulenmembran mit 500 µl PB-Puffer gewaschen. Nach Verwerfen des Durchlaufs wurde die Säulenmembran noch einmal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Die Membran wurde dann durch nochmaliges Zentrifugieren getrocknet. Um die gebundene DNA aus der Membran zu eluieren, wurde diese mit 30 µl Wasser benetzt und die Säule 1 min bei RT inkubiert. Um anschließend die DNA herauszulösen wurde die DNA-Reinigungs-Säule bei 14 000 rpm, 1 min und RT zentrifugiert. Die Eluation der DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

Protokoll 2: (Birnboim and Doly, 1979)

Lösung 1	50 mM Glucose, 10 mM EDTA, pH 8, 25 mM Tris-HCl (pH 8) (autoklavieren)
Lösung 2	200 mM NaOH, 1 % SDS
Lösung 3	3 M KAc (pH 4,8)

1,5 ml einer *E. coli*- Übernachtskultur wurden 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Hinzufügen von 0,1 ml kalter Lösung 1 zum Bakterienpellet und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,2 ml Lösung 2 hinzugegeben, durch vorsichtiges Schütteln gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,15 ml kalter Lösung 3 wurde der Ansatz abermals 5 min auf Eis inkubiert, bevor er 5 min bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das Ausfällen der DNA aus der wässrigen Phase erfolgte durch Hinzufügen eines gleichen Volumens Isopropanol. Der Ansatz wurde 2 min bei RT inkubiert, danach 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das getrocknete Nukleinsäurepellet wurde in 20 µl Wasser aufgenommen und die DNA mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.4.1.2. Isolierung von DNA aus großen Volumina (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)

Zur Isolierung von DNA wurde ein kommerziell erhältlicher Aufreinigungs-Kit (NuceoBond PC 100 Kit) eingesetzt und die Isolierung der DNA anhand der Anleitung durchgeführt.

2.4.2. Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen (nach QIAGEN, Hilden, Deutschland)

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde ein kommerziell erhältlicher Aufreinigungs-Kit (QIAquick Gel Extraction Kit 250) eingesetzt. Die gewünschte DNA-Bande wurde nach Auftrennung im Agarose-Gel und Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV- Bestrahlung so knapp wie möglich aus dem Gel herausgeschnitten und in ein

Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Durch Hinzufügen von 300 µl QG-Puffer pro 100 mg Gel löste sich die DNA aus dem Gel. Der Ansatz inkubierte unter Schütteln 10 min bei 50 °C. Anschließend wurden 100 µl Isopropanol pro 100 mg Gel hinzugefügt, die Lösung in eine Säule überführt und bei 8000 rpm 1 min zentrifugiert. Dann wurden 500 µl QG-Puffer auf die Säule pipettiert und diese wiederum bei 8000 rpm 1 min zentrifugiert. Die Säulenmembran wurde mit 750 µl PE-Puffer durch eine 1-minütige Zentrifugation gewaschen und anschließend trocken zentrifugiert. Abschließend wurde die DNA mit 30 µl reinem Wasser aus der Säulenmembran eluiert. Die Überprüfung der gewonnenen DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

2.4.3. Molekulargenetische Methoden

2.4.3.1. Restriktionsverdau von DNA

Enzyme und Puffer wurden von der Firma Gibco bezogen. Ein Reaktionsverdau mit einem Endvolumen von 50 µl setzte sich wie folgt zusammen:

x µl	DNA-Lösung
5 µl	10× Restriktionspuffer
1 µl	Restriktionsenzym (10U/µl)
x µl	steriles Wasser

Die Ansätze inkubierten 1-4 Stunden bei der durch den Restriktionsenzym-Hersteller empfohlenen Reaktionstemperatur.

2.4.3.2. DNA-Phosphatase-Behandlung

Um die Re-Ligation eines nur mit einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen der Vektor-DNA mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIAP calf intestinal alkaline phosphatase) entfernt.

Der 50 µl Vektor-Restriktions-Verdau wurde nach Behandlung mit den Restriktionsenzymen mit 5 µl CIAP-Puffer sowie 10 U CIAP versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Deaktivierung

des Enzymes erfolgte 30 min bei 70 °C. Danach wurde der Restriktionsverdau auf einem Gel aufgetrennt und nach 2.4.2. aufgereinigt.

2.4.3.3. Agarosegelelektrophorese

TAE (50-fach, 1 l)	242 g Tris-Base, 18,6 g Na ₂ EDTA, 57,1 ml Eisessig
Auftragspuffer (6-fach)	0,25 % Bromphenolblau, 0,1 M EDTA, 30 % Glycerin

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch ein Agarosegel in 1-fach TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente. Vor dem Laden der DNA-Proben wurden diese mit Auftragspuffer in 1/6 des Auftragsvolumens versetzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 90-120V und einer Laufzeit von 1-2 h. Als Größenstandard diente *Hind*III-geschnittene λ-DNA. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel 10-20 min in einem Ethidiumbromid-bad (1 µg/ml) inkubiert. Durch Beleuchtung mit UV-Licht (320 nm) wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mittels Videoaufnahme.

2.4.3.4. Ligation

T4-DNA-Ligase und Puffer wurden von Gibco bezogen. Das Ligationvolumen betrug 10 µl. Zur Vektor-DNA und Insert-DNA, im Verhältnis 1:4 eingesetzt, wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

2 µl	5× Ligationpuffer
1 µl	T4-DNA-Ligase (2,5U/µl)
x µl	steriles Wasser

Die Ligation erfolgte ÜN bei 16°C.

2.4.3.5. Standard-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann bei Wahl geeigneter Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Abschnitten verwendet werden. Dazu wird eine doppelsträngige DNA-

Vorlage mit zwei, das Amplifikat begrenzenden Oligonukleotiden und aufeinanderfolgenden Zyklen von Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Polymerisierung in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und hitzeresistenter Taq-DNA-Polymerase ausgesetzt. Die Oligonukleotide können unter Umständen an ihren 5`-Enden zusätzliche Sequenzen besitzen, wie z.B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen oder Translokationssequenzen (Saiki *et al.*, 1985; Mullis and Faloona, 1987). Die Taq-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma Fermentas (Vilnius, Lit.) bezogen. Die Hybridisierungstemperatur der verwendeten Primer kann nach der Formel berechnet werden. $T_m = (C+G) \times 4 + (A+T) \times 2$

Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<u>Reaktionsansatz:</u>	100 ng 50 pmol 50 pmol 5 µl 2 µl 200 µM 0,5 U-1,5 U x µl	DNA Primer A (Vorwärts-Primer) Primer B (Rückwärts-Primer) 10× Puffer 100 mM MgCl ₂ dNTP Taq-/Pfu-Polymerase steriles Wasser, bis zu einem Endvolumen von 50 µl aufgefüllt
--------------------------------	---	---

<u>Reaktionsbedingungen</u>	<u>Denaturieren:</u> 2 min 94°C Denaturieren: 30 sec 94°C Hybridisieren: 1.30 min 50°C-68°C <u>Amplifikation:</u> 45 sec- 5 min 72°C Amplifikation: 1-5 min 72°C
Zyklenzahl: 25-36	

2.4.3.6. PCR-Fusions-Technik

Um Gene mit Hilfe der PCR zu fusionieren wurde eine spezifische und universell anwendbare Methode beschrieben, die PCR-Fusions-Technik. Diese Methode macht es möglich, DNA-Moleküle an definierten Stellen miteinander zu verknüpfen, ohne die DNA mit Restriktionsenzymen oder DNA-Ligase behandeln zu müssen. Die zu fusionierenden Genfragmente werden zunächst in getrennten Reaktionsschritten amplifiziert, wobei die Konstruktion der Primer die anschließende Fusion der beiden Gene bestimmt. Die Primer werden so ausgewählt, dass die Enden der getrennt amplifizierten DNA komplementäre Sequenzen enthalten. Bei der Primerauswahl muss zusätzlich bedacht werden, dass die verwendete Taq-DNA-Polymerase an beide 3`-Enden der PCR-Produkte Adeninbasen synthetisiert. Nach Mischung der getrennt amplifizierten DNA-Fragmente überlappen diese im komplementären

Bereich, dienen also als Primer, und werden durch die DNA-Polymerase verlängert. Die Reaktionsbedingungen entsprechen denen der Standard-PCR (Horton *et al.*, 1989; Yon and Fried, 1989).

2.4.3.7. Verwendete Primer für PCR und Sequenzierung

Tab. 13: verwendete Primer; Restriktionsschnittstellen verstärkt hervorgehoben und unterstrichen, eingefügte Mutationen verstärkt hervorgehoben, Primer ohne deutliche Markierung wurden für Sequenzierungen verwendet

Primer	Sequenz
Primer für <i>IKKβ</i>Maus	
IKKB ^{EcoRI} F	5'-TCT CCC <u>GAA TTC</u> ATG AGC TGG TCA CCG TCC-3'
IKKB ^{Maus60F}	5'-GTT ACA <u>GAA TTC</u> CTG GGG ACC GGG GGA TTT-3'
IKKB101F	5'-GCC ATG GAG TAC TGC TCT GGA GGA GAT CTG CGA-3'
IKKB107F	5'-TAC TTG AAC CAG TTC AAC AAC TGC TGT GGC CTG-3'
IKKB120F	5'-GGA CTG CGG GAA GGA CAG GTC CTT ACC CTG CTG-3'
IKKB152F	5'-GTT CTG CAG CAA GGA GAG GAT GTT TTA ATA CAC AAA ATT ATT-3'
IKKB166F	5'-GAT CTA GGA TAT GCC AAG GAT GTT GAT CAG GGC AGT CTG TGC-3'
IKKB ^{Maus120F}	5'-TGT CAG <u>GAA TTC</u> ATC GCC ATC AAG CAA TGC CGA-3'
IKKB300F	5'-TGA CAT <u>GAA TTC</u> GGA GGA GAT CTC CGA AGA TAC-3'
EcoRI570F	5'-TCT CCC <u>GAA TTC</u> CCA GAG CTT CTG GAG C-3'
IKKB101R	5'-TCG CAG ATC TCC TCC AGA GCA GTA CTC CAT GGC-3'
IKKB107R	5'-CAG GCC ACA GCA GTT GTT GAA CTG GTT CAA GTA-3'
IKKB120R	5'-CAG CAG GGT AAG GAC CTG TCC TTC CCG CAG TCC-3'
IKKB152R	5'-AAT AAT TTT GTG TAT TAA AAC ATC CTC TCC TTG CTG CAG AAC-3'
IKKB166R	5'-GCA CAG ACT GCC CTG ATC AAC ATC CTT GGC ATA TCC TAG ATC-3'
IKKB ^{XhoI} R	5'-AAG CTT <u>CTC GAG</u> TCA GTC ACA GGC CTG CTC-3'
Primer für <i>yopP</i>	
YopP60F	5'-GAG ACC AGT TCT TTA ATC AGT AAT GAA GAG C-3'
23109F	5'-GTT ACA TCT CCC CTG GAC CTT TCG ATA GAA-3'
YopP+350F	5'-GGG AAA ACA TCT CTG ATA TTG TTT GAA CCA G-3'
YopP+1 <i>Bg</i> III forward	5'-ATC GCA <u>AGA TCT</u> ATG ATT GGA CCA ATA TCA-3'
YopPO9Forward S nach R	5'-GGC AAT AAG GAC AAA AAC GGC CAT TGAACG TT-3'
YopPForward R nach S	5'-GGC AAT AAG TGC AAA AAC GGC CAT TGA ACG TT-3'
YopPO8R-GF	5'-GCG ATG CTG GCA ATA GGG GCA AAA ACG GCC ATT-3'

YopP420*ST forward	5'-GGC AAT AAG TAC AAA AAC GGC CAT TGA ACG TT-3'
23109R	5'-TTC TAT CGA AAG GTC CAG GGG AGA TGT AAC-3'
YopP+390R	5'-GCT GGT TCA AAC AAT ATC AGA GAT GTT TTC CC-3'
YopPO8Reverse R nach S	5'-AAC GTT CAA TGG CCG TTT TTG CAC TTA TTG CC-3'
YopPO8R-GR	5'-AAT GGC CGT TTT TGC CCC TAT TGC CAG CAT CGC-3'
YopP450*ST reverse	5'-AAC GTT CAA TGG CCG TTT TTG TAC TTA TTG CC-3'
YopP750R	5'-TGT TAA CAA CAG TAC CAA CTC CCT GC-3'
YopPSaIIRev	5'- ATA CTC GGT ACC TTA CAG GTC CTC CTC GGA GAT CAG CTT CTG CTC CAT TAC TTT-3'
Primer für Genbank-Gene	
pJG4-5 <i>NheI</i> Forward	5'-AAG CTG <u>GCT AGC</u> ATG GGG TAC CCT TAT GAT GTG CCA GAT-3'
Primer für Vektoren	
pJG4-5700F	5'-GAA AAC CAT TCT TCA CGC CG-3'
pCDNA1041R	5'- GCA AAC AAC AGA TGG CTG GCA-3'
pCMVTAG650F	5'- AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA-3'
pCMV-Tag800R	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3'

2.4.3.8 Zielgerichtete Mutagenese mittels QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

Die zielgerichtete Mutagenese eines Gens kann mit Hilfe des angegebenen Mutagenese-Kits durchgeführt werden. Dabei wird die DNA aus einem dam^+ *E. coli*-Stamm aufgereinigt. Die verwendeten Primer sind komplementär, besitzen die festgelegte Mutation etwa in der Mitte ihrer Sequenz und haben eine T_m von etwa 78 °C oder höher.

Der Ansatz (50 μ l) setzt sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz	10 ng	DNA	
	100 ng	Primer A	(Vorwärts-Primer)
	100 ng	Primer B	(Rückwärts-Primer)
	5 μ l	10 \times Puffer	
	1 μ l	dNTP	
	3 μ l	QuikLösung	
	x μ l	steriles Wasser	
	1 μ l	<i>PfuTurbo</i> -Polymerase (2,5U/ μ l)	

Reaktionsbedingungen	<u>Denaturieren:</u>	1 min	95 °C
	Denaturieren:	50 sec	95 °C
Zykluszahl: 18	Hybridisieren:	50 sec	60 °C
	<u>Amplifikation</u>	1 min/kbp	68 °C
	Amplifikation:	7 min	68 °C

Nach der PCR-Reaktion inkubierte der Ansatz 2 min auf Eis und wurde anschließend mit 1 µl *DpnI*-Restriktionsenzym (10U/µl) versetzt. Dieser Restriktionsansatz inkubierte 1 h bei 37 °C. Das Restriktionsenzym *DpnI* schneidet die methylierte Ausgangs-DNA und somit verbleibt nur die mutagenisierte nichtmethylierte DNA für die Weiterverwendung. Während der Inkubationszeit wurden die ultrakompetenten XL10-Gold *E. coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut. Je 45 µl dieser Bakteriensuspension wurden anschließend mit je 2 µl β-ME versetzt. Dieser Ansatz inkubierte unter leichtem Schütteln 10 min auf Eis. Danach wurden 2 µl des *DpnI*-Restriktionsansatz zu den kompetenten *E. coli*-Bakterien hinzugegeben. Dieser Ansatz inkubierte 30 min auf Eis. Die Transformation der DNA erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien 2 min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration wurden die Bakterien dann mit 1 ml vorgewärmtem LB-Medium versetzt und 1 h unter Rotation bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden die Bakterien 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl LB resuspendiert und auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Bebrütung der Agarplatte erfolgte bei 37 °C.

2.4.3.9. Reinigung von PCR-Produkten (peQlab)

Der PCR-Ansatz wurde mit dem 5-fachen Volumen der Lösung PB versetzt, gemischt und in eine Aufreinigungssäule überführt. Diese wurde bei 14000 rpm 1 min zentrifugiert, sodass die DNA in der Membran zurückgehalten und die Restflüssigkeit abgetrennt wurde. Der Überstand wurde verworfen, die Membran mit 750 µl der Lösung PE gewaschen und bei 14000 rpm 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und die Säule bei 14000 rpm 1 min zentrifugiert, um die Restflüssigkeit aus der Membran zu entfernen. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde die Membran mit 30 µl Wasser versetzt, 1 min bei RT inkubiert und abermals 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die mit dem Wasser aus der Membran eluierte DNA wurde anschließend weiterverwendet.

Zu 10 µl DNA-Ligationsansatz wurden 200 µl kompetente Bakterienzellen hinzugegeben. Dieser Ansatz inkubierte 20 min auf Eis. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock von 1 min bei 42 °C. Die Regeneration der Bakterienzellen erfolgte durch Hinzufügen von 1 ml LB-Medium und einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C. Die Suspension wurde dann auf einer LB-Agar-Platte mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.4.3.12. Herstellung und Transformation elektrokompetenter *Yersinia*- und *Escherichia coli*-Bakterien

200 ml LB-Medium wurden mit 200 µl einer Bakterien-Übernachtskultur beimpft und unter Schütteln bei 27°C (*Yersinia*) bzw. 37 °C (*E. coli*) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Die Kultur wurde bei 5000 rpm, 4 °C und 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend dreimal mit je 35 ml 10 % Glycerin gewaschen, abschließend in 2 ml 10 % Glycerin resuspendiert und in 75 µl Aliquots bei -70 °C weggefroren.

1 µg DNA wurde mit 50 µl elektrokompetenten *Y. enterocolitica*- bzw. *E.coli*-Bakterien in einer auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvette vereint und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Transformation mittels eines Elektroporationsapparates bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF. Die transformierten Bakterien wurden dann sofort mit 1 ml LB-Medium bei 27°C (*Yersinia*) bzw. 37 °C (*E. coli*) regeneriert, danach der Vektorresistenz entsprechend auf geeigneten Antibiotika-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 27 °C bzw. 37 °C bebrütet.

2.5. Das Hefe-2-Hybrid-System

2.5.1 Grundlagen

Das Hefe-2-Hybrid-System ermöglicht eine *in vivo* Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Hefezelle und ist besonders für den Nachweis von transienten und schwachen Wechselwirkungen geeignet. Dieser „Assay“ basiert auf der räumlichen Trennung von DNA-bindender und transkriptionsaktivierender-Domäne vieler eukaryontischer Transkriptionsfaktoren. Die DNA-bindende Domäne ermöglicht die Bindung des Transkriptionsfaktors an eine oberhalb des entsprechenden Transkriptionsstartpunkts gelegene regulatorische DNA-Sequenz, während die transkriptionsaktivierende Domäne für die Initiation der Transkription erforderlich ist. Da die funktionellen Eigenschaften auch bei einer solchen physikalischen Trennung der beiden Domänen erhalten bleiben, lassen sich Interaktionen von Proteinen über die Rekonstitution des intakten Transkriptionsfaktors nachweisen (Fields and Sternglanz, 1994). Das verwendete LexA Hefe-2-Hybrid-System benutzt 88 AS einer transkriptionsaktivierenden-Domäne (B42) von *Escherichia coli*, sowie das LexA-Protein von *E. coli*, das die DNA-bindende Domäne darstellt (Ma and Ptashne 1987). Die Domänen werden durch zwei separate Plasmide (pEG202, pJG4-5) kodiert. Die Interaktion zweier Proteine, fusioniert mit der B42- bzw. LexA-Domäne, führt zur Expression eines Reportergens in der Hefe. Bei diesem System werden zwei Reportergene verwendet, einmal das Hefe-*leu2*-Gen für eine prototrophische, und als Zweites das *Escherichia coli*-Reportergen *lacZ* für die farbliche Analyse einer Proteininteraktion (Ebina *et al.*, 1983, Estojak *et al.*, 1995; SenGupta *et al.*, 1996, Fields and Song, 1989; Fields and Sternglanz, 1994). Abb. 2 veranschaulicht die Systematik des Hefe-2-Hybrid-Systems.

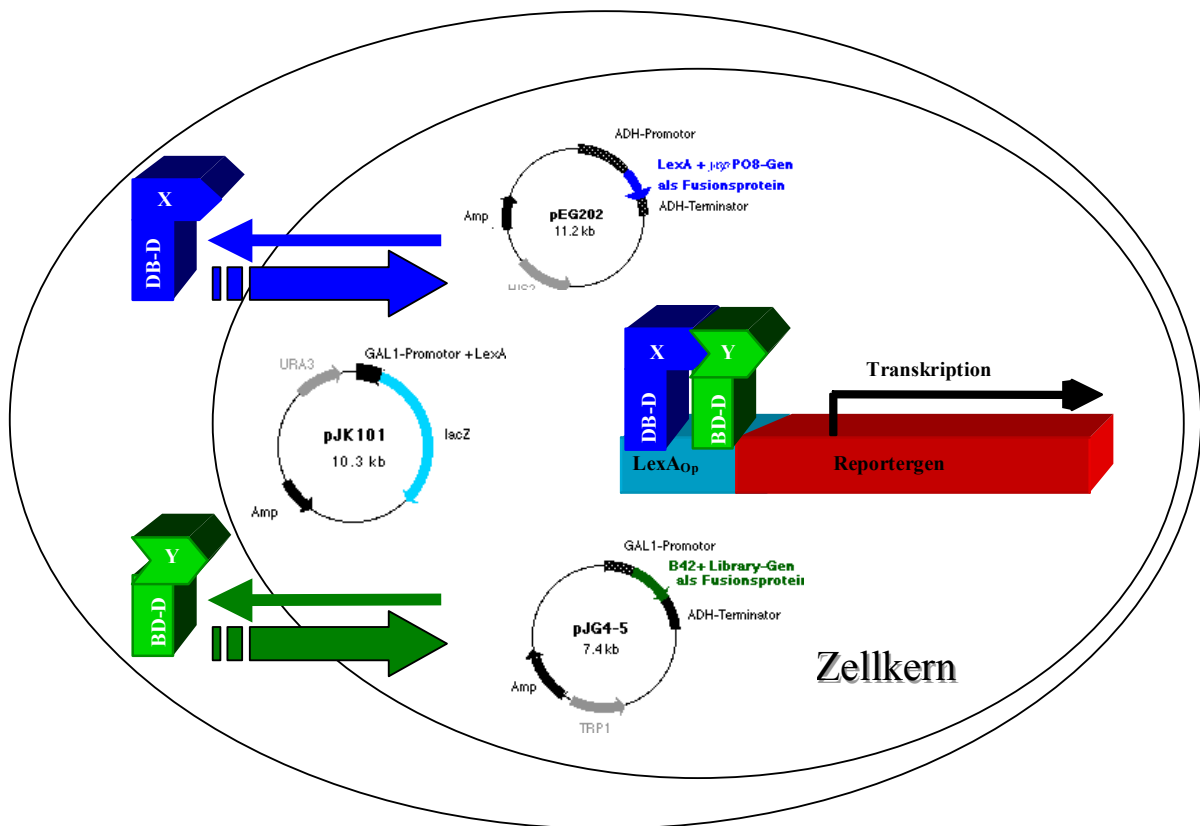


Abb. 2: Übersicht über das verwendete Hefe-2-Hybrid-System: Hybridproteine, bestehend aus der LexA DNA-Bindungsdomäne (DB) und Protein X, sowie aus der B42 Aktivierungsdomäne (BD) und Protein Y werden nach Induktion in der Hefe koexprimiert. Durch *in vivo* – Interaktion zwischen Protein X und Protein Y kann die DB-Domäne an den LexA-Operator binden und die BD-Domäne die Transkription der zwei Reportergene *leu2* und *lacZ* initiieren.

2.5.2. Herstellung und Transformation kompetenter *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen

10× TE	0,1 M Tris, 0,01 M EDTA (autoklavieren)
10× LiOAc	1 M LiOAc (autoklavieren)

5 ml YNB-Medium wurden mit 2 % Glucose und den jeweils benötigten Aminosäuren versetzt, mit einer Hefe-Kolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurde die Kultur auf 50 ml mit YNB-Medium, 2 % Glucose und den entsprechenden Aminosäuren erweitert und solange bei 30 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht wurde.

Die Kultur wurde dann bei 1500 xg, 10 min und RT abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit 50 ml sterilem Wasser gewaschen und zuletzt in 1×TE/LiOAc aufgenommen.

2 µg der zu transformierenden DNA wurden mit 10 µl Lachs-Sperma-DNA versetzt, 10 min bei 98 °C gekocht und anschließend 10 min auf Eis inkubiert.

100 µl der kompetenten Hefen wurden zu jeder DNA-Lösung hinzugegeben und gemischt. Anschließend wurden zu jedem Transformationsansatz je 300 µl 1×TE/LiOAc/PEG8000 zugegeben und gemischt. Der Transformationsansatz wurde 30 min bei 30 °C und 750 rpm inkubiert. Danach wurden 70 µl DMSO hinzugefügt und gemischt. Anschließend erfolgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42 °C. Nach dem Hitzeschock wurden die Hefen 2 min auf Eis inkubiert bevor sie dann bei 14000 rpm 30 sec und RT abzentrifugiert und in 50-100 µl Wasser resuspendiert wurden. Die Suspension wurde auf YNB-Platten und den zusätzlich selektierenden Aminosäuren ausplattiert und bei 30 °C inkubiert (Ito *et al.*, 1983).

2.5.3. β-Galaktosidase *in vivo* Test (Protokoll nach Clontech)

Z-Puffer (1 l)

16 g Na₂HPO₄, 5,5 g NaH₂PO₄, 0,75 g KCl, 0,246 g MgSO₄

2 ml YNB+Raf+Leu der zu untersuchenden Hefekultur wurden über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Zu dieser ÜN-Kultur wurden dann je 8 ml YNB+Gal+Raf-Medium hinzugefügt und die frische Kultur bei 30 °C, 5 h und 200 rpm geschüttelt, bis sie eine OD von 0,5-0,8 erreicht hatte. Von der Kultur wurden separat 1,5 ml bei 14000 rpm, RT und 10 min abzentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt, das Zellpellet mit je 1,5 ml Z-Puffer gewaschen und 10 min bei 14000 rpm und RT abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet in 300 µl Z-Puffer resuspendiert und je 100 µl dieser Suspension wurden in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Zum Aufschließen der Zellen wurde die Einfrier-Auftau-Methode angewandt. Die Zellsuspension wurde für 30 sec in flüssigem Stickstoff inkubiert und anschließend bei 30° C wieder aufgetaut. Dies wurde solange durchgeführt, bis das Zelllysat transparent wurde. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden 700 µl Z-Puffer+0,27 % β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Als letztes wurden 160 µl ONPG (4 mg/ml), das zuvor 2 h geschüttelt und somit vollständig aufgelöst wurde, hinzugegeben und bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,4

ml 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Dann wurde die Probe 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die Extinktion bei einer OD₄₂₀ gemessen. Der Messzeitraum betrug 30 min. Als Nullwert diente ein Reaktionsansatz ohne Zellmaterial. Die gemessenen Werte wurden nach folgender Formel berechnet und als Miller-Units angegeben:

$$t(30 \text{ min}) \times V(100 \mu\text{l}) \times \text{Konzentrationsfaktor}(5) \times \text{OD}_{600} \times \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{\text{OD}_{600}}$$

2.5.4. cDNA-Genbank-Beschreibung

Die verwendete cDNA-Genbank der Firma Origene wurde aus Mäuse-Milz gewonnen und direkt in die *EcoRI/XhoI*-Schnittstellen des Hefe-2-Hybrid-System Vektors pJG4-5 eingefügt. Die Klonanzahl wurde mit 1×10^7 angegeben, die klonierten DNA-Fragmente haben Größen zwischen 0,2-2,5 kbp.

2.5.5. Transformation der cDNA-Genbank in *Saccharomyces cerevisiae* EGY48

20 ml YNB+Glu+Ura wurden mit dem Stamm EGY48+JK101+pEG202yopPO8 angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ dieser Übernachtskultur gemessen. Die Kultur wurde mit 300 ml YNB+Glu+His+Ura versetzt, dass eine OD₆₀₀ von 0,1 erreicht wurde. Diese Kultur wurde solange bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt, bis die OD₆₀₀ 0,5-0,7 betrug. Inzwischen wurden 30 Ansätze von je 1 µg der cDNA-Genbank mit 10 µg der Lachs-Sperma-DNA versetzt, 10 min bei 98 °C inkubiert und 5 min auf Eis abgekühlt.

Nach Erreichen der OD₆₀₀ wurde die Kultur bei 1500 xg, 5 min und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 30 ml sterilem Wasser resuspendiert und abermals bei 1500 xg, 5 min und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde dieser Schritt wiederholt. Das Pellet wurde dann in 3 ml 1×TE/LiOAc resuspendiert, je 100 µl der Suspension zu den DNA-Transformationsansätzen gegeben und kurz gemischt. Jeder dieser Ansätze wurde zusätzlich mit 300 µl 1×TE/LiOAc/PEG8000 versetzt und abermals kurz gemischt. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 30 °C und 750 rpm. Dann wurde jeder Transformationsansatz mit 70 µl DMSO versetzt, kurz gemischt und 20

min bei 42 °C und 750 rpm inkubiert. Anschließend wurden in jedes Eppendorfreaktionsgefäß 600 µl Wasser gegeben. Die Probe wurde kurz gemischt und auf einer 24 cm×24 cm YNB+Glu+Leu-Platte ausplattiert.

Parallel zur Transformation der cDNA-Maus-Genbank wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-3} - 10^{-6} angelegt, um die Transformationseffizienz zu bestimmen. Um eine möglichst vollständige Transformation aller klonierten DNA-Fragmente in die Hefe sicher zustellen, müssen 2×10^6 Transformanten auf den YNB+Glu+Leu-Platten gewachsen sein. Zur Bestimmung der Transformantenzahl wurden die Kolonien pro Verdünnung ausgezählt. 100 Kolonien auf einer 24 cm×24 cm YNB+Glu++Leu-Platte entsprechen einer Effizienz von 10^5 Transformanten pro µg transformierter DNA, also 3×10^6 Totaltransformanten (da 30 Ansätze von je 1 µg der cDNA-Genbank verwendet wurden). Die Transformationseffizienz wurde anhand der ausgezählten Kolonien pro Platte im Verhältnis zu den bereits berechneten Standardwerten errechnet.

Nach der Bestimmung der Transformantenzahl wurden die restlichen 30 Platten circa 4 h bei 4 °C inkubiert um den Agar zu härten. Dann wurden auf jede der 30 Platten 10 ml steriles Wasser pipettiert, die Kolonien mit einem sterilen Spatel abgeschabt und in ein Falcontube überführt. Die Hefesuspension wurde bei 1500 xg, 5 min und Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit je 50 ml sterilem Wasser gewaschen. Zuletzt wurde das Pellet in 50 ml sterilem Wasser resuspendiert. Dann wurden 25 ml 50 %-iges steriles Glycerin hinzugegeben und die Suspension in 2 ml Aliquots bei -72 °C weggefroren.

2.5.6. Identifizierung von potentiell positiven Hefetransformanten

2.5.6.1. Bestimmung der Anzahl transformierter Hefezellen

Um die Anzahl der nach dem Wegfrieren noch lebensfähigen Hefen zu bestimmen, wurden 100 µl der weggefrorenen Transformanten aufgetaut und mit YNB+Glu+Leu-Medium 1:10 verdünnt. Zur „Wiederbelebung“ der weggefrorenen Hefen wurde diese Suspension 4 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden aus dieser Kultur Verdünnungen von 10^{-3} - 10^{-6} hergestellt und jede Verdünnung auf einer YNB+Glu+Leu-Platte ausplattiert. Diese Platten wurden 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert. Dann wurden die Kolonien je Plattenverdünnung ausgezählt.

Um das ganze Spektrum der transformierten cDNA-Klone abzudecken und um möglichst alle Klone zu erfassen, wurden anschließend 1 ml der weggefrorenen Hefe-Genbank-Transformanten mit YNB+Gal+Leu-Medium so verdünnt, dass die Ausgangs-OD₆₀₀ 0,5 betrug. Die verdünnte Kultur wurde nun 4 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert, danach wurden 100 µl entnommen, was 1×10⁶ Hefen entsprach, und auf einer YNB+Gal-Platte ausplattiert, die 2-5 Tage bei 30 °C bebrütet wurde. Nach 2 Tagen wurden gewachsene Kolonien auf eine Stammpatte überimpft, ebenso Kolonien, die nach 3, 4 und 5 Tagen gewachsen waren. Diese Platten wurden wiederum 3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.5.6.2. Glucose/Galaktose-Selektion der transformierten Hefezellen

Zur Identifizierung potentiell positiver Transformanten wurden von diesen Kolonien YNB+Glu- oder YNB+Raf+Gal-Platten angelegt und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Transformanten, die auf YNB+Glu-Platten wuchsen, wurden als falsch positiv bewertet und verworfen. Transformanten, die auf YNB+Gal wuchsen, wurden weiteren Untersuchungen unterworfen.

2.5.6.3. Plasmid-DNA-Isolierung aus potentiell positiven *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen

Vektor-Isolierungslösung	2 % Triton-X-100, 1 % SDS, 0,1 M NaCl, 0,01 M Tris, 0,001 M EDTA
Minimal-Tryptophan-Medium	10,5 g Kaliumphosphat (dibasic), 4,5 g Kaliumphosphat (monobasic), 0,5 g Natriumcitrat in 160ml Wasser gelöst, autoklaviert und zu den 800 ml Wasser + 15 g Agar hinzugefügt
Zu dieser Lösung	1 ml 20 % Magnesiumsulfat, je 10 ml 4 mg/ml Ura/His/Leu 10 ml 20 % Glucose, 1 ml 50 mg/ml Kanamycinsulfat, 0,5 ml 1 % Thiaminhydrochlorid

Alle Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 11 Selektionsmedium sowie 11 Selektionsplatten.

2 ml YNB+Glu+Leu+His+Ura wurden mit je einem der potentiell positiven Hefe-Genbank-Transformanten angeimpft und ÜN bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Durch die Zugabe der

Aminosäuren Leucin, Histidin und Urazil verliert die Hefe die entsprechenden Plasmide und ist gezwungen, nur die durch das Genbank-Plasmid kodierte Aminosäure Tryptophan selbst zu synthetisieren und dieses Plasmid damit zu erhalten. Diese 2 ml wurden am nächsten Tag bei 14000 rpm 10 sec zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Hefezellenpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl der Vektor-Isolierungslösung, 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und 0,3 g sterile Glassperlen jedem Eppendorfreaktionsgefäß hinzugefügt. Diese Mischung wurde 2 min gevortext, dann bei 14000 rpm, 5 min und RT zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl der oberen wässrigen Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 20 µl 3 M NaAc und 440 µl 95 %-igem Ethanol versetzt. Diese Suspension wurde gemischt und 20 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und bei 14000 rpm, 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet vollständig getrocknet und in 5-10 µl Wasser resuspendiert. 5 µl dieser DNA-Lösung wurden zur Transformation in *E. coli* KC8 verwendet (2.4.3.12.), die Transformanten auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Um zu überprüfen, ob die Transformanten auch das Genbank-Plasmid besitzen, wurde eine Minimal-Tryptophan-Stammplatte angelegt. Diese enthält die benötigten Aminosäuren (Leucin, Histidin und Urazil) außer Tryptophan, dessen Synthese durch das Plasmid vermittelt wird. Von gewachsenen *E. coli* KC8-Transformanten, die dieses Plasmid besitzen und somit die fehlende Aminosäure synthetisieren können, wurde Plasmid-DNA isoliert (2.4.1.1.) und wieder in *Saccharomyces cerevisiae* EGY48+pJK101+pEG202yopPO8 transformiert. Die Transformanten wurden auf YNB+Glu+Leu-Platten ausplattiert, 3 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend wurde eine YNB+Glu+Leu-Stammplatte angelegt. Die gewachsenen Hefe-Transformanten wurden zur Selektion auf Protein-Protein-Interaktion auf 4 verschiedenen Selektions-Platten gleichzeitig ausgestrichen, die 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert wurden.

YNB+Gal	potentiell positive Transformanten zeigen Wachstum
YNB+Glu	potentiell positive Transformanten zeigen kein Wachstum
YNB+Raf+Gal+X-Gal	potentiell positive Transformanten, zeigen Wachstum und Blaufärbung
YNB+Glu+X-Gal	potentiell positive Transformanten zeigen kein Wachstum

2.5.6.4. Fusionstest von potentiell positiven Hefetransformanten

Die potentiell positiven Hefeklonen wurden in 3 ml YNB+Glu+His+Leu über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Durch die Zugabe der Aminosäure Histidin verliert die Hefe das pEG202+*yopPO8*-Plasmid. Durch Mangel der AS Tryptophan und Urazil ist die Hefe gezwungen, die durch die Genbank- und Selektions-Plasmide kodierten Aminosäuren selbst zu synthetisieren. Diese Plasmide bleiben der Hefe somit erhalten. Von diesen Flüssigkulturen wurden jeweils Ausstriche auf YNB+Glu+Leu+His-Platten angelegt und bei 30 °C 2-3 Tage inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden von jedem Hefeklon 20 Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen, auf eine YNB+Glu+Leu-Platten ausgestrichen und bei 30 °C 2-3 Tage inkubiert. Kolonien, die auf der YNB+Glu+Leu+His-Platte, nicht aber auf der YNB+Glu+Leu-Platte wuchsen, haben ihr pEG202+*yopPO8*-Plasmid mit dem definierten *his*-Gen verloren, ihr Selektions- und Genbank-Plasmid aber erhalten. Diese Hefen wurden für den Fusionstest verwendet.

Der Hefestamm RFY206 wurde separat mit den Plasmiden pEG202 als Leervektor, sowie mit pEG202+*yopPO8* transformiert, auf YNB+Glu+Leu+Ura+Trp-Platten ausplattiert und bei 30 °C 2-3 Tage inkubiert. Anschließend wurde je eine Kolonie RFY206+pEG202-Leervektor bzw. RFY206+pEG202+*yopPO8* mit jeweils einer Kolonie EGY48+pJG101+pJG4-5-Genbank-Plasmid in YPD-Medium vermischt und 8 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert, auf einer YNB+Glu+Leu-Selektionsplatte ausplattiert und bei 30 °C bebrütet. Nur die Hefen, die durch die Fusion der zwei Hefestämme alle drei Plasmide aufgenommen haben sind in der Lage, die durch die Plasmide kodierten Aminosäuren selbst zu synthetisieren. Von den gewachsenen Transformanten wurde eine YNB+Glu+Leu-Stammpatte angelegt. Die Hefe-Transformanten wurden zur Selektion wieder auf 4 verschiedenen Platten gleichzeitig ausgestrichen (2.5.6.3.) und 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert. Von den potentiell positiven Transformanten wurde das Genbank-Plasmid aus dem zugehörigen *E. coli*-Stamm KC8 nach 2.4.1.1. isoliert und wie in 2.4.3.10. beschrieben sequenziert.

2.6.4. Protein-Expression im Hefe-2-Hybrid-System

Aufschluss-Puffer	8 M Harnstoff, 5 % SDS, 40 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/ml Bromphenol-Blau, 1 % β -Mercaptoethanol, 6,2 % Protease-Inhibitoren, 5 % PMSF
-------------------	--

Um die Expression der entsprechenden Proteine nachzuweisen, wurden 5 ml YNB+Raf+Leu-Selektions-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Nach circa 12 h wurde 1 ml dieser Hefe-Kultur in 50 ml neues YNB+Raf+Gal+Leu-Selektions-Medium überführt und weitere 8 h bei 250 rpm und 30 °C bebrütet. Für die Zellzahlbestimmung wurde nach dieser Wachstumszeit 1 ml der Suspension in eine Küvette überführt und die OD₆₀₀ wurde bestimmt. Gleichzeitig wurde die Hauptkultur bei 5000 rpm, 4 °C und 10 min zentrifugiert, das Pellet zweimal mit eiskaltem sterilem Wasser gewaschen und mit x ml 60 °C vorgewärmten Aufschluss-Puffer, berechnet nach der Formel: $x \text{ ml} = \text{OD}_{600} \times 440 / 33$, aufgenommen. Die resuspendierten Hefezellen wurden in ein mit 0,2 g Glasperlen versetztes Eppendorfreaktionsgefäß überführt, dieser Ansatz wurde 10 min bei 70 °C erhitzt, 1 min gemischt und anschließend 10 min bei 14000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und durch SDS-PAGE (2.6.5.) und Western-Blot (2.6.3.) analysiert.

2.6.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli Puffer	25 mM Tris, 200 mM Glycerin, 0,1 % SDS
Proben-Puffer	125 mM Tris-HCl, 20 % Glycerin, 140 mM SDS, 0,3 mM Bromphenolblau, 2 % Mercaptoethanol

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte durch 6-15 %-ige diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Hilfe einer Mini-Protean II- oder Hoefer-Apparatur (Bio-Rad Laboratories, Deutschland; Amersham, Deutschland). Dabei wurden die in Tabelle 14 angegebenen Volumina eingesetzt.

Als erstes wurde das Trenngel gemäß der BioRad-Anleitung hergestellt, bis etwa 3 cm unter die Glasplattenoberkante gegossen und bis zur vollständigen Polymerisierung (1 h) mit Ethanol überschichtet. Nach dem Entfernen des Ethanols wurde das 5 %ige Sammelgel (2,7 ml Wasser,

0,67 ml 30 % Polyacrylamid, 0,5 ml 1M Tris (pH 6,8), 0,04 ml 10 % SDS, 0,4 ml 10 % APS, 0,004 ml TEMED) aufgegossen und der Proben-Kamm zwischen die Glasplatten in das Sammelgel eingesetzt. Die Polymerisierung des Gels dauerte abermals 1 h bei RT. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese 1:2 mit Proben-Puffer versetzt und 15 min bei 85 °C inkubiert. Nach Auftragen der Proben wurde die angelegte Spannung auf 100 V eingestellt und nachdem die Probenlauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde auf 200 V erhöht. Im Anschluss an eine Laufzeit von 2-3 h wurde das Gel geblottet oder gefärbt.

Tab. 14: Zusammensetzung der verschieden-prozentigen SDS-Gele

Trenngel				
Gelkomponenten	6%	8%	10%	12%
Wasser	15,9 ml	13,9 ml	11,9 ml	9,9 ml
30% Polyacrylamid	6 ml	8,0 ml	10 ml	12 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
10% SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
10% APS	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
TEMED	0,024 ml	0,024 ml	0,024 ml	0,024 ml
Endvolumen	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

2.6.6. Proteintransfer (Western-Blot)

Whatman-Papier

Lösung Anode I

0,3 M Tris, 10 % Methanol (pH 10,4)

Lösung Anode II

25 mM Tris, 10 % Methanol (pH 10,4)

Lösung Kathode

25 mM Tris base, 40 mM Glycerol, 10 % Methanol (pH 9,4)

Graphitplatten

Mit Hilfe des Semi-Dry-Transfer-Systems werden Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen. Der Transfer der Proteine erfolgt auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran, Fa. Millipore, Eschwege).

Semi-dry-Blot

Die Membran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und anschließend 30 sec in Methanol und 30 sec in Anodenpuffer II inkubiert. Das Gel inkubierte während des Apparaturaufbaus im Kathodenpuffer. Zusätzlich zu der Membran wurden 6 Lagen Whatman-3MM-Chromatographie-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) je Gel zugeschnitten und mit den unterschiedlichen Puffern getränkt. Die Blotapparatur setzt sich aus folgenden Lagen zusammen und schließt mit den äußeren Graphittransferplatten ab (von positiv nach negativ) :

- Graphitplatte 1 (positive Spannung)
- 2 Lagen Whatman-Papier (Anode I)
- 1 Lage Whatman-Papier (Anode II)
- PVDF-Membran
- Polyacrylamidgel
- 3 Lagen Whatman-Papier (Kathode)
- Graphitplatte 2 (negative Spannung)

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke ($1,2 \text{ mA/cm}^2$) für 1 h.

2.6.7. Proteinfärbung (Coomassie-Blaufärbung)

Alle Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

Coomassie Blau	0,1 % Coomassie Blau, 40 % MeOH, 10 % Essigsäure
Entfärbelösung	50 % MeOH, 7,5 % Essigsäure oder 100 % MeOH

Zur Färbung der Proteine wurde das Gel oder die Membran 10-30 min in Coomassie Blau inkubiert. Das Gel bzw. die Membran wurde dann unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung solange entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar waren.

2.6.8. Proteindetektion mittels Immunoblot

Alle Schritte wurden auf einem Schüttler bei RT durchgeführt.

Nach vollständiger Entfärbung der PVDF-Membran mit 100 % Methanol wurde diese mit Waschpuffer (1×PBS/0,05 % Tween 20) gewaschen und anschließend mit einer blockierenden Lösung (1×PBS/0,05 % Tween 20 + 3 % Rinderserumalbumin) mindestens 1 h behandelt. Danach wurde die Membran 30 min mit Waschpuffer unter mehrmaligem Pufferwechsel gewaschen und anschließend mit dem ersten Antikörper für eine Stunde inkubiert. Nach 30-minütigem Waschen wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper für 1 h inkubiert und danach 15 min mit Waschpuffer von überschüssigem Antikörper gereinigt. Der Zweitantikörper bindet an den Fc-Teil des Erstantikörpers und ermöglicht durch eine enzymatische Reaktion die Detektion der durch den primären Antikörper gebundenen Antigene.

Die Detektionsmethode des ECL-Kits (Enhanced Chemiluminescence Reaction) basiert auf der Anregung von Luminol durch eine Oxidationsreaktion. Diese Reaktion geht von dem Enzym Peroxidase aus, das an den Sekundäantikörper gekoppelt ist. Dabei wird ein aufgelegter Film an der Stelle belichtet, an der der primäre Antikörper an die Membran gebunden hat. Von den zwei Reaktionslösungen des Kits wurden gleiche Volumina miteinander vermischt. Die gewaschene Membran wurde mit dem Reaktionsgemisch vollständig benetzt. Anschließend wurde die Membran in eine Detektionskassette zwischen zwei Folien gelegt und in der Dunkelkammer ein Film auf die Membran aufgebracht. Mit einer Entwicklungsmaschine wurde der Film nach unterschiedlichen Zeiten entwickelt.

Um mehrere Proteine nacheinander mittels Immunoblotanfärbung auf einer Membran nachweisen zu können, wurden die Antikörperkomplexe von einer bereits gefärbten Membran abgelöst, was eine erneute, spezifische Detektion ermöglicht. Dazu wurde die noch feuchte PVDF-Membran in dem Lösungs-Puffer (6,25 ml Tris HCl, 20 ml 10 % SDS, 704 µl β-Mercaptoethanol, 73 ml Wasser) 30 min bei 50 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Membran 1 h mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die zweite Immunoblotfärbung.

Tab. 15: verwendete Antikörper

Primärer Antikörper			
Monoklonal			
Antigen	Ig-Klasse	Verdünnung	Firma
Flag-M ₂	IgG	1 : 3000	Sigma
HA	IgG	1 : 1000	Santa Cruz
LexA	IgG	1 : 1000	Santa Cruz
Polyklonal			
YopP	IgG	1 : 20000	eigene Arbeit
PP2A	IgG	1 : 5000	BD
Peroxidase konjugierter sekundärer Antikörper			
Kaninchen-IgG	IgG	1 : 10000	Sigma
Maus-IgG	IgG	1 : 10000	Sigma
Ratte-IgG	IgG	1 : 10000	Sigma

2.7. Zellkultur

2.7.1. Kultur- und Infektions-Bedingungen

HEK-293- und J774-Makrophagen-Zellen wurden in DMEM (Dulbecco`s Mod. Eagle Medium)-/ bzw. RPMI-Medium, das mit 10 %-igem, hitzeinaktiviertem FBS (Foetal bovine serum), sowie mit 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml) versetzt wurde, bei 5,2 % CO₂, 95 % rH und 37 °C, Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Medien und Medienzusätze wurden von der Fima Invitrogen bezogen.

Für Infektionsversuche wurde eine Yersinien-ÜN-Kultur 1:10 mit frischem LB-Medium verdünnt und 2 h bei 37 °C bebrütet. Dann wurde die Kultur bei 6000 rpm, 5 min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Bakterienpellet in 3 ml eiskaltem PBS resuspendiert. 100 µl dieser Kultur wurden mit 900 µl PBS vermischt und davon wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Um bei allen Infektionsversuchen gleiche Bakterienzahlen zu gewährleisten, wurden die Bakterienkulturen mit x µl PBS versetzt, welche nach der folgenden Formel errechnet wurden:

$$X \text{ } \mu\text{l PBS} = \frac{y \text{ } \mu\text{l verbleibendes Aufnahmevervolumen} \times \text{OD}_{600}\text{-Wert}}{0,36} - y \text{ } \mu\text{l verbleibendes Aufnahmevervolumen}$$

Nach Einstellung der gewünschten OD wurden die Zellen, die sich in Zellkulturplatten mit je 24- oder 6 Vertiefungen befanden, in einem Verhältnis von 50 Bakterien pro Zelle infiziert. In der Regel wurden die Bakterien anschließend auf die Zellen zentrifugiert (5 min, 1500 rpm), um eine zeitgleiche Infektion zu gewährleisten. 90 min nach Infektionsbeginn wurden die Bakterien durch Zugabe von Gentamycin abgetötet. Die Auswirkungen der Yersinieninfektion auf die Zellen wurden zunächst mikroskopisch analysiert. Die Induktion von Apoptose wurde morphologisch bzw. durch Immunfluoreszenzmikroskopie charakterisiert. Dazu wurden die Zellen mit Fluoreszein-markiertem Annexin V gefärbt, das an Phosphatidylserin in der äußeren Membran apoptotischer Zellen bindet.

2.7.2. Transfektion von HEK-293-Zellen mittels Kalziumphosphat

2×HEPES

280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄
(pH 7,05 +/- 0,5)

2,5 M CaCl₂

Durch Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryontische Zellen eingeschleust. Dabei sollen die Gene, die durch den entsprechenden Vektor kodiert werden, von der Empfängerzelle exprimiert werden. Eine der am häufigsten verwendeten Transfektions-Methode ist die Kalziumphosphat-Transfektion. Hierbei wird die DNA mit einer Kalziumchloridlösung versetzt. Durch anschließendes Hinzufügen von Phosphationen fällt Kalziumphosphat als Präzipitat aus. Da DNA Phosphatgruppen enthält, fällt diese ebenfalls aus. Dieses Präzipitat wird durch Endozytose von der Zelle aufgenommen und die DNA wird in den Zellkern transportiert.

HEK-293-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit Hilfe von Trypsin abgelöst, ausgezählt und mit einer Zellzahl von 10⁶ pro Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgestreut. 0,75 – 1 µg DNA wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß zu 112,5 µl sterilem Wasser pipettiert, anschließend mit 12,5 µl 2,5 M CaCl₂ versetzt, und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette vollständig vermischt. Dieses Gemisch wurde dann durch tropfenweises Hinzufügen von 125 µl, auf 37 °C erwärmtem 2×HEPES-Puffer unter leichtem Schütteln circa 15 sec lang gut vermischt. Diese Mischung wurde zur Komplexbildung 1 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise gleichmäßig auf die Zellen pipettiert. Zum

Abschluss wurde das Medium durch leichtes Schwenken der Zellkulturplatte gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden dann bei 5,2 % CO₂, 95 % rH und 37 °C Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.7.3. *in vitro*-Präzipitation von Zellproteinen mit GST-YopP

Aufschluss-Puffer 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 300 mM NaCl, 0,5 % TritonX-100, 1 mM PMSF, 0,4 mM Na₃VO₄, 0,4 mM EDTA, 10 mM NaF

Für die Fällung zellulärer Proteine mit GST bzw. GST-YopP wurden die Zellen mit Aufschluss-Puffer lysiert. Das Zelllysate wurde nach Zugabe von Glutathion-Sepharosekügelchen und 2 µg GST bzw. GST-YopP 1 h bei 4 °C unter langsamer Rotation inkubiert und anschließend bei 3500 rpm, 4 °C und 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, die Sepharosekügelchen wurden dreimal mit je 1500 µl eiskaltem PBS gewaschen und jeweils 5 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die Sepharose mit den daran gebundenen Proteinen in 80 µl Proben-Puffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

2.7.4. Koimmunpräzipitation von Zellproteinen mit YopP

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Aufschluss-Puffer 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,4 mM Na₃VO₄, 0,4 mM EDTA, 10 mM NaF

Transfizierte oder infizierte Zellen wurden mit Zellschabern geerntet, in einem Falcon-Röhrchen vereinigt und bei 1500 rpm, 5 min und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl Aufschluss-Puffer mit 0,5 % Triton resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 14000 rpm, 10 min und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, zusätzlich mit 200 µl Aufschluss-Puffer sowie 4 µl YopP- oder YopE-Antikörper versetzt und bei 4 °C unter langsamer Rotation 1 h lang inkubiert. Anschließend wurden 30 µl Protein-A-Agarose hinzugefügt und das Lysat erneut bei 4 °C unter langsamer Rotation 1 h inkubiert. Später wurde das Gemisch bei 3500 rpm, 5 min und 4 °C

zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, die verbliebene Agarose dreimal mit je 1 ml eiskaltem Aufschluss-Puffer gewaschen und jeweils 5 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert, wobei der Überstand immer vollständig entfernt wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die Agarose mit den daran gebundenen Proteinen in 80 µl Proben-Puffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE (2.6.5.) und Immunoblot (2.6.8.) analysiert.

2.7.5. Untersuchung der NF-κB-Aktivierung bei Yersinieninfektionen mittels EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

Hypotoner-Puffer	5 mM HEPES, 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, Proteaseinhibitoren
Extraktions-Puffer	20 mM HEPES, 25 % Glycerin, 1 M NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, Proteaseinhibitoren

Mit dieser Methode wird die Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB aus dem Zytoplasma in den Zellkern, und somit die Aktivierung von NF-κB untersucht.

J774-Makrophagen wurden nach einer 90 minütigen Infektion mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem hypotonen Puffer auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe 30 min bei 4°C und 45 000 rpm zentrifugiert. Die gewonnenen Zellkernproteine wurden durch Behandlung des Zellkernpellets mit eiskaltem Extraktions-Puffer gewonnen. Nach einer Bradford-Proteinbestimmung wurden 7 µg der Zellkernproteine mit 2-5 ng einer radioaktiv markierten NF-κB-Sonde versetzt. Diese Sonde beinhaltet die DNA-Bindungsstelle (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' Santa Cruz) des NF-κB-Komplexes. Dieser Reaktionsansatz wurde mit 25 mM HEPES (pH 7,9), 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT und 5 % Glycerin 30 min auf Eis inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte mit Hilfe eines 5 %-igen nativen Polyacrylamidgels. Anschließend wurde das Gel mittels Autoradiographie analysiert.

2.8. Sequenzanalysen

Homologievergleiche auf Proteinebene wurden mit dem Programm Blast 2.2.1. durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997). Die computergestützte Analyse der Proteine erfolgte mit den Programmen ScanProsite (Appel *et al.*, 1994; <http://www.expasy.ch>), Compute pI/MW (Bjellqvist *et al.*, 1994; <http://www.expasy.ch>) und T-COFFEE (<http://www.expasy.ch>).

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche

Um neue Einblicke in die Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Yersinien bei J774-Makrophagen zu gewinnen, wurden diese mit Stämmen verschiedener pathogener *Yersinia*-Serotypen infiziert. Die morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen (Ausstülpungen der Zytoplasmamembran, „membrane-blebbing“, Umbau des Zytoskeletts und Zellschrumpfung) sind nach einem Infektionszeitraum von etwa 5-20 h deutlich zu erkennen und können mit verschiedenen spezifischen Färbemethoden immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (TUNEL-Reaktion (terminal dUTP nick end labeling), Annexin V-Färbung) (Abb.3).

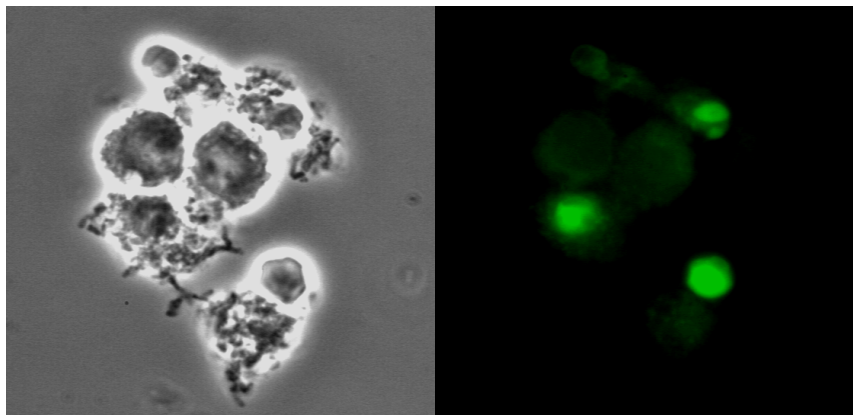


Abb. 3: Nach einer 6-stündigen Yersinieninfektion ist der Zelltod von J774-Makrophagen im Phasenkontrastmikroskop morphologisch sichtbar (links); die DNA-Fragmentierung im Zellkern ist mit Hilfe der TUNEL-Reaktion durch Fluoreszeinfärbung nachweisbar (rechts) (Ruckdeschel 2002)

Die quantitative Auswertung der Apoptoseinduktion zeigte, dass Stämme der *Y. enterocolitica* Serogruppe O8 deutlich mehr Apoptose auslösten als Yersinien der Serotypen O3 und O9. 6 h nach Infektionsbeginn waren bei Infektion mit Yersinien des Serotyps O8 etwa 90 % der infizierten Makrophagen apoptotisch. Im Gegensatz dazu verursachten die Serotypen O3 und O9 eine deutlich geringere Apoptoserate von etwa 20-40 % (Tab. 16) (Ruckdeschel *et al.*, 2001).

Tab. 16: Übersicht zur Effizienz der Apoptoseinduktion durch verschiedene *Y. enterocolitica* Serogruppen

Yersinien-Stamm/ Serotyp	Apoptoseinduktion (+ 20-40 % / +++ > 90 %)
Y-108-P /O3 <i>Y. e.</i> -88 /O3	+ +
WA-314 /O8 Y- 8081 /O8	+++ +++
E40 /O9 Y-96-P /O9 <i>Y.e.</i> -93 /O9	+ + +

Um herauszufinden, ob die unterschiedlichen Apoptoseraten Resultat verschiedener Aktivitäten der einzelnen *Yersinia*-YopP-Effektorproteine sind, wurde *yopP* von den Stämmen WA-314 (Serotyp O8) sowie E40 (Serotyp O9) mittels PCR amplifiziert und in das Plasmid pCJYE138-G3 subkloniert. Durch Transformieren der Plasmide pCJYE138-G3*yopPO8* und pCJYE138-G3*yopPO9* in eine *yopPO8*-Yersinien-Mutante (WA- $\Delta yopP$) wurde das durch ein Transposon inaktivierte endogene *yopP*-Gen durch das eingebrachte exogene *yopP*-Gen komplementiert. Gleichzeitig wurden die Plasmide in einen Yersinien-Stamm (WA- $\Delta \Sigma yop$) transformiert, der nur das Sekretions- und Translokations-Modul des *Yersinia*-TypIII-Sekretionssystems synthetisiert und somit YopP als einzelnes Effektor-Yop produzieren kann. Die daraus resultierenden Yersinienstämme WA- $\Delta yopP/+yopPO8$, WA- $\Delta yopP/+yopPO9$ bzw. WA- $\Delta \Sigma yop/+yopPO8$ und WA- $\Delta \Sigma yop/+yopPO9$ exprimierten YopPO8 bzw. YopPO9 als Fusionsprotein mit den N-terminalen 138 AS von YopE unter Kontrolle des *yopE*-Promotors unter identischen Bedingungen. Die sezernierten und translozierten YopE138-YopP-Fusionsproteine übten keinerlei YopE Effekte auf die Wirtszelle aus (Jacobi *et al.*, 1998; Ruckdeschel *et al.*, 2001).

In allen weiterführenden Experimenten wurde diese Methode zur Komplementierung der *Yersinia-yopP*-Mutanten genutzt, um anschließend deren Auswirkungen auf die Wirtszelle zu untersuchen. Unsere Analysen zeigten, dass die Yersinien-induzierte Apoptose mit einer vorrausgehenden Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch YopP korreliert. Dabei war die Translokation von NF- κ B in den Zellkern nach einer 90-minütigen Infektion mit dem Yersinien-Wildtypstamm WA-314 (Serotyp O8) stärker inhibiert, als bei einer Infektion mit dem Wildtypstamm E40 (Serotyp O9) (Abb. 4). Die mit YopPO8 bzw. YopPO9 komplementierten Stämme (WA- $\Delta yopP/+yopPO8$ = mit *yopPO8* komplementierte WA-*yopP*-Mutanten; WA- $\Delta yopP/+yopPO9$ = mit *yopPO9* komplementierte WA-*yopP*-Mutanten, WA- $\Delta \Sigma yop/+yopPO8$ =

nur YopPO8 produzierende Yersinen-Stämme, WA- $\Delta\Sigma yop/+yopPO9$ = nur YopPO9 produzierende Yersinen-Stämme) zeigten einen, dem *yopP*-Ausgangsstamm entsprechenden Phänotyp. Die YopPO8 produzierenden Yersinien-Stämme hatten dabei eine deutlich stärkere inhibitorische Aktivität auf die NF- κ B-Aktivierung und induzierten etwa dreimal mehr Apoptose als YopPO9 produzierende Yersinien. Diese Befunde unterstützen die Vermutung, dass die Apoptoseinduktion durch *Yersinia* vor allem auf der Inhibition der NF- κ B-Aktivierung beruht (Ruckdeschel *et al.*, 2001).

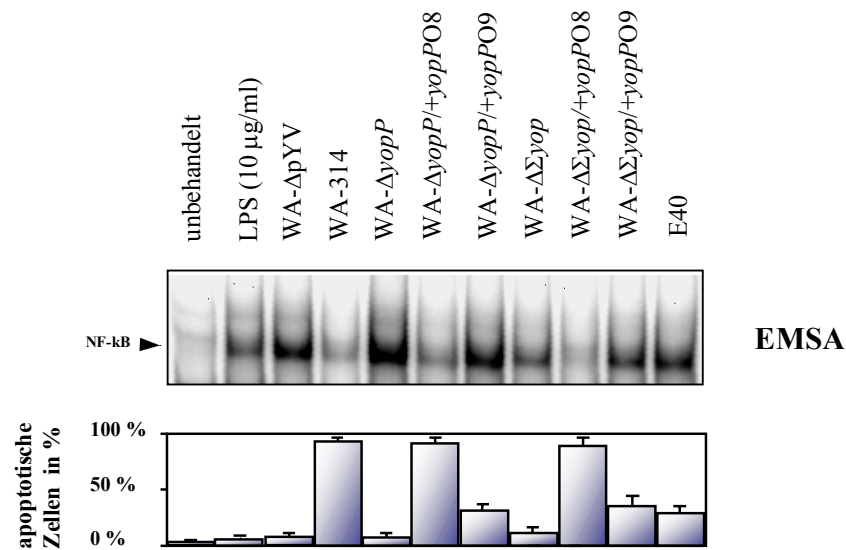


Abb. 4 : (oberes Bild) Inhibition der Translokation von NF- κ B in den Zellkern bei J774-Makrophagen nach 90-minütiger Yersinien-Infektion mit verschiedenen Yersinien-Stämme (WA- ΔpYV = virulenzplasmidloser Yersinien-Stamm; WA-314 = Yersinien-Wildtyp-Stamm O8; WA- $\Delta yopP$ = *yopPO8*-negativer Yersinien-Stamm; WA- $\Delta yopP/+yopPO8$ = mit *yopPO8* komplementierte WA-*yopP*-Mutante; WA- $\Delta yopP/+yopPO9$ = mit *yopPO9* komplementierte WA-*yopP*-Mutante; WA- $\Delta\Sigma yop$ = Yersinien-Stamm, der keine Yop-Effektorproteine produziert; WA- $\Delta\Sigma yop/+yopPO8$ = nur YopPO8 produzierender Yersinien-Stamm; WA- $\Delta\Sigma yop/+yopPO9$ = nur YopPO9 produzierender Yersinien-Stamm und E40 = Yersinien-Wildtyp-Stamm O9)

Die infizierten J774-Makrophagen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem hypotonen Puffer auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe 30 min bei 4°C und 45 000 rpm zentrifugiert und die Zellkernproteine wurden durch Behandlung des Zellkernpellets mit eiskaltem Extraktions-Puffer gewonnen. Nach einer Bradford-Proteinbestimmung (siehe 2.6.3.) wurden 7 μ g der Zellkernproteine mit 2-5 ng einer radioaktiv markierten NF- κ B-Sonde versetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde mit 25 mM HEPES (pH 7,9), 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT und 5 % Glycerin 30 min auf Eis inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte mit Hilfe eines 5 %-igen nativen Polyacrylamidgels und das Gel wurde mittels Autoradiographie analysiert (siehe 2.7.5.).

(unteres Bild) Apoptoseinduktion bei J774-Makrophagen nach einer 6-stündigen Infektion mit verschiedenen Yersinien-Stämme. Die Apoptose der Zellen wurde durch Anfärben mit Annexin V nachgewiesen. Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin, welches sich bei apoptotischen Zellen in der äußeren Zellmembran befindet. Anschließend wurden die markierten apoptotischen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt.

3.2. Homologievergleich von *Y. enterocolitica* YopPO8 mit Proteindatenbanken

YopP ist ein Yersinien-Effektorprotein, das durch den Typ III-Sekretionsapparat von *Yersinia* in die Wirtszelle transloziert wird. Durch Vergleich der AS-Sequenz von *Y. enterocolitica* YopPO8 mit Proteindatenbanken konnten Proteine von verschiedenen Bakterien mit Homologien zu YopPO8 gefunden werden.

Tab. 17: Homologievergleich von YopPO8 mit Computerdatenbanken unter Verwendung des Computerprogramms BLAST

Protein	Homologie zu anderen Proteinen		Mikroorganismus	Referenz
	identisch	ähnlich		
YopPO8	“targeted effector protein” YopJ 95 %	96 %	<i>Y. pestis</i>	NP_395205
YopPO8	94 %	YopJ 95 %	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	P31498
YopPO8	“targeted effector protein” YopP 94%	95%	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O9	NP_052382
YopPO8	“outer protein” AvrA 64 %	74 %	<i>S. enterica</i>	AAB83970
YopPO8	46 %	AopP 64 %	<i>A. salmonicida</i>	NP_710166
YopPO8	36 %	“putative” YopP 55 %	<i>V. parahaemolyticus</i>	NP_800856
YopPO8	XopJ (« outer protein J ») 24 %	41 %	<i>X. campestris</i>	AAK72486
YopPO8	25 %	YopP/AvrRXV family 40 %	<i>R. solanacearum</i>	NP_518989

3.3. Homologievergleich zwischen YopPO8 und YopPO9

Um die unterschiedlichen Apoptoseraten, die durch YopPO8 bzw. YopPO9 induziert wurden, auf eine bestimmte Proteinstruktur bzw. AS-Sequenz zurückführen zu können, wurden die beiden YopP-AS-Sequenzen miteinander verglichen (Abb. 5).

08	MIGPISQINS P GGLSEKET S SLISNEELKNII T QLETDIADG <u>SWFHKNYSR</u> TDVK VMPAL	60
09	MIGPISQINS F GGLSEKET R SLISNEELKNII I QLETDIADG <u>SWFHKNYSR</u> LDIE VMPAL	60
08	VTQANNKYPEMNLNFVTS P LDLSIEIKNVIENGVGSSRFIINMGED DGI HFSVIDYKHING	120
09	VIQANNKYPEMNLNFVTS Q DLSEIEIKNVIENGVGSSRFIINMGEG GGI HFSVIDYKHING	120
08	KTSLILF E PANFNSMGPA M LAI R AKTAIERYQLPDCHFMSVEMDIQRSS E CGIFSLALA	180
09	KTSLILF E PVNFNSMGPA I LAI S TKTAIERYQLPDCHFMSVEMDIQRSS E CGIFSLALA	180
08	KKLYTERD N LLKIHEDNIKGILSD G ENPLPH D KLDPYLPVTFYKHTQGKKRLNEYLNTNP	240
09	KKLYTERD S LLKIHEDNIKGILSD S ENPLPH N KLDPYLPVTFYKHTQGKKRLNEYLNTNP	240
08	QGVGTVVNKKNETIFNRFDNNKSIIDGKELSVSVHKKRIA EYK TLLKV	288
09	QGVGTVVNKKNETIFNRFDNNKSIIDGKELSVSVHKKRIA EYK TLLKV	288

Abb. 5: Vergleich der AS-Sequenzen von YopPO8 (Genbank accession no. AF336309) und YopPO9 (Genbank accession no. NP_052382). Die AS-Sequenzen der *Bam*HI-Schnittstellen innerhalb von *yopP* sind unterstrichen, zwischen YopPO8 und YopPO9 unterschiedliche AS sind stärker hervorgehoben. Die postulierten katalytischen AS einer möglichen Proteaseaktivität von YopP (Histidin-109, Glutaminsäure-128 und Cystein-172) sind mit einem dunklen Hintergrund markiert.

Im Vergleich der beiden YopP-AS-Sequenzen zeigte sich eine große Übereinstimmung auf AS-Sequenz-Ebene (94 % identisch). Die beiden Proteine unterscheiden sich nur in 16 AS, die in Abb. 5 hervorgehoben sind.

In der Sequenz des *yopP*-Gens befinden sich zwei *Bam*HI-Schnittstellen, die ein DNA-Fragment von 518 bp einschließen (Abb. 5). Dieses Fragment kodiert für die AS 44-214 und deckt circa 60 % der Gesamtproteinsequenz ab. Die Mehrheit der zwischen YopP *Y. enterocolitica* Serotyp O8 und Serotyp O9 unterschiedlichen Aminosäuren befinden sich auf dem AS-Segment, für welches dieses *Bam*HI-Fragment kodiert.

3.4. Charakterisierung der YopPO8-Effektordomäne durch Herstellung von YopPO8/YopPO9-Hybridproteinen

3.4.1. YopP Aktivität nach Austausch eines internen *yopP*-*Bam*HI-Fragmentes

Um herauszufinden, ob die beobachteten unterschiedlichen Apoptoseraten einer bestimmten Aminosäuresequenz innerhalb der verschiedenen YopP-Isotypen zugeordnet werden können, wurden Aminosäuren innerhalb der beiden Proteine gegeneinander ausgetauscht. Zunächst wurden die 518 bp-großen *Bam*HI-Fragmente zwischen *yopPO8* und *yopPO9* in den Plasmiden pCJYE138-G3*yopPO8* bzw. pCJYE138-G3*yopPO9* ausgetauscht. Die erhaltenen Plasmide wurden in die *yopPO9*-Yersinienmutante E40- Δ *yopP* transformiert. Diese Mutante kann wegen ihrer Chloramphenicol-Empfindlichkeit, im Gegensatz zu WA- Δ *yopP*, direkt mit pCJYE138-G3 transformiert werden, welches eine Chloramphenicol-Resistenz vermittelt. E40- Δ *yopP* und WA- Δ *yopP* zeigen identische *yopP*-negative Phänotypen. Mit dem *yopP*-*Bam*HI-Fragment wurde der YopP Phänotyp zwischen den Yersinien-Stämmen ausgetauscht, wie sich in den nachfolgenden Infektionsversuchen zeigte.

Im Vergleich zum Ausgangsstamm E40- Δ *yopP*/+*yopPO8* induzierte E40- Δ *yopP*/+*yopPO8*(44-214*yopPO9*) mit dem *yopPO9* *Bam*HI-Fragment, genauso wie E40- Δ *yopP*/+*yopPO9*, eine starke Translokation von NF- κ B in den Zellkern und nur wenige Zellen starben durch Apoptose. Im Gegensatz dazu inhibierte E40- Δ *yopP*/+*yopPO9*(44-214*yopPO8*), welcher das *yopPO8* *Bam*HI-Fragment innerhalb des *yopPO9*-Gens besitzt, die NF- κ B-Translokation in den Zellkern und die Anzahl der apoptotischen Zellen war drastisch erhöht (Abb. 6). Diese Beobachtungen machen deutlich, dass die YopPO8 Effektordomäne mit dem *Bam*HI-Fragment austauschbar ist, folglich also auf der AS-Sequenz lokalisiert sein muss, die durch das *Bam*HI-Fragment kodiert wird.

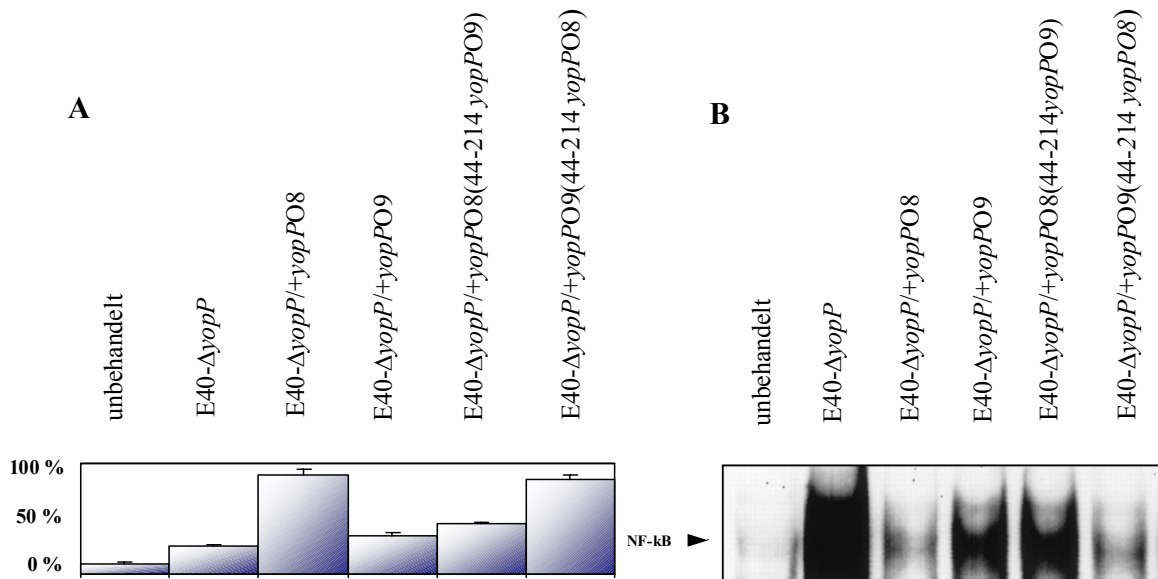


Abb. 6 : (A) Apoptoseinduktion bei J774-Makrophagen nach einer 6-stündigen Infektion mit verschiedenen Yersinien-Stämme (E40- $\Delta yopP$ = *yopPO9*-negativer Yersinien-Stamm; E40- $\Delta yopP/+yopPO8$ = mit *yopPO8* komplementierte E40-*yopP*-Mutanten; E40- $\Delta yopP/+yopPO9$ = mit *yopPO9* komplementierte E40-*yopP*-Mutanten; E40- $\Delta yopP/+yopPO8(44-214 yopPO9)$ = E40- $\Delta yopP$ -Yersinien-Stamm, komplementiert mit *yopPO8* mit internem *Bam*HI-Fragment von *yopPO9*; E40- $\Delta yopP/+yopPO9(44-214 yopPO8)$ = E40- $\Delta yopP$ -Yersinien-Stamm, komplementiert mit *yopPO9* mit internem *Bam*HI-Fragment von *yopPO8*). Die Apoptose der Zellen wurde durch Anfärben mit Annexin V nachgewiesen. Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin, welches sich bei apoptotischen Zellen in der äußeren Zellmembran befindet. Anschließend wurden die markierten apoptotischen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt.

(B) Inhibierung der Translokation von NF- κ B in den Zellkern bei J774-Makrophagen nach 90-minütiger Yersinien-Infektion mit verschiedenen Yersinien-Stämme. Die infizierten J774-Makrophagen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem hypotonen Puffer auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe 30 min bei 4°C und 45 000 rpm zentrifugiert und die Zellkernproteine wurden durch Behandlung des Zellkernpellets mit eiskaltem Extraktions-Puffer gewonnen. Nach einer Bradford-Proteinbestimmung (siehe 2.6.3.) wurden 7 μ g der Zellkernproteine mit 2-5 ng einer radioaktiv markierten NF- κ B-Sonde versetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde mit 25 mM HEPES (pH 7,9), 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT und 5 % Glycerin 30 min auf Eis inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte mit Hilfe eines 5 %-igen nativen Polyacrylamidgels und das Gel wurde mittels Autoradiographie analysiert (siehe 2.7.5.).

3.4.2. YopP-Aktivität nach Austausch von RA und ST an den YopP-Positionen 143 und 144

In der AS-Sequenz, die durch das *Bam*HI-Fragment bestimmt wird, finden sich mehrere kritische AS, in denen sich YopPO8 und YopPO9 unterscheiden. An den Positionen 143 und 144 befinden sich in YopPO8 Arginin (R basisch) und Alanin (A aliphatisch), in YopPO9 Serin (S aliphatisch) und Threonin (T aliphatisch). Um die Bedeutung dieser AS für die Aktivität von YopP zu ermitteln, wurden RA und ST gemeinsam und einzeln zwischen YopPO8 und YopPO9 mit Hilfe der Fusions-PCR-Technik (2.4.3.6.) ausgetauscht. Mit Hilfe definierter Primer, welche für die entsprechenden Mutationen kodierte, wurden von *yopPO8* bzw. *yopPO9* jeweils zwei Fragmente synthetisiert, wobei die hinteren 25 bp des vorderen zu amplifizierenden Fragmentes und die vorderen 25 bp des hinteren zu amplifizierenden Fragmentes zueinander komplementär waren. Die synthetisierten PCR-Fragmente wurden in einer darauffolgenden PCR fusioniert, anschließend mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten und in den ebenfalls *Bam*HI geschnittenen pCJYE138-G3*yopPO9*-Vektor bzw. pCYE138-G3*yopPO8*-Vektor inseriert. Die entstandenen Plasmide wurden in die *yopPO9*-Yersinienmutante E40- Δ *yopP* transformiert. Anschließend wurden die verschiedenen YopPO9/YopPO8-Hybridproteine auf ihre Aktivität untersucht, wie in Abb. 7 dargestellt.

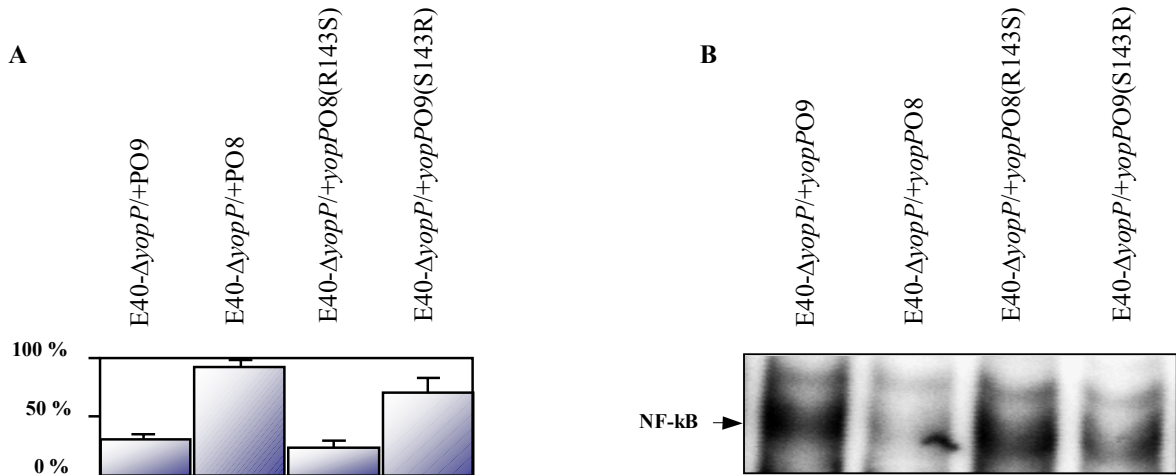


Abb. 7: (A) Apoptoseinduktion bei J774-Makrophagen nach einer 6-stündigen Infektion mit verschiedenen Yersinien-Stämmen (E40- $\Delta yopP/+yopPO9$ = mit *yopPO9* komplementierte E40-*yopP*-Mutanten; E40- $\Delta yopP/+yopPO8$ = mit *yopPO8* komplementierte E40-*yopP*-Mutanten; E40- $\Delta yopP/+yopPO8(R143S)$ = E40- $\Delta yopP$ -Yersinien-Stamm, komplementiert mit *yopPO8* mit interner *yopPO9*-AS S an Position 143, E40- $\Delta yopP/+yopPO9(S143R)$ = E40- $\Delta yopP$ -Yersinien-Stamm, komplementiert mit *yopPO9* mit interner *yopPO8*-AS R an Position 143). Die Apoptose der Zellen wurde durch Anfärben mit Annexin V nachgewiesen. Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin, welches sich bei apoptotischen Zellen in der äußeren Zellmembran befindet. Anschließend wurden die markierten apoptotischen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt.

(B) Inhibition der Translokation von NF- κ B in den Zellkern bei J774-Makrophagen nach 90-minütiger Yersinien-Infektion mit verschiedenen Yersinien-Stämmen. Die infizierten J774-Makrophagen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem hypotonen Puffer auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe 30 min bei 4°C und 45 000 rpm zentrifugiert und die Zellkernproteine wurden durch Behandlung des Zellkernpellets mit eiskaltem Extraktions-Puffer gewonnen. Nach einer Bradford-Proteinbestimmung (siehe 2.6.3.) wurden 7 μ g der Zellkernproteine mit 2-5 ng einer radioaktiv markierten NF- κ B-Sonde versetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde mit 25 mM HEPES (pH 7,9), 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT und 5 % Glycerin 30 min auf Eis inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte mit Hilfe eines 5 %-igen nativen Polyacrylamidgels und das Gel wurde mittels Autoradiographie analysiert (siehe 2.7.5.).

Die AS 143 bestimmt die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung und das Ausmaß der Apoptoseinduktion durch die beiden YopP-Proteine. Durch Austausch von zunächst beiden und darauffolgend von je einer AS im YopP-Bereich 143/144 zwischen YopPO8 und YopPO9 und durch funktionelle Analyse der erhaltenen Stämme, konnte Arginin an Position 143 als eine essentielle AS der YopPO8 Effektor-domäne identifiziert werden. Durch den Austausch von Serin in YopPO9 nach Arginin von YopPO8 konnte die NF- κ B-Inhibition und die Apoptoseinduktion durch YopPO9 deutlich gesteigert werden (Abb. 7). Umgekehrt bewirkte die Mutation von Arginin in YopPO8 nach Serin von YopPO9 einen gegensätzlichen Effekt. Dieser AS-Austausch

hob die starke proapoptotische Aktivität von YopPO8 auf. Dies lässt darauf schließen, dass Arginin an Position 143 die Aktivität von YopPO8 bzw. YopPO9 entscheidend mitbestimmt. Der zusätzliche oder alleinige Austausch der benachbarten AS 144, Threonin bei YopPO9 bzw. Alanin bei YopPO8, zeigte keine nennenswerten Veränderungen in der jeweiligen YopP-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Abb. 8 fasst die Ergebnisse zur Apoptoseinduktion durch die einzelnen YopPO8/YopPO9-Hybridproteine noch einmal schematisch zusammen.

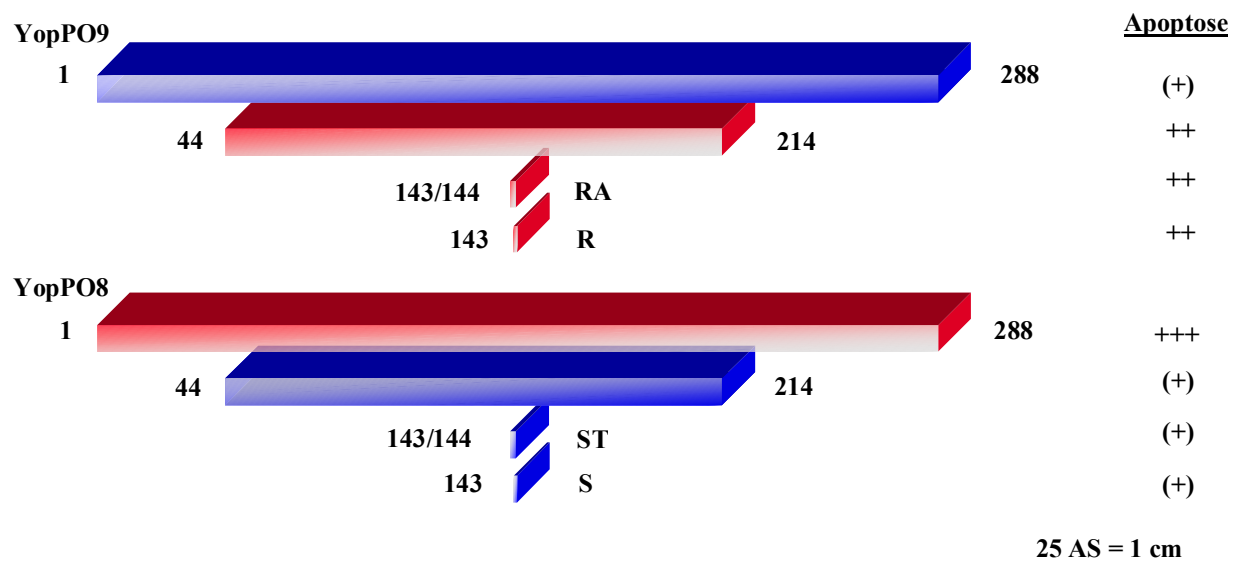


Abb. 8: Übersicht zu den hergestellten YopPO8/YopPO9-Hybridproteinen durch AS-Austausch zwischen YopPO8 und YopPO9, sowie deren Effizienzen in der Apoptoseinduktion bei J774-Makrophagen. Die im jeweiligen Wildtyp (blau und rot entsprechend dem Serotyp) ausgetauschten AS wurden blau und rot entsprechend dem Serotyp markiert. Apoptose infizierter Zellen wurde 6 h nach Infektionsbeginn durch Anfärben mit Annexin V und anschließender Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Apoptoserate: (+) 20-40 %, + 40-60 %, ++ 60-80 % und +++ > 80%)

3.4.3. Analyse der Interaktion von YopP mit IKK β in Kopräzipitationsexperimenten

Im Folgenden versuchten wir der Frage nachzugehen, warum die beiden YopP-Proteine unterschiedliche Aktivitäten in dem dargestellten Zellkultur-Infektionsmodell zeigten. Da YopP mit IKK β interagiert und dessen Aktivität hemmt, besteht die Möglichkeit, dass die unterschiedliche Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch YopPO8 und YopPO9 auf eine unterschiedlich starke Bindung und Hemmung von IKK β zurückzuführen ist. Um die Interaktion zwischen YopP und IKK β beurteilen zu können, wurden Immunpräzipitationen von

transloziertem YopP aus den Lysaten Yersinien-infizierter J774-Makrophagen durchgeführt. Die Infektionen erfolgten mit den Yersinien-Stämmen WA- $\Delta yopP$, WA- $\Delta yopP/+yopPO8$, WA- $\Delta yopP/+yopPO9$, WA- $\Delta yopP/+yopPO8(R143S)$, WA- $\Delta yopP/+yopPO9(S143R)$, E40- $\Delta yopP$, E40- $\Delta yopP/+yopPO8$ und E40- $\Delta yopP/+yopPO9$ (Abb. 9). Transloziertes YopP wurde mit einem polyklonalen anti-YopE-Antikörper präzipitiert, der die N-terminalen 138 AS von YopE erkennt, mit welchen YopP in diesen Konstrukten N-terminal fusioniert ist. Abb. 9 zeigt, dass die verschiedenen YopP-Konstrukte in etwa gleicher Menge von *Yersinia* in die Makrophagen transloziert wurden. Die Detektion von IKK β in den Präzipitaten dokumentiert, dass sowohl YopPO8 und YopPO9, als auch die verschiedenen YopP-Derivate eine Bindung mit IKK β von etwa vergleichbarer Intensität eingehen können.

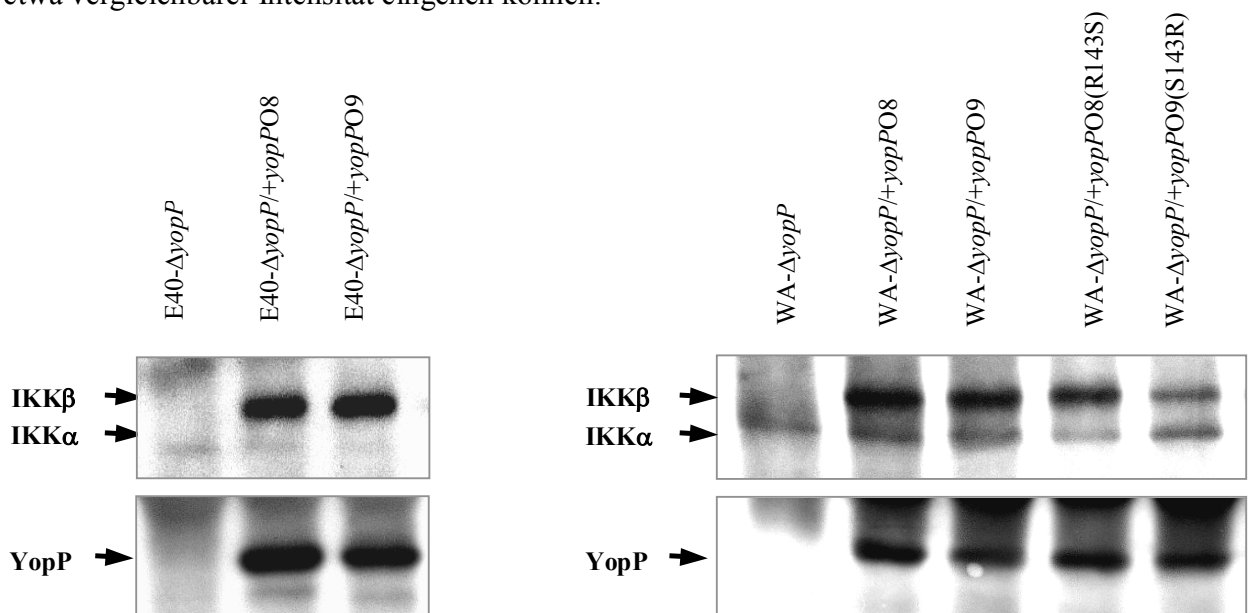


Abb. 9: Interaktion von YopP mit IKK β bei J774-Makrophagen. Je 10^8 J774-Makrophagen wurden 60 min mit verschiedenen Yersinienstämmen infiziert (E40- $\Delta yopP$ = *yopP*-Mutante des Stammes E40; E40- $\Delta yopP/+yopPO8$ = mit *yopPO8* komplementierte E40-*yopP*-Mutante; E40- $\Delta yopP/+yopPO9$ = mit *yopPO9* komplementierte E40-*yopP*-Mutante; WA- $\Delta yopP$ = *yopP*-Mutante des Stammes WA-314; WA- $\Delta yopP/+yopPO8$ = mit *yopPO8* komplementierte WA-314-*yopP*-Mutante; WA- $\Delta yopP/+yopPO9$ = mit *yopPO9* komplementierte WA-314-*yopP*-Mutante; WA- $\Delta yopP/+yopPO8(R143S)$ = WA- $\Delta yopP$ -Yersinien-Stamm, komplementiert mit *yopPO8* mit interner *yopPO9*-AS Serin an Position 143; WA- $\Delta yopP/+yopPO9(S143R)$ = WA- $\Delta yopP$ -Yersinien-Stamm, komplementiert mit *yopPO9* mit interner *yopPO8*-AS Arginin an Position 143). Die infizierten Zellen wurden gewaschen und auf Eis lysiert. Um YopP zu präzipitieren wurde das Lysat mit polyklonalem YopE-AK (erkennt das YopE138-YopP-Fusionsprotein) und Protein-A-Agarose versetzt (siehe 2.7.4.). Die Immunkomplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferriert. Mit einem Teil der Membran wurde ein YopE-Immunoblot durchgeführt, da der YopE-AK das YopP-Fusionsprotein erkennt. Mit dem anderen Membranteil wurde ein Immunoblot mit einem IKK β -AK durchgeführt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper und Chemilumineszenzreaktion (siehe 2.6.6.).

3.5. Untersuchung der Interaktion von YopP mit IKK β mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems

Das Hefe-2-Hybrid-System ist eine anerkannte Methode zur Untersuchung und Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen. In diesem System werden eine DNA-bindende Domäne (LexA) und eine zugehörige 88 AS große transkriptionsaktivierende Domäne (B42) mit Proteinen von Interesse fusioniert und in der Hefe koexprimiert (Estojak *et al.*, 1995). Das Plasmid pEG202 kodiert für die DNA-bindende Domäne LexA, die mit dem N-Terminus des zu untersuchenden Proteins verknüpft wird. Das Plasmid pJG4-5 kodiert für die transkriptionsaktivierende Domäne-B42. Das zu untersuchende Gen wird über sein 5'-Ende mit der Nukleotidsequenz der B42-Domäne verknüpft. Die in der Hefe durch die Plasmide pEG202 und pJG4-5 exprimierten Proteindomänen sind bei fehlender Interaktion der Fusionsproteine nicht in der Lage, die Transkription der *leu2*- und *lacZ*-Reportergene einzuleiten. Eine Aktivierung der Reportergene kann aber durch die mit LexA und B42 fusionierten Proteine induziert werden. Dazu müssen die Fusionsproteine zunächst in den Zellkern wandern, wo sie im Falle einer Interaktion einen funktionsaktiven Transaktivorkomplex ausbilden. Eine positive Interaktionen der Fusionsproteine führt zur Aktivierung des *leu2*- Reportergens, das unter der Kontrolle einer Gal-Aktivierungssequenz steht, sodass die Hefeklone durch Leucinsynthese auf Leucin-freiem Medium wachsen können. Die *lacZ*-Expression, die ebenfalls unter Kontrolle eines Gal-Promotors steht, lässt sich durch β -Galaktosidase-Aktivität aufzeigen (Abb. 2).

Um zu analysieren, ob die Aktivitäten der verschiedenen YopP-Proteine aus unterschiedlichen Intensitäten in der Interaktion mit IKK β hervorgehen, wurde die Interaktion zwischen diesen Proteinen zusätzlich im Hefe-2-Hybrid-System untersucht. Dazu wurde *IKK β* in den mit *EcoRI/SalI*-geschnittenen Vektor pEG202 kloniert und anschließend in den Hefestamm EGY48+pJK101 transformiert. Gleichzeitig wurden die unterschiedlichen *yopP*-Gene mittels PCR und definierten *EcoRI/XhoI*-Primern aus den Yersinien-Stämmen E40- $\Delta yopP/+yopPO8$, E40- $\Delta yopP/+yopPO9$, E40- $\Delta yopP/+yopPO8(R143S)$ und E40- $\Delta yopP/+yopPO9(S143R)$ amplifiziert und in den Vektor pJG4-5 kloniert. Die unterschiedlichen pJG4-5*yopP*-Vektoren wurden separat in den Hefestamm EGY48+pJK101+pEG202*IKK β* sowie EGY48+pJK101+pEG202 transformiert. Zur Analyse der Interaktionsstärke wurden mehrere unabhängige, wie in 2.5.3. beschriebene, ONPG-Versuche mit den verschiedenen YopP-

Derivaten und IKK β durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der Interaktionen erfolgte durch Messung der Umsetzung des Substrates ONPG durch das durch das *lacZ*-Gen kodierte Enzym β -Galaktosidase in einem Zeitraum von 30 min. Als Negativ-Kontrolle wurde der Stamm EGY48+pJK101+pEG202IKK β +pJG4-5Leer verwendet (Abb. 10).

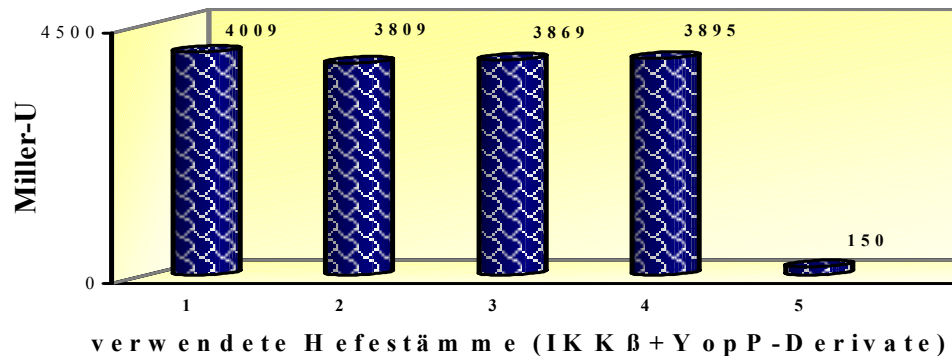


Abb. 10: Nachweis der Interaktion zwischen IKK β und verschiedenen YopP-Derivaten in der Hefe (verwendete Hefe-Stämme: 1 = IKK β +YopPO8; 2 = IKK β +YopPO9; 3 = IKK β +YopPO8(R143S), 4 = IKK β +YopPO9(S143R) und 5 = IKK β +B42). Die Hefezellen wurden nach Stimulation durch Galaktose gewaschen, die Zellezahl bestimmt und anschließend durch Schockgefrierung aufgeschlossen. Zu dem Zellysate wurde das Substrat ONPG hinzugegeben, welches durch die Interaktion exprimierte Enzym β -Galaktosidase umgesetzt wird. Diese Umsetzung wird bei einer OD₄₂₀ gemessen und anhand einer Formel in Miller-Units umgerechnet.

Um sicher zu gehen, dass alle YopP-Derivate sowie IKK β exprimiert wurden, erfolgte die Proteinanalyse aus der Hefe wie in Abschnitt 2.6.4. beschrieben (Abb. 11).

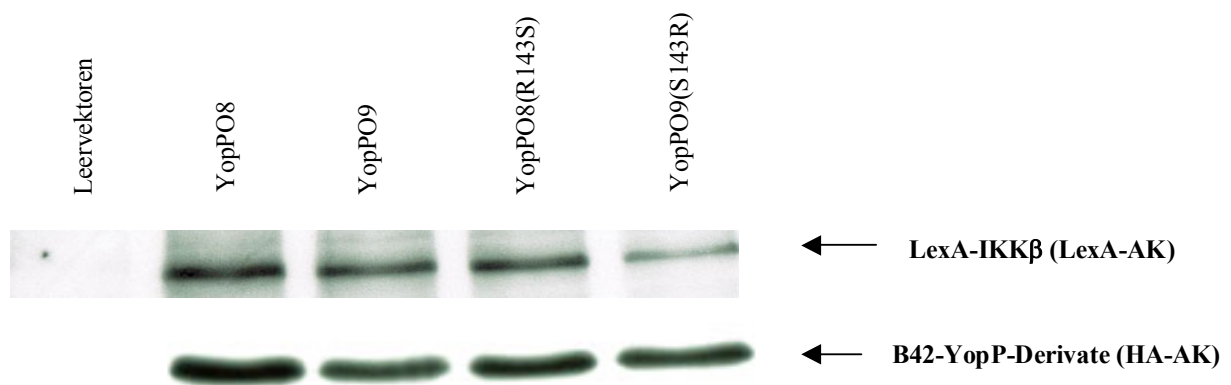


Abb. 11: Nachweis der Expression der LexA-fusionierten IKK β -Proteine und der B42-fusionierten YopP-Derivate aus *S. cerevisiae*-Kulturen. Die Zellen wurden nach der Induktion mit Galaktose in einem definierten, berechneten Aufschluss-Puffer-Volumen lysiert, 1/10 des Lysates wurde anhand eines SDS-Geles aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Proteine wurden anhand ihrer Markierung (LexA, HA) mittels eines Westernblots nachgewiesen.

3.6. Bestimmung potentieller zellulärer Interaktionspartner von *Yersinia enterocolitica* YopPO8 mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems

Da YopPO8 bei den beschriebenen Untersuchungen die stärkste YopP-Aktivität zeigte, versuchten wir mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems nach spezifischen zellulären Interaktionspartnern von YopPO8 zu suchen. Die Suche erfolgte mit einer Mäusemilz-cDNA-Genbank.

3.6.1. Durchsuchung der cDNA-Genbank

Die Durchsuchung der cDNA-Genbank nach Interaktionspartnern erfolgte in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten mit dem Ziel, Hefeklone zu selektionieren, die auf Grund der Interaktion von YopP mit einem Partnerprotein sowohl auf Selektionsmedium wachsen, als auch eine β -Galaktosidase-Aktivität anzeigen können.

Als Ausgangsstamm diente EGY48+pJK101+pEG202yopPO8. Um alle klonierten Genbank-Fragmente abzudecken wurde dieser Stamm in 30 separaten Ansätzen mit Maus-Milz-cDNA transformiert. Die transformierten Hefen wurden anschließend auf 30 YNB+Glu+Leu-Selektivplatten ausplattiert ohne die AS His, Trp und Ura, da die Hefe durch die Aufnahme der Plasmide in der Lage war, diese essentiellen AS selbst zu synthetisieren. Gleichzeitig wurde zur Bestimmung der Transformationszahl eine 10^{-3} -Verdünnung der transformierten Zellen auf einer 100 mm YNB+Glu+Leu-Selektionsplatte angelegt. Nach 2 Tagen Bebrütung wurden die gewachsenen Hefen bei $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren. Die Auszählung der Verdünnung ergab eine Transformantenzahl von 1×10^7 Hefen. Um die Maus-Milz-cDNA-Genbank vollständig abdecken zu können, werden mindestens 2×10^6 Totaltransformanten benötigt, was auf Grund der berechneten Transformantenzahl gewährleistet war.

Um alle gewachsenen Transformanten zu analysieren, muss eine fünf- bis siebenfach höhere Transformantenzahl ($5-7 \times 10^7$) als berechnet untersucht werden. Die entsprechende Hefesuspension wurde auf einer YNB+Raf+Gal-Selektionsplatte ausplattiert und 200 Kolonien wurden nach 2 Tagen Inkubation auf eine YNB+Glu+Leu-Stammplatte übertragen. Die gleiche Prozedur wurde nach 3 und 4 Tagen Inkubation wiederholt, sodass am Ende 600 Hefekolonien, die auf Grund einer potentiellen Interaktion von YopP mit einem Genbankprotein auf

Selektionsmedium wachsen konnten, zur weiteren Untersuchung zur Verfügung standen. Nach Ausstreichen auf YNB+Glu+Leu-Platten wurden die 600 Hefeklone, die in der Lage waren auf Selektionsmedium zu wachsen, auf β -Galaktosidase-Aktivität als zweiten Interaktionsmarker untersucht. Dabei wurden 550 Hefeklone aufgrund ihrer Blaufärbung isoliert und weiterverwendet. Der nächste Schritt war die Isolierung, Analyse und Re-Transformation des Genbank-Plasmides. Dieser Schritt sollte die Anzahl an falsch-positiven Klonen weiter reduzieren, sowie gleich große Genbank-Fragmente identifizieren, von denen jeweils nur ein Klon weiter verwendet werden sollte.

Die Hefepasmide wurden aus der Hefe isoliert, in den *E. coli*-Stamm KC8 transformiert und auf Trp-Mangelmedium ausplattiert, da der *E. coli*-Stamm wie die Hefe in der Lage ist, die durch das Plasmid kodierte AS Tryptophan selbst zu synthetisieren. Von den gewachsenen *E. coli*-Klonen wurde die DNA isoliert, jedes gereinigte Plasmid separat in den Hefestamm EGY48+pJK101+pEG202yopPO8 transformiert und anschließend wieder auf Reporter-gen-Aktivität überprüft. Von diesen 550 Hefeklonen zeigten alle, neben dem Wachstum auf YNB+Raf+Gal-Selektionsplatten, eine deutliche Blaufärbung. Daraufhin wurden alle 550 Hefeklone für den letzten und sensitivsten Test, dem Fusionstest, zur Unterscheidung zwischen echt- und falsch-positiven Klonen verwendet.

Durch die Fusion zweier Hefestämme mit unterschiedlichen Plasmiden und anschließende Selektion wachsen nur die Hefen, die die entsprechenden Plasmide korrekt aufgenommen haben. Eine Interaktion in der aus den zwei haploiden Hefezellen entstandenen Zygote ist sehr spezifisch, da die verschiedenen Plasmide aus zwei getrennten Organismen kommen. Für diese abschließende Kontrolle wurden zuerst die Plasmide pJK101 und pEG202yopPO8 oder pEG202 in den Hefestamm RYH206 nach 2.5.2. transformiert. Parallel dazu wurden die pJG4-5-cDNA-Genbank-Plasmide in den Hefestamm EGY48 transformiert.

Anschließend wurde jeweils eine Kolonie des Hefestammes RYH206+pJK101+pEG202yopPO8 bzw. RYH206+pJK101+pEG202Leervektor mit einer Kolonie des Stammes EGY48+pJG4-5+cDNA in dem Fusionstest nach 2.5.6.4. vereinigt. Zur Kontrolle der Aufnahme aller Plasmide wurden die Hefen auf Selektionsplatten ausplattiert. Von den gewachsenen Hefeklonen wurde stets eine Fünffachbestimmung durchgeführt. Diese wurden wieder dem Reporter-gen-Test unterzogen. Als Kontrolle wurden sowohl fünf Klone pEG202yopPO8+cDNA, als auch fünf Klone pEG202Leervektor+cDNA auf den entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen. Dabei

konnten 46 potentielle Interaktionspartner identifiziert werden (Tab. 18). 504 Klone stellten sich als falsch-positive Klone heraus.

3.6.2. Identifizierung der potentiellen Interaktionspartner von YopPO8

Eine Anzahl potentieller Interaktionspartner wurde mehrfach isoliert. Die meisten Klone beherbergten nur Teilfragmente der klonierten Gene.

Durch DNA-Sequenzierung und Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit Datenbanken mit Hilfe des Computerprogrammes BLAST wurden die potentiellen Interaktionspartner identifiziert.

Tab. 18: Zusammenfassung der identifizierten Genbank-Sequenzen durch BLAST-Search; die Gesamtlänge des Gens wurde in Klammern gesetzt; die Intensität der Interaktion zwischen YopP und potentiellen Interaktionspartnern wurde in Relation zur Interaktionsintensität zwischen YopP und IKK β im β -Galaktosidasetest visuell bestimmt (+++ (YopP+IKK β) = 100 %, ++ ~ 50-75 % und + ~ 25-50 %)

Klone	identifiziertes Gen	Gesamtsequenz des Gen	Intensität der Interaktion im Kreuzungstest
1	Fwd2	AK033129.1 (1364 bp); in frame ab 315 bp	++
1	Tubulin (5)	NM_011655.1 (1334 bp); in frame ab 942 bp	+
1	Fkbp4	XM_216277.1 (1496 bp); in frame ab 901 bp	+
1	ähnlich zu hypothetischem Protein FLJ22316 (Asparaginase-like Sperm Autoantigen)	AK006147 (unbekanntes Protein)	+
1	hypothetisches Protein (similar to Gelsolin)	NM_146120.1 (2195 bp, Sequenz nicht vollständig determiniert)	+
1	hypothetisches Protein XP_212322	XM_212322.1 (266 bp); in frame ab 88 bp	+++
1	Tropomyosin 5	X53753; in frame vollständig 746 bp	++
1	hypothetisches Protein XP_243524	XM_243524.1 (506 bp); in frame ab 60 bp	++
1	hypothetisches Protein	NM_026282.1 (605 bp); in frame ab 11 bp	+++
1	Protein Phosphatase 2A, katalytische Untereinheit	NM_017374.1 (930 bp); in frame ab 391 bp	+++
1	ähnlich zu Cabin1	XM_207031.1 (1760 bp); in frame ab 1101 bp	++

1	“Golgi reassembly stacking protein 2”	XM_130256.2 (1355 bp); in frame ab 915 bp	+
2	Adenin-Nukleotid-Translokator (5)	NM_007451.2 (959 bp); in frame ab 324 bp	++
2	HSP70 (BIP)	AK076079.1 (1967 bp); in frame ab 789 bp	++
2	ähnlich zu Elongations-Faktor 1-Gamma	AF321126.1; in frame vollständig 1313 bp	+++
2	ähnlich zu HSP40	NM_018808.1; in frame vollständig 1022 bp	+
2	Madh1/Smad1	AK017583.1 (1397 bp); in frame ab 232 bp	++
3	Translations-Initiations-Faktor 3, Untereinheit 5	NM_025344.1 (1085 bp); in frame ab 74 bp	+
4	ähnlich zu „Serine-rich“ Protein	AK014874.1 (1691 bp); in frame ab 393 bp	++
5	MAP3K4	NM_011948.1 (4637 bp); in frame ab 3204 bp	++
6	Translations-Elongations-Faktor 1, beta 2	NM_018796.1; in frame vollständig 717 bp	++
6	HSC70	BC006722 (1940 bp), in frame ab 1243 bp	++

3.7. Herstellung von eukaryontischen Expressionsvektoren von potentiellen Interaktionspartnern von YopP

Um die in der Hefe erzielten Ergebnisse zu potentiellen Interaktionspartnern von YopP *in vitro* zu bestätigen, wurden eukaryontische Expressionsvektoren für potentiell relevante Interaktionsmoleküle hergestellt. Die Amplifikation der Gene erfolgte mittels PCR, wobei die sequenzierte DNA der pJG4-5-cDNA-Hefepasmide als Ausgangs-DNA diente. Die verwendeten Primer waren komplementär zur Vektorsequenz. Der Rückwärts-Primer band circa 50 bp entfernt von der zu verwendenden Restriktionsschnittstelle, der Vorwärts-Primer an die Startsequenz des HA-Epitops. Er beinhaltet eine eingefügte *NheI*-Schnittstelle. Die durch PCR vermehrte DNA wurde in die Vektoren pCDNA3.1(-) oder pCMV3B ligiert und nach 2.4.3.11. in *E. coli* DH5 α transformiert.

Grundsätzlich wird empfohlen, die im Hefe-2-Hybrid-System beobachteten Protein-Interaktionen durch unabhängige Methoden zu bestätigen. Dazu wurden innerhalb dieser Arbeit *in vitro*

Bindungsstudien durchgeführt. Die *in vivo*-Kopräzipitationsexperimente sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

Durch Präzipitationsversuche mit GST-YopP wurde die *in vitro* Interaktion von YopP mit seinen potentiellen eukaryontischen Bindungspartnern analysiert. Bei diesen Versuchen wurden HEK-293-Zellen mit den Expressionsvektoren für die jeweiligen Interaktionspartner transfiziert. Die Lysate der transfizierten Zellen wurden einer Präzipitation mit GST-YopPO8 bzw. GST als Negativkontrolle und Agarose zugeführt. Die Präzipitation wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

3.7.1. Translations-Elongations-Faktor 1 beta 2 (eEF1B β)

Der Genbankklon, welcher für den Translations-Elongations-Faktor 1 beta 2 kodiert, wurde am häufigsten isoliert. Der Leseraster dieses Genes ist vollständig an die B42-Gensequenz fusioniert. Somit wird dieses Protein, das 225 AS besitzt und 31 kDa groß ist, vollständig und korrekt exprimiert. Durch Proteinsequenzanalysen konnten bestimmte Proteinstrukturen definiert werden (Abb. 12). Eine Interaktion von GST-YopPO8 mit dem Translations-Elongations-Faktor 1 beta 2 konnte in den *in vitro*-Präzipitationsexperimenten nachgewiesen werden.



Abb. 12: *in vitro*-Präzipitation von eEF1B β -HA (**links**) $9 \cdot 10^6$ 293-Zellen wurden transfiziert mit dem Expressionvektor pCDNA3.1(-)+*eEf1b* β -HA. Das Zelllysate (1/10 davon wurde als positive Kontrolle verwendet) wurde mit 2 μ g GST/GST-YopPO8 und Glutathion-Sepharosekügelchen inkubiert, der Immunkomplex anhand eines SDS-Geles separiert, auf eine PVDF-Membran transferiert. Die eEF1B β -Proteine wurden anschließend mit einem HA-AK detektiert und durch Westernblot nachgewiesen.

(**rechts**) Schematische Darstellung des eEF1B β -Proteins mit bekannten Domänen (Elongation Faktor 1 Nukleotid-Austausch-Domäne Perez, J. M. *et al.*, 1999; Elongation Faktor 1: Signatur 1/ Elongation Faktor 1: Signatur 2, beide Signaturen stimulieren den Austausch von GDP zu GTP bei eEF1B α van Damme *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2000)

3.7.2. Mothers against decapentaplegic (dpp) homolog 1 (SMAD1)

Die Sequenz dieses Genes (Wirbeltier-Homologe zu *mad* werden als *smad* bezeichnet) ist ab 232 bp im richtigen Leseraster an die B42-Domäne fusioniert. Das gesamte Protein besitzt 465 AS und ist 40 kDa groß. Es gliedert sich in verschiedene Domänen. Die WHEP-TRS-Domäne ist 46 AS groß und befindet sich im N-Terminus des Proteines. Die MH1-Domäne (MAD homolog 1) befindet sich auch am N-Terminus und ist in der Lage, durch 11 konservierte, Haarnadelstrukturen-bildende AS an DNA zu binden. Die MH2-Domäne (MAD homolog 2) befindet sich im C-Terminus des Proteins und vermittelt Interaktionen mit einer Vielzahl von Proteinen. Auch für SMAD1 konnte eine *in vitro*-Kopräzipitation mit GST-YopP nachgewiesen werden.

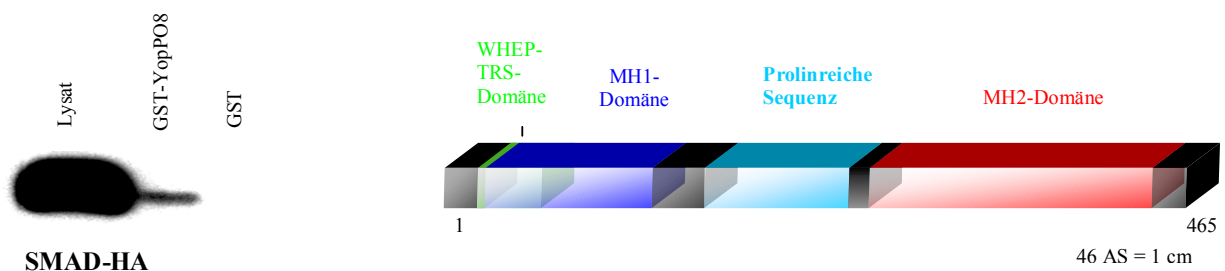


Abb. 13: *in vitro*-Präzipitation von SMAD1-HA (links) $9 \cdot 10^6$ 293-Zellen wurden transfiziert mit dem Expressionsvektor pCDNA3.1.(-)+*Smad1*-HA. Das Zellysate (1/10 davon wurde als positive Kontrolle verwendet) wurde mit 2 μ g GST/GST-YopPO8 und Glutathion-Sepharosekügelchen inkubiert, der Immunkomplex anhand eines SDS-Geles separiert, auf eine PVDF-Membran transferiert. Die SMAD1-Proteine wurden anschließend mit einem HA-AK detektiert und durch Westernblot nachgewiesen.

(rechts) Schematische Darstellung des SMAD1-Proteins mit bekannten Domänen (WHEP-TRS-Domäne, welche mit ATP interagiert Mirande *et al.*, 1991; MH1 (Mad homology 1, welche für die DNA-Bindung verantwortlich ist); MH2 (Mad homology 2, welche für die Protein-Interaktion verantwortlich ist) Yingling *et al.*, 1996, Huang *et al.*, 2000) (rechts)

3.7.3. Protein-Phosphatase 2Ac (PP2Ac)

Ein weiterer isolierter Plasmidklon kodiert für ein 539 bp großes Fragment des Gens für die Protein-Phosphatase 2Ac (*Pp2Ac*). PP2Ac ist ein 244 AS und 36 kDa großes Protein. Dieses Protein stellt die katalytische Untereinheit der Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2 dar. Der PP2-Komplex besteht aus der katalytischen Untereinheit C, einer 60 kDa großen regulatorischen

Untereinheit A und einer B-Untereinheit, welche wiederum aus Proteinen unterschiedlicher Größe (54-, 55-, 72- und 130 kDa) zusammengesetzt ist (Shenolikar and Nairn, 1991). Auch PP2Ac interagiert mit GST-YopP in der *in vitro*-Präzipitation.

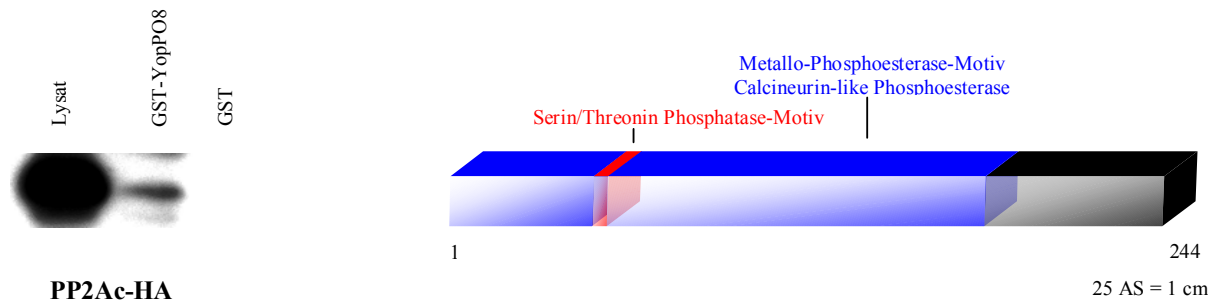


Abb. 14: *in vitro*-Präzipitation von PP2Ac-HA ([links](#)) $9 \cdot 10^6$ 293-Zellen wurden transfiziert mit dem Expressionvektor pCDNA3.1(-)+Pp2Ac-HA. Das Zelllysat (1/10 davon wurde als positive Kontrolle verwendet) wurde mit 2 μ g GST/GST-YopPO8 und Glutathion-Sepharosekügelchen inkubiert, der Immunkomplex anhand eines SDS-Geles separiert, auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PP2Ac-Proteine wurden anschließend mit einem HA-AK detektiert und durch Westernblot nachgewiesen. **(rechts)** Schematische Darstellung des PP2Ac-Proteins mit den bekannten Domänen (Phosphoesterase-Domänen, welche innerhalb der Association zu DNA-Polymerasen eine Rolle spielen Aravind and Koonin, 1998) ([rechts](#))

3.7.4. F-box/WD40-repeat protein 2 (FWD2)

Bei diesem identifizierten Genbank-Klon handelt es sich um ein Protein aus der Klasse der Ubiquitinligasen. Die Gesamtsequenz der cDNA des Klonen ist 1364 bp lang. Bei der Sequenzierung wurde deutlich, dass am 5'-Ende 139 bp zur Gesamtsequenz fehlten. Das vollständig exprimierte Protein setzt sich aus 454 AS zusammen und ist 51,5 kDa groß. Sequenzvergleiche und Motivanalysen der AS-Sequenz ergaben verschiedene konservierte Domänen innerhalb des Proteins. Dieses Protein enthält eine Leucin-reiche AS-Sequenz, eine F-Box Domäne und 4 WD40-Repeat-Domänen (Abb. 15), wobei die F-Box-Struktur und die WD-Domänen Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Bei der GST-YopPO8-Kopräzipitation konnte eine *in vitro*-Interaktion von YopP mit FWD2 nachgewiesen werden.

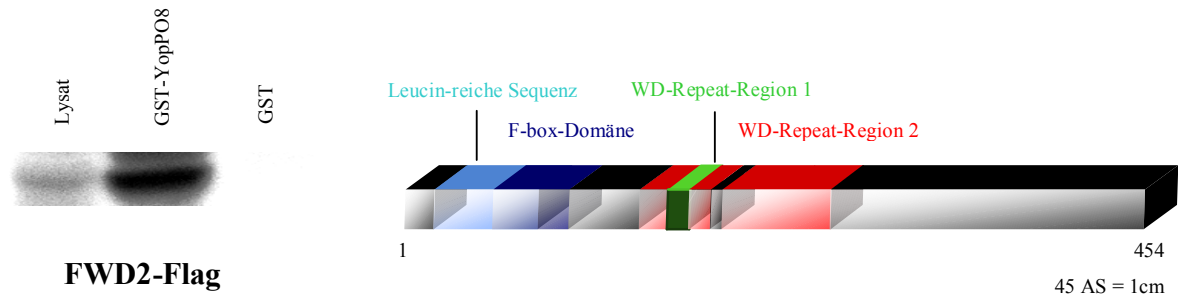


Abb. 15: *in vitro*-Präzipitation von FWD2-FLAG (**links**) $9 \cdot 10^6$ 293-Zellen wurden transfiziert mit dem Expressionvektor pCIneo-Flag-*Fwd2*. Das Zelllysate (1/10 davon wurde als positive Kontrolle verwendet) wurde mit 2 μ g GST/GST-YopPO8 und Glutathion-Sepharosekügelchen inkubiert, der Immunkomplex anhand eines SDS-Geles separiert, auf eine PVDF-Membran transferiert. Die FWD2-Proteine wurden anschließend mit einem Flag-AK detektiert und durch Westernblot nachgewiesen. (**rechts**) Schematische Darstellung des FWD2-Proteins mit den Domänen (F-Box-Domäne, agiert als Interaktionsstelle für ein ubiquitiniertes Protein; WD40-Domäne WD-Di-Peptid mit 40-facher Wiederholung, agiert als Kontaktstelle für definierte phosphorylierte Proteine Schulman *et al.*, 2000) (**rechts**)

Weiterführende Interaktionsstudien werden sowohl mit den bereits in GST-Kopräzipitation charakterisierten Interaktionspartnern, als auch mit noch nicht analysierten weiteren potentiellen Interaktionspartnern durchgeführt. Möglicherweise wird hierfür auch das modifizierte YopPO8(R143S) verwendet, da, wie bei manchen Enzymen nachgewiesen, eine schwächere Aktivität des Proteins mit einer stärkeren und länger anhaltenden Bindung an sein Substrat vergesellschaftet sein kann.

3.8. Herstellung des YopP-AK

Um eine Interaktionen zwischen YopP und möglichen Interaktionspartnern *in vitro* und *in vivo* nachweisen zu können, wurde ein polyklonaler Antikörper (AK) gegen YopPO8 hergestellt. Dazu wurde von dem Yersinien-Stamm WA-314 das *yopP*-Gen durch PCR mit den Primern YopP+1Bg/IIforward und YopP+SalIRev amplifiziert. Dieses Amplifikat wurde gereinigt, mit Restriktionsenzymen geschnitten und in den Vektor pGEX4T-3 ligiert. Das Konstrukt wurde anschließend in den Yersinien-Stamm WA- Δ *yopP* transformiert. Die Analyse GST-YopP-produzierender Klone erfolgte auf Proteinebene nach Induktion mit IPTG.

Die Aufreinigung des GST-YopP-Fusionsproteins aus großem Volumen erfolgte wie in 2.6.2. beschrieben. Ein Kaninchen wurde viermal im Abstand von 4 Wochen mit je 500 µg GST-YopP immunisiert. Vier Wochen nach der letzten Immunisierung wurde durch Ausbluten des Kaninchens das Serum gewonnen und der AK-Titer gegen YopP bestimmt.

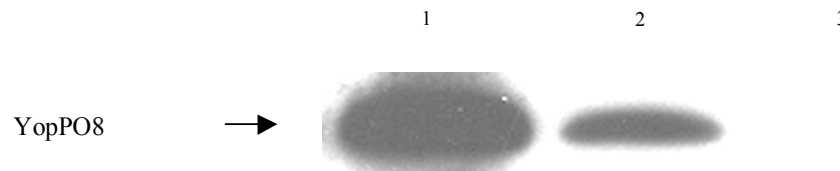


Abb. 16: Austesten des gewonnenen YopPO8-Antiserums in verschiedenen Verdünnungen im Immunoblot gegen *Yersinia*-transloziertes YopP in J774-Makrophagenlysate (1 = 1 : 1000; 2 = 1 : 10000, 3 = YopP-freies Serum (nicht infizierte J774-Makrophagen) als Negativkontrolle). $5 \cdot 10^7$ J774-Makrophagen wurden mit dem Yersinienstamm WA- $\Delta yopP/+yopPO8$ 60 min infiziert. Die Zellen wurden auf Eis 10 min lysiert. 1/50 Volumen des Lysates wurde auf ein SDS-Geles aufgetragen und getrennt, auf eine PVDF-Membran transferriert und anschließend mit dem isolierten polyklonalen YopP-AK in verschiedener Verdünnung inkubiert. Die Detektion des YopP-Proteins erfolgte anhand eines Westernblots.

3.9. Vergleich der YopP-Expression in verschiedenen Organismen

Unter Verwendung des neuen YopP-AK wurden Lysate verschiedener YopP-exprimierender Organismen auf eine eventuelle Modifikation von YopP hin untersucht.

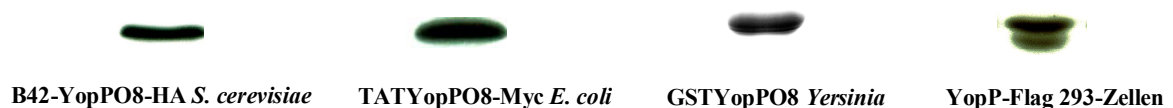


Abb. 17: Vergleich von in verschiedenen Organismen überexprimierten YopP-Proteinen und dessen Präzipitation. Bei der Expression in *S. cerevisiae*, *E. coli* und *Yersinia* handelt es sich um eine induzierte Expression nach Stimulation mit den Induktoren Galaktose (*S. cerevisiae*) und IPTG (*E. coli* und *Yersinia*). Die Expression des YopP-Flag in 293-Zellen erfolgte nach deren Transfection mit dem Expressionsplasmid pCMV2B-Flag-*yopP*. Die Zellzahl wurde nach der Induktion bestimmt und als Positivkontrolle eine OD₆₀₀ von 0,1 durch Aufkochen lysiert. Die Detektion des YopP-Proteins wurde anhand der Markierungen mit den definierten AK durch Westernblot detektiert.

Bei Expression von YopP in 293-Zellen wurde eine Doppelbande erkennbar, während bei Expression in Hefe oder Bakterien jeweils nur eine YopP-Bande sichtbar war. Untersuchungen,

ob die Doppelbande möglicherweise auf eine relevante Modifikation von YopP durch die Wirtszelle zurückgeführt werden kann, sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

3.10. Identifizierung der Bindungsdomäne von IKK β an YopPO8 mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems

Das Hefe-2-Hybrid-System bietet die Möglichkeit, Bindungsdomänen zweier miteinander interagierender Proteine zu lokalisieren. Wie bereits beschrieben, liegt das IKK-Signalosom als ein Multiproteinkomplex im Zellzytoplasma vor. Dieser Komplex setzt sich aus zwei aktiven Kinasen (IKK α , IKK β), sowie aus mehreren Gerüstproteinen (NEMO (IKK γ) und IKAP) zusammen. Von diesem Komplex ist bisher nur IKK β als ein Zielprotein von YopP ermittelt worden. Es sollte die Interaktionsstelle von IKK β mit YopP definiert werden. Das *Yersinia yopPO8*-Gen wurde mittels PCR mit definierten Primern vervielfältigt und nach Restriktionsverdau in den Vektor pEG202 kloniert. Anschließend wurde das Plasmid in den Hefestamm EGY48+pJK101 transformiert.

Um herauszufinden, welcher Bereich von IKK β für die Interaktion mit YopP verantwortlich ist, wurden verschiedene IKK β -Fragmente als B42-Fusionsproteine unter Verwendung von definierten Primern amplifiziert. Dabei handelte es sich um N-terminale Deletionsmutanten von IKK β (Abb. 19), in dieser Arbeit als IKK β 20, IKK β 40, IKK β 60, IKK β 100 und IKK β 190 bezeichnet. Die Zahlen geben die Anzahl der deletierten AS von IKK β an. Über definierte Schnittstellen wurden die DNA-Fragmente in den Vektor pJG4-5 kloniert und anschließend durch PCR und Restriktionsanalyse überprüft. Abschließend wurden die Plasmide in den Hefestamm EGY48+pJK101+pEG202*yopPO8* transformiert.

Die Fusionsproteine B42-IKK β , B42-IKK β 20, B42-IKK β 40, B42-IKK β 60, B42-IKK β 100 waren im Hefe-2-Hybrid-System in der Lage, durch Interaktion mit LexAYopPO8 auf YNB+Gal-Selektionsplatten zu wachsen, sowie die Expression des *lacZ*-Reportergens zu aktivieren. Die Deletion von 190 AS bei IKK β führte zum Verlust der Interaktion mit YopP. Durch diese Analyse konnte ein IKK β -AS-Bereich eingegrenzt werden, der die Interaktion mit YopPO8 herzustellen scheint. Dieser Proteinabschnitt befindet sich offenbar im N-terminalen Bereich von IKK β zwischen AS 100 und AS 190 (Abb.20, 21).

3.10.1. Gezielter AS-Austausch von IKK β nach IKK α

Da aus den vorangegangenen Interaktionsstudien der AS-Bereich 100-190 im N-Terminus von IKK β für die Interaktion mit YopPO8 relevant erscheint, wurden nun gezielte AS-Mutationen in IKK β vorgenommen. Um Anhaltspunkte für die Interaktion kritischer Aminosäuren zu bekommen, wurden die AS-Sequenzen der Kinase-Domänen von IKK β , IKK α und MAPKK3 von unterschiedlichen Organismen miteinander verglichen. Eine Interaktion von YopP mit IKK β und MAPKK3, nicht aber mit IKK α , ist aus Publikationen und eigenen Vorexperimenten bekannt. Diese AS-Sequenzen wurden mit dem ClustalX-Programm analysiert.

IKKβMaus	12	cgawEMKERLGTGGFGNVIRWHNQATGEQIAIKQCR~QELsPKNRNRWCLEIQIMRRLNH	70
IKKβRatte		WEMKERLGTGGFGNVIRWHNQVTGEQIAIKQCR~QELsPKNRDRWCLEIQIMRRLNH	70
IKKβHuman		WEMKERLGTGGFGNVIRWHNQETGEQIAIKQCR~QELsPRNRERWCLEIQIMRRLTH	70
IKKβDroso.		WERCRLGEGGFGLVIHWRNRRTTGREIATKHIKEADQqVKLSERWNKELNWSRQFKN	102
IKKβlike Droso.		WERCRLGEGGFGLVIHWRNRRTTGREIATKHIKEADQqVKLSERWNKELNWSRQFKN	102
MAPKK3Maus		ISELGRGAYGVVEKVRHAQSGT IMAVKRIR~ATVnTQEQKRLMLDLDIMRTVDC	87
MAPKK3Human		ISELGRGAYGVVEKVRHAQSGT IMAVKRIR~ATVnSQEQKRLMLDLDIMRTVDC	92
IKKαMaus		WEMRERLGTGGFGNVSLYQHRELDLKI AIKSCRLE~LsSKNRERWCHEIQIMKKLDH	70
IKKαHuman		WEMRERLGTGGFGNVCLYQHRELDLKI AIKSCRLE~LsTKNRERWCHEIQIMKKLNH	70
IKKβMaus	71	PNVVAARDVPEGM~~~~~QNLapndlpLLAMEYCGgDLRRYLnqfENCcgLREGAVLT	124
IKKβRatte	71	PNVVAARDVPEGM~~~~~QNLapndlpLLAMEYCGgDLRRYLnqfENCcgLREGAILT	124
IKKβHuman	71	PNVVAARDVPEGM~~~~~QNLapndlpLLAMEYCGgDLRKYLnqfENCcgLREGAILT	124
IKKβDroso.	104	PHIVAGVDI~EDP~~~~~DFLeyl ngmVIVLEYCNGgDVRKRL---QNAngLTFEFVRQ	162
IKKβlikeD.	104	PHIVAGVDI~EDP~~~~~DFLeyl ngmVIVLEYCNGgDVRKRL---QNAngLTFEFVRQ	162
MAPKK3Maus	88	FYTVTFYGALFRE~~~~~GDV-----WICMELMDT~SLRKVL---EKNmkIPEDILGE	135
MAPKK3Hu.	93	FYTVTFYGALFRE~~~~~GDV-----WICMELMDT~SLRKVL---DKNmtIPEDILGE	139
IKKαMaus	71	ANVVKACDVPEEL~~~~~NFL-----ILAMEYCSGgDLRKLL---NKCCgLKESQILS	123
IKKαHuman	71	ANVVKACDVPEEL~~~~~NIL-----ILAMEYCSGgDLRKLL---NKCCgLKESQILS	123
IKKβMaus	125	LLSDIASALRYLHENRI IHRDLKPENIVLqqgEKRLIHKI IDLGYAKELDQGs~LCTSFV	183
IKKβRatte	125	LLSDIASALRYLHENRI IHRDLKPENIVLqqgEKRLIHKI IDLGYAKELDQGs~LCTSFV	183
IKKβHuman	125	LLSDIASALRYLHENRI IHRDLKPENIVLqqgEQLIHKI IDLGYAKELDQGs~LCTSFV	183
IKKβDroso.	163	ILGALRKALHFLHSQGI CHRDLKPDNIVIqrgDGKKIYKLTDFGLARG~TPDT~MVQSVV	224
IKKβlikeD.	163	ILGALRKALHFLHSQGI CHRDLKPDNIVIqrgDGKKIYKLTDFGLARG~TPDT~MVQSVV	224
MAPKK3Maus	136	IAVSIVRALEHLHKS SVIHRDVKPSNVLI---NKEGHVKMCDFGISGYLED SA~KTMD~A	192
MAPKK3Hu.	140	IAVSIVRALEHLHKS SVIHRDVKPSNVLI---NKEGHVKMCDFGISGYLED SA~KTMD~A	196
IKKαMaus	124	LLSDIGSGIRYLHENKI IHRDLKPENIVL---QDVGIHKI IDLGYAKDVDQGs~LCTSFV	182
IKKαHuman	124	LLSDIGSGIRYLHENKI IHRDLKPENIVL---QDVGIHKI IDLGYAKDVDQGs~LCTSFV	182

Abb. 18: AS-Sequenzvergleich der Kinase-Domänen von IKK β Maus (Genbank accession no. AAC23557), IKK β Ratte (Genbank accession no. AAF21978), IKK β Human (Genbank accession no. AAC64675), IKK β *Drosophila* (Genbank accession no. AAG02485), IKK β -like-*Drosophila* (Genbank accession no. AAF04130), MAPKK3Maus (Genbank accession no. O09110), MAPKK3Human (Genbank accession no. P46734), IKK α Maus (Genbank accession no. Q60680) und IKK α Human (Genbank accession no. O15111); die aus dem AS-Sequenz-Vergleich potentiell zu analysierenden 7 AS wurden verstärkt hervorgehoben

Durch den Vergleich der verschiedenen IKK β -, MAPKK3- und IKK α -Kinase-Domänen wurden sieben potentiell essentielle AS eingegrenzt, welche auf Grund ihrer Physiologie zwischen IKK β -/MAPKK3- und IKK α stark differieren (z. B. sauer→basisch). Es wurden entsprechende Punktmutationen eingefügt. Diese IKK β -Punktmutationen wurden als IKK β 101, -107, -120, -152 und IKK β 166 bezeichnet (Abb. 19). Bei den Ansätzen IKK β 152 und IKK β 166 wurden 2 AS, bei den Ansätzen IKK β 101, IKK β 107 und IKK β 120 wurde jeweils eine AS von der AS-Sequenz IKK β nach IKK α ausgetauscht. Die Mutationen wurden mit Hilfe der QuikChange XL Site-Directed Mutagenese (Stratagene) mit definierten Primern nach 2.4.3.8. durchgeführt. Die DNA wurde anschließend sequenziert und in den Hefestamm EGY48+pJK101+pEG202yopPO8 transformiert.

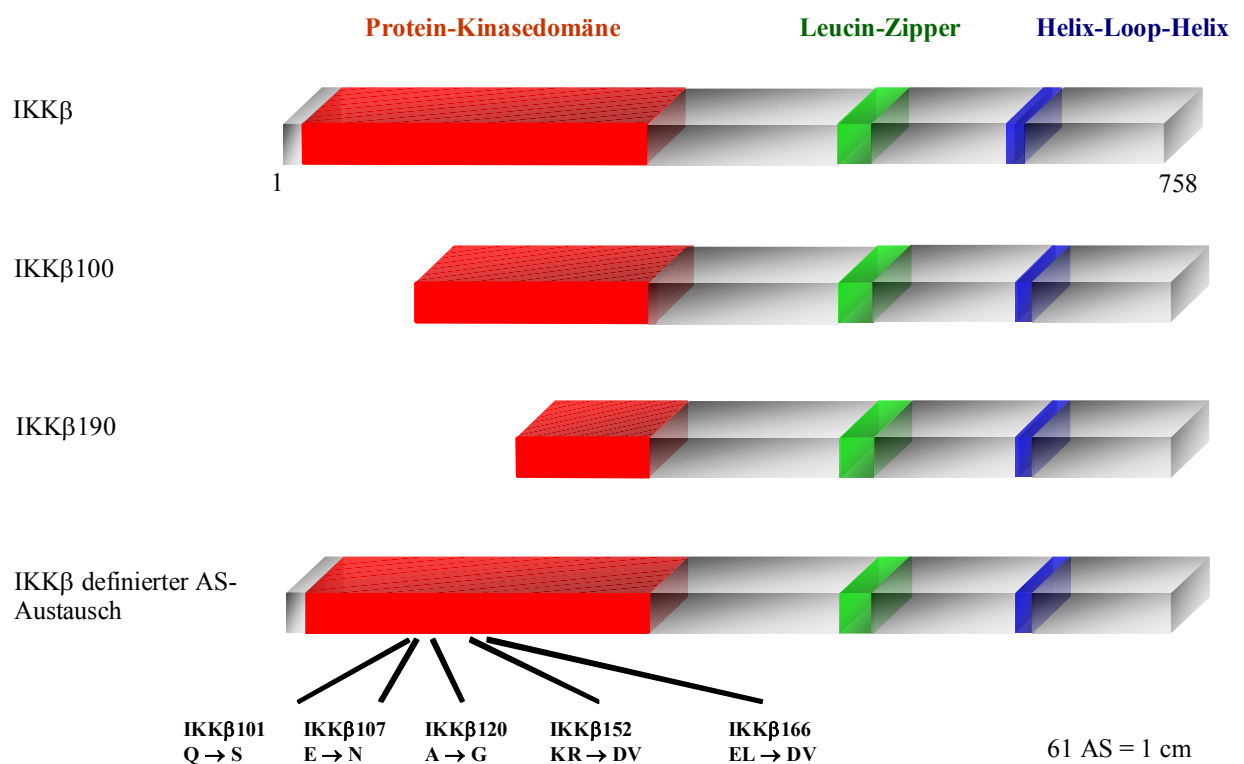


Abb. 19: Übersicht über die 8 klonierten IKK β - Derivate (IKK β , IKK β 100, IKK β 190, IKK β 101, IKK β 107, IKK β 120, IKK β 152 und IKK β 166). Bei IKK β 100 und IKK β 190 handelt es sich um Deletionsmutanten von IKK β , die Punktmutationen (IKK β 101, IKK β 107, IKK β 120, IKK β 152 und IKK β 166) wurden mittels QuikChange XL Site-Directed Mutagenese (Stratagene) in IKK β eingefügt.

3.10.2. Analyse der Interaktion von YopPO8 mit IKK β -Deletions- und IKK β -Punktmutanten

Um die Interaktion mittels β -Galaktosidasefärbung nachzuweisen, wurde von jeder Transformation eine YNB+Glu+Leu-Stammpfanne und eine YNB+Raf+Gal+X-Gal Selektionspfanne ausgestrichen und 2 Tage bei 27°C inkubiert. Durch die Interaktion von YopP mit IKK β auf der Selektionspfanne YNB+Raf+Gal+X-Gal können die Hefezellen die Markergene *leu2* und *lacZ* transkribieren, was zu Wachstum sowie zu einem Farbumschlag (Blaufärbung) führt. Keine Interaktion führt zu einer Inhibition des Wachstums, da die essentielle AS Leucin nicht synthetisiert werden kann. In Abb. 20 und in Tab. 19 sind die Ergebnisse der Interaktionsanalyse zusammengefasst.

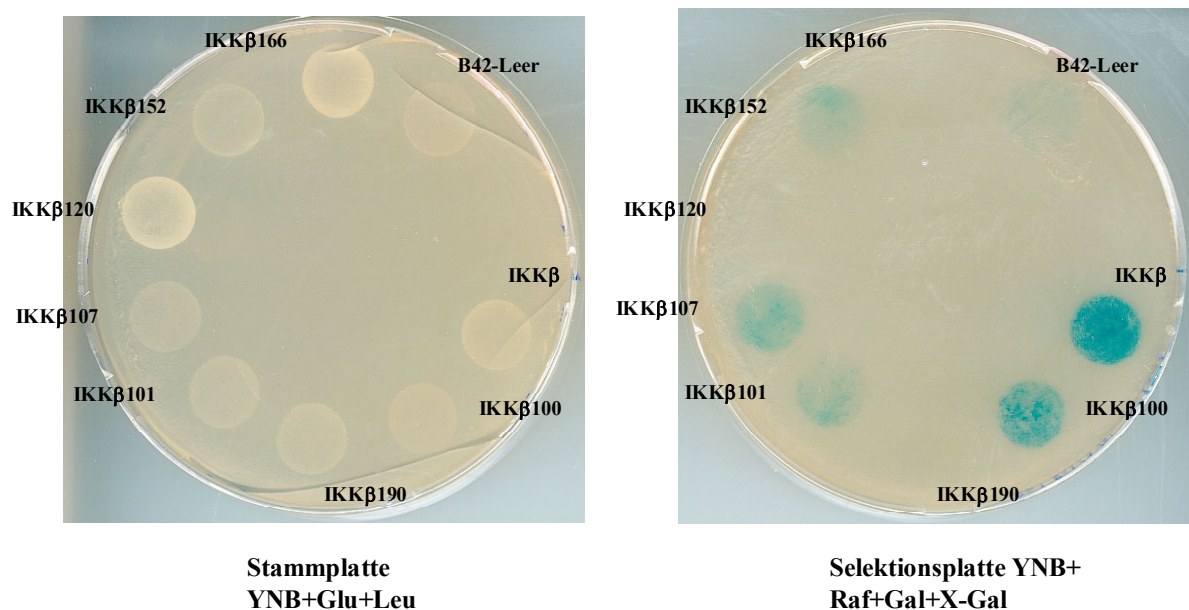


Abb. 20: Qualitativer Nachweis der Interaktion zwischen IKK β -Derivaten und YopPO8. Bei der Stammpfanne wurde Glucose als Zuckerquelle und Leucin hinzugefügt, sodass alle Hefezellen ohne zusätzlichen Interaktions-Selektionsdruck wachsen konnten. Bei der Selektionspfanne wurde Raffinose als Zuckerquelle und Galaktose als Stimulator hinzugegeben. Durch die Interaktion von YopP mit IKK β können die Hefezellen die Markergene *leu2* und *lacZ* transkribieren, was zu Wachstum sowie zu einem Farbumschlag (Blaufärbung) führt. Keine Interaktion führt zu einer Inhibition des Wachstums, da die essentielle AS Leucin nicht synthetisiert werden kann.

Tab. 19: Zusammenfassung der beobachteten Interaktionen zwischen YopPO8 und den IKK β -Derivaten

Fragment	Beschreibung	Visuelle Charakterisierung der Interaktionsstärke
B42	B42-Domäne	/
B42-IKK β	Vollständiges B42-IKK β -Fusionsprotein	++++
B42-100IKK β	Deletion von N-terminalen 100 AS bei IKK β	+++
B42-190IKK β	Deletion von N-terminalen 190 AS bei IKK β	/
B42-101IKK β	Modifikation der AS 101 Q \rightarrow S von IKK β nach IKK α (sauer, hydrophil \rightarrow basisch, aliphatisch)	++
B42-107IKK β	Modifikation der AS 107 E \rightarrow N von IKK β nach IKK α (sauer, hydrophil \rightarrow sauer, hydrophil)	++
B42-120IKK β	Modifikation der AS 120 A \rightarrow Q von IKK β nach IKK α (neutral, aliphatisch \rightarrow sauer, hydrophil)	/
B42-152IKK β	Modifikation der AS 152 KR \rightarrow DV von IKK β nach IKK α (basisch, hydrophil \rightarrow sauer, hydrophil, aliphatisch, hydrophob)	++
B42-166IKK β	Modifikation der AS 166 EL \rightarrow DV von IKK β nach IKK α (sauer, hydrophil, aliphatisch, hydrophob \rightarrow sauer, hydrophil, aliphatisch, hydrophob)	/

3.10.3. Quantifizierung der Interaktion von YopPO8 mit IKK β -Deletions- und IKK β -Punktmutanten

Um die Interaktionsstärke zwischen den IKK β -Derivaten und YopP quantitativ zu charakterisieren, wurden mehrere unabhängige β -Galaktosidase-Versuche nach 2.5.3. durchgeführt. Die Interaktionsstärke wurde durch Bestimmung der Umsetzung des Substrates ONPG durch die β -Galaktosidase bei positiver Interaktion analysiert. Die in Tab. 19 dokumentierten, visuell bestimmten Unterschiede in der Interaktionsstärke bestätigten sich in diesem Versuch. IKK β , die Deletionsmutante IKK β 100 und die IKK β -Punktmutanten 101, -107 und 155 zeigten eine deutliche Interaktion. Dagegen ließ sich keine Interaktion zwischen YopPO8 und IKK β 190 und den IKK β -Punktmutanten -120 und -166 nachweisen (Abb. 21).

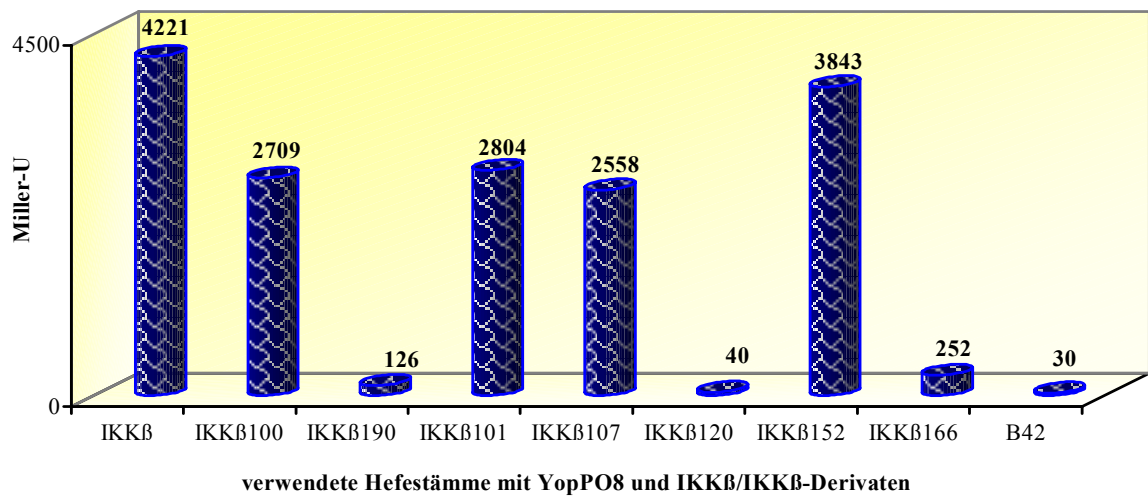


Abb. 21: Quantifizierung der Interaktion zwischen YopPO8 und IKKβ mittels β-Galaktosidase-Test. Die Hefezellen (IKKβ+YopPO8; Deletionsmutante IKKβ100+YopPO8; Deletionsmutante IKKβ190+YopPO8, Punktmutation IKKβ101+YopPO8, Punktmutation IKKβ107+YopPO8, Punktmutation IKKβ120+YopPO8, Punktmutation IKKβ152+YopPO8, Punktmutation IKKβ166+YopPO8 sowie YopPO8+Leervektor pJG4-5 B42; die Zahl hinter IKKβ definiert bei Deletionsmutanten die Deletion der Anzahl N-terminaler AS, bei Punktmutationen die mutierte AS) wurden nach Stimulation durch Galaktose gewaschen, die Zellezahl bestimmt und anschließend durch Schockgefrierung aufgeschlossen. Zu dem Zellysate wurde das Substrat ONPG hinzugegeben, welches durch das durch Interaktion exprimierte Enzym β-Galaktosidase umgesetzt wird. Diese Umsetzung wird bei einer OD₄₂₀ gemessen und anhand einer Formel in Miller-Units umgerechnet.

Die Expression der IKKβ-Derivate in der Hefe wurde mittels Westernblot kontrolliert, wie in Abschnitt 2.6.4. beschrieben (Abb. 22).

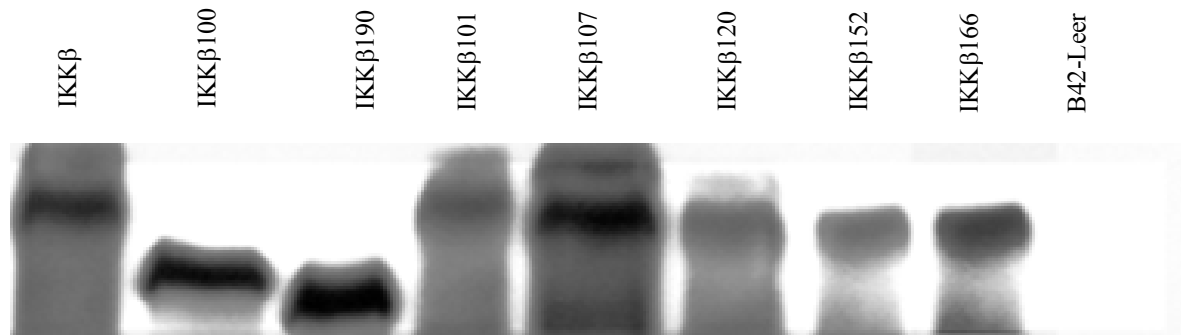


Abb. 22: Nachweis der IKK β -Expression in der Hefe mittels Westernblot. Die Zellen wurden nach der Induktion mit Galaktose in einem definierten, berechneten Aufschluss-Puffer-Volumen lysiert, 1/10 des Lysates wurde anhand eines SDS-Geles aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferriert. Die Detektion der B42-IKK β -Proteine erfolgte mit Hilfe des AK gegen das B42-HA-Epitop. Die IKK β -Deletionsmutanten (IKK β 100, IKK β 190) haben eine höhere elektrophoretische Mobilität im Vergleich zu Wildtyp IKK β bzw. zu den IKK β -Punktmutanten (IKK β 101, IKK β 107, IKK β 120, IKK β 152, IKK β 166).

3.10.4. *in vitro*-Charakterisierung der Interaktion zwischen IKK β /IKK β 120 und YopPO8

Zusätzlich zur Analyse der Interaktion in der Hefe, wurde die Bindung zwischen YopPO8 und IKK β bzw. IKK β 120 *in vitro* mittels GST-Präzipitation untersucht. Dafür wurde die AS-Mutation 120 (Alanin nach Glutamin) durch QuikChange XL Site-Directed Mutagenese in das in den eukaryontischen Expressionsvektor pCMV2B-Flag klonierte *IKK β* -Gen eingefügt und sequenziert. HEK293-Zellen wurden wie in 2.7.2. beschrieben mit den IKK β -Vektoren transfiziert. Anschließend wurde von den Zelllysaten eine GST-Präzipitation mit GST-YopPO8 durchgeführt, wie in 2.7.3. dargestellt. Diese Versuche bestätigten die im Hefe-2-Hybrid-System gewonnenen Ergebnisse. Die AS-Mutation an Position 120 innerhalb von IKK β verhinderte die Bindung des Proteins an GST-YopPO8 (Abb. 23). Die GST-Kontrolle zeigt keine unspezifische Interaktion mit IKK β , somit ist die Bindung von GST-YopPO8 an IKK β auf YopP zurückzuführen.

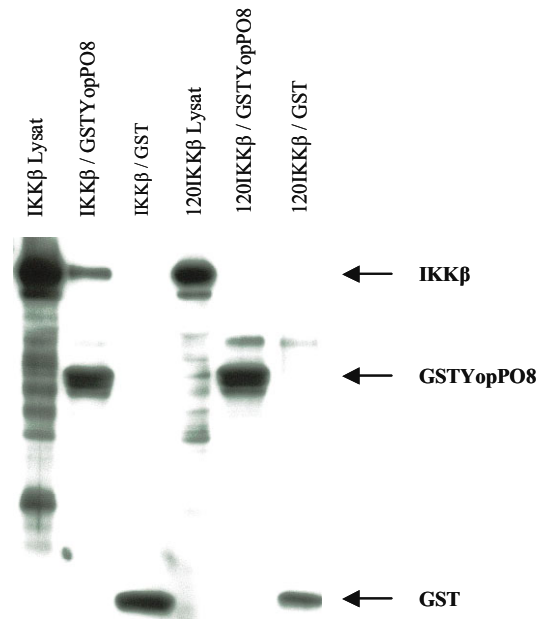


Abb. 23: *in vitro*-Präzipitation von IKK β , sowie IKK β 120 mittels an Glutathion-Sepharose gebundenes GST/GST-YopPO8. $9 \cdot 10^6$ 293-Zellen wurden transfiziert mit dem Expressionvektor pCMV2B-Flag(-)+ *IKK β* sowie pCMV2B-Flag(-)+*IKK β 120*. Das Zelllysat (1/10 davon wurde als positive Kontrolle verwendet) wurde mit 2 μ g GST/GST-YopPO8 und Glutathion-Sepharosekügelchen inkubiert, die Immunkomplexe anhand eines SDS-Geles separiert, auf eine PVDF-Membran transferiert. Die IKK β -Proteine wurden anschließend mit einem Flag-AK detektiert und durch Westernblot nachgewiesen GST und GST-YopPO8 wurden durch Coomassie-Färbung nachgewiesen.

Die *in vivo*-Koexpressionsexperimente zur Interaktion der IKK β -Derivate mit YopPO8 nach Transfektion oder *Yersinia*-Infektion von HEK293-Zellen sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Gleichzeitig werden Funktionsanalysen von IKK β und IKK β 120 durchgeführt.

4. Diskussion

4.1. Aktivitäten verschiedener YopP-Isotypen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die YopP-Effektorproteine verschiedener pathogener *Y. enterocolitica*-Serotypen die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, sowie das Überleben von Makrophagen unterschiedlich beeinflussen. Während YopP von *Y. enterocolitica*-Serotyp O8 die Aktivität von IKK β und die Translokation von NF- κ B in den Zellkern effizient inhibiert, ist die Einflussnahme von YopP des Serotyps O9 auf die NF- κ B-Signalkaskade weniger stark ausgeprägt. Die deutliche Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch YopPO8 korreliert mit einer starken Apoptoseinduktion, wohingegen YopPO9 nur wenig Apoptose auslöst. Dieser Befund zeigt, dass die Inhibition des NF- κ B-Signalweges und die Auslösung von Apoptose bei Makrophagen eng miteinander verbunden sind. Dies wiederum lässt vermuten, dass die Apoptoseinduktion Resultat der Inhibition der NF- κ B-Aktivierung ist.

Um die Effekte der Proteine YopPO8 und YopPO9 auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde eine *yopP*-negative-Yersinien-Mutante durch Einbringen *yopP*-kodierender Vektoren komplementiert. Die entsprechenden exogenen Gene von YopPO8 und YopPO9 wurden in den komplementierten Mutanten unter identischen Bedingungen exprimiert, die produzierten YopPO8- und YopPO9-Proteine wurden in vergleichbaren Mengen transloziert. In der infizierten Zelle interagierten beide Proteine mit dem Zielprotein IKK β und vermitteln einen dem YopP-Wildtyp entsprechenden Phänotyp. Zur weiteren Charakterisierung der unterschiedlichen Apoptose-Effekte von YopPO8 und YopPO9, wurden die Aminosäure-Sequenzen beider Proteine miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Sequenzen von YopPO8 und YopPO9 zu 94 % identisch sind. Um die Effektor-domäne des aktiveren YopPO8 zu lokalisieren, wurden nachfolgend einzelne oder mehrerer AS zwischen YopPO8 und YopPO9 ausgetauscht (Abb. 7). Die anschließenden Infektionsversuche mit den entsprechenden YopP-Mutanten identifizierten Arginin an Position 143 als eine, für die Effektorfunktion von YopPO8 essentielle AS. Arginin-143 bewirkt eine effiziente Inhibition der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, was anschließend zu einer ausgeprägten Apoptoseinduktion durch YopPO8-produzierende Yersinien führt. YopPO9 dagegen besitzt an der Position 143 ein Serin, welches nur eine schwache NF- κ B-Inhibition und apoptotische Reaktion der Zelle auslöst. YopP von *Y. enterocolitica*-Serotyp O3

besitzt ebenfalls ein Serin an AS-Position 143 und vermittelt YopPO9-ähnliche zelluläre Reaktionen. Die publizierten Proteinsequenzen von YopJ von *Y. pseudotuberculosis* (Genbank-Nr.: L33833) und *Y. pestis* (Genbank-Nr.: AAF074612) zeigen ein Arginin an Position 143 wie bei YopPO8.

Der molekulare Mechanismus, wie YopPO8 einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf IKK β ausübt, ist noch nicht geklärt. Möglicherweise wird allein durch diese Bindung von YopP/J an seine Zielproteine deren Phosphorylierung und Aktivierung blockiert (Orth *et al.*, 1999). YopP/J wurde aber auch als eine Cysteinprotease definiert, die auf zelluläre Proteine einwirkt, welche mit dem Ubiquitin-ähnlichen Molekül SUMO-1 modifiziert wurden (Orth *et al.*, 2000). Sowohl YopPO8 als auch YopPO9 besitzen die für Cysteinproteasen-relevanten katalytischen Aminosäuren Histidin-109, Glutaminsäure-128 und Cystein-172 (Abb. 5). Mutationen der Aminosäuren Histidin-109 und Cystein-172 bewirken eine Abschwächung der inhibitorischen Wirkung von YopP/J auf den NF- κ B-Signalweg sowie auf die Fähigkeit, Apoptose auszulösen. Es wird vermutet, dass die SUMO-1-Konjugation von Proteinen Einfluss auf die Zusammensetzung von zellulären Signalkomplexen nimmt, welche möglicherweise durch YopP/J modifiziert wird (Orth *et al.*, 2000). Ein Zusammenhang zwischen der De-SUMO-lyierung zellulärer Proteine und der Inhibition von IKK β oder den MKK's ist bisher noch nicht geklärt. MKK's und IKK β scheinen aber keine direkten Zielproteine einer SUMO-1 Modifikationen zu sein und die Proteine, die möglicherweise durch YopP/J de-SUMO-lyiert werden, müssen erst noch identifiziert werden. Die hypothetische Sekundärstruktur von YopP/J lässt eine strukturelle Rolle von Arginin an Position 143 im Aufbau einer α/β -Helix vermuten. Arginin-143 befindet sich aber auch an zentraler Stelle innerhalb der vorgeschlagenen katalytischen Domäne von YopP. Dies könnte auf eine direkte Beeinflussung der postulierten enzymatischen Aktivität von YopP/J durch Arginin-143 hinweisen.

Ob die stärkere Aktivität von YopPO8 mit einer höheren Virulenz für den Wirt in Zusammenhang steht, ist bisher nicht bekannt. Interessanterweise zeichnen sich Yersinien des *Y. enterocolitica* Serotyps O8, ähnlich wie *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*, durch höhere Mausvirulenz, im Vergleich zu *Y. enterocolitica* Serotyp O9, aus. Dieser Unterschied ist jedoch auf die chromosomal-kodierte *Yersinia*-Pathogenitätsinsel (HPI, high pathogenicity island) zurückzuführen, welche für das Yersiniabaktinsiderophorsystem kodiert (Carniel 2001, Rakin *et al.*, 1999). Über das Siderophorsystem versorgen sich die Bakterien mit Eisenionen aus der

Umgebung. Die Eisenaufnahme bestimmt somit entscheidend die Virulenz im Mausinfektionsmodell. Da Yersinien der Serogruppe O3 und O9 zwar den Siderophorrezeptor (FyuA), nicht aber das Siderophor selbst synthetisieren, haben diese Serotypen eine verminderte Mausvirulenz. Yersinien der Serogruppe O8 hingegen besitzen ein funktionelles Eisenaufnahmesystem und sind hoch-mauspathogen (Jurado, 1997). Da diese chromosomal-kodierten Charakteristika die Virulenzeigenschaften einzelner YopP's maskieren, kann ein unterschiedlicher Phänotyp von YopPO8 und YopPO9 *in vivo* im Maus-Infektions-Modell nur schwerlich nachgewiesen werden.

Darüberhinaus zeigen *in vivo* Studien, dass YopP/J nur einen diskreten Phänotyp im Maus-Infektionsmodell aufweist. Nach Monack *et al.*, (1998) spielt YopP/J eine Rolle bei der systemischen Ausbreitung der Yersinien im Wirt, ein Befund, der durch Studien von Galyov *et al.*, (1994) nicht unterstützt wird. Vermutlich ist die antiinflammatorische Aktivität von YopP/J weniger für die Auslösung eines akuten Krankheitsbilds, sondern eher für eine länger anhaltende Kolonisierung und Infektion von Bedeutung. Da *Y. enterocolitica* Serotyp O8 wie *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* vor allem Nagetiere, *Y. enterocolitica* Serotyp O9 und Serotyp O3 aber in erster Linie Hausschweine zum Wirt haben, könnte Arginin-143 in YopP/J möglicherweise einen Vorteil für die Anpassung der Yersinien an Nagetiere als Wirt vermitteln.

4.2. Identifizierung potentieller YopP-Interaktionspartner mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems

Da diese Ergebnisse auf eine ausgeprägte Aktivität von YopP des *Y. enterocolitica* Serotyp O8 auf die Wirtszelle hinweisen wurde im Rahmen dieser Arbeit YopPO8 eingesetzt, um nach zellulären Interaktionspartnern von YopP zu fahnden. Dazu wurden exprimierte Proteine einer Milz-cDNA-Genbank im Hefe-2-Hybrid-System auf Interaktion mit YopPO8 untersucht. Von initial $3,7 \times 10^7$ Hefeklonen wurden im ersten Selektionsverfahren 550 Klone als in der Interaktion mit YopPO8 potentiell positive Klone isoliert. Durch weitere Selektionstests konnte deren Anzahl auf 46 reduziert werden. Die Sequenzierung dieser Klone ergab 22 unterschiedliche, mögliche Interaktionspartner von YopP. Um die Ergebnisse des Hefe-2-Hybrid-Systems *in vitro* und auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden die Gene der möglichen Interaktionspartner in eukaryontische Expressionsvektoren umkloniert. Von einigen, in HEK293-Zellen exprimierten

Molekülen konnte eine Bindung an rekombinant hergestelltes YopP nachgewiesen werden. Auf die Bedeutung dieser möglichen Interaktionen wird im Folgenden eingegangen. Tests zur *in vivo* Interaktion von YopP mit seinen potentiellen Partnermolekülen und zelluläre Funktionsanalysen stehen noch aus.

4.2.1. F-box/WD40-repeat protein 2 (FWD2)

Das Ubiquitin-Proteasom-System wird von der Zelle eingesetzt, um Proteine gezielt zu degradieren. Neben inkorrekt gefalteten oder beschädigten Proteinen sind kurzlebige Proteine, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, Zellwachstumsmodulatoren, Signaltransduktions- und Zell-Zyklus-Proteine ebenfalls Zielmoleküle des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Ein erforderlicher Schritt für die Degradation dieser Substrate ist die Anlagerung von Polyubiquitineinheiten. Die polyubiquitinierten Moleküle werden durch einen großen Proteasekomplex, das 26S Proteasom, abgebaut (Hershko and Ciechanover, 1998).

Der Ubiquitin-Ligase-SCF-Komplex, eine neue Klasse von E3-Ligasen, setzt sich aus zwei konstanten Untereinheiten, Skp1 und Cullin, und einer variablen, die Substratspezifität bestimmenden Untereinheit, einem F-Box-Protein, zusammen. Das F-Box-Protein bindet durch sein F-Box-Motiv an Skp1 (Patton *et al.*, 1998). Bis heute sind elf F-Box-Proteine bei *Saccharomyces cerevisiae*, 326 bei *C. elegans*, 22 bei *Drosophila* und 38 beim Menschen, aber keine bei Prokaryonten bekannt (Jackson *et al.*, 2000; Cenciarelli *et al.*, 1999; Winston *et al.*, 1999). Die F-Box-Proteine wurden anhand ihrer Protein-Protein-Interaktionsdomänen in drei Klassen eingeteilt: Fbw-Proteine sind F-Box-Proteine mit WD40-Wiederholungsdomänen, Fbw1-Proteine besitzen leucinreiche Sequenzen, und F-Box-Proteine mit anderen Protein-Protein-Interaktions-Strukturen wie z.B. Leucin-Zippern, Ring-Finger-Strukturen, Helix-Loop-Helix-Motiven, prolinreichen Sequenzen oder SH2-Domänen (Src homology 2) werden als Fbx-Proteine bezeichnet. Zwei SCF-Komplexe wurden bei humanen und murinen Zellen identifiziert und charakterisiert (Cenciarelli *et al.* 1999). Der Komplex SCF^{Fbl1} ist verantwortlich für die Ubiquitinierung des Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitors p27^{Kip1} (Carrano *et al.*, 1999), SCF^{Fbw1 α / β TrCP} ubiquitiniert β -Catenin und I κ B α (Maniatis 1999).

Bei FWD2 handelt es sich auch um ein F-Box-Protein des SCF-Komplexes. FWD2 setzt sich aus 454 AS zusammen, ist 51,5 kDa groß und gliedert sich in eine leucinreiche Sequenz, eine F-Box-

Domäne und in 4 WD40-Wiederholungsdomänen. Da FWD2 nur eine geringe Homologie zu anderen F-Box-Proteinen aufweist (Cdc4/Fbw 11% oder Fbwl 2%) ist eine Klassifizierung nur schwer möglich. Über die Funktion von FWD2 ist bisher wenig bekannt. In Überexpressionstudien konnte FWD2 im Zytoplasma lokalisiert werden. Da eine Komplexbildung von FWD2 mit Skp1 und Cullin gezeigt werden konnte (SCF^{Fwd2}), reguliert möglicherweise auch FWD2 die Ubiquitin-assoziierte Proteolyse von Proteinen (Miura *et al.*, 1999).

Bei dem in dieser Arbeit aus der Interaktion mit YopP isolierten Gen von *Fwd2* ist die Sequenz nicht vollständig, sondern es fehlen 315 bp am 5'-Ende (105 AS). Aufgrund dieser Deletion kann die Interaktion zwischen FWD2 und YopP nur über den C-terminalen Rest von FWD2 stattfinden. In diesem Proteinforment befindet sich die WD40-Wiederholungs-Sequenzen, die für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind.

In einer Interaktion von YopP mit FWD2 wären prinzipiell zwei unterschiedliche Szenarien denkbar. Einmal könnte YopP selbst direkt durch den SCF^{Fwd2} -Ligasekomplex ubiquitiniert werden, was zu einer Degradation von YopP durch die Zelle führen könnte. FWD2 könnte somit auf die Aktivität von YopP einwirken. Umgekehrt könnte aber auch YopP Einfluss auf die Funktion des SCF^{Fwd2} -Ligasekomplex nehmen. So könnte die Bindung an FWD2 die Interaktion mit Zielmolekülen des Ligasekomplexes oder die Ligaseaktivität direkt inhibieren. Dabei ist auch möglich, dass YopP nach einem von Tang *et al.* (2003) beschriebenen Prinzip verfährt. YopP könnte wie das LMP1-Protein (latent membrane protein 1) des Epstein-Barr-Virus, welches kein echtes, sondern ein Pseudo-Substrat der Ubiquitinligase $SCF^{HOS\beta-TrCP}$ darstellt, die Ligaseaktivität von SCF^{Fwd2} -Ligasekomplex blockieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass YopP ähnlich wie z.B. Vpu (viral protein U) vom HIV-1-Virus die Ligase direkt durch Proteaseaktivität zerstört (Besnard-Guerin C. *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2003).

4.2.2. Protein-Phosphatase 2Ac (PP2Ac)

Proteinphosphorylierung ist ein essentieller Mechanismus der Informationsübermittlung innerhalb der Zelle. Die Protein-Phosphatase 2A ist eine der wichtigsten zellulären Serin/Threonin-Phosphatasen und wesentlich an der negativen Regulation verschiedener zellulärer Signaltransduktions-Prozesse beteiligt. PP2A katalysiert die Dephosphorylierung von

Phosphoserinen und Phosphothreoninen. PP2A besteht aus der katalytischen Untereinheit PP2Ac (36 kDa), der strukturellen Untereinheit PP2Aa (65 kDa), und der regulatorischen Untereinheit B, welche von drei Familien (B/PR55, B'/PR61 und B''/PR72) kodiert wird (Mumby and Walter, 1993; Janssens and Goris, 2001). Die A-Untereinheit besitzt 15 Spiralen einer Hufeisen-förmigen Anordnung, die als Anlagerungsgerüst für die Untereinheiten C und B dienen (Groves *et al.*, 1999). PP2A inaktiviert die Kinaseaktivität von IKK *in vitro*, wogegen Okadaic-Säure, ein Inhibitor von PP2A, NF- κ B *in vivo* aktiviert (DiDonato *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1995). Sowohl die A-Untereinheit als auch die C-Untereinheit weisen zwei Isoformen (α und β) auf. Die Isoformen der katalytischen Untereinheit setzen sich aus jeweils 309 AS zusammen und sind zu 97 % identisch. Das aus dem Hefe-2-Hybrid-System in der Interaktion mit YopP isolierte *Pp2Ac* Gen hat keine vollständige Sequenz, da 391 bp am 5'-Ende (130 AS) fehlen. Aufgrund dieser Deletion kann die Interaktion zwischen PP2Ac und YopP nur über den C-Terminus stattfinden. In diesem Proteinfolegment befindet sich ein Metallo- sowie ein Calcineurin-ähnliches Phosphoesterase-Motiv. Wegen des Fehlens der in dem N-Terminus kodierten bp sind diese Motive allerdings nicht vollständig vorhanden. Die Interaktion zwischen YopP und PP2A könnte unterschiedliche Auswirkungen haben. Da PP2A durch Dephosphorylierung von IKK β eine Suppression der NF- κ B-Aktivierung bewirken kann, könnte der inhibitorische Effekt von YopP auf IKK β durch eine Induktion der PP2A-Phosphataseaktivität zustande kommen. Andererseits könnte eine Inhibition von PP2A durch YopP abseits des NF- κ B-Signalweges aber auch zur Apoptose führen (Lim *et al.*, 2001; Rajesh *et al.*, 1999). YopP könnte beispielsweise die für die PP2A-Komplexbildung essentielle Methylierung von PP2Ac verhindern und so die Komplexbildung sowie dessen Funktion blockieren (Yu *et al.*, 2001).

4.2.3. Translations-Elongations-Faktor 1 beta 2 (eEF1B β)

Die Translation und die Elongation sind essentielle Schritte bei der Synthese von Proteinen, welche ein hohes Maß an Energie verbrauchen. Der Elongationsprozess im Zytoplasma von höheren Eukaryonten benötigt zwei Arten von Hilfsfaktoren, einen der die Aminoacyl-tRNA an die A-Seite des Ribosoms anlagert und einen der die Translokation ermöglicht. In Eukaryonten sind dies die Faktoren eEF1A und eEF1B. eEF1A interagiert in GTP-gebundener Form mit Aminoacyl-tRNA und wandert zur A-Seite der Ribosomen (Merrick *et al.*, 2000). Während

dieses Prozesses erfolgt eine Hydrolyse von GTP zu GDP, worauf eEF1A-GDP das Ribosom verlässt und erst nach Bindung von GTP wieder mit Aminoacyl-tRNA interagieren kann. Dieser Schritt wird durch eEF1B ermöglicht, welcher als Nukleotid-Austauschfaktor agiert. eEF1B besteht aus drei Untereinheiten ($\alpha\beta\gamma$) und befindet sich in der Nähe des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Sanders *et al.*, 1996). In höheren Eukaryonten sind eEF1A und eEF1B $\alpha\beta\gamma$ Zielproteine für eine Vielzahl von Proteinkinasen und liegen in der Regel als Phosphoproteine vor. Eine der Proteinkinasen ist die konstitutiv aktive Casein-Kinase-2 (CK2), die die α - als auch die β -Untereinheit von eEF1B phosphoryliert (Traugh 2001). eEF1A und eEF1B sind gleichzeitig Substrate der Proteinkinase C (PKC) (Venema *et al.*, 1999). Das *eEF1B β* -Gen wurde am häufigsten aus Hefeklonen isoliert, die eine Interaktion mit YopP zeigten. Dabei war die *eEF1B β* -Sequenz vollständig vorhanden. Durch die Interaktion von YopP mit eEF1B kann YopP möglicherweise neben der Unterdrückung der NF- κ B- und MAPK-Aktivierung die Proteinsynthese direkt inhibieren. Die Blockade von eEF1B hätte die Inhibition von eEF1A zur Folge. Da eEF1A neben seiner primären Rolle in der Proteinsynthese ebenso für die Bindung und Bündelung von Aktin (Murray *et al.*, 1996; Condeelis, 1995), für den Proteinabbau durch den Ubiquitin-Signalweg (Gonen *et al.*, 1994) und für die Assoziation mit Ribosomenkomplexen wichtig ist (Kruse *et al.*, 1998), könnte die Suppression der eEF1B-Aktivität vielfältige Folgen für den Zellstoffwechsel haben.

4.2.4. Mothers against decapentaplegic (dpp) homolog 1 (Smad1)

Smad-Proteine wurden zuerst als Produkte von *Drosophila mad*- und *C. elegans sma*-Genen identifiziert, die unterhalb des TGF- β (transforming growth factor- β) und BMP-Rezeptors (bone morphogenetic protein) geschaltet sind (Patterson and Padgett, 2000; Whitman, 1998). Von den acht Smad-Proteinen gibt es drei Subfamilien: Rezeptor-aktivierte Smads (R-Smads: Smad1,2,3,5,8) welche phosphoryliert werden; vermittelnde Smads (Co-Smads : Smad4) welche Oligomere mit R-Smads bilden, und inhibitorische Smads (I-Smads: Smad6,7), welche die TGF- β /BMP-Signalwege wieder deaktivieren. Alle R-Smads und Smad4 sind primär im Zytoplasma lokalisiert, während sich die I-Smads primär bereits im Zellkern befinden (Itoh *et al.*, 2001). Die meisten Smad-Proteine besitzen zwei konservierte Domänen, die N-terminale MH1-Domäne für den Kernimport und die DNA-Bindung, und eine C-terminale MH2-Domäne für

Proteininteraktionen. Die MH1-Domäne weist elf β -Haarnadelstrukturen auf und ist in der Lage an DNA zu binden. Deshalb könnte die Interaktion zwischen Smad1 und YopP im MH2 Bereich des Proteins stattfinden. Die MH1- und MH2-Domänen sind durch eine Prolin-reiche Verbindungsdomäne voneinander getrennt, welche potentielle Phosphorylierungssequenzen (z.B. Phosphorylierung durch MAPK's) aufweist (Li *et al.*, 2000; Wrana 2000). Die Phosphorylierung der R-Smads induziert eine Komplexbildung mit Smad4. Der Komplex wandert anschließend in den Zellkern und moduliert die Expression der Zielgene. Bis heute sind 48 Transkriptionsfaktoren, Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren bekannt, die mit Smads interagieren können (Miyazawa *et al.*, 2002). Das im Hefe-2-Hybrid-System isolierte und für die Interaktion mit YopP verantwortliche *Smad1*-Gen ist nicht vollständig vorhanden, sondern es fehlen 232 bp am 5'-Ende (77 AS). Aufgrund dieser Deletion kann die Interaktion zwischen Smad1 und YopP nur über das C-terminale Ende stattfinden. In diesem Proteinfragment befindet sich die für Protein-Protein-Interaktionen wichtige MH2-Domäne.

Rezeptoren der TGF- β -Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Zellvermehrung, Zelldifferenzierung und Apoptose. Sie können durch TGF- β 's, Aktivine/Inhibine und die BMP-Zytokine aktiviert werden. Es wurde von Beg and Baltimore (1996), Chen *et al.*, (2001), sowie Liu *et al.*, (1996) beschrieben, dass die durch TNF-induzierte Apoptose durch BMP's blockiert wird, indem über den Smad-Signalweg eine NF- κ B-Aktivierung stattfindet. Smad1 zählt zu den R-Smad-Proteinen und wird nach BMP-Stimulation der Zellen phosphoryliert. Möglicherweise bindet YopP an Smad1, blockiert dessen Phosphorylierung oder die Komplexbildung mit Smad4 und verhindert dadurch dessen Translokation in den Zellkern. Die Interaktion mit Smad1 könnte auch direkt die Bindung von Smad1 an DNA-Elemente verhindern und die Transkription von Smad1-Zielgenen blockieren. Beide Fälle hätten die Inaktivierung von Smad1 und der nachfolgenden Signalwege zur Folge.

4.3. Charakterisierung der Interaktion zwischen YopPO8 und IKK β -Derivaten

Der NF- κ B-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Expression von zellulären Proteinen, welche die Immunantwort der Zelle kontrollieren. Die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade kann durch unterschiedliche Stimuli erfolgen, z. B. durch Zytokine (TNF- α und IL-1), Lipopolysaccharide, und bakterielle oder virale Infektionen. In nicht

aktivierten Zellen liegt der Transkriptionsaktivator NF- κ B im Zytoplasma gebunden an seine I κ B-Inhibitorproteine vor (Baldwin, 1996; DiDonato *et al.*, 1995). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch die aminoterminalen Serin-Phosphorylierung von I κ B durch die zwei Kinasen IKK α und IKK β . Dies führt zur Degradation von I κ B und zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern. IKK α und IKK β sind katalytische Komponenten des 700 kDa großen IKK-Komplexes. Sie weisen eine 52 %-ige AS-Identität auf. Im Aufbau der Proteine imponiert eine 275 AS große Kinasedomäne, ein 29 AS großes Leucin-Zipper-Motiv und ein 40 AS großes Helix-Loop-Helix-Motiv (Abb. 17). Die Kinasedomäne dieser Proteine enthält eine zu den MEK homologe Aktivierungssequenz mit zwei essentiellen Serinresten (S176/180 IKK α und S177/181 IKK β). Deren Phosphorylierung, unter anderem durch die Kinasen NIK und MEKK1, führt zur Aktivierung von IKK α und IKK β (DiDonato *et al.*, 1997). Zusätzlich sind im C-terminalen Bereich von IKK β mehrere Serine lokalisiert, die entscheidend an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt sind. Deren Autophosphorylierung führt zu einer Herunterregulation der IKK β -Aktivität (Delhase *et al.*, 1999).

Zur näheren Charakterisierung der Interaktion zwischen IKK β und YopPO8 wurde die AS-Sequenz von IKK β , an welche YopP im Hefe-2-Hybrid-System bindet, eingegrenzt. Dazu wurden unterschiedliche, N-terminal verkürzte IKK β -Derivate mit YopPO8 in der Hefe koexprimiert und im β -Galaktosidase-Test auf Interaktion untersucht. Da bei einer Deletion von 190 AS keine Interaktion zwischen IKK β und YopPO8 mehr festzustellen war, wurden anschließend mehrere AS im N-Terminus vor AS 190 ausgewählt (IKK β 101, -107, -120, -152 und -166), die im Vergleich der verschiedenen IKK β -, MAPKK3- und IKK α -Kinasedomänen-Sequenzen auf Grund ihrer biochemischen Eigenschaften als für die Interaktion von IKK β und MAPKK3 mit YopP als relevant erachtet wurden (Tab.19). Der Bereich bis zur AS 190 beinhaltet unter anderem die von Delhase *et al.*, (1999) beschriebene, für die Aktivierung wichtige Domäne, einschließlich der beiden Serine an der Position 177 und 181. Durch Austausch einzelner AS von IKK β nach IKK α konnten drei verschiedene IKK β -AS identifiziert werden, welche für die Interaktion von IKK β mit YopP wichtig zu sein scheinen. Es handelt sich dabei um AS an den Positionen 120, 166 und 167. An AS-Position 120 wurde Glutamin von IKK β durch Alanin von IKK α ersetzt. Die IKK β -Aminosäuren Glutaminsäure und Leucin an den Positionen 166 und 167 wurden zu Asparaginsäure und Valin von IKK α ausgetauscht. Eine

Interaktion zwischen YopP und IKK β mit der Mutation von Alanin nach Glutamin an Position 120 wurde anschließend auch auf zellulärer Ebene in einem Überexpressionssystem charakterisiert. Bei der AS Alanin handelt es sich um eine hydrophobe AS mit aliphatischer/unpolarer Seitenkette. Aufgrund dieser biochemischen Eigenschaften liegt diese AS meist im Inneren eines Proteines vor. Glutamin hingegen hat einen sauren Charakter und ist hydrophil/polar. Da polare AS in hohem Maße Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, befindet sich Glutamin meist an der Oberfläche von Proteinen und kann daher nicht nur zur Wasserlöslichkeit, sondern auch zu Ausbildung von Bindungsstellen für andere geladenen Moleküle beitragen.

Um dieses Ergebnis auch *in vitro* auf Zellkulturebene zu untersuchen, wurde die Mutation von Alanin nach Glutamin an Position 120 in IKK β eingefügt, welches in einem eukaryontischen Expressionvektor exprimiert wurde. In *in vitro*-Präzipitationsexperimenten mit GST-YopP konnte keine Interaktion mit dem mutierten IKK β beobachtet werden, während Wildtyp-IKK β an GST-YopPO8 band. Diese Versuche bestätigen eine Rolle der AS Alanin an Position 120 in der Interaktion von IKK β mit YopP. Ob das mutierte IKK β noch funktionell aktiv ist oder *in vivo* noch eine Bindung mit YopP eingeht, muss in weiterführenden Versuchen geklärt werden.

4.4. Ausblick

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems mehrere potentielle zelluläre Interaktionspartner des *Y. enterocolitica* Virulenzproteins YopP identifiziert. Die in der Hefe nachgewiesene Interaktion muss nun unter Infektionsbedingungen auf zellulärer Ebene untersucht werden. Die Bedeutung möglicher Interaktionen mit YopP wird anschließend durch Funktionsanalysen eruiert. Aus diesen Untersuchungen sollen neue Einblicke in die Mechanismen der Modulation der Immunantwort durch YopP gewonnen werden. Darüberhinaus könnten diese Studien weitere Hinweise auf potentielle Modifikationen von YopP in der Wirtszelle geben, welche möglicherweise mit einer Aktivierung oder Deaktivierung von YopP in Zusammenhang stehen. Diese Untersuchungen könnten dazu beitragen, das Schicksal bakterieller Virulenzfaktoren, welche in die Wirtszelle transloziert wurden, zu klären. Ferner sollen in den zukünftigen Studien die bisher gewonnenen Erkenntnisse zur Charakterisierung der Interaktion zwischen YopP und IKK β erweitert werden. Dafür werden weiterführende Bindungsstudien

zwischen YopP und IKK β sowohl im Hefe-2-Hybrid-System, als auch *in vitro* und *in vivo* in Zellkultursystemen durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Yersinien sind auf Grund ihres spezifischen Typ III-Proteinsekretionssystems (TTSS) in der Lage, nach Anlagerung an Zellen bakterielle Virulenzproteine in das Innere der Wirtszelle zu translozieren. Dies führt zu einer Zellparalyse und bei Makrophagen zum Zelltod. Eines der translozierten Virulenzproteine ist YopP/J, das die Signalwege der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Wirtszelle inhibiert. Es wird angenommen, dass YopP/J zur Familie der Cystein-Proteasen zählt. Es zeigt Homologien zu AvrRXV/AvrBst von *Xanthomonas campestris*, welches eine dem apoptotischen Zelltod vergleichbare sogenannte „Hypersensitive Reaktion (HR)“ bei Pflanzen auslösen kann.

Die Bakterien der enteropathogenen Spezies *Yersinia enterocolitica*, welche nach oraler Aufnahme im terminalen Ileum durch M-Zellen in die Lymphfollikel der Peyerschen Plaques wandern, werden anhand ihrer Oberflächen-(O)- und Geißel-(H)-Antigene in verschiedene Serotypen unterteilt. Unsere Studien haben gezeigt, dass sich einzelne *Y. enterocolitica*-Serotypen in der Apoptoseinduktion bei Makrophagen unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde den Mechanismen der Apoptoseinduktion durch die verschiedenen *Y. enterocolitica*-Serotypen nachgegangen. Zunächst konnte YopP für die unterschiedlichen Apoptose-Effekte verantwortlich gemacht werden. Durch DNA-Austausch und der anschließenden Modifikation einzelner Aminosäuren zwischen YopP von *Y. enterocolitica*-Serotyp O8 und *Y. enterocolitica*-Serotyp O9 konnte Arginin (R) an Position 143 als essentielle AS der Effektor-domäne von YopPO8 definiert werden. YopP von *Y. enterocolitica*-Serotyp O9 und *Y. enterocolitica*-Serotyp O3 besitzt an dieser AS-Position Serin (S). YopPO8 vermittelt deutlich stärker Apoptose als YopPO9 und YopPO3. Der erhöhten Apoptoseinduktion durch YopPO8 geht eine effiziente Unterdrückung der NF- κ B-Aktivierung voraus. Die Inhibition des antiapoptotischen NF- κ B-Signalwegs durch YopP scheint Voraussetzung für die Apoptoseinduktion durch *Yersinia* zu sein.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems nach neuen unbekanntem intrazellulären YopP-Interaktionspartnern gesucht. Aus einer Maus-Milz-cDNA-Genbank konnten 22 potentielle YopP-Interaktionspartner isoliert werden. In *in vitro*-Bindungsstudien konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt eine Interaktion von YopP mit vier Proteinen (PP2Ac, FWD2, eEflb β , Smad1) bestätigt werden. Weiterführende Bindungs- und

Funktionsanalysen werden noch durchgeführt. Die möglichen Auswirkungen dieser Interaktionen werden diskutiert. Die durchgeführten Studien erbrachten zudem Hinweise auf eine Modifikation von YopP in der Wirtszelle.

Darüberhinaus konnte mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems der Interaktionsbereich von YopP mit seinem Zielprotein IKK β eingeschränkt werden. Die durchgeführten Bindungsanalysen mit IKK β -Deletionsmutationen weisen auf eine Bindung von YopP an den IKK β -N-Terminus hin. Das Ergebniss wurde durch *in vitro*-Bindungsstudien bestätigt. Unter anderem scheint Alanin an IKK β -Position 120 die Interaktion mit YopP zu bestimmen. So konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit unterschiedliche Aspekte der Wechselwirkung von *Y. enterocolitica* YopP mit der Wirtszelle und Wirtszellproteinen analysiert werden. Diese Studien tragen zum besseren Verständnis der Immunmodulation durch pathogene Bakterien bei.

6. Literaturangabe

Aepfelbacher M., Zumbihl R., Ruckdeschel K., Jacobi C.A., Barz C. and Heesemann J. (1999). "The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defense." Biol. Chem. 380: 795-802.

Anderson D.M. and Schneewind O. (1997). "A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*." Science 278: 1140-1143.

Akira S. (2003). "Mammalian toll-like receptors." Curr. Opin. Immunol. 15: 5-11.

Aleksic S. and Bockemuhl J. (1990). „ Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections.“ Immun. Infect. 18: 178-185

Allaoui A., Woestyn S., Sluiters C. and Cornelis G.R. (1994). " YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion." J. Bacteriol. 176: 4534-4543

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J. (1997). "Grapped BLAST and PSI_BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

Andor A., Trulzsch K., Essler M., Roggenkamp A., Wiedemann A., Heesemann J. and Aepfelbacher M. (2001). " YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells." Cell Microbiol. 3: 301-310

Appel R.D., Bairock A. and Hochstrasser D.F. (1994). "A new generation of information on retrieval tools for biologists: the example of the EXPASY WWW server." Trends Biochem. Sci 19: 258-260.

Aravind L. and Koonin E.V. (1998). " Phosphoesterase domains associated with DNA polymerases of diverse origins." Nucleic Acids Res. 26: 3746–3752

- Ashkenazi A. and Dixit V.M. (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**: 1305-1308.
- Bacot A.W. and Martin C.J. (1914 LXVII). "Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas." J. Hyg. **13** (Plague Suppl. 3): 423-439.
- Baichwal V.R. and Baeuerle P.A. (1997). "Apoptosis: activate NF- κ B or die?" Curr. Biol. **7**: R94-96.
- Bantel H., Sinha B., Domschke W., Peters G., Schulze-Osthoff K. and Janicke R.U. (2001). „ alpha-toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling.“ J. Cell Biol. **155**:637-648
- Barz C., Abahji T.N., Truzsch K. and Heesemann J. (2000). „ The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1.“ FEBS Lett. **482**: 139-143
- Beg A.A. and Baltimore D. (1996).” An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death.” Science **274** :782-4.
- Bergman T., Erickson K., Galyov E.E., Persson C. and Wolf-Watz H. (1994). "The lcrB (yscN/U) gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in Yop secretion and shows high homology to the spa gene clusters of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*." J. Bacteriol. **176**: 2619-2626.
- Besnard-Guerin C, Belaidouni N, Lassot I, Segeral E, Jobart A, Marchal C, Benarous R. (2004). “HIV-1 Vpu sequesters beta-transducin repeat-containing protein (betaTrCP) in the cytoplasm and provokes the accumulation of beta-catenin and other SCFbetaTrCP substrates.”J. Biol.Chem. **279**: 788-95

Bjellqvist B., Basse B., Olsen E. and Celis J.E. (1994). "Reference points for comparison of two-dimensional maps from human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions." Electrophoresis **15**: 529-539.

Black R.E., Jackson R. J., Tsai T., Medvesky M., Shayegani M., Feeley J.C., MacLeod K.I.E. and Wakelee A.M. (1978). "Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk." N. Engl. J. Med. **298**: 76-79.

Black D.S. and Bliska J.B. (1997). "Identification of p130Cas as a sustrat of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions." EMBO J. **16**: 2730-2744.

Black D.S. and Bliska J.B. (2000). "The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence." Mol. Microbiol. **37**: 515-527.

Blattner, F. R., Plunkett, G.I.I.I., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. and Shao, Y. (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**: 1453-1474.

Bliska J.B., Copass M.C. and Falkow S. (1993). "The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells." Infect. Immun. **61**: 3914-3921.

Bliska J.B. and Falkow S. (1992). "Bacterial resistance to complement killing mediated by the ail protein of *Yersinia enterocolitica*." Proc. Natl. Acad. Sci USA **89**: 3561-3565.

Bochud P.Y. and Calandra T. (2003). "Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment." BMJ **326**: 262-266.

Boland A. and Cornelis G.R. (1998). "Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection." Infect. Immun. **66**: 1878-1884.

Boland A., Sory M.P., Iriarte M., Kerbouch C., Wattiau P. and Cornelis G.R. (1996). "Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus." EMBO J. **15**: 5191-5201.

Bolin I. and Wolf-Watz H. (1988). "The plasmid-encoded Yop2b protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is a virulence determinant regulated by calcium and temperature at the level of transcription." Mol. Microbiol. **2**: 237-245.

Born T.L., Thomassen E., Bird T.A. and Sims J.E. (1998). "Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling." J. Biol. Chem. **273**: 29445-29450.

Boudreau T.M.R., Garduno R. and Lin T.J. (2002). "Protein phosphatase 2A and protein kinase Calpha are physically associated and are involved in *Pseudomonas aeruginosa*-induced interleukin 6 production by mast cells." J. Biol. Chem. **277**: 5322-5329

Brubaker R.R. (1972). "The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence." Curr. Top Microbiol. Immunol. **57**: 111-158

Brubaker R.R. (1991). "Factors promoting acute and chronic disease caused by *Yersinia*." Clin. Microbiol. Rev. **4**: 309-324.

Bukholm G., Kapperud G. and Skurnik M. (1990). " Genetic evidence that the yopA gene-encoded *Yersinia* outer membrane protein Yop1 mediates inhibition of the anti-invasive effect of interferon." Infect. Immun. **58**: 2245-2251

Burns K., Cladworthy J., Martin L., Martinon F., Plumpton C., Maschera B., Lewis A., Ray K., Tschopp J. and Volpe F. (2000). "Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor." Nat. Cell Biol **2**: 346-351.

Butler T. (1983). "Plague and other *Yersinia* infection." Plenum Press, New York, N.Y.

Cao Z., Xiong J., Takeuchi M., Kurama T. and Goeddel D.V. (1996). "TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1." Nature **383**: 443-446.

Calandra T., Bochud P. Y., and Heumann D. (2002). "Cytokine in septic shock." Curr. clinical topics in infection diseases Oxford: Blackwell Publishing: 1-23.

Carniel E. (2001). "The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island." Microbes Infect. **3**: 561-569

Carrano A.C., Eytan E., Hershko A. and Pagano M. (1999). "Skp2 is required for the ubiquitin-mediated degradation of the Cdk-inhibitor p27." Nat. Cell Biol. **1**: 193-199.

Cavanaugh D.C. and Randall R. (1959). "The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plague." J. Immunol. **83**: 348-363.

Cenciarelli C., CHiaur D.S., Guardavaccaro D., Parks W., Vidal M. and Pagano M. (1999). "Identification of a family of human f₂ box proteins." Curr. Biol. **9**: 1177-1179.

Chang A.C. and Cohen S.N. (1978). "Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid." J. Bacteriol. **134**: 1141-1156

Chen F., Castranova V., Shi X. and Demers L.M. (1999). "New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B, a Ubiquitous Transkription Factor in the Initiation of Diseases." Clin. Chem. **45**: 7-17.

Chen S., Guttridge D.C., Tang E., Shi S., Guan K. and Wang C.Y. (2001). "Suppression of tumor necrosis factor-mediated apoptosis by nuclear factor kappaB-independent bone morphogenetic protein/Smad signaling." J. Biol. Chem. **276** :39259-63.

Collier-Hyams L.S., Zeng H., Sun J., Tomlinson A.D., Bao Z.Q., Chen H., Madara J.L., Orth K. and Neish A.S. (2002). "Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF- κ B pathway." J. Immunol. **169**: 2846-2850

Connelly, M. A. and Marcu K.B. (1995). "CHUK, a new member of the helix-loop-helix and leucine zipper families of interacting proteins, contains a serine-threonine kinase catalytic domain." Cell. Mol. Biol. Res. **41**: 537-549.

Condeelis J. (1995). "Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton." Trends Biochem Sci. **20**: 169-170

Cornelis G. R. and Van Gijsegem F. (2000). "Assembly and Funktion of Type III secretory sytem." Annu. Rev. Microbiol. **54**: 735-774.

Cornelis G.R., Boland A., Boyd A.P., Geuijen C., Iriarte M., Neyt C., Sory M.P. and Stainier I. (1998). "The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 1315-1352.

Cornelis G.R. (2000). "Molecular and cell biology aspects of plague." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**: 8778-8783.

Cornelis G.R., Sluiter C., Lambert de Rouvroit C.L. and Michiels T. (1989). "Homology between VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator." J. Bacteriol. **171**: 254-262.

Conelis G.R. and Wolf-Watz H (1997). "The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells." Mol. Microbiol. **23**: 861-867.

Delhase M., Hayakawa M., Chen Y. and Karin M. (1999). "Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation." Science **284**: 309-313.

Denecker G., Declercq W., Geuijen C.A.W., Boland A., Benabdillah R., van Gurp M., Sory M.P., Vandenabeele P. and Cornelis G.R. (2001). "*Yersinia enterocolitica* YopP-induced Apoptosis of Makrophages Involves the Apoptotic Signaling Cascade Upstream of Bid." J. Biol. Chem. **276**: 19706-19714.

Derijard B., Raingeaud J., Barrett T., Wu I.-H., Han J., Ulevitch R.J. and Davis R.J. (1996). "Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK AND MKK ISOFORMS." Science **267**: 682-685.

DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E. and Karin M. (1997). "A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B." Nature **388**: 548-554.

Dukuzumuremyi J.M., Rosqvist R., Hallberg B., Akerstrom B., Wolf-Watz H. and Schesser K. (2000). "The *Yersinia pestis* kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor." J. Biol. Chem. **275**: 35281-35290.

Ebina Y., Takahara Y., Kishi F. Nakazawa A. (1983). "LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene." J. Biol. Chem. **258**: 13258-13261.

Estojak J., Brent R. and Golemis E. A. (1995). "Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements." Molecular and Cellular Biology **15**: 5820-5829.

Fallman M., Andersson K., Hakansson S., Magnusson K.E., Stendahl O. and Wolf-Watz H. (1995). "*Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells." Infect. Immun. **63**: 3117-3124.

Fan T., Lu H., Shi L., Maclarty G.A., Nance D.M., Greenberg A.H. and Zhong G. (1998). "Inhibition of apoptosis in *Chlamydia*-infected cells: Blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation." J. Exp. Med. **187**: 487-496.

Ferber D.M. and Brubaker R.R. (1981). "Plasmids in *Yersinia pestis*." Infect. Immun. **31**: 839-841.

Fields S. and Sternglanz R. (1994). "The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions." Trends Genet. **10**: 286-292.

Fields S. and Song O. (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interaction." Nature **340**: 245-246.

Finch A., Holland P., Cooper J., Saklatvala J. and Kracht M. (1997). "Selective activation of JNK/SAPK by interleukin-1 in rabbit liver is mediated by MKK7." FEBS Lett. **418**: 144-148.

Fitzgerald K.A. (2001). "Mal (MyD88 adapter-like) is required for TLR-4 signal transduction." Nature **413**: 78-83.

Forsberg A., Viitanen A.-M., Skurnik M. and Wolf Watz H. (1991). "The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*." Mol. Microbiol. **5**: 977-986.

Frederiksen W. (1964). "A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella* X)." Proc. 14th. Scand. Congr. Path. Microbiol. **108**.

Gaede K.I. and Heesemann J. (1995). "Arthritogenicity of genetically manipulated *Yersinia enterocolitica* serotype O8 for Lewis rats." Infect. Immun. **63** :714-719

Galan J.E. and Collmer A. (1999). " Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells." Science **284**: 1322-1328

Galyov, E. E., Hakansson,S. and Wolf-Watz,H. (1994). "Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersinia pseudotuberculosis*." J. Bacteriol. **176**: 4543-4548.

Galyov E.E., Hakansson S., Forsberg A. and Wolf-Watz H. (1993). "A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant." Nature **361**: 730-732.

Gao L.-Y. and Kwai A. (2000). "Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens." Microbes and Infection **2**: 1705-1719.

Ghosh S., May M.J. and Kopp E.B. (1998). "NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune response." Annu. Rev. Immunol. **16**: 225-260.

Gonen H., Smith C.E., Siegel N.R., Kahana C., Merrick W.C., Chakraburty K., Schwartz A.L. and Ciechanover A. (1994) " Protein synthesis elongation factor EF-1 alpha is essential for ubiquitin-dependent degradation of certain N alpha-acetylated proteins and may be substituted for by the bacterial elongation factor EF-Tu." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **91**: 7648-7652

Gosdent N., Maridonneau-Parini I., Sory M.P. and Cornelis G.R. (2002). "Role of the Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to Phagocytosis." Infect. Immun. **70**: 4165-4176.

Gottfried R.S. (1983). The black death. Natural and human disaster in medieval europe. The Free Press, New York, N.Y.

Guan K. and Dixon J.E. (1990). "Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*." Science **249**: 553-556.

Gyuris J., Golemis E.A., Chertkov H. and Brent R. (1993). "Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2." Cell **75**: 791-803.

Hanahan D. (1983). " Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J. Mol. Biol. **166**: 557-580

Harrison S.C. (1996). " Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains." Cell **86**: 341-343

Hatada E.N., Krappmann D. and Scheidereit C. (2000). "NF- κ B and innate immune response." Curr Opin Immunol. **12**: 52-58.

Heesemann J., Gross U., Schmidt N. and Laufs R. (1986). "Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* grown in calcium-deficient media." Infect. Immunol. **54**: 561-567.

Heesemann J. (1987). "Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species." FEMS Microbiol. Lett. **48**: 229-233.

Heesemann J. (1994). "Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen." Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie (7. Auflage) herausgegeben von Brandis H., Eggers H.J., Köhler W., Pulverer G. (Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York).

Heesemann J and Grüter L. (1987). "Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells." FEMS Microbiol. Lett. **40**: 37-41.

Heesemann J., Hantke K., Vocke T., Saken E., Rakin A., Stojiljkovic I and Berner R. (1993). "Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membran polypeptid of 65 000 Da and pesticin sensitivity." Mol. Microbiol. **8**: 397-408.

Heesemann J. and Laufs R. (1983). "Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid." J. Bacteriol. **155**: 761-767.

Heesemann J., Algermissen B. and Laufs R. (1984). "Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*." Infect. Immun. **46** 105-110

Hershko A. and Ciechanover A. (1998). "The ubiquitin system." Annu. Rev. Biochem. **67**: 425-479.

Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A. and Heesemann J. (2000) "Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins." EMBO J. **22**:5989-99

Hornig T., Barton G.M. a. Medzhitov R. (2001). "TIRAP: an adaptor molecule in the toll signalling pathway." Nat. Immunol **2**: 835-841.

Horton R.M., Hunt H.D., Ho S.N., Pullen J.K. and Pease L.R. (1989). " Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension." Gene **77**: 61-68

Huang S., Flanders K.C. and Roberts A.B. (2000) "Characterization of the mouse Smad1 gene and its expression pattern in adult mouse tissues" Gene **258** 43-53

Hueck C.J. (1998). " Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animal and plants." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 379-433

Huwiler A., Brunner J., Hummel R. Vervoordeldonk M., Stabel S., van den Bosch H. and Pfeilschifter J. (1996). "Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase." Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A. **93**: 6959-6963.

Ibrahim A., Goebel B.M., Liesack W., Griffiths M. and Stackebrandt E. (1993). " The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences". FEMS Microbiol. Lett. **114**: 173-177

Iriarte M. and Cornelis G.R. (1995). " MyfF, an element of the network regulation the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*." J. Bacteriol. **177**: 738-744

Medzhitov R. (2001). " Toll-like receptors and innate immunity." Nat. Rev. Immunol. **1**: 135-145

Iriarte M. and Cornelis G.R. (1998). "YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells." Mol. Microbiol. **29**: 915-929.

Ito H., Fukuda Y., Murata K. and Kimura A. (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." J. Bacteriol. **153**: 163-168.

Isberg R.R. and Leong J.M. (1988). " Cultured mammalian cells attach to the invasins protein of *Yersinia pseudotuberculosis*." Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **85**: 6682-6686

Isberg R.R. and Leong J.M. (1990). "Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells." Cell **60**: 861-871.

Itoh F., Asao H., Sugamura K., Heldin C.-H., ten Dijke P. and Itoh S. (2001). "Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads." EMBO J. **20**: 4132-4142.

Jackson P.K., Eeldridge A.G., Freed E. Furstenthal L., Hsu J.Y. Kaiser B.K. and Reimann J.D.R. (2000). "The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases." Cell Biology **10**: 429-439.

Jacobi C.A., Roggenkamp A., Rakin A., Zumbihl R., Leitritz L. and Heesemann J. (1998). "*In vitro* and *in vivo* expression studies of yopE from *Yersinia enterocolitica* using the gfp reporter gene." Mol. Microbiol. **30**: 865-882

Janeway C.A. and Medzhitov R. (2002). "Innate immune recognition." Annu. Rev. Immunol. **20**: 197-216.

Janssens V. and Goris J. (2001). "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling." Biochem. J. **353**: 417-439.

Jiang Z., Zamanian-Daryoush M., Nie H., Silva A.M., Williams B.R. and Li X. (2003). "Poly(dI dC)-induced toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NF κ B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR." J. Biol. Chem. **278**: 16713.

Jiao K., Zhou Y. and Hogan B.L. (2002). Identification of mZnf8, a mouse Kruppel-like transcriptional repressor, as a novel nuclear interaction partner of Smad1." Mol. Cell. Biol. **22**:7633-44.

Jurado R.L. (1997). "Iron, infection, and anemia of inflammation." Clin. Infect. Dis. **25**: 888-895.

Juris S.J., Rudolph A.E., Huddler D., Orth K. and Dixon J.E. (2000). " A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption." Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **97**: 9431-9436

Karin M. and Ben-Neriah Y. (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity." Annu. Rev. Immunol. **18**: 621-663.

Kaufmann S.H. and Hengartner M.O. (2001). " Programmed cell death: alive and well in the new millenium." Trends Cell. Biol. **11**: 526-534

Klinger K., Tchou-Wong K. M., Brandli O., Aston C., Kim R., Chi C. and Rom W.N. (1997). "Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes." Infect. Immun. **65**: 5272-5278.

Kobayashi K., Hernandez L.D., Galan L.E., Janeway Jr. C.A., Medzhitov R. and Flavell R.A. (2002). "IRAK-M is a negative regulator of Toll-Like signalling." Cell **110**: 191-202.

Koh H., Lee K.H., Kim D., Kim S., Kim J.W. and Chung J. (2000). "Inhibition of Akt and its anti-apoptotic activities by tumor necrosis factor-induced protein kinase C-related kinase 2 (PRK2) cleavage." J. Biol. Chem. **275**: 34451-34458.

Kop E., Medzhitov R., Carothers J., Xiao C., Douglas I., Janeway C.A. and Gosh S. (1999). "ECSIT is an evolutionary conserved intermediate in the toll/IL-1 signal transduction pathway." Gene Dev. **13**: 2059-2071.

Kornfeld H., Mancino G. and Colizzi V. (1999). "The role of macrophage cell death in tuberculosis." Cell Death Differ. **6**: 71-78.

Koster M., Bitter W., de Cock H., Allaoui A., Cornelis G.R. and Tommassen J. (1997). "The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex." Mol.Microbiol. **26**: 789-798.

Kruse C., Grunweller A., Willkomm D.K., Pfeiffer T., Hartmann R.K. and Muller P.K. (1998). "tRNA is entrapped in similar, but distinct, nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein complexes, both of which contain vigilin and elongation factor 1 alpha." Biochem. J. **329**: 615-621

Lambert de Rouvroit C.L., Sluifers C. and Cornelis G. R. (1992). "Role of the transkriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*." Mol. Microbiol. **6**: 395-409.

Leung K.Y. and Straley S.C. (1989). " The yopM of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPPb alpha." J. Bacteriol. **171**: 4623-4632

Leung K.Y., Reisner B.S. and Straley S.C. (1990). " YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice." Infect. Immun. **58**: 3262-3271

Li J., Lee G. I., Van Doren S.R. and Walker J.C. (2000). "The FHA domain mediates phosphoprotein interaction." J. Cell Sci. **113**: 4143-4149.

Li S., Strelow A., Fontana E.J. and Wesche H. (2002). "IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase." Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **99**: 5567-5572.

Lim I.K., Park T.J., Park S.C., Yoon G., Kwak C.S., Le M.S., Song K.Y., Choi Y.K. and Hyun B.H. (2001). " Selective left-lobe atrophy by nodularin treatment accompanied by reduced protein phosphatase 1/2A and increased peroxisome proliferation in rat liver." Int. J. Cancer. **91**: 32-40

- Lindler L.E., Klempner M.S. and Straley S.C. (1990). " *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterisation of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague." Infect. Immun. **58**: 2569-2577
- Lindler L.E. and Tall B.D. (1993). " *Yersinia pestis* pH 6 antigen forms fimbriae and is induced by intercellular association with macrophages." Mol. Microbiol. **8**: 311-324
- Liu Z.G., Hsu H., Goeddel D.V. and Karin M. (1996). " Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death." Cell **87** :565-76.
- Liu Q., Yu L., Fu Q., Lang T., Zhang J., Mao D. and Zhao,S. (2000) "Molecular cloning and tissue expression analysis of the beta subunit of elongation factor 1 in the mouse." Biochem. Genet. **38** 111-117
- Ma J. and Ptashne . (1987). " A new class of yeast transcriptional activators." Cell **51**: 113-119
- Makino,K., Oshima,K., Kurokawa,K., Yokoyama,K., Uda,T., Tagomori,K., Iijima,Y., Najima,M., Nakano,M., Yamashita,A., Kubota,Y., Kimura,S., Yasunaga,T., Honda,T., Shinagawa,H., Hattori,M. and Iida,T. (2003) " Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*." Lancet **361** 743-749
- Maniatis T. (1999). " A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways." Genes Dev. **13**: 505-510
- McDonald C., Panayiotis O.V., Bliska J.B. and Dixon J. E. (2003). "The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases." J. of Biol. Chem. **278**: 18514-18523.
- Medzhitov R. and Janeway C. Jr. (2000). " Innate immune recognition: mechanism and pathways." Immunol. Rev. **173**: 89-97

Mercurio, F., Zhu H., Murray B.W., Shevchenko A., Bennett B.L., Li J.W., Young D.B., Barbosa M., Mann, M., Manning A. and Rao A. (1997). "IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation." Science **278**: 860-866.

Merrick W.C. and Nyborg J. (2000). "The protein biosynthesis elongation cycle. In Translation Control of Gene Expression." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: 89-125.

Mills S.D., Boland A., Sory M.P., van der Smissen P., Kerbouch C., Finlay B.B. and Cornelis G.R. (1997). "*Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**: 12638-12643.

Mirande M., Gratecos D., Astier M., Kerjan P., Cerini C. and Semeriva M. (1991). "A component of the multisynthetase complex is a multifunctional aminoacyl-tRNA synthetase." EMBO J. **10**: 4267- 4277

Miura M., H. S., Hattori K. and Nakayama K.-I. (1999). "Strukture and expression of the gene encoding mouse f-box protein Fwd2." Genomics **62**: 50-58.

Miyazawa K., Shinozaki M., Hara T., Furuya T., Miyazono K. (2002). "Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signaling." Genes Cell **7**: 1191-1204.

Monack D.M., Meccas J., Ghori N. and Falkow S. (1997). "*Yersinia* signals makrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary this cell death." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 10385-10390.

Monack D.M., Meccas J., Bouley D. and Falkow S. (1998). "*Yersinia*-induced apoptosis *in vivo* aids in the establishment of a systemic infection of mice." J. Exp. Med. **188**: 2127-2137

Mumby M.C. and Walter G. (1993). "Protein serine/threonine phosphatases: structure,

regulation, and function in cell growth." Physiol. Rev. **73**: 673-699

Murray J.W., Edmonds B.T., Liu G. and Condeelis J. (1996). " Bundling of actin filaments by elongation factor 1 alpha inhibits polymerization at filament ends." J. Cell. Biol. **135**: 1309-1321

Muzio M., Polentarutti N., Bosisio D., Prahlanan M.K. and Mantovani A. (2000). "Toll-like receptors; a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes." J. Leukoc. Biol. **67**: 450-456.

Nemoto S., DiDonato J.A. and Lin A. (1998). "Coordinate regulation of IkappaB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF-kappaB-inducing kinase." Mol Cell Biol. **18**: 7336-7343.

Neyt C. and Cornelis G.R. (1999). "Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translokators YopB and YopD." Mol. Microbiol. **31**: 143-156.

Nilles M.L., Fields K.A. and Straley S.C. (1998). "The V antigen of *Yersinia pestis* regulates Yop vectorial targeting as well as Yop secretion through effects on YopB and LcrG." J. Bacteriol. **180**: 3410-3420.

O'Connell M.A., Bennett B.L., Mercurio F., Manning A.M. and Mackman N. (1998). "Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells." J. Biol. Chem. **273**: 30410-30414.

Orth K., Palmer L.E., Bao Z.Q., Stewart S., Rudolph A.E., Bliska J.B. and Dixon J.E. (1999). "Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector." Science **285**: 1920-1923.

Orth K., Xu Z., Mudgett M.B., Bao Z.Q., Palmer L.E., Bliska J.B., Mangel W.F., Staskawicz B. and Dixon J.E. (2000). "Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease." Science **290**: 1594-1597.

Palmer L.E., Hobbie S., Galan J.E. and Bliska J.B. (1998). "YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK." Mol. Microbiol. **27**: 953-965.

Patterson G.I. and Padgett R.W. (2000). "TGF β -related pathways: roles in *Caenorhabditis elegans* development." Trends Genet. **16**: 27-33.

Patton E.E., Willems A.R. and Tyers M. (1998). "Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis." Trends Genet. **14**: 236-243.

Payne P.L. and Straley S.C. (1998). "YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system." J. Bacteriol. **180**: 3882-3890.

Perez J. M., Siegal G., Kriek J., Hrd K., Dijk J., Canters G. W. and Moller W. (1999) "The solution structure of the guanine nucleotide exchange domain of human elongation factor 1beta reveals a striking resemblance to that of EF-Ts from *Escherichia coli*." Structure Fold Des **217**

Perkins N.D. (2000). "The Rel/NF-kB family: friends and foe." Trends Biochem. Sci. **25**: 434-440.

Perry R.D. and Fetherston J.D. (1997). "*Yersinia pestis*- etiologic agent of plague." Clin. Microbiol. Rev. **10**: 35-66

Perry R.D., Straley S.C., Fetherston J.D., Rose D.J., Grego J. and Blattner F.R. (1998). "DNA sequencing and analysis of the low-Ca²⁺-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5." Infect. Immun. **66**: 4611-4623.

Persson C., Carballeira N., Wolf-Watz H. and Fällman M. (1997). "The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesion." EMBO J. **16**: 2307-2318.

Plano G.V. and Straley S.C. (1993). "Multiple effects of lcrD mutations in *Yersinia pestis*." J. Bacteriol. **175**: 3536-3545.

Plano G.V. and Straley S.C. (1995). "Mutations in yscC, yscD and yscG prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*." J. Bacteriol. **177**: 3843-3854.

Poland J.D. and Barnes A.M. (1979). "Plague." J.H. Steele (ed), CRC handbook series in zoonoses. Section A. Bacterial, rickettsial, and mycotic diseases, vol. I. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla: 515-559.

Prager R., Miold S., Tietze E., Strutz U., Knuppel B., Rabsch W., Hardt W.D. and Tschape H. (2000). " Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*." Int. J. Med. Microbiol. **290**: 605-617.

Rajesh D., Schell K. and Verma A.K. (1999). " Ras mutation, irrespective of cell type and p53 status, determines a cell's destiny to undergo apoptosis by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A." Mol. Pharmacol. **56**: 515-525

Rakin A., Noelting C., Schubert S. and Heesemann J. (1999). "Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*." Infect Immun. **67** 5265-5274

Rathmell J.C. and Thompsen C.B. (1999). "The central effectors of cell death in the immune system." Annu. Rev. Immunol. **17**: 781-828.

Regnier C. H., Song H.Y., Gao X., Goeddel D.V., Cao Z. and Rothe M. (1997). "Identification and characterization of an IkappaB kinase." Cell **90**: 373-383.

Roggenkamp, K. Ruckdeschel, L. Leitritz, R. Schmitt, J. Heesemann. (1996) "Deletion of Amino Acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia* serotype O:8 in selective abrogation of adherence to neutrophils." Infect. Immun. **64**: 2506 - 2514

Rojas M., Olivier M., Gros P., Barrera L.F. and Garcia L.F. (1999). "TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages." J. Immunol. **162**: 6122-6131.

Rosqvist R., Forsberg A., Rimpilainen M., Bergman T. and Wolf-Watz H. (1990). "The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence." Mol. Microbiol. **4**: 657-667.

Rosqvist R., Bolin I. and Wolf-Watz H. (1988). "Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein." Infect. Immun. **56**: 2139-2143.

Ruckdeschel K., Harb S., Roggenkamp A., Hornef M., Zumbihl R., Kohler S., Heesemann J. and Rouot B. (1998). "*Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production." J. Exp. Med. **187**: 1069-1079.

Ruckdeschel K., Machold J., Roggenkamp A., Schubert S., Pierre J., Zumbihl R., Liautard J.P.; Heesemann J and Rouot B. (1997). "*Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extra-cellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun HN2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production." J. Biol. Chem. **272**: 15920-15927.

Ruckdeschel K., Mannel O., Richter K., Jacobi C.A., Trülzsch K., Rouot B. and Heesemann J. (2001). "*Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear-factor-kappaB pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages." J. Immunol. **166**: 1823-1831.

Ruckdeschel K., Roggenkamp A., Lafont V., Mangeat P., Heesemann J. and Rouot B. (1997). "Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophages cell death through apoptosis." Infect. Immun. **65**: 4813-4821.

Ruckdeschel K. (2002). "Immunomodulation of Macrophages by pathogenic *Yersinia* species." Arch. Immunol. et Therapiae Exp. **50**: 131-117.

Sakahira H., Enari M. and Nagata S. (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." Nature **391**: 96-99.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). "Molecular cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Schesser K., Spiik A.K., Dukuzumuremyi J.M., Neurath M.F., Pettersson S. and Wolf-Watz H. (1998) "The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity." Mol. Microbiol. **28**: 1067-1079

Schulman B.A., Carrano A.C., Jeffrey P.D., Bowen Z., Kinnucan E.R., Finnin M.S., Elledge S.J., Harper J.W., Pagano M. and Pavletich NP. (2000) "Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex." Nature **408**: 381-6.

Schulte R., Wattiau P., Hartland E.L., Robins-Browne R.M. and Cornelis G.R. (1996). "Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*." Infect. Immun. **64**: 2106-2113

SenGupta D.J., Zhang B., Kraemer B., Pochart P., Fields S. and Wickend M. (1996). "A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo." Proc. Natl. Acad. Sci. **93**: 8496-8501.

Shao F., Merritt P. M., Bao Z., Innes R.W. and Dixon J.E. (2002). "A *Yersinia* effector and a pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis." Cell **109**: 575-588.

Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K. and Kimoto M. (1999). "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on a toll-like receptor 4." J. Exp. Med. **189**: 1777-1782.

Shtrichman R. and Kleinberger T. (1998). "Adenovirus type 5 E4 open reading frame 4 protein induces apoptosis in transformed cells." J. Virol. **72**: 2975-2982.

Silverman N. and Maniatis T. (2001). "NF- κ B signaling pathway in mammalian and insect innate immunity." Genes Dev **15**: 2321-2342.

Sing A., Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Geiger AM, Kirschning CJ, Wiedemann A, Aepfelbacher M and Heesemann J.(2003) "Mechanisms of *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen." Adv. Exp. Med. Biol. **529** 165-167.

Skrzypek E., Cowan C. and Straley S. C. (1998). "Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus." Mol. Microbiol. **30**: 1051-1065.

Skurnik M. and Wolf-Watz H. (1989). " Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp." Mol. Microbiol. **3**: 517-529

Sory M.P., Boland A., Lambermont I. and Cornleis G.R. (1995). " Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the cyaA gene fusion approach." Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **92**: 11998-12002

Stone S.R., Hofsteenge J. and Hemmings B.A. (1987). "Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A." Biochemistry **26**: 7215-7220.

Sun S.C., Maggirwar S.B. and Harhaj E. (1995). "Sun S.C., Maggirwar S.B. and Harhaj E." J. Biol. Chem. **270**: 18347-18351.

Sun W.Y., Vincent S., Settleman J. and Johnson G.L. (2000). "MEK kinase 2 binds and activates protein kinase C-related kinase 2. Bifurcation of kinase regulatory pathways at the level of an MAPK kinase kinase." J. Biol. Chem. **275**: 24421-24428.

- Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S., Parkhitko A.A. and Fuchs A.Y. (2003). "Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein1 with SCF^{HOS β -TrCP} E3 ubiquitin ligase regulates extent of NF- κ B activation." J. Biol. Chem. **278**:48942-48949
- Traugh J.A. (2001). "Insulin, phorbol ester and serum regulate the elongation phase of protein synthesis." Prog. Mol. Subcell. Biol. **26**: 33-48.
- Von Pawel-Rammingen U., Telpnev M.V., Schmidt G., Aktories K., Wolf-Watz H. and Rosqvist R. (2000). "GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure." Mol. Microbiol. **36**: 737-748.
- Vassalli P. (1992). " The pathophysiology of tumor necrosis factors." Annu. Rev. Immunol. **10**: 411-452
- Venema R.C., Peters H.I. and Traugh J. A. (1999). "Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) and valyl-tRNA synthetase by protein kinase C and stimulation of EF-1 activity." J. Biol. Chem. **266**: 12574-12580.
- Viprey V., Del Greco A., Golinowski W., Broughton W.J. and Peret X. (1998). "Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*." Mol. Microbiol. **28**: 1381-1389.
- Wang R.F. and Kushner S.R. (1991). " Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*." Gene **100**: 195-199
- Wang (2001). "TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK." Nature **412**: 346-351.
- Wauters G., Kandolo K. and Janssens M. (1987). "Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*." Contrib. Microbiol. Immunol. **9**: 14-21.

Whitman M. (1998). "Smads and early developmental signaling by the TGF β superfamily." Genes Dev. **12**: 2445-2462.

Winston J.T. et al. (1999). "A family of mammalian F-box proteins." Curr. Biol. **9**: 1180-1182.

Woestyn S., Allaoui A., Wattiau P. and Cornelis G.R. (1994). "YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery." J. Bacteriol. **176**: 1561-1569.

Wrana J.L. (2000). "Regulation of Smad activity." Cell **100**: 189-192

Wright S.D., Tobias P.S., Ulevitch R.J. and Ramos R.A. (1989). "Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages." J. Exp. Med. **170**: 1231-1241.

Wurfel M.M., Monks B.G., Ingalls R.R., Dedrick R.L., Delude R. and Zhou D. (1997). "Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS response *ex vivo*, whereas *in vivo* response remain intact." J Exp Med. **186**: 2051-2056.

Wainwright L.A. and Kasper J.B. (1998). "EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol. Microbiol. **27**: 1247-1260.

Yamaoka S., Courtois G., Bessia C., Whiteside S.T., Weil R., Agou F., Kirk H.E., Kay R.J. and Israel A. (1998). "Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation." Cell **93**: 1231-1240.

Yamamoto M., Sato S., Mori K., Hoshino K., Takeuchi O., Takeda K. and Akira S. (2002). "A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling." J. Immunol. **169**: 6668-6672.

Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Uematsu S., Hoshino K., Kaisho T., Takeuchi O., Takeda K. and Akira S. (2003) "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway." Nat Immunol. **4**:1144-1150

Yang Y., Merriam J.J., Mueller J.P. and Isberg R.R. (1996). "The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells." Infect. Immun. **64**: 2483-2489.

Yaron A., Hatzubai A., Davis M., Lavon I., Amit S., Manning M., Andersen J.S., Mann M., Mercurio F. and Ben-Neriah Y. (1998). "Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase." Nature **396**: 590-594.

Yingling J.M., Das P., Savage C., Zhang M., Padgett R.W. and Wang X.F. (1996). "Mammalian dwarfins are phosphorylated in response to transforming growth factor beta and are implicated in control of cell growth." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:8940-8944.

Yokoi S., Yasui K., Iizasa T., Takahashi T., Fujisawa T. and Inazawa J. (2003). "Down-regulation of SKP2 induces apoptosis in lung-cancer cells." Cancer Sci. **94**: 344-349

Yon J. and Fried M. (1989). "Precise gene fusion by PCR." Nucleic Acids Res. **17**: 4895

Yordy J.S. and Muise-Helmericks R.C. (2000). "Signal transduction and the Ets family of transcription factors." Oncogene **19**: 6503-6513

Yu X.X., Du X., Moreno C.S., Green R.E., Ogris E., Feng Q., Chou L., McQuoid M.J. and Pallas D.C. (2001). "Methylation of the protein phosphatase 2A catalytic subunit is essential for association of B α regulatory subunit but not SG2NA, striatin, or polyomavirus middle tumor antigen." Mol. Biol. Cell. **12**: 185-199

Zagulski M., Herbert C.J. and Rytka J. (1998). "Sequencing and functional analysis of the yeast genome." Acta Biochim. Pol. **45**: 627-643

Ziegler P. (1991). "The black death." Alan Sutton Publishing Inc., Wolfeboro Falls, N.H.

Zimmermann K.C., Bonzon C. and Green D.R. (2001). " The machinery of programmed cell death." Pharmacol. Ther. **92**: 57-70

Zumbühl R., Aepfelbacher M., Andor A., Jacobi C.A., Ruckdeschel K. et al. (1999). "The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA." J. Biol. Chem. **274**: 29289-29293.

7. Lebenslauf**persönliche Angaben**

Name: Richter
Vorname: Kathleen
Geburtsdatum: 27.08.1975 in Bautzen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

09/82-08/86 Polytechnische Oberschule in Kamenz
09/86-08/87 Polytechnische Oberschule in Bautzen
09/87-06/94 Sportgymnasium Dresden
Abschluss mit Abitur

09/94-04/99 Technische Universität Dresden
Studiengang Biologie, Studienrichtung Genetik
Abschluss als Diplombiologin

8. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die Aufnahme und die Bereitstellung des Themas am Lehrstuhl für Bakteriologie des Max-von-Pettenkofer-Institutes München.

Bei Prof. Dr. E. Weiss bedanke ich mich für die Betreuung dieser Arbeit sowie der Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie der LMU. In Gesprächen konnte ich stets wissenschaftliche Anregungen finden.

Anschließend möchte ich besonders Dr. K. Ruckdeschel danken, der immer ein offenes Ohr für Probleme jeglicher Art hatte und es versteht ein sehr gutes Arbeitsklima zu schaffen. Die Bestärkung in der Richtigkeit meines Schaffens hat mich in einigen Phasen meiner Arbeit aufgebaut. Nicht zu vergessen sind die „ausgelassenen“ Feiern nach gelungenen Veröffentlichungen, bei denen ich meinen kulinarische Hintergrund erweitern konnte. Ein Grund mehr, diese Zeit in sehr schöner Erinnerung zu behalten.

Ein weiteres Dankeschön an unsere Super-MTA Gudrun Pfaffinger. Durch ihre Unermüdlichkeit konnte ich in stressigen Arbeitsphasen stets auf ihre Unterstützung bauen. In „gefährlichen“ elektrotechnischen Methoden war sie immer in vorderster Front.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen ehemaligen sowie jetzigen Laborkollegen, welche immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten.

Mein größter Dank gilt natürlich meinen Eltern, der Familie und Jens, welche mich in meiner ganzen akademischen Laufbahn tatkräftig unterstützt haben. Ich hoffe, ich kann ein wenig von dem zurückgeben, was ich all die Jahren bekommen habe. Die Vernachlässigung einiger sozialer Kontakte versuche ich unverzüglich aufzuholen.