

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der
Ludwigs-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl: Bakteriologie
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann

**Molekularbiologische Charakterisierung des Membranankers des Yersinien-
Adhaesins YadA**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Maximilian Werner Tiller
aus
Gera
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Uli C. Brödl
Priv. Doz. Dr. Markus Rentsch

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Andreas Roggenkamp

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2008

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2002 bis Februar 2008 im Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität München erstellt.

An dieser Stelle möchte ich zuerst Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann danken für die Überlassung des interessanten Themas, für das Bereitstellen eines Arbeitsplatzes, meine Aufnahme in das Graduiertenkolleg für Infektion und Immunität, sowie für die weiterführenden und hilfreichen Gespräche.

Besonderen Dank schulde ich natürlich Herrn Priv. Doz. Dr. Andreas Roggenkamp für all die Arbeit und Mühe, die er mir und meiner Arbeit in seiner Rolle als mein Betreuer widmete, aber auch für sein Verständnis und seine Unterstützung gegenüber den Notwendigkeiten, die Ereignisse jenseits dieser Doktorarbeit mit sich brachten.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Harald Hoffmann und Herrn Dr. Nikolaus Ackermann für ihre Unterstützung, Tips, Ratschläge, Vorarbeiten und praktischen Hilfen, die die Bearbeitung des Themas ungemein erleichterten, vereinfachten und beschleunigten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Gisela Anding, ohne deren Mitarbeit, praktische und mentale Unterstützung, aufrichtende Worte, sowie Geduld, Nervenstärke und Verständnis für meine Situation diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für ihre Unterstützung sowie das Ermöglichen meiner gesamten Ausbildung, einschließlich dieser Arbeit, möchte ich meinen Eltern aus ganzem Herzen danken.

Tiefer Dank gilt auch meinen beiden Kindern, Konstantin und Helena, deren beider Geburt in den Zeitraum fiel, in dem diese Arbeit entstand, und die deshalb sehr oft und häufig auf die Anwesenheit ihres Vaters verzichten mussten.

Nicht zuletzt möchte ich im Besonderen meiner Frau Britta danken, die die vorliegende Arbeit in ihrem gesamten Entstehungsprozess begleitete und einige Rückschläge und Enttäuschungen dank ihres unendlichen Verständnisses und ihrer grenzenlosen Geduld auffing. Ihr ist die Arbeit daher gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung in die Gattung <i>Yersinia</i>	1
1.2	Klinik der Yersiniose	3
1.3	Diagnostik der Yersiniose	4
1.4	Therapie der Yersiniose	4
1.5	Pathogenität von <i>Y. enterocolitica</i>	4
1.6	Pathogenitätsfaktoren von <i>Y. enterocolitica</i>	5
1.7	Das Adhaesin YadA	6
1.8	Die Oca-Familie	7
1.9	Die Membranankerdomäne der Oca-Familie	10
1.10	Fragestellung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Medien	15
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.5	Kits	18
2.1.6	Software	18
2.1.7	Verwendete Antikörper	18
2.1.7.1	Monoklonale Antikörper	18
2.1.7.2	Polyklonale Antikörper, Peptidantikörper	18
2.1.8	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	19
2.1.9	Verwendete Primer/Oligonukleotide	21
2.1.10	Puffer und Lösungen	23
2.1.10.1	Herstellung Ca^{2+} -kompetenter Bakterien	23
2.1.10.2	Plasmid-DNA-Präparation	23
2.1.10.3	Isolation von bakteriellen Außenmembranproteinen	24
2.1.10.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.1.10.5	Coomassie-Färbung eines Proteingels	25
2.1.10.6	Immunoblot/Westernblot eines Proteingels	25
2.1.10.7	Serumresistenztest	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Kultivierung von Bakterien	27
2.2.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> (Ca^{2+} -Methode)	27
2.2.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	28
2.2.4	Konjugation	28
2.2.5	Präparation von Plasmid-DNA	29
2.2.6	DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen	30
2.2.7	Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA	31
2.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.10	Herstellung der FLAG-Oligonukleotid-Inserts	34
2.2.11	DNA-Gelelektrophorese	34
2.2.12	DNA-Sequenzierung	35
2.2.13	DNA-Konstruktion der YadA-FLAG-Mutanten und YadA-Ankerhybridmutanten mit den Multicopy-Plasmiden pUC-A-1 und pUC-A-H in <i>E. coli</i> DH5 α	35
2.2.14	Cystein-scanning Mutagenese	39

2.2.15	Transfer der <i>yadA</i> -Cystein-Gene von <i>E. coli</i> DH5 α über <i>E. coli</i> SM10 λ pir in <i>Y. enterocolitica</i>	39
2.2.16	Isolation von bakteriellen Außenmembranproteinen	40
2.2.17	Proteinmengenbestimmung nach Lowry.....	41
2.2.18	Markierung der YadA-S-C-Varianten mit PEO-Biotin-Maleimid.....	44
2.2.19	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.2.20	Immunoblot/Westernblot	47
2.2.21	Dotblotverfahren	48
2.2.22	Immunofluoreszenztests.....	49
2.2.23	YadA-Kollagenbindungsanalysen.....	49
2.2.24	Antikörperagglutinations- und Autoagglutinationstest	50
2.2.25	Zelladhärenztest	51
2.2.26	Serumresistenztest.....	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Untersuchungen zur Topologie des membraintegrierten YadA.....	53
3.1.1	FLAG-Mutagenese.....	53
3.1.1.1	Strategie/Konstruktion/Mutagenese	53
3.1.1.2	Expression der FLAG-YadA-Fusionsgene	54
3.1.1.3	Nachweis der FLAG- <i>yadA</i> -Fusionsgene an der bakteriellen Aussenmembran.....	56
3.1.2	Cysteine-Scanning Mutagenese	58
3.1.2.1	Strategie/Mutagenese	58
3.1.2.2	Analyse der YadA-S-C-Varianten	59
3.1.2.3	Nachweis der YadA-S-C-Varianten an der bakteriellen Aussenmembran	60
3.1.2.4	Nachweis von Biotin-Maleimid-konjugiertem YadA	61
3.2	Untersuchungen zur Transmembrantransport und zur Oligomerisierung von YadA: Analyse von YadA-Ankerhybrid-Konstrukten	64
3.2.1	Fragestellung und Strategie.....	64
3.2.2	Expression der YadA-Ankerhybride in WA(pYVO8-A0).....	65
3.2.3	Transport der Yad-A-Ankerhybride in die äußere Membran.....	66
3.2.4	Nachweis der YadA-Ankerhybrid-Proteine auf der Oberfläche der Außenmembran von <i>Y. enterocolitica</i>	67
3.2.5	YadA-Ankerhybrid-abhängige Serumresistenz	68
3.2.6	Adhärenzverhalten der <i>Yersinien</i> -Stämme mit YadA-Ankerhybrid-Proteinen	69
4	Diskussion	71
5	Zusammenfassung.....	78
6	Literaturverzeichnis.....	80

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Gattung *Yersinia*

1964 wurde die Gattung *Yersinia*, die zuvor der Gattung *Pasteurellae* zugeordnet wurde, nach dem schweizer Bakteriologen Alexandre J. Yersin benannt, der 1894 als Erster den Erreger der Pest (*Yersinia pestis*) isolierte (Yersin 1894). Zur Gattung *Yersinia* zählen neben *Y. pestis* u. a. die humanpathogenen Arten *Y. pseudotuberculosis*, ebenfalls seit Ende des 19. Jahrhunderts bekannt (Malassez und Vignal 1883), und *Y. enterocolitica*, die erst 1938 entdeckt wurde und 1964 ihren endgültigen Namen bekam, nachdem sie zuvor „*Bacterium enterocoliticum*“ bzw. „*Pasteurella X*“ genannt wurde (Köhler et al., 2001). Seit 1974 zählt man die Yersinien zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Yersinien sind pleomorphe, gramnegative Stäbchenbakterien, die keine Sporen bilden, Katalase positiv und Oxidase negativ sind sowie fakultativ anaerob wachsen. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 28°C und 30°C. Darüber hinaus ist Wachstum aber auch im Temperaturbereich zwischen 4°C und 43°C möglich (mesophil). Die enteropathogenen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* vermehren sich auch im Temperaturbereich 0-4°C (psychrophil), was für die Lebensmittelindustrie von Bedeutung ist. Unter 30°C Anzuchttemperatur sind *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* peritrich begeißelt und beweglich.

Zur Gattung *Yersinia* zählen derzeit 11 Spezies, darunter die drei humanpathogenen Arten *Y. pestis* (Erreger der Pest), *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. Die Pest ist primär eine Erkrankung von Nagetieren (Meriones, u.a.). Sie wird durch *Y. pestis*-infizierte Flöhe auf den Menschen übertragen und verursachte besonders im Mittelalter verheerende Epidemien in Europa (Ell et al. 1984). Auch heute tritt die Pest in einigen Ländern noch endemisch auf (Butler 1983). *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* verursachen eine intestinale Infektion mit Durchfall, kolikartigen Unterbauchschmerzen und mesenterialer Lymphadenitis. Diese in der Regel selbstlimitierende Erkrankung wird Yersiniose genannt. Sie wird hauptsächlich durch kontaminierte Lebensmittel, wie Schweinefleisch und Milchprodukte, auf den Menschen übertragen (Lee et al. 1977, Shayegani et al. 1981), was vor allem durch die Fähigkeit sich bei 4°C zu vermehren begünstigt wird. Während einige Serogruppen von *Y. kristensenii* in Mäusen, die mit Eisenverbindungen vorbehandelt wurden, Virulenz zeigen (Robins-Browne et al. 1990), konnte Tierpathogenität für die Arten *Y. frederikensii*, *Y. intermedia*, *Y. rhodei*, *Y. mollaretii* und *Y. bercovieri* nicht nachgewiesen werden (Shayegani et al. 1981). Zu den fischpathogenen Arten zählt *Y. ruckeri* (Ewing et al. 1978).

Tabelle 1:	
Yersinien-Art	Pathogenität
<i>Y. pestis</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i> <i>Y. enterocolitica</i>	humanpathogen (Pesterreger bzw. enteropathogen (Yersiniosen))
<i>Y. ruckeri</i>	fischpathogen (Rotmaulerkrankung bei Lachsen und Forellen)
<i>Y. frederiksenii</i> , <i>Y. rohdei</i> , <i>Y. aldovae</i> , <i>Y. kristensenii</i> , <i>Y. bercovieri</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. Mollaretii</i>	Nicht humanpathogen

Die Unterteilung in Serogruppen anhand des O-Antigens (Lipopolysaccharid) hat sich bei Yersinien bewährt. *Y. pseudotuberculosis* umfasst 6 Serotypen, von denen O1 für die meisten Infektionen verantwortlich gemacht werden kann. Unter den 60 Serotypen von *Y. enterocolitica* haben O:3, O:8, O:9, O:13, O:20, und O:5,27 die größte klinische Bedeutung. Epidemiologische Untersuchungen haben einen Zusammenhang zwischen Serotypen und geographischen Häufungen aufgezeigt. Für Nordamerika sind die sog. „amerikanischen“ Serogruppen (O:8, O:13, O:20) typisch, während in Europa, Kanada und Japan die „europäischen“ Serogruppen (O:3, O:9, O:5,27) vorherrschen. Anhand ihrer Virulenz im Mausmodell kann man enteropathogenen Yersinien in mausletale (*Y. pseudotuberculosis* und „amerikanische“ Serogruppen von *Y. enterocolitica*), sowie nicht mausletale (europäische Serogruppen von *Y. enterocolitica*) unterteilen (Carter 1975, Cornelis et al. 1987). Die O-Serotypisierung ist hilfreich pathogene *Y. enterocolitica* von klinischen Isolaten zu unterscheiden. Es kann dabei jedoch auf Grund von kreuzreagierenden O-Antigenen zur falschen Artdifferenzierung kommen. Nicht zuletzt sei auch die Unterteilung einzelner *Y. enterocolitica* Isolate anhand von biochemische Eigenschaften genannt. Dabei gelten *Y. enterocolitica*-Isolate der Biovar 1B, 2, 3, 4 und 5 als pathogen für Mensch und Nager, während Biovar 1A ubiquitär vorkommt (Van Noyen et al. 1981). Biovar 1B werden nahezu ausschließlich in den USA isoliert (Serotypen O:8, O:13, O:20), alle anderen Biovar können überall auf der Welt vorgefunden werden. Inzwischen ist mittels t-DNA-basierter PCR und Fluoreszenz-in Situ-Hybridisierung mit r-RNA-spezifischen fluoreszierenden Oligonukleotiden eine rasche Differenzierung der Biogruppen möglich (Trebesius et al., 1998).

Tabelle 2: Korrelation von Virulenz, Biotyp, Serotyp und Verbreitung bei *Y. enterocolitica* (nach Bottone et al., 1997).

Human-Pathogen	Biotyp	Serotyp	Verbreitung
-	1A	O:5, O:6,30, O:7,8, O:18, O:46	Darm von Säugetieren, Umwelt, weltweit
+	1B	O:8, O:4, O:13, O:18, O:20, O:21	Wildtiere, Schwein (O:8), Umwelt, häufig in den USA
+	2	O:9, O:5,27	Schwein, Europa (O:9), USA, Japan
+	3	O:1,2,3, O:5,27	Chinchilla, Schwein (O:5,27)
+	4	O:3	Schwein, Europa, USA,
+	5	O:2,3	Hase, Europa

1.2 Klinik der Yersiniose

Das klinische Bild und der Verlauf einer *Y. enterocolitica*- oder *Y. pseudotuberculosis* – Infektion sind sehr stark vom Alter des jeweiligen Patienten aber auch von seinem Abwehrzustand, dem Histokompatibilitätstyp und dem Geschlecht abhängig. So handelt es sich bei Säuglingen und Kleinkindern um eine im Regelfall sich selbst limitierende Gastroenteritis mit Fieber, wässrigem bis blutigem Durchfall und Erbrechen. Jugendliche erkranken nach einer Infektion meist an einer akuten mesenterialen Lymphadenitis (Ileozoekalwinkel) mit Fieber, abdominellen Schmerzen im rechten unteren Quadranten (Pseudoappendizitis) und seltener mit Durchfällen. Bei Erwachsenen ist das Spektrum des klinischen Erscheinungsbildes einer Yersiniose unspezifischer. Oftmals zeigt sich lediglich ein grippaler Infekt mit Pharyngitis. Es kann aber auch zu einer chronisch rezidivierenden Ileokolitis kommen, dem sogenannten „Pseudo-Crohn“. Klinisch von Bedeutung sind auch die aseptischen, extraintestinalen Begleit- und Folgeerkrankungen, wie die reaktive Arthritis, bei der es 1-2 Wochen nach *Yersinia*-Darminfektion zu einer sterilen Mono-oder Oligoarthritis kommt, die normalerweise nach 4-12 Wochen wieder abklingt. Chronische Verläufe sind besonders bei HLA-B27-positiven Patienten möglich. Eine weitere extraintestinale Manifestation ist das Erythema nodosum, das häufiger bei Frauen als bei Männern vorkommt. Hierbei handelt es sich um erythematöse Hautveränderungen vor allem der unteren Extremität, nach abgelaufener Yersiniose. Weitere Yersiniose-assoziierte Erkrankungen sind Morbus Reiter (Trias: Arthritis, Uveitis, Urethritis), Athralgien, Myalgien, Uveitis anterior, Urticaria, Sweet-Syndrom, fernöstlich-

scharlachähnliches Fieber/Kawasaki-ähnliches-Syndrom (*Y. pseudotuberculosis*), Guillain-Barré-Syndrom (Köhler, Eggers et al. 2001).

1.3 Diagnostik der Yersiniose

Zur Diagnostik der Yersiniose stehen verschiedene Verfahren zu Verfügung. Wichtig ist der Erregernachweis aus dem Stuhl, bei septischer Symptomatik auch aus dem Blut. Darüber hinaus ist ein Nachweis der Yersinien aus Dünndarmbiopsaten oder mesenterialen Lymphknoten, die eventuell bei einem operativen Eingriff gewonnen werden, sinnvoll. Serologisch kann eine Serokonversion durch Nachweis agglutinierender Antikörper gegen O- und H-Antigene nachgewiesen werden. Des Weiteren stehen einem diesbezüglich auch indirekte Hämagglutinationstests oder ELISA zur Verfügung. Seit einigen Jahren werden auch spezifische Antikörper (IgG, IgA und IgM) gegen *Yersinia outer proteins* (sog. Yop's, s.u.) mittels Immunoblot nachgewiesen. Besteht der Verdacht auf Yersinia- Folgeerkrankungen ist ein Yop-spezifischer IgA-Nachweis differentialdiagnostisch relevant.

1.4 Therapie der Yersiniose

In der Regel ist eine medikamentöse Therapie einer unkomplizierten Yersiniose obsolet. Palliative Maßnahmen, wie beispielsweise eine orale Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution sind in den meisten Fällen ausreichend. Akute Yersiniosen bei abwehrschwachen Patienten können zu septischen Verlaufsformen führen und müssen antibiotisch therapiert werden, wobei hierbei Cephalosporine der III. Generation oder Fluor-Chinolone Mittel der Wahl sind. Eine hohe Aktivität induzierbarer β -Laktamasen verhindert ein therapeutisches Wirken von Penicillinen oder I.- und II.-Generation-Cephalosporinen (Cover & Aber, 1989). Alternativ sind Cotrimoxazol, Tetrazyklin oder Aminoglykoside einsetzbar. Auf Folgeerkrankungen scheint eine antibiotische Therapie hingegen kaum Einfluß zu haben.

1.5 Pathogenität von *Y. enterocolitica*

Yersinia enterocolitica ist im Tierreich weit verbreitet. Beim Menschen spielt für das Infektionsgeschehen vor allem der Genuss von kontaminiertem Schweinefleisch eine Rolle. Nach Hof, Müller, Dörries (2000) sind etwa 60% der *Yersinia enterocolitica*-Infektionen mit dem Genuss von rohem Schweinefleisch assoziiert. Die Erreger werden oral aufgenommen und dringen dann in das darmassoziierte lymphatische

Gewebe ein. Hier vermehren sie sich und bilden einen Abszess (Mikroabszess). Während einer akuten Infektionsphase werden massenhaft Yersinien über den Darm ausgeschieden. Nun kann es zum Einbruch in das Darmlumen einerseits, zur Ausbreitung über abfließende Lymphgefäße in die mesenterialen Lymphknoten andererseits kommen. Endoskopisch und histologisch sind bei einer vorliegenden Yersiniose oberflächliche apthoide Ulzerationen von Ileum und Kolon zu erkennen. Bei Vorliegen schwerer Grundleiden, wie Leukämie, hämolytische Anämie, Diabetis mellitus, Leberzirrhose, Hämosiderose oder anderen, werden bakteriämische Verläufe und Sepsis beobachtet.

1.6 Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica*

Die humanpathogenen Yersinien verfügen über eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren, von denen einige chromosomal, andere auf dem 70 kb großen hochkonservierten (55-90%) Virulenzplasmid pYV lokalisiert sind. Zu den chromosomal kodierten Faktoren gehören das *Invasin* (InV), der *attachment invasive locus* (Ail), die *mucoïd yersinia fibrillae* (Myf) und das *Yersinia hitzestabile Enterotoxin* (Yst), sowie das Yersiniabactin-Siderophorsystem (FyuA/Irp1-9). Das Invasin ist für die Zellinvasion der Yersinien in die Peyer Plaques verantwortlich (Tran van Nhieu & Isberg, 1993, Wachtel & Miller 1995), Ail vermittelt Serumresistenz und das Yst verursacht im Kaninchen wässrigen Durchfall (Delor & Cornelis, 1992). Die Rolle von Myf ist bisher ungeklärt. Auch das Yersiniabactin (Ybt) – Siderophorsystem, bestehend aus FyuA (Ybt-Siderophor-Rezeptor) mit Irp1-9 (*iron-repressible proteins* Nummer 1 bis 9), zählt zu den chromosomalen Pathogenitätsfaktoren. Ybt ist für eine effektive Eisenversorgung der pathogenen Yersinien wichtig (Brem et al, 2001). Darüber hinaus spielen plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren eine wichtige Rolle. Diese befähigen die Yersinien die angeborenen Immunantwort des Wirtes zu unterlaufen (beispielsweise Makrophagen und polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten, PMN). Das plasmidkodierte Yersiniaadhäsın YadA vermittelt Zelladhärenz. Effektorproteine (sog. „*Yersinia outer proteins*“, Yop H, E, T, O, P), die über eine plasmidkodierte Typ III-Proteinsekretionssystem in die Wirtszelle „injiziert“ werden, inhibieren Signalwege der Wirtszelle. YopH ist eine Tyrosinphosphatase, mittels derer es zu Ausschaltung der Phagozytose kommt (Rosquist et al, 1988). YopQ und N werden regulatorische Effekte zugeschrieben. Yop B und D erfüllen Translokationsfunktionen

1.7 Das Adhäsın YadA

Die Anhaftung von Bakterien an Zellen oder Basalmembranen wird durch spezielle Proteinstrukturen ermöglicht, den sog. Adhäsinen. Durch sie wird die physikalische Entfernung der Erreger von Wirtszellen, beispielsweise durch hydrodynamische Scheerkräfte, schwieriger. Für Bakterien mit entsprechenden Adhäsinen ist es so möglich, neue Lebensräume zu erschließen. Bemerkenswert dabei ist die hohe, Immunglobulinen ähnliche, Spezifität mit denen die Adhäsine auf molekularer Ebene an ein Rezeptormolekül binden. Damit eröffnet sich den Bakterien die Möglichkeit speziesspezifische ökologische Nischen zu besiedeln, wie beispielsweise *Escherichia coli* im Harntrakt (Svanborg, 1994). Das Yersinien-Adhäsın A, früher auch P1 oder Yop1 genannt (Skurnik und Wolf-Watz, 1989), wird durch das *yadA*-Gen kodiert, das sich auf dem 70 kb-Virulenzplasmid pYV zusammen mit dem gesamten Typ III-Sekretionsapparat und dessen Yops befindet. Unbeeinflusst vom *lcr*-Regulon, wird es bei 37°C Ca^{2+} -unabhängig exprimiert, verstärkt über den Transkriptionsaktivator VirF (LcrF) (Skurnik und Toivanen, 1992). Zur Expression *in vitro* eignet sich eine Anzucht in Mangelmedium (Kapperud et al., 1985). Als Hinweis für seine Pathogenität im inneren Milieu des Makroorganismus kann die Tatsache gewertet werden, dass YadA bei einer Temperaturerhöhung auf 37°C innerhalb von 2 Minuten an der Bakterienoberfläche nachweisbar ist (Bölin et al., 1982). Bei *Y. pestis* ist die Expression von *yadA* durch Deletion eines Basenpaares zu Beginn der kodierenden Region (Entstehung eines Stopcodons) unterbrochen (Skurnik & Wolf-Watz, 1989; Tahir & Skurnik, 2001).

Bis dato wurden zahlreiche Versuche, in der Hauptsache *in vitro* und im Mausinfektionsmodell, durchgeführt, um die verschiedenen Funktionen von YadA zu entschlüsseln. Dabei konnte herausgefunden werden, dass YadA zumindest bei *Y. enterocolitica* ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist. Bei *Y. pseudotuberculosis* hingegen findet sich keine wesentliche Einschränkung der Virulenz bei Fehlen des Adhäsins (Kapperud & Namork, 1987; Skurnik et al., 1988). YadA vermittelt bei 37°C und maximaler Expression Autoagglutination (Skurnik et al., 1984). Auch Bindung und extrazelluläre Lokalisation an epitheliale Zellen wird durch YadA ermöglicht (Heesemann und Grueter, 1987). Eine weitere spezifische YadA-Funktion ist die Adhärenz an Proteine der extrazellulären Matrix. So ist *Y. enterocolitica*, dank YadA, in der Lage an Kollagen Typ I, II und IV (Emödy et al., 1989; Schulz-Koops et al.,

1992; Roggenkamp et al., 1995), an zelluläres Fibronectin (Terti et al., 1992; Schulze-Koops et al., 1993) sowie an Laminin (Flügel et al., 1994; Tamm et al. 1993) zu binden. Außerdem konnte YadA die Fähigkeit zur Adhärenz an intestinalen Mucus und an die Bürstensaummembran von Kaninchen zugeschrieben werden (Mantle et al., 1989; Paeregard et al., 1991). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Yersinien über YadA an humane Granulozyten (PMN) binden können, selbst im nichttopsonierten Zustand (Roggenkamp et al., 1996). Dies ermöglicht die Inhibition der Granulozytenfunktion durch die mittels des TypIII-Sekretionssystems injizierten Yops (insbesondere YopH). Dass die Serumresistenz grundsätzlich abhängig von der YadA-Produktion ist, zeigte sich in Versuchen, bei denen YadA-defiziente Stämme die Fähigkeit zur Resistenz gegen Komplementlyse verloren haben (Heesemann & Grueter, 1987). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass YadA einen protektiven Effekt gegen Defensine von Granulozyten vermittelt (Visser et al, 1996). Erst kürzlich wurde außerdem beschrieben, dass YadA in der Lage ist, die Produktion von Interleukin 8 in epithelialen Zellen zu fördern (Schmid et al., 2004). Im Mausmodell erwies sich YadA als bedeutender Pathogenitätsfaktor (Pepe et al., 1995). Außerdem waren Mäuse, die mit YadA-spezifischen Antikörpern behandelt (passive Immunisierung) wurden, gegen eine Infektion mit *Y. enterocolitica* immun (Vogel et al., 1993).

1.8 Die Oca-Familie

Mittels Sequenzvergleichen konnte gezeigt werden, dass YadA den Prototyp einer neuen Klasse von Nicht-Fimbrien-Adhäsinen darstellt (Hoiczkyk et al., 2000), die von Roggenkamp als Oca (*Oligomere coiled-coil Adhäsine*)–Familie bezeichnet wird, aber auch unter dem Namen AT2 (Autotransporter 2)-Familie bekannt ist (Roggenkamp et al., 2003; Kim et al., 2006). Die Oca-Familie zählt zu den Typ-V-Autotransportern. Auf Grund des Aufbaus aus drei identischen Monomeren (s.u.) und der Art und Weise ihrer Sekretion bildet die Oca-Familie jedoch eine eigene Untereinheit, die TypVc- oder AT2- Autotranporter (Henderson et al, 2004). Die YadA-homologen Proteine der Oca-Familie existieren in verschiedenen Subdivisionen der *Proteobacteria* wie den α -*Proteobacteria*, wie z.B. dem Hülsenfruchtsymbionten *Sinorhizobium meliloti* (Hoiczkyk et al., 2000), in den für Menschen und Pflanzen pathogenen Subdivisionen der β -*Proteobacteria* wie *Neisseria meningitidis* (NadA) (Comanducci et al., 2002) und γ -*Proteobacteria* wie *Escherichia coli* (Eib-Proteine) (Sandt & Hill, 2001),

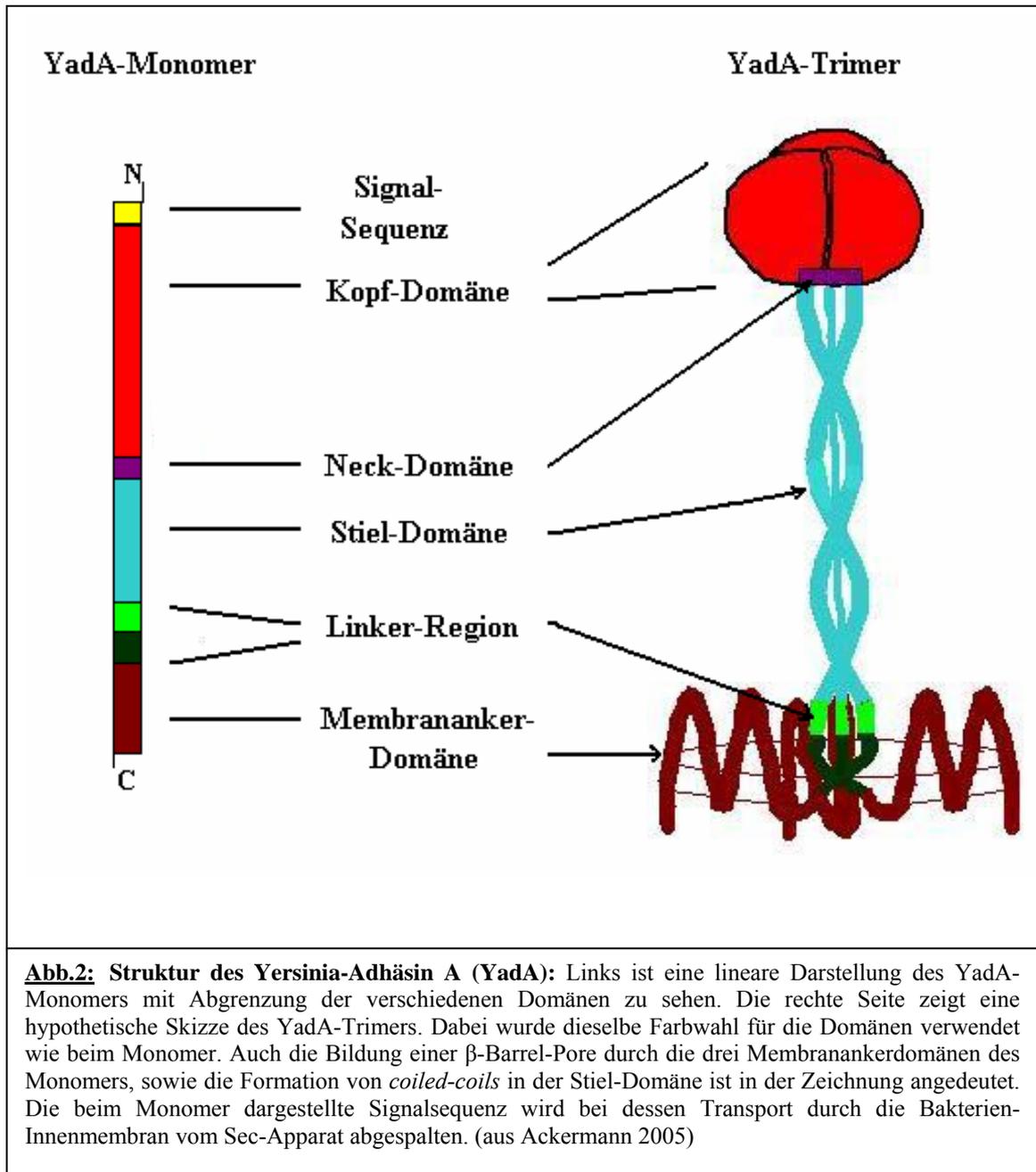
Haemophilus influenzae (Hia) (Surana et al., 2004), *Haemophilus ducreyi* (DsrA) (Elkins et al., 2000), *Moraxella catarrhalis* (UspA1, UspA2), *Y. enterocolitica* (YadA) (Hoiczky et al., 2000) und dem Reispflichtigen *Xanthomonas oryzae* (XadA) (Ray et al., 2002), sowie in der Gattung Clostridia, z.B. Dha1 in *Desulfotobacterium hafniense* (Kim et al., 2006). Wie YadA bilden auch die bereits näher charakterisierten Proteine der Oca-Familie (Hia, NadA, UspA1, UspA2, DsrA, Eib-Proteine) hitzestabile Oligomere. Konservierte Strukturelemente aller Oca-Mitglieder sind (I) eine N-terminale Sec-abhängige Sekretionssignalsequenz, (II) eine hoch konservierte Hals (*neck*) -Domäne, (III) eine längenmäßig variierende Stieldomäne mit hoher Wahrscheinlichkeit für *coiled coils* und (IV) eine C-terminale Membrananker-Domäne bestehend aus einem linkshändigen *coiled-coil* Segment (sog. *linker*-Bereich), gefolgt von vier amphipatischen transmembranen β -Faltblattstrukturen am C-Terminus des Proteins (Abb.2). Im Folgenden soll der strukturelle Aufbau von YadA als Beispiel für die gesamte Oca-Gruppe erklärt werden.

Anhand der dreidimensionalen Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Quartärstruktur von YadA um ein aus drei identischen Monomeren bestehenden Oligomer handelt. Für die Größe der Monomere wurde anhand von Sequenzierung der *yadA*-Gene verschiedener Yersinien-Stämme (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* Serotyp III, *Y. enterocolitica* Serotypen O3 und O8) ein Molekulargewicht zwischen 41,3 und 44,4 kDa errechnet (Skurnik & Wolf-Watz, 1989). Die Tatsache, dass im SDS-PAGE hitzestabile Aggregate des Proteins im Bereich von 160 bis 250 kDa nachweisbar sind, gilt als Hinweis dafür, dass es sich bei YadA um ein Oligomer handelt (Skurnik & Wolf-Watz, 1989; Tamm et al., 1993; Mack et al., 1994; Gripenberg-Lerche et al., 1995; Hoiczky et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass der hydrophobe C-Terminus des Adhäsins typisch für eine Membranankerdomäne bakterieller Außenmembranproteine ist (Tamm et al., 1993). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen stellt sich das YadA-Protein in der äußeren Membran als baldachinartige, *lollipop*-förmige Projektion auf der Außenmembran von Yersinien dar (Abb.2) (Hoiczky et al., 2000). Derzeit geht man davon aus, dass es sich um ein Homotrimer handelt (Roggenkamp et al., 2003). Das Monomer selbst wird in 3 Hauptdomänen eingeteilt: Einen N-terminalen *lollipop*-förmigen Kopf, gefolgt von einem je nach Serotyp unterschiedlich langen Stiel und einem C-terminalen Membrananker. Dies ergibt sich aus eben genannten Untersuchungen sowie der Analyse der Aminosäuresequenz. Auch funktionale Expressionsstudien von

N- und C-terminal- verkürzten YadA-Mutanten sprechen für dieses Modell (Tamm et al., 1993; Roggenkamp et al., 1995 und 1996). Nummelin et al. (2004) ist es gelungen mittels kristallographischer Daten eine Aussage über die stereogeometrische Organisation der Kopfdomäne zu machen. Dabei fallen vor allem die aus 9 linksgerichteten Wendeln bestehende β - Faltblätter auf, die einen röhrenartigen Hohlraum bilden, die laut Nummelin et al. die Kollagenbindende Region der Kopf-Region darstellt. Eine Analyse des Proteins mit dem von Lupas 1991 entwickelten „Coils“-Programm (Lupas et al., 1991) ergab Hinweise auf das Vorhandensein von *coiled-coil* Strukturen in zwei Abschnitten des Stiel-Bereiches zwischen den Aminosäuren 220 bis 350 der 422 Aminosäuren langen YadA-Sequenz von *Y. enterocolitica* O8 (Abb.3). Wollmann et al. (2006) konnten zeigen, dass der C-terminale Bereich nicht nur aus die Membran durchdringende β -Faltblatt-Domänen besteht, sondern sich kurz vor dem ersten Faltblatt ein *coiled-coil*- Abschnitt befindet, der die Transmembranpore des trimeren Proteins „verschließt“. Es handelt sich dabei um α -helikale Abschnitte des jeweiligen Monomers, die sich zu einer *coiled-coil*-Struktur zusammenlegen.



Abb.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von YadA-Proteinen auf der Oberfläche von *Y. enterocolitica*. Sie zeigt die lollipop-ähnliche Struktur des Proteins mit Kopf- und Stiel-domäne (aus Hoiczky et al, 2000).



1.9 Die Membranankerdomäne der Oca-Familie

Im Vergleich zu jenen äußeren Membranproteinen, deren Struktur mittels Kristallographie bereits aufgeklärt werden konnte, scheint die Oca-Membranankerdomäne anders aufgebaut zu sein. Wichtiges Strukturmerkmal außerhalb der Oca-Familie sind v.a. antiparallel gelagerte β -Faltblattstränge, deren Länge zwischen 6 und 25 Aminosäuren variiert. Die *E.coli* Porine OmpF und OmpC beispielsweise sind aus 16 β -Strängen aufgebaut, OmpA aus 8 Strängen, die TonB-abhängigen Siderophor-Rezeptoren FepA und FhuA aus 22 β -Strängen (Zakharov et al., 2004; Keller & Misra, 2002; Kleinschmidt, 2005, Ferguson et al, 1998; Usher et al, 2001). Zum Periplasma hin werden die β -Stränge durch kurze *turns* verbunden,

nach außen hin durch längere *loops* (Buchanan et al. 1999). Porine sind Homotrimere, deren drei Monomere jeweils eine transmembranöse Pore bilden (Keller&Misra, 2002). Autotransporter dagegen bilden mit ca.12 β -Strängen eine Transportpore, mittels derer die N-terminale Passagierdomäne durch die äußere Membran geschleust wird (Oomen et al., 2004). Die Membranankerdomäne der Oca-Gruppe weist hier deutliche Unterschiede auf. Diese sollen im Folgenden am Beispiel von YadA erläutert werden. Die Membranankerdomäne von YadA wird in zwei unterschiedliche Bereiche eingeteilt: (1) der *linker*-Bereich (von Aminosäure 331 bis 369) und (2) die Faltblattdomäne, bestehend aus vier amphiphatischen β -Strängen (Aminosäuren 370 bis 442). Insgesamt handelt es sich also um einen Bereich der 111 Aminosäuren einschließt. Inzwischen geht man davon aus, dass das Oligomer aus drei Monomeren besteht, wobei drei Membranankerdomänen eine Pore mit 12 β -Strängen bilden. Den β -Strängen geht der *linker*-Bereich voraus. Er besteht aus zwei bis drei *coiled-coil repeats*. Es ist nicht klar, ob der *linker*-Bereich die Pore von außen abdeckt oder ob er die Pore durchquert und wie ein Schwenkarm die Passagierdomäne durch die Pore schleust. An den *linker*-Bereich schließt sich der *stalk*-Bereich an. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine *coiled-coil* Struktur, bestehend aus 7 Pentadekameren. Der *stalk*-Bereich zählt nicht mehr zum Membranankerbereich bzw. zur Translokatorodomäne, sondern wird der Passagierdomäne des Proteins zugerechnet, dem Teil, der auf der Aussenseite der bakteriellen Membran präsentiert wird. Nach dem von uns entworfenen Modell bauen sich die 3 Monomere so zusammen, dass die 3 Ankerbestandteile eine die Membran durchdringende Pore bilden mit je zwei nach außen gerichteten *loops* und einem nach innen gerichteten *turn*. Das C-terminale Ende liegt an der dem Periplasma zugewandten Seite der äußeren Membran. Die drei monomeren Untereinheiten des *linker*-Bereichs schließen sich an das ebenfalls innen liegende N-terminale Ende des Ankerbereichs an und bilden einen weiteren *turn*, wobei sie sich im Sinne einer *coiled coil* Struktur ineinander verdrillen und so eine einzige oligomere Struktur bilden, die die von dem Anker geformte Pore durchdringt. An diese schließt sich außerhalb der äußeren Membran der *stalk*-Bereich als erster Anteil der Passagierdomäne an. Es ist aber auch denkbar, dass das C-terminale Ende des Ankers an der Außenseite der äußeren Membran liegt. In diesem Fall würden die drei monomeren Linkeranteile die Membran nicht durchdringen sondern sich direkt an der Außenseite zum Oligomer verbinden (Siehe Abbildung 3)

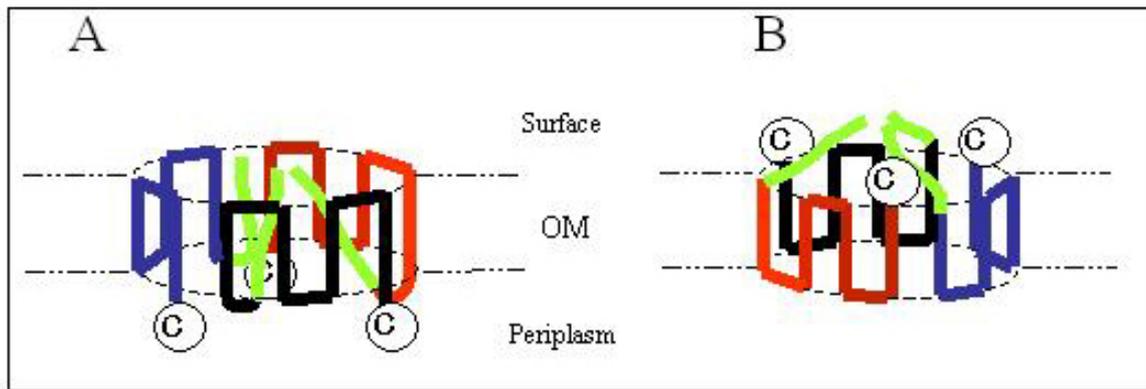


Abb. 3: Zwei mögliche Modelle des Membranankers von YadA, schematisch dargestellt. Die C-Termini von drei einzelnen Molekülen von YadA trimerisieren in der äußeren Membran (OM) und bilden eine Pore. Die C-Termini der einzelnen Moleküle sind jeweils in einer anderen Farbe (Rot, Blau, Schwarz) dargestellt. Jedes YadA-Moleküle enthält 4 amphipathische, transmembrane β -Stränge, die hier in vertikalen Strichen dargestellt sind. Der N-terminal folgende *linker*-Bereich ist in grün dargestellt. Möglichkeit **A**, die C-Termini sind zum Periplasm hin lokalisiert; **B**, die C-Termini sind zur bakteriellen Oberfläche hin lokalisiert.

1.10 Fragestellung der Arbeit

Zahlreiche Untersucher haben sich in der Vergangenheit mit Struktur- bzw. Funktionsanalysen von YadA beschäftigt. Dabei spielten methodisch nicht nur die Elektronenmikroskopie und Bioinformatik eine Rolle, sondern auch die molekularbiologische Konstruktion von Mutanten und deren Analyse hinsichtlich Funktionalität, Oligomerisierung und Proteintopographie. V.a. der Versuch einer Zuordnung von Funktionen zu den dafür verantwortlichen Proteinbereichen führte zu einigen neuen Erkenntnissen. Der Prozess der Oligomerisierung und des Einbaus des Adhäsins in die äußere Bakterienmembran bleibt jedoch bis dato zum großen Teil unverstanden. Roggenkamp et al. kamen 2003 zu dem Schluss, dass gerade für diese Vorgänge dem Membrananker eine bedeutende Rolle zukommt, denn nur eine korrekte Oligomerisierung und Ausrichtung des Proteins an der äußeren Membran stellt die Virulenzfunktion von YadA sicher. Ziel dieser Arbeit sollte deshalb sein, mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden Aussagen zum Aufbau und zur Struktur der C-terminalen Membranankerdomäne von YadA zu gewinnen. Mit mehreren unterschiedlichen Versuchsansätzen werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

(1) *Untersuchungen zur Topologie des Membranankers:*
 Zum einen soll durch den Einbau von für kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper erkennbare Epitopsequenzen (*Tag*-Sequenzen, z.B. das Epitop FLAG) der Membrananker „kartiert“ werden. Zum anderen soll mittels *cysteine-scanning-*

mutagenesis extrazelluläre und periplasmatische Bereiche des Membranankers identifiziert werden.

(2) *Untersuchung zum Transport und zur Oligomerisierung des Membransankers:* Der YadA-Membrananker soll durch den Membrananker verwandter Adhäsine von *M. catarrhalis* (UspaA), *E.coli* (EibA) bzw. *H influenzae* (Hia) ausgetauscht werden. Die erhaltenen YadA-Hybridproteine sollen auf ihre veränderten Eigenschaften hinsichtlich Autotransporterfunktion, Oligomerisierung, Serumresistenz und Zelladhäsion untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaagen	Mettlex, AT 261 Delta Ranger
Brutschrank	Heraeus, B12
Fotografie-System	312 nm INTAS, UV-Systeme
Umwälzpumpe	Pharmacia LKB, Multitemp V
Gelelektrophorese:	
Horizontale Gelkammern	BioRad
Transformator	BioRad
Mikroskope	
Objektträger:	
Photometrie:	Amersham Biosciences, Ultospec 3100pre
Mikrotiterplattenphotometer	Titertek Multiskan
Absorptionsspektralphotometer	Pharmacia
pH-Meter	
Pipetten	Knick, Digital pH-Meter Eppendorf Gilson
PCR-ThermoCycler	
	PE Applied Biosysteme, Weiterstadt:GeneAmp PCR System 2700 GeneAmp PCR System 2400
Sequenziergerät	Applied Biosystems 373 A Sequencer
Sterilwerkbank	Heraeus, Lamin Air HBB2436
Thermoblöcke	Eppendorf 5320 Thermostat
Schüttelinkubator	Eppendorf, Thermomixer compact

Ultraschall-Applikator	Bransen Sonifier B15
Whirlmix	Scientific Industries, Vortex Genie

Zentrifugen:

Kühlzentrifuge	Sigma 3K30
Tischzentrifuge	Sigma 1K15

2.1.2 Medien:

Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,4-7,6
LB-Agar	15 g Agar / l LB-Medium
LB-Einfriermedium	LB-Medium ad 15% Glycerin-Lsg.
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml 250 mM KCl-Lösung einstellen auf pH 7,0, danach 20 mM Glucose hinzugeben und sterilfiltrieren.
YT-Medium	2,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,4 % MgSO ₄ 10 mM KCl ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,6
RPMI-Medium	Zellkulturmedium (PAA-Laboratories, Etobicoke, Kanada)

Antibiotika (Sigma) wurden je nach Bedarf den Medien in folgenden Konzentrationen hinzugefügt:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml

Nalidixinsäure	60 µg/ml
Spectinomycin	50 µg/ml
Tetracyclin	20 µg/ml

2.1.3 Chemikalien

Agarose	SeaKem LE Agarose Cambrex
Acrylamid, 30%	Sigma
Amidoschwarz	Merck
Aqua dest. FW 169,9	Fresenius, Bad Homburg
Bisacrylamid	Sigma
Biotin-Maleimid	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP)	Sigma
Bromphenolblau (C ₁₉ H ₂₀ Br ₄ O ₅ S)	Merck
Butanol	Merck
Diethanolamin	Merck
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethanol 70%	Merck
Ethanol 90%	Merck
Ethidiumbromid 1 mg/ml	BioRad
FKS	Sera-Tech, St. Salvator
Folin-Ciocalteus	Merck
Formamid	Sigma
Glucose	Merck
Glycerin 87%	Merck
Glycin	Merck
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	Oxoid
Isopropanol 70%	Klinikapotheke Klinikum Großhadern, München
Lysozym	Sigma

Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumnatriumtartrat	Merck
Kupfer-II-Sulfat-Pentahydrat	Merck
Magnesiumchlorid	Fermentas
Magnesiumsulfat	Merck
Mercaptoäthanol	Sigma
Natronlauge (NaOH)	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumduodecylsulfat	Merck
NB-Agar	Difco, Detroit
Nitroblautetrazoliumchlorid	Roche
N-Laurylsarcosylsr.	Sigma
PEO-Maleimide Activated Biotin	Pierce, Rockford, USA
Pepton	Oxoid, Hampshire, UK
Phenol	Biomol
PMSF	Roche
Saccharose	Merck
Salzsäure(HCl)	Merck
SDS	Merck
TEMED	Biomol
Trichloressigsäure	Merck
Trishydroxymethylaminomethan	Merck
Triton-X	Merck
Trypton	Oxoid
Tween	Merck

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Als Verbrauchsmaterialien wurden 1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg), Glaspipetten (Brand, Wertheim), 200µl PCR-Reaktionsgefäße (Applied

Biosystems), 10ml Reaktionsgefäße (Sarsted, Germany), 50 ml Reaktionsgefäße (Beckton Dickenson, New Jersey), Pipettenspitzen (Brand), Einmalküvetten (Brand) und Parafilm (Brand).

2.1.5 Kits

Nucleo Bond AX100	Machery-Nagel
Nucleo-Spin-Extract	Machery-Nagel
Quiagen Doly Prep	Quiagen
Gene Tailor™ Site-Directed Mutagenesis System	Invitrogen

2.1.6 Software

Zur Bearbeitung und Auswertung der Sequenzen wurden die Programme EditSeq, SeqMan und MegAlign (DNA Star Inc., Madison, USA) verwendet

2.1.7 Verwendete Antikörper:

2.1.7.1 Maus-Monoklonale Antikörper

AK 8D1: Bindet im *stalk*-Bereich an Aminosäuren 290 bis 330 (Roggenkamp, 2003)

AK-FLAG: Bindet an das FLAG-Epitop (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Immunopure® Streptavidin Alkaline Phosphatase conjugated (Pierce, Rockford, USA)

2.1.7.2 Kaninchenantiserum, Peptidantikörper

Folgende YadA-spezifischen Kaninchen-Antikörper wurden benutzt:

Anti-P1-O8: YadA wurde nach SDS-Page-Auftrennung aus dem Gel eluiert und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet.

AK 14: Ein Kaninchenantiserum gegen den *linker*-Bereich wurde durch Immunisierung mit synthetischem Oligopeptid (Aminosäuren 369 bis einschließlich 398) hergestellt. Das Peptid wurde am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Würzburg, synthetisiert. Anschließend wurden Kaninchen mit dem synthetischen Peptid immunisiert und so ein Antiserum erhalten. Das Antiserum bindet lediglich an die

oligomere Bande eines bei 37°C in Probenpuffer solubilisiertem YadA-Proteins. Es bindet nicht denaturiertes YadA.

2.1.7.3 Sekundär-Antikörper

Es wurden folgende Antikörper der Firma Sigma verwendet:

Zur Markierung polyklonaler Kaninchen-Antikörper: FITC-conjugated Goat-Anti-Rabbit-IgG

Zur Markierung monoklonaler Maus- Antikörper: FITC-conjugated Goat-Anti-Mouse-IgG.

2.1.8 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Stämme/Plasmide	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
Stämme		
<u><i>Y. enterocolitica</i></u>		
WA-314	klinisches Isolat von Serotyp O8, trägt das Virulenz-Plasmid pYVO8, Biogruppe 1B, Nal ^r	Heesemann et al. (1983)
WA-C	plasmidloses Derivat von WA-314	Heesemann et al. (1983)
<u><i>E. coli</i></u>		
DH5 α	<i>E. coli</i> endA1 supE44 hsdR17 ($r_{\text{K}}^- m_{\text{K}}^+$) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ (lacZYA-argF) U169 (ϕ 80lacZ Δ M15)	Hanahan (1983)
Sm10 λ pir	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-TC::Mu-Kan</i> (λ pir), Km ^r	Miller & Mekalanos (1988)
ECOR 9	EibA-positives klinisches Isolat, , durch Sequenzierung bestätigt	Diese Arbeit
<u><i>Haemophilus influenzae</i></u>		
<i>Haemophilus influenzae</i> , Hia positiv	Hia-positives klinisches Isolat, durch Sequenzierung bestätigt	Diese Arbeit
<u><i>Moraxella catarhalis</i></u>		
O35 E	UspA1- und UspA2-positiver Stamm	Hoiczky et al (2000)
Plasmide		
pUC-A-1	pUC13 mit 5 kb <i>EcoRI-HindIII</i> Insertionsfragment von pYVO8, welches das <i>yadA</i> Gen beinhaltet (A-1-Fragment)	Roggenkamp et al. (1995)
pUC-A-H	pUC-A-1, bp 88-564 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>head region</i> as 30-188)	Roggenkamp et al. (2003)
pUC-A-HNS4	pUC-A-1, bp 88-990 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht dem <i>head region, neck region</i> und allen 15mer Repeats, as 30-330)	Roggenkamp et al. (2003)
PUC-A-HNS4.1	PUC-A-1, bp 88-1024 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>head region, neck region, stalk- und proximalen linker-</i>	Diese Arbeit

pUC-A-HNSL5	Bereich, as 30-342) pUC-A-1, bp 88-1056 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht dem <i>head</i> -, <i>neck</i> -, <i>stalk</i> - und proximalen <i>linker</i> -Bereich, as 30-352)	Roggenkamp et al. (2003)
pUC-A-HNSL6	pUC-A-1, bp 88-1108 deletiert in (entspricht dem <i>head</i> -, <i>neck</i> -, <i>stalk</i> -, und <i>linker</i> -Bereich, as 30-370)	Diese Arbeit
pUC-A-1276-Sac	pUC-A-1, trägt Sac-Schnittstelle bei bp 1267	Diese Arbeit
pUC-A-HNS4-FLAG	pUC-A-HNS4, trägt die 32 bp FLAG Epitope-Sequenz vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNS4	Diese Arbeit
pUC-A-HNS4.1-FLAG	pUC-A-HNS4.1, trägt die 32 bp FLAG Epitope-Sequenz vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNS4.1	Diese Arbeit
pUC-A-HNSL5-FLAG	pUC-A-HNSL5, trägt die 32 bp FLAG Epitope-Sequenz vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNSL5	Diese Arbeit
pUC-A-HNSL6-FLAG	pUC-A-HNSL6, trägt die 32 bp FLAG Epitope-Sequenz vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNSL6	Diese Arbeit
pUC-A-1276-FLAG	pUC-A-1267-Sac, trägt die 32 bp FLAG Epitope-Sequenz vor dem Stop-Codon des <i>yadA</i> -Gens	Diese Arbeit
pUC-A1 _{Δ335-422}	pUC-A-1, bp 1000-1267 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht dem <i>linker</i> - und Ankerbereich, as 335-442)	Diese Arbeit
pUC- A-YadA-UspA _{1A}	pUC-A1 _{Δ334-422} , trägt statt der <i>yadA-linker</i> -und Ankerbereiche die inklonierte UspA1- <i>linker</i> -und Ankerbereiche	Diese Arbeit
pUC- A-YadA-YadA _A	pUC-A1 _{Δ334-422} , trägt statt der <i>yadA-linker</i> - und Ankerbereiche die inklonierte EibA- <i>linker</i> - und Ankerbereiche	Diese Arbeit
pUC-A-YadA-EibA _A	pUC-A1 _{Δ334-422} , trägt wieder inklonierte <i>yadA-linker</i> - und Ankerbereiche	Diese Arbeit
pUC- A-YadA-Hia _A	pUC-A1 _{Δ334-422} , trägt statt der <i>yadA-Linker</i> -Ankerbereiche die inklonierte Hia- <i>Linker</i> - und Ankerbereiche	Diese Arbeit
pUC-S327C	pUC-A-H, Punktmutation C->G an bp 976	Diese Arbeit
pUC-S355C	pUC-A-H, Punktmutation A->T an bp 1063	Diese Arbeit
pUC-S361C	pUC-A-H, Punktmutation A->T an bp 1081	Diese Arbeit
pUC-S382C	pUC-A-H, Punktmutation C->G an bp 1145	Diese Arbeit
pUC-S390C	pUC-A-H, Punktmutation C->G an bp 1169	Diese Arbeit
pUC-S397C	pUC-A-H, Punktmutation A->T an bp 1189	Diese Arbeit
pUC-S409C	pUC-A-H, Punktmutation C-> Gan bp 1226	Diese Arbeit
pHP45Ω	Ursprung der Spectinomycin (Spc) Kasette	P. J. Sansonetti
pGP704	Suizid-Vector, R6K ² Replikon benötigt π Protein <i>in trans</i> von λpir-besitzendem Empfänger	Miller & Mekalanos (1988)
pGPS-A-1	pGP704, 1.8 kb Spc-Kasette in der <i>EcoRI</i> Site, trägt das <i>yadA</i> Gen als ein <i>EcoRI-SphI</i> Fragment von pUC-A-1	Roggenkamp et al. (1995)
pGPS-A-H	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-H Fragment von pUC-A-H	Roggenkamp et al. (2003)
pGPS-A-HNS4 – FLAG	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-HNS4-FLAG Fragment von pUC-A-HNS4-FLAG	Roggenkamp et al. (2003)
pGPS-A-HNS4.1-FLAG	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-HNS4.1-FLAG Fragment von pUC-A-HNS4.1-FLAG	Diese Arbeit
pGPS-A- HNS 5-FLAG	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-HNS5 -FLAG Fragment von pUC-A- HNS5 – FLAG	Diese Arbeit
pGPS-A- HNS 6-FLAG	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-HNS 6 - FLAG Fragment von pUC-A- HNS 6 FLAG	Diese Arbeit
pGPS-A- 1276 – FLAG	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-1276 - FLAG Fragment von pUC-A-1276 – FLAG	Diese Arbeit
pGPS-A- A1 _{Δ335-422}	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A1 _{Δ335-422} Fragment von pUC- A1 _{Δ335-422}	Diese Arbeit
pGPS- A-YadA-UspA _{1A}	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A- A1 Fragment von pUC- A-YadA-UspA _{1A}	Diese Arbeit
pGPS- A-YadA-YadA _A	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A- A2 Fragment von pUC- A-YadA-YadA _A	Diese Arbeit
pGPS- A-YadA-EibA _A	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A- A3 Fragment von pUC-A-YadA-EibA _A	Diese Arbeit

pGPS- A-YadA-Hia _A	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A- A4 Fragment von pUC- A-YadA-Hia _A	Diese Arbeit
pGPS-A- S327C	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A- S327C Fragment von pUC-A-S327C	Diese Arbeit
pGPS-A- S355C	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A- S355C Fragment von pUC-A-S355C	Diese Arbeit
pGPS-A- S361C	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A- S361C Fragment von pUC-A-S361C	Diese Arbeit
pGPS-A- S397C	pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A- S397C Fragment von pUC-A-S397C	Diese Arbeit
PYVO8	Virulenzplasmid von WA-314	Heesemann et al. (1983)
PYVO8-A-0	pYVO8, <i>yadA</i> , Km-GenBlock inseriert in die <i>PstI</i> -Sites des <i>yadA</i> Gens durch Austausch von Allelen	Roggenkamp et al. (1995)
PYVO8-A-1	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-1, Wildtyp <i>yadA</i>	Roggenkamp et al. (1995)
PYVO8-A-H	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-H	Roggenkamp et al. (2003)
pYVO8-A-HNS4 – FLAG	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-HNS4 - FLAG	Roggenkamp et al. (2003)
pYVO8-A-HNS4.1- FLAG	pYVO8-A- 0 mit integriertem pGPS-A- HNS4.1- FLAG	Diese Arbeit
pYVO8-A- HNS 5- FLAG	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A- HNS 5- FLAG	Diese Arbeit
pYVO8-A- HNS 6- FLAG	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A- HNS 6- FLAG	Diese Arbeit
pYVO8-A- 1276 – FLAG	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A- 1276 - FLAG	Diese Arbeit
pYVO8-A- YadA-UspA1 _A	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS- A-YadA-UspA1 _A	Diese Arbeit
pYVO8-A- YadA-YadA _A	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS- A-YadA- YadA _A	Diese Arbeit
pYVO8-A- YadA-Eiba _A	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS- A-YadA-Eiba _A	Diese Arbeit
pYVO8-A- YadA-Hia _A	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS- A-YadA-Hia _A	Diese Arbeit
PYVO8-A- S327C	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A- S327C	Diese Arbeit
PYVO8-A- S355C	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A- S355C	Diese Arbeit
PYVO8-A- S361C	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A- S361C	Diese Arbeit
PYVO8-A- S397C	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A- S397C	Diese Arbeit

2.1.9 Verwendete Primer/Oligonukleotide

Sämtliche Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) in entsalztem und lyophilisiertem Zustand geliefert und in Aqua_{bide}st gelöst, um eine Konzentration von 100 pmol/μl zu erreichen.

Primer	Beschreibung	Sequenz
PCR:		Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen
FLAG-Konstrukte		
A – 1024 -f	forward Primer, verwendet für YadA-L2, <i>SacI</i> -Site, Start: bp 1024 (=L341) von <i>yadA</i>	5' <u>ATTGAGCTCTTAGATAAACTTGACACACGAGT</u> ^{3'}
A-1108-f	forward Primer, verwendet für YadA-L2, <i>SacI</i> -Site, Start: bp1108 (=K370) von <i>yadA</i>	5' <u>AAAGAGCTCAAAGATAACTTTCTGCAGGTG</u> ^{3'}
A-Cla-f	forward Primer für A-1276-FLAG (PCR 1), Start: 167 bp vor dem YadA-Startcodon	5' <u>TTTTAAAGATCGATTAGTGCTGT</u> ^{3'}
A-1266-r	reverse Primer für A-1267-FLAG (PCR 1),	5' <u>ACCGAGCTCCCACTCGATATTAATGATGC</u> ^{3'}

	Ende: bp 1266 (=W 422) von <i>yadA</i>	
A-1267-f	forward Primer für A-1276-FLAG (PCR 2), Start: Stopcodon	5' <u>AATGAGCTCT</u> AATATCATTTAGAAGTTAACAAGTC ^{3'}
A-Sph-r	ständiger reverse Primer für alle FLAG-PCR, Ende: 569 bp nach <i>yad</i> Stopcodon, 30 bp nach <i>SphI</i> -Site	5' GTCAATACAGAGATAGAACAGCT ^{3'}
FLAG-SacI-f	Konstruktion der 30 bp FLAG-Insert-dsDNA, deletiert eine SacI-Site nach der Insertion	5' GGACTATAAGGACGATGATGACAAACAGCT ^{3'}
FLAG-SacI-r	Konstruktion der 30 bp FLAG-Insert-dsDNA, deletiert eine SacI-Site nach der Insertion	5' GTTTGTTCATCATCGTCCTTATAGTCCAGCT ^{3'}
PCR:		
Anker-Konstrukte		
A-Cla-f	forward Primer für PCR 1 (Einbau SACI-Schnittstelle) Start: 167 bp vor dem <i>YadA</i> -Startcodon	5' TTTTAAAGATCGATTAGTGCTGT ^{3'}
A-993-r	reverse Primer für PCR 1 (Einbau SACI-Schnittstelle) Ende: bp 993 (= T331)	5' CACGAGCTCTGTGTATTGATTCGATTCACGG ^{3'}
A-1268-f	forward Primer für PCR 2 (Einbau SACI-Schnittstelle) Start: hinter dem Stopcodon	5' CGCGAGCTCTATCATTTAGAAGTTAACAAGTCT ^{3'}
A-Sph-r	reverse Primer für PCR 2 (Einbau SACI-Schnittstelle), Ende: 569 bp nach <i>yad</i> Stopcodon, 30 bp nach <i>SphI</i> -Site	5' GTCAATACAGAGATAGAACAGCT ^{3'}
A-1000-f	forward Primer für <i>yadA</i> -Insert Start: bp 1000 (=K 333)	5' GGGGAGCTCAAATTCCATCAACTTGACAACC ^{3'}
A-1267-r	reverse Primer für <i>yadA</i> -Insert Ende: Stopcodon	5' ATTGAGCTCTTACCACTCGATATTAATGATG ^{3'}
EibA-916-f	forward Primer für EibA-Insert Start: bp 916 (=L 305)	5' GTCGAGCTCCTGGACAGCCAGCAGCGCCAG ^{3'}
EibA-1179-r	reverse Primer für EibA-Insert Ende: Stopcodon	5' ATTGAGCTCTTAAAACTCGAAGTTCACACCA ^{3'}
UspA1-2470-f	forward Primer für UspA1-Insert Start: bp 2470 (=G 823)	5' GACGAGCTCCAGGGTCAGCATTTTAATAATC ^{3'}
UspA1-2738-r	reverse Primer für UspA1-Insert Ende: Stopcodon	5' TATGAGCTCTATTTCCAGCGGTAACCTACCA ^{3'}
Hia-3366-f	Forward Primer für das Hia-Insert Start: bp 3366	5' AAC GAG CTC CAA GTC AAT AAT CTT GAG GGC AA ^{3'}
Hia-3633-r	reverse Primer für das Hia-Insert Ende: Stopcodon	5' ATT GAG CTC TTA CCA GTG GTA ACC AAC ACC ^{3'}
Cystein-Mutagenese-PCR		
A-976-C-f	forward Primer zur Mutagenese von bp 976	5' TAAGAAAGCAATCCGTGAAT <u>G</u> CAATCAATACACAGA ^{3'}
A-975-r	reverse Primer zur Mutagenese von bp 976	5' ATTCACGGATTGCTTTCTTAGTCGAATTA ^{3'}
A-1063-C-f	forward Primer zur Mutagenese von bp 1063	5' GAGTTGACAAAGGTTTAGCC <u>I</u> GTTTCAGCCGC ^{3'}
A-1062-C-r	reverse Primer zur Mutagenese von bp 1063	5' GGCTAAACCTTTGTCAACTCGTGTGTCAAG ^{3'}
A-1081-C-f	forward Primer zur Mutagenese von bp 1081	5' CCAGTTCAGCCGCTTTAAACT <u>I</u> GCTTGTTC ^{3'}

Mutationen sind unterstrichen

A-1080-C-r	reverse Primer zur Mutagenese von bp 1081	5' GTTTAAAGCGGCTGAACTGGCTAAACCTTT ^{3'}
A-1145-C-f	forward Primer zur Mutagenese von bp 1145	5' AGGTGTCGGGGGATATCGCTGTAGTCAGGC ^{3'}
A-1144-C-r	reverse Primer zur Mutagenese von bp 1145	5' AGCGATATCCCCGACACCTGCAGTAAAGT ^{3'}
A-1169-C-f	forward Primer zur Mutagenese von bp 1168	5' TCAGGCATTAGCAATTGGTTGTGGCTATCGT ^{3'}
A-1168-C-r	reverse Primer zur Mutagenese von bp 1168	5' AACCAATTGCTAATGCCTGACTAGAGCGAT ^{3'}
A-1189-C-f	forward Primer zur Mutagenese von bp 1189	5' CTGGCTATCGTGTAATGAGTGTGTCGCACT ^{3'}
A-1188-r	reverse Primer zur Mutagenese von bp 1189	5' CTCATTTACACGATAGCCAGAACCAATTGC ^{3'}
A-1226-C-f	forward Primer zur Mutagenese von bp 1126	5' CGGTGTGGCTTATGCCGTTGCTCGGATGTCAT ^{3'}
A-1225-r	reverse Primer zur Mutagenese von bp 1126	5' AACCGGCATAAGCCACACCGGCTTTAAGTG ^{3'}
Primer zur PCR-Kontrolle		
A-975-f	forward Primer zur PCR-Kontroller der YadA-Konstrukte Start: bp 975 (N 325)	5' GAATCGAATCAATACACA ^{3'}

2.1.10 Puffer und Lösungen:

2.1.10.1 Herstellung Ca²⁺-kompetenter Bakterien

TFB 1:

- 30 mM KAc
- 50 mM MnCl₂
- 100 mM RbCl
- 10 mM CaCl₂
- 15 % Glycerin

einstellen auf pH 5,8

TFB 2:

- 10 mM NaMops pH 7,0
- 75 mM CaCl₂
- 10 mM RbCl
- 15 % Glycerin

einstellen auf pH 7,0

2.1.10.2 Plasmid-DNA-Präparation

Puffer P1:

- 100 µg/ml RNAase A
- 50 mM Tris-HCl
- 10 mM EDTA, pH 8,0

Puffer P2:

- 200 mM NaOH
- 1 % SDS

Puffer P3:
Puffer QBT:

- 3 M KAc, pH 5,5
- 750 mM NaCl
- 50 mM MOPS
- 15 % Ethanol

	0,15 % Triton X-100, pH 7,0
Puffer QC:	1 M NaCl 50 mM MOPS 15 % Ethanol, pH 7,0
Puffer QF:	1,25 M NaCl 50 mM Tris HCl 15 % Ethanol, pH 8,5

2.1.10.3 Isolation von bakteriellen Außenmembranproteinen

200 mM Tris HCl, pH 8,0-Lösung	24,22 g Tris HCl, pH8,0 ad 1000ml Aqua dest.
Lyse-Puffer	24,22 g Tris HCl, pH 8,0 342,3 g Saccharose 0,372 g EDTA ad 1000ml Aqua dest.
Lysozym-Lösung	2 mg Lysozym ad 1ml 200 mM Tris HCl, pH 8,0-Lösung
Extraktionspuffer	6,1 g Tris HCl, pH 8,0 2,0 g MgCl 20 ml Triton X-100 ad 1000 ml Aqua dest.

2.1.10.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

44 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid:	44 g Acrylamid 0,8 g Bisacrylamid ad 100 ml Aqua dest.
4 % Sammelgel:	2,5 ml 250 mM Tris, pH 6,8 0,5 ml 44 % Acrylamid 0,1 ml 10 % SDS 1,9 ml Aqua dest. zum Polymerisationsstart: 30 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat) 30 µl TEMED (N,N,N',N' – Tetramethylethylendiamin)
11 % Trenngel:	5,0 ml 750 mM Tris, pH 8,8 2,5 ml 44 % Acrylamid 0,2 ml 10 % SDS 2,3 ml Aqua dest.

FKS-Block-Lösung:	1 x	PBS
	2 %	fetales Kälberserum (FKS)
	0,5 %	Tween 20
Waschpuffer:	1 x	PBS
	0,5 %	Tween 20
Substratpuffer:	100 ml	Diethanolamin
	ad 1000 ml	Aqua dest., pH 9,6
Gebrauchspuffer:	200 ml	Substratpuffer
	800 ml	0,9 %-NaCl-Lösung
	100 µl	1 M MgCl ₂ -Lösung
NBT-Lösung:	1 mg/ml	Nitroblautetrazoliumchlorid in Aqua dest.
Indolyolphosphat-Lösung	5 mg/ml	5-Brom-4-chloro-3-indolyolphosphat in Dimethylformamid
Färbelösung:	9 ml	Gebrauchspuffer
	1 ml	NBT-Lösung
	100 µl	Indolyolphosphat-Lösung

2.1.10.7 Serumresistenztest

PBS-5 mM MgCl ₂ -Puffer	137 mM	NaCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	2,7 mM	KCl
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	5,0 mM	MgCl ₂

Humanserum: Blut von 10 gesunden Blutspendern wurde abgenommen, in dem keine Antikörper gegen Yersinien nachgewiesen werden konnten. Nachdem das Blut geronnen ist wurde die Probe dann bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, das eigentliche Serum, wurde abpipettiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Bakterien wurden über Nacht in Luria-Bertani Medium (LB) angezüchtet, *Yersinia* bei 27°C, *E. coli* bei 37°C. Von den Vorkulturen wurden Hauptkulturen im Verhältnis 1:20 beimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm und damit definierten Bakterienkonzentration bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden über Nacht bei 27°C in LB angezüchtet, um eine adäquate YadA-Expression zu gewährleisten. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien 1:40 in RPMI 1640 Medium (Biochrom) verdünnt. Für Kollagen- und Zelladhärenztest wurden dann die Kulturen im Thermoschüttler bei 37°C und 150 rpm 2 Stunden belassen, zur Präparation von Außenmembranproteinen 6 Stunden.

2.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli* (Ca²⁺-Methode)

Bakterien sind in der Lage fremde genetische Information in Form von Phagen-DNA aufzunehmen. Dieses Phänomen kann durch die Anwesenheit von Ca²⁺ verstärkt werden. Als Ursache dafür wird eine erhöhte Permeabilität der bakteriellen Membran unter Einfluss des Ions sowie kurzzeitiger Temperaturerhöhung angenommen. In dieser Arbeit kommt das 1983 von Hanahan noch durch Zugabe anderer Ionen wie Rb²⁺ und Mn²⁺ verbesserte Protokoll zur Anwendung.

Eine bakterielle Einzelkolonie (in dieser Arbeit zur Herstellung kompetenter *E. coli* vom Stamm SM10λpir) wird von einer Mangelmedien-Agarplatte (Müller-Hinton) über Nacht in YT-Medium bei 37°C angesetzt. Am nächsten Morgen wird diese Vorkultur einem großen Gefäß mit angewärmten YT-Medium im Verhältnis von 1:100 zugegeben und bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 250 rpm für etwa 2 Stunden bebrütet, bis die OD₆₀₀ 0,4 bis 0,5 beträgt. Die so angezüchtete Bakterien-Hauptkultur wird nun auf sterile 40 ml Falcon-Gefäße verteilt und für 5 Minuten auf Eis gekühlt. Danach zentrifugiert man die Behälter 10 Minuten bei 4°C und 3000 rpm. Der Überstand wird dekantiert und die Bakterienpellets in 30 ml gekühltem TFB1-Puffer pro 100 ml Hauptkultur auf Eis resuspendiert. Anschließend zentrifugiert man die entstandene Lösung für 10 Minuten bei 4°C und 3000 rpm. Der Überstand wird verworfen und die Pellets in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer pro 100 ml Hauptkultur aufgenommen. Jeweils 400 µl der Bakteriensuspension werden in vorgekühlte Eppendorfhütchen pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die jetzt

kompetent gewordenen Bakterien werden nun bei -80°C gelagert oder können sofort für eine Transformation verwendet werden.

2.2.3 Transformation kompetenter *E.coli*

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von linearer oder zirkulärer DNA durch Bakterien. Hierfür werden 150 μl der kompetenten Bakteriensuspension mit 10 μl eines vorangegangenen Ligationsansatzes oder ca. 5 ng Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wird 30 Minuten lang in Eppendorfhütchen auf Eis gelagert und anschließend für 90 Sekunden im Thermoblock auf 42°C erwärmt. Danach schließt sich eine fünfminütige Lagerung auf Eis an, wonach 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium hinzupipettiert wird. Die Probe werden für 1 Stunde bei 37°C und 650 rpm im Thermoblock inkubiert, damit die frisch transformierten Bakterien ihre chromosomal- und plasmidvermittelten Antibiotikaresistenz-Mechanismen produzieren können. Dem neuen Resistenzschema entsprechend werden je 200 μl der Suspension auf antibiotikahaltigen Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank angezüchtet.

2.2.4 Konjugation

Bakterien können über direkten Kontakt konjugierbare Plasmide horizontal übertragen (Konjugation mit Plasmiddonor und Plasmidrezipient). Für die Konjugation müssen bestimmte Bedingungen erfüllt werden. Zum einem müssen DNA-Abschnitte, die übertragen werden sollen, einen *origin of transfer* haben (*oriT*), der den Startpunkt für den Einzelstrangtransfer bildet. Der *oriT* ist innerhalb der Mobilisierungsregion (*mob*) lokalisiert. Zusätzlich sind für den Transfer der DNA noch zahlreiche *tra*-Gene (DNA-Transfer, ähnlich zum Typ IV Proteinsekretionssystem) erforderlich. Die *tra*-Gene können auf dem zu transferierenden Plasmid oder auf dem Chromosom lokalisiert sein. Je nachdem, ob ein Plasmid sowohl über eine *oriT*-Site als auch über die *tra*-Gene, oder aber nur über eine *oriT*-Site (bzw. *mob*-Site) verfügt, spricht man entweder von einem mobilisierbaren und selbstkonjugativen (z.B. RP4) oder einem mobilisierbaren und nicht-selbstkonjugativen Plasmid (z.B. pGP704), das für den Transfer ein Helferplasmid mit *tra*-Genen oder die *tra*-Gene auf der chromosomalen DNA des Donors (SM10 λ *pir*) benötigt. In dieser Arbeit wurde für die Konjugation als Donor der *E. coli*-Stamm SM10 λ *pir* mit dem Suizidplasmid pGP704 verwendet. Die Replikation dieses Plasmids ist vom Faktor π (*pir*) abhängig. Als Rezipient dienten

die *Y. enterocolitica*-Stämme WA-C und WA-314. Zur Vorbereitung einer Konjugation wird jeweils eine separate Blutagarplatte, belegt mit den jeweiligen Antibiotika-Plättchen, mit Donor bzw. Rezipient aus der Einfrierkultur beimpft. Es folgt die Inkubation über Nacht bei 27°C (*Y. enterocolitica*) oder 37°C (*E. coli*). Am nächsten Morgen entnimmt man mit einer sterilen Impföse von der Donor-Kultur etwa 4 Kolonien und von der Rezipienten-Kultur etwa 12. Nun verrührt man beide in einem mit 500 µl PBS-Lösung gefüllten Eppendorfhütchen, gefolgt von sorgfältigem Resuspendieren. Das Bakterienmischung wird anschließend auf eine frische Blutagarplatte zweieurostückgroß pipettiert und zur Konjugation bei der für den Donor idealen Temperatur von 37°C im Brutschrank 6 Stunden lang inkubiert. Danach suspendiert man ein Viertel des Konjugationsrasens in 1 ml PBS und plattiert davon 100 µl, 200 µl und 500 µl auf frisch vorbereiteten LB-Agar-Platten mit passenden Selektionsantibiotika aus. Diese inkubiert man für 36 Stunden bei 27°C. Mittels PCR wurden die angewachsenen Kolonien auf korrekte Konjugation kontrolliert.

2.2.5 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden zwei verschiedene Kits mit leicht unterschiedlichen Verfahren verwendet. Wurden größere Mengen an Plasmiden für Klonierungen benötigt (bis zu 100 µg), wurde der Nucleobond AX100 Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet, für Klon-Screening und PCR der „QuickDNA Kit“ der Firma QIAGEN, mittels dem zwar nur kleinere DNA-Mengen präpariert werden konnte, dies dafür jedoch umso schneller. Grundsätzlich beruhen beide Kits auf dem 1979 veröffentlichten Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly. Ziel ist die Trennung der Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA und bakteriellen Proteinen. Dies geschieht anhand von 3 Puffern, denen die Bakterien in kurzen zeitlichen Abstand ausgesetzt werden. Anfangs werden die Bakterienpellets im ersten Puffer, der Glucose und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthält, resuspendiert. Unter diesen hypertonen und Ca/Mg-komplexbildenden Bedingungen gelingt es, die bakterielle Zellmembran zu destabilisieren. Daneben kann mittels enthaltener RNase bakterielle RNA entfernt werden. Im nächsten Schritt erfolgt die alkalische Lyse. Der im 2. Schritt verwendete zweite Puffer enthält ein NaOH-SDS-Gemisch, das die Denaturierung linearer Nukleinsäuren und Proteine zur Folge hat. Die Trennung der Plasmid-DNA findet damit statt, da die denaturierte chromosomale DNA fest an die ebenfalls dank SDS denaturierten bakteriellen Proteine gebunden ist.

Im dritten Schritt werden die freien Nukleinsäuren renaturiert. Hierbei handelt es sich dann ausschließlich um Plasmid-DNA. Kalium, das ebenfalls im Puffer 3 vorhanden ist, führt zum Ausfällen der SDS-Komplexe, welche durch Zentrifugation leicht von der Plasmid-DNA getrennt werden können. Letztere werden mittels Anionenaustauscher-Säule aus dem Überstand eluiert, durch Isopropanol entsalzt, konzentriert und mit Ethanol (70%) präzipitiert.

2.2.6 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Seit 1968 sind Enzyme bekannt, mit deren Hilfe es möglich ist DNA enzymatisch zu „verdauen“. Diese sogenannten Restriktionsendonukleasen binden an definierte Sequenzen (Schnittstellen). Sie werden nach ihren Herkunftsgenen benannt (z. B. EcoRI aus *Escherichia coli*). Bis heute sind mehr als 900 Restriktionsendonukleasen aus mehr als 230 verschiedenen Bakterienarten isoliert worden.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden in einer Palindromsequenz und erzeugen so genannte „sticky ends“, d.h. die DNA-Fragmente sind an ihren durchtrennten Enden einsträngig und können bei einer darauf folgenden Ligation leicht mit komplementären einsträngig endenden DNA-Fragmenten verbunden werden.

Folgende Restriktionsenzyme der Firma Fermentas, Burlington, Canada wurden benutzt:

Restriktionsenzym	Schnittstelle (5'-3')
ClaI	ATCGAT
EcoRI	GAATTC
HinDIII	AAGCTT
SacI	GAGCTC
SphI	GCATGC

Zum Verdau von DNA wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

10 x Restriktionsenzym-Puffer	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl (entspricht 2 U/µg DNA)
DNA	x µl (entspricht 1 µg)
TE-Puffer	ad 20 µl
Beschichtung mit 1 Tropfen (20 µl) PCR-Öl	

Dieser Ansatz wurde bei leichtem Schütteln (300 rpm) im Thermoblock bei 37°C für 3 Stunden inkubiert. Waren größere Mengen an DNA für Klonierungen notwendig, wurden entsprechende 60 µl-Ansätze vorbereitet.

2.2.7 Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA

Die Wahrscheinlichkeit ist groß, dass sich linearisierte Plasmide, die nur mit einer Restriktionsendonuklease aufgeschnitten wurden, bei einer folgenden Ligation wieder ohne Einlagerung der dafür bestimmten Passagier-DNA religieren. Deshalb hat sich eine kurze Inkubation der Vektoren mit einer Phosphatase bewährt. Dieses Enzym entfernt die randständigen 5'-Phosphatgruppen der Plasmid-DNA, was eine intramolekulare Religation erschwert. Nach Reinigung und Elution der Vektor-DNA mit dem NucleoSpin Extract Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) wird diese nach folgendem Protokoll mit der Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) (Gibco, Eggenstein, Deutschland) angesetzt:

Vektor-DNA (eluiert)	30 µl (entspricht 3 µg DNA)
10 x Dephos Buffer (Gibco)	6 µl
CIAP	0,5 µl (1U/µl)
Aqua _{bidest}	ad 60 µl

Die Probe wird 15 Minuten bei 37°C im Thermoblock, danach zur Denaturierung der CIAP für weitere 15 Minuten bei 75°C inkubiert. Anschließend stellt man die Probe kurz auf Eis und reinigt sie über eine weitere DNA-Gelelektrophorese durch Exzision und Elution der Bande aus dem Gel.

2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Verfahren der Ligation ermöglicht es, DNA-Fragmente unterschiedlicher Herkunft miteinander zu verbinden. Dabei nutzt man die nach einem Restriktionsenzymverdau mit der selben Endonuklease entstandenen „sticky ends“, sodass sich beide Enden der Fragmente aneinander legen („Annealing“). Die T4-DNA-Ligase schließt dann unter ATP-Verbrauch die zwischen den Fragmenten vorhandene Lücke in der Phosphatkette und führt somit zu einem stabilen neuen DNA-Produkt. In dieser Arbeit wurde grundsätzlich die dreifache molare Menge an Insert-DNA zur Menge an Vektor-DNA hinzugefügt. So wurden 20 µl-Ansätze mit 2

μl 10 x Ligase-Puffer, 1 μl T4-DNA-Ligase, 100 ng Vektor-DNA und der dreifach molaren Menge an Insert-DNA zusammengestellt, als Auffüllpuffer diente Tris-Puffer, pH 8,6. Die Proben wurden über Nacht im 14°C kühlen Wasserbad inkubiert und am nächsten Morgen für eine Transformation verwendet.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR genannt, entwickelt von Mullis, 1986, eröffnete für die Molekularbiologie bis dahin ungeahnte Möglichkeiten der DNA-Amplifikation.

Zentraler Punkt des Wirkungsprinzips der PCR ist die DNA-Vervielfältigung mit Hilfe thermostabiler Polymerasen (z.B. Taq-Polymerasen). Diese Enzyme sind in der Lage DNA anhand einer Vorlage (Ursprungs-DNA, Template) zu verdoppeln. Dazu benötigen sie jedoch kurze, ca. 30 Basenpaare lange, einzelsträngige Nukleotidsequenzen, die sogenannten Primer. Diese sind der Startpunkt für die Synthese. Die Dauer der Synthese, bzw. die Aktivität des Enzyms wird durch die Temperaturvariation während der einzelnen Synthesedurchläufe beeinflusst.

Zu Beginn einer PCR muss sichergestellt werden, dass die doppelsträngig vorliegende Ursprungs-DNA denaturiert und so in einzelsträngiger Form vorliegt. Nur so können sich die Primer binden und die Polymerase mit der Synthese beginnen. Dies wird dadurch erreicht, dass ein jeder Syntheszyklus mit einem Temperaturanstieg auf 94°C beginnt. Für das spezifische Binden der Primer an das Template ist diese Temperatur jedoch zu hoch, weswegen der nächste Schritt des PCR-Zyklus eine Abkühlung auf eine für die jeweiligen Primer optimale Temperatur (liegt exakt 2° unter dem Schmelzpunkt des einzelnen Primers). Im nächsten Schritt erhöht man die Temperatur auf das Reaktionsoptimum der Polymerase (72°C für die Taq-Polymerase). So kann die Elongationsphase der DNA-Stränge mit höchster Effizienz ablaufen. Ausgehend von den Primern, verknüpft die Polymerase Desoxynukleotidtriphosphate entsprechend der DNA-Matrize zu einer ihr komplementären Sequenz. Nun wiederholt sich der gesamte Vorgang, beginnend mit der Erhitzung auf 94°C, wobei in der Folge nicht nur die Ursprungs-DNA, sondern auch die neu gewonnenen DNA-Stränge als Matrize fungieren können. So vervielfältigt sich die gewünschte DNA-Sequenz. Mit jedem Schritt wächst die Anzahl der Kopien exponentiell und innerhalb von den üblichen 30-35 durchgeführten Zyklen entsteht eine ausreichende Menge DNA. Um zu ermöglichen, dass auch

tatsächlich alle DNA-Sequenzen komplett synthetisiert werden, beendet man die PCR mit einer zusätzlichen 7-minütigen Elongationsphase.

Als genetisches Ausgangsmaterial kann man außer präparatorisch gewonnener, reiner DNA auch ein aufgekochtes Gesamtzell-Lysat verwenden.

In dieser Arbeit wurde die PCR, soweit nicht anders erwähnt, nach folgendem Standard durchgeführt:

Zur Herstellung eines Gesamtzell-Lysats wurde 1 µl einer bakteriellen Übernachtskultur in 50 bis 500 µl Aqua_{bidest} abhängig vom genetischem Material aufgenommen (hohe Verdünnungen für Multicopy-Plasmid-PCRs und niedrige für Lowcopy-Plasmid-PCRs oder chromosomale PCRs), für 10 Minuten aufgeköcht, danach abgekühlt und zentrifugiert. Reine DNA wurde entsprechend 1:50 bis 1:1000 in Aqua_{bidest} verdünnt. Alle Primer wurden von der Firma metabion (Martinsried, München) synthetisiert.

Folgender Reaktionsansatz wurde in PCR-Reaktionsgefäße angesetzt:

10 x PCR-Puffer (Perkin-Elmer)	5	µl
2 mM dNTP-Mix (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)	5	µl
100 µM Primer 1	0,5	µl
100 µM Primer 2	0,5	µl
Taq-Polymerase (Perkin-Elmer)	0,25	µl (2,5U/100µl)
DNA (aus Gesamtzell-Lysat oder rein)	2,5	µl
Aqua _{bidest}	ad	50 µl

Die Polymerase wurde kurz vor dem Reaktionsstart hinzupipettiert und die Probengefäße in den auf 94°C vorgeheizten PCR-Thermocycler gestellt. Das Gerät wurde auf folgende Weise programmiert:

Start-Denaturierung	94°C	5 min
30 Zyklen:	Denaturierung	94°C 30 sec
	Annealing	x°C 45 sec
	Elongation	72°C 2 min
Nach-Elongation	72°C	7 min
Abkühlung	4°C	bis zum Abbruch

Die PCR-Produkte wurden entweder auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe unten) oder zur weiteren Verarbeitung mit dem NucleoSpin Extract Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach dem dort beschriebenen Protokoll gereinigt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.10 Herstellung der FLAG-Oligonukleotid-Inserts

Die FLAG-Oligonukleotide (mit Kodierung der FLAG-Peptidsequenz DYKDDDDK) wurden von der Firma metabion (Martinsried, München) in 5'-phosphoriliertem Zustand geliefert, um sie für eine Ligation sofort einsatzbereit zu machen. Dafür war es auch vorher nötig, die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide zu einem doppelsträngigen Molekül zusammenzuführen. Dies wird erreicht, indem man die Oligonukleotide hochkonzentriert (10 OD₂₆₀-Einheiten/100 µl) in STE-Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) löst und sie dann in äquimolaren Mengen zusammen führt. Anschließend erhitzt man den Ansatz auf 94°C im Thermoblock, schaltet nach 2 Minuten man den Thermoblock ab und lässt das Gemisch dann auf Raumtemperatur abkühlen. Die Proben können nun bei -20°C im Gefrierschrank bis zur Ligation aufbewahren. Das Annealing hat stattgefunden.

2.2.11 DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse aber auch zu gezielten präparatorischen Reinigung von DNA-Fragmenten wurden diese anhand ihres Molekulargewichts in Agarosegelen aufgetrennt. Je nach Größe der Fragmente benutzt man dabei Gele unterschiedlicher Konzentration. Zur Herstellung eines Agarosegels wird die entsprechende Menge an Agarose (Sigma) in TAE-Puffer (0,4M Tris, 0,2 M NaAcetat, 20 mM EDTA pH 7,4) durch kurzes Aufkochen gelöst. Anschließend lässt man sie auf ca. 50°C abkühlen und gießt sie in eine Flachbett-Gelelektrophoresekammer (BioRad). Sind die Gele ausgehärtet wird die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt. Die zu analysierenden Proben werden mit einem Zehntel Volumen DNA-Stopmix (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % Glycerin) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt mit einer Feldstärke von 10 V/cm. Nach der Elektrophorese wird das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) für 20 Minuten gefärbt. Um die aufgetrennten Nukleinsäuren sichtbar machen zu können, wird das Gel mit UV-Licht bestrahlt. Das Ethidiumbromid hat sich in die Nukleinsäuren eingelagert und fluoresziert bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 254 nm oder 300 nm im sichtbaren Bereich

rot-orange (590 nm). Die Fragmentgrößen der einzelnen Banden können dabei anhand eines geeigneten DNA-Längenstandards (MBI Fermentas) bestimmt werden. Die Dokumentation der Gele erfolgt mit dem Image Master Video Documentation System der Firma Pharmacia Biotech.

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung aller neu klonierten Produkte erfolgte mit dem 373A DNA-Sequencer von Applied Biosystems und der entsprechenden Software 373A-Sequencer-Data-Analysis-Program. Die Proben wurden unter Verwendung der TaqDyeDideoxy-Terminationsmethode vorbereitet. Dafür pipettiert man 1 µg der zu sequenzierenden DNA mit 5 pmol des passenden Primers zusammen mit dem Big-Dye-Terminator-Mix, der die Taq-Polymerase, die Deoxy-Nukleotide und die Dideoxy-Nukleotide enthält, in ein Reaktionsgefäß und stellt den Ansatz für 25 Zyklen (96°C: 10 sec, 55°C: 15 sec, 60°C: 4 min) in den PCR-Thermocycler. Das dadurch synthetisierte Oligonukleotid-Gemisch präzipitiert man daraufhin mit 50 µl 96%-igem Ethanol und 2 µl 3 M NaAcetat, pH 4,6 für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgt ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 15°C und 14000 rpm in der Tischzentrifuge, das Abpipettieren des Überstandes, die Zugabe von 400 µl 70%-igem eiskaltem Ethanol zur Reinigung und eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 14000 rpm. Danach wird der Alkohol dekantiert und die nun sequenzierbereiten Proben werden bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.13 DNA-Konstruktion der YadA-FLAG-Konstrukte und YadA-Ankerhybridkonstrukte mit den Multicopy-Plasmiden pUC-A-1 und pUC-A-H in *E. coli* DH5α

Mit Ausnahme der Cystein-Konstrukten (s.u.), erfolgte die Herstellung der Konstrukte in dieser Arbeit nach folgendem Prinzip. Für die Klonierungen wurde der *E. coli* Stamm DH5α verwendet, als Vektoren wurde das Multicopy-Plasmid pUC-A-1, das die komplette 1266 Basenpaare umfassende Gensequenz des Adhäsins-Wildtyps mit angrenzenden Bereichen als eine 5-kb-Insertion (aus dem Ursprungsvektor pYVO:8) enthält, benutzt, außerdem das Plasmid pUC-A-H, das pUC-A-1 entspricht, mit den Unterschieden, dass die Gensequenz des *yadA*-Kopfabschnittes von Nukleotid 75 bis 569 fehlt und zwischen Signalsequenz und *neck*-Bereich eine *SacI*-Schnittstelle (bp75) liegt. In dem großen *EcoRI-HindIII*-Fragment liegen 150 bp bzw. 167 bp vor dem *yadA* Gen zwei *ClaI*-Schnittstellen nah nebeneinander (Basenpaarpositionen (BPP))

177 und 194, GenBank accession no. X13881) und 569 bp hinter dem *yadA* Stopcodon eine *SphI*-Site (BPP 2185). Mittels der Restriktionsenzyme *ClaI*, *SphI* sowie *SacI* kann man so entweder das gesamte *yadA* Gen (pUC-A-1) oder aber den Bereich hinter der Signalsequenz (pUC-A-H) aus ihren jeweiligen Plasmiden ausschneiden und den übriggebliebenen Rest des Vektors als Ausgangsplasmid für Klonierungen verwenden. Die verschiedenen YadA-Gen-Konstrukte werden in Form verschiedener PCR-Fragmente in das jeweilige Ausgangsplasmid eingebracht. Diese wurden zuerst in PCRs mit Hilfe geeigneter Primerpaare (siehe Tabelle 2), die speziell für die gewünschten Mutationen erstellt wurden, synthetisiert werden. Zur Konstruktion der HNS-FLAG-Konstrukte wurde pUC-A-H als Ausgangsplasmid genutzt, und ein *SacI-SphI*-Fragment einkloniert. Weiterhin wurde das beidseits mit *SacI*-Sequenz endende FLAG-Oligonukleotid in die Plasmide der HNS-FLAG-Konstrukte ligiert, die vorher mit *SacI* eröffnet und mit CIAP dephosphoriliert (siehe „Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA“) worden waren. Zur Konstruktion des Konstrukts A-1267-FLAG sowie der Ankerkonstrukte A-YadA-UspA1_A, A-YadA-EibA_A, A-YadA-Hia_A, A-A1_{Δ335-422} wurde pUC-A-1 verwendet. Es wurden 2 (A-1267-FLAG) bzw. drei PCR-Produkte synthetisiert, ein *ClaI-SacI*-Fragment, ein *SacI-SacI*-Fragment sowie ein *SacI-SphI*-Fragment. Siehe hierzu auch Abb.4.

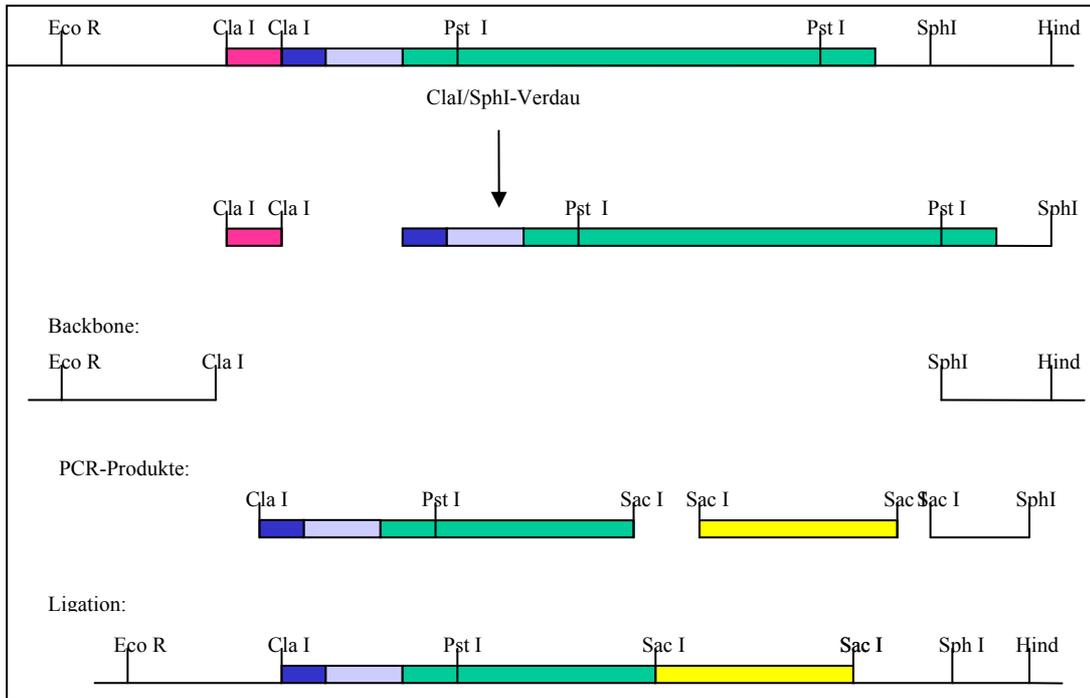


Abb.4: Verfahren zur Konstruktion von YadA-in-Frame-Deletionsmutanten, hier am Beispiel von pUC- A-YadA-YadA_A. Dafür wurde das Multicopy-Plasmid pUC-A1, welches das Wildtyp YadA-Gen trägt mit den Restriktionsenzymen *ClaI* und *SphI* gespalten und als Klonierungsvektor (Ausgangsplasmid) verwendet. In drei verschiedenen PCR-Reaktionen mit pUC-A1 als DNA-Matrize wurden drei PCR-Produkte hergestellt, eine *ClaI*-*SacI*-, ein *SacI*-*SacI*-, sowie ein *SacI*-*SphI*-Fragment. Diese drei Fragmente wurden schließlich mit dem Ausgangsplasmid ligiert. (Nach Ackermann 2005)

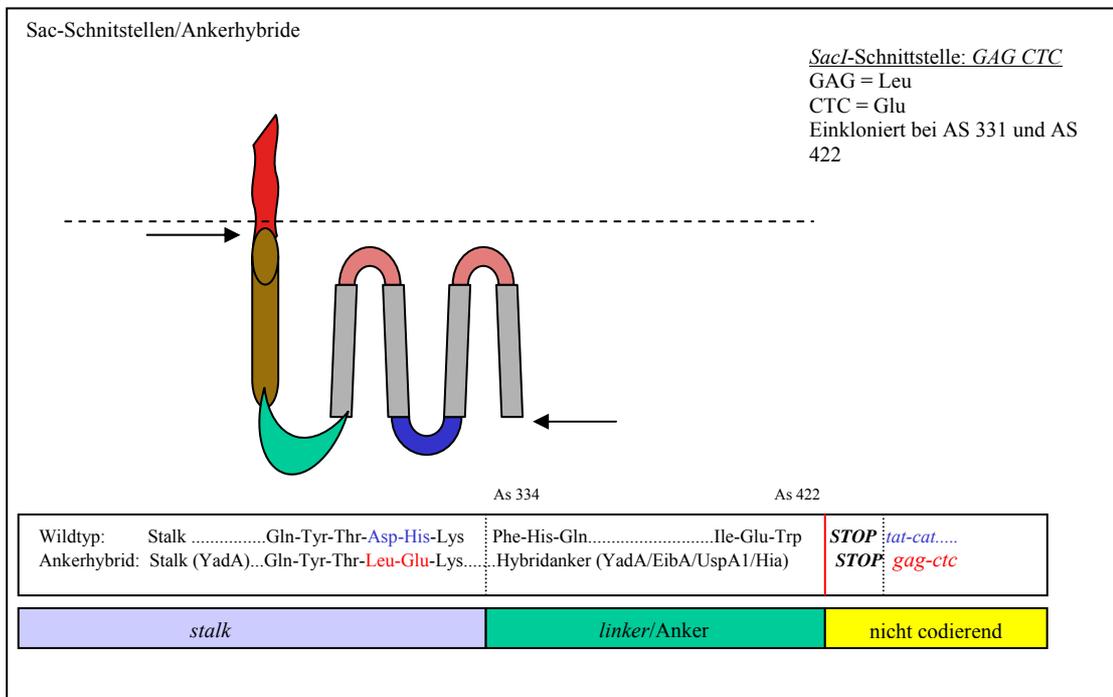


Abb.5: Schematische Darstellung der SacI-Schnittstellen zur Ankerhybridherstellung im yadA Gen. Die C-Terminalen Bereiche (*linker*- und Ankerbereich der Oca-Proteine UspA1, EibA, Hia) wurden mittels oben beschriebenen Verfahren im Austausch gegen die entsprechenden Bereiche des YadA-Wildtyps ausgetauscht. Die Veränderungen in der Aminosäuresequenz durch Einbringen der Schnittstellen bei der Konstruktion der Ankerhybride sind farblich markiert.

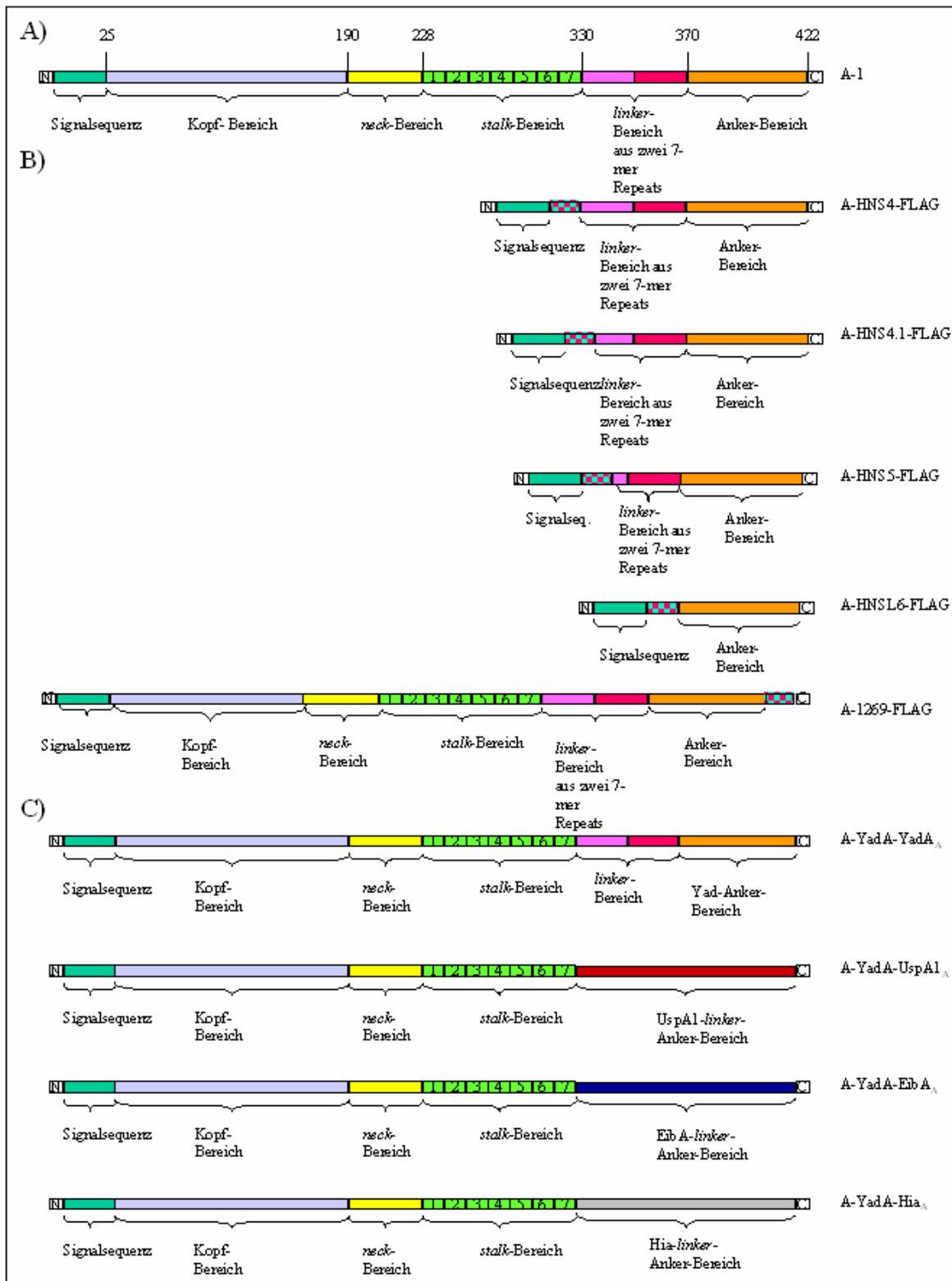


Abb.6: A) Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des YadA von *Y. enterocolitica* O8 mit Abgrenzung der von Hoiczky et al., 2000 beschriebenen Domänen: 1: Signalsequenz; 2: Kopf-Bereich; 3: neck-Bereich; 4: stalk-Bereich; 5: linker-Bereich (7 Heptamere); 6: Ankerbereich, B) Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten YadA-FLAG-Konstrukte. Die karierte Fläche (7) bei den A-HNS-FLAG-Mutanten stellt das 8 As große FLAG-Peptid dar. C) Übersicht über die YadA-Ankerhybrid-Konstrukte: UspA1-Anker; 9: EibA-Anker; 10: Hia-Anker (nach Ackermann 2005)

2.2.14 Cystein-scanning Mutagenese

Es wurden Kodons im *yadA*-Gen gezielt in Cystein-Kodons mittels Gene-TailorTM-Mutagenesis-Kit der Firma Invitrogen konvertiert. Bei diesem Verfahren wird das ursprüngliche Gen tragende Plasmid methyliert. Das methylierte Plasmid wird als Matrize für die darauf folgende PCR-basierte Mutagenese mit zwei Primern verwendet. Einer der beiden Primer, der forward-Primer, enthält das Cystein-Kodon an der gewünschten Position. Bei der PCR-Reaktion wird das komplette Plasmid repliziert, so dass an deren Ende das methylierte, nicht mutierte Ursprungsplasmid sowie das nicht methylierte, nicht geschlossen und linear vorliegende, jedoch mutierte Plasmid-PCR-Produkt entstehen. Beides wird in *E. coli* DH5 α transferiert. Hier läuft zum einen der Schluss des PCR-Produkts zum ringförmigen Plasmid zum anderen der Abbau der methylierten Ursprungs-DNA ab, so dass am Ende nur noch das mutierte Plasmid vorliegt. Als Ursprungsplasmid wurde pUC-A-H verwendet. Das Einfügen des Cysteinkodons im Gen und folglich des Cysteins im Protein dient dazu, eine Biotinylierungsstelle und somit eine zusätzliche Angriffsstelle für Nachweisreagenzien zu schaffen. Das Cysteinkodon konnte erfolgreich an 6 Stellen des *yadA*-Gens eingefügt werden, und zwar an bp 976, 1061, 1081, 1145, 1169, 1189 sowie 1226 (Kontrolle durch Sequenzierung). Die Mutation an bp 1250 gelang nicht. Bei den Kodonkonversionen handelt es sich entweder um den Austausch von Cytosin (C) zu Guanin (G) für bp 976, 1145 und 1226, oder um Adenin (A) zu Thymin (T) für bp 1061, 1081, 1169 sowie 1189.

2.2.15 Transfer der *yadA*-Cystein-Gene von *E. coli* DH5 α über *E. coli* SM10 λ pir in *Y. enterocolitica*

Um die in *E. coli* erstellten *yadA*-Konstrukte in *Y. enterocolitica* zu überführen, mussten alle Konstrukte von den Multicopy-Plasmid pUC-A-1 bzw. pUC-A-H in einen Vektor umkloniert werden, der in der Lage ist, sich in das Yersinien-Virulenzplasmid pYVO:8 zu integrieren. Der Suizidvektor pGP704 kann, sofern er eine pYV-Sequenz trägt, diese über homologe Rekombination in das Wildtyp *yadA*-Gen des pYVO:8-Plasmids integrieren. Von einem Suizidvektor spricht man, wenn ein Vektor sich nur unter bestimmten Bedingungen in einem Bakterium halten kann. Für pGP704 ist das nur dann möglich, wenn sein Wirt das *pir*-Gen enthält, welches den Replikationsapparat komplettiert. In dieser Arbeit wurde dieser Vektor in *E. coli* SM10 λ pir gehalten und vermehrt. Darüber hinaus enthält pGP704 eine *mob*-Site,

jedoch keine *tra*-Gene, und ist somit ein mobilisierbares jedoch nicht selbst konjugierbares Plasmid (siehe 2.2.4 Konjugation, Seite 28). SM10 λ pir enthält die *tra*-Gene chromosomal. Zur eigentlichen Überführung von *E. coli* SM10 λ pir in *Y. enterocolitica* wird die Tatsache genutzt, dass sich die DNA des Suizidvektors bei evtl. vorhandenen homologen Gensequenzen in die des Rezipienten integriert. Zuerst mussten dafür die auf pUC-Multicopy-Plasmiden liegenden mutierten *yadA*-Gene mit *EcoRI* und *SphI* herausgeschnitten und mit dem pGP704-Plasmid verbunden werden, der mit den selben Restriktionsenzymen gespalten wurde. Um eine zusätzliche Antibiotika-Selektionsmöglichkeit zu erhalten, wurde in die *EcoRI*-Site von pGP704 ein 1,8 kb großes Sm^r Spc^r Ω -Fragment inkliniert. Ein mit dieser Spectinomycin-Resistenz ausgestatteter Suizidvektor wurde als pGPS704 bezeichnet und folglich die nach der Ligation entstandenen Konstrukte als pGPS-A-HNS 4-FLAG, pGPS-A-HNS 4.1 bis -HNS-5-FLAG, pGPS-A-HNSL6-FLAG, pGPS-A-1269-FLAG, pGPS-A-YadA-UspA1_A, pGPS-A-YadA-YadA_A, pGPS-A-YadA-Eiba_A, pGPS-A-YadA-Hia_A, pGPS-A-327-C, -355-C, -361-C sowie -397-C.

2.2.16 Isolation von bakteriellen Außenmembranproteinen

Das *Yersinia*-Adhäsın YadA wird bei 37°C produziert und in die Außenmembran von *Y. enterocolitica* integriert. Um YadA von Innenmembran- und Debrisproteinen zu trennen, und um Yersinien mit einer erhöhten Konzentration an YadA zu erhalten, wurde die Außenmembran gereinigt. Dabei werden durch physikalische und chemische Trennschritte die Außenmembranen und aus diesen wiederum die Außenmembranproteine (*outer membrane proteins*, OMPs) isoliert. Zunächst bewirkt die Zugabe von Sucrose, dass eine Lösung mit pelletierten bakteriellen Zellen hyperton wird, und die Bakterien so nicht platzen können. Dann behandelt man die Lösung mit Lysozym, dass zu einer Spaltung des Mureins der Zellwand führt. Bei diesem Schritt werden aus den Stäbchen kugelförmige und instabile Sphärozyten. Fügt man nun noch EDTA hinzu, wird die Sphärozytenmembran noch fragiler. Diese kann dann leicht durch Ultraschall zerkleinert werden. Drei Zentrifugationsschritte führen dann zu einer reinen Außenmembranpräparation. Mit dem ersten zentrifugiert man langsam sämtlichen Zelldebris ab. Der Überstand wird eine Stunde lang zentrifugiert so dass die Gesamtmembran im Pellet verbleibt. Anschließend entfernt man die lipidreiche Innenmembran durch Zugabe des Detergens Triton X-100 und fällt die Außenmembran durch Zusatz von MgCl₂ aus. Eine weitere Zentrifugation

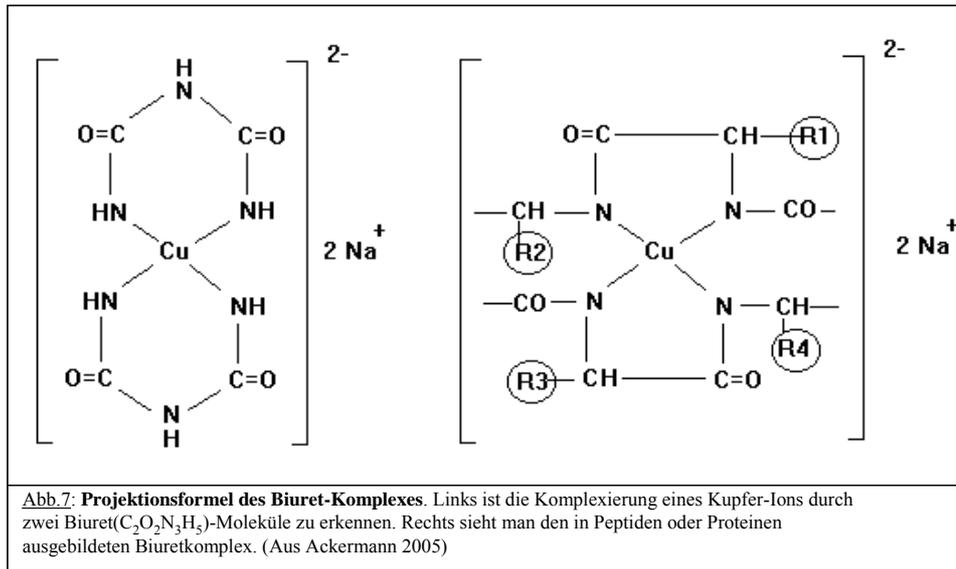
führt zu einem Pellet, das der Außenmembran entspricht. Dieses kann dann in Aqua_{bidest} resuspendiert und nach Bestimmung des Proteingehalts in einer SDS-PAGE aufgetrennt werden.

Zur Isolierung der Außenmembran von *Y. enterocolitica* wird eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes über Nacht in 1 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika-Schema bei 27°C angezüchtet. Am nächsten Morgen setzt man die Hauptkultur im Verhältnis 1:40 in 100ml RPMI-Medium an und lässt sie für 6 Stunden bei 37°C unter starkem Schwenken inkubieren. Daraufhin werden die Bakterien 15 Minuten bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 50 mM Tris-1mM MgCl₂-Lösung zweimal gewaschen und danach auf Eis in 0,5 ml 200 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Lyse-Puffer, 100 µl Lysozym-Lösung und 3,2 ml Aqua_{bidest} lässt man den Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Bei der darauf folgenden Ultraschallbehandlung wird das Lysat 4 mal 45 Sekunden lang unter Eiskühlung beschallt. Zwischen jeder Beschallung erfolgt eine Kühlpause von 15 Sekunden. Danach zentrifugiert man die Probe für 30 Minuten bei 3000 rpm und 4°C. Das Pellet, welches bakteriellen Debris enthält, wird verworfen und der Überstand in frische Eppendorf-Gefäße überführt. Diese werden in der Zentrifuge für 45 Minuten bei 19000 rpm und 4°C belassen. Das danach entstandene Sediment entspricht der Gesamtmembran des Yersinien-Stammes. Diese kann nun in 200 µl Aqua_{bidest} resuspendiert werden. Es lässt sich zudem bei -20°C aufbewahren. Zur Trennung von Außen- und Innenmembran resuspendiert man das Pellet in 5 ml Extraktionspuffer und inkubiert den Ansatz 20 Minuten bei Raumtemperatur unter mehrfachem Schwenken. Danach folgt eine weitere 45-minütige Zentrifugation bei 19000 rpm und 4°C. Die Außenmembran wird so sedimentiert. Zweimaliges Waschen des Pellets mit jeweils 5 ml Aqua_{bidest} für je 30 Minuten in der Zentrifuge (19000 rpm, 4°C) führt zu einer besonders reinen Präparation. Sie wird danach in 200 µl Aqua_{bidest} aufgenommen. Danach folgt die Bestimmung der in der Suspension enthaltenen Proteinkonzentration mit Hilfe der Methode von Lowry (s.u.) und eine Kontroll-SDS-PAGE mit je 5 µg Protein pro Spur.

2.2.17 Proteinmengenbestimmung nach Lowry

Lowry, Rosebrough, Farr und Randall etablierten 1951 eine Methode (Mary Ann Markwell et al., 1978) zur Bestimmung der Konzentration löslicher sowie unlöslicher

Proteine. Diese wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Außenmembranpräparationen angewandt. Bei Lowrys Protokoll gehen die Proteine zunächst mit einem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz eine Verbindung ein, die dem Biuret-Komplex ähnelt (siehe Abb.7).



Die mit dem Cu^{2+} komplexierten Proteine reduzieren das Folin-Ciocalteu-Reagenz. Dabei findet die Reduktion des im Folin-Reagenz enthaltene Wolframat und Molybdat durch den Kupfer-Protein-Komplex von der Wertigkeitsstufe VI zur Wertigkeitsstufe IV statt. Es entstehen Mischoxide zwischen jeweils VI- und IV-wertigem Molybdän (Molybdänblau-Reaktion) bzw. Wolfram. Vermutlich geschieht dies nachdem Cu^{2+} im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu^{1+} reduziert wird. Zusätzlich reduzieren die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan das Folin-Reagenz direkt ohne vorherige Komplexierung mit dem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz. Dies alles führt zu einem Farbumschlag des Folin-Reagenz von gelb nach blau. Die Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt. Dazu wird für mehrere Proben mit bekannter Proteinkonzentration die Extinktion des blauen Farbstoffs ermittelt, der bei der Reaktion mit dem Folin-Reagenz entsteht. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

E_{λ} - Extinktion bei der Wellenlänge λ

ε_{λ} - molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

c - Konzentration

d - Schichtdicke (hier 1cm)

Die gemessene Extinktion kann somit als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt und der molare Extinktionskoeffizient aus dem Anstieg der resultierenden Geraden ermittelt werden. Unter Verwendung des so erhaltenen molaren Extinktionskoeffizienten lässt sich nun für eine beliebige Proteinprobe wiederum unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration bestimmen. Da die Proteinbestimmung nach Lowry durch Tris, Ammoniumsulfat, EDTA, Saccharose, Citrat und Phenole verfälscht werden kann, wurde in dieser Arbeit eine modifizierte Version verwendet (Mary Ann K. Markwell et al., 1978). Dabei wird in das alkalische Cu^{2+} -Reagenz zusätzlich Natriumdodecylsulfat (SDS) gegeben und die Gesamtmenge an Kupfer-Tartrat-Reagenz erhöht. Diese Änderungen ermöglichen nicht nur, die Membranpräparationen trotz darin enthaltener Saccharose und EDTA zu analysieren, sondern erübrigen auch eine normalerweise vorher notwendige Solubilisation oder Lipid-Extraktion.

Folgende Reagenzien werden für den Versuch benötigt:

Reagenz A:	2 % Na_2CO_3	Reagenz C:	100 ml Reagenz A
	0,4 % NaOH		1 ml Reagenz B
	0,16 % KNaTartrat		(kurz vor Gebrauch mischen)
	1 % SDS		
Reagenz B:	4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		
	50% Folinreagenz in H_2O		

Zur Proteinbestimmung werden 10 mg Rinderserumalbumin (BSA) in 100 ml $\text{Aqua}_{\text{dest}}$ gelöst, um eine Albumin-Stammlösung in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu erhalten. Folgende Verdünnungsreihe wird davon in Reagenzgläsern vorbereitet (jeweils 1 ml), um eine Eichproteinlösung zu erhalten: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Zusätzlich wird noch ein Reagenzglas mit 1 ml H_2O zur Bestimmung des Leerwertes befüllt. Es folgen dann die eigentlichen Membranpräparationsproben, von denen jeweils 20 μl in 980 μl H_2O verdünnt werden. Grundsätzlich werden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Zu allen Ansätzen pipettiert man nun jeweils 3 ml von Reagenz C, mischt gründlich und wartet 10 min bei Raumtemperatur. Danach wird zu jeder Probe 300 μl einer 50%-igen Folin-Lösung zugefügt und durch kräftiges Schütteln gemischt. Der Reaktionsansatz

wird 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Extinktion des gebildeten blauen Farbstoffs bei 750 nm am Spektralphotometer gemessen. Man trägt die ermittelten Extinktionen als Funktion der Konzentration der Eichproteinlösungen auf und bestimmt den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{λ} . Mit diesem kann man nun die Proteinkonzentration der Membranproteine nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnen.

2.2.18 Markierung der YadA-S-C-Varianten mit PEO-Biotin-Maleimid

Zur Darstellung der Ankertopographie wurden zwei verschiedene Nachweismethoden durchgeführt. Neben dem Nachweis gentechnisch eingebrachter Flagepitope geschah dies auch über den Nachweis von spezifisch eingebrachten Cysteinresten im Austausch gegen Serinresten. Der Vorteil dieser Methode ist, dass am Protein nur minimale Veränderungen vorgenommen werden (Austausch zweier in Ihren biochemischen Eigenschaften ähnlichen Aminosäurereste) ohne eine große strukturelle Veränderung in der Proteinstereometrie zu riskieren. Die SH-Gruppen der Cysteinreste wurden dann mittels Biotin-Maleimid markiert und sollten über eine Avidin-Biotin-Reaktion nachgewiesen werden. Bei PEO-Biotin-Maleimid handelt es sich um ein Biotinmolekül, dass über einen Polyäthylenoxid (PEO)-Spacer-Arm mit dem Maleimidmolekül verbunden ist. Das Maleimid reagiert mit der SH-Gruppe und bildet eine Thioetherbindung (siehe Abbildung 9). Streptavidin (Sigma) bindet hochspezifisch an Biotin. Eine schematische Darstellung der Reaktion zeigt Abbildung 10. Das Markieren der YadA-Cysteinproteine wurde mit Biotin-Maleimid-Reagenzien zweier verschiedener Anbieter durchgeführt, zum einen mit EZ-Link™ PEO-Maleimide-Activated Biotin (Pierce, Rockford), zum anderen mit Biotin-Maleimid der Firma Sigma (St.Luis). Es wurde nach der von Bös et. al. 1997 beschriebenen Methode vorgegangen. Die *Yersinia*-Zellen, die die YadA-Varianten produzieren wurden in NB-Medium bei 37°C kultiviert. Die Erreger wurden bei Erreichen einer optischen Dichte von 1,0 (578nm) abzentrifugiert. Dies entspricht der logarithmischen Wachstumsphase der Kultur. Anschließend wurden die Pellets dreimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben in 1 ml PBS-Puffer versetzt mit 0,5 mM Biotin-Maleimid und 1% DMSF für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Proteine im denaturierten Zustand zu markieren wurde zum Biotinylierungsansatz zusätzlich in verschiedenen Versuchsreihen 3% SDS, Formamid bis zu 30%, oder 8M Harnstoff. Die

Markierungsreaktion wurde mit einem 40fachen Überschuss von DTT gestoppt (110 μ l einer 200 mM-Lösung; endgültige Konzentration 20mM). Danach wurden die Proben erneut dreimal in eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend für 5 Minuten bei 100°C in Lysis-Puffer inkubiert. Die so behandelten Proben wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

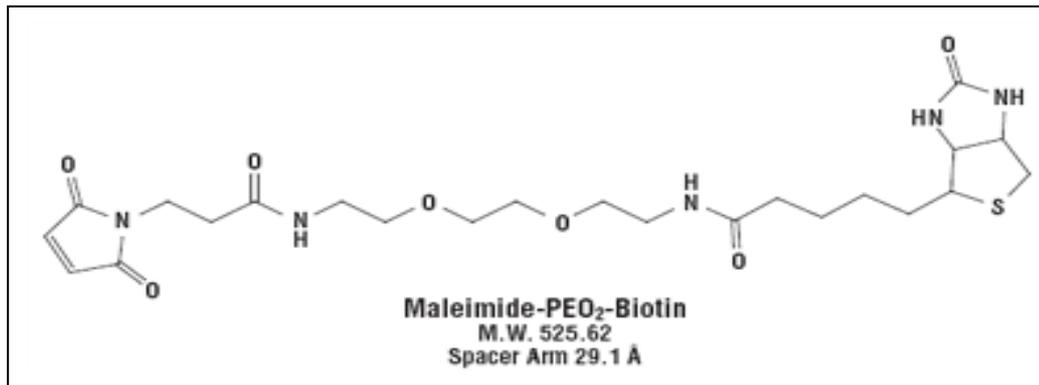


Abb.8: Strukturformel von PEO-Maleimid (von www.piercenet.com)

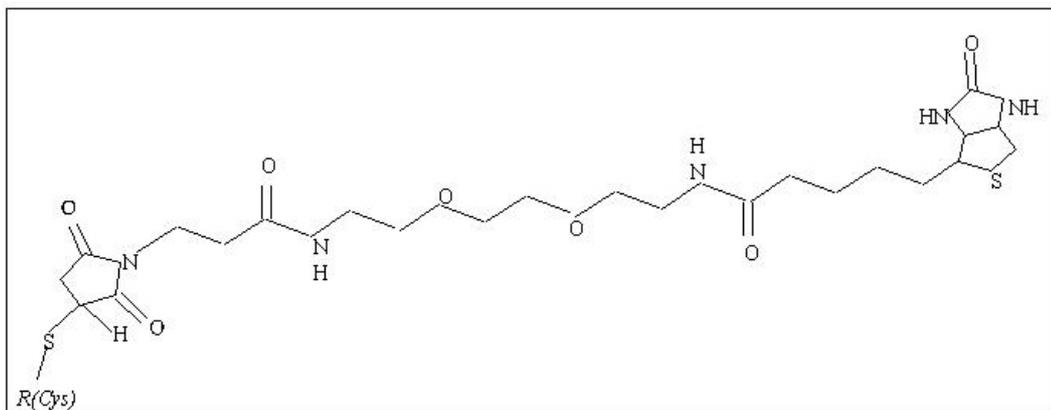


Abb.9: Strukturformel von PEO-Maleimid nach Bildung der Thioethergruppe mit der SH-Gruppe des Cystein

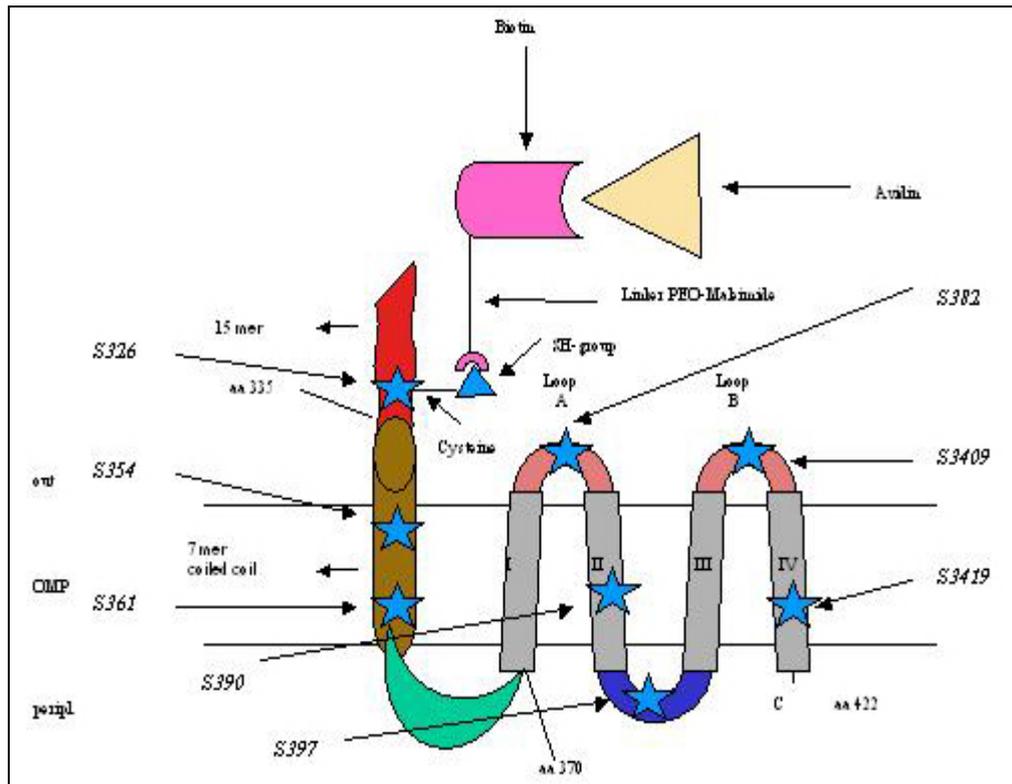


Abb. 10: Modell des YadA-Ankers. Rot: *stalk*-Bereich, Braun: *linker*-Bereich, Grün: *turn* (zählt zum *linker*-Bereich), Grau: Transmembrandomänen I-IV, Rosa: *loops* A und B, Blau: *turn*. Schematische Darstellung der ausgetauschten Cysteinreste im YadA. Ankerbereich (blaue Sterne stellen die Cysteinreste dar) und der Biotin-Maleimid-Nachweismethode (*E.coli* – und Yersinien-Mutanten).

2.2.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine in einem diskontinuierlichen Puffersystem entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, ist eine vollständige Denaturierung und Ladungsangleichung der Proteine nötig. Die Denaturierung kann durch ein zehnminütiges Aufkochen der Substrate und durch Einwirkung von beta-Mercaptoethanol zur Spaltung von Protein-Disulfidbrücken erreicht werden. Die Proteinladungen können durch Inkubation mit Natriumdodecylsulfat, kurz SDS, welches die Eigenladungen der Proteine mit seiner negativen Ladung überdeckt, ausgeglichen werden. Die so behandelten Proben können nun auf ein Gel aufgetragen werden, in dem die Proteine unter einer Spannung von 90 V und einer Stromstärke von 15 mA nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Um schärfere und deutlichere Banden zu erhalten, hat es sich bewährt, zwei unterschiedliche Gele zu kombinieren. So gießt man in einer vertikalen Kammer zuerst das etwa 6 cm hohe Trenngel, welches als das eigentliche Laufgel zu betrachten ist und anschließend ein 1 cm hohes Sammelgel, in welches der Gelkamm mit seinen Zähnen eingebracht wird.

In die dabei entstandenen Vertiefungen werden nun die Proteinproben, aufgenommen in Stopmix mit Bromphenolblau und beta-Mercaptoethanol, einpipettiert. Die Bromphenolblau-Front macht den Lauf der Banden zur Anode hin sichtbar. Als Marker verwendet man einen Proteinmix mit fest definierten Molekulargewichten im Bereich von 14 bis 97 kDa. Das Gel läuft dabei in einem diskontinuierlichen Puffersystem, einem Tris-Glycin-Puffer. Der Gellauf ist beendet, wenn die Farbfront das untere Ende des Gels erreicht hat, was bei 15 mA etwa 90 bis 120 Minuten dauert. Anhand eines Immunoblots wurden dann gezielt bestimmte Proteine mit einem gegen sie gerichteten Antikörper enzymatisch sichtbar zu machen.

2.2.20 Immunoblot/Westernblot

Mit dem Immunoblot ist es möglich, bestimmte Proteine aus einem Proteingemisch mit Hilfe von gegen entsprechende Proteinepitope gerichteten Antikörper darzustellen. Nach einer Auftrennung wird das Proteingel luftblasenfrei auf eine Nitrozellulose-Membran (BA85; Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) gelegt, die als fester Trägerstoff fungiert. Das Gel auf der Membran wird in eine Halterung aus Kunststoff zusammen mit Schaumstoff und Filterpapier in folgender Reihenfolge eingespannt:

Anodenseite des Kunststoffs

Schaumstoff

Whatman-Filterpapier

Nitrozellulose-Membran

Proteingel

Whatman-Filterpapier

Schaumstoff

Kathodenseite des Kunststoffs

Unter Kühlung erfolgt nun in einer mit Westernblot-Puffer gefüllten vertikalen Kammer die Elektrophorese bei 0,3 A für 1 Stunde. Danach entfernt man das Gel von der Nitrozellulose, schneidet von der Nitrozellulose den Streifen ab, auf dem das Marker-Proteingemisch gelaufen ist und färbt diesen Streifen mit Amidoschwarz (0,8 % w/v in 10 % Essigsäure, 5 % Methanol) ein. Dies ist gleichzeitig eine Kontrolle des Blotvorganges, mit Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran. Die vom Protein freien Stellen der Membran blockiert man nun über Nacht bei 4 °C in 20 %

fetalem Kälberserum (FKS) mit 0,5 % Tween20 in PBS (Blockierlösung). So kann verhindert werden, dass es später zu unspezifische Bindungen der Antikörper kommt. Danach wird die Blockierlösung dekantiert und die Nitrozellulose dreimal 10 Minuten mit PBS-Tween unter leichtem Schütteln gewaschen. Danach gibt man den spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper für das gesuchte Protein, in einer geeigneten Verdünnung (in der Regel 1:1000) in 10 ml PBS-Tween auf die Membran und inkubiert für 90 Minuten. Für die Darstellung des gesamten YadA wurden Kaninchen-Antiseren wie Anti-P1-08 sowie der monoklonale Maus-Antikörper 8D1. Für die YadA-Cystein-Biotin-Proteine wurde mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin verwendet, für die Flag-Konstrukte monoklonale Anti-Flag (AK Flag). Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wäscht man die Nitrozellulose erneut dreimal für jeweils 10 Minuten und gibt dann in einer Verdünnung von 1:5000 den zweiten Antikörper, als Detektions-Antikörper, wiederum in 10 ml PBS-Tween verdünnt, für 60 Minuten darauf. Dieser ist ein kommerziell (Sigma) erhältlicher Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (für polyklonale Erstantikörper) bzw. Anti-Maus-IgG-Antikörper (für monoklonale Erstantikörper), der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Er bindet an den Fc-Teil des Erstantikörpers, sodass man nun dessen Bindungsort gezielt nachweisen kann. Streptavidin lag als Konjugat mit alkalischer Phosphatase vor. Nach erneutem dreimaligem Waschen wird der Blot in die Substratlösung gegeben. Alkalische Phosphatase hydrolysiert das Indolylphosphat, das dann mit Nitroblautetrazolium einen blauen Farbniederschlag erzeugt. Die Antikörper-Antikörper-Protein-Komplexe stellen sich so als violette Banden auf der Nitrozellulose-Membran dar. Sind deutliche Banden sichtbar wird die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt.

2.2.21 Dotblotverfahren

Das Dotblotverfahren ist ein vereinfachtes Immunoblotverfahren, bei welchem eine Auftrennung von Proteinen nicht durchgeführt wird. Hier wurde es verwendet, um YadA auf Bakterienoberflächen zu detektieren. Es werden 50 ml Übernachtskultur in BHI 1:20 mit BHI verdünnt und nachfolgend abzentrifugiert. Danach wird das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und weitere dreimal mit PBS gewaschen. Bei 600nm wird anschließend eine OD von 0,1 eingestellt. Von dieser Bakterienlösung werden 100 µl in die Immuno-DOT-Kammer pipettiert. Diese ist wie eine Mikrotitrationplatte mit 8x12 Löchern aufgebaut. Durch Vakuumfiltration werden die Bakterien konzentriert und

immobilisiert. Anschließend wird der beschichtete Nitrozellulosefilter wie beim Immunoblotverfahren mit Antikörpern gefärbt (siehe 2.2.20).

2.2.22 Immunofluoreszenztests

Eine weitere Möglichkeit, YadA an der Oberfläche von *Yersinia enterocolitica* darzustellen, ist der indirekte Immunfluoreszenztest. Hierfür inkubiert man die Bakterien mit einem geeigneten YadA-spezifischen-Antikörper. Nach gründlichem Waschen zur Entfernung aller nicht gebundenen Antikörper, weist man dann mit einem kommerziell erhältlichen, an Fluoreszein gekoppelten Zweitantikörper den Erstantikörper nach. Es folgt ein erneuter Waschvorgang, wiederum um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der Nachweis gilt als positiv, wenn in der Fluoreszenzmikroskopie die Fluoreszenz des Zweitantikörpers als grünes Leuchten deutlich sichtbar wird und im Vergleich zur negativen Kontrolle so das Vorhandensein von YadA (mit YadA-Antiserum) an der bakteriellen Oberfläche nachweisbar ist. Eine Kolonie der zu untersuchenden Yersinien-Stämme wird für 6 Stunden bei 37°C unter dem geeigneten Antibiotika-Schema in 1 ml BHI-Medium inkubiert. Anschließend zentrifugiert man 10 Minuten bei 3000 rpm und 4°C. Das Pellet wird in PBS-0,1%-Tween20-Lösung gewaschen und wie vorher abzentrifugiert. Danach resuspendiert man das Bakterien-Sediment in 50 µl einer 1:300 Verdünnung des YadA-Antikörpers (AK70 oder AK-FLAG (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)) und inkubiert den Ansatz für 30 Minuten bei 37°C. Anschließend wäscht man das Pellet dreimal mit PBS-0,1%-Tween20-Lösung. Nun wird das Pellet in 50 µl einer 1:50 Verdünnung des (FITC)-konjugierten Anti-Maus bzw. Anti-Kaninchen-Immunglobulins (Sigma-Aldrich) aufgenommen und weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird wieder dreimal gewaschen und zentrifugiert. Zuletzt wird jedes Bakterien-Pellet in 200 µl PBS gelöst und 1 µl dieser Suspension auf einen Objektträger pipettiert. Man lässt den Tropfen eintrocknen und fixiert das Präparat für 10 Minuten in eiskaltem Methanol. Nun können die Bakterien im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht und ausgewertet werden.

2.2.23 YadA-Kollagenbindungsanalysen

Die YadA-vermittelte Bindung von Yersinien an Kollagen wurde mittels ELISA-Technik untersucht.

Es werden 96-Well-Platten des Typs Microlon 600 der Firma Greiner (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) mit je 50 µl unterschiedlich konzentrierter Kollagen-Typ I-Lösungen (z.B. 20 µg Kollagen Typ I pro ml PBS) 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert und anschließend dekantiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Mikrotiterplatten zu verhindern, folgt eine einstündige Absättigung mit je 200 µl einer 0,5%-igen Rinderserumalbumin(BSA)-PBS-Lösung pro Napf bei 37°C. Jeder Ansatz wird danach fünfmal mit je 200 µl einer 0,1%-igen Tween20-PBS-Lösung gewaschen. Danach schließt sich die einstündige Inkubation der Näpfe bei 37°C mit den zuvor 20 Minuten bei 60°C inaktivierten unterschiedlichen Yersinien-Stämmen, die in einer 0,01%-igen Natriumazid-PBS-Lösung bei einer OD₆₀₀ von 0,5 vorbereitet wurden, an. Anschließend werden die Ansätze fünfmal gewaschen. Das Kaninchenantiserum Anti-WA-C (immunisierungsantigen pYV-freier WA-C-Stamm) wird 1:10000 in PBS verdünnt und auf jeden Ansatz pipettiert und die so beimpften Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem fünfmaligen Waschen wird die Mikrotiterplatte mit je Well 50 µl einer 1:5000-Verdünnung des Detektionsantikörpers, eines Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers von der Ziege, der an eine Peroxidase gekoppelt ist, für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen erfolgt die enzymatische Farbstoffreaktion durch Zugabe von je 100 µl einer pNPP-Lösung gestartet und bis zur deutlich sichtbaren Gelbfärbung werden die Mikrotiterplatten bei 37°C inkubiert. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von jeweils 100 µl einer 0,5N NaOH-Lösung gestoppt und die Absorption der einzelnen Proben im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen eine ohne den ersten Antikörper verarbeitete Probe (negative Kontrolle) bestimmt.

2.2.24 Antikörperagglutinations- und Autoagglutinationstest

Zwei weitere Verfahren, um YadA an der bakteriellen Oberfläche nachzuweisen sind die Antikörperagglutinationstestung und der Autoagglutinationstest. Bei ersterem untersucht man die Agglutination der Yersinien bei Zugabe von Anti-YadA-Serum (Sory et al., 1990). Ebenso ist die Fähigkeit zur Autoagglutination eine charakteristische Eigenschaft von *Yersinia enterocolitica* bzw. YadA. Auch sie ist von einer korrekten Präsentation des Adhäsins an der Bakterienoberfläche abhängig (Skurnik et al., 1984).

Die verschiedenen Stämme werden über Nacht auf Blutagarplatten bei 27°C angezüchtet und anschließend 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Jeweils eine Kolonie

wird entnommen, auf zwei Objektträger verteilt und einerseits mit 10 µl NaCl-Lösung zum Nachweis der Autoagglutination, andererseits mit 10 µl Anti-YadA-Kaninchenserum Anti-P1-O8 zum Nachweis der Antikörperagglutination resuspendiert. Dabei erkennt man das Auftreten von Agglutination als eine mit bloßem Auge erkennbare Bildung kleiner scholliger Agglutinate in einer vorher homogenen Bakteriensuspension. Die Bewertung erfolgt durch drei unabhängige Untersucher. Als Positivkontrolle dient WA-314, als Negativkontrolle WA-C.

2.2.25 Zelladhärenztest

Ebenso wie die Bindung an extrazelluläre Matrix ist *Yersinia enterocolitica* in der Lage an menschliche epitheliale Zellen zu binden. Diese Eigenschaft wurde in der vorliegenden Arbeit mit Yersinien, die unterschiedliche Ankerhybridkonstrukten exprimieren, untersucht. Dazu wurde das Bindungsverhalten der Yersinien an HeLa-Zellen analysiert

Die Zellen wurden in Click RPMI 1640 Medium (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) auf Deckgläschen in 24-Well-ELISA-Platten als Monolayer angezüchtet. Anschließend werden sie mit 37°C warmem Click-Medium gewaschen. Yersinien werden in vorgewärmtem BHI-Medium bei 37°C auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt. Das entspricht einer Zahl von 5×10^7 Bakterien pro ml. Es werden je 500 µl der Bakteriensuspension auf die Zellen pipettiert. Danach wird der Ansatz bei 37°C für 45 Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit erwärmtem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wird der Ansatz für 45-Minuten in 500 µl Click-Medium bei 37°C nachinkubiert. Daraufhin wäscht man die Zellen zweimal mit PBS und fixiert sie dann 10 Minuten lang mit eiskaltem Methanol. Nach einem letzten Waschgang mit PBS lässt man die Deckgläschen lufttrocknen. Um Zellen und Bakterien anzufärben führt man nun eine Giemsa-Färbung durch. Giemsa-Lösung wird im Verhältnis von 1:10 mit Wasser verdünnt, filtriert, in Mengen von jeweils 500 µl auf die Präparate pipettiert und darauf für 20 Minuten belassen. Danach kippt man die Lösung ab, wäscht die Proben einmal mit Wasser und lässt sie erneut lufttrocknen. Das Mikroskopieren ist dann in 1000-facher Vergrößerung mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv ohne Eindecken möglich. Um die Zelladhärenz der *Yersinien* quantitativ zu ermitteln wurde die Anzahl der an Zellen haftenden Bakterien pro Gesichtsfeld bestimmt und in die Gruppen 0 (keine Bakterienbindung), 1-4, 5-10 und >10 Bakterien pro Zelle eingeteilt.

2.2.26 Serumresistenztest

Serum wirkt auf viele Mikroorganismen über Komplementaktivierung, Lysozyme und transferrinvermittelte Eisenbindung bakterizid bzw. bakteriostatisch. Die Fähigkeit von Bakterien im Serum zu überleben oder sich zu vermehren ist daher als Pathogenitätsfaktor (Serumresistenzfaktor) zu bewerten. *Yersinia enterocolitica* exprimiert eine YadA-vermittelte Serumresistenz (Heesemann & Grueter, 1987). In dieser Arbeit wurden die verschiedenen YadA-Ankerhybridstämme auf Serumresistenz untersucht. Humanserum wurde wie folgt gewonnen: das Blut von 10 gesunden Blutspendern, in deren Blut keine Antikörper gegen Yersinien nachgewiesen werden konnten, wird abgenommen und gepoolt. Nach Gerinnung bei Raumtemperatur und Lagerung über Nacht im Kühlschrank werden die Blutzellen durch Zentrifugation bei 3000 rpm und 4°C für 10 Minuten abgetrennt. Der Überstand, das Serum, wird abpipettiert und bei -80°C aufbewahrt. Die jeweiligen Yersinienstämme werden über Nacht bei 37°C in 1ml RPMI-Medium angezchtet und am nächsten Morgen in der Tischzentrifuge 2 Minuten lang bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Pellets werden in 1ml PBS-5 mM MgCl₂-Puffer aufgenommen und nochmal in selber Weise zentrifugiert. Danach nimmt man sie in 1ml PBS-5 mM MgCl₂-Lösung auf und stellt sie in sterilen Küvetten am Photometer auf eine OD₆₀₀ von 0,3 ein (entspricht einer Zellzahl von 5 x 10⁷ Bakterien pro ml). Danach werden die Kulturen 1: 50 im PBS-5 mM MgCl₂-Puffer verdünnt und davon 100µl auf 100µl menschlichen Serums pipettiert. 100µl dieses Gemischs werden sofort in einer 1:100 und in einer 1:1000 Verdünnung auf LB-Agar-Platten ausgespatelt. Die restlichen 100 µl werden bei 37°C im Thermoblock ohne Schütteln für 90 Minuten inkubiert und danach in einer 1:10 und einer 1:1000 Verdünnung ausplattiert. Die Agar-Platten werden über Nacht bei 28°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen folgt die Auszählung der Kolonien auf den Platten. Die Serumresistenz wird abschließend als Prozentsatz der überlebenden Bakterien angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Topologie des membranintegrierten YadA

3.1.1 FLAG-Mutagenese

3.1.1.1 Strategie/Konstruktion/Mutagenese

Um oberflächenexponierte Sequenzen verkürzter YadA-Konstrukte zu detektieren, wurden FLAG-tags mit dem *yadA*-Gen fusioniert. Sequenzinsertionen und Verkürzungen (Deletionen) in YadA bzw. dem *yadA*-Gen wurden an insgesamt 5 charakteristischen Stellen durchgeführt bzw. mit Konstrukten der Vorarbeit (Ackermann 2005) verglichen. Folgende Konstrukte wurden hergestellt (Abb.11): im Übergang vom *stalk*- in den *linker*-Bereich (Flag 1), im vorderen *linker*-Bereich (Flag 2), direkt vor dem mutmaßlichem *turn* des *linker*-Bereichs, der die Verbindung zu den Transmembrandomänen des Ankers schafft (Flag 3), sowie direkt vor die erste von vier Transmembrandomänen des C-terminalen Ankers (Flag 4). Um den Nachweis der klonierten Epitope nicht zu behindern, erfolgte der Einbau der FLAGs in N-terminal deletierte Konstrukte (Konstruktion: siehe 2.2.13). Vorarbeiten hatten gezeigt, dass die Tagsequenz selber keinen Einfluss auf die Fähigkeiten des Restpeptids zur Oligomerisierung und zum Einbau in die äußere Membran hat. Darüber hinaus wurde eine weitere YadA-Variante konstruiert, bei der die Tagsequenz direkt vor das Stopcodon gesetzt wurde (Flag 5). Da dieser Proteinabschnitt vermutlich für den Einbau in die Membran entscheidend ist, sollte mit diesem Konstrukt untersucht werden, ob an dieser Stelle überhaupt eine genetische Manipulation möglich ist. Der Einbau erfolgte an einem nicht verkürzten *yadA*-Gen. Zur Konstruktion wurde eine PCR-Strategie gewählt, bei der man grundsätzlich ein PCR-Produkt vom 5'-Ende und ein anderes vom 3'-Ende des *yadA*-Gens synthetisiert. Je nachdem, wieviel vom Gen deletiert werden soll, variiert man die Länge dieser beiden Fragmente. Um die zwei PCR-Produkte miteinander verbinden zu können, werden jeweils an ihr komplementäres Ende eine *SacI*-Schnittstelle durch die Primer eingeführt. Beide Fragmente werden über geeignete Restriktionsenzym-Schnittstellen (meist *Clal* und *SphI*) in den entsprechenden Vektor ligiert, in *E. coli* transformiert und über einen Suizidvektor in den *yadA*-negativen Stamm WA(pYVO8-A-0) transferiert. Die Flagsequenzen werden über die bestehende *SacI* – Schnittstelle eingebracht und mittels Sequenzierung überprüft. Die Flag-Untersuchungen zeigten, dass nur drei Mutanten exprimiert und in der äußeren Membran eingebaut werden (A-HNSL-4.1-flag, A-HNSI-6-flag und A-flag-

1267). Von diesen konnten Flag 1 und 2 einwandfrei an der Oberfläche nachgewiesen werden. Flag 3 scheint innerhalb der äußeren Membran oder an der Innenseite derselben zu liegen scheint, da er nicht mehr an der bakteriellen Oberfläche nachweisbar war. Flag 4 wird nicht mehr exprimiert oder aber im periplasmatischen Raum direkt von Proteasen degradiert, ebenso Flag 5.

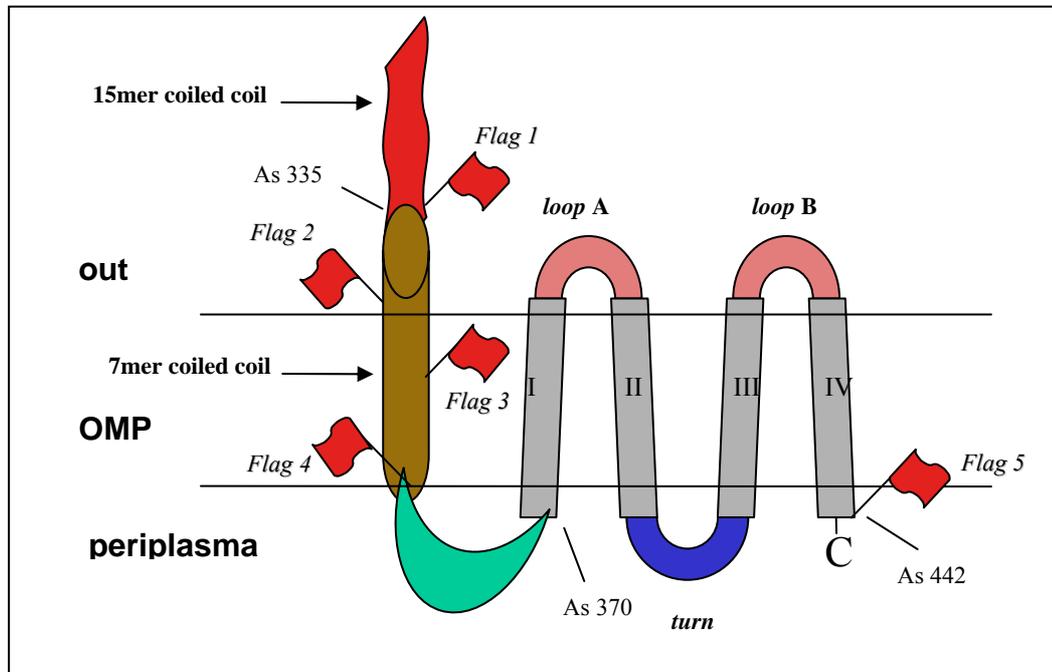
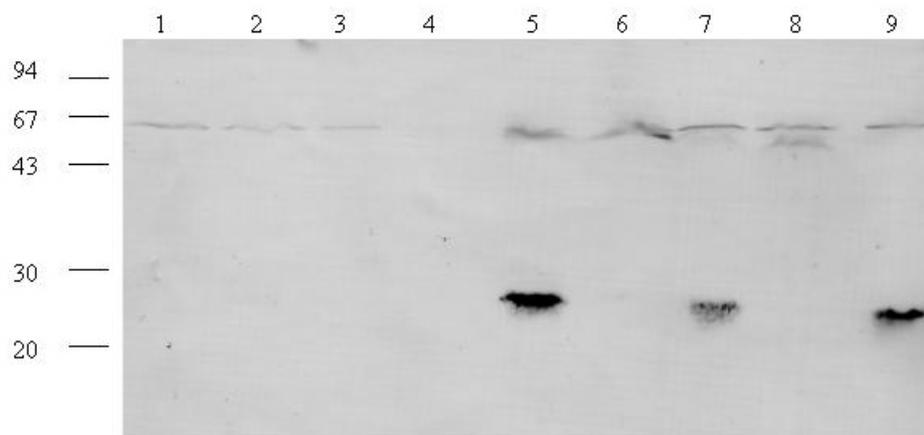


Abb. 11: Modell des YadA-Ankers. Rot: *stalk*, Braun: *linker*-Bereich, Grün: *turn* (zählt zum *linker*-Bereich), Grau: Transmembrandomänen I-IV, Rosa: *loops* A und B, Blau: *turn*. Übersicht über Positionen der eingebrachten Flag-Epitope im YadA-Gen, Flag1: WA(pYVO8-A-HNS4-FLAG), Flag2: WA(pYVO8-A-HNSL4.1-FLAG), Flag3: WA(pYVO8-A-HNSL5-FLAG), Flag4: WA(pYVO8-A-HNSL6-FLAG), Flag5: WA(pYVO8-A-FLAG-1267)

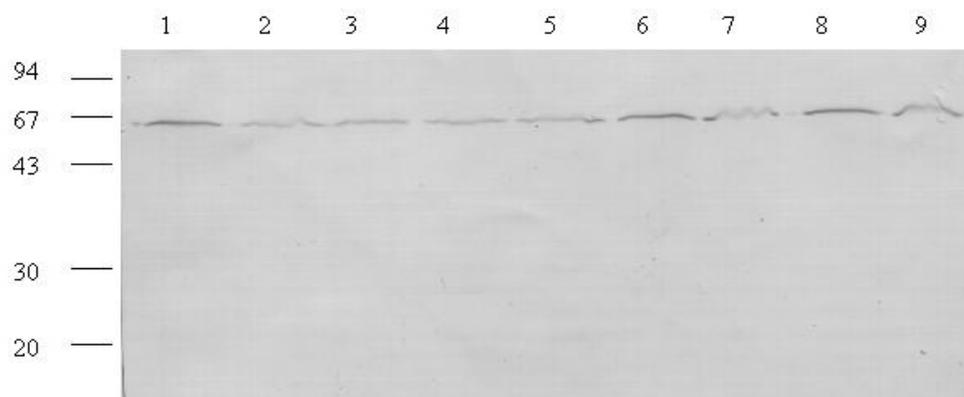
3.1.1.2 Expression der FLAG-*yadA*-Fusionsgene

Um festzustellen, wie die verschiedenen *yadA*-Konstrukte in *Y. enterocolitica* O8 exprimiert werden, wurden die Zelllysate von mittlogarithmisch angewachsenen Bakterienkulturen im Immunoblot verglichen. Zur Markierung dienten dabei YadA-spezifische Kaninchenantiseren (hier AK14) oder ein monoklonaler Mausantikörper (AK Flag) (zu den verwendeten Antikörpern siehe 2.1.7, Seite 18).

Blot A:



Blot B:



Blot C:

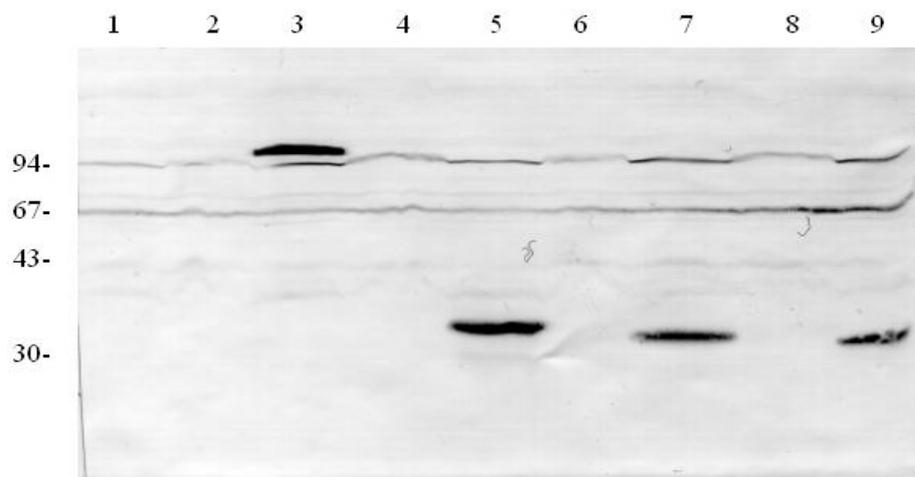


Abbildung 12: Fortsetzung Seite 57

Blot D:

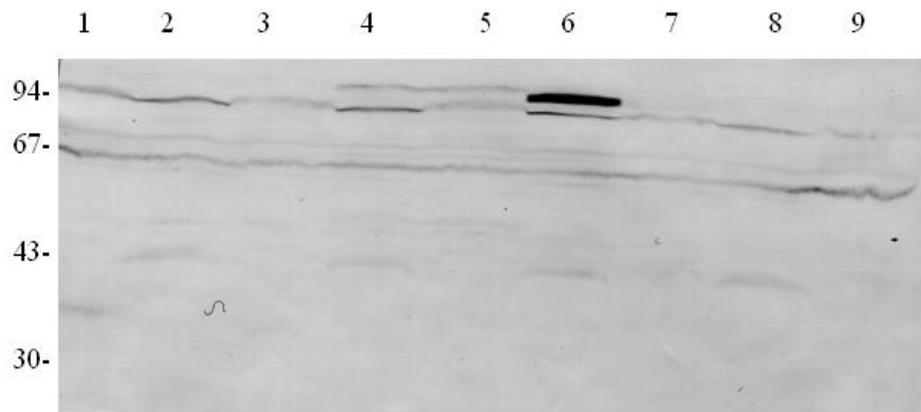


Abb. 12: Zelllysate von Yersinien (WA-pYVA0) mit verschiedenen FLAG-YadA-Konstrukten. Westernblots entwickelt mit AK-FLAG (Blots A und B) sowie Peptidantikörper AK 14 (Blots C und D); vor dem Auftragen auf das Proteingel wurde eine Hälfte der Proben für 60 min. bei 37°C in Probenpuffer solubisiert, die andere Hälfte für 10 Minuten bei 100°C; A0=Negativkontrolle;

Blot A & C:

1:WA(pYVO8-A0)	37°C	6: WA(pYVO8-A-HNS4-FLAG)	100°C
2:WA(pYVO8-A0)	100°C	7:WA(pYVO8-A-HNS4.1-FLAG)	37°C
3:WA(pYVO8-A1)	37°C	8:WA(pYVO8-A-HNSL4.1-FLAG)	100°C
4:WA(pYVO8-A1)	100°C	9:WA(pYVO8-A-HNSL5-FLAG)	37°C
5:WA(pYVO8-A-HNS4-FLAG)	37°C		

Blot B & D:

1:WA(pYVO8-A-HNSL5-FLAG)	100°C	6:WA(pYVO8-A1)	37°C
2:WA(pYVO8-A-HNSL6-FLAG)	37°C	7:WA(pYVO8-A1)	100°C
3:WA(pYVO8-A-HNSL6-FLAG)	100°C	8:WA(pYV-A0)	37°C
4:WA(pYVO8-A-1267-FLAG)	37°C	9:WA(pYVO8-A0)	100°C
5:WA(pYVO8-A-1267-FLAG)	100°C		

Translatiert wurden alle 3 Konstrukte und konnten sowohl mit Flag-Antikörpern als auch mit YadA-Peptid-Antikörper AK14 nachgewiesen werden. Zu beachten ist, dass auf Grund der extremen Kürze der Konstrukte (<10 kDa), nur die oligomere Form im Blot sichtbar ist (37°C-Banden bei FLAG- und AK14 Blots). Die Konstrukte A-HNSL6-flag (Flag4 in Abb.11) und A-flag-1267 (Flag 5 in Abb.11) konnten nicht nachgewiesen werden.

3.1.1.3 Nachweis der FLAG-yadA-Fusionsgene an der bakteriellen Aussenmembran

Um nachzuweisen, ob die Konstrukte in der äusseren Membran von *Yersinia enterocolitica* eingebaut werden, wurden Immunoblots der bakteriellen Aussenmembran des exprimierten Konstruktes WA-pYV-A-HNSL4.1-FLAG durchgeführt. Ausserdem wurden Dotblots von intakten, auf Nitrozellulose aufgetragenen Yersinien angefertigt und zusätzlich Immunfluoreszenztests mit

intakten Yersinien durchgeführt. In vorangegangenen Arbeiten (Roggenkamp et al., 2004) waren diese Tests mit den Konstrukten A-HNS4-flag und A-HNS5-flag erfolgt.

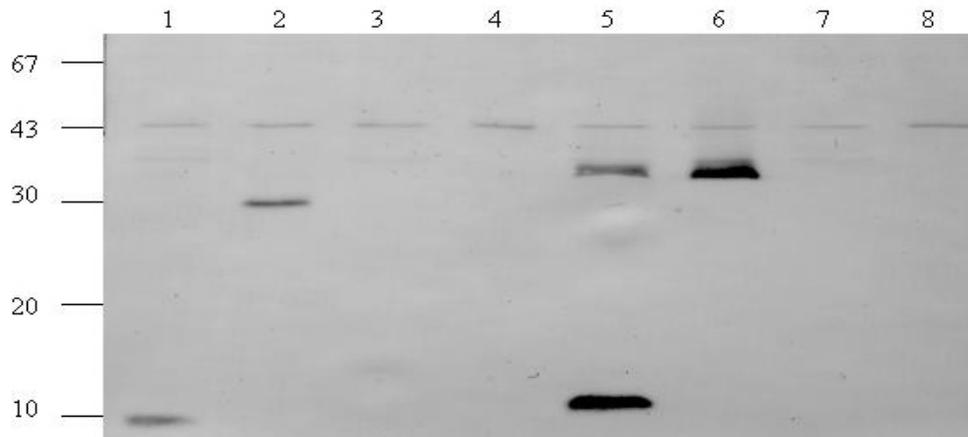


Abb. 13: Außenmembranpräparation von Yersinien (WA-pYVA0) mit verschiedenen FLAG-YadA-Konstrukten. Westernblot entwickelt mit AK-FLAG; vor dem Auftragen auf das Proteingel wurde eine Hälfte der Proben für 60 min. bei 37°C in Probenpuffer inkubiert, die andere Hälfte für 10 Minuten bei 100°C; A1=Negativkontrolle;

1:WA(pYVO8-A-HNS4.1-FLAG)	100°C	5:WA(pYVO8-A-HNS4-FLAG)	100°C
2:WA(pYVO8-A-HNS4.1-FLAG)	37°C	6:WA(pYVO8-A-HNS4-FLAG)	37°C
3:WA(pYVO8-A-HNSL6-FLAG)	100°C	7:WA(pYVO8-A1)	100°C
4:WA(pYVO8-A-HNSL6-FLAG)	37°C	8: WA(pYVO8-A1)	37°C

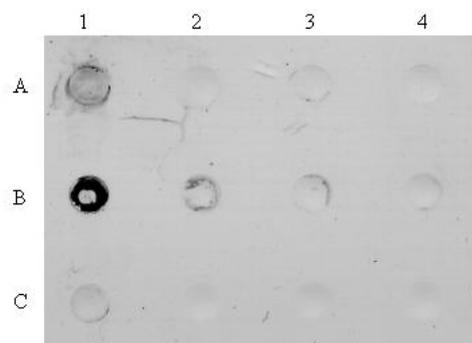


Abb. 14: Dotblot intakter Zellen von Yersinien (WA-pYVA0) mit verschiedenen FLAG-YadA-Konstrukten. Übernachtkulturen wurden abzentrifugiert und in 1 ml PBS aufgenommen (mit einer OD von 0,1 bei 600nm). Diese Bakteriensuspension wurden dann in unterschiedlichen Konzentrationen (A: 1:1, B: 1:10, C: 1:100) mit Aqua dest. verdünnt und auf Nitrozellulosefilter aufgebracht (siehe 2.2.21, S.19). Entwicklung mit AK-FLAG. 1: WA(pYVO8-A-HNS4-FLAG), 2: WA(pYVO8-A-HNS4.1-FLAG), 3: WA(pYV-A1), 4: WA(pYV-A0)

Konstrukt	WA(pYV-A-HNS4-FLAG)	WA(pYV-A-HNSL4.1-FLAG)	WA(pYV-A-HNSL5-FLAG)
Immunfluoreszenz mit AK-FLAG	+	-	-

Tabelle 3: Immunfluoreszenztest von Yersinien (WA-pYVA0) mit verschiedenen FLAG-YadA-Konstrukten Die verschiedenen Stämme wurden für 6h bei 37°C in BHI-Medium angezchtet, gewaschen und mit monoklonalem AK-FLAG 30 min bei 37°C inkubiert. Die so markierten Bakterien wurden im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Alle Ergebnisse wurden von drei unabhängigen Untersuchern bestätigt. + deutlich sichtbare Immunfluoreszenz, - = keine Immunfluoreszenz

Alle FLAG-YadA-Konstrukte, die auch schon im Zelllysate nachweisbar waren, gelangten offensichtlich in die Außenmembran und konnten im Westernblot detektiert werden. Im Dotblotverfahren ließ sich WA(pYV-A-HNS4-FLAG) einwandfrei an der Bakterienoberfläche nachweisen, während die beiden anderen Konstrukte nicht eindeutig vom Antikörper erkannt werden konnten. Mittels Immunfluoreszenz konnte lediglich WA(pYV-A-HNS4-FLAG) dargestellt werden, WA(pYV-A-HNSL4.1-FLAG) und WA(pYV-A-HNSL5-FLAG) nicht. Die Ergebnisse zeigen, dass nur das Flag-Epitop von WA(pYV-A-HNS4-FLAG) außerhalb der äußeren Membran liegt und so für Antikörper zugänglich ist. WA(pYV-A-HNSL4.1-FLAG) sowie WA(pYV-A-HNSL5-FLAG) konnten an intakten Zellen nicht detektiert werden. Nur der N-terminale Teil des *linker*-Bereiches wird also an der Membranaussenseite exponiert, wohingegen die weiter C-terminal lokalisierten „FLAGs“ nicht für die Antikörper zugänglich sind. Die Untersuchung bestätigen das aufgezeigte Modell des YadA-Membranankers und die vermutete Lokalisation des *linker*-Bereiches (siehe Abb.11).

3.1.2 Cystein-Scanning Mutagenese

3.1.2.1 Strategie/Mutagenese

Bei den Untersuchungen zur YadA-Topologie wurde neben dem Einbringen von FLAG-Sequenzen auch mit der Cystein-Scanning-Mutagenese gearbeitet. Dafür wurden Kodons für Serinreste im Bereich des Ankers und des *linker*-Bereiches gegen Kodons für Cysteinreste im YadA-Gen ausgetauscht. Cysteinreste haben in den meisten Fällen keinen Einfluss auf die Stereometrie des Gesamtproteins und werden als Ersatz für Serin toleriert (Van Geest & Lolkema, 2000). Die so erhaltene reaktive SH-Gruppe kann mit der Sulfhydrylgruppe der Maleimide reagieren und bildet eine Thioether-Bindung (Abb.8 und 9, S. 45). Da das Maleimid an Biotin

gekoppelt ist, kann es über die Reaktion mit Streptavidin, der daran konjugierten Phosphatase sowie farbigem Substrat nachgewiesen werden (Abb.10, S. 46). Biotin-Malleimid ist nicht in der Lage die äußere Bakterienmembran zu durchdringen. Es eignet sich deshalb zur Untersuchung oberflächenexponierter Proteine und Proteindomänen. Für die Versuchsdurchführung vereinfachend ist, dass Wildtyp-YadA über keine Cystein-Reste verfügt und so nur die eingebrachten Cystein-Reste markiert werden. Als Vektor wurde pUC-A-H verwendet. Durch Verwendung dieser „kopflosten“ YadA-Variante, sollte das Biotinmalleimid mit dem Cysteinrest des Ankerbereichs reagieren. Von insgesamt 7 Mutationen des YadA-Gens, die in *E. coli* durchgeführt worden sind, sind 4 in den *Yersinia enterocolitica* Stamm WA (pYV 08-A0) transferiert worden. Wegen geringer Erfolgsaussichten wurde auf den Transfer der restlichen Mutationen verzichtet. Bei den untersuchten Mutanten handelt es sich um den Austausch des Serins S326 (WA(pYVO8-A-S326C), Mutation im letzten 15mer des *stalk*-Bereiches), S354 (WA(pYVO8-A-S354C), Mutation hinter dem letzten Heptamer-repeat des *linker*-Bereiches), S361 (WA(pYVO8-A-S361C), Mutation hinter dem letzten Heptamer-repeat des *linker*-Bereiches) und S397 (WA(pYVO8-A-S397C), Mutation im *turn* des Ankerbereiches). Bei den in *E. coli* vorliegenden Konstrukten handelt es sich um den Austausch des Serins S382 (Mutation im *loop A* des Ankerbereiches), S390 (Mutation im Bereich Transmembrandomäne II des Ankerbereiches) sowie S409 (*loop B* des Ankerbereiches). Der geplante Austausch des Serinkodons an der Stelle S419 (Transmembrandomäne IV des Ankerbereiches) gelang nicht. (Siehe hierzu auch Abb. 10, Seite 46).

3.1.2.2 Analyse der YadA-S-C-Varianten

Es wurden Westernblots mit Zelllysaten der 4 in *Yersinia* vorliegenden YadA-S-C-Varianten durchgeführt. Abbildung 15 zeigt die 4 transferierten YadA-S-C-Varianten samt WA(pYVO8-A0) und WA(pYV-O8-A1) als Negativ- und Positivkontrollen. Alle 4 YadA-S-C-Varianten werden exprimiert und sind im Blot mit YadA-spezifischem Antiserum Anti-P1-O8 nachweisbar

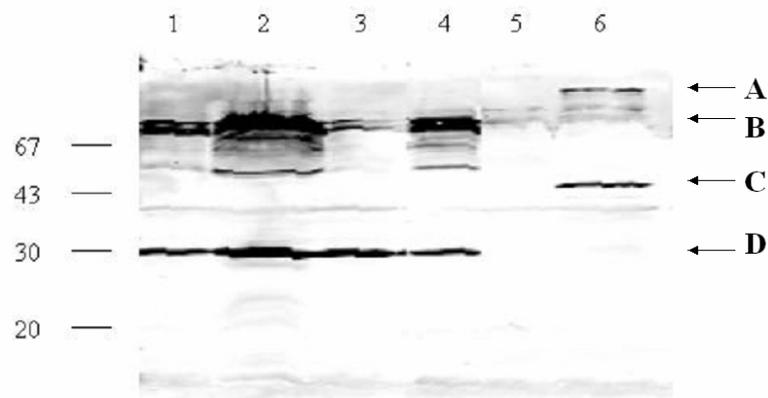


Abb. 15: Zelllysate von Yersinien (WA-pYVA0) mit YadA-S-C-Varianten: Westernblots von Zelllysate von Yad-S-C-Varianten entwickelt mit Antiserum Anti-P1-O8 (Proben bei 100°C solubilisiert); A0=Negativkontrolle; A: Oligomer des Wildtyp-YadA (Positivkontrolle), B: Oligomere der YadA-S-C-Varianten, C: Monomer des Wildtyp-YadA, D: Monomere der YadA-S-C-Varianten.

1: WA(pYVO8-A-S327C)

2: WA(pYVO8-A-S355C)

3: A-WA(pYV-A-S361C)

4: WA(pYVO8-A-S397C)

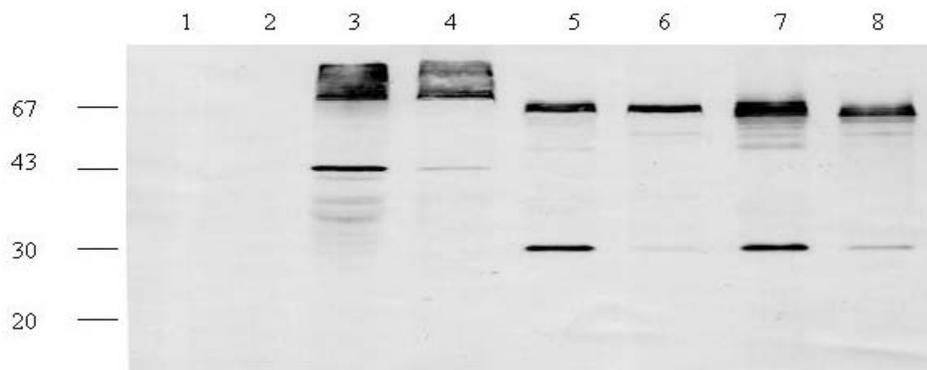
5: WA(pYVO8-A-0)

6: WA(pYVO8-A1)

3.1.2.3 Nachweis der YadA-S-C-Varianten an der bakteriellen Außenmembran

Um nachweisen zu können, dass die YadA-S-C-Varianten in die äußere Membran eingebaut werden, wurden von den in Yersiniastämmen vorliegenden Konstrukten WA(pYVO8-A-S327C), WA(pYVO8-A-S355C), WA(pYVO8-A-S361C) sowie WA(pYVO8-A-S397C) Äußere-Membran isoliert. Diese wurden dann mittels Westernblot analysiert. Der Serin-Cysteinaustausch scheint keinen Einfluss auf die Expression und den Einbau von YadA in die äußere Membran zu haben. Alle YadA-Konstrukte liegen wie die Positivkontrolle (WA(pYVO8-A1) und WA(pYVO8-A-H)) sowohl als Oligomer wie auch als Monomer vor. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Variante WA(pYVO8-A-S361C) bei Solubilisierung bei 100°C vollständig zum Monomer zerfällt, während alle anderen Mutanten noch in ihrer oligomeren Form nachweisbar sind. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der Serin-Cysteinumtausch an dieser Stelle zu einem Stabilitätsverlust des Trimers führt.

Blot A:



Blot B:

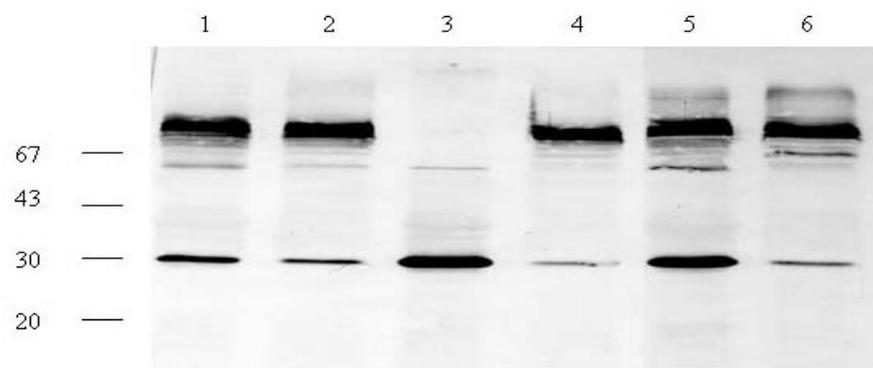


Abb. 16: Außenmembranpräparationen von Yersinien (WA-pYV-A0) mit YadA-S-C-Varianten; Westernblots von äußeren Membranen nach Entwicklung mit dem monoklonalen Antikörper 8D1; Die Proben wurden bei 37°C/60min. und 100°C/10min. solubilisiert; Spur 1 und 2 in Blot A: Negativkontrolle

Blot A:

- 1: WA(pYVO8-A0) (100°C)
- 2: WA(pYVO8-A0) (37°C)
- 3: WA(pYVO8-A1) (100°C)
- 4: WA(pYVO8-A1) (37°C)

- 5: WA(pYVO8-A-H) (100°C)
- 6: WA(pYVO8-A-H) (37°C)
- 7: WA(pYVO8-A-S327C) (100°C)
- 8: WA(pYVO8-A-S327C) (37°C)

Blot B:

- 1: WA(pYVO8-A-S355C) (100°C)
- 2: WA(pYVO8-A-S355C) (37°C)
- 3: WA(pYVO8-A-S361C) (100°C)

- 4: WA(pYVO8-A-S361C) (37°C)
- 5: WA(pYVO8-A-S397C) (100°C)
- 6: WA(pYVO8-A-S397C) (37°C)

3.1.2.4 Nachweis von Biotin-Maleimid-konjugiertem YadA

Intakte Yersinien wurden mit Biotinmaleimid markiert. Danach wurden die äußeren Membranen präpariert und ein Westernblot durchgeführt. Dieser wurde dann mit an alkalische Phosphatase-konjugiertem Streptavidin entwickelt. Um zu verhindern, dass sich die freien SH-Gruppen zu Disulfidbrücken oxidieren bzw. dimerisieren, wurden Proben in verschiedenen Versuchen mit Mercaptoethanol versetzt. Es zeigten sich bei den so durchgeführten Blots eine Vielzahl an Hintergrundbanden

(vermutlich andere äußere Membranproteine), die eigentlichen YadA-Banden, mit den charakteristischen Oligo- und Monomerbande waren jedoch nicht nachweisbar. Markierungssubstanzen anderer Hersteller zeigten das gleiche Ergebnis. Nachdem die YadA-S-C-Varianten so nicht einwandfrei nachzuweisen waren, wurde die Blots mit denaturierten Proteinen durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine Markierung überhaupt möglich ist. Dabei wurden die Proteine auf unterschiedliche Weise denaturiert, einerseits durch Versetzen mit 3 M Harnstoff, SDS, andererseits mittels Formamid in unterschiedlichen Konzentrationen.

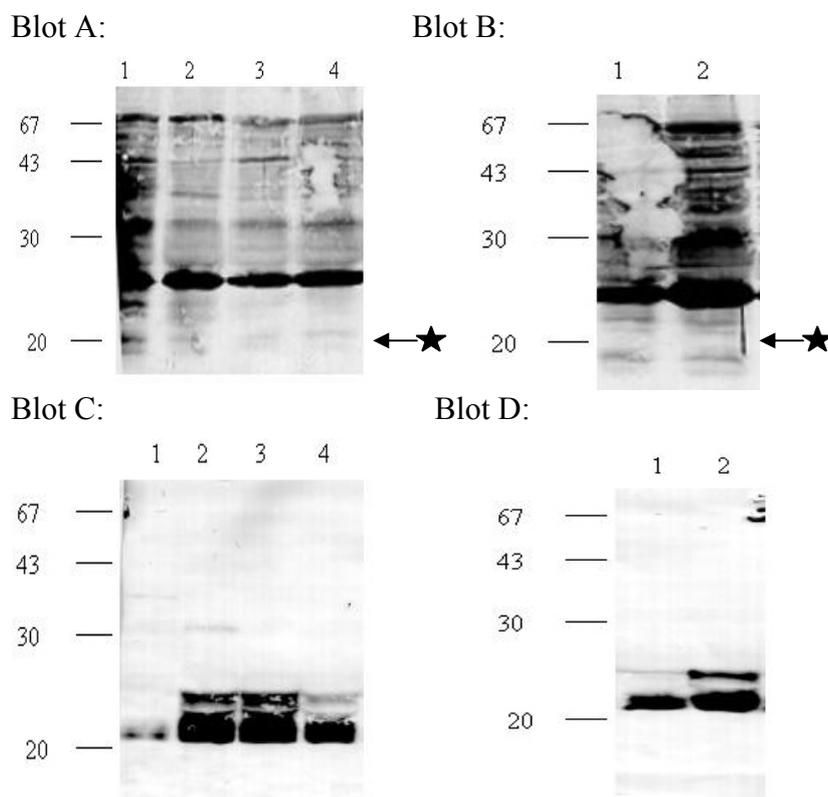


Abb. 17: Außenmembranpräparationen von Yersinien (WA-pYV-A0) mit YadA-S-C-Varianten; Westernblots von äußeren Membranen entwickelt mit Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat (Blot A und B) bzw. mit monoklonalem Antikörper AK 8D1 (Blot C und D); den Proteinproben wurden 3M Urea zugegeben; die Markierungen (Sterne in Blot A und B) kennzeichnen die Höhe der zu erwartenden YadA-Monomer-Bande;

Blot A & C

1: WA(pYVO8-A-H)
2: WA(pYVO8-A- S327C)

3: WA(pYVO8-A- S355C)
4: WA(pYVO8-A- S361C)

Blot B & D:

1:WA(pYVO8-A-H)

2: WA(pYVO8-A-S397C)

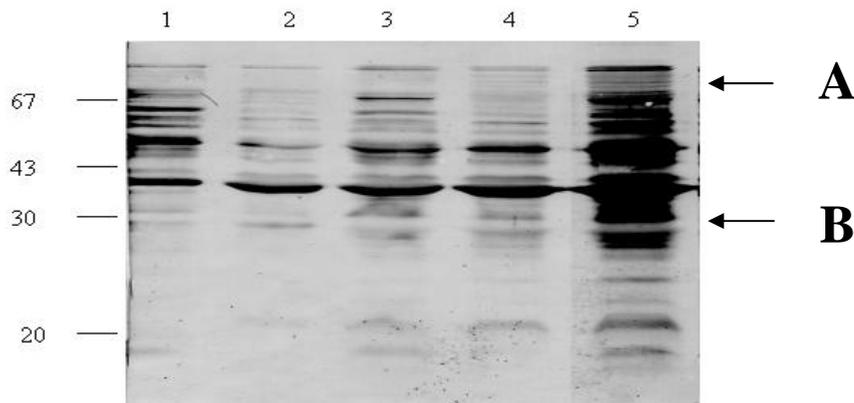


Abb. 18: Außenmembranpräparation von Yersinien (WA-pYV-A0) mit YadA-S-C-Varianten; Westernblot von mit Formamid versetzten äußeren Membranen nach Entwicklung mit alkal. Phosphatase konjugiertem Streptavidin; A: Höhe der zu erwartenden YadA-Oligomerbande; B: Höhe der zu erwartenden YadA-Monomer-Bande

1: WA(pYVO8-A-H) (Negativkontrolle)	4: WA(pYVO8-A-S361C)
2: WA(pYVO8-A-S327C)	5: WA(pYVO8-A-S397C)
3: WA(pYVO8-A-S355C)	

Auch an das derart denaturierte Protein gelang der einwandfreie Biotinmaleimidnachweis der Cysteinseitengruppen der Mutanten nicht. Immer noch blieben die Hintergrundbanden dominant und die Banden der YadA-Mutanten waren nicht klar zu identifizieren. Es konnte aber auch nachgewiesen werden, dass die Behandlung der YadA-Proben mit Harnstoff deren Laufverhalten im Polyacrylamid-Gel änderte. Der Grund für das Scheitern des Nachweises der Biotinylierung von YadA-Cystein-Konstrukten konnte letztlich nicht eindeutig geklärt werden. Denkbar wäre es, dass die Bakterienmembran so dicht mit YadA bepackt ist, dass die Cysteinreste der YadA-S-C-Varianten nicht für die Biotinylierung zugänglich sind. Denkbar wäre auch, dass ein Großteil des Nachweisagens bereits durch andere, ebenfalls über SH-Gruppen verfügende und an der Außenmembran haftende bakterielle Proteine gebunden wird, und so kaum noch Biotinmaleimid an die YadA-S-C-Varianten binden kann. Eine weiterführende Aussage über den Ankerbau, seine Topographie und genaue Lokalisation von *turns* und *loops* konnte mit dieser Methode nicht getroffen werden.

3.2 Untersuchungen zur Transmembrantransport und zur Oligomerisierung von YadA:

Analyse von YadA-Ankerhybrid-Konstrukten

3.2.1 Fragestellung und Strategie

Die Funktionalität von YadA ist an eine intakte Oligomerisierung gebunden (Roggenkamp et al., 2003). Diese wiederum wird maßgeblich durch den Anker bestimmt. Durch Austausch entsprechender C-terminaler Domänen (Anker- und *linker*-Bereich) sollte der Einfluss des Ankers auf Transport der N-terminalen YadA-Domäne und Oligomerisierung untersucht werden. Hierfür wurden YadA-Hybridproteine mit den C-terminalen Translokator-domänen von UspA1, EibA sowie Hia (verwandte Vertreter der Oca-Familie) konstruiert. Diese Domänen zeigen signifikante Unterschiede zu YadA, betreffend der Aminosäuresequenz und der Wahrscheinlichkeit *coiled-coil*-Strukturen im *linker*-Bereich zu bilden. Die prozentuale Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz beträgt zwischen YadA und EibA 40%, zwischen YadA und Hia 26% und zwischen YadA und UspA1 sogar nur 16%. Berechnet man mit dem von Lupas et al. (1991) entwickeltem Softwareprogramm „Coils“ die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von *coiled-coil*-Strukturen, so besteht bei UspA1 und Hia im *linker*-Bereich nur eine geringe Wahrscheinlichkeit für die Bildung von *coiled-coil*-Strukturen, während diese bei YadA und EibA wesentlich größer ist. Der Einfluss dieser Unterschiede auf die funktionellen N-terminalen Abschnitte von YadA sollte untersucht werden. Entsprechend den FLAG-YadA-Konstrukten, wurde eine YadA-Mutante konstruiert, bei der die *linker*- und Ankerbereich deletiert wurden (YadA $_{\Delta 335-422}$). Es konnten nun mittels der eingebrachten *Sac*-Schnittstellen vier Ankerhybridkonstrukte konstruiert werden, bei denen der *linker*- und Ankerbereich des YadA durch die der von UspA1, Hia und EibA sowie, als Positivkontrolle, durch YadA selber ersetzt wurden. Die Klonierungen wurden in *E. coli* durchgeführt (Vektor pUC-A1) und dann in WA-pYVO8-A0 transferiert. Es wurden folgende Stämme hergestellt: WA(pYVO8-A-YadA-UspA1_A) (entspricht pYV-A1 $_{\Delta 335-422}$ -UspA1₈₂₃₋₉₁₃), WA(pYVO8-A-YadA-EibA_A) (entspricht pYV-A1 $_{\Delta 335-422}$ -EibA₄₁₇₋₅₀₄), WA(pYVO8-a-YadA-YadA_A) (entspricht pYV-A1 $_{\Delta 335-422}$ -YadA₃₃₅₋₄₂₂) sowie WA(pYVO8-a-YadA-Hia_A) (entspricht pYV-A1 $_{\Delta 335-422}$ -Hia₁₀₁₀₋₁₀₉₈). Alle Plasmidkonstrukte wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

3.2.2 Expression der YadA-Ankerhybride in WA(pYVO8-A0)

Alle konstruierten Ankerhybriden zeigten ein dem YadA-Wildtyp ähnliches Expressionsverhalten. Bezüglich der Stabilität besteht jedoch eine gewisse Varianz der Konstrukte. Während bei Yad-A-Wildtyp und YadA-EibA_A bis YadA-Hia_A selbst bei 10 minütigem Kochen der Proben bei 100°C noch Oligomere YadA-Formen nachgewiesen werden konnten, konnte YadA-Hia_A nur noch als Monomer nachgewiesen werden.

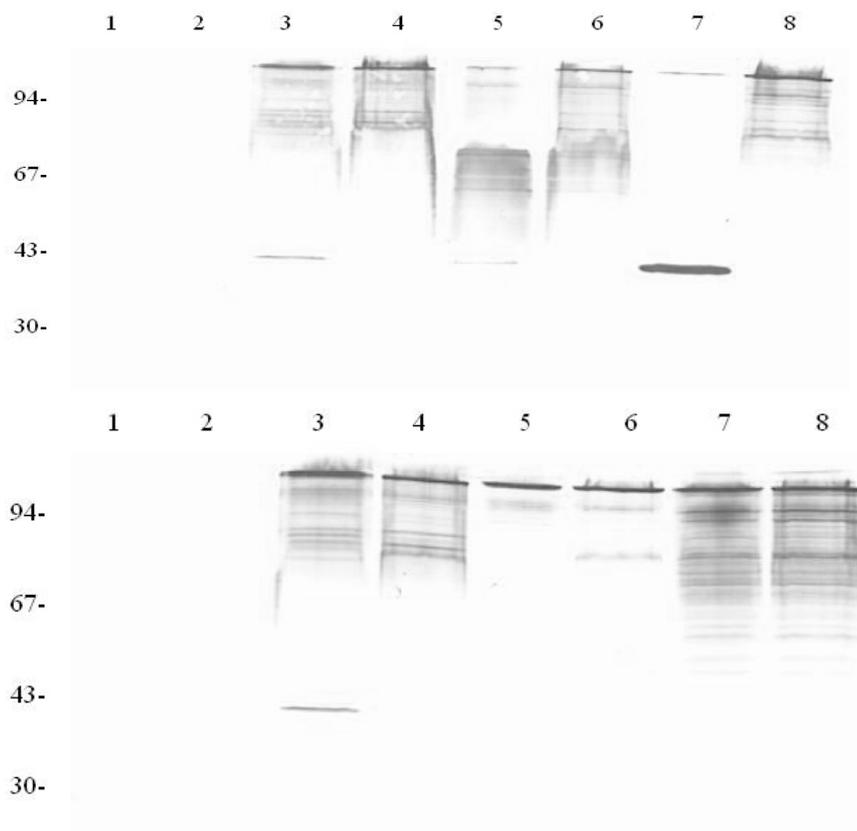


Abb. 19: Zellysate mit YadA-Ankerhybriden; Westernblot entwickelt mit monoklonalem Antikörper AK 8D1; Die Proben wurden bei 37°C/60min. und 100°C/10min. solubilisiert; Spur 1 und 2: Negativkontrolle

1	WA(pYVO8-A0)	100°C	9	WA(pYVO8-A0)	100°C
2	WA(pYVO8-A0)	37°C	10	WA(pYVO8-A0)	37°C
3	WA(pYVO8-A1)	100°C	11	WA(pYVO8-A1)	100°C
4	WA(pYVO8-A1)	37°C	12	WA(pYVO8-A1)	37°C
5	WA(pYVO8-A-YadA-YadA _A)	100°C	13	WA(pYVO8-A-YadA-EibA _A)	100°C
6	WA(pYVO8-A-YadA-YadA _A)	37°C	14	WA(pYVO8-A-YadA-EibA _A)	37°C
7	WA(pYVO8-A-YadA-UspA1 _A)	100°C	15	WA(pYVO8-A-YadA-Hia _A)	100°C
8	WA(pYVO8-A-YadA-UspA1 _A)	37°C	16	WA(pYVO8-A-YadA-Hia _A)	37°C

3.2.3 Transport der Yad-A-Ankerhybride in die äußere Membran

Um nachzuweisen, ob die YadA-Ankerhybride in der äußeren Membran von *Yersinia enterocolitica* eingebaut werden, wurden Westernblots mit bakterieller Außenmembran durchgeführt und die YadA-Hybridkonstrukte mittels Antikörper nachgewiesen.

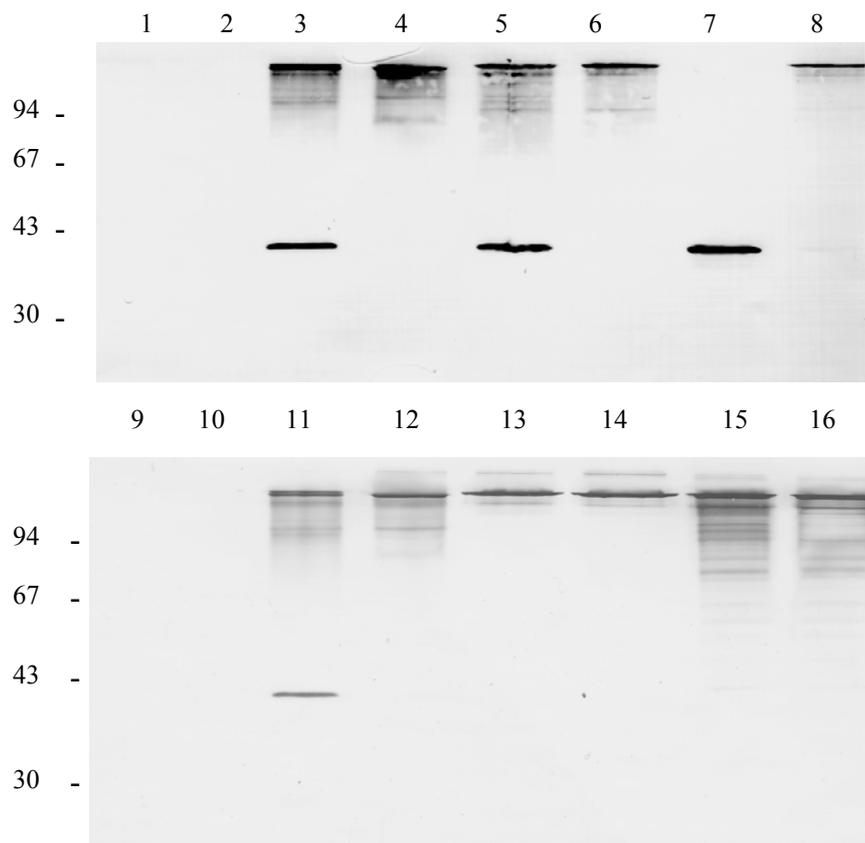


Abb. 20: Außenmembranpräparationen mit YadA-Ankerhybriden; Westernblot entwickelt mit monoklonalem Antikörper AK 8D1; Die Proben wurden bei 37°C/60min. und 100°C/10min. solubilisiert; Spur 1 und 2: Negativkontrolle

1	WA(pYVO8-A0)	100°C	9	WA(pYVO8-A0)	100°C
2	WA(pYVO8-A0)	37°C	10	WA(pYVO8-A0)	37°C
3	WA(pYVO8-A1)	100°C	11	WA(pYVO8-A1)	100°C
4	WA(pYVO8-A1)	37°C	12	WA(pYVO8-A1)	37°C
5	WA(pYVO8-A-yadA-YadA _A)	100°C	13	WA(pYVO8-A-YadA-EibA _A)	100°C
6	WA(pYVO8-A-yadA-YadA _A)	37°C	14	WA(pYVO8-A-YadA-EibA _A)	37°C
7	WA(pYVO8-A-YadA-UspA1 _A)	100°C	15	WA(pYVO8-A-YadA-Hia _A)	100°C
8	WA(pYVO8-A-YadA-UspA1 _A)	37°C	16	WA(pYVO8-A-YadA-Hia _A)	37°C

Alle Konstrukte wurden in der äußeren Membran mittels Westernblot nachgewiesen. Auffällig sind die Stabilitätsunterschiede für Oligomerbildung. Während das YadA-UspA1-Hybrid nach Inkubation bei 100°C komplett in Monomere zerfällt, sind die Oligomere von YadA-Hia- und das YadA-EibA-Hybrid stabiler. Dies entspricht den Ergebnissen der Zellysat-Westernblots und bestätigt die Unterschiede bezüglich der Oligomerstabilität.

3.2.4 Nachweis der YadA-Ankerhybrid-Proteine auf der Oberfläche der Außenmembran von *Y. enterocolitica*

Um nachzuweisen, ob der N-terminale YadA-Anteil der Hybridproteine extrazellulär liegt und seine Bindungseigenschaften weiterhin vermittelt, wurden unterschiedliche Verfahren angewandt. (I) Autoagglutination in Kochsalzlösung, (II) Agglutinationsversuche der Bakterien auf Objektträgern zum Nachweis von Antikörperagglutination mit dem Antiserum anti-P1-O8 und (III) Immunfluoreszenztests der intakten Yersinien mit Anti-P108 (Tabelle 4).

Tabelle 4: Nachweis der Oberflächenexposition der YadA-Hybridemittels Autoagglutination, P1-O8-Antikörperagglutination und Immunfluoreszenz

Stamm	(I): Autoagglutination in NaCl	(II): Agglutination mit Anti-P108	(III): Immunfluoreszenz mit Anti-P108
WA(pYV-A0) (Negativkontrolle)	-	-	-
WA(pYV-A-1) (YadA)	+	+	+
WA (pYVO8-A-YadA-UspA1 _A)	-	+	+
WA (pYVO8-A-YadA-EibA _A)	+	+	+
WA (pYVO8-A-YadA-YadA _A)	+	+	+
WA (pYVO8-A-YadA-Hia _A)	+	+	+

Die Ergebnisse zeigen, dass trotz erheblicher Unterschiede in der Aminosäuresequenz alle YadA-Ankerhybride in der äußeren Membran der Yersinien eingebaut und an der

Oberfläche präsentiert werden. Allerdings weisen die Hybridproteine ein unterschiedliches Verhalten bei den Autoagglutinationsversuchen auf. Das UspA1-Hybrid A-A1 erweist sich, genau wie die Negativkontrolle, als Autoagglutinationsnegativ. Alle Hybride agglutinieren in Gegenwart von Anti-P108 und reagieren im indirekten Immunfluoreszenztest mit Anti-P108 positiv. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass alle YadA-Ankerhybride in die äußere Bakterienmembran eingebaut werden und der N-terminale Anteil von YadA exponiert wird. Die C-terminale Translokator-domäne von UspA1 scheint jedoch einen Einfluß auf die Struktur der N-terminalen Kopfdomäne zu haben. Dies wird besonders in den Untersuchungen zur Autoagglutination deutlich.

3.2.5 YadA-Ankerhybrid-abhängige Serumresistenz

Die Serumresistenz von *Y. enterocolitica* wird durch YadA vermittelt (Heesemann & Grueter, 1987). Es stellt sich die Frage, ob auch die in ihrer Ankerbeschaffenheit veränderten YadA-Hybride die Serumresistenz beeinflussen. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Serum-Resistenztestung (50% Humanserum) für die verschiedenen Hybride zusammengestellt (90 Minuten/37°C Inkubation).

Tabelle 5: Überlebensraten der Yersinien-Stämme WA im 50% Human-Serumpool bei 37°C.

Stamm	Überleben (%) nach 90 minütiger Inkubation
WA(pYV-A0) (Negativkontrolle)	3+/-22
WA(pYV-A1) (YadA)	251+/-30
WA (pYVO8-A-YadA-UspA1 _A)	1+/-13
WA (pYVO8-A-YadA-EibA _A)	84+/-47
WA (pYVO8-A-YadA-YadA _A)	217+/-69
WA (pYVO8-A-YadA-Hia _A)	27,8+/-24,4

Es zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Ankerhybriden. Der Stamm mit dem rekonstruierten YadA weist, wie erwartet, ähnliche Werte wie die Positivkontrolle WA(pYV-A1) auf. Im Vergleich zu WA(pYV-A1) zeigte das YadA-EibA-Hybrid eine reduzierte Serumresistenz (84+/-47% Überlebensrate). Die Überlebensrate liegt prozentual aber deutlich über denen der YadA-Hia und YadA-UspA1-Hybride. Auch der YadA-Hia-Hybrid-Stamm liegt in der Serumresistenz zwischen dem YadA-EibA- und dem YadA-UspA1- Hybrid-Stamm. Das YadA-

UspA1-Hybrid zeigt ein Serumresistenzmuster, das vergleichbar zur Negativkontrolle ist. Dieses Hybrid scheint die Fähigkeit verloren zu haben Resistenz zu vermitteln, entsprechend einer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von lediglich noch 16%.

3.2.6 Adhärenzverhalten der *Yersinien*-Stämme mit YadA-Ankerhybrid-Proteinen

YadA vermittelt Adhärenz zur extrazellulären Matrix und zu epithelialen Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass für die Fähigkeit zur Adhärenz die globuläre Kopfdomäne verantwortlich ist (El Tahir et al., 2000; Roggenkamp et al., 1996; Tamm et al., 1993). Um die Auswirkungen des Austausches von Anker- und Linkerregion auf die Bindungseigenschaften von YadA zu untersuchen und damit Rückschlüsse auf veränderte strukturellen Eigenschaften des YadA-Hybride schließen zu können, wurden die Stämme auf ihre Fähigkeit an (I) HeLA-Zellen und (II) immobilisiertes Kollagentyp I zu binden untersucht. Die Ergebnisse zeigen Abb. 21 und 22.

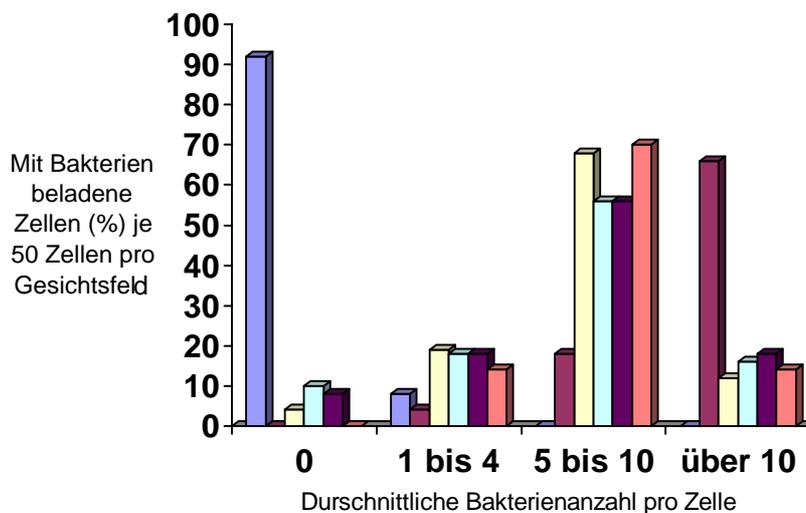


Abb. 21: Zelladhärenztest der Ankerhybride (WA-pYVO9-A0): Bindung an HeLA-Zellen; Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl von an Zellen haftenden Bakterien bei einer betrachteten Gesamtzellzahl von 50 Zellen; Die Zellen wurden von drei unabhängigen Untersuchern mikroskopisch gezählt; bei einer Streubreite <1% des Mittelwerts wurde auf die Abbildung der Streuung verzichtet; Blaue Säule: WA(pYVO8-A0), gelbe Säule: WA(pYVO8-A-YadA-UspA1_A), türkise Säule: WA(pYVO8-A-YadA-EibA_A), lila Säule: WA(pYVO8-A-YadA-YadA_A), hellrote Säule: WA(pYVO8-A-YadA-Hia_A), weinrote Säule: WA(pYVO8-A1)

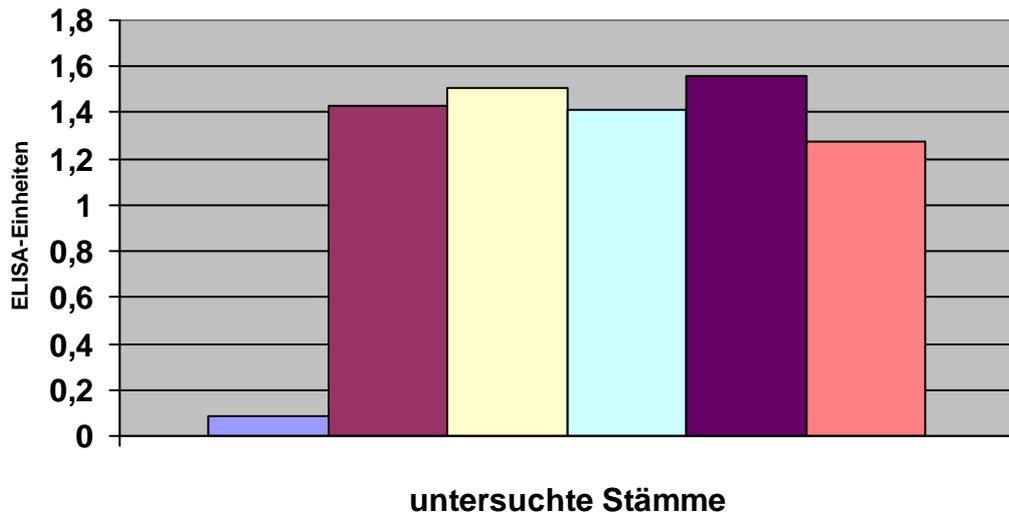


Abb. 22: Bindung der Ankerhybride (WA-pYVO9-A0) an immobilisiertes Kollagen TypI (Mikrotiterplatte/Elisa-Technik); Blaue Säule: WA(pYVO8-A0), gelbe Säule: WA(pYVO8-A-YadA-UspA1_A), türkise Säule: WA(pYVO8-A-YadA-EibA_A), lila Säule: WA(pYVO8-A-YadA-YadA_A), hellrote Säule: WA(pYVO8-A-YadA-Hia_A), weinrote Säule: WA(pYVO8-A1); ELISA-Einheit: Extinktion des umgesetzten Substrats bei 405 nm im Photometer gegen einen Leerwert.

Obwohl Unterschiede in der Zelladhäsion feststellbar sind, bleibt die Fähigkeit zur Zelladhärenz und zur Bindung an Kollagen bei allen Yad-Hybrid-produzierenden Yersinien erhalten.

4 Diskussion

Eine Gruppe von äußeren Membranproteinen bei Gram-negativen Bakterien, die als trimere Autotransporter (TypV Sekretionssystem) nicht fimbrielle Adhäsine an der Oberfläche exponieren, gehören der Oca (*oligomeric-coiled-coil-adhesions*)-Familie an. Bei humanpathogenen Erregern können diese Adhäsine zur Virulenz beitragen. Ein gemeinsames strukturelles Merkmal ist der Membrananker. Dieser ist verantwortlich für den Transport und die 3-dimensionale Struktur (Oligomerisierung) der Proteine. An YadA, dem Prototyp der Oca-Gruppe, sollte der Membrananker, dessen genaue Struktur unbekannt ist, untersucht werden. Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen ließen vermuten, dass der C-Terminus aus einem 4 Transmembrandomänen umfassenden Ankerbereich und einem helikalen *linker*-Bereich, der die Verbindung zur N-terminalen Passagierdomäne herstellt, besteht. Nach wie vor unklar war die genaue Orientierung des Ankers in der bakteriellen Außenmembran, sowie Oligomerisierungs- und Transportmechanismen. Ziel der Arbeit war es daher, Aussagen über die Topologie sowie über den Transport und die Oligomerisierung des Membransankers machen zu können.

(I) YadA-FLAG-Konstrukte. Mit den FLAG-Konstrukten sollte untersucht werden, welcher Teil des Membransankers extrazellulär präsentiert wird (siehe hierzu auch Abb.11, Seite 54). Von Vorarbeiten war bekannt, dass die Aminosäure an Position 330 (Übergang *stalk-linker*-bereich) extrazellulär liegt, während die Aminosäure an Position 352 nicht mehr extrazellulär nachweisbar war. Bei den Versuchen mit den YadA-FLAG-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass der *linker*-Bereich vermutlich in seiner vollen Länge innerhalb der Transmembranpore, die die 4 amphiphatischen transmembranösen β -Faltblätter des Ankers bilden, liegt. Es wurden insgesamt drei neue Konstrukte erstellt (WA(pYVO8-A-HNS4.1-FLAG) entspricht Flag2 in Abb.11, WA(pYV-O8-A-HNSL6-FLAG) entspricht Flag4, WA(pYVO8-A-1267-FLAG) entspricht Flag4. Diese wurden mit Konstrukten der Vorgängerarbeit (Ackermann 2005) verglichen (WA(pYVO8-A-HNS4-FLAG) entspricht Flag1, WA(pYVO8-A-HNSL5-FLAG) entspricht Flag5). Dabei wurden auf verkürzte *linker*-Bereiche FLAG-Erkennungssequenzen ligiert, mit deren Hilfe die extrem verkürzten Yad-Varianten nachgewiesen werden sollten. In den Expressionsstudien mittels Westernblot, bei denen die Zellsate aufgetragen wurden, konnten die Stämme, die noch Anteile des *linker*-Bereiches besitzen (WA(pYVO8-A-HNS4-FLAG), WA(pYVO8-A-HNSL5-FLAG), WA(pYVO8-A-HNSL4.1-FLAG)), eindeutig nachgewiesen werden, sowohl

mit dem YadA spezifischem Peptid-Antiserum AK 14 als auch mit dem FLAG-Antikörper. Die Stämme WA(pYVO8-A-HNSL6-FLAG) sowie das ungekürzte WA(pYVO8-A-1267-FLAG) konnten weder mit FLAG-Antikörper noch mit AK14-Antiserum nachgewiesen werden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass diese YadA-Konstrukte nicht ausreichend produziert werden, oder zwar produziert, aber nach Transport durch die innere Membran im Periplasma von den dort vorkommenden Proteasen degradiert werden. Im Gegensatz dazu konnten alle YadA-Stämme, deren Verkürzungen im *linker*-Bereich sich auf das erste Heptamer beschränken, (A-HNS4-FLAG, A-HNSL4.1-FLAG, A-HNSL5-FLAG) im Zellysate und auch in der Außenmembranpräparation nachgewiesen werden (siehe dazu auch Roggenkamp et al. 2003, Ackermann 2005). In den Immunfluoreszenztests konnte jedoch nur WA(pYVO8-A-HNS4-Flag) nachgewiesen werden, was für die Exposition des FLAG-Epitops spricht (Abb.11, Flag1). Es handelt sich hierbei um das Konstrukt, das noch einen vollständigen *linker*-Bereich enthält (Flagepitop bei AS 330) und dessen FLAG-Erkennungssequenz direkt vor dem ersten Heptamer des *linker*-Bereiches liegt. Die beiden anderen Konstrukte innerhalb des ersten Heptamers (Flagepitop bei AS 342 und AS 353) waren in der Immunfluoreszenz negativ. Dies spricht dafür, dass das Epitop nicht exponiert ist. Wie oben schon erwähnt, sind beide Epitope jedoch eindeutig in der Außenmembran mittels Immunoblot nachweisbar. Daraus können wir schließen, dass der *linker*-Bereich nahezu vollständig in der äußeren Membran lokalisiert ist.

(II) Cystein-Scanning Mutagenese. Ziel der Cystein-Scanning Mutagenese war es, vergleichbar zu den FLAG-Konstrukten, Aussagen über an der Außenmembran exponierte N-terminale Bereiche vom Membrananker (*linker*- und Ankerbereich) nachzuweisen. Hierzu wurden Punktmutationen in bestimmten Codon der ankerkodierenden Sequenz durchgeführt, um Serin- gegen Cysteinreste auszutauschen, die dann mit Biotinmaleimide konjugiert und mit Streptavidin nachgewiesen wurden. Dieser Nachweis gelang jedoch nicht. Möglicherweise ließen sich die Cystein-markierten YadA-Proteine nicht eindeutig markieren, weil andere Äußere-Membranproteine mit ihren reaktiven Cysteinresten der genetisch veränderten YadA-Mutanten zahlenmäßig überlegen waren. Es wäre durchaus denkbar, dass die reaktiven Nachweisreagenzien weniger an YadA-Cysteine sondern bevorzugt an verschiedene äußere Membranproteine gebunden haben. Für eine derartige Annahme spräche auch der starke Hintergrund in den meisten Western-Blots nach Streptavidinmarkierung. Es erscheint jedoch auch plausibel, dass die verkürzten YadA-Moleküle in der äußeren

Membran stabile, durch Mercaptoethanol nicht zu reduzierende bzw. spaltende Cysteinthioätherbrücken bilden, die damit einer Reaktion mit Biotinmalleimiden nicht zugänglich sind.

(III) YadA-Ankerhybridproteine. YadA-Hybridproteine wurden konstruiert durch Austausch des *linker*- und Ankerbereichs von YadA durch homologe Domänen der Oca-Proteine UspA1 (*Moraxella cattarhalis*), Hia (*Hämophilus influenzae*) und EibA (*Escherichia coli*). Aufschlüsse über Oligomerisierung und Transport in die äußere Membran von *Yersinia enterocolitica* sollten über die in den dafür maßgeblichen Bereichen (*linker*- und Ankerbereich) gewonnen werden. Die Ergebnisse der Versuche mit den YadA-Ankerhybridproteinen zeigen, dass es trotz erheblicher Unterschiede in der Aminosäuresequenz der ausgetauschten Abschnitte (verglichen mit der *linker*- und Ankeraminosäuresequenz von YadA hat EibA 40%, Hia 26% und UspA1 16% Sequenzhomologie) zum Transport und zur Integration der YadA-Hybridproteine in die äußere Membran kommt, ebenso wie zur Präsentation der YadA-Passagierdomäne an der Membranoberfläche. Im Westernblot konnten für die YadA-Hybridproteine gleiche elektrophoretische Mobilitäten und Größenverhältnisse wie für Wildtyp YadA nachgewiesen werden, was auf gleiche Oligomerisierung (Trimer) hinweist. Außerdem konnte das Vorhandensein der Proteine an der bakteriellen Aussenmembran durch Außenmembranpräparationen, Agglutinationsversuch mit YadA-spezifischen Antiserum P1-O8 sowie mit indirekten Immunfluoreszenztests nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die 4 Autotransporterdomänen von YadA, UspA1, Hia und EibA auch funktionell verwandt sind und die Passagierdomäne (N-terminales YadA) nicht diskriminieren. Roggenkamp et al. (2003) vermuteten, dass der *linker*- und Ankerbereich zum Transport der Passagierdomäne durch die äußere Membran verantwortlich sind, aber auch beim Einbau in die äußere Membran und auch bei der Oligomerisierung eine wichtige Rolle spielen. Da dies auch trotz Austausch der beiden Domänen mit denen der 3 anderen Oca-Proteinen gelang, ist es wahrscheinlich, dass alle 4 Oca-Proteine strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind, nämlich aus einem linkshändigen *coiled-coil*-Segment (*linker*-Bereich) und 4 amphiphatischen transmembranösen β -Faltblättern. Surana et al. (2004) konnte nachweisen, dass *coiled-coil*-Abschnitte für eine regelhafte Oligomerisierung und Präsentation der Passagierdomäne nicht zwingend notwendig sind. Da das YadA-Hia-Hybrid ebenfalls Trimere bildet, kann angenommen werden, dass die *coiled-coil* Abschnitte im *linker*-Bereich keine wichtige Rolle für die Oligomerisierung spielen. Denkbar ist aber auch, dass die Anzahl der Monomere aus dem das oligomere Adhäsion

gebildet wird, bei allen 4 Proteinen gleich sein sollte. Roggenkamp et al. (2003) folgerten aus ihren Versuchen, dass es sich bei YadA um ein Homotrimer handeln muss, ähnliches vermuteten Sandt und Hill (1999) für EibA sowie Surana et al. (2004) für Hia. Cope et al. (1999) schlossen aus Westernblots von UspA1 und UspA2, dass auch diese Proteine ein oligomeres Adhäsins bilden. Es ist also wahrscheinlich, dass alle 4 Oca-Proteine aus Homotrimeren gebildet werden. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass als zweite Untergruppe der Oca-Familie auch tetramere Adhäsine vorkommen können

Neben dem Nachweis der chimären Proteine im Westernblot, wurden auch funktionelle Tests durchgeführt, da Eigenschaften wie Serumresistenz oder Adhärenz von einer korrekten 3-dimensionalen Struktur abhängig sein sollten. Die vier Oca-Proteine produzierenden Yersinienstämme wurden im Hinblick auf Autoagglutination, Serumresistenz, Bindung an Kollagen und HeLa-Zellen sowie Hitzestabilität der Oligomere (100°C für 10 Minuten) untersucht. Die Bindungseigenschaften an Kollagen und HeLa-Zellen waren bei allen 4 Stämmen vergleichbar. Tahir et al. (2000) forderten als Bedingung für die Kollagenbindung eine bestimmte, nicht näher beschriebene dreidimensionale Anordnung des YadA-Proteins. Roggenkamp et al. (2003) konnten zeigen, dass für beide Eigenschaften, Kollagenbindung und Zelladhärenz, Kopf- und *neck*-Bereich wichtig sind. Deshalb kann angenommen werden, dass beide Bereiche bei den Hybridproteinen entsprechend dem Wildtyp ausgebildet wurden. Die Vermutung, dass die Struktur der Hybridproteine der des kompletten YadA-Trimers ähnelt, wird so bestätigt. Auch waren die Stämme, die YadA-EibA- oder YadA-Hia-Hybridproteine produzierten, zur Autoagglutination fähig. Interessanterweise erwies sich der das YadA-UspA1-Hybrid produzierende Stamm als agglutinationsnegativ. Da dieser Stamm aber zur Kollagenbindung und zur Zelladhärenz fähig war, könnte der Verlust der Autoagglutination ein Hinweis für eine durch das Hybridprotein-bedingte Strukturveränderung des Adhäsins sein.

Daneben ist auch das abweichende Verhalten der Konstrukte bei der Vermittlung von Serumresistenz auffallend. Keiner der YadA-Hybridprotein-produzierender Stämme war in der Lage, bei Exposition mit humanem Serum ähnliche hohe Überlebenseigenschaften zu zeigen, wie der YadA-produzierende Stamm. Roggenkamp et al. konnten der Eigenschaft Serumresistenz keinen spezifischen Bereich in YadA zuordnen, sondern sie vermuteten, dass allein die Länge des YadA-Proteins (23nm) dafür verantwortlich ist, wobei sie eine Mindestlänge von 13nm für den exponierten Teil

des YadA-Adhäsins forderten. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass der Austausch der *linker*- und Ankerbereiche einen Einfluss auf die Proteinstruktur im *stalk*-Bereich hat, denn Transport, Oligomerisierung sowie Faltung von Kopf- und *neck*-Bereich scheinen dem Wildtyp-YadA zu entsprechen. Diese Strukturveränderungen hätten Einfluss auf die Serumresistenz, setzten sich aber nicht in den für das Adhärenzverhalten mitverantwortlichen *neck*-Bereich fort. Roggenkamp et al. (2003) zufolge müsste dies zumindest bei dem UspA1-Hybrid, das einen Serumresistenzgrad ähnlich des YadA-negativen Stammes aufwies, eine signifikante Verkürzung des *stalk*-Bereiches. Tatsächlich konnte Hoiczky et al. 2000 nachweisen, dass sich der *stalk*-Bereich von UspA1 sowie von UspA2 von dem des YadA hinsichtlich der *coiled-coil*-Struktur unterscheidet. Im Vergleich zum YadA-*stalk*, bei dem eine Windungslänge von 3,75 Aminosäuren pro Windung mit einer rechtsgerichteten Drehrichtung besteht, sind es bei UspA1 und UspA2 3,52 Aminosäuren bei einer linksgerichteten Drehrichtung. Eine Störung in der *stalk*-Konformation erscheint in Anbetracht dieser Tatsachen als möglich. Eventuell hätte diese Störung, die bei dem UspA1-Hybrid vermutlich am stärksten ausgeprägt ist, auch Einfluss auf die Fähigkeit zur Autoagglutination. Ungewöhnlich wäre, dass eine derartige deformierte Passagierdomäne, wie sie die Ergebnisse bei diesem Hybrid vermuten lassen könnten, überhaupt zur Passage der äußeren Membran befähigt ist. Vorstellbar ist jedoch, dass die Oligomerisierung der Passagierdomäne mit Ausbildung der endgültigen Struktur erst nach Passage durch die Membranpore stattfindet, der Ablauf der Oligomerisierung also von C-terminal nach N-terminal fortschreitet. So ließe sich erklären, dass eine vermutlich im Bereich des C-terminalen *stalk*-Abschnitts strukturell deformierte Passagierdomäne mit einer nicht unerheblichen Verkürzung, einerseits die Membranpore passieren, andererseits aber Kopf- und *neck*-Bereiche ausbilden kann, welche zwar nicht zur Autoagglutination, wohl aber zur Bindung an Kollagen und HeLa-Zellen in der Lage sind. Auch Kostakioti und Stathopoulos gehen grundsätzlich von einer Oligomerisierung und Faltung der Passagierdomäne von C- nach N-terminaler Richtung aus (Kostakioti and Stathopoulos, 2006). Sie beschreiben insgesamt vier verschiedene denkbare und bereits diskutierte Mechanismen, wie der Transport und die Faltung von statten gehen könnte: das „Hairpin“-Modell, das „Threading“-Modell („Einfädeln“) und das „Multimeric“-Modell, bei denen nicht von einer strikten C-nach N-terminal gerichteten Faltung oder Strukturbildung ausgegangen werden kann (für das „Threading“-Modell wird gar die umgekehrte Richtung vermutet) sowie das „Omp85“-Modell, bei dem tatsächlich von

einer streng C- nach N-terminal gerichteten Proteinfaltung ausgegangen wird. Omp85 ist ein Protein in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, das, so wird vermutet, in seiner Funktion eine Art Chaperon für Autotransporter darstellt, indem es beim Einbau in die äußere Membran, beim Falten und Oligomerisieren des Autotransporters eine wichtige Rolle spielt (Gentle et al., 2005). Ob ein Omp85-homologes Protein auch für die Membranintegration von YadA eine Rolle spielt, bleibt zu prüfen.

Die Tatsache, dass sowohl das YadA-Hia- als auch das YadA-EibA-Hybrid die Überlebenszeit der Yersinien bei Serumexposition im Vergleich zur YadA-negativen Kontrolle verlängern, wenn auch nicht im dem Maße wie der Wildtyp WA(pYV), deutet gemäß dieser Sichtweise darauf hin, dass die Strukturstörungen durch die ausgetauschten *linker*-Ankerbereiche nicht so stark ausgeprägt sind. Dazu würde auch die erhaltene Fähigkeit zur Autoagglutination passen. Die Tatsache jedoch, dass diese Fähigkeit funktionell denselben Bereichen wie Kollagenbindung und Zelladhärenz zugeordnet werden soll, würden dann in Frage gestellt, da die Bindungseigenschaften ja unbeeinflusst blieben.

Die Stabilität der YadA-Oligomere im Westernblot nach 10 minütigen Kochen ist bei keinem der YadA-Hybride mit YadA vergleichbar. Anscheinend haben die *linker*- und Ankerbereiche von Hia, im besonderen aber von EibA eine auf das gesamte Hybridprotein stabilisierenden Einfluss, während die von UspA1 das Oligomer thermisch instabiler machen. Bei den mittels SDS-PAGE durchgeführten Westernblots stellte sich bei dem YadA-EibA-Hybrid gar keine und bei dem YadA-Hia-Hybrid lediglich eine sehr schwache Bande, die der des YadA-YadA-Hybrid-Monomers entspricht, dar (Bande im Bereich 44 kDa). Bei dem YadA-UspA1-Hybrid hingegen konnte nur die Monomerbande nachgewiesen werden. Dies ist für das Wildtyp-UspA1 nicht ungewöhnlich. Schon Cope et al. (1999) beschrieben in ihrer Arbeit das Phänomen, dass Zellysate die bei 37°C solubilisiert wurden, Banden von wesentlich höherem Molekulargewicht (>220 kDa) zeigten und Zellysate die bei 100°C solubilisiert wurden Banden von wesentlich geringerem Molekulargewicht (ca. 120 bis 140 kDa) aufwiesen. Wollmann et al. (2006) postulierten, dass für die Stabilität von YadA ein helikaler Abschnitt verantwortlich sei, der sich vor dem transmembranösen Teil des Ankers befindet und durch Bildung von *coiled-coil*-Strukturen die Autotransporterpore verschließt und so die Stabilität des YadA-Oligomers bedingt. Unsere Ergebnisse bestätigen dies insofern, dass der Anker anscheinend eine zentrale

Rolle in der Oligomerstabilität spielt. Tatsächlich waren die YadA-Eib- und YadA-Hia-Hybride jedoch wesentlich stabiler als das YadA selbst. Es stellt sich also die Frage, ob auch der Hia- und Eib-Autotransporterbereich über entsprechende *coiled-coils* verfügt. Für den Hia-Autotransporterbereich kann mittels des von Lupas entwickelten Programms „Coils“ (Lupas et al., 1991) kein *coiled-coil-Segment* vorhergesagt werden. Dieser negative Befund widerspricht dem von Wollmann postulierten Modell.

5 Zusammenfassung

Nach wie vor spielen die von enteropathogene *Yersinien* hervorgerufenen Erkrankungen eine wichtige Rolle im Bereich der gesamten klinischen Medizin. Neben akuten Erkrankungen (Yersiniosen), die vor allem bei Kleinkindern, alten und abwehrgeschwächten Patienten vorkommen, sind es auch die verschiedenen immunologischen Folgeerkrankungen, wie Arthritiden oder das Reitersyndrom, die im besonderen *Yersinia enterocolitica* in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses rücken und eine molekularbiologische Analyse der Infektionsmechanismen nötig machen. Eine besondere Bedeutung kommt dem hochkonservierte Virulenzplasmid pYV zu, das für ein TypIII- Proteinsekretionssystem und für das Yersinien Adhäsins YadA (Autotransporter, TypV-Sekretionssystem) kodiert. YadA ist der Prototyp einer Gruppe von Autotransportern, deren struktureller Aufbau sich von allen anderen bisher bekannten Autotransporterklassen unterscheidet, vor allem im Bereich des Membranankers, des Teils also, der für den Einbau des Proteins in die Membran, den Transport der funktionellen Domäne durch die Membran, die Oligomerisierung und die Stabilität des Gesamtproteins verantwortlich ist. Auf Grund dieser aus molekularbiologischer Sicht zentralen Rolle, die der Membrananker für das Funktionieren des Adhäsins und Autotransports von YadA spielt, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit mehr über die Topologie und strukturellen Eigenschaften sowie des Oligomerisierungs- und Transportmechanismus dieser C-terminalen Domäne von YadA in Erfahrung zu bringen. Der Membrananker selbst besteht aus vier C-terminalem β -Faltblättern (Anker-Bereich) sowie dem N-terminalen *linker*-Bereich, der Verbindung zur funktionellen Passagierdomäne herstellt. In den *linker*-Bereich von N-terminal verkürzten YadA-Mutanten wurden FLAG-Sondensequenzen inkloniert, die mit speziell an diese FLAG-markierten Bereiche bindenden monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden können und so eine Aussage über extrazelluläre oder intrazelluläre lokalisierte Domänen möglich machen. Die Ergebnisse dieser Versuche legen nahe, dass nahezu der gesamte *linker*-Bereich innerhalb der Membran, also der vom Ankerbereich gebildeten transmembranösen Pore, befindet. Weiterhin wurde versucht, mittels Cystein-Scanning-Mutagenese die FLAG-Experimente zu bestätigen, was nicht gelang, weil die eingefügten Cysteinreste in YadA nicht spezifisch mit Biotinmalleimid reagierten. In einem weiteren Versuch wurde der gesamte YadA-Membrananker gegen Membrananker anderer Mitglieder der Oca-Familie (UspA1 von *Moraxella catarrhalis*, EibA von *Escherichia coli*, Hia von *Haemophilus influenza*)

ausgetauscht. Es stellte sich heraus, dass alle so hergestellten YadA-Hybridproteine exprimiert und an der Bakterienoberfläche exponiert werden. Jedoch zeigten sich Unterschiede bei der Funktionalität der Hybridadhäsine, vor allem in der Serumresistenz, der Autoagglutination und der Oligomerenstabilität.

Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen das bestehende Modell des YadA-Membranankers als Autotransporter und unterstützen die Einteilung von YadA, EibA, UspA1 und Hia in eine einheitliche Klasse von Autotransportern, die als Oca-Familie bezeichnet wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die N-terminale YadA-Passagierdomäne von unterschiedlichen Autotransporterdomänen über die äußere Bakterienmembran transloziert wird.

6 Literaturverzeichnis

1. **Ackermann, N.**, 2005, Das *Yersinia*-Adhäsın YadA, ein oligomerer Autotransporter als Prototyp der Oca-Familie - eine molekulare Struktur- und Funktionsanalyse - .Dissertationsarbeit an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
2. **Aebi, C., E.r.Lafontaine, L.D.Cope, J.L.Latimer, S.L:Lumbley, G-H.McCracken, Jr., and E.J.Hansen.** 1998. Phenotypic effect of isogenic usp A1 and usp A2 mutations on *Moraxella catarrhalis* O35E. Infect.Immun.; **66**: 3113-3119
3. **Ausubel, F.M., R.Brent, R.E.Kingston, D.D.Moore, J.G.Seidmann, J.A.Smith, and K.Struhl.** 1989. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
4. **Barenkamp, S.J., and J.W.ST.Geme III.** 1996. Identifaction of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. Mol.Microbiol.; **19**: 1215-1223
5. **Bölin, I., Norlander, L., Wolf-Watz, H.** 1982: Temperature-inducible outer membraneprotein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. Infect. Immun.; **37**: 506-512
6. **Bos, C., Lorenzen, D., Braun, V.** 1998. Specific In Vivo Labelling of Cell Surface-Exposed Protein Loops: Reactive Cysteines in the Predicted Gating Loop Mark a Ferrochrome Binding Site and a Ligand-Induced conformatial Change of the Escherichia coli FhuA Protein, Journal of Bacteriology; **180**: 605-613
7. **Bottone, E. J.** 1997: *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin. Microbiol. Rev.; **10**: 257-276
8. **Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D. & Deisenhofer, J.** 1999 Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from eschericia coli, Nat. Struct.Biol.; **6**: 56–63
9. **Brem, D., Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi C.A., Heesemann J.** 2001. Functional analysis of *yersiniabactin* transport genes of *Yersinia enterocolitica*. Pathogenicity and Medical Microbiology.; **147**:1115-1127
10. **Comanducci, M., Bambini, S., Brunelli, B., Adu-Bobie, J., Arico, B., Capecchi, B., Giuliani, M. M., Massignani, V., Santini, L., Savino, S., Granoff, D. M., Caugant,**

- D. A., Pizza, M., Rappuoli, R., Mora, M.** 2002: NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med.*; **195**: 1445-1454
11. **Cope, L.D., E.R.Lafontaine, C.A. Slaughter, C.A.Hasemann, Jr., C. Aebi, F.W.Henderson, G.H.McCracken, Jr., and E.J.Hansen.** 1999. Characterization of the *Moraxella catarrhalis* uspA1 and uspA2 genes and their encoded products. *J.Bacteriol.*; **181**: 4026-4034
12. **Cornelis, G. ,Laroche Y, Balligand G, Sory MP, Wauters, G.** 1987.*Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness.*Rev. Infect. Dis.*; **9**: 64-87
13. **Cornelis, G.R., A.Boland, A.P.Boyd, C.Geuijen, M.Iriarte, C.Neyt, M.P. Sory, and I.Stainier.** 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*; **62**: 1315-1352
14. **Cover, T. L., Aber, R. C.** 1989: *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.*; **321**: 16-24
15. **Daniels, JJHM.** 1963. Untersuchungen an als *Pasteurella pseudotuberculosis* diagnostizierten Stämmen von Chinchillas. *Zentralbl. Veterinaermed.* **10**: 413-417
16. **Delor, I., Cornelis, G. R.** 1992: Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimentalinfection of young rabbits. *Infect. Immun.*; **60**: 4269-4277
17. **Elkins, C., K.J.Morrow, Jr. and B.Olsen.** 2000. Serum resistance in *Haemophilus ducreyi* requires outer membrane protein DsrA. *Infect.Immun.*; **68**: 1608-1619
18. **Ell, SR.** 1984. Immunity as a factor in the epidemiology of the medieval plague. *Rev. Infect. Dis.*; **6**: 866-879
19. **El Tahir, Y., P.Kuusela, and Mskurnik.** 2000. Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identifaction of eight NSVAIG-S motifs in the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. *Mol.Microbiol.*; **291**:209-218
20. **El TahirY. and M.Skurnik.** 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int.J.Med.Microbiol.*; **291**: 209-218
21. **Emödy, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skurnik, M., Kapperud, G., O'Toole, P., Wadstrom, T.** 1989: Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for YopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J. Bacteriol.*; **171**: 6674-6679
22. **Ewing, WH, Ross, AJ, Brenner, DJ, Fanning, GR.** 1978. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. *Int. J. syst. Bacteriol.*; **28**: 37-44
23. **Ferguson, AD, Hofmann, E, Coulton, JW, Diederichs, K, Welte, W.** 1998: Siderophore-Mediated Iron Transport: Crystal Structure of FhuA with Bound Lipopolysaccharide. *Science*; **282**: 2215-2220

24. **Flügel, A., Schulze-Koops, H., Heesemann, J., Kuhn, K., Sorokin, L., Burkhardt, H., von der Mark, K., Emmrich, F.** 1994: Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J. Biol. Chem.*; **269**, 29732-29738
25. **Gentle, I.E., Burri, L., Lithgow, T.** 2005: Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Molecular Microbiology*; **58**, 1216-1225
26. **Gripenberg-Lerche, C., Skurnik, M., Toivanen, P.** 1995: Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: experimental studies with rats. *Infect Immun.*; **63**: 3222-3226
27. **Hanahan D.** 1983: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*; **166**: 557-580
28. **Henderson, IR, Navarro-Garcia, F, Desvaux, M, Fernandez, RC, Ala'Aldeen, D.** 2004: Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiology and molecular Biology reviews*; **68**: 692-744
29. **Heesemann, J., 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
30. **Heesemann, J., Keller, C., Morawa, R., Schmidt, N., Siemens, H. J., Laufs, R.** 1983: Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J. Infect. Dis.* ; **147**:107-115
31. **Hof, H., Dörries, R. Müller, R.L. (Hrsg.)** 2000, *Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart: 383-389
32. **Hoicyk, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., Heesemann, J.** 2000: Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.*; **19**: 5989-5999
33. **Kapperud, G., Namork, E., Skarpeid, H. J.** 1985: Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*; **47**, 561-566
34. **Keller, CK., Misra, R.** 2003 Protease-Deficient DegP Suppresses Lethal Effects of a Mutant OmpC Protein by Its Capture, *journal of bacteriology*; **185**: 148-154
35. **Kim, D.S.H., Saier, M.H.** 2006: Protein-Translocating Trimeric Autitransporters of Gram-Negative Bacteria, *Journal of Bacteriology*; **188**: 5655-5667

36. **Köhler, W., Eggers, H.J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H., Pulverer, .G.** (Hrsg.) 2001: Medizinische Mikrobiologie. Urban und Fischer-Verlag, München
Jena: 323-328
37. **Kostakioti, M., Stathopoulos, C.** 2006: Role of the α -Helical Linker if the C-Terminal Translocator in the Biogenesis of the Serine Protease Subfamily of Autotransporters, *Infection and Immunity*; **74**: 4961-4969
38. **Knapp, W., Thal, E.** 1963. Untersuchungen über die kulturell-biochemischen, serologischen, tierexperimentellen und immunologischen Eigenschaften einer vorläufig „Pasteurella X“ benannten Bakterienart. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.*; **190**:472-484
39. **Lee, WH, McGrath, PP., Carter, PH, Eide, EL.** 1977: The ability of some *Yersinia enterocolitica* strains to invade HeLa cells. *Can. J. Microbiol.*; **12**: 1714-22
40. **Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, J.** 1991: Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*; **252**: 1162-1164
41. **Mack, D., Heesemann, J., Laufs, R.** 1994: Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA. *Med. Microbiol. Immunol.* ; **183**: 217-227
42. **Mallassez, L, Vignal, W.** 1883: Tuberculose zooglycique. *Arch. Physiol. Norm. Path.*:369-411
43. **Mantle, M., Basaraba, L., Peacock, S. C., Gall, D. G.** 1989: Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect. Immun.*; **57**: 3292-3299
44. **Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., Tolbert, N. E.** 1978: A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*; **87**: 206-210
45. **Miller, V. L., Mekalanos, J. J.** 1988: A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J. Bacteriol.*; **170**: 2575-2583
46. **Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.** 1986: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* ; **51** : 263-273
47. **Nummelin, H., Merckel, M. C., Leo, J. C., Lankinen, H., Skurnik, M., Goldman, A.** 2004: The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J.*; **23**: 701-711

48. **Oomen , C.J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., tomassen, J., Gros, P.** 2004: Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter, EMBO J.; **23**: 1257-1266
49. **Paerregaard, A., Espersen, F., Jensen, O. M., Skurnik, M.** 1991: Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. Infect. Immun.; **59**: 253-260
50. **Pepe, J. C., Miller, V. L.** 1993: *Yersinia enterocolitica* invasins: a primary role in the initiation of infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 6473-6477
51. **Pilz, D., Vocke, T., Heesemann, J., Brade, V.** 1992: Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. Infect Immun. **60**: 189-195
52. **Ray, S. K., Rajeshwari, R., Sharma, Y., Sonti, R. V.** 2002: A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. Mol. Microbiol.; **46**: 637-647
53. **Robins-Browne, RM, Cianciosi, S, Bordun, AM, Wauters, G.** 1991: Pathogenicity of *Yersinia kristensenii* for mice. Infect. Immun.; **59**: 162-167
54. **Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C. A., Truelzsch, K., Hoffmann, H., Heesemann, J.** 2003: Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. J. Bacteriol.; **185**: 3735-3744
55. **Roggenkamp, A., Neuberger, H. R., Flügel, A., Schmoll, T., Heesemann, J.** 1995: Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. Mol. Microbiol.; **16**: 1207-1219
56. **Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R., Heesemann, J.** 1996: Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. Infect. Immun.; **64**: 2506- 2514
57. **Rosqvist, R., Skurnik, M., Wolf-Watz, H.** 1988: Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. Nature; **334**: 522-524
58. **Sandt, C.H., and C.W.Hill.** 2000: Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. Infect.Immun.; **61**: 2513-2519

59. **Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., Kirsch, T., Swoboda, B., Bull, C., Goodman, S., Emmrich, F.** 1993: Outer membrane protein YadA of enteropathogenic *Yersinia* mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect. Immun.*; **61**: 2513-2519
60. **Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., von der Mark, K., Emmrich, F.** 1992: Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia* to various types of collagen. *Infect. Immun.*; **60**: 2153-2159
61. **Shayegani, M., DeForge, I., McGlynn, DM, Root, T.** 1981: Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal, and environmental sources. *J.Clin.Microbiol.*; **3**: 304-312
62. **Skurnik, M., Bolin, I., Heikkinen, H., Piha, S., Wolf-Watz, H.** 1984: Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J. Bacteriol.*, **158**, 1033-1036
63. **Skurnik, M., Toivanen, P.** 1992: LcrF is the temperature-regulated activator of the YadA gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.*; **174**: 2047-2051
64. **Skurnik, M., Wolf-Watz, H.** 1989: Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol. Microbiol.*; **3**: 517-529
65. **Sory, M. P., Tollenaere, J., Laszlo, C., Biot, T., Cornelis, G. R., Wauters, G.** 1990: Detection of pYV+ *Yersinia enterocolitica* isolates by P1 slide agglutination. *J. Clin. Microbiol.*; **28**: 2403-2408
66. **Surana, N. K., Cutter, D., Barenkamp, S. J., St. Geme, J. W., III.** 2004: The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short, trimeric translocator domain. *J. Biol. Chem.*; **279**: 263-273
67. **Svanborg, C., Ørskov, F., Ørskov, I.** 1994: Fimbriae and disease. In: Klemm, P. (Hrsg.) *Fimbriae, adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines*. S. 239-254. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
68. **Tamm, A., Tarkkanen, A., Korhonen, P. K., Toivanen, P., Skurnik, M.** 1993: Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.*; **10**: 995-1011
69. **Tahir, Y. E., Skurnik, M.** 2001: YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int. J. Med.Microbiol.*; **291**: 209-218

70. **Tran Van Nhieu, G., Isberg, R. R.** 1993: Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *EMBO J.*; **12**: 1887-1895
71. **Trebesius, K., Harmsen, D., Rakin, A., Schmelz, J., Heesemann, J.** 1998: Development of rRNA-Targeted PCR and In Situ Hybridization with Fluorescently Labelled Oligonucleotides for Detection of *Yersinia* Species. *J. of Clin. Microbiology*; **36**: 2557-2564
72. **Usher, K.C., Özkan, E., Gardner, K.H., Deisenhofer, J.** 2001: The plug domain of FepA, a TonB-dependent transport protein from *Escherichia coli*, binds its siderophore in the absence of the transmembrane barrel domain, *PNAS*; **98**:10676-10681
73. **Van Geest, M., Lolkema, J.S.** 2000: Membrane Topology and insertion of Membrane Proteins: Search for Topogenic Signals. *Microbiology and Molecular Biology.*; **64**: 13-33
74. **Van Noyen, R., Vandepitte, J., Wauters, G., Selderslaghs, R.** 1981: *Yersinia enterocolitica*: its isolation by cold enrichment from patients and healthy subjects. *J. Clin. Pathol.*; **34**:1052-1056
75. **Vogel, U., Autenrieth, I. B., Berner, R., Heesemann, J.** 1993: Role of plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* in humoral immunity against secondary *Y. enterocolitica* infection in mice. *Microb. Pathog.*; **15**: 23-36
76. **Visser, L. G., Hiemstra, P. S., van den Barselaar, M. T., Ballieux, P. A., van Furth, R.** 1996: Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect Immun.*; **64**: 1653-1658
77. **Wachtel, M. R., Miller, V. L.** 1995: In vitro and in vivo characterization of an ail mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*; **63**: 2541-2548
78. **Wollmann, P., Zeth, K., Lupas, A., Linke, D.** 2006: Purification of the YadA membrane anchor for secondary structure analysis and crystallization. *Int.J. of Bio. Mac.*; **38**: 1855-1861
79. **Yersin, A.** 1894.: La peste bubonique a Hong Kong. *Ann. Inst. Pasteur.* ; **8**: 662-667
80. **Zakharov, S.D., Eroukova, V.Y., Rokitskaya, T.I., Zhalina, M.V., Sharma, O., Loll, P.J., Zgurskaya, H.I., Antonenko, Y.N., Cramer, W.A.** 2004 : Colicin Occlusion of OmpF and TolC Channels : Outer Membrane Translocons for Colicin Import. *Biophysical Journal*; **87**: 3901-39011

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Maximilian Werner Tiller

Geburtsdatum/-ort: 22.04.1979 in Gera

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulische Ausbildung

1985 – 1988	Oberschule „Alexander Matrossow“, Gera (ehem. DDR)
1988	Grundschule Grafing b. München
1988 - 1989	Volksschule Poing b. München
1989 – 1998	Musisches Pestalozzi-Gymnasium München, Abitur

Zivildienst

08/1998 – 08/1999	13-monatiger Zivildienst im Labor für Immunogenetik der Ludwigs-Maximilians-Universität (LMU) München
-------------------	---

Studium

10/1999	Beginn des Medizinstudiums an der Otto von Guericke-Universität Magdeburg
02 und 08/2000	Pflegepraktikum an der Chirurgischen Klinik Innenstadt der LMU
09/2001	Ärztliche Vorprüfung
10/2001	Wechsel an die LMU München
03/2002	4-wöchige Famulatur an der Chirurgischen Klinik Innenstadt der LMU
08/2002	1. Teil der Ärztlichen Prüfung
09/2002	Beginn der Dissertationsarbeit am Max von Pettenkofer-Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene
02/2003	6-wöchige Famulatur am Max von Pettenkofer-Institut, Außenstelle Großhadern
02/2003	Aufnahme ins Graduiertenkolleg „Infektion und Immunität“, LMU
07/2004	4-wöchige Famulatur an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU

09/2004 4-wöchige Famulatur in der internistischen Praxis Dr.
Beckenbauer, München

09/2005 2. Teil der Ärztlichen Prüfung

10/2005 Praktisches Jahr mit den Tertialen an der Maria-Theresia-Klinik
München, an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der
LMU, sowie an den Medizinischen Kliniken I und II im
Klinikum Großhadern der LMU

11/2006 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

Beruf

Seit 01/07 Assistenzarzt an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie
und gastroenterologischen Onkologie im Klinikum München
Bogenhausen, Prof. Dr. W. Schepp

München, 04.03.2008

Maximilian Tiller