

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

**Charakterisierung des Quorum Sensings in
Yersinia enterocolitica unter Kultur- und
Infektionsbedingungen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christoph A. Jacobi

aus
Sanderbusch

Jahr
2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Griese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Enders

Prof. Dr. med. H.-W. Pfister

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: entfällt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2006

Meinen Eltern und Geschwistern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Quorum Sensing	1
1.2. <i>Yersinia</i>	3
1.2.1. Klinisches Bild der humanen Yersiniose	4
1.2.2. Pathogenitätsfaktoren von <i>Yersinia enterocolitica</i>	5
1.2.3. QS und <i>Yersinia</i>	8
1.3. 2-D-SDS-Gelelektrophorese	9
1.4. Zielsetzungen dieser Arbeit	10
2. Material und Methoden	13
2.1. Material	13
2.1.1. Geräte	13
2.1.2. Sonstige Materialien	14
2.1.3. Chemikalien	14
2.1.4. Enzyme, dNTPs und Antikörper	14
2.1.5. Elektrophorese-Marker	14
2.1.6. Synthetische Oligonukleotide	15
2.1.7. Plasmide	16
2.1.8. Bakterienstämme	16
2.1.9. Versuchstiere	16
2.1.10. Medien und Lösungen	17
2.1.10.1. Medien für die Bakterienkultur	17
2.1.10.2. Puffer und Lösungen	18
2.2. Methoden	21
2.2.1. Mikrobiologische Methoden	21
2.2.1.1. Kultivierung von Bakterien	21
2.2.1.2. Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen	21
2.2.1.3. Ausplattieren von Bakterien	21
2.2.1.4. Lagerung von Bakterien	22
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	22
2.2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA	22
2.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.2.2.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
2.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.2.5. Ligation	24
2.2.2.6. Elektroporation von <i>E.coli</i> und <i>Yersinia</i>	24
2.2.2.7. Red—vermittelter Genausstausch	25

2.2.3. Proteinchemische Methoden	26
2.2.3.1. Isolierung der sekretierten Yops	26
2.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.2.3.3. Immunoblot	28
2.2.3.4. Herstellung von gereinigtem AiiA	29
2.2.3.5. 2-D-SDS Gelelektrophorese	29
2.2.3.5.1. Preparation der Bakterien	29
2.2.3.5.2. Isoelektrische Fokussierung	30
2.2.3.5.3. SDS-Gelelektrophorese	30
2.2.3.5.4. Sequenzierung der Aminosäuren	31
2.2.4. Extraktion und Detektion von HSL	31
2.2.4.1. Extraktion von HSL aus in vitro kultivierten Yersinien	31
2.2.4.2. Extraktion von HSL aus infizierten Mäusen	31
2.2.4.3. Detektion von extrahierten HSL durch Autoradiographie	32
2.2.4.4. Detektion von HSL durch Biolumineszenz in der Mikrotiterplatte	32
2.2.5. Tierversuche	33
3. Ergebnisse	35
3.1. Nachweis von HSL	35
3.2. Detektion von HSL aus <i>Y. enterocolitica</i> in vitro	35
3.3. Extraktion von HSL aus <i>Y. enterocolitica</i> in vitro	36
3.4. Extraktion und Detektion von HSL im Mausinfektionsmodell	38
3.5. QS-Mutanten von <i>Y. enterocolitica</i>	41
3.5.1. Konstruktion der Mutanten	41
3.5.2. Charakterisierung der Mutanten mit 2-D-SDS-PAGE	44
3.5.3. <i>Yen</i> -Mutanten und Pathogenität	47
3.6. AiiA	48
3.6.1. Herstellung der AiiA-Konstrukte	48
3.6.2. Experimente mit den AiiA-Konstrukten	50
4. Diskussion	53
Zusammenfassung	62
Literatur	64
Lebenslauf	73
Danksagung	75

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
A. bidest	Doppel-destilliertes Wasser
AiiA	Autoinducer inhibiting enzyme A
Ail	attachment invasion locus
Ak	Antikörper
Ampuwa	hochreines Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
AraC	Arabinosid C
ATP	Adenosintriphosphat
au	Arbitrary units
BHI	brain heart infusion
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca	Calzium
cfu	colony forming units
Cm	Chloramphenicol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxytyrosintriphosphate
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycobis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GDP	Guanosindiphosphat
h	Stunde
HCl	Hydrochlorid
HHL	N-(3-Hexanoyl)-Homoserinlaktone

HLA	Human leukocyte antigen
HRP	horse radish peroxidase
HSL	Homoserinlaktone
h ν	Licht
IEF	Isoelectric focussing
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
Inv	Invasin
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
kn	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	kilo-Dalton
kV	kilo-Volt
LB	Luria-Bertani
LcrV	low calcium response V
LMW	low molecular weight
Lux	Bakterielle Luziferase
mA	Milliampere
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mRNA	messenger Ribnukleinsäure
Myf	mucoid <i>yersinia</i> factor
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OdDHL	N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlaktone
OHHL	N-(3-Oxohexanoyl)-Homoserinlaktone
Ohm	elektrischer Widerstand
PAGE	Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese

PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	Potenz der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
pYV	<i>Yersinia</i> Virulenzplasmid
QS	Quorum Sensing
<i>red</i>	Gene , die für Rekombinasen kodieren
REV	Restriktionsenzymverdau
RP	released protein
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
Sta	<i>E.coli</i> Enterotoxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TM	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
µA	Mikroampere
µl	Mikroliter
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	volume/volume (Vol.%)
VirF	virulence F
YadA	<i>Yersinia</i> adhesin A
<i>yen</i>	QS Gen von <i>Y. enterocolitica</i>
Yop	<i>Yersinia</i> Outer Protein
<i>yps</i>	QS Gen von <i>Y. pseudotuberculosis</i>
<i>ysc</i>	yop secretion
Yst	<i>Yersinia</i> Enterotoxin
<i>ytb</i>	QS Gen von <i>Y. pseudotuberculosis</i>

1. Einleitung

1.1. Quorum Sensing

Mit der Entdeckung, dass Bakterien miteinander kommunizieren, hat sich die Sicht verändert, mit der wir zuvor die „einfachen“, einzelligen Organismen betrachtet hatten, die unsere Welt bevölkern. Anstatt der Sprache benutzen Bakterien bestimmte Moleküle, die sie in ihre Umgebung abgeben, um zu kommunizieren. Zusätzlich zu der Produktion dieser Signalmoleküle besitzen Bakterien die Fähigkeit, die Konzentration dieser Stoffe innerhalb einer Population zu bestimmen. Der Begriff „Quorum Sensing“ (QS) beschreibt dieses Phänomen (Fuqua et al., 1994), welches Einzelbakterien erlaubt, die Zahl der Bakterien innerhalb einer Population über die Konzentration dieser Botenstoffe/Signalmoleküle zu messen. Dies ermöglicht der Bakterienpopulation ein koordiniertes Verhalten. QS wird sowohl von Gram-negativen wie Gram-positiven Bakterien benutzt, um verschiedene physiologische Funktionen, inklusive die der Virulenz, zu regulieren bzw. der Umgebung anzupassen. In allen Fällen gehören zum QS die Produktion und die Detektion von extrazellulären Signalmolekülen. Diese Form der Kommunikation zwischen Bakterien wurde erstmalig bei dem biolumineszierenden, marinen Bakterium *Vibrio fischeri* entdeckt und beschrieben (Nealson et al., 1970; Eberl, 1999; Miller and Bassler, 2001). Dieses Bakterium kommt entweder freilebend im Ozean oder als Symbiont in sogenannten „Lichtorganen“ verschiedener Fische vor. Die Arbeiten hierüber begannen Ende der 60er Jahre mit den Untersuchungen über das Regulationssystem der Lichtproduktion. Erst wenn eine bestimmte Bakteriendichte überschritten wird („ein Quorum“) kommt es zur Produktion von Licht. Verantwortlich hierfür sind die Gene *luxI* und *luxR*, welche respektive für das Signalmolekül und für den Regulator kodieren, sowie das *luxICDABE*-Operon. Dieses Operon kodiert für alle an der Biolumineszenz beteiligten Gene. Ist eine bestimmte Konzentration der Signalmoleküle erreicht, interagieren diese mit dem Regulator LuxR und aktivieren damit die Expression des *luxICDABE*-Operons zur Bildung eines Chemilumineszenzsystems (Abb. 1). Die biologische Bedeutung dieses einzigartigen Systems ist nicht abschließend geklärt. Es wird diskutiert, dass die „lumineszierenden“ -Fische am Meeresgrund für ihre Räuber unsichtbar sind, da sie keinen Schatten werfen, wenn sie nahe am Meeresgrund schwimmen. Die von *V. fischeri* produzierten Signalmoleküle wurden erstmalig 1981 isoliert und als N-(3-Oxo-hexanoyl)-Homoserinlaktone (3-Oxo-

C6-HSL (OHHL)), einem N-acetyl-L-Homoserinlaktone (HSL) identifiziert (Eberhard et al., 1981). Dieser Regulationsmechanismus führte zum Modell des QS (Eberl, 1999; Miller and Bassler, 2001; Henke and Bassler, 2004). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Produktion von HSL auf marine Bakterien der Genera *Vibrio* und *Photobacterium* beschränkt sei. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass die Fähigkeit, HSL zu synthetisieren, unter Gram-negativen Bakterien weit verbreitet ist. Die Produktion der HSL geschieht mit Hilfe von *luxR/luxI* homologen Genen. Bei einer geringen Populationsdichte produzieren die Bakterien nur eine basale Menge an HSL.

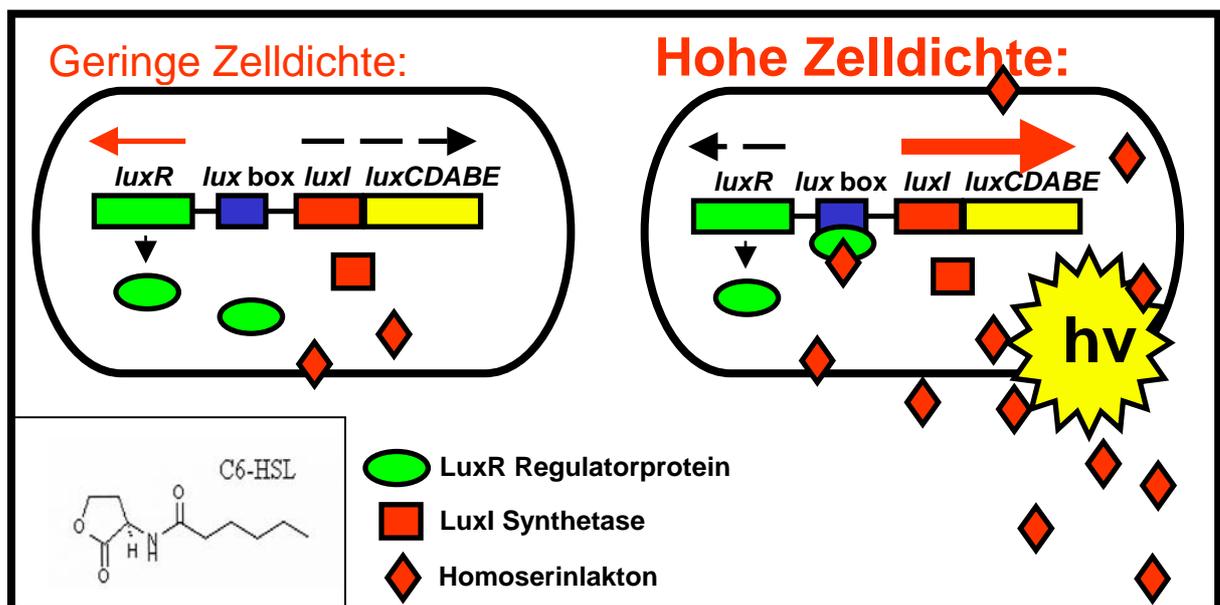


Abb. 1. Quorum Sensing Modell von *Vibrio fischeri*: bei einer geringen Bakterienzeldichte wird wenig HSL produziert (rote Symbole; links), steigende Bakterienzellzahlen (rechts), führen zu einer Anreicherung von HSL. Nach dessen Bindung an den Regulator LuxR (grünes Symbol) wird die Expression des *lux*-Operons aktiviert. Links unten ist die chemische Struktur von C6-HSL (HHL) abgebildet.

Steigt die Bakteriendichte, so akkumuliert HSL im Medium. Wird eine bestimmte Konzentration erreicht oder überschritten, so binden die HSL-Moleküle aufgrund ihrer Menge an den Rezeptor. Diese Bindung führt entweder zur Induktion oder Repression von HSL-regulierten Genen (Miller and Bassler, 2001). Die HSL-abhängigen Regulationsmechanismen kontrollieren eine Vielzahl sehr verschiedener Funktionen, unter anderem die Synthese von Antibiotika und Pigmentstoffen oder die Produktion von extrazellulären hydrolytischen Enzymen. Darüber hinaus kodieren QS-kontrollierte Gene Virulenzfaktoren und Genprodukte für Bakterien-Wirt Interaktionen. QS beeinflusst komplexe bakterielle Verhaltensmuster, wie die Fähigkeit, Oberflächen-assoziierte strukturierte und kooperierende Verbände, sogenannte Biofilme, zu bilden. Biofilmbildung spielt eine wichtige Rolle bei der bakteriellen In-

fektion und ist eine häufige Ursache für persistierende Infektionen. Insbesondere an körperfremden Materialien, zumeist Plastikimplantaten, spielt die Biofilmbildung eine große Rolle. Häufig bedingt sie die Explantation der betroffenen Materialien und eine langfristigen Einnahme von Antibiotika. Bakterien in diesen Biofilmen sind häufig resistent gegenüber Desinfektionsmitteln, Antibiotika und auch gegen das Immunsystem des Wirtes (Geisenberger et al., 2000; Parsek and Greenberg, 2000; Williams et al., 2000; Hentzer et al., 2003; Telford et al., 2003). Zusätzlich bereitet die zunehmende Antibiotika-Resistenz der Bakterien, die nicht in Biofilmen assoziiert sind, Sorgen, so dass in dieser „Post-antibiotischen“ Ära über neue Strategien zur Infektionsbekämpfung nachgedacht werden muss. Es wird immer wieder über bakterielle Infektionen, besonders auf den Intensivstationen der Krankenhäuser, berichtet, die nur noch auf ausgewählte oder auf keine Antibiotika mehr ansprechen. Dieses kann für die Patienten lebensgefährlich sein. Das Phänomen „QS“ kann eine solche neuartige Strategie darstellen. Hier gibt es verschiedene Möglichkeiten; I. Antagonisten kompetieren mit den HSL für die Bindungsstelle an den Regulator, II. Spezifische Antikörper binden an HSL und neutralisieren diese, III. Die Produktion der Substrate für die Herstellung von Laktonen wird verhindert, IV. Spezifische Antisense Oligonukleotide interagieren mit der RNA von *luxR*- oder *luxI*-Homologen und verhindern so die Translation, V. Laktonasen degradieren die Laktone und verhindern so die Interaktion mit dem Regulator. So konnte gezeigt werden, dass eine transgene Tabakpflanze, die die Laktonase AiiA konstitutiv produziert und somit das QS-Molekül degradiert, resistent ist gegenüber einer Infektion mit dem pflanzenpathogenen Bakterium *Erwinia carotovora* (Dong et al., 2000; Hentzer et al., 2003).

1.2. *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* (früher *Pasteurella*) wurde 1964 nach dem Schweizer Bakteriologen Alexandre J. Yersin benannt (Frederiksen, 1964), der 1894 als erster den Erreger der Pest isolierte (Yersin, 1894). Seit 1974 gehört die Gattung *Yersinia* zu der Familie der *Enterobacteriaceae* und umfasst 11 Arten (Schleifstein and Coleman, 1939). Die ubiquitär verbreiteten Yersinien sind pleomorphe, Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien mit einem Wachstumsoptimum von 27-30 °C. Sie bilden keine Sporen, sind Katalase-positiv und Oxidase-negativ. Bei Anzuchtbedingungen unter 30°C sind die Bakterien peritrich begeißelt und beweglich

(Miller et al., 1988). Es sind drei humanpathogene Yersinien bekannt (Brenner, 1979; Cornelis et al., 1987):

- *Yersinia pestis*
- *Yersinia pseudotuberculosis*
- *Yersinia enterocolitica*

Während *Yersinia pestis* der Erreger der sogenannten Beulen- und Lungenpest ist, stellen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* die enteropathogenen Vertreter der Gattung dar (Knapp, 1988). Die bereits 1886 isolierte und beschriebene Spezies *Y. pseudotuberculosis* wird nach sechs O-Antigenen (I-VI) typisiert. Die erst 1964 eindeutig differenzierte Spezies *Y. enterocolitica* ist biochemisch und serologisch sehr heterogen. 57 verschiedene O-Antigene lassen 18 O-Serotypen unterscheiden. Das Vorkommen der Serogruppen unterliegt einer geographischen Verteilung. In Europa werden vorwiegend sporadische Infektionen mit den Serotypen O3, O5,27 und O9 beobachtet, während in den USA vornehmlich die Serotypen O4, O8, O13 und O20 anzutreffen sind (Aleksic and Bokemühl, 1990). In den USA ist eine starke Zunahme des Serotypes O3 festzustellen, welche wahrscheinlich auf den Import von kontaminiertem Schweinefleisch aus Kanada zurückzuführen ist (Bisset et al., 1990; Lee et al., 1990; Blumberg et al., 1991).

1.2.1. Klinisches Bild der humanen Yersiniose

Die Infektion durch *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* erfolgt meist durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel, in der Regel Schweinefleisch, Wasser oder Milch (Cover and Aber, 1989; Aleksic and Bokemühl, 1990).

Y. pseudotuberculosis und *Y. enterocolitica* rufen Krankheitsbilder (Bottone, 1977; Toivanen et al, 1985; Cover and Aber, 1988) hervor, die sich in ihrer erregerunspezifischen und klinisch uncharakteristischen Verlaufsform ähneln. Das Hauptbild dieser Yersiniosen ist eine akute Enteritis, gekennzeichnet durch kolikartige abdominale Beschwerden, Übelkeit, Diarrhoe und Fieber. 10-20% der Patienten können eine mesenteriale Lymphadenitis bis hin zu einer letalen Sepsis mit Abszessen in den retikuloendothelialen Organen erleiden. Septische Verlaufsformen finden sich aufgrund bestehender Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, Immunsuppression, Desferrioxamin-Behandlung und bei Patienten mit Eisenüberladung (Rabson et al., 1975; Bottone, 1977; Bouza et al., 1980). Unbehandelt liegt hierbei die Letalität bei 50% (Larsen, 1979). Chronisch persistierende Yersiniosen sind ebenfalls selten

(Hoogkamp Korstanje et al., 1988). Immunpathologische Folgeerkrankungen wie sterile reaktive Arthritis, Uveitis oder Erythema nodosum können besonders bei erwachsenen Trägern des Gens HLA-B27 auftreten (Ahvonen et al., 1969; Winblad, 1969; Ahvonen and Dickhoff, 1974; Dequeker et al., 1980; Toivanen et al., 1985). Die Diagnose einer Yersiniose erfolgt durch den kulturellen Nachweis aus einem Stuhlprobenausstrich auf Spezialnährmedien oder durch serologische Verfahren, z.B. Widal-Agglutination oder Immunoblot. Die Therapie besteht meist aus ausreichender Flüssigkeitszufuhr, da die Infektion vorwiegend selbstlimitierend ist. Nur in schweren Fällen, bei Sepsis oder bei Immunsupprimierten ist eine Chemotherapie zum Beispiel mit Cotrimoxazol notwendig (Kayser et al., 2001).

1.2.2. Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica*

Alle humanpathogenen *Yersinia*-Arten haben eine Reihe von Resistenzmechanismen entwickelt, um der Infektabwehr des Wirtes (z.B. Komplementlyse und Phagozytose) zu entgehen (Martinez, 1983; Lian et al., 1987; Hanski et al., 1989; Heesemann, 1990; Simonet et al., 1990; Hanski et al., 1991; Heesemann et al., 1993). Für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* werden sowohl chromosomal als auch plasmid kodierte Virulenzfaktoren verantwortlich gemacht (Cornelis et al., 1987; Cornelis et al., 1989; Cornelis et al., 1994; Cornelis et al., 1998; Aepfelbacher et al., 1999).

Zu den chromosomal kodierten Virulenzfaktoren gehört das hitzestabile Enterotoxin Yst. Dieses wird nur von *Y. enterocolitica* gebildet und besitzt Ähnlichkeit mit dem Enterotoxin Sta von *E. coli* und Guanylin, dem endogenen Aktivator der intestinalen Guanylat-Cyclase (Pai and Mors, 1978; Currie et al., 1992). Obwohl Yst in vitro nur bei Temperaturen unter 30 °C produziert wird, spielt es wahrscheinlich bei der Diarrhoe während der Yersiniose eine Rolle (Delor and Cornelis, 1992).

Bei 37 °C wird unter sauren Kulturbedingungen das Myf (“mucoid yersinia factor”) Antigen produziert. Es bildet eine fibrilläre Struktur, die dem CS3-Pilus des humanen enterotoxischen *E. coli* ähnelt (Iriarte et al., 1993). Myf könnte bei der Adhärenz an Darmepithelien und bei der Erreger-Phagozyten-Interaktion eine Rolle spielen (Lindler et al., 1990).

Die beiden äußeren Membranproteine Inv (Invasin) und Ail (“attachment invasive locus”) vermitteln über β 1-Integrine die Adhärenz an und die Invasion in Wirtszellen (Miller and Falkow, 1988; Isberg, 1989; Miller et al., 1990; Brett et al., 1993; Ennis et al., 1993). Inv scheint in der Frühphase der intestinalen Yersinieninfektion (Invasion

des Darmepithels) von Bedeutung zu sein (Pepe and Miller, 1994; Grassl et al., 2003), während Ail zusätzlich für die Serumresistenz verantwortlich ist (Miller et al., 2001). Gene verschiedener Eisenaufnahmesysteme sind ebenfalls chromosomal kodiert (Heesemann and Gaede, 1994).

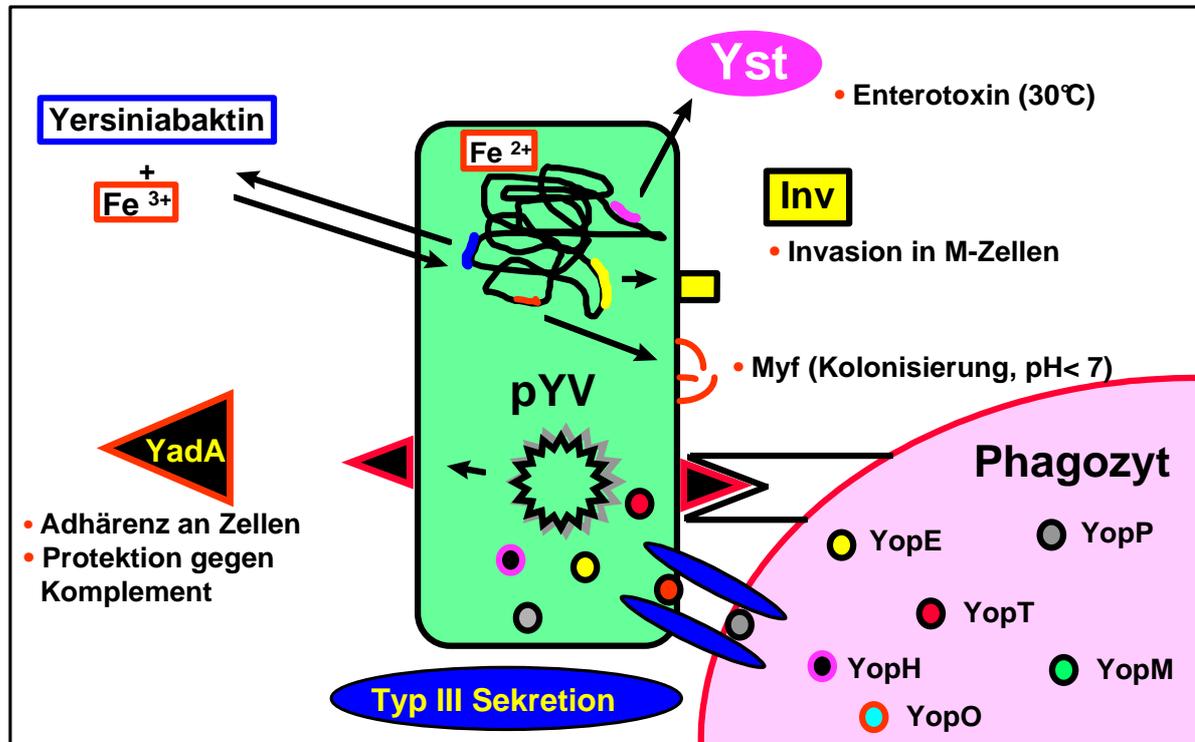


Abb. 2. Virulenzfaktoren von *Yersinia enterocolitica* (Cornelis, 1994; Cornelis et al., 1998; Aepfelbacher et al., 1999).

Alle humanpathogenen Yersinien tragen ein ca. 70 kb großes Virulenzplasmid (pYV), welches für eine Vielzahl von Proteinen und Polypeptiden kodiert. Darunter befinden sich das äußere Membranprotein YadA („*Yersinia adhesin A*“), sezernierte Proteine (Yops - „*Yersinia outer proteins*“) sowie verschiedene regulatorische Cytosolproteine.

Virulenzfaktor	Lokal. 1	nachgewiesene und vermutete Funktionen
Yst	C	Hitzestabiles Enterotoxin, Diarrhoe
Myf	C	Darmkolonisierung
Inv	C	Invasin: Eintritt in intestinale Zellen während der initialen Infektionsphase, Adhäsion: Bindung an β 1-Integrine
Ail	C	Invasion, Adhäsion, Komplementresistenz, Phagozytose-resistenz
Yersiniabaktin	C	Eisenaufnahme, Immunsuppression?
YadA (YopA)	P	Hauptmembranprotein, Bindung an Kollagen und Fibronektin, Autoagglutination, Darmkolonisierung, Phagozytoseresistenz, Komplementresistenz
Translokations – Yops:		
YopB	P	Transmembranprotein, Translokation von Yops
YopD	P	Transmembranprotein, Translokation von Yops
LcrV	P	Sekretion der Yops, Evasion der angeborenen Immunität
Effektor – Yops:		
YopE	P	Cytotoxizität, Phagozytoseresistenz
YopH	P	Protein-Tyrosin-Phosphatase, Inhibierung Signaltransduktionswegen
YopM	P	Thrombinbindung, Translokation in den Nukleus
YopN (LcrE)	P	Regulation der Translokation
YopO (YpkA)	P	Serin/Threonin-Protein-Kinase, Hemmung der Phagozytose, MAP-Kinasen und antiapoptotischen Reaktion
YopP	P	Inhibierung von NF- κ B, Einleitung der Apoptose

Tab. 1. Wichtige Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica*

1) Genetische Lokalisation: C: chromosomal kodiert, P: Plasmid kodiert

Bei YadA handelt es sich um ein trimeres Oberflächen-Agglutinin, welches bei 37°C produziert wird und eine Lollipop-ähnliche Struktur bildet (Heesemann and Grüter, 1987; Hoiczky et al., 2000). YadA vermittelt die Adhärenz an extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen und Fibronektin (Heesemann and Grüter, 1987; Schultze Koops et al., 1992; Skurnik et al., 1994). Obwohl diese Eigenschaft auf eine Rolle als Kolonisierungsfaktor hinweist, könnte die Hauptaufgabe von YadA in der unspezifischen Abwehr eines Infekts liegen. YadA vermittelt Resistenz gegen Opsonierung und Komplementlyse. Antikörper gegen YadA wirken nach einer parenteralen Infektion protektiv (Toivanen et al., 1985; Pilz et al., 1992; China et al., 1993).

Die Yops werden bei 37°C und Calcium-Entzug in das Medium sezerniert (Heesemann et al., 1986; Heesemann et al., 1987). Calcium-Entzug oder der Kontakt mit einer eukaryontischen Zelle und die Temperatur kontrollieren die Transkription der *yop* Gene. Der am besten charakterisierte Regulator ist VirF, ein transkriptioneller Aktivator der AraC-Familie (Cornelis et al., 1987; Cornelis et al., 1989). Er kontrolliert die Transkription der meisten Gene, die an der Yop-Synthese und Sekretion beteiligt sind (Lambert de Rouvroit et al., 1992). Zwölf verschiedene Yops (YopB, D, E, H, M, N, O, P, Q, R, T, und IcrV) werden in Ca-depletiertem Medium bei 37°C sezerniert. Im Zellkultur-Infektionsmodell wurde gezeigt, dass YopE, H, M, O, P und T in die Wirtszelle transloziert werden (Heesemann et al., 1984; Bolin et al., 1985; Cornelis et al., 1987; Bolin et al., 1988; Cornelis et al., 1989; Leung et al., 1990; Rosqvist et al., 1990; Viitanen et al., 1990; Forsberg et al., 1991; Bliska et al., 1992; Galyov et al., 1993; Hakansson et al., 1993; Persson et al., 1995; Straley et al., 1993; Beuscher et al., 1995; Hakansson et al., 1996; Cornelis et al., 1998; Iriarte and Cornelis, 1998; Iriarte et al., 1998; Orth et al., 1999; Zumbihl et al., 1999; Kerschen et al., 2004; Trulzsch et al., 2005; Viboud and Bliska, 2005). Die Funktion der Yops ist vielfältig. In Tabelle 1 sind diese stichwortartig zusammengefasst.

1.2.3. QS und *Yersinia*

Es ist seit einigen Jahren bekannt, dass auch *Yersinia* Signalmoleküle produzieren und somit über ein QS-Regulationssystem verfügen. So wurde 1995 gezeigt, dass *Yersinia enterocolitica* Stamm 10460 Substanzen bildet, die den QS-Biosensor *E. coli* [pSB403] aktivieren. Die chemische Analyse identifizierte N-Hexanoyl-L-Homoserinlaktone (HHL) und N-(3-Oxohexanoyl)-L-Homoserinlaktone (OHHL) (Abb. 3B) als Signalmoleküle (Throup et al., 1995). Für die Synthese verantwortlich zeigte sich das Gen *yenI*, 642 Basenpaare lang, welches für das 24.6 kDa große Protein YenI kodiert (20% Identität zur LuxI-Familie). Wird dieses Gen mutiert, so werden HHL oder OHHL nicht mehr produziert. Die Sequenzanalyse zeigte ein weiteres Gen, *yenR*, welches signifikante Homologien zur *luxR*-Familie der transkriptionalen Aktivatoren zeigt (Abb. 3A). Es wurde gezeigt, dass die Signalmoleküle konstitutiv produziert werden und dass die Produktion von Yops durch die Mutationen nicht beeinflusst wird. In der 2-D-SDS-Gelelektrophorese zeigen sich Unterschiede in den synthetisierten Proteinen zwischen dem Wildtyp und den entsprechenden Mutanten.

Welche Funktionen QS bei Yersinien hat, blieb zunächst/bisher unbeantwortet (Throup et al., 1995).

Y. pseudotuberculosis produziert neben HHL und OHHL auch N-Octanoyl-L-Homoserinlaktone (C8-HSL). Im Unterschied zu *Y. enterocolitica* werden zwei LuxR/I-Homologe synthetisiert, YpsR/I und YtbR/I. YpsI und Ytbl synthetisieren jeweils HHL, während YpsI zusätzlich OHHL und Ytbl zusätzlich C8-HSL herstellt. In einer *ypsl*-negativen Mutante ist Ytbl jedoch in der Lage, bei 37 und 22°C alle drei HSL zu synthetisieren, während OHHL überraschenderweise bei 28°C nicht hergestellt wird. In der *ypsr*-Mutante findet sich kein C8-HSL bei 22°C. Phänotypisch kommt es bei der *ypsr*-Mutante zu einer Verklumpung und zu einer verstärkten Produktion einer Flagellin-Untereinheit. Zusätzlich kommt es bei den beiden Mutanten, *ypsr* und *ypsl*, zu einer erhöhten Motilität der Bakterien. Diese Phänotypen sind

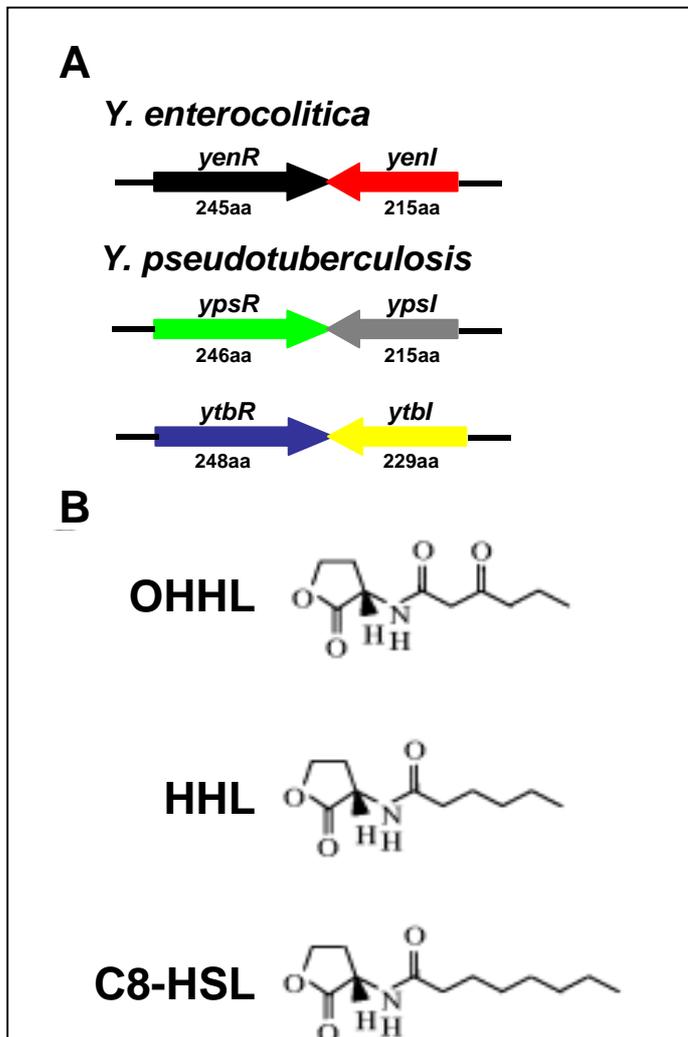


Abb. 3. Schematische Darstellung in A des jeweiligen QS-Operons (aa = Aminosäuren) und in B der chemischen Strukturen der HSL, die von Yersinien produziert werden.

sind temperaturabhängig und konsistent mit einer hierarchisch aufgebauten QS-Kaskade (Atkinson et al., 1999).

1.3. 2-D-SDS-Gelelektrophorese

Zweidimensionale-Gelelektrophorese ist eine wichtige und häufig verwendete Methode zur Analyse von komplexen Proteingemischen (Membranproteine, cytosolische Proteine) aus verschiedensten prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen. Diese Technik trennt Proteine nach zwei verschiedenen physikalischen Merkmalen

auf: in der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (pH-Gradient), werden Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten aufgetrennt. In der zweiten Dimension, der SDS-Polyacrylamide-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Jeder Punkt auf dem Gel repräsentiert in der Regel eine einzige Proteinspezies der Probe. Über Tausend verschiedene Proteine können aufgetrennt werden, und Informationen über isoelektrischen Wert (pI), das Molekulargewicht und die Menge des Proteins geben. Vergleicht man Mutanten mit dem Wildtyp, dann können unterschiedlich produzierte Proteine, quantitativ und qualitativ erfasst werden.

1.4. Zielsetzungen dieser Arbeit

Über lange Zeit hinweg wurden die Grundlagen des QS hauptsächlich an den „klassischen“ Organismen wie *Vibrio fischeri* oder *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Die Tatsache, dass viele Bakterien in der Lage sind, diese Signalmoleküle zu produzieren und darauf zu reagieren, zeigt, dass QS sehr weit verbreitet ist. Es ist bereits gezeigt worden, dass QS auch bei dem enteropathogenen Bakterium *Y. enterocolitica* stattfindet (Throup et al., 1995). Während hier Unterschiede in den synthetisierten Proteinen detektiert worden sind, wurden Phänotypen von QS-Mutanten von *Y. pseudotuberculosis* beschrieben. Dort zeigten die Mutanten auf der einen Seite eine Tendenz zur Verklumpung, auf der anderen Seite aber auch eine gesteigerte Motilität (Throup et al., 1995; Atkinson et al., 1999).

Ziel dieser Arbeit war es, QS von *Y. enterocolitica* unter Kultur- und Infektionsbedingungen zu untersuchen. Mit dem besseren Verständnis von QS soll die Basis dafür geschaffen werden, potentiell neuartige Strategien zur Infektionsbekämpfung zu entwickeln. Die Etablierung von Techniken stand in dieser Arbeit ebenso im Vordergrund, da zum einen QS ein neues Thema darstellte und zum anderen neuartige Fragestellungen bearbeitet wurden.

Die Arbeit gliedert sich in folgende Abschnitte:

1. Detektion und Extraktion von HSL aus *Y. enterocolitica* in vitro.
 - 1A. Etablierung von Extraktions- und Nachweismethoden für HSL von *Y. enterocolitica* mit Hilfe von zwei verschiedene Methoden. Dies ist zum einen ein chemischer Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und zum anderen ein biologisches Nachweisverfahren mit Hilfe eines Biosensors.

1B. Einfluss unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die Produktion von HSL. Die Produktion von verschiedenen Virulenzfaktoren der Yersinien ist abhängig von der Temperatur und den Wachstumsbedingungen. Hier soll untersucht werden, inwieweit diese Faktoren ebenfalls die Synthese der HSL beeinflussen. Daraus soll Rückschlüsse auf die Regulation von QS erlauben.

2. Extraktion und Detektion von HSL im Balb/c Mausmodell nach Infektion mit *Y. enterocolitica*.

Das Balb/c Mausinfektionsmodell ist ein etabliertes Tiermodell für die Infektion mit *Y. enterocolitica*. In diesem Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob *Y. enterocolitica* HSL in der Maus produziert und es möglich ist, diese zu extrahieren und zu detektieren. Weitere Fragen schließen sich an; hat die Route der Infektion einen Einfluss auf die Menge an HSL? Verteilen sich die HSL in gleichmäßig in den Mausgeweben? Wie hoch muss die Anzahl der Bakterien sein, damit HSL in den Geweben detektiert werden kann?

3. QS-Mutanten von *Y. enterocolitica*.

Um den Einfluss zu untersuchen den QS auf *Y. enterocolitica* hat, müssen QS-Mutanten hergestellt werden.

3A. Konstruktion der QS-Mutanten mit Hilfe des „Red-vermittelten Genaustausches“. Mit dieser PCR-basierten Methode werden Mutationen durch einen Allelen-Austausch hergestellt. Diese Mutanten zeichnen sich durch ihre hohe Stabilität aus, und sind deshalb gut für Virulenzversuche geeignet (Trulzsch et al., 2004).

3B. Charakterisierung der Mutanten mit 2-D-SDS-Gelelektrophorese. Hier soll untersucht werden, inwieweit sich die Proteinexpressionsprofile der Stämme unterscheiden. Außerdem sollen die differentiell produzierten Proteine durch Ansequenzierung identifiziert werden.

3C. Virulenzversuche mit den Mutanten. Hier sollen Balb/c Mäuse oral mit den Mutanten oder dem Wildtyp infiziert werden, um zu untersuchen, ob die QS-Mutanten in der Virulenz attenuiert sind.

4. Die Laktonase Autoinducer Inhibitor A (AiiA)

AiiA war die erste beschriebene Laktonase, welche den Laktonring enzymatisch spaltet. Tabakpflanzen, welche dieses Enzym transgen tragen, waren resistent gegenüber pflanzenpathogenen Bakterien. AiiA soll benutzt werden, um die HSL der Yersinien zu degradieren. Hierfür soll AiiA rekombinant hergestellt

werden, außerdem sollen verschiedene Genfusionen zwischen *yopE*, *lac* und *aiiA* konstruiert werden, um deren Einfluss auf die HSL zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaagen	R160P; PT 1200	Sartorius, Göttingen
Brutschränke	BB6220; Thermicon T	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	Flachbett-Kammern Protean II; Mini Protean	von Keutz, Reiskirchen BioRad, München
Elektroblot-Apparatur	Trans Blot Cell	BioRad, München
2-D-SDS-PAGE	PROTEAN Plus Dodeca Cell	BioRad, München
Filmentwickler	FPM-100A	Fuji, Tokio
French Press		
FPLC	Superdex 75 26/60	Amersham
Isofokussierung	PROTEAN IEF-Cell	BioRad, München
PCR-Thermocycler	GeneAmp System 9600	PE, Weiterstadt
pH-Meter	Modell pH530	WTW, Weilheim
Pipetten	Research P10-P1000	Eppendorf, Hamburg
Photopapierdrucker	Phaser 450	Tektronix, München
Rotationsverdampfer	VV2000/WB 2000	Heidolph, Schwabach
Schüttelinkubatoren	Certomat BS-1	B.Braun, Melsungen
Spannungsquellen	Modelle 200/2,0; 3000 xi	BioRad, München
Spektralphotometer	Ultraspec 3000	Pharmacia, Freiburg
Sterilwerkbank	Hera safe	Heraeus, Hanau
Tischinkubator	Thermostat 5350	Eppendorf, Hamburg
UV-Handlampe		Bachofer, Reutlingen
UV-Transluminator		Bachofer, Reutlingen
Videophotoanlage	E.A.S.Y. RH	Herolab, Wiesloch
Video-Printer		Mitsubishi, Tokio
Zentrifugen	Bactifuge; Biofuge 1.5; Megafuge 1.0; Kühlzentrifuge 3MK Eppendorf 5412	Heraeus, Hanau Sigma, Osterode Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Sonstige Materialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia (Braunschweig), B. Braun (Melsungen), E. Merck (Darmstadt), Eppendorf (Hamburg), Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Nürtingen), Millipore (Eschborn), Sartorius (Göttingen) und Schleicher & Schuell (Dassel).

2.1.3. Chemikalien

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien und Antibiotika von den Firmen Amersham-Pharmacia (Braunschweig), Biomol (Hamburg), E. Merck (Darmstadt), Fluka (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen), und Medien für die Bakterienkultur von der Firma Difco (Detroit, MI, USA) bezogen.

Acrylamid, Bisacrylamid	National Diagnostics, USA
-------------------------	---------------------------

2.1.4. Enzyme, dNTPs und Antikörper

Restriktionsenzyme (inkl. Puffer)	Invitrogen
T4-DNA-Ligase (inkl. Puffer)	Invitrogen
Taq-DNA-Polymerase (inkl. Puffer)	Perkin Elmer
dNTP (dTTP, dGTP, dCTP, dATP)	Invitrogen
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, HRP konjugiert	Dianova, Hamburg
Anti-YopE-Kaninchen-Antiserum	Roggenkamp et al., 1995

2.1.5. Elektrophorese-Marker

DNA-Standard X; XIV	Invitrogen
LMW-Protein-Marker	Invitrogen
Prestained SDS-PAGE-Standards Low Range	Invitrogen
2-D-SDS-PAGE-Marker	BioRad

2.1.6. Synthetische Oligonukleotide

Für die PCR wurden folgende synthetische Oligonukleotide (Thermohybid, Ulm und Metabion, Martinsried) eingesetzt.

Name	T _m (°C) ¹	Sequenz (5'→3') ²
KanRevYenIET		ACTCTTTAACGTAAATTTTAATAATATGCCGGAAA GGAAGTTAGACGAGACGTAATGCTCTGCCAGTG
KanForYenIET		CGGCCAGGTTTCGAGAGTTTTGGTTCAACTTGAT GTACTCTCAGTATTTCTCTGATGTTACATTGCACA
KanForYenRET		TAATTGACTATTTTGATAACGAAAGTATTAATGAA GATATAAAGAACTATCTCTGATGTTACATTGCACA
KanRevYenRET		CAACTCTATGCCAAGCCTTATTGCATGCTTGGCAT TTAAACACCCAGCTCGTAATGCTCTGCCAGTG
KanconETR	56	<u>CTCGTCCAACATCAATACAA</u>
KanconETF	56	<u>TGATGTTACAGATGAGATGG</u>
YenRconETF	56	<u>AGGGTATGTTATACCGCATT</u>
YenIconETR	56	<u>AGATAGAGATCGGTACGAT</u>
YenRinETF	54	<u>GCCGAAATCTCAATTATCTT</u>
LacHiF	54	CGTATAAGCTT <u>TGATTCTGTGGATAACCGT</u>
LacBaR	58	CGTAGGATCCT <u>GGCGTAATCATGGTCATAG</u>
YopE53BaR	58	CGCGGATCCGGAACCCCTGAGGGCTTTC
YopE138BaR	60	CGCGGATCCCGTGGCGAACTGATCATGATT
YenRBaF	56	CGTAGGATCCTGCGCTAAGATACTAGCTC
YenIBaF	56	CGTAGGATCCAGCATGCAATAAGGCTTGG
YenIRBaF	54	CGTAGGATCCGTGCTGTATCCCCCCC
YenIRSaR	54	AGCCCCGTCGACTTGCACTCATAGATAGAGAT
AiiABaF	50	CGTAGGATCCATGACAGTAAAGAAGCTTA
AiiASaR	52	GTCACGTCGACCTATATATATTCAGGGAACA
AiiAEcF	50	ACGTGAATTCCATGACAGTAAAGAAGCTTTA
AiiAXhR	52	GCCGCTCGAGCTATATATATTCAGGGAACA

1) T_m bezeichnet die Schmelztemperatur hybridisierender DNA-Sequenzen

2) Bei den zur PCR verwendeten synthetischen Oligonukleotiden ist die hybridisierende DNA-Sequenz unterstrichen.

Kursiv ist die jeweilige Erkennungssequenz des entsprechenden Restriktionsenzym gekennzeichnet.

2.1.7. Plasmide

Plasmide	Genotyp/Phänotyp	Quelle
pACYC177	low copy vector Kn ^R ; Tc ^R	1
pACYC184	low copy vector Cm ^R ; Tc ^R	1
pGEX	Proteinexpressionsvektor Amp ^R	Pharmacia
pKD46	kodiert Rekombinasen <i>redα</i> und <i>redβ</i> ; <i>redγ</i> (inhibiert Exonuk.)	2
pSB403	luxRI ⁺ ::luxCDABE on a pACYC184 vector	3
pCJYE53-AiiA	<i>SalI-HindIII YopE53-AiiA</i> Fragment in pACYC184	Diese Arbeit
pCJYE138-AiiA	<i>SalI-HindIII YopE138-AiiA</i> Fragment in pACYC184	Diese Arbeit
pCJYenR	<i>SalI-BamHI YenR</i> Fragment in pACYC184	Diese Arbeit
pCJYenRI	<i>SalI-BamHI YenRI</i> Fragment in pACYC184	Diese Arbeit
pGEXAiiA	<i>AiiA</i> fragment in pGEX	Diese Arbeit

(1): Chang and Cohen, 1978; (2): Datsenko et al., 2000; (3): Winson et al., 1998

2.1.8. Bakterienstämme

Stämme	Genotyp/Phänotyp	Quelle
DH5α (<i>E.coli</i>)	<i>endA1 hsdR17(r_k- m_{k+}) supE44 thi-1 recA1</i>	4
BL21	<i>gyrA relA1Δ(lacZYA-argF)U169 (φ80lacZΔM15)</i>	5
DH5 [pSB403]	DH5 trägt Plasmid pSB403	Diese Arbeit
BL21[pGEXAiiA]	BL21 trägt Plasmid pGEXAiiA	Diese Arbeit
WA-C	Plasmidloses Derivat von Stamm WA-314 (klinisches Isolat)	6
WA-P	WA-C trägt Virulenzplasmid pYV08	6
8081	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp 08, biotype 1B	7
WA-P[KD46]	WA-P trägt pKD46	Diese Arbeit
WA-P[pCJYE53-AiiA]	WA-P trägt pCJYE53-AiiA	Diese Arbeit
WA-P[pCJYE138-AiiA]	WA-P trägt pCJYE138-AiiA	Diese Arbeit
WA-P <i>yenR</i> ::kn	WA-P deletiert in <i>YenR</i>	Diese Arbeit
WA-P <i>yenR/yenI</i> ::kn	WA-P deletiert in <i>YenR</i> und <i>YenI</i>	Diese Arbeit
WA-P <i>yenR</i> ::kn[pCJYenR]	WA-P <i>YenR</i> Mutante, komplementiert	Diese Arbeit
WA-P <i>yenR/yenI</i> ::kn[pCJYenRI]	WA-P <i>YenR/YenI</i> Mutante, komplementiert	Diese Arbeit

(4): Hanahan, 1983; (5) Sambrock et al., 1989; (6): Heesemann, 1987; (7): Portnoy et al., 1983

2.1.9. Versuchstiere

Für in vivo Experimente wurden 6-8 Wochen alte weibliche Mäuse des Inzuchtstammes Balb/c (Harlan Winkelmann, Borcheln) verwendet. Die Mäuse wurden unter speziellen pathogenfreien Bedingungen in einer Überdruckkammer gehalten und erhielten unbegrenzt Wasser und Futter.

2.1.10. Medien und Lösungen

2.1.10.1. Medien für die Bakterienkultur

LB (Luria-Bertani)-Medium: 5 g NaCl (E. Merck)
5 g Bacto Hefeextrakt (Difco)
10 g Bacto Trypton (Difco)
in 1 l A. bidest. lösen, pH 7,4-7,6 mit
NaOH (E. Merck) einstellen

LB-Agar: 15 g Bacto Agar (Difco)
in 1 l LB-Medium

LB-Softagar: 6 g Bacto Agar (Difco)
In 1 l LB-Medium

NB (Nutrient Broth)-Medium: 8 g Nutrient broth (Difco)
5 g NaCl (E. Merck)
in 1 l A. bidest lösen

NBD-Medium: NB-Medium und 200 μ M α - α '-Dipyridyl (Sigma)

BHI-Medium: 37 g/l BHI (Difco) in A. bidest

Folgende Konzentrationen an Antibiotika wurden dem entsprechendem Medium und dem Agar zugesetzt:

Ampicillin (Biomol): 100 μ g/ml für *E. coli*
300 μ g/ml für *Yersinia enterocolitica*

Chloramphenicol (Sigma): 50 μ g/ml

Nalidixin (Sigma): 50 μ g/ml

Kanamycin (Sigma): 50 μ g/ml

Tetracyclin (Sigma): 15 μ g/ml

Einfriermedium für Bakterien: 20% Glycerin (E. Merck) in LB-Medium

10 x Elektrophoresepuffer:	30 g Tris-HCl (Invitrogen) 144,4 g Glycin (Biomol) 100 ml 10% SDS (Biomol) ad 1l A. bidest
2 x Laemmli-Probenpuffer:	125 mM Tris-HCl (Invitrogen), pH 6,8 20% Glycerin (E. Merck) 4% SDS (Biomol) 10% β -Mercaptoethanol (E. Merck) 0,0025% Bromphenolblau (Sigma)
Westernblot Puffer:	3 g Tris-HCl (Invitrogen) 14,4 g Glycin (Biomol) ad 1l A. bidest
Coomassie-Färbelösung:	0,2% Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma) in 50% Methanol, 10% Essigsäure (E. Merck)
Entfärbelösung:	30% Methanol, 10% Essigsäure (E. Merck)

Lösungen für die 2-D-SDS-Gelelektrophorese:

Lysepuffer:	100 mM Tris-HCl (Invitrogen), pH7,5 1 mM EDTA (Biomol) 5 mM DTT (Biomol) 5 μ g/ml Pepstatin A (Roche) 1 mM PMSF (E. Merck)
UC-Puffer:	7 M Urea (Biomol) 2 M Thiourea (Biomol) 4% CHAPS (Biomol) 2 mM Tributyl

Äquibrierungslösung:	72 g Urea (Biomol) 60 g Glycerin (Biomol) 4 g SDS (Biomol) 6,6 ml 1,5 M Tris-HCl (Invitrogen), pH8,8 ad 1 l A. bidest
12% Gel (für 10 Gele):	240 ml 30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid (National Diagnostics) 150 ml 1,5 M Tris-HCl (Invitrogen), pH 8,8 6 ml 10% SDS (Biomol) 5,2 ml 10% APS (E. Merck) 150 µl TEMED (Biomol) 204 ml A. bidest
Fixier-Lösung:	800 ml Ethanol (E. Merck) 200 ml Essigsäure (E. Merck) ad 2 l A. bidest
Färbelösung:	100 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 g Ortho-Phosphorsäure (85%) (Fluka) 250 ml Methanol (E. Merck) Coomassie-Brilliant Blue G250 (Serva) ad 1 l A. bidest
<i>Lösung zur Proteinaufreinigung:</i>	
Elutionspuffer:	10 mM red. Glutathion (Amersham) 100 mM Tris-HCl (Invitrogen), pH 7,5 100 mM NaCl (E. Merck)
Puffer Gelfiltration:	50 mM Tris-HCl (Invitrogen), pH 7,4 0,1 M NaCl (E. Merck)

Lösungen zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterien:

Wasch-Puffer: steriles Ampuwa

Einfrier-Puffer: 10% Glycerin in Ampuwa

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von Bakterien

Ein Kolben oder Reagenzglas wurde unter sterilen Bedingungen mit dem entsprechenden Nährmedium befüllt; dabei sollte das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen möglichst groß sein, um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Das Medium wurde mit einer Kolonie oder Vorkultur des gewünschten Stammes angeimpft und unter Schütteln bei 27°C (*Y. enterocolitica*) oder 37°C (*E. coli*) über Nacht (üN) inkubiert.

Bakterien wurden auf Blutagarplatten mit einem Dreiösenausstrich beimpft. Filterplättchen, mit den entsprechenden Antibiotika getränkt, wurden auf dem Bakterienausstrich appliziert, um die jeweiligen Bakterien zu selektionieren.

2.2.1.2. Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen

Die optische Dichte (OD) einer Bakterienkultur wurde mit dem Spektralphotometer durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Eine Bakterienkultur hat in der exponentiellen Wachstumsphase eine optische Dichte im Bereich von 0,3-0,7 (entspricht ca. $1-2,5 \times 10^8$ CFU/ml).

2.2.1.3. Ausplattieren von Bakterien

Von einer geeigneten Verdünnung einer Bakterienkultur wurden 100-200 µl auf eine Agarplatte gegeben und mit einem abgeflamten, sterilen Glasspatel gleichmäßig verteilt. Nach dem Antrocknen wurden die Platten bei 27°C für *Yersinia* und bei 37°C für *E. coli* im Brutschrank inkubiert. Nach 12-18 Stunden waren Einzelkolonien gewachsen.

2.2.1.4. Lagerung von Bakterien

Durch Parafilm abgedichtete Agarplatten mit Bakterienkolonien können bei 4-10 °C ca. 4 Wochen gelagert werden. Bei -80°C überleben Bakterien im Nährmedium dem 20% Glycerin zugesetzt wurde, nahezu unbegrenzt.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden (Ausubel et al., 1989; Sambrook et al., 1989)

2.2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA (Birnboim and Doly, 1979)

Das Prinzip für die Isolierung von Plasmid-DNA beruht auf den unterschiedlichen Eigenschaften von Plasmid-DNA und chromosomaler-DNA. Während denaturierte Plasmid-DNA sich nach einer Neutralisation wieder renaturiert, bleibt die chromosomale-DNA unlöslich und kann pelletiert werden.

Eine Übernachtskultur (10 ml) der Bakterien wurde abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA aus dem resultierenden Pellet wurde durch die Auflösung der Bakterienzellwand durch Lysozym isoliert. Anschließend wurde die gesamte bakterielle DNA im alkalischen Milieu denaturiert. Die nachfolgende Neutralisation der Lösung erlaubte nur der kovalent geschlossenen, zirkulären Plasmid-DNA eine Renaturierung. Die chromosomale-DNA wurde abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA blieb löslich im Überstand. Dieser Überstand wurde nun auf eine "Mini-prep" Säule (Qiagen, Hilden) gegeben, welche eine Glasmilchmatrix enthält. Die Plasmid-DNA wurde an diese Matrix gebunden, nach Protokoll durch Zentrifugation von Verunreinigungen gesäubert und von der Matrix eluiert. Die isolierte Plasmid-DNA konnte für alle molekularbiologischen Manipulationen genutzt werden.

Die Isolierung großer Mengen (aus 50-100 ml Bakterienkulturen) reiner Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Extraktion nach dem Protokoll der Firma Macherey-Nagel, Düren, wobei die Plasmid-DNA über Austauscher-Säulen (Nucleobond AX 20, AX 100) aufgereinigt wurde.

2.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt eine Vervielfältigung (Amplifikation) eines gewünschten DNA-Abschnittes. Mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase und einem zur amplifizierenden DNA komplementären Primerpaar werden multiple Kopien dieser DNA hergestellt.

Die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte erfolgte aus einem Gesamtzelllysate von Bakterien. Dazu wurde Bakterienzellmasse von einer Agarplatte direkt in 70 µl sterilem Ampuwa aufgelöst und für 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend 5 min bei 15000 upm abzentrifugiert. Je 5 µl des DNA-haltigen Überstands wurden in einem 100 µl PCR-Reaktionsansatz eingesetzt. Der 100 µl Reaktionsansatz enthielt außerdem 2,5 U Taq-Polymerase, 1/10 Volumen des mitgelieferten Puffers, je 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1,5 mM MgCl₂ und je 1 µM der beiden Primer. Die Amplifikation der DNA-Segmente wurde durch 25-35 Zyklen der folgenden drei Inkubationsschritte in einem PCR-Thermocycler durchgeführt: 1) Denaturierung der DNA bei 94°C für 45 sec, 2) Bindung der Primer bei den entsprechenden Schmelztemperaturen für 1 min, 3) DNA-Elongation bei 72°C für 2 min. Den Zyklen ging ein einmaliger Denaturierungsschritt bei 94°C für 10 min voraus und eine Elongation bei 72°C für 7 min beendete die PCR. 10 µl des PCR-Ansatzes wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt, analysiert und für die späteren Klonierungsschritte über "QIAquickspin"-Säulen (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.2.2.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige-DNA an spezifischen Stellen - definiert durch bestimmte Basensequenzen, sog. Palindrome - spalten. Bei einfacher Spaltung von Plasmid-DNA entsteht ein linearisierter Vektor, der anschließend mit entsprechenden DNA-Fragmenten ligiert werden kann.

Die Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgte mit den im Ergebnisteil aufgeführten Restriktionsenzymen und den geeigneten, vom Hersteller mitgelieferten Puffern. 1 µg DNA wurde in einem Volumen von 50 µl mit 10 U Restriktionsenzym 2-3 h (Plasmid-DNA) oder 12-24h (PCR-Produkt) bei 37°C inkubiert. Die Spaltung von PCR-Produkten ist sehr viel ineffektiver als die Spaltung von Plasmid-DNA. Anschließend wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und über "QIAquickspin"-Säulen (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird eingesetzt, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen. Hierzu wird die Agarose in dem für die Elektrophorese benutzten Laufpuffer (1 x TAE-Puffer) aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 50°C in das Bett einer Horizontal-Gelelektrophoresekammer gegossen. Der Einsatz eines Gelkammes bildet die Taschen, in die die zu analysierende DNA-Probe gegeben wird. Die Konzentration der Agarosegele (0,8-1,2%) wurde entsprechend der Größe der zu analysierenden DNA gewählt. Je größer die zu trennenden DNA-Stücke waren, umso geringer konzentriert wurde die Agarose eingesetzt.

Etwa 10-20 µl DNA-Lösung wurde mit 1-2 µl 10 x Probenpuffer versetzt und bei einer Feldstärke von 5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Größe der DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde gleichzeitig ein Elektrophorese-Marker mitlaufen gelassen (siehe 2.1.5.). Nach Beendigung der Elektrophorese konnten die DNA-Fragmente durch Färbung des Gels für 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) und anschließender UV-Beleuchtung sichtbar gemacht werden.

2.2.2.5. Ligation

DNA-Fragmente, die durch PCR-Amplifikation (2.2.2.2.) oder Restriktionsverdau (2.2.2.3.) entstanden, ließen sich in Plasmide, sogenannte Vektoren, einbauen. Hierzu wurden sowohl Vektor als auch DNA-Fragment mit Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend in einer Ligationsreaktion zu einem Plasmid zusammengesetzt. Zur Ligation wurden 0,5 µg Vektor-DNA und 1 µg DNA-Fragment, mit dem entsprechendem Volumen 10 x Ligase-Puffer (Endkonzentration 1 x Ligase-Puffer) sowie 1 U T4-DNA-Ligase für 16-18 h bei 14°C inkubiert. Die rekombinanten Plasmide wurden durch Transformation (2.2.2.6.) in kompetente *E. coli* DH5α eingebracht. Die Suche nach "positiven Klonen" (Klone, die das Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment enthalten) erfolgte mit Hilfe von Antibiotika-Selektion und anschließender Analyse einzelner Klone in Mini-Plasmidpräparationen.

2.2.2.6. Elektroporation von *E.coli* und *Yersinia*

Die Methode der Elektroporation beruht darauf, dass eine Bakteriensuspension hoher Zelldichte, zu der DNA pipettiert wurde, kurzfristig einem starken elektrischen Feld ausgesetzt wird. Wahrscheinlich werden dabei Poren in der Bakterienzellwand geöffnet, durch die Plasmid-DNA in das Zellinnere diffundieren kann. Damit es nicht

zu einem Kurzschluss kommt, muss die bakterielle Suspension möglichst frei von Ionen sein.

1 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* oder *Y. enterocolitica* Stammes wurde in 100 ml LB-Medium gegeben und bei 27°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien dreimal mit eiskaltem Ampuwa (10 min, 5000 upm) und einmal mit 10% Glycerin gewaschen. Darauf wurde die Bakterien suspension in 1 ml 10% Glycerin aufgenommen und in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Die Elektroporation wurde mit 0,1-1 µg Plasmid-DNA pro 50 µl Bakterien durchgeführt. Die Elektroporation selbst erfolgte mit dem Gene-Pulser- Transfection-Apparatus der Firma BioRad; folgende Bedingungen wurden eingesetzt: U = 2,5kV, C = 25 µF, R = 200 Ohm. Nach der erfolgreichen Elektroporation (Zeitkonstante 4-5 msec) wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium pipettiert, eine Stunde bei 27°C (*Y. enterocolitica*) bzw. 37°C (*E. coli*) geschüttelt und anschließend auf entsprechende, Antibiotika enthaltende LB-Agarplatten ausplattiert.

2.2.2.7. Red-vermittelter Genaustausch (Datsenko et al., 2000)

QS-Mutanten von *Y. enterocolitica* WA-P wurden mit Hilfe des Red-vermittelten Allelen-Austausches hergestellt. Hierbei werden PCR-Produkte direkt in Bakterien elektroporiert, die zusätzlich Phagen-Rekombinasen produzieren können. Die entsprechenden Primer enthalten Nukleotide, die komplementär zu dem zu deletierenden DNA-Bereich sind (siehe Abb.4).

In einem ersten Schritt wurde WA-P mit dem Plasmid pKD46 transformiert. Kodiert auf diesem Plasmid sind die Gene für die Rekombinasen (aus dem λ Phagen) *redα* und *redβ* und zusätzlich *redγ*, welches als Inhibitor für die bakterielle Exonuklease fungiert. Die Übernachtskultur von WA-P[pKD46] wurde verdünnt und zur exponentiellen Wachstumsphase wachsen gelassen. Die Produktion der Rekombinasen wurde mit 0,1% Arabinose induziert. Diese Yersinien wurden elektrokompetent gemacht und bei -80°C eingefroren. Mit Hilfe von PCR- Primern wurde eine Antibiotika-Kassette amplifiziert. An den Primern waren jeweils zusätzlich ca. komplementäre 50-70 Nukleotide synthetisiert. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt und mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut, um die Template-DNA zu entfernen. Nach einer erneuten Reinigung und Präzipitation mit Ethanol wurden 1-2 µg dieser DNA in die elektrokompetenten Yersinien elektroporiert.

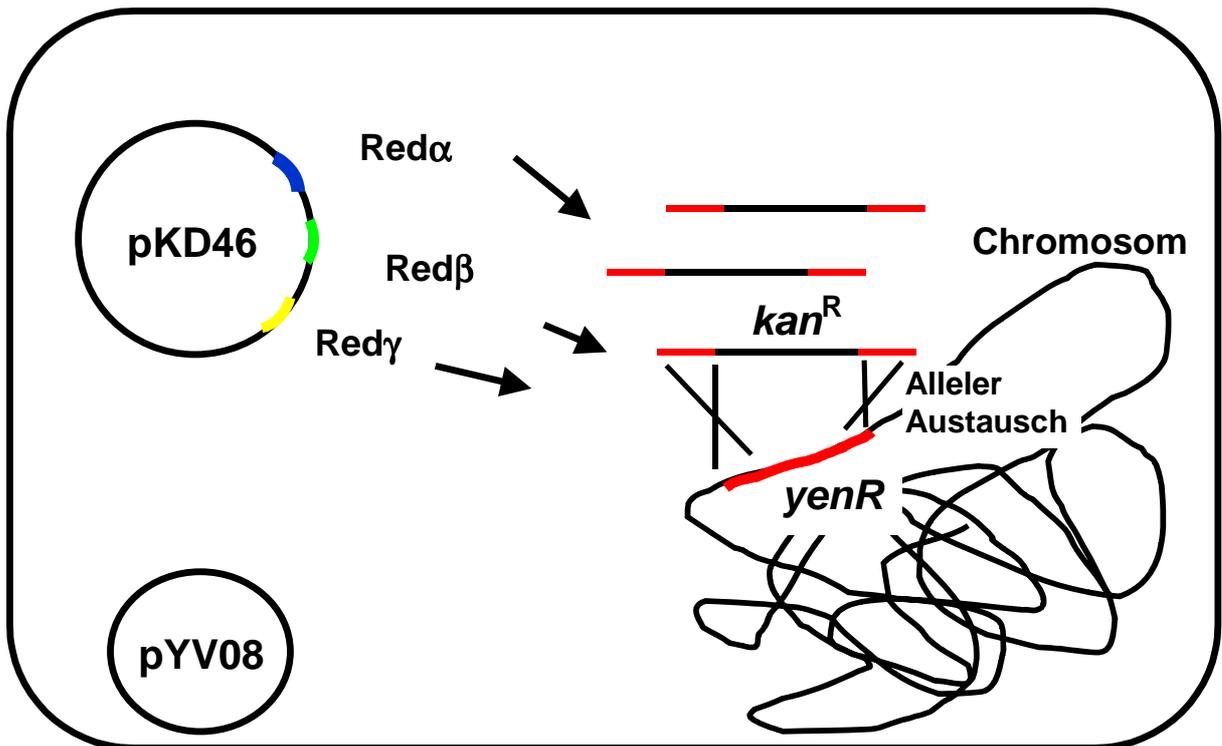


Abb. 4. Schematische Darstellung der Red-Rekombination zur Herstellung von Deletionsmutanten durch Allelen-Austausch. WA-P[KD46] produziert die notwendigen Rekombinasen. Ein PCR-Produkt, bestehend aus einer Kanamycinkassette und den flankierenden homologen Nukleotiden (jeweils 50-70 Basen lang) des zu deletierenden Gens (hier *yenR*) wird in diesen Stamm elektroporiert. Die Rekombinasen katalysieren den Allelen-Austausch, so dass die resultierende Mutante Kanamycin resistent wird.

2.2.3. Proteinchemische Methoden

2.2.3.1. Isolierung der sekretierten Yops (Heesemann et al., 1986)

Die Produktion von *Yersinia* Outer Proteins (Yops) wurde bei 37°C in Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI) induziert. Durch Chelatierung von Ca^{2+} mit EGTA wird die Sekretion von Yops induziert.

Eine Übernachtskultur, bei 28°C in LB-Medium gewachsen, wurde 1:40 in BHI-Medium verdünnt und bei 37°C für 90 min schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde durch Zugabe von EGTA (Endkonzentration 5 mM), MgCl_2 (Endkonzentration 15 mM) und Glukose (Endkonzentration 0,2%) die Sekretion der Yops induziert. Nach einer weiteren 90 bis 120-minütigen Inkubation wurden die Bakterien bei 5000 upm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml 0,9% NaCl aufgenommen und bei -20 °C eingefroren. Die Präzipitation der sekretierten Proteine im Überstand erfolgte mit Trichloressigsäure (TCA) (Endkonzentration 10%) für mindestens 60 min bei 4°C. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 15000 upm und 4°C. Das bräunlich gefärbte Proteinpellet wurde vorsichtig mit eiskaltem Aceton aus

dem Zentrifugenröhrchen gekratzt. Diese präzipitierten Proteine wurden darauf zwei bis dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, um die TCA zu entfernen. Nach dem letzten Aceton-Waschschritt wurden die Proteine in eiskaltem Ampuwa aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Ampuwa quantitativ mit einer Spritze entfernt, die Proteine in 50 µl Ampuwa resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

2.2.3.2. **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese** (Laemmli, 1970)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Hierbei bewirkt das Detergenz SDS die Dissoziation, Entfaltung und Solubilisierung komplexer Proteinmoleküle oder -assoziat. β -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken und unterstützt damit diesen Vorgang. Im elektrischen Feld wandern die von dem negativ geladenen SDS umgebenen Proteine in Richtung der Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit großer Proteinmoleküle geringer als die kleiner Proteinmoleküle, wodurch als Folge eine Auftrennung entsprechend dem Molekulargewicht der Proteine erfolgt. Die angewandte Methode nach Laemmli bedient sich eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels. Hierbei werden die Proteine erst in einem sogenannten Sammelgel "fokussiert", um sie dann in dem "Trenngel" nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht zu trennen.

Die für das Trenngel erforderlichen Substanzen (siehe Tab. 2) wurden auf Eis zusammen gegeben und vorsichtig in eine Vertikalkammer (10,5 cm x 7,5 cm x 1,0 mm) bis zu 2/3 des Endvolumens pipettiert. Das Gel wurde mit Ampuwa überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach 30-minütiger Polymerisation des Trenngels und Entfernung des Ampuwas wurde das Sammelgel in das verbleibende Volumen der Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach erneuter 30-minütiger Polymerisation des Sammelgels erfolgte der Probenauftrag. Zu analysierende Proteinproben wurden mit 1/2 v/v 2 x SDS-Proben-Puffer versetzt, 5 min bei 100°C inkubiert, 10 min abkühlen lassen und dann 5 min bei hoher Geschwindigkeit abzentrifugiert. Daraufhin wurden die Proben vorsichtig in die Taschen des kurz zuvor entfernten Kammes pipettiert. Die Elektrophorese wurde in 1 x SDS-Elektrophorese-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel durchgeführt.

Tab. 2. Zusammensetzung des SDS-Gelkomponenten

Lösung	Trenngel	Sammelgel
	11%	4%
AA/BA (30:0,8)	3,7 ml	0,7 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,6)	2,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,25 ml
Ampuwa	3,6 ml	3,05 ml
10% SDS	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl
10% APS	40 µl	40 µl

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele unter leichtem Schütteln für 10-30 min in "Coomassie-Blue" Färbelösung und anschließend für 6-12 h in der Entfärbelösung inkubiert.

2.2.3.3. Immunoblot (Towbin et al., 1979)

Der Immunoblot erlaubt die Detektion gewünschter Proteine, die zuvor auf eine Membran transferiert worden waren, durch eine spezifische Antikörper-Antigen Reaktion.

Die über eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch in einer BioRad Minigel Blotting Kammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer erfolgte in Westernblotpuffer bei einer Stromstärke von konstant 350 mA für 1 h. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend für 1 h bis üN in Blockierungspuffer inkubiert. Nach dem Blockieren der freien Membranareale wurde die Nitrozellulosemembran für 1,5 h bis üN mit einem gegen das gewünschte Protein gerichteten polyklonalen YopE-Antikörper (1:3000 verdünnt in PBS/Tween (0,5%)) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS/Tween (0,5%) wurde ein zweiter, gegen den ersten gerichteter Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG, HRP konjugiert, 1:5000 verdünnt in PBS/Tween (0,5%)), dazugegeben und für 1,5 h mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal mit PBS/Tween (0,5%) gewaschen. Die Konjugation des zweiten Antikörpers mit einer Peroxidase (HRP) erlaubte einen Nachweis spezifischer Proteinbanden nach Inkubation mit dem Substrat (ECL Kit, Amershan-Pharmacia).

2.2.3.4. Herstellung von gereinigtem AiiA

Eine Übernachtskultur von BL 21[pGEXAiiA], bei 28°C in LB-Medium gewachsen, wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt und bei 37°C für 90 min schüttelnd inkubiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Bakterien für weitere vier Stunden inkubiert. Die Suspension wurde bei 5000 upm bei 4°C zentrifugiert, mit eiskaltem PBS gewaschen, zentrifugiert und erneut in PBS resuspendiert. Zur Protektion der Proteine wurde PMSF in einer finalen Konzentration von 1 mM hinzugefügt. Die Bakterien wurden mit der French Press aufgeschlossen (dreimal mit einem Druck von 1000 psi). Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 1000 upm an. Der Überstand wurde zu 5 ml Glutathion-Sepharose gegeben und auf Eis für zwei Stunden schüttelnd inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation bei 3000 upm für 5 Minuten entfernt und der Überstand wurde nochmals auf die Sepharose gegeben. Die Sepharosen wurden vereint, dreimal mit PBS gewaschen und mit 5 ml Elutionspuffer versetzt. Es schloss sich eine Inkubation auf Eis für eine Stunde an. Das AiiA befand sich nach einer kurzen Zentrifugation im Überstand. Als einen zweiten Aufreinigungsschritt wurde eine Gelfiltration mit dem Superdex 75 26/60 durchgeführt. Hierfür wurde 10 ml Probe aufgetragen und mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min wurden Fraktionen von je 2,5 ml gewonnen.

2.2.3.5. 2-D-SDS-Gelelektrophorese

2.2.3.5.1. Preparation der Bakterien

Zur Analyse des Proteinexpressionsmuster von Wildtyp im Vergleich zu den korrespondierenden QS-Mutanten, wurden die Yersinien unter zwei verschiedenen Bedingungen wachsen gelassen; die bakteriellen Gesamtproteine einer Übernachtskultur und einer logarithmisch gewachsenen Kultur wurden untersucht. Die Kulturen wurden abzentrifugiert und in jeweils 20 ml Lysepuffer resuspendiert. DNase und RNase wurden hinzugefügt und die Zellen wurden mit der French Press (3 x bei 1000 psi) aufgeschlossen. Die Suspension wurde abzentrifugiert (30 min bei 5000 upm; 4°C), der Überstand wurde mit dem vierfachen Volumen für 1h bis unten bei -20°C mit Aceton gefällt. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt (1h bei 10000 upm; 4°C) an. Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen, erneut abzentrifugiert (1h bei 10000 upm; 4°C) und komplett getrocknet. Es schloss sich eine Rehydrierung der Proteine an, um diese vorsichtig vollständig zu lösen und zu denaturieren. Hierbei

sollte die Temperatur 37°C nicht überschritten werden. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt an, um eventuell unlösliche Reste abzutrennen. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

2.2.3.5.2. Isoelektrische Fokussierung

1 mg bakterieller Proteine wurden insgesamt in einem Volumen von 320 µl UC-Puffer aufgenommen und in die Fokussierungsschale pipettiert. Die getrockneten IEF-Streifen wurden vorsichtig in die Schale gelegt und mit Mineralöl überschichtet, um sie vor Austrocknung bzw. der Auskristallisierung des Harnstoffs zu schützen. Die Rehydratisierung der IEF-Streifen erfolgte für 12 Stunden bei 20 °C und einer Spannung von 50 V/Gel. Es folgte automatisch die Fokussierung, die nach einem festen Zeitprogramm (Tab. 3) ablief. Die Stromstärke wurde auf 50 µA/Streifen begrenzt.

Tab. 3.: IEF-Spannungs-Programm

Schritt	Spannung	Dauer
1	200 V	30 min
2	500 V	30 min
3	10000 V	55 kVh
4	500 V	24h

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die IEF-Streifen entweder bis zur 2. Dimension in Klarsichthüllen bei -80°C eingefroren oder gleich zur 2. Dimension vorbereitet. Hierfür wurden die Streifen in jeweils 12,5 ml Äquilibriumspuffer mit 320 µl TBT transferiert und für 20 Minuten schüttelnd inkubiert.

2.2.3.5.3. 2-D-SDS-Gelelektrophorese

In der zweiten Dimension der 2-D-Gelelektrophorese werden die Proteine durch eine SDS-PAGE nach ihrer molekularen Masse getrennt. Hierbei wird das Gel ohne ein Sammelgel hergestellt. Um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erreichen dauert der Polymerisationsvorgang der SDS-Gele mindestens 12 Stunden bei 4 °C. Die äquilibrierten IEF-Streifen wurden zusammen mit einem Proteinmarker auf das vertikale SDS-Gel gebracht und mit warmer 1%iger Agarose auf dem SDS-Gel fixiert. Die Elektrophorese wurde in der „PROTEAN Plus Dodeca Cell“ von BioRad mit einer Spannung von 20 Volt für vier Stunden gestartet, um dann für weitere 24 Stunden bei drei Watt pro Gel zu laufen. Nach Ende des Laufes wurden die Gele vorsichtig

entfernt und in die Fixierlösung gegeben, um sie anschließend zu färben. Es schloss sich eine dreimalige Wässerung an. Danach wurden die Gele mit dem BioRad Densitometer GS-800 elektronisch gespeichert.

2.2.3.5.4. Sequenzierung der Aminosäuren

Die differentiell produzierten Proteine wurden aus dem Gel ausgestanzt und mit Hilfe des MALDI TOF (Gut, 2004) ansequenziert. Die Sequenz wurde mit der „GenBank“ Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) verglichen.

2.2.4. Extraktion und Detektion von HSL

2.2.4.1. Extraktion von HSL aus in vitro kultivierten Yersinien

5 ml einer üN-Kultur von *Y. enterocolitica* wurde in 50 ml LB-Medium gegeben und bis zur logarithmischen Wachstumsphase wachsen gelassen. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und der Überstand wurde zweimal mit jeweils 50 ml Dichlormethan in einem Scheidetricher ausgeschüttelt. Die untere, organische Phase, in der die HSL in Lösung sind, wurde gewonnen. Mit Hilfe von wasserfreiem Magnesiumsulfat wurde der organischen Phase das restliche Wasser entzogen. Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter gegeben, um das feste Magnesiumsulfat zu entfernen. In dem Rotationsverdampfer wurde das Dichlormethan eingeeengt, das Konzentrat (enthält die HSL) wurde in 500 µl Ethylacetat aufgenommen. Yersinien, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (in BHI bei 37°C; üN-Kultur; unter Eisenmangelbedingungen) inkubiert wurden, wurden entsprechend behandelt.

2.2.4.2. Extraktion von HSL aus infizierten Mäusen (Jacobi et al., 2003)

Die infizierten Mäuse (siehe 2.2.5.) wurden nach drei Tagen getötet. Der Bauchraum wie auch der Darm wurde mit jeweils 4 ml eiskalter NaCl-Lösung gespült. Milz und Leber wurden homogenisiert und in eiskalter 0.9% NaCl-Lösung resuspendiert (100 mg Milzgewebe in 2 ml, bzw. 400 mg Lebergewebe in 4 ml Lösung). Aliquots wurden entnommen, um zum einem die Bakterienzellzahl zu bestimmen und zum anderen die Menge an HSL indirekt über ein Sensorbakterium in einer Mikrotiterplatten-Biolumineszenzassay (siehe 2.2.4.4.) zu bestimmen. Die jeweiligen Organhomogenate der fünf Tiere wurden vereint und mit steriler eiskalter 0.9% NaCl-Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Wiederum wurde davon die Bakterienzellzahl bestimmt. Die Homogenate

wie auch die Intestinal- und Peritonealspülungen wurden bei 6000 upm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Extraktion der HSL bei -20°C eingefroren. Die HSL wurden, wie in 2.2.4.1. b beschrieben, konzentriert. Das Konzentrat wurde in 100 µl Ethylacetat resuspendiert.

2.2.4.3. Detektion von extrahierten HSL durch Autoradiographie (Shaw et al., 1997)

Die Konzentrate, bzw. deren Verdünnungen, wurden auf die Dünnschichtchromatographie (DC)-Platte (RP-18 F_{254S}; 20 x 20 cm; Merck) aufgetragen. Für sechs Stunden (bis sich die Lösungsmittelfront etwa 1 cm unterhalb des oberen Randes befindet) wurde das Konzentrat auf der DC in einer feuchten Kammer in einem Gemisch von 60% Methanol und 40% Wasser aufgetrennt. Die Platte wurde danach getrocknet und mit 200 ml LB-Softagar überschichtet, der vorher mit einer logarithmisch gewachsenen Kultur (20 ml) des Biosensorstammes *E. coli* [pSB403] beimpft wurde. Diese DC-Platte wurde üN in einer feuchten Kammer bei 30°C inkubiert, anschließend wurde eine Autoradiographie durchgeführt.

2.2.4.4. Detektion von HSL durch Biolumineszenz in der Mikrotiterplatte (Winson et al., 1998)

Die tiefgefrorenen zell- und bakterienfreien Überstände der in vitro Kulturen wie auch von den Mausorganen wurden auf Eis aufgetaut. 50 µl dieser Überstände wurden mit 50 µl einer logarithmisch gewachsenen Bakteriensuspension von *E. coli* [pSB403] versetzt und in jeweils vier Näpfe einer weißen Mikrotiterplatte pipettiert. Die abgedeckten Platten wurden bei 30 °C üN inkubiert. Mit Hilfe des MicroLumatPlus-Gerätes wurde die Lumineszenz für jeweils 10 Sekunden gemessen und der Durchschnitt der Lumineszenz aus drei Näpfen (die extremste Abweichung (Napf vier) wurde verworfen) ermittelt und graphisch dargestellt.

2.2.5. Tierversuche (Jacobi et al., 2001)

Bevor Mausversuche mit Yersinien durchgeführt wurden, wurden die Bakterien in der Maus „passagiert“, um auf virulente Yersinien zu selektionieren. Hierfür wurden die jeweiligen Bakterien (1×10^7 cfu) intraperitoneal in die Maus gegeben, nach 24h wurde eine Peritonealspülung (siehe unten) durchgeführt und auf entsprechenden Antibiotika-haltigen Platten ausplattiert. Die Yersinien wurden sowohl auf die Präsenz des pYV Plasmids, wie auch auf das entsprechenden Konstrukt hin untersucht und bei -80°C eingefroren.

Für einen Infektionsversuch wurden die Einfrierkulturen für drei Stunden bei 27°C und Antibiotikazugabe inkubiert und dann dreimal mit sterilem PBS gewaschen und die gewünschte Bakterienkonzentration in PBS eingestellt. Die Bakterienzahl wurde durch das Ausplattieren entsprechender Verdünnungen bestimmt. Die Infektionsdosen betragen:

- intravenös (i.v.) 5×10^5 cfu,
- intraperitoneal (i.p.) 1×10^7 cfu,
- orogastrisch (oral) 5×10^9 cfu.

Zur intravenösen Applikation wurden $50 \mu\text{l}$ der entsprechenden Bakterienkonzentration in die laterale Schwanzvene injiziert. I.p. wurden die Mäuse durch Injektion von $200 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension in den Peritonealraum infiziert. Für die orale Infektion wurden die Mäuse für 12 Stunden ohne Wasser und Futter gehalten; danach wurde ihnen die Bakteriensuspension ($50 \mu\text{l}$) mit einer Pipette verabreicht.

Um die Menge an HSLs in der Maus zu bestimmen, wurden Gruppen von jeweils fünf Mäusen, i.v., i.p. oder oral mit WA-P infiziert. Nach dreitägiger Infektion wurden die Mäuse getötet und das Fell bauchwärts aufgetrennt. Eine Peritonealspülung wurde mit 4 ml eiskaltem sterilem $0,9\%$ NaCl durchgeführt und ein Aliquot wurde zur Keimzahlbestimmung eingesetzt. Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet und die Milz und Leber entfernt. Die Organe wurden mit einem Stößel und eiskaltem $0,9\%$ NaCl homogenisiert. Der Darm wurde entnommen und mit 4 ml eiskalter $0,9\%$ NaCl gespült. Die Peyer Plaques wurden isoliert und ebenfalls homogenisiert. Es wurden Verdünnungsreihen aufgestellt und auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert. Nach 24 bis 48-stündiger Inkubation bei 27°C wurden die Kolonien ausgezählt.

Um die Virulenz der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu bestimmen wurde analog wie oben beschrieben, vorgegangen. Gruppen von jeweils fünf Mäusen wurden oral mit den jeweiligen Bakterienstämmen infiziert und nach zwei bzw. vier Tagen getötet.

Milz, Leber und Peyer Plaques wurden homogenisiert und ausplattiert, eine Darmspülung wurde durchgeführt und ebenfalls ausplattiert und anschließend wurden die gewachsenen Bakterien in Kolonien (cfu) ausgezählt. Die Daten wurden statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis von HSL

Der Nachweis, dass *Y. enterocolitica* HSL-Signalmoleküle synthetisiert, wurde auf zwei verschiedenen Wegen erbracht: 1. indirekter Nachweis mittels eines Reporter-systems (siehe 3.2.) und 2. direkter Nachweis durch Extraktion von HSL aus dem Bakterienüberstand (siehe 3.3.).

3.2. Detektion von HSL aus *Y. enterocolitica* in vitro

Um QS bei *Y. enterocolitica* zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt versucht, QS bei Virulenzplasmid-haltigen, mausvirulenten (WA-P) und Virulenzplasmid-losen

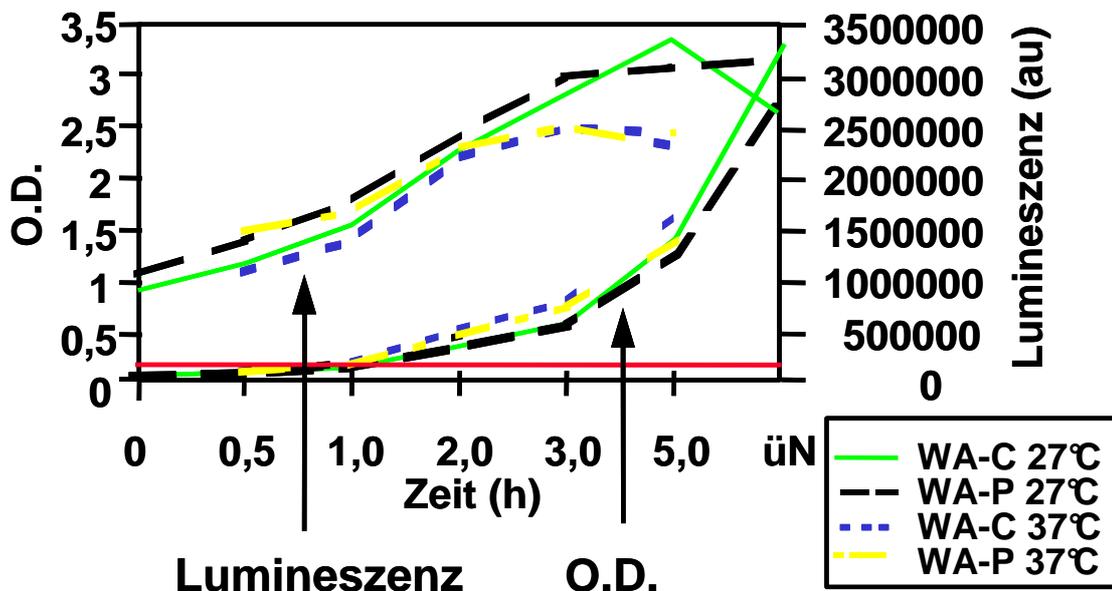


Abb. 5. Zeitverlauf der HSL-Produktion von WA-C bzw. WA-P bei 27°C oder 37°C. Die HSL der Bakterienüberstände wurden mit Hilfe des Sensorbakteriums *E. coli* [pSB403] in Abhängigkeit der Zeit detektiert. Zusätzlich wurde die optische Dichte (OD; Wachstumsphase) in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Die rote Linie markiert die Negativkontrolle ohne Bakterienüberstand (nur Sensorbakterium).

Stämmen (WA-C) von *Y. enterocolitica* zu detektieren. Dafür wurden die Bakterien in Flüssigmedium entweder bei 27 °C (LB-Medium) oder 37 °C (BHI-Medium) inkubiert. Um den Einfluss von verschiedenen Wachstumsphasen zu untersuchen, wurden Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen und analysiert. Der Überstand dieser Proben wurde mit dem „QS-Sensor“-Bakterium *E. coli* [pSB403] bei 30°C ün inkubiert. Es zeigte sich (Abb. 5), dass die Lumineszenzintensität und damit die Menge an HSL innerhalb der ersten drei Stunden bei 27°C stetig anstieg, dann

konstant blieb und später in der stationären Phase sogar etwas abnahm (WA-C). Innerhalb der ersten drei Stunden gab es keinen Unterschied zwischen WA-C und WA-P. Während jedoch nach fünf Stunden die Lumineszenzintensität, und damit die Menge an HSL, bei WA-C um etwa 15% abnahm, blieb die Menge bei WA-P nahezu konstant. Zwischen der ersten und dritten Stunde war der Verlauf zwischen der Produktion von HSL und dem Anstieg der Bakterienzellmasse fast parallel. Die Inkubation bei 37 °C (Induktion der *Yersinia* outer proteins (Yops)-Produktion) führte dazu, dass bereits nach etwa zwei Stunden die Lumineszenzintensität und damit die Menge an produzierten HSL am größten war. WA-P und WA-C verhielten sich auch hier gleichermaßen. Danach nahm die Menge an HSL ab. Die rote Linie repräsentiert die Negativkontrolle, hier wurde das Sensorbakterium mit dem sterilem Medium zusammen inkubiert. Erwartungsgemäß ist die Lumineszenz sehr gering.

Dieser indirekte Nachweis des QS bei *Y. enterocolitica* erlaubt keine Rückschlüsse auf die chemische Identität der Signalmoleküle. Zur Identifikation wurde in einem nächsten Schritt die Bakterienüberstände von verschiedenen in vitro Kulturen mit Dichlormethan extrahiert um HSL zu isolieren.

3.3. Extraktion von HSL aus *Y. enterocolitica* in vitro

Die Signalmoleküle von *Y. enterocolitica* wurden mit Dichlormethan aus stationär gewachsenen Kulturen (12-stündige Inkubation unter den genannten Bedingungen) extrahiert. Es konnte lediglich eine Art von HSL, nämlich das N-(3-Oxohehexanoyl)-L-Homoserinlaktone (OHHL), aus *Y. enterocolitica* WA-P und WA-C extrahiert werden.

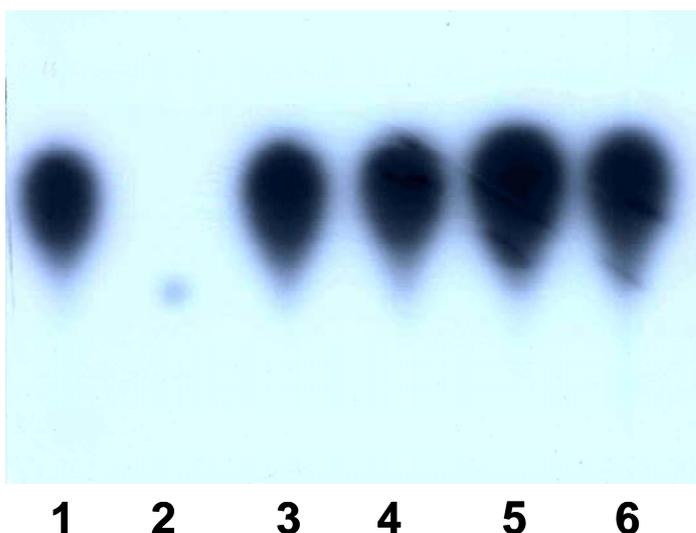


Abb. 6. Detektion der extrahierten HSL mit Hilfe der DC. In den Spuren 1 und 2 sind respektive die synthetischen OHHL und HHL aufgetragen.

1: 5 ng OHHL

2: 20 ng HHL

3: WA-P LB (27°C) = 0,1 ml Kultur

4: WA-P NBD (27°C) = 1,0 ml Kultur

5: WA-P BHI (37°C) = 1,0 ml Kultur

6: WA-C LB (27°C) = 0,1 ml Kultur

Die Ergebnissen waren vergleichbar mit denen der indirekten Detektion von QS (siehe 3.2.); die Menge an HSL produziert von dem Virulenzplasmid-losen Stamm

WA-C war ähnlich wie bei dem WA-P, so dass das Virulenzplasmid pYV08 die Produktion von OHHL nicht zu beeinflussen scheint. Unterschiedlich war jedoch die Menge an produzierten OHHL, wenn die Yersinien unter verschiedenen Bedingungen inkubiert wurden. So war die OHHL-Menge im Eisenmangelmedium (NBD – Fe II wird in der Bakterienzelle von α , α' Dipyridyl komplexiert und täuscht somit Eisenmangel vor) nur etwa 1/10 der Menge vom LB-Medium. Ganz ähnlich verhielt es sich, wenn Yersinien bei 37°C in BHI-Medium inkubiert wurden. In diesem Medium wird die Produktion von Yops induziert. Auch hier war die Menge an OHHL nur ca. 1/10 der Menge wie im LB-Medium bei 27°C (Abb. 6). Diese Daten stehen grundsätzlich mit den Daten von Abschnitt 3.2. im Einklang, obwohl die Menge von OHHL im BHI-Medium dort mehr ist. Allerdings wurden hier die HSL nach 12 Stunden extrahiert, in Abschnitt 3.2. wurde aber nur für insgesamt fünf Stunden gemessen.

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, inwieweit die Produktion von HSL stammspezifisch ist. Es wurde versucht, HSL aus dem mausvirulenten *Y.*

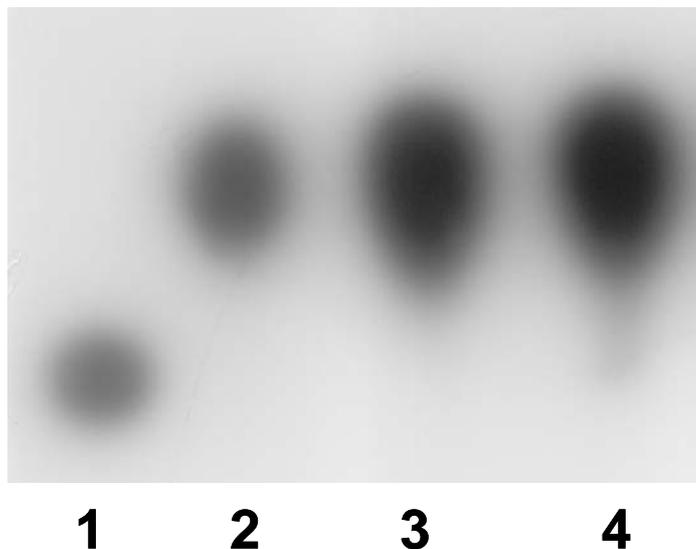


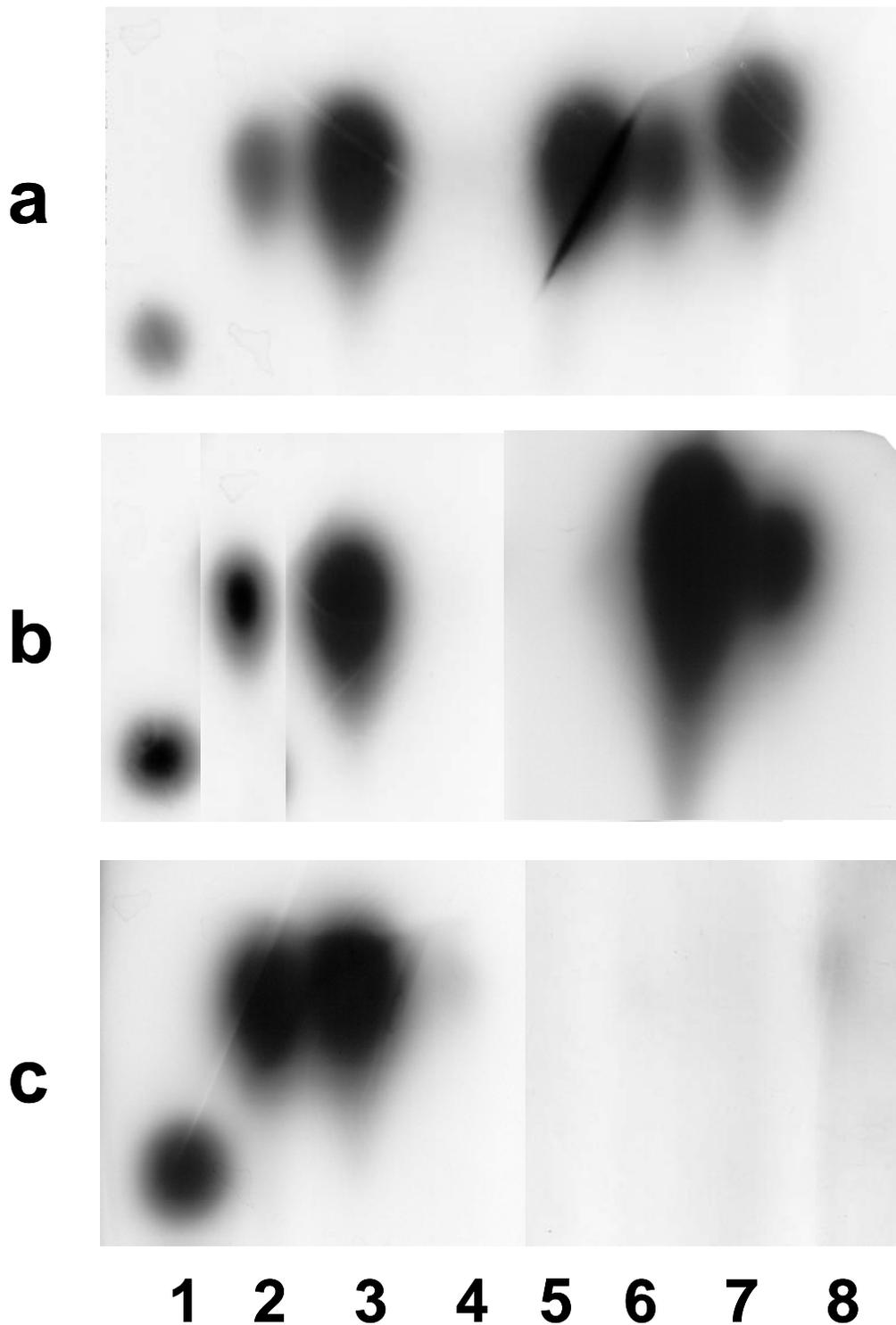
Abb. 7. DC von Extrakten aus in vitro gewachsenen Kulturen von WA-P und 8081;
Spur 1 und 2: synthetisches HHL bzw. OHHL;
3: Überstand von WA-P (4×10^7 Bakterien);
4: Überstand von 8081 (2.5×10^8 Bakterien)

enterocolitica Stamm 8081, welcher, wie WA-P, ebenfalls zur Serogruppe O8 gehört, zu extrahieren. Die Überstände aus μ N-Kulturen wurden mit Dichlormethan extrahiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm ebenfalls lediglich OHHL produziert, jedoch aber nur ca. 1/10 der Menge an OHHL wie in *Y. enterocolitica* WA-P (Abb. 7).

3.4. Extraktion und Detektion von HSL im Mausinfektionsmodell

In diesem Abschnitt sollte geklärt werden, ob Yersinien in vivo HSL bilden und ob diese aus den Mausgeweben extrahiert werden können. Im Rahmen dieser Untersu-

I.



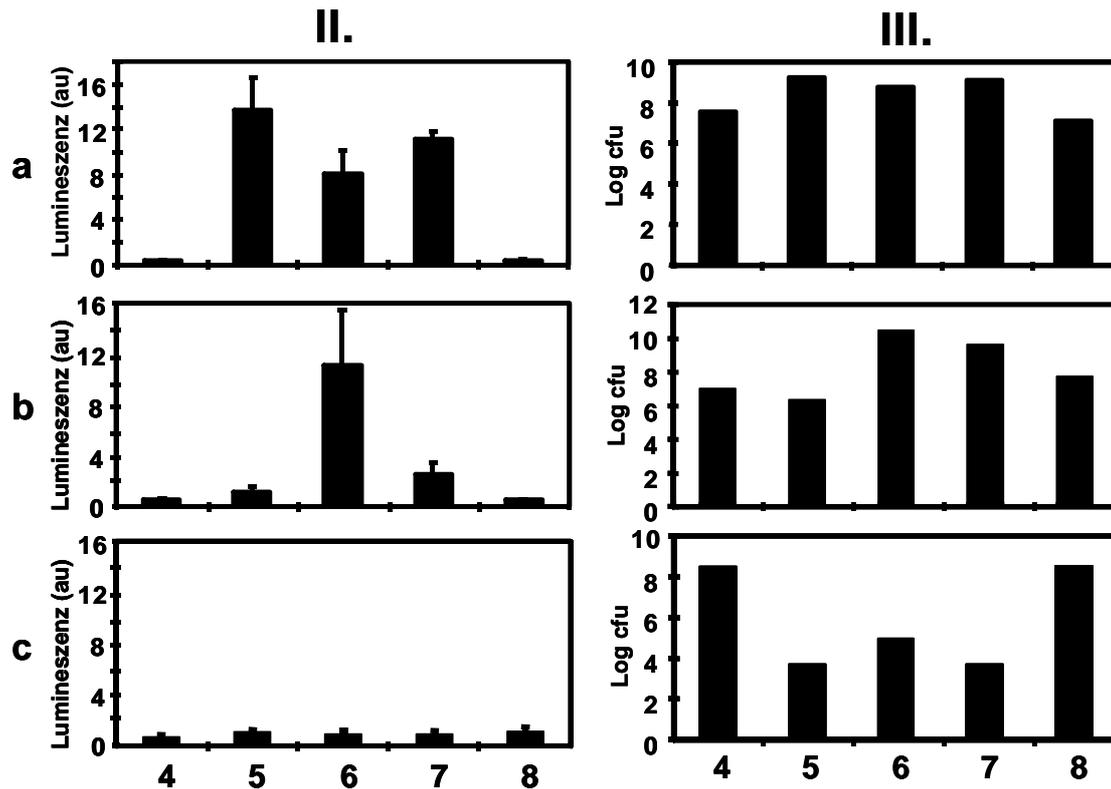


Abb. 8. Detektion von HSL produziert von WA-P in vitro und in der infizierten Balb/c Maus nachgewiesen durch I. DC-Analyse (Autoradiographie) und II. dem Biosensor *E. coli* [pSB403] (in au: arbitrary Einheiten x 100000). In III. ist die Zellzahl (in Log₁₀ cfu) korrespondierend zum 50 ml Extraktionsvolumens der Proben in I. aufgetragen.

Extrakte der Homogenate (Spuren 6-8) und Spülungen (Spuren 4, 5) der Organe von 5 Balb/c Mäusen, die mit WA-P via (a) der intraperitonealen, (b) der intravenösen und (c) der oralen Route infiziert wurden (für drei Tage); Spuren 1 und 2: synthetische HHL und OHHL Standards; Spur 3: In vitro Kultur von WA-P; Spur 4: Intestinale Spülung; Spur 5: Peritonealspülung; Spuren 6-8: Homogenate der Leber, Milz und der Peyerschen Plaques

chungen sollten anschließend verschiedene Fragen geklärt werden; produzieren die Yersinien in vivo genauso viele HSL wie in vitro? Sind HSL unabhängig von der Bakterienzahl im gesamten Mausgewebe verteilt? Oder spielt es eine Rolle, auf welcher Route die Mäuse infiziert wurden? Um dieses zu untersuchen, wurden Balb/c Mäuse mit *Y. enterocolitica* infiziert. Es wurden verschiedene Infektionsrouten gewählt, die Infektionsdauer betrug drei Tage. Die weiteren Vorgehensweisen sind in Abschnitt 2.2.4. beschrieben.

HSL wurden aus den Überständen der homogenisierten Organe und den Spülungen aus der Maus extrahiert und detektiert. Somit konnte erstmalig gezeigt werden, dass *Y. enterocolitica* in vivo tatsächlich HSL synthetisiert. Es zeigte sich außerdem, dass deren Menge unabhängig war vom Infektionsweg; egal ob die Mäuse i.p., i.v. oder oral mit den Yersinien infiziert wurden. Im Einklang mit den in vitro Ergebnissen, wurde auch in den Mäusen lediglich OHHL produziert. Je mehr Yersinien aus dem

jeweiligen Organ und Spülungen isoliert wurden, umso mehr HSL wurden extrahiert. So wurde nach einer intraperitonealen Infektion (Abb. 8a) eine große Menge an OHHL im Peritoneum extrahiert (I. a5) und detektiert (II. a5). Aus der Peritonealspülung wurde dort über 10^9 Yersinien isoliert, nach einer i.v. oder oralen Infektion waren es aber nur 10^7 , bzw. 10^4 Bakterien. Entsprechend konnten dort keine HSL detektiert werden (I./II. b5; c5). Umgekehrt war die Menge an extrahierten HSL nach einer intravenösen Infektion in der Leber (Abb. 8b) besonders hoch (I./II. b6). Unterschiedlich war jedoch die Sensitivität der Detektion von HSL in vitro und in vivo:

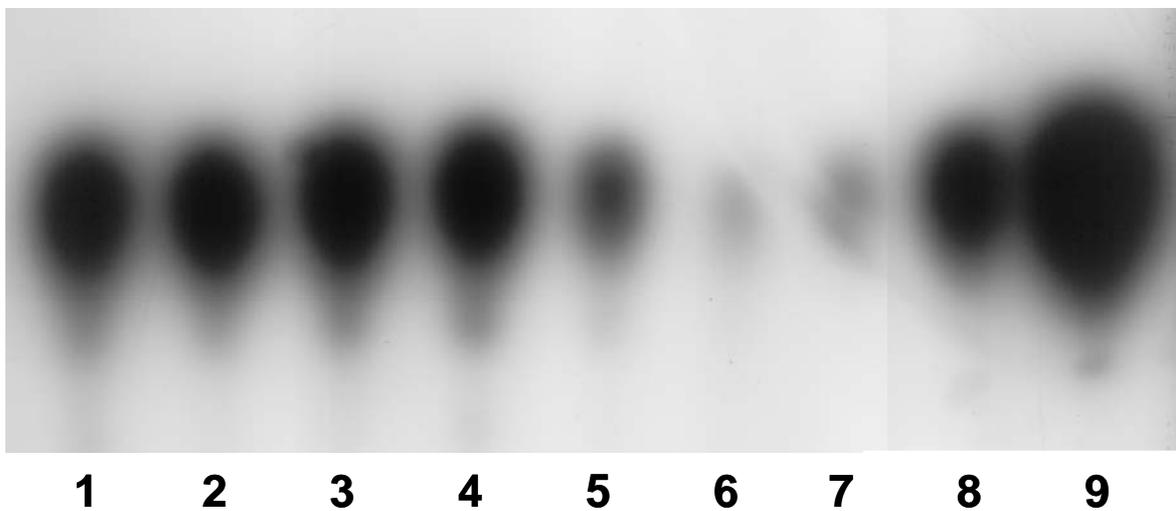


Abb. 9. DC aus Extrakten von Kontrollversuchen um die Effizienz der HSL-Extraktion in vivo zu bestimmen: Spuren 1-3: Darmspülung, Leberhomogenat, Milzhomogenat, respektiv. Jede Probe wurde mit dem Überstand von WA-P (5×10^7 Bakterien) versetzt. Spuren 4-6: Überstand von WA-P korrespondierend zu 5×10^7 , 2.5×10^7 and 1.25×10^7 Bakterien, respektiv; Spuren 7-9: synthetische OHHL: respektive 30fg, 80fg und 160fg.

während zur Detektion in vitro gewachsener 10^7 Yersinien (WA-P) ausreichten, konnten HSL nur in Organen und Spülungen detektiert werden, aus denen mindestens 10^8 Yersinien isoliert wurden. Somit wurde entweder I. in der Maus zehnfach weniger OHHL produziert oder II. es war zehnfach weniger OHHL in den Mausgeweben vorhanden oder III. die Sensitivität war zehnfach geringer (Fig. 9). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der HSL-Bioassay sensitiver war, als die direkte Extraktion und Konzentrierung der HSL mit Dichlormethan (Fig. 8). Kontrollexperimente wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob Mausgewebe und Spülungen die Extraktionseffizienz von HSL beeinflussen. So wurden Organhomogenate und Spülungen von fünf Mäusen mit jeweils 25 ml eines Überstandes einer üN-Kultur von WA-P versetzt und für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Nach einem

Zentrifugationsschritt wurden die HSL aus den Überständen mit Dichlormethan extrahiert und konzentriert. Die Menge an extrahierten HSL aus diesen Gemischen war nahezu identisch mit der Menge an HSL von Überständen ohne Mausgewebe oder Spülung (Abb. 9). Das Mausgewebe bzw. die Spülungen haben somit keinen signifikanten Einfluss auf die Extraktionseffizienz von HSL. So ist davon auszugehen, dass die Menge an extrahiertem HSL aus den Mausgeweben tatsächlich die der Menge an enthaltenden HSL entspricht.

3.5. QS-Mutanten von *Y. enterocolitica*

3.5.1. Konstruktion der Mutanten

Um den Einfluss von QS in *Y. enterocolitica* zu untersuchen, wurden entsprechende Mutanten konstruiert. Um möglichst stabile Mutanten zu bekommen, wurden diese mit Hilfe des „Red-vermittelten Genaustausches“ hergestellt. Hierbei werden Deletionsmutanten mit Hilfe eines Allelen-Austausches konstruiert. Es wurde das *yenR*-Gen deletiert und eine Doppelmutante von *yenI* und *yenR* hergestellt. Die entsprechenden Mutationen wurden mit Hilfe von Kontroll-PCRs bestätigt (Abb. 10).

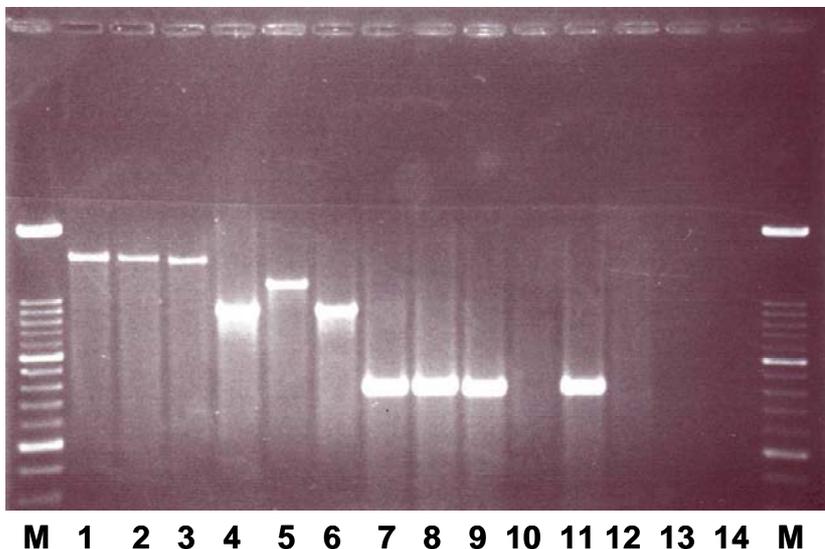


Abb. 10. Kontroll-PCR für die WA-P $_{yenI::kn}$ und WA-P $_{yenR/yenI::kn}$ Mutanten im Vergleich zum Wildtyp WA-P. M: 1kB Marker; Spuren 1-6, 13: PCR-Primer: YenRconETF-YenIconETR; Spuren 7-12, 14: YenIconETF-YenIconETR; Spuren 1-3, 7-9: WA-P-DNA; Spuren 4, 6, 10, 12: *YenR/yenI::kn* Mutanten-DNA; Spuren 5 und 11: *YenI::kn* Mutanten DNA; Spuren 13 und 14: Negativkontrollen.

Hierbei war die Größe des PCR-Fragments von WA-P 1509 Basen (Spuren 1-3) bzw. 829 Basen (Spuren 7-9). Bei den Mutanten waren die Größen der PCR-Produkte entsprechend. In einem weiteren Schritt wurden die Überstände dieser Mutanten und des Wildtyps mit Dichlormethan ausgeschüttelt um HSL zu isolieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletionsmutante WA-P $yenR/yenI::kn$ kein HSL produziert (Abb. 11., Spur 4). Die *yenR* Mutante produzierte jedoch weiterhin HSL (Abb. 11., Spur 3). Erstaunlicherweise und entgegen unseren Erwartungen produzierte diese Mutante ähnlich viel OHHL wie der Wildtyp. Die Mutanten wurden mit den entsprechenden Genabschnitten komplementiert. Hierfür wurden die Gene mit den entsprechenden PCR-Primern (Primerpaar YenIRBaF – YenIRSaR für das *yenR/yenI*-Fragment und Primerpaar YenRBaF – YenIRSaR für das *yenR*-Fragment) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den low copy Vektor pACYC184 kloniert. Die resultierenden Vektoren wurden pCJYenR und pCJYenRI benannt und in die entsprechenden Mutanten transformiert. Es zeigte sich, dass OHHL wieder synthetisiert wurde (Abb. 11; Spuren 6-8). Auffällig war, dass die mit dem entsprechenden Plasmid komplementierten Mutanten mehr HSL produzierten als der entsprechende Wildtyp. Dieses beruht wahrscheinlich auf einem Gendosiseffekt des Plasmids.

Es wurde ebenfalls versucht, eine *yenI*-Einzelmutante zu konstruieren. Obwohl Kanamycin-resistente Yersinien isoliert wurden, wurde trotzdem, wenn auch in einer

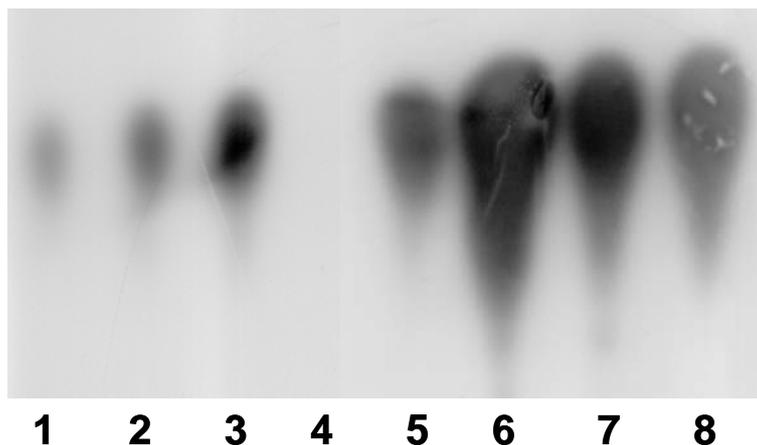


Abb. 11.: DC-Analyse (Autoradiographie) von Extrakten von in vitro angezüchteten Kulturen von 2: WA-P $yenI::kn$; 3: WA-P $yenR::kn$; 4: WA-P $yenR/yenI::kn$; 5: WA-P; 6: WA-P $yenI::kn$ [pCJYen RI]; 7: WA-P $yenR::kn$ [pCJYenR]; 8: WA-P $yenR/yenI::kn$, [pCJYenRI]; 1: synthetisches OHHL

geringeren Menge, OHHL

synthetisiert (Abb. 11.; Spur 2). Das entsprechende PCR-Produkt war jedoch kleiner als das des Wildtyps (Abb. 11.; Spur 5). Zukünftige Experimente und Kontrollen müssen zeigen, ob sich die Kanamycinkassette tatsächlich in den gewünschten Genabschnitt integriert hat und somit *yenI* ausgeschaltet hat.

In weiteren Versuchen wurde das Wachstumsverhalten der QS-Mutanten *in vitro* bei 27 °C in LB-Medium untersucht. Es sollte geschaut werden, ob sich das Wachstum in den verschiedenen Konstrukten unterscheidet. Dazu wurde eine ΔN -Kultur verdünnt und schüttelnd inkubiert. Die OD wurde nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Es zeigte sich, dass die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ähnlich schnell und zu einer ähnlichen Dichte wuchsen (Abb. 12), so dass sie sich im Wachstumsverhalten nicht zu unterscheiden schienen. Um die Mutanten weiter zu charakterisieren, wurden die Gesamtzellproteine gewonnen und mit Hilfe der 2-D-SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es ist bereits gezeigt worden, dass sich die QS-Mutanten in dem Gesamtzellproteinen unterscheiden. In welchen Proteinen sich die Mutanten von dem Wildtyp unterscheiden, wurde jedoch nicht untersucht (Throup et al., 1995).

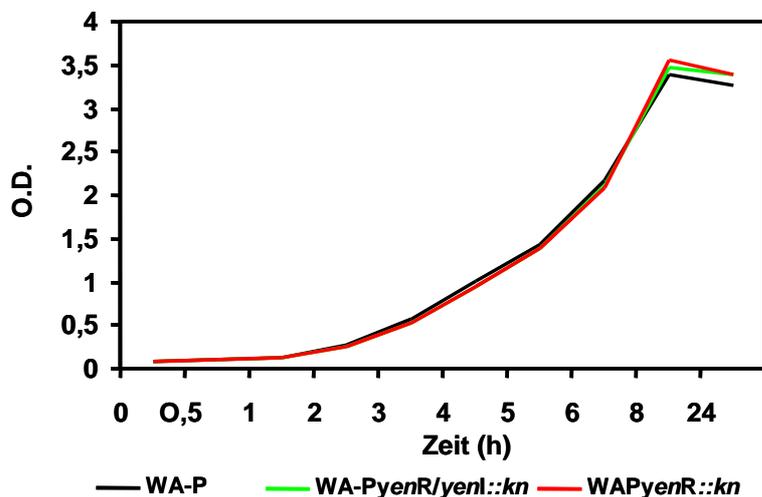
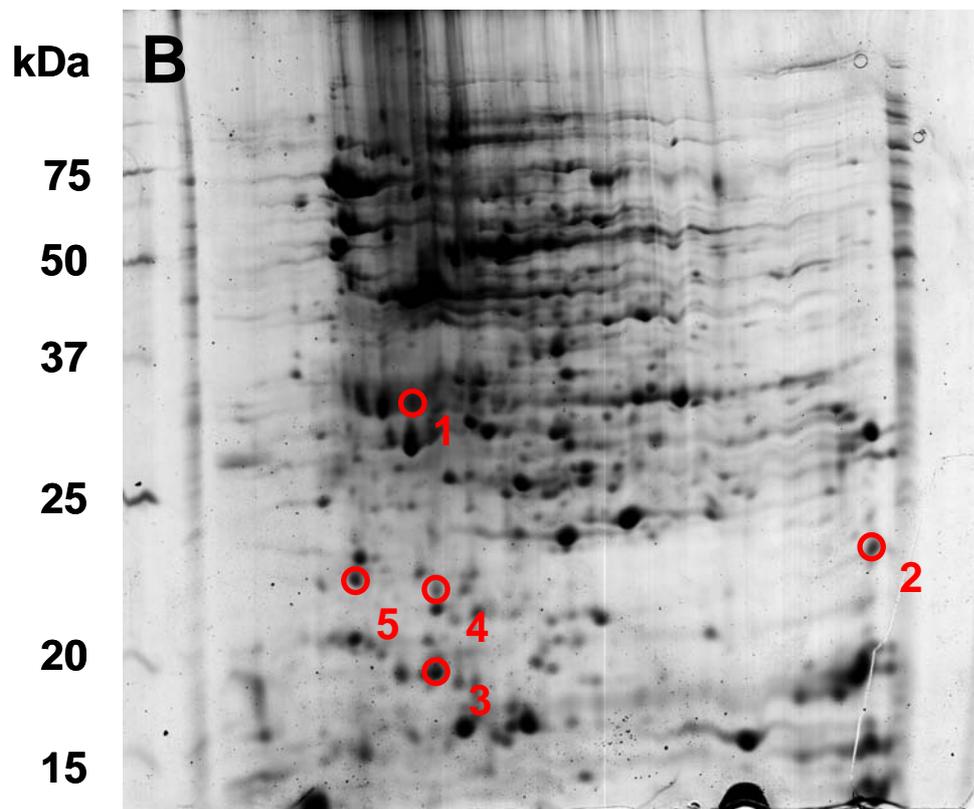
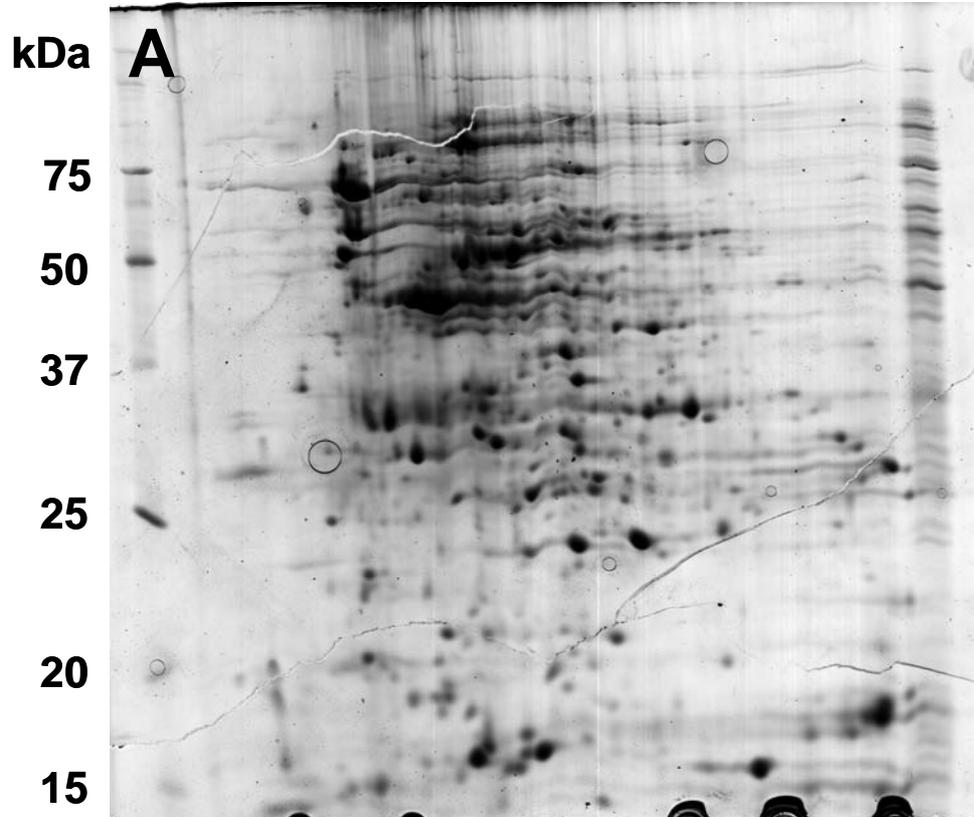


Abb. 12. Wachstumskurve der Mutanten im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp WA-P (mit Hilfe der optischen Dichte (OD 600) bestimmt)

3.5.2. Charakterisierung der Mutanten mit 2-D-SDS-PAGE

Um die Mutanten weiter zu charakterisieren, wurden die Gesamtzellproteine der Mutanten mit Hilfe der 2-D-SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem Wildtyp WA- P



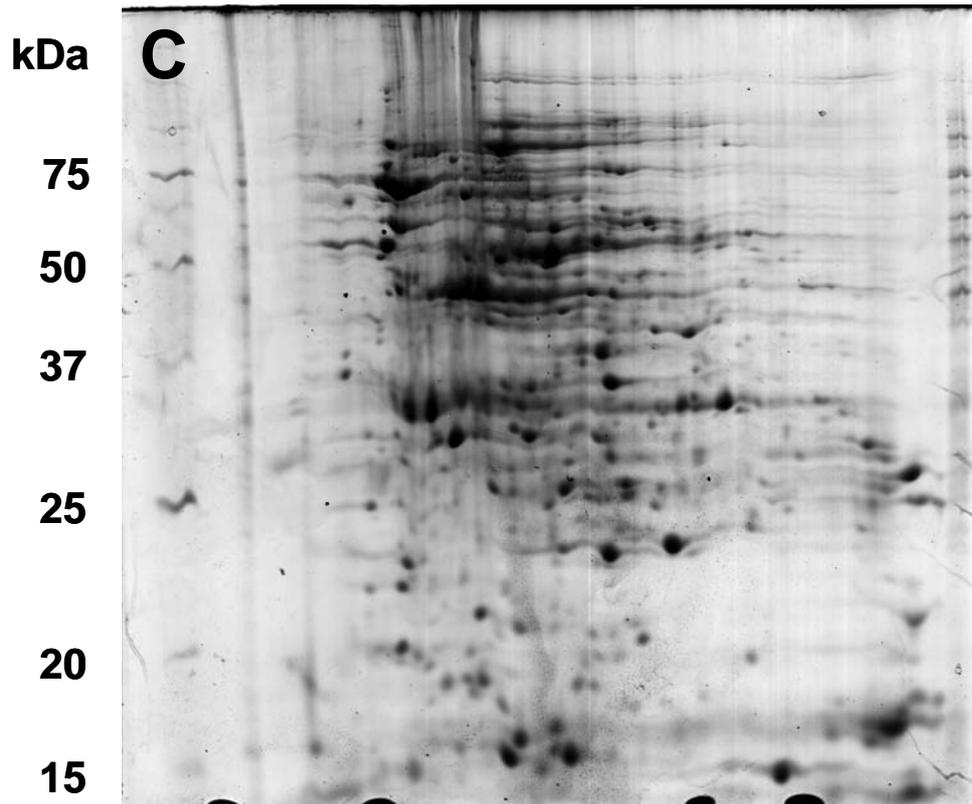


Abb.13. 2-D-SDS-Gelelektrophorese von Gesamtzellprotein (1mg) von

A: WA-P

B: WA-PyenR/yenl::kn

C WA-PyenR::kn

Die Bakterien wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. In B sind mit einem Kreis differentiell produzierte Proteine markiert, die ansequenziert worden sind:

1: Elongation Faktor Ts

2: Mixtur aus gi71528 und gi4557703

3: Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase

4: Single-strand binding Protein

5: Inorganic Pyrophosphatase

verglichen. Sowohl die *yenR*- und die *yenR/yenI*-Mutanten als auch der Wildtyp WA-P wurden in der logarithmischen Wachstumsphase „geerntet“. Nach einer entsprechenden Behandlung dieser Proteine wurden diese in zwei Dimensionen aufgetrennt. Die Gele wurden lediglich visuell verglichen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde noch zweimal wiederholt und konnte weitgehend reproduziert werden. Man erkennt eine Vielzahl von Proteinen, die differentiell produziert werden. Aus dem Gel der *yenR/yenI*-Mutante wurden fünf differentiell produzierte Proteinspots mittels MALDI-TOF ansequenziert. Während sich ein Proteinspot als ein Gemisch von zwei Proteinen herausstellte, waren die übrigen vier Proteine in dem Energiestoffwechsel der Bakterien involviert. Während beispielsweise das „Single-strand-binding-Protein“ nur in der *yenR/yenI*-Mutante gefunden wurde, wurde sowohl die „Inorganic Pyrophosphatase“ wie auch die „Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase“ im Wildtyp

weniger stark produziert als in den Mutanten. Es ist bekannt, dass QS in der Regulation von Stoffwechselfvorgängen involviert ist (zum Beispiel Chen et al., 2003). Um eine solche Aussage auch bei *Yersinia* treffen zu können, müssen noch weitere

Nr.	Protein	Funktion	Konsensus zur Lux Box	Literatur
1	Elongation Faktor TS (31 kDa)	katalysiert die Bindung von as an die Polypeptidkette	GTTAGGGGGGCCCTTATAGGC CCC CTTTGCATATCTAATGTGAGATTT TGTCTTCACAAGAGAACCGAGGA AATTTAAATG	
3	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (19 kDa)	katalysiert die Umwandlung der cis-trans - Peptidbindungen	C ACTTTTTCGCCCATAAAGGC AG CAGAACGAGTACTGACTCAATCTC AGAGATATGATATAAGAGCCGTCT AAAGAGTTACGACTCATTGTGAA TACACCTATTACACTAGCAGGAAC A TTATT ATG	Henriksson 2004
4	Single-strand binding Protein (Homotetramer von 19 kDa)	ist in allen Aspekten des DNA-Metabolismus involviert : Replikation, Reparatur und Rekombination	GAC ACCGCCAGTACGAAACGGG CA ATTATGACACAAAAAACCTGA ATGGATATCCAGTGTTTGGTTGTA ATTTAGGTAGATGTTGCGATAGAA CTGCAATATATTTTCGCAGTTATGA TCATCCGTGTTGTTAACAGTTAG CGTGTAAACTTACTGGTTTATAC TTTA TAAATTTAT TTCATCAGGA GAGTTCACATG	Meyer 1990
5	Inorganic Pyrophosphatase (19 kDa)	ist in der ATP-Gewinnung involviert	CCTCGCGGAGCAAGCCGGT GGT AAAGCCACCGATGGGGTGAACCG TATTCTGGACATCGTGCCAGAGA AA CTGCATCAAC GCGCACCGTT CTTCGTGGGAACAAAATCCAGGT GGAAGATGCGGAAGGGTTTATCG CTA AATTCCCAGATGAAGAAGCC AAGTAACTTGCAAGTAATGCCGTC GCTCCCTTCAAAAATAAGCTAACA GCG GCCTTTTAAGCCGCTGTTTT TTATTTCTAACGGAATAAAATAGC CCTACCTCTGGCTATCCAACGTCA T CTGACAATGA AAAGGACAGG AATTCATAAAAGACTTGGCTATAA TAGCCAGCACTCCATTTCTGGTTT GA TAAAGGAAACCGACATG	

Tab. 4. Darstellung der Promotorregionen der identifizierten Protein-kodierenden Gene: Die Lux-Box ist in rot, die identischen, konservierten Reste sind fett und unterstrichen. Die -35 und -10 Boxen sind in grün wobei jeweils die beste Vorhersage berücksichtigt ist. Das Start-Codon ist in gelb markiert.

Proteine identifiziert werden. Auch muss geklärt werden, inwieweit die putativen „Lux-Boxen“ überhaupt eine Rolle in der Regulation spielen. Mit einer Identität von 45-55%

ist es nicht sicher, ob sie überhaupt funktionell sind. Durch Reportergen- und Mutationsanalysen müssen diese offenen Fragen geklärt werden.

3.5.3. *Yen*-Mutanten und Pathogenität

Um zu untersuchen, ob die Mutationen in *yenR* und *yenR/yenI* einen Einfluss auf die Pathogenität haben, wurden Balb/c Mäuse mit den Mutanten oder mit dem Wildtyp

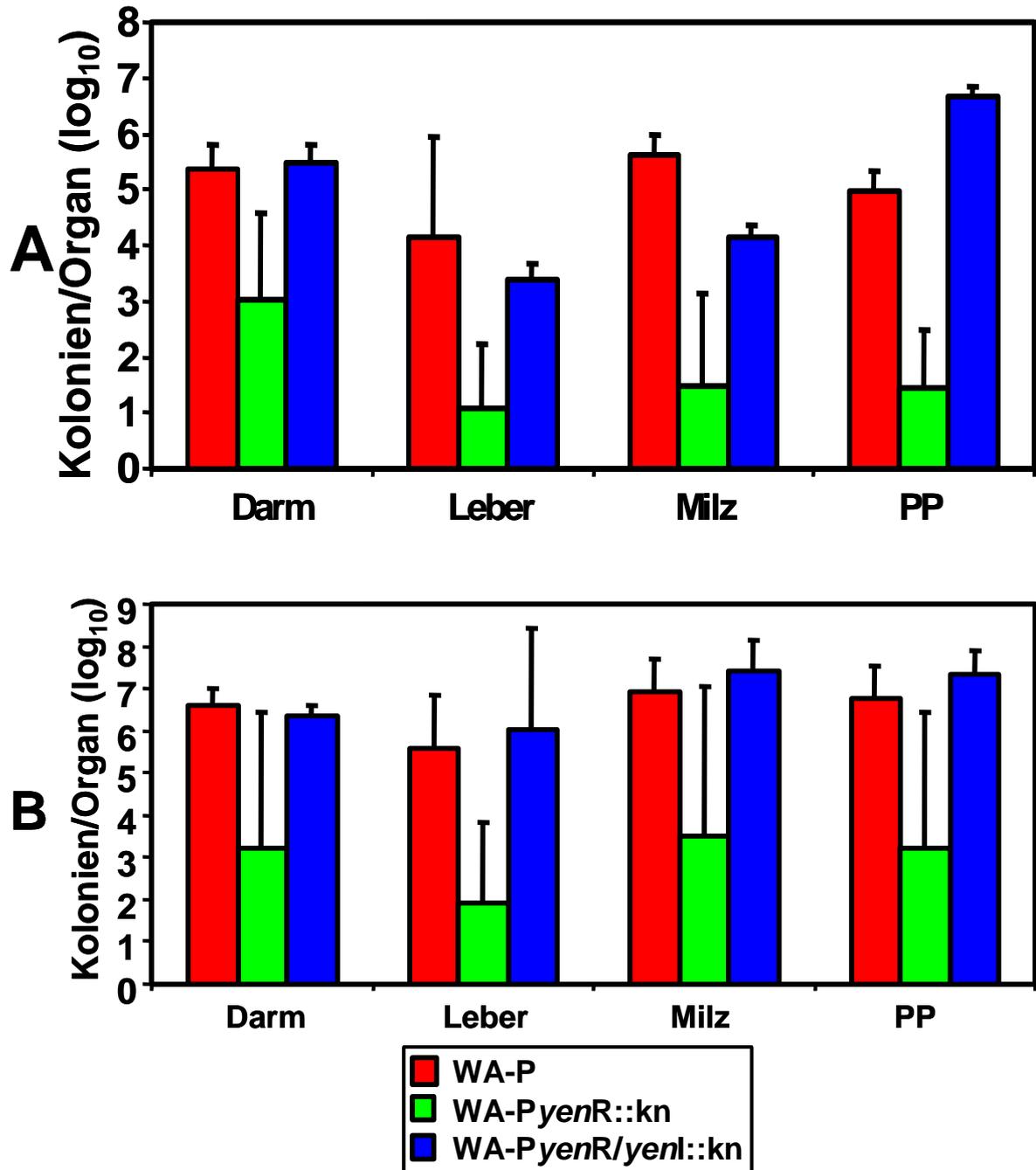


Abb.14. Zeitverlauf (A: nach 2 Tagen; B: nach 4 Tagen) der Kolonisierung der *Y. enterocolitica* WA-P Mutanten und dem Wildtyp nach einer oralen Infektion von Balb/c Mäusen. Die Zahlen repräsentieren die durchschnittlichen Zahlen rückisolierter Bakterien (in log) von jeweils 8 Mäusen.

oral infiziert. Die Mäuse wurden am Tag zwei und Tag vier getötet. Es wurde eine Darmspülung durchgeführt, die Organe entnommen und homogenisiert. Aliquots aus entsprechenden Verdünnungsreihen wurden ausplattiert und nach 48 h wurden die Kolonien gezählt und auf die Kolonien pro Organ errechnet. Die durchschnittliche Anzahl Kolonien von acht Mäusen wurden graphisch dargestellt.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Zahlen der rückisolierten Yersinien von den Mutanten und dem Wildtyp. Erstaunlicherweise war die *yenR*-Mutante weniger virulent als die *yenR/yenI*-Doppelmutante. Während die Besiedlung mit Yersinien im Durchschnitt pro Organ bei der *yenR*-Mutante ca. 2-4 Logstufen geringer als die des Wildtyps war, waren die Keimzahlen der *yenR/yenI*-Mutante ähnlich wie die Zahlen des Wildtyps. Hierbei befanden sich besonders in der Leber eine geringere Zahl der *yenR*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die *yenR/yenI*-Mutante schien jedoch leicht attenuiert zu sein, da ihre Zahlen in der Milz und Leber am Tag zwei geringer waren als am Tag vier im Vergleich zum Wildtyp. Im Darm und in den Peyer Plaques waren die Zahlen jedoch identisch zum Wildtyp. Im Allgemeinen jedoch war der Infektionsverlauf über vier Tage ohne signifikante Änderungen: auch nach vier Tagen war die Besiedlung der *yenR*-Mutante pro Organ deutlich geringer. Die Bakterienzahlen der Mutante *yenR* waren am Tag zwei in den Organen geringer als im Darm, während sich die Zahlen zwei Tage später diesbezüglich angleichen. Da die Mäuse oral infiziert wurden, war dieses erwartungsgemäß.

3.6. AiiA

Das Protein AiiA (Autoinducer inhibitor A) ist ein 28 kDa schweres, aus 246 Aminosäuren bestehendes Enzym, welches den Laktoring der Homoserinlaktone hydrolytisch zu spalten vermag (Wang et al., 2004). Dieses Enzym wurde aus einer *Bacillus*-Spezies einer Bodenprobe isoliert und charakterisiert.

Es sollte hier untersucht werden, inwieweit AiiA in der Lage ist, das von *Y. enterocolitica* produzierte OHHL hydrolytisch zu spalten und dadurch zu zerstören. Im Zuge dessen sollten hierfür verschiedene Plasmidkonstrukte hergestellt werden.

3.6.1. Herstellung der AiiA-Konstrukte

Zum einen wurde ein Expressionsvektor konstruiert, um AiiA im großen Maßstab rekombinant herstellen und reinigen zu können. Zum anderen wurden verschiedene

Fusionsproteine mit AiiA hergestellt, um den Einfluss von AiiA auf die bakterielle Kommunikation zu untersuchen.

Für die Herstellung des Expressionsvektors wurde *aiiA* mit einem PCR-Primer-Paar amplifiziert, das eine *EcoRV* oder eine *XhoI* Restriktionsstelle enthielt. Das aufgerei-

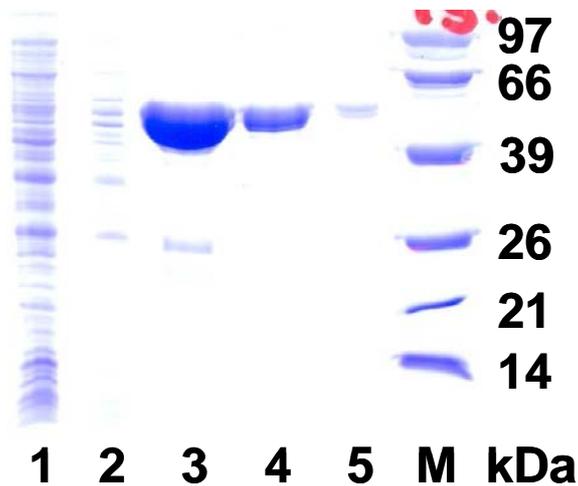
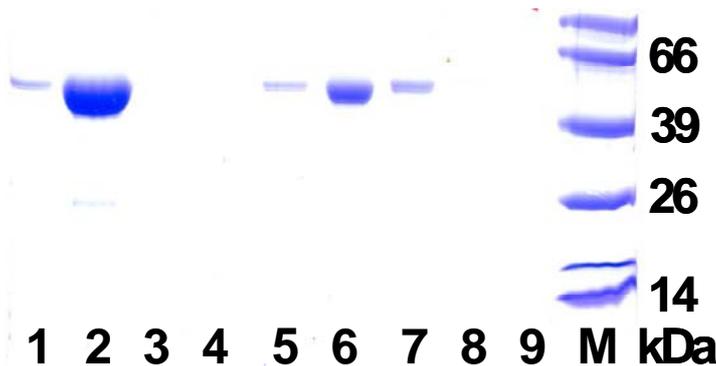


Abb. 15. SDS-PAGE von AiiA-GST Fusionen nach der Isolierung (links) und dann nach der Säulenreinigung (unten).

Links: Spur 1 und 2: Gesamt-zelllysat vor bzw. nach der Induktion mit IPTG, Spuren 3 und 4: erstes bzw. zweites Eluat. Spur 5: Sepharose-Kugeln nach der Elution. M: Marker.

Unten: Spur 1: Sepharose-Kugeln nach der Elution. Spur 2: Auftrag auf die Sephadex Säule. Spuren 3-9: Gewonnene Fraktionen # 9, 11, 14, 16, 18, 20, 23 von der Säule (jeweils 5µl aufgetragen). M: Marker.



nigte PCR-Produkt wurde in den Expressionsvektor pGEX kloniert. Nach der Induktion zur Produktion des Proteins wurden die Bakterien aufgeschlossen (Abb. 15, links) das Protein an Sepharose-Kugeln gebunden und über eine FPLC Superdex Säule gereinigt. Die verschiedenen Proteinfractionen wurden auf SDS-PAGE-Gelen kontrolliert (Abb. 15, unten). Es konnte gezeigt werden, dass nach Induktion durch IPTG AiiA-GST (56 kDa groß) im Bereich von mehreren Milligramm synthetisiert wurde (Abb. 15 links, Spur 3: 56 kDa (AiiA 28 kDa, GST 28 kDa)). Das Eluat (Abb. 15 links, Spur 3) wurde anschließend auf eine FPLC-Säule aufgetragen. Die Fraktion # 16 (Abb. 15 unten, Spur 6) enthielt am meisten AiiA-GST-Fusionsprotein. Diese Fraktion wurde für die weiteren Experimente (siehe unten) verwendet.

Desweiteren wurden sowohl Genfusionen zwischen dem *lac*-Operon und *aiiA* und zwischen dem *Yersinia yopE* und *aiiA* hergestellt. Während das Lac-AiiA Fusionsprotein konstitutiv produziert wurde, wurden die YopE-AiiA Fusionsproteine nur nach

Induktion bei 37°C und Ca-Depletion synthetisiert und sezerniert. Mit diesen verschiedenen Konstrukten können wir den Einfluss von AiiA auf die von den

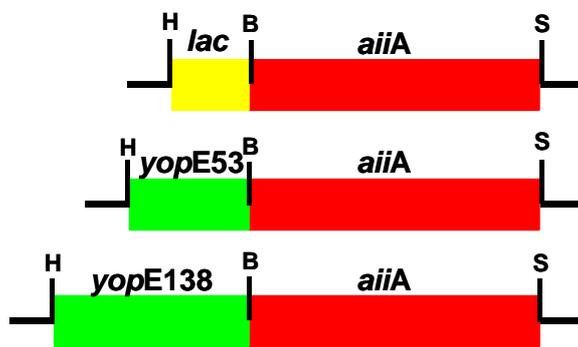


Abb. 16. Schematische Darstellung der Genfusionen mit *aiiA* in dem Plasmid pACYC184; H: *HindIII*, B: *BamHI*, S: *SalI* Restriktionsenzyme. „53“ und „138“ sind die Anzahl der Aminosäuren.

Yersinien produzierten OHHL

untersuchen. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden mit PCR-Primern amplifiziert und sequenziell in das Plasmid pACYC184 (Plasmid mit wenigen Kopien im Bakterium) kloniert. Hierfür wurden die Restriktionsschnittstellen *HindIII*, *BamHI* und *SalI* benutzt (Abb. 16). Die YopE₅₃-AiiA und YopE₁₃₈-AiiA Hybride sollten vom *Yersinia*-Proteinsekretionssystem sezerniert und in die eukaryontische Zielzelle transloziert werden.

3.6.2. Experimente mit den AiiA-Konstrukten

Es stellte sich heraus, dass das gereinigte, rekombinante AiiA weiterhin seine enzymatische Aktivität besitzt. Es spaltete den Laktoring hydrolytisch. Es wurden Überstände vom Wildtyp WA-P mit verschiedenen Verdünnungen von AiiA-GST inkubiert. Danach wurde das Sensorbakterium *E. coli* [pSB403] hinzugefügt und über Nacht inkubiert. Die Lumineszenz war selbst bei einer hohen Verdünnung von AiiA nur ca. 5% (Spur 3; wenige Nanogramm) der Lumineszenzintensität der Positivkontrolle ohne dem AiiA (Abb. 17).

Ähnliche Versuche wurden mit den Konstrukten von Abschnitt 3.6.1. durchgeführt. Im Fall der YopE-AiiA-Konstrukte wurden die Yop-Sekretion der rekombinanten Yersinien durch Inkubation bei 37°C in BHI-Medium induziert. In der SDS-PAGE zeigten sich Proteinbanden, die der Größe der Fusionsproteine entsprachen. Dieses wurde durch einen Immunoblot (Abb. 18.) mit einem Anti-YopE Antikörper bestätigt. Um die tatsächliche Degradation von OHHL durch das AiiA zu bestimmen, wurden die Überstände der entsprechenden Bakterien mit Dichlormethan extrahiert. Während das Lac-AiiA Konstrukt wenig Einfluss auf die Menge an HSL hatte, wurde nur eine geringe Menge von OHHL bei 27°C aus den Überständen der Yersinien

extrahiert, die zusätzlich das YopE₅₃-AiiA oder das YopE₁₃₈-AiiA Konstrukt tragen. Kein OHHL wurde aus dem Überstand von diesen rekombinanten Yersinien extra-

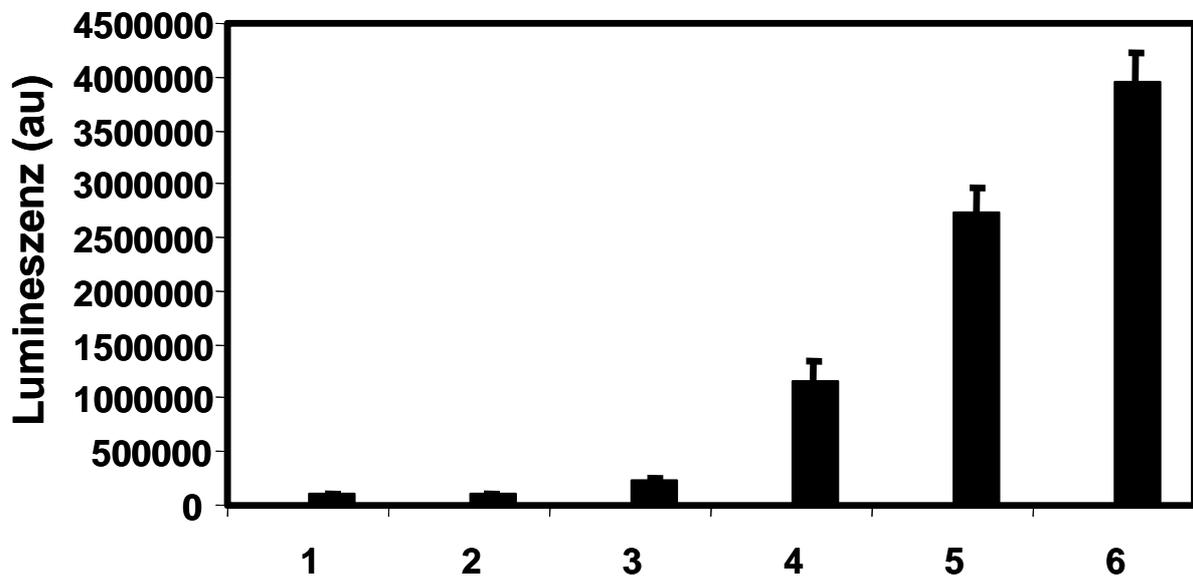


Abb. 17. Rekombinantes AiiA degradiert OHHL von WA-P. 50µl WA-P Überstand (stationäre Phase) wurde mit dem Biosensor *E.coli*[pSB403] (50µl) versetzt. Hinzugefügt wurde rekombinantes AiiA der Fraktion # 16: 1: 20 µl; 2: 4 µl; 3: 0,8 µl; 4: 0,16 µl; 5: 0,03 µl und in 6: keine Zugabe (Positivkontrolle). Inkubation üN bei 30°C

hiert, die bei 37°C in BHI-Medium inkubiert wurden. Hierbei kam es zur Induktion der Yop-Produktion und anschließender Sekretion: auch das Fusionsprotein YopE-AiiA wurde produziert, welches dann das OHHL enzymatisch spaltet. In der Folge konnte das OHHL nicht mehr extrahiert werden.

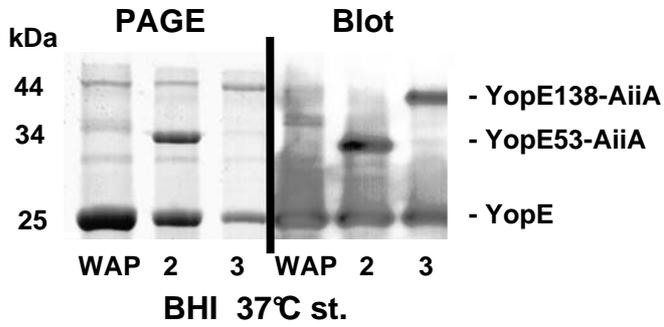
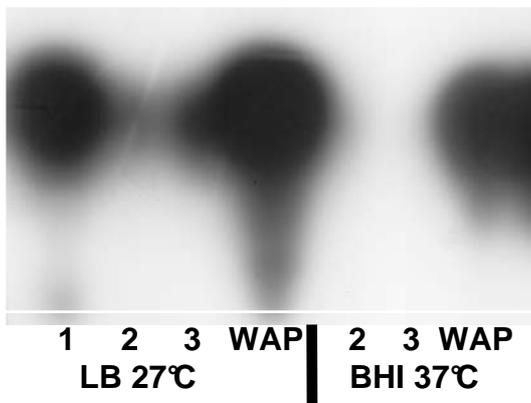


Abb. 18. oben: SDS PAGE und korrespondierendem Westernblot (entwickelt mit Anti-YopE Antikörper) von Überständen von *Y. enterocolitica* WA-P: Ausgangsstamm, 2: WA-P[pCJYopE53-AiiA], 3: WA-P[pCJYopE138-AiiA]. Links: DC Analyse von Überständen der Stämme (siehe oben) 1: WA-P [pCJLac-AiiA] LB: Standard-; BHI-Sekretionsmedium



4. Diskussion

QS wurde bei *Yersinia enterocolitica* 1995 erstmalig beschrieben. Die Homoserinlaktone HHL und OHHL wurden aus den entsprechenden Bakterienüberständen extrahiert. Gleichzeitig sind die entsprechenden *luxR/I*-Homologe *yenR/I* identifiziert worden. Die Gene wurden mutiert und zeigten in der 2-D-SDS-Gelelektrophorese im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp ein unterschiedliches Proteinexpressionsmuster (Throup et al., 1995). In einer zweiten Veröffentlichung wurde QS bei *Y. pseudotuberculosis* beschrieben. Hierbei wurden zwei *luxR/I*-Homologe gefunden, *ypsR/I* und *ytbR/I* welche sowohl HHL, OHHL wie auch C8-HSL synthetisieren. Wurde *ypsR* mutiert, so kam es zu einer Verklumpung und zur verstärkten Produktion einer Flagellin-Untereinheit. Zusätzlich kommt es zu einer erhöhten Motilität, welches auch bei der *ypsl*-Mutante der Fall ist. (Atkinson et al., 1999). Ob und inwieweit QS die Pathogenität von Yersinien beeinflusst, blieb in diesen beiden Arbeiten offen.

4.1. Detektion von HSL in vitro

Für die Detektion von HSL in vitro, wurden in dieser Arbeit einerseits der Biosensor Stamm *E. coli* [pSB403] mit Überständen von Yersinien versetzt und andererseits wurden die Überstände von *Y. enterocolitica* mit Dichlormethan extrahiert und mit Hilfe der DC aufgetrennt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Nottingham (Throup et al., 1995) wurde nur ein einziger Typ von HSL isoliert und detektiert: N-(3-Oxohehexanoyl)-L-Homoserinlaktone (OHHL). Die Kollegen hatten zusätzlich auch N-(Hexanoyl)-L-Homoserinlaktone (HHL) aus Überständen von *Y. enterocolitica* Stamm 10460 extrahiert. Dabei handelte es sich bei diesem Stamm jedoch um ein Umweltisolat der Serogruppe 01. Auf der Ebene von Aminosäurehomologien ist YenI von der Serogruppe 01 zu 98,6% homolog zu YenI von *Y. enterocolitica* der Serogruppe 08. Da von uns wie auch von der Arbeitsgruppe aus Nottingham derselbe Biosensor Stamm *E. coli* [pSB403] eingesetzt wurde, sind wahrscheinlich die unterschiedlichen Serogruppen der Grund für den Unterschied. Es ist ebenfalls bekannt, dass sich Bakterien unterschiedlicher Serogruppen, insbesondere wenn sie in unterschiedlichen ökologischen Nischen vorkommen, auch genomisch unterscheiden (Samrakandi et al., 2002). Bei *Y. pseudotuberculosis* wurde gezeigt, dass drei verschiedene HSL hergestellt werden können, das Bakterium aber nur zwei verschiedene Synthesegene besitzt. Wurde ein Synthesegen mutiert, so war *Y. pseudotu-*

berculosis jedoch immer noch in der Lage, alle drei HSL zu synthetisieren. Die Synthese der HSL geht über S-Adenosyl-L-Methionin, die genauen Schritte der Synthese sind jedoch noch weitgehend ungeklärt (Watson et al., 2002). Es ist anzunehmen, dass die Synthese von OHHL und HHL denselben Weg geht, am Ende wird die Oxogruppe an HHL synthetisiert. Die Temperatur scheint aber auch einen Einfluss darauf zu haben, welches HSL gebildet wird (Atkinson et al., 1999). Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde andererseits bei *Pseudomonas aeruginosa* in der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose gezeigt, dass sich die Zusammensetzung und die Menge an HSL über Jahre nicht ändert (Geisenberger et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Menge an OHHL bei *Y. enterocolitica* WA-P und WA-C proportional zur Bakteriendichte steigt. In der spät logarithmisch bis stationären Phase, wenn die Menge an OHHL am größten ist, müssen mindestens 10^7 Yersinien im Medium sein, damit OHHL detektiert werden konnte. Während die Menge an OHHL in der stationären Phase stabil blieb, nahm die Lumineszenzintensität im gleichen Zeitraum bei WA-C um etwa 15% ab. Inwieweit die Yops daran beteiligt sind, bleibt zu klären. In der Arbeit von Bleves et al. (2005) wurde bei *P. aeruginosa* gezeigt, dass dort QS das Typ III-Sekretionssystem negativ reguliert. Auf der DC sah man keine Unterschiede in der Menge. Ob eine DC einen Mengenunterschied von 15% detektieren kann, ist jedoch fraglich. Interessanterweise waren die Mengen an isolierten OHHL unterschiedlich bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen des gleichen Stammes. Weniger OHHL wurden aus diesen Überständen von Yersinien isoliert, die im Eisenmangelmedium gewachsen waren. Das QS mit dem Eisenstoffwechsel interagiert ist bekannt, so wird das bakterielle Wachstum sowohl von exogenen Siderophoren wie auch durch exogene HSL stimuliert (Guan et al, 2000; Stintzi et al., 1998). Da das Bakterienwachstum aber in diesem Medium geringer ist, wurde als Folge auch weniger HSL synthetisiert. Ebenso gering war die Menge bei Wachstum bei 37°C in BHI-Medium (Induktion der Yop-Produktion). Es bleibt zu klären, ob tatsächlich die Yops die Synthese der HSL beeinflussen: der pYV-lose Stamm WA-C, der keine Yops produziert, synthetisiert ebenfalls weniger HSL. Als Ursache kann die erhöhte Temperatur von 37°C in Betracht kommen, welche die Stabilität der HSL beeinflussen könnte. Das Virulenzplasmid scheint somit keinen Einfluss auf die Produktion von HSL zu haben. Dünnschichtchromatographisch wurde die gleiche Menge von OHHL bei pYV-haltigen wie pYV-losen Stämmen (27°C) detektiert. Interessanterweise produzierte

der mausvirulente *Y. enterocolitica*-Stamm 8081, Serogruppe 08, nur ca. 1/10 der Menge an OHHL wie der Stamm WA-P. Auf Aminosäuren-Ebene ist das YenI von WA-P 98,6% homolog zu YenI von *Y. enterocolitica* 8081 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/Y_enterocolitica/). Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Der Stamm 8081 wächst genauso gut wie WA-P.

4.2. Detektion von HSL im Mausinfektionsmodell

Die direkte Extraktion und Detektion von QS-Molekülen aus mit Bakterien infizierten Tieren ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden. In der Vergangenheit wurden lediglich die Sputen von Patienten mit Cystischer Fibrose mit Dichlormethan extrahiert. Es wurden HSL detektiert (Middleton et al., 2002).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob I. *Y. enterocolitica* im Mausinfektionsmodell HSL synthetisiert und II. diese extrahiert und detektiert werden kann. So wurden Balb/c Mäuse auf unterschiedlichen Wegen (i.v., i.p. oder oral) mit *Y. enterocolitica* WA-P infiziert. Nach einer Infektionsdauer von drei Tagen wurden die Tiere getötet und deren Organe homogenisiert., die Homogenate zentrifugiert und der Überstand mit Dichlormethan extrahiert. Ebenso wurde mit den Darm- und Peritonealspülungen verfahren. HSL konnte aus allen untersuchten Mausgeweben in unterschiedlichen Mengen extrahiert werden. Wie in der in vitro Situation, wurde auch hier ausschließlich OHHL detektiert. Deren Menge hing von der Zahl der aus diesem Organ isolierten Yersinien ab. Die Infektionsroute schien somit keine Rolle bei der Produktion und Verteilung von HSL in den einzelnen Organen zu haben. Die Kommunikation mit HSL findet unabhängig von der Route statt. Die HSL wurden somit nur aus den Organen extrahiert, die mit Yersinien stark infiziert waren. So scheinen sich die HSL nicht im gesamten Organismus zu verteilen, sie bleiben dort, wo sie synthetisiert worden sind. Während in vitro der Überstand von 10^7 Yersinien ausreicht, müssen es in vivo mindestens 10^8 Yersinien sein, um detektiert zu werden. Um auszuschließen, dass die geringere Extraktionseffizienz durch einen störenden Einfluss des Mausgewebes verursacht wird, wurden entsprechende Kontrollversuche durchgeführt. Diese bestätigten, dass das Mausgewebe die Effizienz der Extraktion grundsätzlich nicht beeinflusst. Die Unterschiede der OHHL-Produktion zwischen der in vitro- und der in vivo-Situation könnten folgende sein: I. Yersinien produzieren weniger OHHL in der Maus; II. die HSL könnten nach deren Produktion rasch von dem Mausgewebe abgebaut und ausgeschieden werden oder

direkt über den Blutkreislauf und der Niere ausgeschieden werden. Somit würden sie ihrer Extraktion/Detektion entgehen; III. sie gelangen nach der Produktion sofort in die eukaryontischen Zellen der Maus und sind so ebenfalls für die Extraktion nicht zugänglich. Tatsächlich wurde erst kürzlich gezeigt, dass HSL in der Lage sind, in Säugetierzellen zu gelangen. Diese Zellen waren vorher mit einem Reportersystem transfiziert worden (Williams et al., 2004). Natürlich kann es auch sein, dass die Yersinien bei einer erhöhten Temperatur nicht mehr soviel OHHL produzieren oder OHHL bei 37°C instabil ist. Tatsächlich wurde *in vitro* bei 37°C weniger OHHL detektiert. Ob dieses mit einer geringeren Produktion oder Stabilität zu tun hat bleibt zu klären.

4.3. Herstellung von QS-Mutanten von *Y. enterocolitica*

Mutanten im QS-System wurden mit Hilfe des Red-vermittelten Allelen-Austausches generiert. Diese PCR-basierte Methode stellt stabile Mutanten her (Datsenko et al., 2000). Insbesondere für *in vivo*-Studien ist die Stabilität der Konstrukte essentiell. So wurde eine *yenR*-Einfach- und eine *yenR/yenI*-Doppelmutante hergestellt, welches sowohl durch einen PCR-Assay wie auch durch einen funktionellen Assay (Extraktion der HSL) bestätigt wurde. Trotz mehrfachen Versuchen misslang jedoch die Herstellung einer *yenI*-Einfachmutante. Obwohl in den entsprechenden Versuchen die Antibiotika-Resistenz vorlag, wurde wenn auch reduziert OHHL produziert. Wurden diese Stämme mit Hilfe der PCR kontrolliert, so entsprachen die resultierenden PCR-Banden denen des Wildtyps. Das intakte *yenI*-Gen konnte somit nachgewiesen werden.

4.3.1. Proteomvergleich von WA-P und *yen*- Mutanten

In einem ersten Schritt soll der Einfluss der Mutationen auf die Synthese der Gesamtzellproteine der Bakterien im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. Hierfür wurde das Gesamtzellprotein der jeweiligen Bakterien mit Hilfe der 2-D-SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Bakterien wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Es fand sich eine große Anzahl von differentiell produzierten Proteinen, einige wurden in den Mutanten vermehrt, einige weniger oder gar nicht produziert. Um einen ersten Eindruck zu bekommen, welche Arten von Proteine differentiell produziert werden, wurde eine Auswahl ansequenziert. In diesem ersten „Screen“ fanden sich ausschließlich Proteine des Zellstoffwechsels; ein Protein

welches bei der DNA-Replikation eine Rolle spielt oder auch ein Protein welches in der Translation involviert ist. Während beispielsweise das „Single-strand binding Protein“ nur in der *yenR/yenI*-Mutante gefunden wurde, wurde die „Inorganic Pyrophosphatase“ im Wildtyp weniger stark produziert als in den QS-Mutanten. Wird das QS-System mutiert, so werden die von diesem System abhängige Gene hochreguliert. Dieses sind Gene, deren Produkte in den Stoffwechsel eingreifen. Dieses macht insofern Sinn, da QS die Bakterien für die stationäre Phase vorbereitet. In dieser Phase sollten Proteine, die in den Stoffwechsel eingreifen, nur geringfügig oder gar nicht mehr produziert werden (Lazazzera, 2000; Chen et al., 2003). Der Promotorbereich von jedem dieser Gene wurde nach Homologiebereichen für „Lux-Boxen“ abgesucht. Es sind in den vier Genen (Tab. 4) in Promotorbereich Sequenzen mit 45-55% Identität zur „Lux-Box“ zu finden. Dieses ist nicht sehr hoch, denn bei zufällig ausgewählten Sequenzen mit ähnlicher Länge finden sich immer Bereiche mit ähnlicher Identität. Im Falle des Elongationsfaktors „TS“ überlappt die mögliche Lux-Box tatsächlich mit der -35 Promotor Region. Jedoch ist hier eine „Lux-Box“ mit einer 45% Identität eher unwahrscheinlich. Ob diese Lux-ähnlichen Elemente funktionieren kann nur experimentell durch Mutationsanalysen oder Reportergenkonstrukte getestet werden. Auch wenn es bereits mehrfach beschrieben worden ist, dass QS in der Regulation von Stoffwechselfvorgängen involviert ist (Lazazzera, 2000; Chen et al., 2003), bedarf dieses noch weiteren Untersuchungen. Dieses gilt insbesondere für die Relevanz der „Lux-Boxen“ in den entsprechenden Proteinen. Bei *Y. pseudotuberculosis* wurde gefunden, dass QS bei der Beweglichkeit der Bakterien eine Rolle spielt (Atkinson et al., 1999). Der zugrunde liegende Regulationsmechanismus ist noch völlig ungeklärt., so dass die Regulation von Stoffwechselfvorgängen durchaus in Betracht kommt. Eingehendere Untersuchungen in der Zukunft sollten dieses klären. QS bei *Yersinia* scheint somit eine zentrale Rolle in der Genregulation einzunehmen. Es wurde bereits gezeigt, dass QS eine zentrale Rolle in der bakteriellen Physiologie spielt, bei der QS-Wege sich mit „Starvation Response“-Wegen überlappen, um den Zelleintritt in die stationäre Phase zu regulieren (Lazazzera, 2000). Andererseits ist es aber erstaunlich, dass die Mutanten ein ähnliches Wachstumsverhalten haben wie die entsprechenden Wildtyp-Bakterien.

4.3.2. Yen-Mutanten und Pathogenität

Den Einfluss von QS von *Y. enterocolitica* WA-P auf die Virulenz wurde in dem bereits bekannten Balb/c Mausinfektionsmodell untersucht. Hierfür wurden Balb/c Mäuse oral mit den entsprechenden Mutanten infiziert. Zum Vergleich wurden Mäuse mit dem Wildtyp WA-P infiziert und die Zahl der rückisolierten Bakterien aus den einzelnen Organen nach einer Infektionsdauer von zwei und vier Tagen bestimmt. Erstaunlicherweise wurde eine Attenuierung der Virulenz bei der *yenR*-Mutante nachgewiesen, während die *yenR/yenI*-Doppelmutante nur sehr schwach attenuiert zu sein scheint. Lediglich an Tag zwei nach Infektion waren hier die Keimzahlen dieser Mutante in Milz und Leber geringer als beim Wildtyp, während die Zahlen im Darm und in den Peyer Plaques sehr ähnlich waren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Doppelmutante mit einer Verzögerung systemisch wird. Nach vier Tagen sind die Zahlen der isolierten Mutanten wieder sehr ähnlich denen des Wildtyps. Denkbar wäre die Möglichkeit, dass YenR ein zentraler Regulator ist, der unter anderem hierarchisch über der OHHL-Synthase YenI steht. Ist nun dieser Regulator defekt, so sind zentrale Funktionen in Verbindung mit der OHHL-Synthese der Bakterien gestört, so dass die Virulenz attenuiert ist. Anders bei einer Doppelmutation in *yenR/yenI*: bei dieser Konstellation könnte von Anfang an ein anderer Weg, OHHL-unabhängig, gegangen werden. In der Folge kommt es zu keiner Attenuierung der Virulenz, zumindest zu keiner Attenuierung im oralen Mausinfektionsmodell. Ob dieses einen Einfluss im i.v.- oder i.p.-Infektionsmodell hat, bleibt abzuwarten. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen Tag zwei und Tag vier nach Infektion bezüglich der Virulenz. Die Zahl der rückisolierten Bakterien ist jedoch erwartungsgemäß höher zum späteren Zeitpunkt.

Der Einfluss von QS auf die Virulenz wurde am intensivsten bei *P. aeruginosa* von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Hier wurde der Einfluss der HSL auf eukaryontische Zellen untersucht. Es wurde gezeigt, dass N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlaktone (OdDHL) die Proliferation von Lymphozyten und die Produktion von TNF α durch LPS-stimulierte Makrophagen inhibiert. Weiterhin reguliert OdDHL die Produktion von IL-12 herunter, in hoher Konzentration inhibiert es die Antikörperproduktion in Milzzellen und in niedrigen Konzentrationen stimuliert es die Antikörperproduktion. Außerdem scheint es die IgE-Produktion durch IL-4 stimulierte humane mononukleäre Blutzellen zu stimulieren (Telford et al., 1998). Pseudomonaden, die OdDHL nicht mehr produzieren, haben größte Schwierigkeiten, die Lun-

gen von Mäusen zu kolonisieren. Wird OdDHL in die Haut von Mäusen injiziert, so kommt es zur Induktion von mRNAs von Zytokinen (z.B. IL-6) und Chemokine (z.B. MIP-2) sowie zur Produktion von Cyclooxygenase 2. Außerdem werden T-Zellen aktiviert, die IFN- γ produzieren (Smith et al., 2002). In einer weiteren Studie, die den Effekt von OdDHL auf das Immunsystem untersucht, wurde aber auch gezeigt, dass I. die Produktion von Zytokinen relativ unspezifisch ist und II., es zu keiner spezifischen Th1- oder Th2-Immunantwort kommt (Ritchie et al., 2003). Wurden neutrophile Zellen und Monozyten mit OdDHL inkubiert, so kommt es zur Apoptose, welche jedoch nicht bei epithelialen Zellen (z.B. HEp-2) auftritt (Tateda et al., 2003). Eine andere Arbeit zeigte, dass OdDHL tatsächlich in eukaryontische Zellen gelangt. Dieses wurde durch ein Reportersystem gezeigt (Williams et al., 2004).

Der Einfluss von QS auf die Virulenz wurde aber auch in anderen Bakterien studiert. So wurde gezeigt, dass QS-Regulatoren in der Regulation von *Vibrio cholera* Virulenz involviert sind. Sind diese Regulatoren mutiert, so hat die Mutante größte Schwierigkeiten den Dünndarm zu kolonisieren (Zhu et al., 2002). Eine andere Arbeit zeigte, dass das *cep*-QS-System von *Burkholderia cepacia* ursächlich für den Tod des Nematoden *C. elegans* verantwortlich ist (Kothe et al., 2003). QS bei EHEC wurde ebenfalls intensiv untersucht; es moduliert die Regulation der Virulenz des Bakteriums durch das Typ III-Sekretionssystem und ist ebenso involviert in der Kommunikation mit dem Wirt durch das Hormon Epinephrine (Sircili et al., 2004; Sperandio et al., 2003).

4.4. AiiA

Das Protein AiiA (Autoinducer inhibitor A) spaltet den Laktonring der HSL enzymatisch und zerstört diese somit. Dieses Enzym, die Laktonase, wurde bei einem „Screen“ von Bodenproben aus einer *Bacillus*-Spezies isoliert und charakterisiert. Es wurde beschrieben, dass eine rekombinante, mit dem Laktonasegen transfizierte Tabakpflanze resistent ist gegenüber einer Infektion mit dem Pflanzenpathogen *Erwinia carotovora* (Dong et al., 2000).

Es wurden verschiedene AiiA-Konstrukte mit Hilfe der PCR hergestellt. Zum einen sollte AiiA rekombinant hergestellt und gereinigt werden und zum anderen sollten verschiedene Fusionsproteine mit dem *Yersinia* YopE hergestellt werden. Zusätzlich wurde ein Konstrukt hergestellt, welches das AiiA konstitutiv produziert. Hierfür wurde das Lac-Operon verwendet. Das produzierte Lac-AiiA bleibt intrazellulär.

Es wurde gezeigt, dass das rekombinante AiiA enzymatisch aktiv ist. Wurde das rekombinante AiiA zu Überständen von Yersinien gegeben, so wurden im Vergleich zu Kontrollen nur noch weniger als 5% OHHL nachgewiesen, gemessen an der Lumineszenzintensität im Reporter-gen-Assay. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das YopE-AiiA-Fusionsprotein nach Stimulation bei 37°C in BHI-Medium OHHL degradiert: somit ist AiiA weiterhin funktionell. Erstaunlicherweise wird OHHL von Yersinien, die AiiA konstitutiv produzieren, nicht degradiert. Das Lac-AiiA Fusionsprotein verbleibt, im Gegensatz zu YopE-AiiA, intrazellulär und OHHL kann dort nicht degradiert werden. Eine andere Möglichkeit besteht, dass OHHL so rasch aus der Bakterienzelle diffundiert, dass es nicht so schnell degradiert werden kann.

4.5. Ausblick

Welche Rolle QS für die Pathogenese von *Y. enterocolitica* spielt, bleibt letztlich noch ungeklärt. Überraschend ist der Befund, dass die *yenR/yenI*-Doppelmutante ähnlich virulent ist wie der Wildtyp, die *yenR*-Mutante aber attenuiert ist. Um dieses weiter zu untersuchen, müssen die jeweiligen Mutanten entsprechend komplementiert werden. Aber auch weiterführende Untersuchungen bezüglich der 2-D-SDS-Gelelektrophorese müssen unternommen werden, insbesondere Studien mit Reporter-genkonstrukten, um zu bestätigen, dass QS in *Y. enterocolitica* Stoffwechselfvorgänge reguliert. Ebenso sollten Experimente mit dem rekombinanten AiiA durchgeführt werden; zum Beispiel könnte man Balb/c Mäuse mit dem Protein füttern, und diese dann gleichzeitig mit WA-P infizieren. Sind die Yersinien durch die fehlende Kommunikation in ihrer Virulenz attenuiert?

AiiA und andere Inhibitoren des QS sind verheißungsvolle Substanzen, um die Kommunikation von Bakterien zu beeinflussen. Diese Substanzen können die Basis neuartiger Strategien zur Bekämpfung von Infektionserkrankungen sein. Hierfür gibt es bereits verschiedene Beispiele. Initial wurde die AiiA-produzierende Tabakpflanze beschrieben, die resistent war gegenüber den pflanzenpathogenen *Erwinia* (Dong et al., 2000). Ein weiteres Beispiel sind Furanone. Furanone werden von verschiedenen Meeresalgen als Sekundärmetabolite produziert, die als Antagonist des bakteriellen QS dienen. Es wurde gezeigt, dass Furanone QS inhibieren. Im „Lungen“-Mausinfektionsmodell wurden die inokulierten *Pseudomonas aeruginosa* sehr viel schneller aus der Lunge eliminiert: auch war die pathologischen Veränderungen an der Lunge nicht mehr so deutlich. (Hentzer et al., 2003a; Wu et al., 2004). Es wurde

weiterhin gezeigt, dass Infektionen mit Biofilm-bildenden Bakterien potentiell mit Furanonen behandelt werden können (Hentzer et al., 2003b). Ähnliche Ergebnisse konnten im marinen Bereich erzielt werden, als Fische mit dem Fischpathogen *V. anguillarum* infiziert wurden, aber auch gleichzeitig Furanone bekamen. Diese Forellen wiesen eine weitaus geringere Mortalität auf als nicht behandelte Fische (Rasch et al., 2004).

Diese Untersuchungen sind noch weit entfernt von einer Anwendung im humanmedizinischen Bereich. Jedoch zeigt es, dass es durchaus möglich ist, Bakterien auch ohne die klassischen Antibiotika erfolgreich zu bekämpfen.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde Quorum Sensing (QS) in dem mauspathogenen Bakterium *Yersinia enterocolitica* WA-P Serogruppe 08 in vitro und im Mausinfektionsmodell untersucht. QS beschreibt das Phänomen, welches Einzelbakterien erlaubt, die Anzahl der Bakterien innerhalb einer Population über die Konzentration von Signalmolekülen zu messen. Der untersuchte Stamm synthetisiert lediglich das N-(3-Oxohehexanoyl)-Homoserinlaktone (OHHL) als Signalmolekül, während Yersinien anderer Serogruppen über ein weiteres Homoserinlaktone (HHL) verfügen. Es wurde gezeigt, dass die OHHL-Produktion von den Wachstumsbedingungen abhängt aber auch stammspezifisch sein kann. So synthetisierte der Stamm 8081 der gleichen Serogruppe 08 unter vergleichbaren Wachstumsbedingungen nur 1/10 der Menge an OHHL wie der Stamm WA-P. Der Überstand von mindestens 10^7 Yersinien musste extrahiert werden, um OHHL detektieren zu können. Erstmals wurde aus *Yersinia*-infiziertem Mausgewebe (Leber, Milz und Peyer Plaques) und aus dem Darm und Peritoneum HSL isoliert. Für die Detektion im Mausgewebe mussten aus dem jeweiligen Organhomogenat mindestens 10^8 Yersinien isoliert werden. Auf welchem Wege (oral, i.v. oder i.p.) die Mäuse mit den Yersinien infiziert wurden, hatte keinen Einfluss auf die OHHL-Menge im Gewebe. Es gelang mit einer neuartigen Rekombinationsmethode, dem „Red-vermittelten Genaustausch“, eine *yenR*-Mutante wie auch eine *yenR/yenI*-Doppelmutante herzustellen. Virulenztests mit den Mutanten zeigten eine Attenuierung der *yenR*-Mutante, während die *yenR/yenI*-Doppelmutante ähnlich virulent war wie der Wildtyp. Die Proteome der *Yen*-Mutanten wurden mittels 2D-SDS-PAGE mit denen des Mutterstammes verglichen. Dabei wurden vier differentiell produzierte *YenR/YenI*-abhängige Proteine identifiziert, die am Energiestoffwechsel beteiligt sind und in der Doppelmutante vermehrt synthetisiert wurden. Da QS in der Doppelmutante nicht stattfinden kann, könnte der Weg zum Übergang in die stationäre Phase versperrt sein. In der Folge werden weiterhin Stoffwechselgene exprimiert. Diese Ergebnisse müssen allerdings noch durch Komplementierungsexperimente überprüft werden. Es wurde ebenso die Degradation von OHHL durch die Laktonease AiiA in Yersinien untersucht. Es wurde AiiA sowohl rekombinant hergestellt, wie auch Fusionsproteine konstruiert. Behandlung der Überstände von Yersinien mit AiiA führte erwartungsgemäß zu einer Degradation von OHHL. Einen ähnlichen Effekt konnte auch bei Yersinien

beobachtet werden, die ein YopE-AiiA Fusionsprotein produzierten. AiiA ist ein Beispiel für ein neuartiges Antiinfektivum.

Literaturverzeichnis

- Aepfelbacher, M., R. Zumbihl, K. Ruckdeschel, C.A. Jacobi, C. Barz, and J. Heesemann. 1999.** The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: A pathogen's strategy to resist host defense. *Biol. Chem.* **380**:795-802.
- Ahvonen, P., K. Sievers, and K. Aho. 1969.** Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *Acta Rheumatol. Scand.* **15**:232-253.
- Ahvonen, P., and K. Dickhoff. 1974.** Uveitis, episcleritis and conjunctivitis associated with *Yersinia* infection. *Acta Ophthalmol. Suppl. Copenh.* **123**:209-212.
- Aleksic, S., and J. Bockemühl. 1990.** Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. *Immun. Infect.* **18**:178-185.
- Anand. 2003.** Quorum sensing and expression of virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* **85**:1-9.
- Atkinson, S., J.P. Throup, G.S. Stewart, and P. Williams. 1999.** A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol. Microbiol.* **33**:1267-77.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1989.** *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley&Sons, Inc., New York.
- Blevess, S., C. Soscia, P. Nogueira-Orlandi, A. Lazdunski, and A. Filloux. 2005.** Quorum Sensing Negatively Controls Type III Secretion Regulon Expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* **187**:3898-902.
- Beuscher, H.U., F. Rödel, A. Forsberg, and M. Röllinghoff. 1995.** Bacterial evasion of host immune defense: *Yersinia enterocolitica* encodes a suppressor for tumor necrosis factor alpha expression. *Infect. Immun.* **63**:1270-1277.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* **7**:1513-1523.
- Bissett, M.L., C. Powers, S.L. Abbott, and J.M. Janda. 1990.** Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency and serotype distribution. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 910-912.
- Bliska, J.B., J.C. Clemens, J.E. Dixon, and S. Falkow. 1992.** The *Yersinia* tyrosine phosphatase: specificity of a bacterial virulence determinant for phosphoproteins in the J774A.1 macrophage. *J. Exp. Med.* **176**:1625-1630.
- Bliska, J.B., M.C. Copass, and S. Falkow. 1993.** The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infect. Immun.* **61**:3914-3921.
- Blumberg, H.M., J.A. Kiehlbauch, and I.K. Wachsmuth. 1991.** Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* O:3 infections: use of chromosomal DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2368-2374.
- Bouza, E., A. Dominguez, M. Meseguer, L. Buzon, D. Boixeda, M.J. Revillo, L. de Rafael, and J. Martinez Beltran. 1980.** *Yersinia enterocolitica* septicemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **74**:404-409.
- Bolin, I., A. Forsberg, L. Norlander, M. Skurnik, and H. Wolf-Watz. 1988.** Identification and mapping of the temperature-inducible, plasmid encoded proteins of *Yersinia* spp. *Infect. Immun.* **56**:342-348.
- Bolin, I., D.A. Portnoy, and H. Wolf-Watz. 1985.** Expression of the temperature-inducible outer membrane proteins of yersiniae. *Infect. Immun.* **48**:234-240.

- Bottone, E.J. 1977.** *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. CRC. Crit. Rev. Microbiol. **5**:211-241.
- Brenner, D.J. 1979.** Speciation in *Yersinia*. Contrib. Microbiol. Immunol. **5**:33-43.
- Brett, S.J., A.V. Mazurov, I.G. Charles, and J.P. Tite. 1993.** The invasin protein of *Yersinia* spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins. Eur. J. Immunol. **23**:1608-1614.
- Burrows, T.W., and G.A. Bacon. 1956.** The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence. Br. J. Exp. Pathol. **37**:481-493.
- Chang, A.C.Y., and S.N. Cohen. 1978.** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the the P15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. **134**:1141-1156.
- Chen, H., M. Teplitski, J.B. Robinson, B.G. Rolfe, and W.D. Bauer. 2003.** Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. J Bacteriol. **185**:5029-36.
- China, B., M.P. Sory, B.T. N'Guyen, M. de Bruyere, and G.R. Cornelis. 1993.** Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. Infect. Immun. **61**:3129-3136.
- Cornelis, G.R., M.P. Sory, Y. Laroche, and I. Derclaye. 1986.** Genetic analysis of the plasmid region controlling virulence of *Yersinia enterocolitica* 0:9 by Mini-Mu insertions and *lac* gene fusions. Microb. Pathog. **1**:349-359.
- Cornelis, G., Y. Laroche, G. Balligand, M.P. Sory, and G. Wauters. 1987b.** *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. Rev. Infect. Dis. **9**:64-87.
- Cornelis, G., J.-C. Vanooteghem, and C. Sluifers. 1987.** Transcription of the *Yop* regulon from *Y. enterocolitica* requires transacting pYV and chromosomal genes. Microb. Pathogen. **2**:367-379.
- Cornelis, G.R., C. Sluifers, C.L. Lambert de Rouvroit, and T.Michiels. 1989.** Homology between *virF*, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and *AraC*, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. J. Bacteriol. **171**:254-262.
- Cornelis, G.R., T. Biot, C. Lambert de Rouvroit, T. Michiels, B. Mulder, C. Sluifers, M.P. Sory, M. Van Bouchaute, and J.C. Vanooteghem. 1989b.** The *Yersinia* Yop regulon. Mol. Microbiol. **3**:1455-1459.
- Cornelis, G.R. 1994.** *Yersinia* pathogenicity factors. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **192**:243-263.
- Cornelis, G.R. A. Boland, A.P. Boyd, C.Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M.P. Sory, and E. Stainier. 1998.** The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**:1315-1352.
- Cover, T.L., and R.C. Aber.1989.** *Yersinia enterocolitica*. N. Engl. J. Med. **321**:16-24.
- Currie, M.G., K.F. Fok, J. Kato, R.J. Moore, F.K. Hamra, K.L. Duffin, and C.E. Smith. 1992.** Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**:947-951.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:6640-6645
- Delor, I., and G.R. Cornelis. 1992.** Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. Infect. Immun. **60**:4269-4277.

- Dong, Y.H., Xu J.L., Li X-Z. Zhang, L.H. 2000.** AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. Proc Natl Acad Sci U S A. **97**:3526-31.
- Dequeker, J., R. Jamar, and M. Walravens. 1980.** HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. J. Rheumatol. **7**:706-710.
- Eberhard, A, A.L. Burlingame, C. Eberhard, G.L. Kenyon, K.H. Neilson, and N.J. Oppenheimer. 1981.** Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase.. Biochemistry. **20**:2444-9.
- Eberl, L. 1999.** N-acyl homoserine lactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. Syst. Appl. Microbiol. **22**:493-506.
- Ennis, E., R.R. Isberg, and Y. Shimizu. 1993.** Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial beta 1 integrin ligand invasin. J. Exp. Med. **177**:207-212.
- Forsberg, A., A.M. Viitanen, M. Skurnik, and H. Wolf-Watz. 1991.** The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. Mol. Microbiol. **5**:977-986.
- Frederiksen, W. 1964.** A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella X*). Proc. 14th. Scand. Congr. Path. Microbiol. 103-104.
- Fuqua, W.C., S.C. Winans, and E.P. Greenberg.1994.** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol. **176**:269-75.
- Galyov, E.E., S. Hakansson, A. Forsberg, and H. Wolf-Watz. 1993.** A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. Nature **361**:730-732.
- Geisenberger, O., M. Givskov, K. Riedel, N. Hoiby, B. Tummler, and L. Eberl. 2000.** Production of N-acyl-L-homoserine lactones by *P. aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. FEMS Microbiol. Lett. **184**:273-8.
- Grassl, G.A., E. Bohn, Y. Muller, O.T. Buhler, and I.B. Autenrieth. 2003.** Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. Int J Med Microbiol. **293**:41-54.
- Guan, L.L., H. Onuki, and K. Kamino. 2000.** Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic N-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions. Appl Environ Microbiol **66**: 2797-803.
- Hakansson, S., T. Bergman, J.C. Vanooteghem, G. Cornelis, and H. Wolf-Watz. 1993.** YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. Infect. Immun. **61**:71-80.
- Hakansson, S., E.E. Galyov, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz. 1996.** The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. Mol. Microbiol. **20**:593-603.
- Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**:557-580.
- Hanski, C., U. Kutschka, H.P. Schmoranzer, M. Naumann, A. Stallmach, H. Hahn, H. Menge, and E.O. Riecken. 1989.** Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. Infect. Immun. **57**:673-678.
- Hanski, C., M. Naumann, A. Grutzkau, G. Pluschke, B. Friedrich, H. Hahn, and E.O. Riecken. 1991.** Humoral and cellular defense against intestinal murine infection with *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. **59**:1106-1111.

- Henke, J.M., and B.L Bassler. 2004.** Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol.* **14**:648-56
- Heesemann, J., B. Algermissen, and R. Laufs. 1984.** Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **46**:105-110.
- Heesemann, J., U. Gross, N. Schmidt, and R. Laufs. 1986.** Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect. Immun.* **54**:561-567.
- Heesemann, J., C. Eggers, and J. Schröder. 1987.** Serological diagnosis of yersiniosis by immunoblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic *Yersinia*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **9**:285-289.
- Heesemann J., and Grüter L. 1987.** Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS. Microbiol. Lett.* **40**:37-41.
- Heesemann, J. 1987.** Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS. Microbiol. Lett.* **48**:229-233.
- Heesemann, J. 1990.** Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden. *Immun. Infekt.* **18**:186-191.
- Heesemann, J., and K. Gaede. 1989.** Mechanisms involved in the pathogenesis of *Yersinia* infections. *Rheumatol. Int.* **9**:213-217.
- Henriksson, L.M., P. Johansson, T. Unge, and S.L. Mowbray. 2004.** X-ray structure of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Biochem.* **271**:4107-13.
- Hentzer, M., L. Eberl, J. Nielsen, and M. Givskov. 2003a.** Quorum sensing : a novel target for the treatment of biofilm infections. *BioDrugs.* **17**:241-50.
- Hentzer, M., H. Wu, J.B. Andersen, K. Riedel, T.B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M.A. Schembri, Z. Song, P. Kristoffersen, M. Manefield, J.W. Costerton, S. Molin, L. Eberl, P. Steinberg, S. Kjelleberg, N. Hoiby, and M. Givskov. 2003b.** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO.* **22**:3803-3815.
- Hoiczyk, E, A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann.2000.** Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* **19**:5989-99.
- Holmstrom, A., R. Rosqvist, H. Wolf-Watz, and A. Forsberg. 1995.** Virulence plasmid encoded YopK is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systemic infection in mice. *Infect. Immun.* **63**:2269-2276.
- Hoogkamp Korstanje, J.A., J. de Koning, and J. Heesemann. 1988.** Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man. *Infection.* **16**:81-85.
- Isberg, R.R.1989.** Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of enteropathogenic *Yersinia* species. *Mol. Microbiol.* **3**:1449-1453.
- Iriarte, M., J.C. Vanooteghem, I. Delor, R. Diaz, S. Knutton, and G.R. Cornelis. 1993.** The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **9**:507-520.
- Iriarte, M., and G.R. Cornelis 1998.** YopT, a new *Yersinia* effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol. Microbiol.* **29**:915-929.
- Iriarte, M., M.P. Sory, A. Boland, A.P. Boyd, S.D. Mills, I. Lambermont, and G.R. Cornelis. 1998.** TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.* **17**:1907-1918.

- Jacobi, C.A., S. Gregor, A. Rakin, and J. Heesemann. 2001.** Expression analysis of the yersiniabactin receptor gene *fyuA* and the heme receptor hemR of *Yersinia enterocolitica* in vitro and in vivo using the reporter genes for green fluorescent protein and luciferase. *Infect. Immun.* **69**:7772-
- Jacobi, C.A., A. Bach, L. Eberl, A. Steidle, and J. Heesemann. 2003.** Detection of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone in mice infected with *Yersinia enterocolitica* serotype O8. *Infect. Immun.* **71**:6624-6.
- Knapp, W. 1988.** Die Gattung *Yersinia*-Yersiniosen, p. 348-358. In H. Brandis and G. Pulverer (ed.), *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*.
- Kayser, B., J. Eckert, and R. Zinkernagel. 2001.** *Medizinische Mikrobiologie*. 10. ed. Stuttgart: GeorgThieme Verlag. 300-303.
- Kerschen, E.J., D.A. Cohen, A.M. Kaplan, and S.C. Straley. 2004.** The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect Immun.* **72**:4589-602.
- Kothe, M., M. Antl, B. Huber, K. Stoecker, D. Ebrecht D, I. Steinmetz I, and L. Eberl. 2003.** Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the cep quorum-sensing system. *Cell Microbiol* **5**:343-51.
- Kulich, S.M., T.L. Yahr, L.M. Mende-Mueller, J.T. Barbieri, and D.W. Frank. 1994.** Cloning the structural gene for the 49-kDa form of exoenzyme S (*exoS*) from *Pseudomonas aeruginosa* strain 388. *J. Biol. Chem.* **269**:10431-10437.
- Lambert de Rouvroit, C.L., C. Sluifers, and G.R. Cornelis. 1992.** Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **6**:395-409.
- Larsen, J.H. 1979.** The spectrum of clinical manifestations of infections with *Yersinia enterocolitica* and their pathogenesis. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **5**:257-269.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Lazazzera, B.A. 2000.** Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr Opin Microbiol.* **3**:177-82.
- Lee, L.A., A.R. Gerber, D.R. Lonsway, J.D. Smith, G.P. Carter, N.D. Puhr, C.M. Parrish, R.K. Sikes, R.J. Finton, and R.V. Tauxe. 1990.** *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *N. Engl. J. Med.* **322**:984-987.
- Leung, K.Y., B.S. Reisner, and S.C. Straley. 1990.** YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect. Immun.* **58**:3262-3271.
- Lian, C.J., W.S. Hwang, and C.H. Pai. 1987.** Plasmid-mediated resistance to phagocytosis in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **55**:1176-1183.
- Lindler, L.E., M.S. Klempner, and S.C. Straley. 1990.** *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. *Infect. Immun.* **58**:2569-2577.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989.** *Molecular Cloning*. ; C. Nolan, N. Ford, and M. Ferguson, editors. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Martinez, R.J. 1983.** Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **41**:921-930.

- Middleton, B., H.C. Rodgers, M. Camara, A.J. Knox, P. Williams, and A. Hardman. 2002.** Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiol. Lett.* **207**:1-7.
- Miller, M.B. and B.L. Bassler. 2001.** Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:165-99.
- Miller, V.L., B.B. Finlay, and S. Falkow. 1988.** Factors essential for the penetration of mammalian cells by *Yersinia*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **138**:15-39.
- Miller, V.L., and S. Falkow. 1988.** Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* **56**:1242-1248.
- Miller, V.L., J.J. Farmer, W.E. Hill, and S. Falkow. 1989.** The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect. Immun.* **57**:121-131.
- Miller, V.L., J.B. Bliska and S. Falkow. 1990.** Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica ail* gene and characterization of the Ail protein product, *J. Bacteriol.* **172**:1062-1069.
- Miller, V.L., K.B. Beer, G. Heusipp, B.M. Young, and M.R. Wachtel. 2001.** Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol Microbiol.* **41**:1053-62.
- Nealson, K.H., T. Platt, and J.W. Hastings. 1970.** Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol.* **104**:313-22.
- Orth, K., L.E. Palmer, Z.Q. Bao, S. Stewart, A.E. Rudolph, J. Bliska, and J.E. Dixon. 1999.** Inhibition of the MAP kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science.* **285**:1920-1923.
- Pai, C.H., and V. Mors. 1978.** Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **19**:908-911.
- Parsek, M.R., and E.P. Greenberg. 2000.** Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram negative bacteria: A signalling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**:8789-8793.
- Pepe, J.C., and V.L. Miller. 1994.** The biological role of invasins during a *Yersinia enterocolitica* infection. *Infect. Agents. Dis.* **2**:236-241.
- Persson, C., R. Nordfelth, A. Holmström, S. Hakansson, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz. 1995.** Cell-surface bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarised mechanism into the target cell. *Mol. Microbiol.* **18**:135-150.
- Persson, C., N. Carballeira, H. Wolf-Watz, and M. Fallman. 1997.** The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130^{CAS} and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J.* **16**:2307-2318.
- Pilz, D., T. Vocke, J. Heesemann, and V. Brade. 1992.** Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. *Infect. Immun.* **60**:189-195.
- Portnoy, D.A., and S. Falkow. 1981.** Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* **148**:877-83.
- Rabson, A.R., A.F. Hallett, and H.J. Kpoornhof. 1975.** Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Infect. Dis.* **131**:447-451.
- Rasch, M., C. Buch, B. Austin, W.J. Slierendrecht, K.S. Ekmann, J.L. Larsen, C. Johansen, K. Riedel, L. Eberl, M. Givskov, and L. Gram. 2004.** An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst Appl Microbiol.* **27**:350-9.

- Ritchie, A.J., A.O. Yam, K.M. Tanabe, S.A. Rice, M.A. Cooley. 2003.** Modification of in vivo and in vitro T- and B-cell-mediated immune responses by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun.* **71**:4421-31.
- Roggenkamp, A., H.-R. Neuberger, A. Flügel, T. Schmoll, T., and J. Heesemann. 1995.** Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen-binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol. Microbiol.* **16**:1207-1221.
- Rosqvist, R., A. Forsberg, N. Rimpilainen, T. Bergman, and H. Wolf-Watz. 1990.** The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* **4**:657-667.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**:487-491.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Samrakandi, M.M., S.L. Cirillo, D.A. Ridenour, L.E. Bermudez, and J.D. Cirillo. 2002.** Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains. *J Clin Microbiol.* **40**:1352-62.
- Schleifstein, J.I., and M.B. Coleman. 1939.** An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Pasteurella pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *NY. State. J. Med.* **39**:1749-1753.
- Schultze Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, K. von der Mark, and F. Emmerich. 1992.** Plasmid-encoded outer membrane Protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersiniae* to various types of collagen. *Infect. Immun.* **60**:2153-2159.
- Shaw, P.D., G. Ping, S.L. Daly, C. Cha, J.E. Cronan Jr, K.L. Rinehart, and S.K. Farrand. 1997.** Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**:6036-41.
- Sircili, M.P., M. Walters, L.R. Trabulsi, and V. Sperandio. 2004.** Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect. Immun.* **72**:2329-37.
- Skurnik, M., Y. el Tahir, M. Saarinen, S. Jalkanen, and P. Toivanen. 1994.** YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect. Immun.* **62**:1252-1261.
- Smith, R.S., S.G. Harris, R. Phipps, and B. Iglewski. 2002.** The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol.* **184**:1132-9.
- Sperandio, V., A.G. Torres, B. Jarvis, J.P. Nataro, and J.B. Kaper. 2003.** Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **15**:8951-6.
- Stintzi, A., K. Evans, J.M. Meyer, and K. Poole. 1998.** Quorum sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasR/lasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **166**:341-5
- Straley, S.C., E. Skrzypek, G.V. Plano, and J.B. Bliska. 1993.** Yops of *Yersinia* ssp. pathogenic for humans. *Infect. Immun.* **61**:3105-3110.
- Strathdee, C.A., and R.Y. Lo. 1989.** Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *J. Bacteriol.* **171**:916-928.
- Tak, P.P., L.G. Visser, J.A. Hoogkamp Korstanje, J.C. Kluin Nelemans, P.C. Hogendoorn, P.M. Kluin, M. Barza, J. de Koning, and R. van Furth. 1992.** Unusual manifestations of *Yersinia enterocolitica* infections diagnosed using novel methods. *Clin. Infect. Dis.* **15**:645-649.

- Tateda, K., Y. Ishii, M. Horikawa, T. Matsumoto, S. Miyairi, J.C. Pechere, T.J. Standiford, M. Ishiguro, and K. Yamaguchi. 2003.** The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun.* **71**:5785-93.
- Telford, G., D. Wheeler, P. Williams, P.T. Tomkins, P. Appleby, H. Sewell, G.S. Stewart, B.W. Bycroft, and D.I. Pritchard. 1998.** The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect. Immun.* **66**:36-42.
- Throup, J.P., M. Camara, G.S. Briggs, M.K. Winson, S.R. Chhabra, B.W. Bycroft, P. Williams, and G.S. Stewart. 1995.** Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol.* **17**:345-56.
- Toivanen, A., K. Granfors, R. Lahesmaa Rantala, R. Leino, T. Stahlberg, and R. Vuento. 1985.** Pathogenesis of *Yersinia* triggered reactive arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects. *Immunol. Rev.* **86**:47-70.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:4350-4354.
- Trulzsch, K., G. Geginat, T. Sporleder, K. Ruckdeschel, R. Hoffmann, J. Heesemann, and H. Russmann. 2005.** *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J Immunol.* **174**:4244-51.
- Viboud, G.I., and J.B. Bliska. 2005.** *Yersinia* Outer Proteins: Role in Modulation of Host Cell Signalling Responses and Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.*
- Viitanen, A.M., P. Toivanen, and M. Skurnik. 1990.** The *lcrE* gene is part of an operon in the *lcr* region of *Yersinia enterocolitica* 0:3. *J. Bacteriol.* **172**:3152-3162.
- Watson, W.T., T.D. Minogue, D.L. Val, S.B. von Bodman, and M.E. Churchill. 2002.** Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol cell.* **9**:685-94.
- Williams, P., M. Camara, A. Hardman, S. Swift, D. Milton, V.J. Hope, K. Winzer, B. Middleton, D.I. Pritchard, and B.W. Bycroft. 2000.** Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**: 667-80.
- Williams, S.C., E.K. Patterson, N.L. Carty, J.A. Griswold, A.N. Hamood, and K.P. Rumbaugh. 2004.** *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and functions in mammalian cells. *J Bacteriol.* **186**:2281-7.
- Winblad, S. 1969.** Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*. *Scand.J.Infect.Dis.* **1**:11-16.
- Winson, M.K., S. Swift, L. Fish, J.P. Throup, F. Jorgensen, S.R. Chhabra, B.W. Bycroft, P. Williams, and G.S. Stewart. 1998.** Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**:185-92.
- Wu, H., Z. Song, M. Hentzer, J.B. Andersen, S. Molin, M. Givskov, and N. Hoiby. 2004.** Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob Chemother.* **53**:1054-61.
- Yersin, A. 1894.** La bubonique peste a Hong Kong. *Ann. Inst. Pasteur Paris.* **8**:662-667.
- Zhu J, M.B. Miller, R.E. Vance, M. Dziejman, B.L. Bassler, and J.J. Mekalanos. 2002.** Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:3129-34.

Zumbihl, R., M. Aepfelbacher, A. Andor, C.A. Jacobi, K. Ruckdeschel, B. Rouot, J. Heesemann. 1999. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* **274**:29289-29293.

Lebenslauf

Geboren am: 06.05.1967 in Sanderbusch/ Niedersachsen

ledig/ evangelisch

1974-78	Grundschule in Wilhelmshaven
1978-84	OS und Gymnasium in Schortens, Bonn und Flensburg
1984-86	F.W. Cox Hightschool in Virginia Beach, Va, USA
Juni 86	Hightschool Diploma
1986-87	Old Dominion University, Va, USA
Sept. 87	Allgemeine Hochschulzugangsberechtigung (Note: 1,2)
1988-90	Studium der Biologie an der Universität Bonn
Okt. 90	Vordiplom in Biologie
1990-93	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
Aug./Sept. 91	Epidemiologisches Feldforschungsprojekt in Kamerun/ Westafrika
Apr.-Dez. 92	Forschungsaufenthalt am Dept. for Microbiology (Prof. Stackebrandt) University of Queensland/ Australien
Apr.-Aug. 93	Mündliche Diplomprüfungen ("gut")
Sept. 93-Aug. 94	Diplomarbeit an der DSMZ/ Braunschweig unter der Betreuung von Prof. Dr. E. Stackebrandt
Sept.94	Diplom ("sehr gut")
Sept. 94-März 96	Doktorarbeit bei Prof. Dr. Dr. J. Heesemann am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg
Apr. 96-Juni 99	Fortsetzung der Doktorarbeit bei Prof. Heesemann am Max von Pettenkofer- Institut der Universität München
SoSe 98- Nov 03	Studium der Humanmedizin an der Universität München
Aug. 99	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
Jan. 00	Promotion zum Dr. rer. nat. ("magna cum laude")
Jan. 00- Dez 01	Postdoc und Sprecher der Graduierten des Graduiertenkollegs "Infektion und Immunität" (Sprecher: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann)
Aug. 00	1. Staatsexamen
Aug./Sept. 02	2. Staatsexamen
Okt. 02-Feb. 03	PJ Tertial: Chirurgische Klinik Innenstadt der LMU
Feb.03-Jun. 03	PJ Tertial: Psychiatrische Klinik der LMU
Jun./Jul. 03	1/2 PJ Tertial: Medizinische Poliklinik der LMU
Aug./Sept.03	1/2 PJ Tertial: University Hospital Center Yaounde (CHUY), Kamerun, Westafrika
Nov. 03	3. Staatsexamen

27.11.2003	Approbation auf Zeit
Feb. 04-Sept. 04	AiP am UKT, Medizinische Klinik I (Direktor: Prof. Dr. M. Gregor)
Sept. 04	Approbation als Arzt
Seit Okt. 04	Assistenzarzt am UKT, Medizinische Klinik I (Direktor: Prof. Dr. M. Gregor)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für seine hervorragende Betreuung, Unterstützung und Interesse an dieser Arbeit. Seine ständige Bereitschaft über Ergebnisse und neue Ideen zu diskutieren, haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ebenso herzlich möchte ich mich bei Ihm bedanken, dass er mir die Möglichkeit eröffnet hat, Medizin „nebenbei“ zu studieren. Ohne diese, seine fortwährende Unterstützung, hätte ich dieses nicht auf mich genommen. Ich habe diesen Schritt, in die Medizin zu gehen, nie bereut.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Gottfried Wilharm herzlich bedanken, der mich tatkräftig bei den Genanalysen unterstützt hat. Außerdem natürlich für seine Ideen, Anregungen und stets guter Laune im Büro.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dipl. Ing. Christina Nölting bedanken, die mich ebenso tatkräftig bei dem einen und andern Experiment unterstützt hat.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Dipl. Biol. Monika Schwienbacher, die mir ausdauernd gezeigt hat, wie 2-D-SDS-Gelelektrophorese funktioniert.

Herrn Dr. T. Schlunck, Institut für Immunologie der LMU danke ich für die Ansequenzierung der Proteine.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Ursula Bausenwein für ihre sehr hilfreichen Anmerkungen und Korrekturen bezüglich dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. A.L. Bissinger danke für die Durchsicht der Arbeit.

Meinen früheren Doktoranden, Herrn Dr. med. Sebastian Gregor, Frau Alexandra Bach und Herrn Mark Oellerich danke ich für die stets gute Zusammenarbeit, ihre Geduld mit mir, ihr Engagement und den frischen Wind, den sie ins Labor gebracht haben.

Namentlich möchte ich mich bei einer Reihe von Mitarbeitern bedanken, die mich und meine Arbeiten, teilweise viele Jahre über begleitet haben: Herrn Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher, Frau Dr. Daniela Brem, Frau Dr. Cosima Pelludat, Herrn Dr. Alexander Rakin, Herrn Prof. Dr. med. Holger Rüssmann, Herrn PD. Dr. med. Klaus Ruckdeschel, Herrn Dr. med. Sören Schubert, Herrn Dr. med. Konrad Trülzsch, Herrn Dr. Robert Zumbühl

Ich möchte auf keinen Fall versäumen, allen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer-Institutes für die außergewöhnlich gute Arbeitsatmosphäre, Zusammenarbeit und Spaß aber auch für die zahlreichen, teils unvergesslichen Aktivitäten inner- und außerhalb des Labors zu danken.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für ihre fortwährenden Unterstützung in allen Bereichen und Lebenslagen.