

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

# **Analyse der Yersinia-Infektion im Mausmodell mittels Fluoreszenzproteinmarkierung**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Alexandra Bach**

aus

**Trier**

Jahr

**2006**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. C. Schäfer  
Priv. Doz. Dr. St. Ihrler

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 9.11.2006

# Danksagung

Ich danke von ganzem Herzen den Menschen, die mich bei dieser Doktorarbeit unterstützt haben:

meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann,  
meinem Betreuer Dr. Dr. Christoph Jakobi.

Ich danke meinem verstorbenen Vater, meiner Mutter und meinen Geschwistern, meinen Freunden und meinem Mann Joachim, dass sie immer ein offenes Ohr, interessante Ideen und auch tröstende Worte für mich hatten.

Alexandra Wendler

München, November 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1	Das Genus <i>Yersinia</i> .....	6
1.1.1	Das klinische Bild der Yersiniose.....	7
1.1.2	Virulenzfaktoren von <i>Y.enterocolitica</i> .....	8
1.2	Salmonella enterica .....	9
1.3	Reportergene.....	10
1.4	Ziele dieser Arbeit.....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1	Material.....	13
2.1.1	Geräte.....	13
2.2	sonstige Materialien .....	14
2.2.1	Chemikalien .....	14
2.2.2	Kitsysteme .....	14
2.2.3	Proteine und Enzyme .....	15
2.2.4	Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie.....	15
2.2.5	Synthetische Oligonukleotide .....	15
2.2.6	Plasmide .....	16
2.2.7	Bakterienstämme .....	17
2.2.7	Versuchstiere .....	17
2.2.8	Medien und Lösungen.....	18
2.3	Methoden.....	20
2.3.1	Mikrobiologische Methoden.....	20
2.3.1.1	Kultivierung von Bakterien.....	20
2.3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Bakterien.....	20
2.3.1.3	Ausplattieren von Bakterien.....	20
2.3.1.4	Lagerung von Bakterien .....	21
2.3.2	Molekularbiologische Methoden .....	21
2.3.2.1	DNA-Fällung.....	21
2.3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	21
2.3.2.3	Agarosegel-Elektrophorese .....	22
2.3.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
2.3.2.5	Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	23
2.3.2.6	Ligation.....	23

2.3.2.7	Transformation von <i>E.coli</i> , <i>Yersinien</i> und <i>Salmonellen</i> .....	24
2.3.2.8	ET-Klonieren .....	24
2.3.3	Mausinfektionsversuch .....	26
2.3.3.1	Infektion.....	27
2.3.4	Histologische Methoden .....	28
2.3.4.1	Anfertigung von Kryomikrotomschnitten .....	28
2.3.4.2	Fixierungsmethoden.....	28
2.3.4.3	Gewebefärbungen.....	29
2.3.4.4	Immunfärbung .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	Ergebnisse zur Mikrokoloniebildung.....	30
3.1.1	Vorarbeiten zur Optimierung der GFP-Reifung.....	30
3.1.1.1	Austestung verschiedener RFP-Varianten.....	30
3.1.1.2	Optimierung der Fixierungslösung.....	31
3.1.1.3	Optimierung der Fluoreszenzstabilität .....	35
3.1.3	Untersuchungen zur Mikrokoloniebildung.....	39
3.1.4	Infektionsversuche mit <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	43
3.2	Yersiniabaktin-Kreuzfütterungsversuche durch Koinfektion von Mäusen .....	47
3.2.1	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Yersinien im Gewebe nach Mischinfektion.....	55
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>56</b>
4.1	Darstellung von fluoreszierenden Yersinien im Gewebe von infizierten Mäusen ...	56
4.1.1	Optimierung der RFP- Expression für Mausinfektion .....	56
4.1.2	Optimierung der Fixierungsmethode für Gewebe mit.....	57
	fluoreszierenden Bakterien .....	57
4.1.3	Konstruktion stabil fluoreszierender Yersinien .....	58
4.1.4	Mechanismus der Mikrokoloniebildung bei <i>Y.enterocolitica</i> .....	59
4.1.5	Gewebedissemation von Salmonellen .....	62
4.2	Untersuchungen zur Yersiniabaktin-Kreuzfütterung von Yersinien im Mausinfektionsmodell.....	63
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Genus *Yersinia*

Die Erstbeschreibung des Genus *Yersinia* erfolgte durch den Schweizer Bakteriologen Alexandre Yersin, der den Erreger der Beulenpest (*Yersinia pestis*) 1884 isolierte und seit 1964 als Namensgeber fungiert [9, 73]. Seit 1964 werden Yersinien zur Gattung der *Enterobacteriaceae* gezählt [30]. 1974 wurden die Yersinien zu einer eigenen Gattung zusammengefasst, nachdem sie vorher zum Genus *Pasteurella* gezählt worden waren [49].

Yersinien sind gramnegative, pleomorphe, fakultativ anaerobe, katalasepositive und oxidasenegative Stäbchen, die bei 27°C peritrich begeißelt, bei 37°C allerdings unbegeißelt und unbeweglich sind. Sie bilden keine Sporen. Die Bakterien sind auf Nährböden wie z.B. Schafblut- oder McConcey-Agar anzüchtbar und wachsen innerhalb von zwei Tagen zu weißlichen, stecknadelkopfgroßen Kolonien [45].

Zum Genus *Yersinia* gehören neben 9 apathogenen Arten auch drei humanpathogene Arten [12, 21]:

*Yersinia pestis*

*Yersinia enterocolitica*

*Yersinia pseudotuberculosis*.

*Yersinia pestis* wurde von Alexandre Yersin 1894 in Hongkong als Erreger der Beulenpest entdeckt. In der jüngeren Menschheitsgeschichte gab es drei große Pandemien. Die letzte Pandemie trat Mitte des 19. Jahrhunderts auf, trotzdem wurden auch in heutiger Zeit vor allem in Asien und Afrika immer wieder Fälle von Pest gemeldet [58].

*Yersinia enterocolitica* wurde 1939 von Schleifstein und Coleman erstmals beschrieben, gewann seitdem zunehmend an Bedeutung und ist heute für rund ein Prozent der akuten Enteritiden in Europa verantwortlich [67]. In Deutschland ist *Y. enterocolitica* der dritthäufigste bakterielle Erreger von Enteritiden.

Auch *Yersinia pseudotuberculosis* ist enteropathogen und wurde bereits 1883 beschrieben. Erkrankungen mit diesem Erreger manifestieren sich häufiger als mesenteriale Lymphadenopathie mit Pseudoappendizitisyndrom [46]. Allerdings werden in Deutschland *Yersinia pseudotuberculosis* Infektionen viel seltener gemeldet als *Yersinia enterocolitica* Infektionen.

Die verschiedenen *Yersinia*-Arten werden durch Serotypisierung und Biotypisierung differenziert.

Bei den ubiquitär in Wasser- und tierischen Reservoirs vorkommenden *Y. enterocolitica* unterscheidet man mittlerweile acht verschiedene Biovarietäten (BV). Biovar 1A gilt als apathogen, während Biovar 1B für Mäuse hochvirulent ist [8]. Das Hauptreservoir dieser Biovarietäten ist das Schwein.

Allen pathogenen Stämmen ist ein 70 kb großes Virulenzplasmid (pYV) gemeinsam. Einen Überblick über das Genus *Yersinia* gibt die folgende Abbildung 1-1.

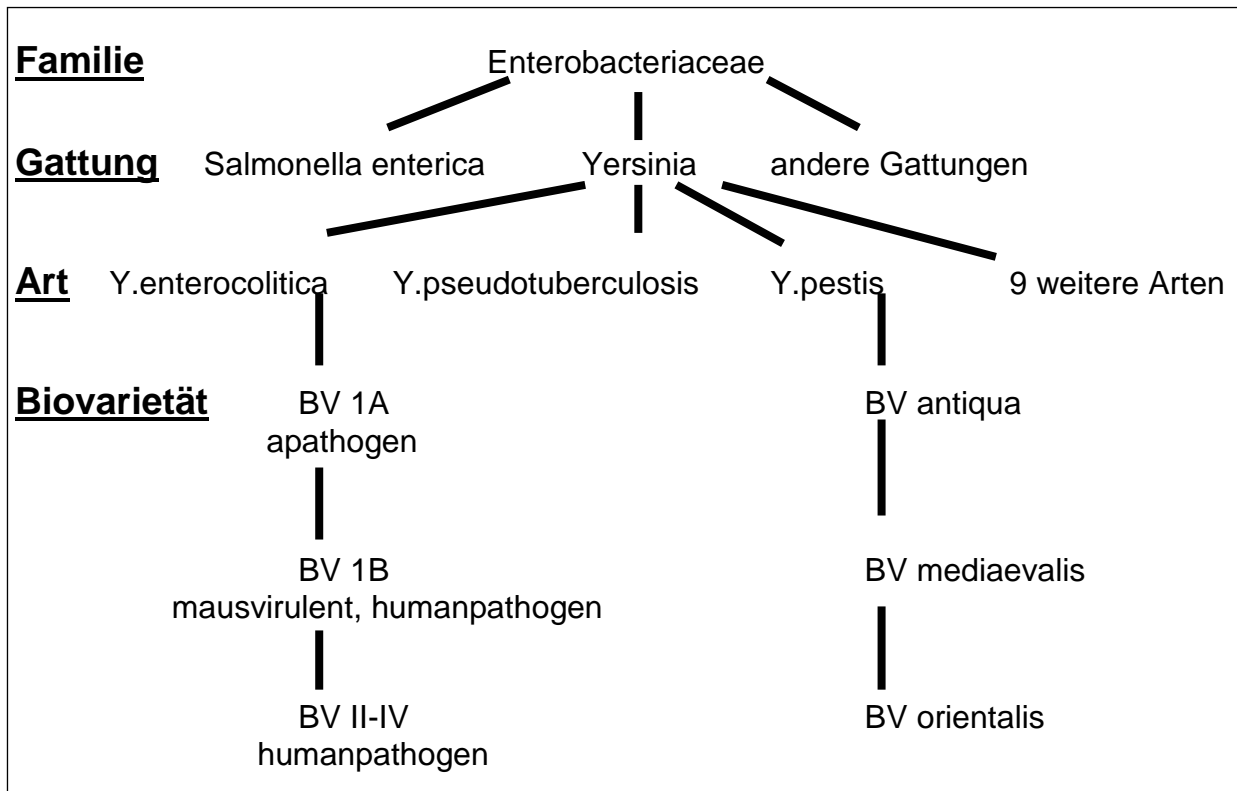


Abbildung 1-1: Eingruppierung der *Yersinia*-Arten in die Familie der Enterobacteriaceae

### 1.1.1 Das klinische Bild der Yersiniose

Die Yersiniose ist eine Infektionskrankheit, die durch *Y. enterocolitica* oder durch *Y. pseudotuberculosis* hervorgerufen wird und gehäuft in gemäßigten Klimazonen auftritt. Die enteropathogenen Yersinien werden durch kontaminierte Nahrungsmittel (rohes Schweinefleisch, Milch u.a.) übertragen. Schlachtschweine sind häufig im Oropharynx mit humanpathogenen Yersinien besiedelt [1, 2].

Die aufgenommenen Erreger penetrieren die Mukosa der Peyerschen Plaques über die M-Zellen des Ileums und können meist bei prädisponierten Patienten wie Kindern und Immunsupprimierten nach einer Inkubationszeit von ein bis elf Tagen eine Enteritis mit begleitender Mesenterial-Lymphadenitis hervorrufen [7, 10, 60].

Folgende Symptome können auftreten: Diarrhö, leichtes Fieber, bei Kindern vor allem Bauchschmerzen, die sich bei Pseudoappendizitis im rechten Mittel- und Unterbauch bemerkbar machen. Bei Vorliegen einer Grunderkrankung wie Diabetes mellitus, Leberzirrhose, hämolytischer Anämien u.a. kann die Yersiniose zur Sepsis mit Milz- und Leberabszessen führen [6].

Zusätzlich können vor allem bei erwachsenen Trägern des Gens HLA-B27 postinfektiöse Gelenkbeschwerden (reaktive Arthritis) und Vaskulitiden (Erythema nodosum, Uveitis anterior u.a.) auftreten [27, 31, 72].

Der Goldstandard der Diagnose ist die Anzucht von Yersinien aus Stuhlproben oder bioptischem Material (Darmbiopsie, Abszesspunktat). Häufig kommen die serologische Diagnostik mit Widal-Agglutination oder der Immunoblot mit Yop-Antigenen zum Einsatz. Die Diagnose wird gestützt durch erhöhte Infektionsparameter wie eine beschleunigte Blutkörperchensenkung, eine Leukozytose mit Linksverschiebung und die klinischen Symptome.

Die Therapie besteht meist nur aus einer ausreichenden Flüssigkeitszufuhr, da die Infektionen überwiegend selbstlimitierend sind. In schweren Fällen, bei Sepsis oder bei Immunsupprimierten, ist eine Antibiotikatherapie mit Cephalosporinen der 3. Generation oder mit Fluorchinolonen zu empfehlen [45].

### **1.1.2 Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica***

Die Erreger gelangen nach oraler Aufnahme in das terminale Ileum, wo sie wahrscheinlich von den M-Zellen des Follikel-assoziierten Epithels (FAE) der Peyerschen Plaques (PPs) in die Submukosa bzw. in die Lymphfollikel der PPs transloziert werden [33, 48]. Über eigens gebildete Proteine greifen die Yersinien in die Abwehr und sonstige Funktionen der körpereigenen Zellen ein, modulieren damit die Immunantwort des Wirtes und verhindern so die Eliminierung des Erregers [22, 23, 26, 28, 35, 42, 55].



Im oralen Mausinfektionsmodell gelangt *Y. enterocolitica* der BV 1B vermutlich über Lymphgefäße, in Assoziation mit Makrophagen, über die Blutbahn in Milz, Leber und Lunge. Dort bilden sich Mikrokolonien, die nach einigen Tagen zum Tod der Mäuse führen. Diese Mausvirulenz wird durch die „High Pathogenicity Island“ (HPI) bewirkt, die für ein Siderophorsystem (Yersiniabaktin) kodiert und die Eisenversorgung der Yersinien in der Maus sichert.

Eisen ist für fast alle Mikroorganismen essenziell zum Überleben. In Säugetieren herrscht ein Milieu mit sehr niedrigem Eisengehalt. Yersinien, wie auch viele andere Erreger, nutzen daher  $\text{Fe}^{3+}$ -chelatisierende Verbindungen, die man als Siderophore bezeichnet [3, 11, 57]. Das Eisenaufnahmesystem für das Siderophor „Yersiniabaktin“ ist auf einer Region des Chromosoms lokalisiert, die man als HPI (High-Pathogenicity-Island) bezeichnet [15]. Nur die für Mäuse hochpathogenen Yersinien (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* BG 1B) besitzen diese HPI mit einer Größe von ca. 40 kb [25, 40].

Außer für die Synthesegene des Yersiniabaktins (Ybt) kodiert die HPI auch für die Ybt-Transporter FyuA (Ferric-Yersiniabaktin uptake Rezeptor der äußeren Membran). Über FyuA gelangt  $\text{Fe}^{3+}$ -Ybt zum Irp6/Irp7 Transporter der inneren Membran und dann in das Zytoplasma, wo  $\text{Fe}^{3+}$  in  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird [34, 61, 68].

Bei einem erhöhten Eisenangebot steigt das zytosolische  $\text{Fe}^{2+}$  an und reprimiert die Siderophorgene durch den Repressor  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur, was zu einer Reduzierung des Ybt und der Transporter führt [14, 15, 68].

Mutanten, wie die *irp1*-Mutante, die einen Defekt im Ybt-Synthesegen haben und kein Ybt mehr synthetisieren können, sind im Mausmodell um den Faktor 1000 weniger virulent (50%-letale Dosis ( $\text{LD}_{50}$ ) steigt von  $10^3$  (Wildtyp) auf  $10^6$  Yersinien an) [56].

## 1.2 Salmonella enterica

Das Genus *Salmonella* gehört zu der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Art *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* ist enteropathogen für Warmblüter [16]. *S. enterica* kann je nach Serotyp sowohl klar umschriebene, selbst limitierte Infektionen des Magen-Darm-Trakts als auch schwerwiegende systemische Infektionen bei

Tier und Mensch hervorrufen. Der Serotyp Typhi zum Beispiel ist humanspezifisch und ist Erreger des Typhus, der sich als generalisiertes septisches Krankheitsbild manifestiert [29, 59]. Andere Serotypen, wie Typhimurium und Enteritidis, können in vielen verschiedenen Warmblütern zu lokalen Enteritiden führen, mit klinischen Symptomen wie massiver Diarrhö, leichtem Fieber und Erbrechen.

Salmonellen sind fakultativ intrazellulär lebende Bakterien, deren Pathogenität von Typ-III-Proteinsekretionssystemen bestimmt wird [35, 50]. Salmonellen haben zwei auf dem Chromosom lokalisierte Pathogenitätsinseln (SPI1 und SPI2), die für T3SS kodieren.

SPI 1 kodiert für das Typ-III-Sekretionssystem, das im Anfangsstadium der Infektion für die Darminvasion und das Überleben in der Submukosa erforderlich ist und die Aufnahme in Makrophagen bewirkt. Das zweite Typ-III-Sekretionssystem, kodiert auf SPI 2, das im späteren Stadium der Infektion von intrazellulären Bakterien produziert wird, spielt hier eine Rolle bei der Ausbildung der systemischen Infektion durch Eingriff in die Funktion der Wirtszelle. Weitere Virulenzfaktoren werden auf anderen SPIs und dem Virulenzplasmid pSLT kodiert [62].

Im Mausmodell ruft *S.Typhimurium* einen murinen Typhus hervor, bei der die Bakterien über M-Zellen, die sie bei der Passage zerstören, dendritische Zellen und Makrophagen durch die Darmwand gelangen, von wo sie in Organe wie Leber, Milz und Lunge weiter vordringen [52, 74]. Nach einigen Tagen führt die systemische Infektion zum Tod der Maus [37]. In dieser Arbeit werden *S.Typhimurium* eingesetzt.

### 1.3 Reportergene

In dieser Arbeit werden die Gene „green fluorescent protein“ (GFP) und das „red fluorescent protein“ (RFP), die für selbstfluoreszierende Proteine kodieren, in *Yersinien* eingefügt, um die Bakterien anhand ihrer Eigenfluoreszenz im Mausinfektionsmodell unterscheiden zu können [51]. Darüber hinaus wurde auch ein *fyuA*-GFP-Reporterkonstrukt in *Yersinien* verwendet, um die Eisenversorgung von *Yersinien* indirekt zu verfolgen.

GFP ist ein autofluoreszierendes Protein, das aus der Qualle *Aequoria victoria* isoliert wurde und seit 1994 als Reportergen eingesetzt wird. Es ist ein 238 Aminosäu-

ren großes Protein, das in seinem zylinderförmigen Inneren mit Hilfe von  $\alpha$ -Helixsträngen ein Chromophor stützt (s. Abb.1-2) [20, 54, 66].

Dieses Chromophor gibt nach Anregung mit blauem Licht ( $\lambda$  395 nm) grünes Licht mit einer Wellenlänge von 509 nm ab. Die grüne Fluoreszenz ist somit sowohl im konventionellen Epifluoreszenzmikroskop wie auch im Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) gut detektierbar.

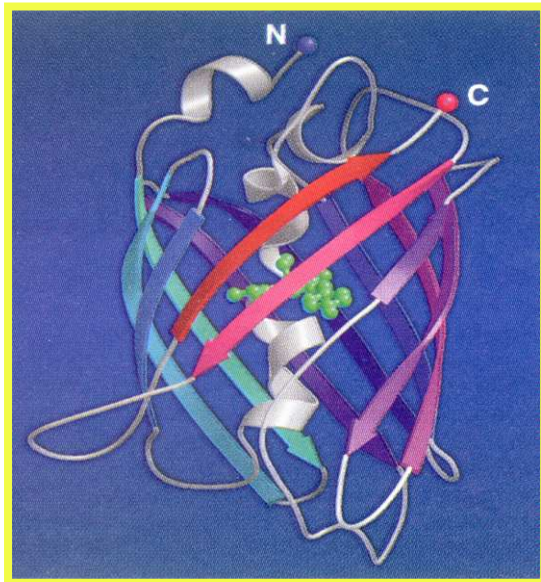


Abbildung 1-2: 3D-Struktur des GFP  
[54, 69]

Ein weiteres fluoreszierendes Protein, das „rot fluoreszierende Protein“, wurde aus der Korallenart *Discosoma sp.* isoliert. Es ist von besonderer Bedeutung, da sein Anregungs- und Emissionsspektrum von 558 nm bzw. 579 nm kaum mit dem von GFP überlappt und somit für den kombinierten Einsatz mit GFP am besten geeignet ist [47]. Ähnlich wie das GFP bildet RFP eine Tertiärstruktur, die aus einem von 11 Strängen gebildeten Zylinder ( $\beta$ -Faltblatt) besteht, in dessen Inneren das Chromophor umgeben von  $\alpha$ -Helix-Strängen sitzt [71, 32]. Das RFP neigt zur Tetramerenbildung. Da die Zeit zur Fluoreszenzentwicklung sehr lang und das RFP schwerer löslich ist, wurde das RFP2 und darauf das so genannten RFPexpress entwickelt [4]. Hier sorgen Mutationen in der Aminosäuresequenz für die maximale Fluoreszenzintensität, für eine schnellere Faltung zur vollen Fluoreszenz und für eine stärkere Löslichkeit (keine Tetramerenbildung) [5].

GFP und RFP lassen sich als in-vivo-Reportergen in zahlreichen pro- wie auch eukaryotischen Organismen einsetzen, da weder weitere Genprodukte noch Substrate für die Fluoreszenz erforderlich sind. Zusätzlich konnte keine störende toxische Wirkung der Proteine nachgewiesen werden [17, 64].

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

Darmpathogene Bakterien wie *Yersinia enterocolitica* und *Salmonella* Typhimurium disseminieren nach oraler Aufnahme in der Maus in Leber, Milz und Lunge. Der genaue Mechanismus, wie und wie viele Bakterien initial durch die Darmwand translokieren, auf welchem Wege sie zu den Zielorganen gelangen und wie sie Mikrokolonien bilden, ist noch unbekannt. Unbekannt ist auch, ob ein Austausch von Faktoren zur Kommunikation zwischen einzelnen Yersinien stattfindet.

Mittels Reportergentechnologie sollen folgende infektionsbiologische Fragen untersucht werden:

- I. Mit Hilfe der Reportergene GFP und RFP sollen die Erregerdissemination, Lokalisation und die Mikrokoloniebildung verfolgt werden. Wie viele Yersinien gelangen im Mausversuch durch das Darmepithel in die Peyerschen Plaques und bilden Mikrokolonien in Leber und Milz? Dies soll des Weiteren mit der Infektionskinetik von *Salmonella* Typhimurium in der Maus verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst stabil rot (RFP) und grün (GFP) fluoreszierende Yersinien und Salmonellen hergestellt, die sich außer in der Wellenlänge des von ihnen emittierten Lichts nicht weiter in ihrer Virulenz unterscheiden. Letztendlich soll die direkte Sichtbarmachung von verschiedenfarbig fluoreszierenden Bakterien in Gewebeschnitten durch diese Arbeit etabliert werden.
- II. Im zweiten Teil der Arbeit soll die Reportergentechnologie genutzt werden, um die Yersiniabaktin-Kreuzfütterung in infiziertem Mausgewebe nachzuweisen. Hierzu wurde eine Yersiniabaktinsynthese-defekte Mutante (*irp1*-Mutante) mit GFP „markiert“ und zusammen mit einem isogenen Wildtypstamm, der mit RFP „markiert“ ist, für die Mausinfektion verwendet. Man weiß, dass Yersinien das Siderophor Yersiniabaktin bilden müssen, um in der Maus zu überleben. Mutanten, die einen Defekt in der Yersiniabaktinsynthese besitzen (z.B. *irp1*-Mutante), sind nicht überlebensfähig und damit weit weniger virulent. Es soll untersucht werden, ob unter in-vivo-Bedingungen im Mausmodell eine Kreuzfütterung stattfindet, bei der der Wildtyp sein Yersiniabaktin an die *irp1*-Mutante verfüttert. Hierzu wurden einerseits die Yersinien direkt in Kryotomschnitten von Milz und Leber infizierter Mäuse mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und andererseits die Keimzahl von infizierten Organhomogenaten differentiell bestimmt (*irp1*-Mutante versus Wildtyp).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Analysenwaagen	R160P; PT 1200	Satorius, Göttingen
	510	Kern, Albstadt
Brutschränke	BB6220; Thermicon T	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	Gasi	Schütt, Göttingen
Elektrophoresekammern	Flachbett-Kammern	Keutz, Reiskirchen
	Protean II; Mini Protean	BioRad, München
Elektroporationsgerät	Gen Pulser II	BioRad, München
Elektroporationsküvetten		Eurogentech, Köln
Kryomikrotom		Leica, Wetzlar
Magnetrührer	Combimag REO	Janke&Kunkel, Staufen
Mikroskope	Leica Aristoplan	Leica, Wetzlar
	CLSM	Leica, Heidelberg
PCR Thermocycler	T3	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Modell pH530	WTW, Weilheim
Photopapierdrucker	Phaser 450	Tektronix, München
Pipetten	Research P10-P1000	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubatoren	Certomat BS1	Braun, Melsungen
Spannungsquellen	Modelle 200/2,0; 3000 xi	BioRad, München
Spektralphotometer	Ultrospec 3000	Pharmacia, Freiburg
Tischinkubator	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV-Licht	Transluminator	Bachofer, Reutlingen
Videokamera	Spot	DiagnosticInstruments, Inc.
Videophotoanlage	E.A.S.Y. RH	Herolab, Wiesloch
Video	Printer	Mitsubishi, Tokyo
Wasserbad	Typ WB7	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Minispin plus	Eppendorf, Hamburg
	Kühlzentrifuge 3K30 Kühl-	Sigma,
	zentrifuge 1K15	Allendorf

## 2.2 sonstige Materialien

Plastik- und Verbrauchsmaterial wurde von folgenden Firmen bezogen:

Brand, Wertheim; B.Braun, Melsungen; Eppendorf, Hamburg; Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg; Hartenstein, Würzburg; Kimberly-Clark, Zaveuten (Belgien); Langenbrinck, Emmendingen; Menzel-Gläser, Braunschweig; Nunc, Roskilde (Dänemark); Sakura, Zoeterwoude (Niederlande); Sartorius, Göttingen.

### 2.2.1 Chemikalien

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien und Antibiotika von den Firmen Biomol (Hamburg), Biozym (Hamburg), E.Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe); Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Medien und Zusätze für die Bakterienkultur von Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France) und ICN Biomedicals, Aurora (USA) bezogen.

DNA Standard (1Kb,100 bP)	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Biochrom, Berlin
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer, Mannheim

### 2.2.2 Kitsysteme

QIAquick	Gel-Extraction-Kit,	Qiagen, Hilden
QIAquick	Nucleotide-Removal-Kit,	Qiagen, Hilden
QIAquick	PCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep	Miniprep-Kit	Qiagen, Hilden
Nucleobond	AX 100, Maxiprep	Macherey-Nagel, Düren

### 2.2.3 Proteine und Enzyme

BSA	Biomol, Hamburg
Restriktionsenzyme (inkl. Puffer)	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase (inkl. Puffer)	Invitrogen, Karlsruhe
CIP-Alkaline Phosphatase (inkl. Puffer)	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase (inkl. Puffer)	Perkin Elmer, Weiterstadt

### 2.2.4 Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie

Ziege-anti-Kaninchen, Cy <sup>TM</sup> 5 konjugiert	Dianova, Hamburg
Anti-YadA-Kaninchen-IgG-Antiserum	[63]
Polyspezifisches Testreagenz Anti-Salmonella I (A-E)	SIFIN GmbH, Berlin

### 2.2.5 Synthetische Oligonukleotide

Für die PCR wurden folgende synthetischen Oligonukleotide (Metabion, Martinsried und ThermoHybaid, Ulm) verwendet:

Name	T (°C)	Sequenz (5'→3')
LacFHind	54	CGTATAAGCTTTGATTCTGTGGATAACCGT
LacFSpe	52	CGTACTAGTTGATTCTGTGGATAACCGT
LacRBam	60	CGTAGGATCCTGGCGTAATCATGGTCATAG
RFPBamF	58	GGCGGATCCATGAGGTCTTCCAAGAATGTT
RFPRSpe	54	CGTACTAGTCCGCTAAAGGAACAGATG
RFP2BamF	58	CGTAGGATCCATGGCCTCCTCCGAGAAC
RFP2SalR	56	GTCACGTCGACCTACAGGAACAGGTGGTG
RFP2RYadET	93	AACGGGCGGAGTTTATTTTCGCTTGCGCTGGCGAAAT- GAGCTGAGAGCCATGCAGGGGAAACTACAGGAACAG GTGGTG
S65ThindF	52	GGATAAGCTTGATGAGTAAAGGAGAAGAA
S65TRSpe	48	CGTACTAGTTTATTTGTATAGTTCATCC

S65ThindR	50	CACGTAAGCTTCTATTTGTATAGTTCATCC
S65TRYadET	86	AACGGGCGGAGTTTATTTTCGCTTGCGCTGGCGAAAT GAGCTGAGAGCCATTTATTTGTATAGTTCATCC
KanXbaFor2	60	CGTATCTAGACTCTGATGTTACATTGCACA
KanXbaRev2	56	CGTATCTAGACGTAATGCTCTGCCAGTG
KanForYadET	84	ATAAATCGTCAATGTCAAGCTCTGGATAGGCATTGC TCTGATGTTACATTGCACA
KanRevYadET	87	ATAAATCGTCAATTGGGACAATGTCAAATTCCAGCT CTGGATAGGCATTGCCATTTTTCCGTAATGCTCTG CCAGTG

### 2.2.6 Plasmide

Plasmide		Quelle
pACYC184	Kopienzahl 5-10; Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	[18]
pACYC177	Kopienzahl 5-10; Kn <sup>R</sup>	[18]
pDsRed	Kopienzahl; pKS enthält cDNA des Wildtyp RFP; Amp <sup>R</sup>	[47]
pDsRed2	Kopienzahl, pKS enthält cDNA der Variante RFP2; Amp <sup>R</sup>	[5]
pDsRedExpress	Kopienzahl; enthält cDNA der Variante RFPexpress; Amp <sup>R</sup>	[5]
pGPCATFyuAGFP	aus pGP704 mit einer Chloramphenicolkasette in eine PstI Schnittstelle inseriert; Cm <sup>R</sup>	C. Jacobi
pHR113		H. Rüssmann
pKD46		[24]
PCJLacGFP	<i>Sall-BamHI</i> GFP Fragment in pACYC184	C. Jakobi
pCJ-LacRFP	<i>Sall-BamHI</i> RFP Fragment in pACYC184	Diese Arbeit
pCJ-LacRFP2	<i>Sall-BamHI</i> RFP2 Fragment in pACYC184	Diese Arbeit
pCJ-RFPexp	<i>Sall-BamHI</i> RFPexpress Fragment in pA- CYC184	Diese Arbeit



### 2.2.7 Bakterienstämme

Stämme	Genotyp/Phänotyp	Quelle
DH5 $\alpha$ ( <i>E.coli</i> )	<i>EndA1 hsdR17(r<sub>k-mk+</sub>) supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1<math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169 (<math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15)</i>	[36]
DH10 $\beta$ ( <i>E.coli</i> )	<i>F<sup>-</sup>mcrA<math>\Delta</math>-(mrrhsdRUS-mcrBC)80dlacZ<math>\Delta</math>M15<math>\Delta</math>lacX74deoR recA ara D139<math>\Delta</math>(ara,leu)7697 galR<math>\lambda</math>rpsL end A1 nupG</i>	
S-17-1 $\lambda$ ( <i>E.coli</i> )	<i>pir<sup>+</sup> tra<sup>+</sup></i>	[65]
S.Typhimurium	SB300	H. Rüssmann
S.Typhimurium[pCJLacGFP]		Diese Arbeit
S.Typhimurium[pCJLacRFPexp]		Diese Arbeit
WA[pYV08]	Klinisches Isolat ( <i>Y. enterocolitica</i> ) mit Virulenzplasmid YV08	[39]
WA $irp1$ [pYV08]	Das Biosynthesegen <i>irp1</i> für Yersiniabaktin wurde durch Insertion einer Kanamycinresistenzkassette inaktiviert	[56]
WA[pYV08, pKD46]		Diese Arbeit
WA[pYV08,pGFP]		Diese Arbeit
WA[pYV08,pRFP2]		Diese Arbeit
WA[pYV08,pRFPexp]		Diese Arbeit
WA[pYV08::GFP]		Diese Arbeit
WA[pYV::RFPexp]		Diese Arbeit

### 2.2.7 Versuchstiere

Für Mausinfektionsversuche wurden 6-8 Wochen alte weibliche Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c (Charles River Wiga, Sulzfeld) verwendet. Die Mäuse wurden unter speziellen pathogenfreien Bedingungen in einer Überdruckkammer gehalten und erhielten unbegrenzt Wasser und Futter.

## 2.2.8 Medien und Lösungen

Medien für Bakterienkulturen

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

LB-NaCl-Medium: 50 g NaCl (E.Merck)  
5 g Bacto Hefeextrakt (ICN Biomedicals)  
10 g Bacto Trypton (Becton Dickinson)  
in 1L A.bidest. lösen,  
pH 7,4-7,6 mit NaOH (E.Merck) einstellen

LB-Agar: 15 g Bacto Agar (Becton Dickinson)  
in 1L LB-Medium

Folgende Konzentrationen an Antibiotika wurden dem Medium und dem Agar zuge-

setzt: Ampicillin (Sigma): 100 µg/ml für *E.coli*  
300 µg/ml für *Yersinia enterocolitica*  
Chloramphenicol (Sigma): 50 µg/ml  
Kanamycin (Sigma): 50 µg/ml  
Nalidixin (Sigma): 50 µg/ml

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

Puffer und Lösungen:

Lösungen für die Agarosegelelektrophorese:

10 x TAE-Puffer:	0,4 M Tris-HCl (Gibco)
	50 mM Natriumacetat (E.Merck)
	10 mM EDTA (E.Merck), pH 7,6
10 x Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau (Sigma)
	25% (v/v) Ficoll 400 (Biomol)
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma) in A.bidest.

Lösungen zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterien:

Wasch-Puffer:	steriles Ampuwa
Einfrier-Puffer:	10% Glycerin (steril) in Ampuwa

Fixierungslösungen:

Formalin:	20 ml 39%-iges Formalin (Sigma)
	200 ml PBS
Aceton:	100%, -20°C kaltes Aceton (Sigma)
Methanol:	100%, -20°C kaltes Methanol (Sigma)

Färbelösungen:

Hämatoxin:	225 ml Aqua dest.
	75 ml Häkalaun nach Mayer (Sigma), rühren, filtrieren
Eosin:	250 ml Aqua dest.
	1 Messerspitze Eosin (Sigma), rühren, filtrieren
Methylenblau:	nach Löffler (Sigma)

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.3.1.1 Kultivierung von Bakterien

Ein Erlenmeyer-Kolben wird unter sterilen Bedingungen mit dem entsprechenden Medium (z.B. LB-Medium) gefüllt. Um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, sollte das Verhältnis von Oberfläche des Kolbens zu Volumen möglichst groß sein. Nachdem das Medium mit einer Vorkultur oder Kolonie des gewünschten Stammes angeimpft wurde, wird es unter ständigem Schütteln bei 27°C (*Yersinien*) bzw. 37°C (*E.coli*) über Nacht inkubiert.

Blutagarplatten werden mit Bakterien mittels Dreiösenausstrich beimpft und mit Filterplättchen versehen, die mit dem entsprechenden Antibiotikum getränkt sind, so dass auf die jeweiligen Bakterien selektioniert wird.

#### 2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Bakterien

Mit dem Spektralphotometer wird durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm die optische Dichte (OD) einer Bakterienkultur bestimmt. In der exponentiellen Wachstumsphase besitzt eine Bakterienkultur eine optische Dichte von 0,3-0,7, was einer CFU von ca.  $1-2,5 \times 10^8$ /ml entspricht.

#### 2.3.1.3 Ausplattieren von Bakterien

Von einer geeigneten Verdünnung einer Bakterienkultur werden 100-200 µl auf eine Agarplatte mit Nährmedium gegeben und mit einem abgeflamten Metallspatel gleichmäßig verteilt. Nach kurzem Antrocknen werden die Platten bei 27°C (*Yersinien*) bzw. 37°C (*E.coli*) im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 24 h sind auf den Platten Einzelkolonien zu erkennen.

### 2.3.1.4 Lagerung von Bakterien

Bakterienkolonien können auf Agarplatten, die mit Parafilm abgedichtet wurden, ca. 4 Wochen bei 4-10 °C überleben. Um Bakterien für eine unbegrenzte Zeit überlebensfähig zu machen, sollte man sie in Nährmedium geben, dem 20%-iges Glycerin zugegeben wurde, und sie bei -80 °C einfrieren.

## 2.3.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.2.1 DNA-Fällung

DNA lässt sich aus verdünnten wässrigen Lösungen mittels Alkohol präzipitieren. Zum Ausfällen der DNA aus einer wässrigen Lösung gibt man zuerst 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat zu, dann für 4-10 h 2 Teile -20° kalten Äthanol zur DNA-Fällung. Die so spontan ausgefallene Nukleinsäure wird durch Zentrifugation pelletiert und mit Äthanol gewaschen, um sie von Salzresten zu reinigen. Die DNA wird dann in gewünschter Konzentration in der Pufferlösung wieder aufgenommen.

### 2.3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Dank der verschiedenen Eigenschaften von plasmid- und chromosomaler DNA lassen sich diese beiden DNA-Arten trennen. Die viel kürzere Plasmid-DNA kann nach Denaturierung wieder hybridisieren, während die chromosomale DNA aufgrund ihrer Länge nicht wieder hybridisiert.

Bei der Isolierung wird zunächst die Bakterienzellwand aufgelöst, um dann die gesamte bakterielle DNA im alkalischen Milieu zu denaturieren. Nach Neutralisation der alkalischen Lösung renaturiert die kovalent geschlossene, zirkuläre Plasmid-DNA und löst sich im Überstand. Die chromosomale DNA pelletiert und wird entfernt. Der Überstand wird nun auf eine Mini-Prep-Säule (Quiagen, Hilden) mit Glasmilchmatrix geladen, durch Zentrifugation von Verunreinigungen gesäubert und eluiert.

Um große Mengen reiner Plasmid-DNA zu bekommen, wird nach dem Protokoll der Firma Macherey-Nagel, Düren, verfahren, bei dem die Plasmid-DNA über Austauscher-Säulen (Nucleobond AX 100) aufgereinigt wird.

### 2.3.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach auftrennen zu können, wird die Agarosegelelektrophorese angewandt. Hierbei wird die Agarose (1%) im entsprechenden Laufpuffer (1 x TAE-Puffer) aufgekocht und nach kurzem Abkühlen auf ca. 50°C in das Bett einer Horizontal-Gelelektrophoresekammer gegossen. Die zu analysierende DNA-Probe wird mit 1/10 VT 10 x Probenpuffer versetzt und genauso wie ein Elektrophoresemarker in die Taschen pipettiert, die mit Hilfe des Gelkammes entstanden sind. Bei einer angelegten Spannung von 5 V/cm werden die Probe und der Probenpuffer in die verschieden großen Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt.

Danach wird das Gel für 10 min in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt, sodass die darin enthaltene DNA anschließend unter UV-Beleuchtung sichtbar wird und die Größe der Fragmente anhand des zusätzlich aufgebrauchten DNA-Elektrophorese-Markers bestimmt werden kann.

### 2.3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird angewandt, um geringe Mengen vorhandener DNA zu amplifizieren. Dabei wird mit Hilfe eines der DNA komplementären Primerpaars und einer hitzestabilen DNA-Polymerase eine multiple Anzahl von Kopien der gewünschten DNA hergestellt.

Um die DNA aus einer Bakterienzellmasse zu erhalten, wird eine auf einer Platte gewachsene Kolonie in 70 µl steriles Wasser gegeben, für 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend 5 min bei 15000 rpm abzentrifugiert.

Aus diesem Gesamtzelllysat wird 5 µl des DNA-haltigen Überstandes in einem 100 µl PCR-Ansatz eingesetzt. Ein solcher Ansatz enthält außerdem 2,5 U Taq-Polymerase mit 1/10 des entsprechenden Puffers, je 1 µM der beiden Primer, je 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), dieser wird dann mit Ampuwa auf 100 µl aufgefüllt.

Im PCR-Thermocycler wird die Probe dann einmalig 5 min auf 94°C erhitzt und damit denaturiert. Es folgen dann 25-35 Zyklen mit Denaturierung der DNA bei 94 °C für 45 sec, Bindung der Primer bei ihren entsprechenden Schmelztemperaturen für 1 min und die DNA-Elongation bei 72 °C für 2 min.

Die PCR endet mit einem 7-minütigen Elongationsschritt bei 72 °C. Zur Kontrolle werden 10 µl des PCR-Ansatzes elektrophoretisch aufgetrennt und der restliche Ansatz mit Hilfe des „PCR Purification Kit“ (Quiagen, Hilden) aufgereinigt.

### 2.3.2.5 Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

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

Die Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgt 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 12-24 h (PCR-Produkt) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und über „QIAquickspin“-Säulen (Quiagen, Hilden) aufgereinigt.

### 2.3.2.6 Ligation

DNA-Fragmente, die durch Restriktionsverdau (2.3.2.5.) oder durch PCR-Amplifikation entstanden sind, können in Plasmide, sogenannte Vektoren, eingebaut werden. Dazu werden sowohl das DNA-Fragment, als auch der Vektor erst in einem Restriktionsverdau an gleichen Sequenzen geschnitten und dann unter Zugabe eines Ligationsenzyms ligiert, wobei große lineare und zirkuläre DNA-Stränge entstehen.

Zur Ligation werden 0,5 µg Vektor-DNA und 1 µg DNA-Fragment mit dem entsprechenden Volumen 10 x Ligase-Puffer (Endkonzentration 1 x Ligase-Puffer) sowie 1 U T4-DNA Ligase für 16-18 h bei 14 °C inkubiert.

### 2.3.2.7 Transformation von *E.coli*, *Yersinien* und *Salmonellen*

Um DNA wieder in Bakterien einzuschleusen, nutzt man die Transformation. Bei der hier angewandten Methode der Transformation wird die ligierte DNA oder Plasmide zu einer Bakteriensuspension hoher Zelldichte pipettiert und dann kurzzeitig einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. Man nimmt an, dass sich dabei Poren in der Bakterienzellwand öffnen, durch die die Plasmid-DNA dann ins Zellinnere diffundieren kann. Für die Elektroporation müssen die Bakterien zunächst kompetent gemacht werden: Von einer Übernachtskultur gibt man 6 ml in 400 ml LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben und inkubiert diese Kultur bis zu einer OD von 0,4. Alle weiteren Schritte haben dann auf Eis gelagert zu geschehen.

Die Kultur wird dreimal in eiskaltem Ampuwa und einmal in 10-prozentigem Glycerin gewaschen (4 °C; 10 min; 6000 rpm) und in 600 µl 10-prozentigem Glycerin resuspendiert. Davon werden je 100 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert. Die 1,5 ml-Eppendorfgefäße werden in mit Trockeneis gekühltem Ethanol schockgefroren und bei -80 °C eingefroren.

Für die Transformation selbst lässt man die Bakterienlösung auf Eis auftauen und pipettiert 50 µl in eine Transformationsküvette. Dann werden 0,1-1 µg Plasmid-DNA dazupipettiert und in einem „Gene-Pulser-Transfection-Apparatus“ der Firma BioRad (U=2,5 kV; C=25 µF; R=200 Ohm) elektroporiert. Nach erfolgreicher Elektroporation (Zeitkonstante 4-5 msec) werden die Bakterien in 1 ml Medium aufgenommen und 1 h bei 27 oder 37 °C geschüttelt und anschließend auf Agar mit dem entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

### 2.3.2.8 ET-Klonieren

Um ein DNA-Fragment in ein Plasmid zu integrieren, bzw. um fluoreszierende *Yersinien* WA[pYV08::GFP] und WA[pYV08::RFPexp] herzustellen, lassen sich verschiedene Klonierungstechniken anwenden. Eine neue Technik ist das ET-Klonieren, benannt nach den *E.coli*-Rekombinasen RecE und RecT, das auf homologer Rekombination beruht und zum Allelaustausch führt.

Hierbei werden die entsprechenden Gene als PCR-Produkte direkt in Bakterien, die zusätzlich Phagen-Rekombinasen produzieren können, durch Elektroporation eingeführt. Die entsprechenden Primer enthalten Nukleotide, die komplementär zu dem



auszutauschenden DNA-Bereich sind. In einem ersten Schritt wurde WA[pYV08] mit dem Plasmid pKD46 transformiert. Kodiert auf diesem Plasmid sind die Rekombinasen *red $\alpha$*  und *red $\beta$*  und zusätzlich *red $\gamma$*  (aus dem  $\lambda$  Phagen), welches als Inhibitor für die bakterielle Exonuklease fungiert. Die Übernachtskultur von WA[pYV08,pKD46] wird verdünnt für die exponentielle Wachstumsphase. Die Expression der Rekombinasen wird mit 0,1%-iger Arabinose induziert. Diese Yersinien werden elektrokompetent gemacht und bei -80°C eingefroren. Darauf werden LacRFPexp bzw. LacGFP mit einer Kanamycinkassette ligiert. Mit Hilfe von PCR-Primern wird das Produkt amplifiziert. An den Primern sind jeweils zusätzlich ca. 50-70 komplementäre Nukleotide synthetisiert. Das PCR-Produkt wird über ein Agarosegel gereinigt und mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut, um die Template-DNA zu entfernen. Nach einer erneuten Reinigung und Präzipitation mit Ethanol, werden 1-2  $\mu$ g dieser DNA in die elektrokompetenten Yersinien elektroporiert.

Durch homologe Rekombination wurde das Fragment in das gewünschte Plasmid integriert.

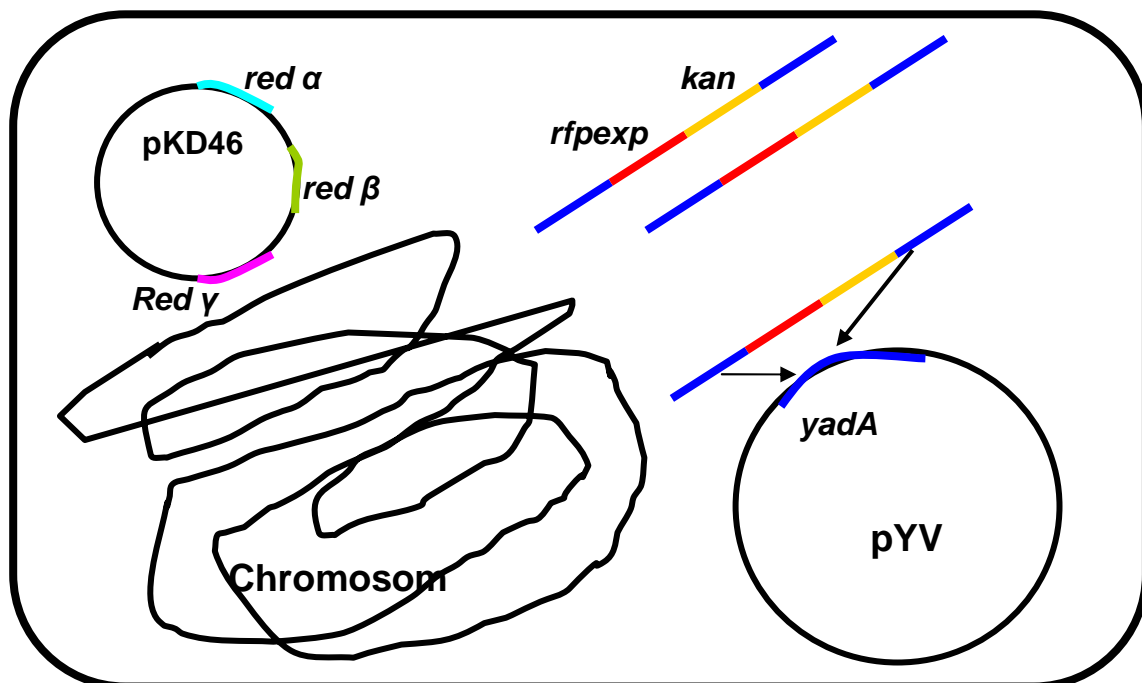


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des ET-Klonierens zur Herstellung der Mutanten mittels Allelaustausch: WA[pYV08,pKD46] produziert die notwendigen Rekombinasen. Ein PCR Produkt, bestehend aus einer Kanamycinkassette, ligiert an LacRFPexp und den flankierenden homologen Nukleotiden des Genabschnitts von upstream *YadA* Basenpaar 61-1550 wird in diesen Stamm per Elektroporation eingeführt. Die Rekombinasen katalysieren die homologe Rekombination, sodass RFP und Kanamycin im Plasmid integriert werden.

### 2.3.3 Mausinfektionsversuch

Bevor Mausinfektionsversuche mit den rekombinanten Yersinien durchgeführt werden, werden diese Stämme mauspassagiert. Die jeweiligen Stämme werden dazu intraperitoneal in die Balb/c-Maus gespritzt ( $1 \times 10^7$  CFU), nach 24 h wird eine Peritonealspülung (siehe unten) durchgeführt und diese auf entsprechenden Antibiotika-haltigen Platten ausplattiert. Die Yersinien werden sowohl auf die Präsenz des pYV-Plasmids, wie auch auf das des entsprechenden Konstruktes hin untersucht. Die kontrollierten Yersinien werden daraufhin bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren.

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

	Intraperitoneal (i.p.)	Intravenös (i.v.)	Oral (p.o.)
Yersinien	$1 \times 10^7$ CFU	$5 \times 10^5$ CFU,	$5 \times 10^9$ CFU
Salmonellen	$1 \times 10^4$ CFU	$1 \times 10^3$ CFU	$1 \times 10^6$ CFU

Zur intravenösen Applikation werden  $100\text{ }\mu\text{l}$  der entsprechenden Bakterienkonzentration in die laterale Schwanzvene injiziert. Für die gastrointestinale Infektion werden die Mäuse mindestens für 12 h ohne Wasser und Futter gehalten, und danach mit einer hochkonzentrierten Bakteriensuspension von  $50\text{ }\mu\text{l}$  gefüttert. Intraperitoneal werden die Mäuse durch Injektion von  $100\text{-}200\text{ }\mu\text{l}$  Bakteriensuspension in den Peritonealraum infiziert.

Es werden Balb/c-Mäuse i.p., i.v. und p.o. mit den jeweiligen Yersinienstämmen bzw. Salmonellenstämmen infiziert. Die Infektionsdauer beträgt 3 bei i.p.- und i.v.-Infektion und 5 Tage bei oraler Infektion. Nach Tötung der Maus wird das Fell bauchwärts aufgetrennt. Eine Peritonealspülung wird nach i.p.-Infektion mit 5 ml eiskaltem, sterilem 0,9%-igem NaCl durchgeführt, und ein Aliquot wird zur Keimzahlbestimmung eingesetzt. Anschließend wird der Bauchraum geöffnet, Milz, Leber und nach oraler Infektion der Darm entfernt. Der Darm wird mit 4 ml NaCl gespült. Die Organe werden mit einem Sieb und eiskaltem 0,9% NaCl homogenisiert. Es werden Verdünnungsreihen aufgestellt und auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert. Nach 24-48-stündiger Inkubation bei  $27\text{ °C}$  werden die Kolonien ausgezählt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit bei den Versuchen zur Kreuzfütterung werden pro Organ und Maus jeweils 100 Klone auf Nalidixin-Agar und 100 auf Nalidixin-Chloramphenikol-Kanamycin-Agar ausgestrichen. Da die *irp1*-Mutante gegen diese drei Antibiotika resistent ist, der Wildtyp aber nur gegen Nalidixin resistent ist, lässt sich durch Vergleich des Bakterienwachstums auf den beiden Platten das Verhältnis von Mutante an dem aller aus der Maus rückisolierten *Yersinien* ermitteln.

Ein weiterer Teil der der Maus entnommenen Organe wird für das Kryomikrotom vorbereitet, indem diese in Flüssig-N<sub>2</sub> schockgefroren werden (61). Die Dicke der Kryoschnitte beträgt 8-25 µm. Der Rest der Organe wurde für mikroskopische Untersuchung verwandt.

### 2.3.3.1 Infektion

Mausinfektionen wurden mit folgenden Bakterien durchgeführt:

- Yersinia enterocolitica*: WA[pYV08,pRFP2],  
WA[pYV08,pRFPexp],  
WA[pYV08,pGFP],  
WA[pYV08::RFPexp],  
WA[pYV08::GFP],  
WA[pYV08],  
WA<sub>*irp1*</sub>[pYV08]
- Salmonella typhimurium*: S. Typhimurium[pCJLacRFPexp],  
S.Typhimurium[pCJLacGFP].

Folgende Variationen der Infektionsdosen wurden eingesetzt:

Alleinige Infektion mit WA[pYV08,pRFP2];

Mischinfektion von WA[pYV08,pRFPexp] und WA[pYV08,pGFP] in den Verhältnissen 1:1, 1:10, 1:100 und 10:1, 100:1 oral, i.p. und i.v.;

Mischinfektion von WA[pYV08::pRFPexp] und WA[pYV08::GFP] in den Verhältnissen 1:1, 1:10, 1:100 und 10:1, 100:1 oral, i.p. und i.v.;

Mischinfektion von WA[pYV::pRFPexp] und WA[pYV::GFP] als gleichzeitig orale und i.p. bzw. orale und i.v.-Infektion;

Alleinige Infektion mit WA[pYV08];

Alleinige Infektion mit WA<sub>*irp1*</sub>[pYV08];

Mischinfektion mit WA[pYV08] und WA*irp1*[pYV08] im Verhältnis 1:1, 1:10, 1:100 und 10:1, 100:1 oral, i.p., iv;

Mischinfektion mit WA[pYV::RFPexp] und WA*irp1*[pYV08] als i.p.-Infektion im Verhältnis 1:1.

## 2.3.4 Histologische Methoden

### 2.3.4.1 Anfertigung von Kryomikrotomschnitten

Milz, Leber und Peyersche Plaques werden der Maus entnommen, in Kryoröhrchen mit TissueTek eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Organe werden dann auf einem kleinen Teller eines Kryomikrotoms mittels TissueTek befestigt und davon 5-30 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die auf einen speziellen Kryobjektträger gebracht werden. Die Gewebeschnitte werden in 4%-igem Formalin fixiert, dreimal in PBS gewaschen und mit Fluoprep und Deckgläsern abgedeckt.

### 2.3.4.2 Fixierungsmethoden

Formalinfixierung: In eine Plastikschaale werden 180 ml PBS und 20 ml 39%-iges Formaldehyd gegeben. Drei weitere Schalen werden mit 200 ml 100%-igem PBS gefüllt. Sowohl die vorher angefertigten Gewebeschnitte, als auch die Objektträger mit Ausstrichen von Homogenaten werden für 10 min in das 3,9%-ige Formaldehyd gestellt. Danach werden die Objektträger dreimal für 10 min in PBS gewaschen, luftgetrocknet und bei 4 °C aufbewahrt.

Acetonfixierung: Aceton wird in einer Plastikschaale auf -20 °C heruntergekühlt und die Objektträger werden für 2 min darin fixiert. Anschließend werden die Objektträger wieder dreimal in reinem PBS gewaschen.

Methanolfixierung: Die Kryoschnitte werden für 10 min in eiskaltem Methanol (-20°C) fixiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen.

### 2.3.4.3 Gewebefärbungen

HE-Färbung: In Aceton fixierte, 5 µm dicke Gewebeschnitte werden kurz in Aqua dest. angefeuchtet, 5 min in Hämalaun gefärbt, wieder in Aqua dest. gespült und 10 min unter fließendem, kaltem Wasser gebläut. Die nun blau gefärbten Gewebeschnitte werden dann 5 min. in Eosin gelegt, zuerst in 90%-igem Ethanol, dann in absolutem Ethanol gespült und dreimal jeweils 5 min in Xylol gehalten, bis die Lösung klar blieb.

Methylenblau-Färbung: In Aceton fixierte, 5 µm dicke Gewebeschnitte werden 5 min mit Methylenblau nach Löffler bedeckt und mit kaltem Wasser abgespült.

### 2.3.4.4 Immunfärbung

In Aceton fixierte, 5 µm dicke Gewebeschnitte werden mit einem Fettstift umrandet und in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Der erste Antikörper gegen Yersinien bzw. gegen Salmonellenantigen wird mit der Verdünnung von 1:100 in PBS jeweils 50 µl pro Schnitt aufgetragen, und die Schnitte werden in der feuchten Kammer für 2 h bei 37°C inkubiert. Dann werden die Schnitte drei mal jeweils für 10 min in PBS gewaschen und jeweils 50 µl des zweiten Antikörpers, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy<sup>TM5</sup> konjugiert ist, in der Verdünnung von 1:100 aufgetragen. Die Schnitte werden wieder für 1 h bei 37°C in der Metallbox inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen und luftgetrocknet. Bevor die Gewebeschnitte unter dem konfokalen Lasermikroskop untersucht und Aufnahmen erstellt werden können, müssen sie noch mit Fluoprep und Deckgläschen abgedeckt werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse zur Mikrokoloniebildung

#### 3.1.1 Vorarbeiten zur Optimierung der GFP-Reifung

##### 3.1.1.1 Austestung verschiedener RFP-Varianten

Es sollten isogene Yersinien hergestellt werden, die mikroskopisch unterschieden werden können. Dazu sollten die fluoreszierenden Proteine GFP und RFP eingesetzt werden. Die Detektion/Visualisierung des GFP in vivo wurde bereits erfolgreich gezeigt und musste daher nicht optimiert werden.

Initial war ein „Wildtyp“-RFP erhältlich, bei dem die Zyklisierung der Chromophore und damit die Fähigkeit zur Fluoreszenz erst nach über 48 Stunden in vitro deutlich wurde. Dieses schloss eine Verwendung in vivo aus. Nachfolgend kam das RFP2 auf den Markt, welches sich durch eine schnellere Zyklisierung auszeichnete (Abb.3-1a, b)). Aber erst mit dem RFPexpress war ein fluoreszierendes Protein vorhanden, welches sich für in-vivo-Studien eignet (s. S.31 Abb.3-2a, b).

Die entsprechenden Gene wurden in Plasmide kloniert. Zusätzlich wurden rekombinante Bakterien hergestellt, die diese Plasmide tragen.

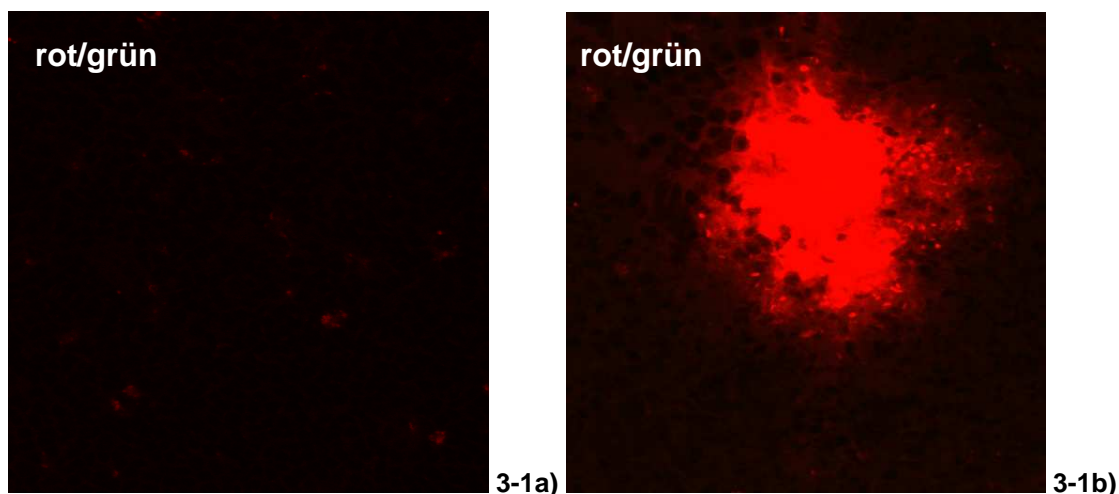


Abbildung 3-1a)b): Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Yersinien in der Milz (WA[pYV08, pRFP2) Organentnahme 3 Tage nach Infektion; 40-fache Vergrößerung).

a) Am Tag der Organentnahme. b) 3 Tage nach Organentnahme (die Organe wurden 3 Tage bei +4°C in Tissue-Tek aufbewahrt, bevor sie schockgefroren und zu Gewebeschnitten weiterverarbeitet wurden).

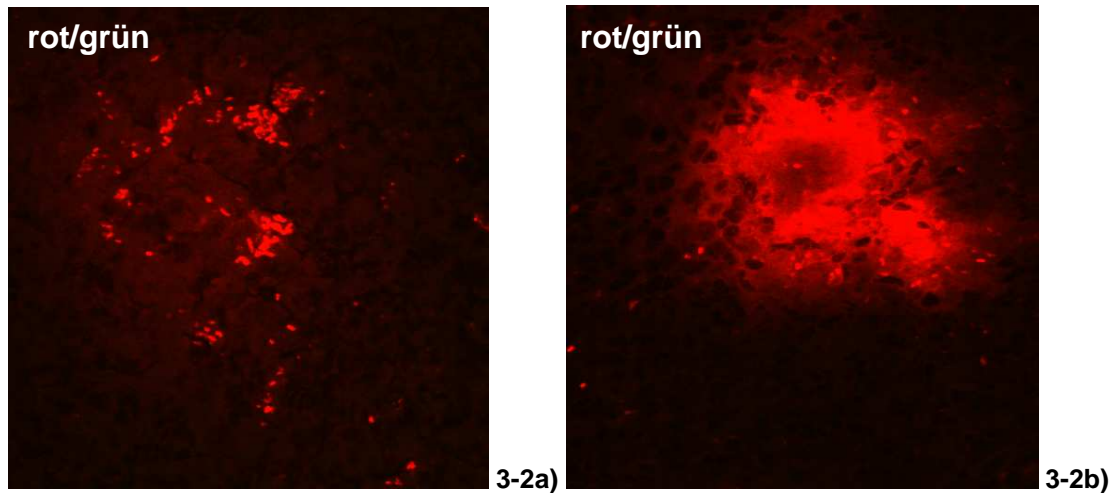


Abbildung **3-2a-b**): Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Yersinien (WA[pYV08,pRFPexp); Organentnahme 3 Tage nach Infektion (40-fache Vergrößerung). Fixiertes Gewebe a) am Tag der Organentnahme. b) 3 Tage nach Organentnahme

### 3.1.1.2 Optimierung der Fixierungslösung

Um die optimalen Ergebnisse bezüglich der Mikroskopie zu erlangen und die hergestellten Schnitte für längere Zeit haltbar zu machen, wurden Versuche mit verschiedenen Fixierungsmethoden durchgeführt.

Im Vergleich zu unbehandelten Schnitten zeigte das fixierte Gewebe eine stärkere Hintergrundfluoreszenz. Zusätzlich wurde auch die Fluoreszenzintensität der Proteine GFP und RFPexpress negativ von den Fixierungslösungen beeinflusst. Diese negativen Effekte galt es durch eine geeignete Fixierung möglichst gering zu halten.

Folgende Fixierungen wurden miteinander verglichen: Formalin, Aceton und Methanol. Es stellte sich heraus, dass Methanol sowohl die Fluoreszenzproteine inaktiviert, als auch die Gewebestruktur stark verändert, somit für die Fixierung nicht geeignet ist (s. S.32 Abb.3-5).

Bei Fixierung mit Formalin und Aceton wurde jeweils eine stärkere Hintergrundfluoreszenz gefunden als bei unbehandelten Schnitten, aber es zeigte sich weder eine Destruktion der Gewebestruktur noch eine Abnahme der Fluoreszenz. Die Bakterien ließen sich zwar etwas weniger scharf abgrenzbar darstellen, waren aber immer noch gut zu erkennen (s.S.32 Abb.3-3, 3-4).

Folgende Bilder wurden alle mit gleicher Einstellung des Lasers und gleicher Vergrößerung (40-fach) aufgenommen.

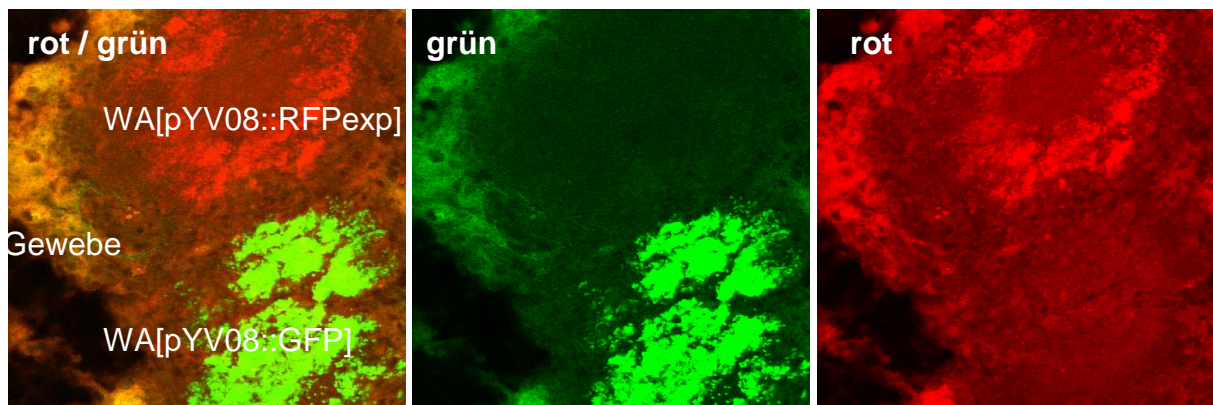


Abbildung 3-3

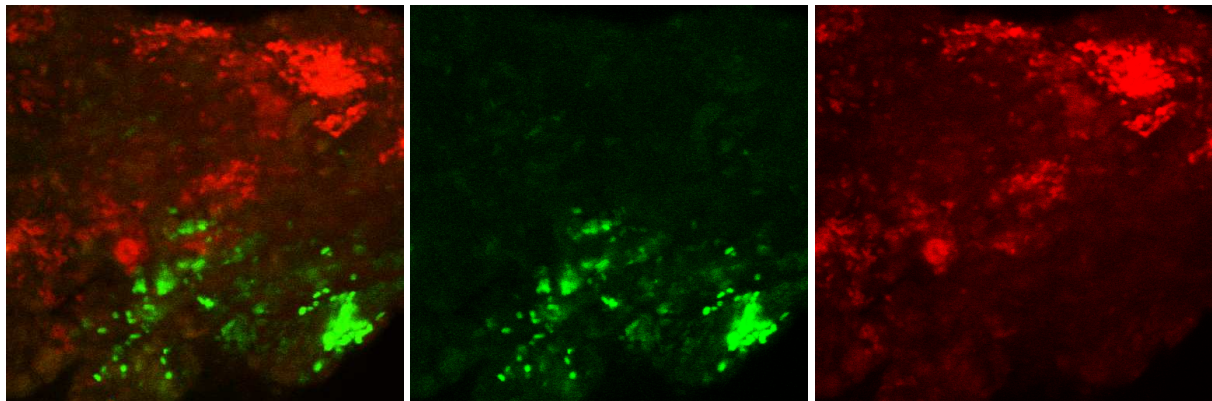


Abbildung 3-4

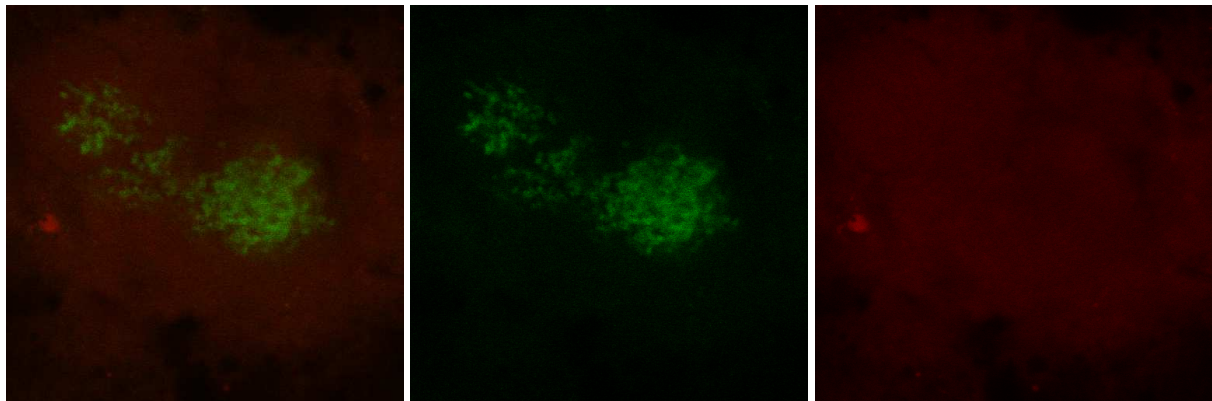


Abbildung 3-5:

Abbildungen 3-3 bis 3-5: Kryomikrotomschnitte der Milz 3 Tage nach i.v.-Infektion mit WA[pYV08::GFP] und WA[pYV08::RFPexp] (40-fache Vergrößerung des konfokalen Lasermikroskops). 3-3) Fixierung in Aceton; 3-4) Fixierung in Formalin; 3-5) Fixierung in Methanol. Gewebestrukturen sind in Abb. 3-5 nicht mehr zu erkennen. Unklar ist, ob rote Fluoreszenz von Mikrokolonien vorliegt, aber von der Hintergrundfluoreszenz nicht mehr zu differenzieren ist.



Weiter stellte sich heraus, dass bei der Behandlung der Gewebeschnitte nicht nur die Fixierungsmethode eine wichtige Rolle spielte, sondern auch die Gewebefärbung an sich nicht ohne Probleme durchgeführt werden konnte. Um darlegen zu können, dass es sich bei den gezeigten mikroskopischen Bildern tatsächlich um *Y. enterocolitica* und *S.Typhimurium* bzw. das bezeichnete Organ handelte, mussten die Gewebestruktur dargestellt bzw. die Bakterien mittels indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Dazu wurde das Gewebe zum einen mit der HE-Färbung nach Mayer und zum anderen mit der Methylenblaufärbung nach Löffler gefärbt. Dabei stellte sich heraus, dass nur die Methylenblaufärbung dazu geeignet war, gleichzeitig das Gewebe und die Bakterien darzustellen. Allerdings war die Fluoreszenz speziell der Yersinien nur sehr schlecht zu erkennen, da durch die Fixierung bei dieser Schnittdicke von 5  $\mu\text{m}$  vermutlich ein Eindringen der Färbelösung erfolgte (s. Abb.3-7).

Die Salmonellen ließen sich mit der Methylenblaufärbung besser darstellen als die Yersinien (Abb.3-6). Die HE-Färbung war auch hier nicht nutzbar, da die Fluoreszenz inhibiert wurde, sodass zwar die Gewebestruktur erkennbar war, jedoch keine Bakterien anhand ihrer Fluoreszenz sichtbar blieben.

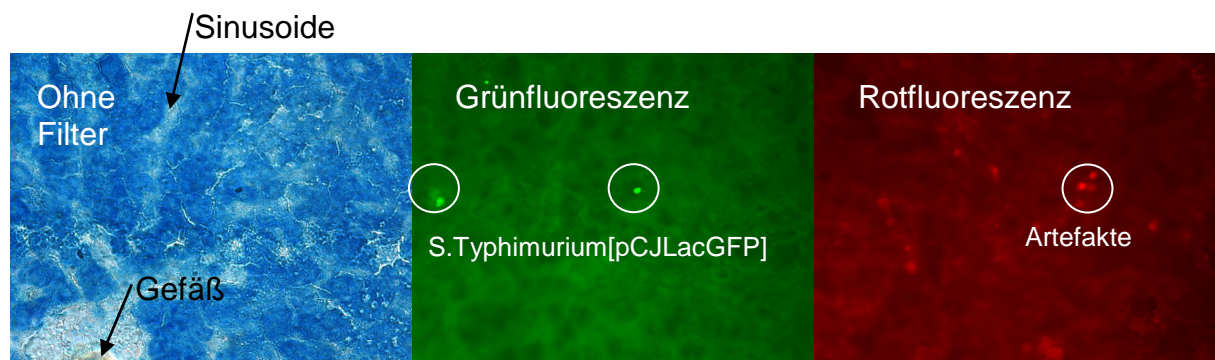


Abbildung 3-6: Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop *S.Typhimurium*[pCJLacGFP] in einem 5  $\mu\text{m}$  dicken mit Methylenblau angefärbten Gewebeschnitt der Leber nach i.p.-Infektion mit Lebersinusoide.

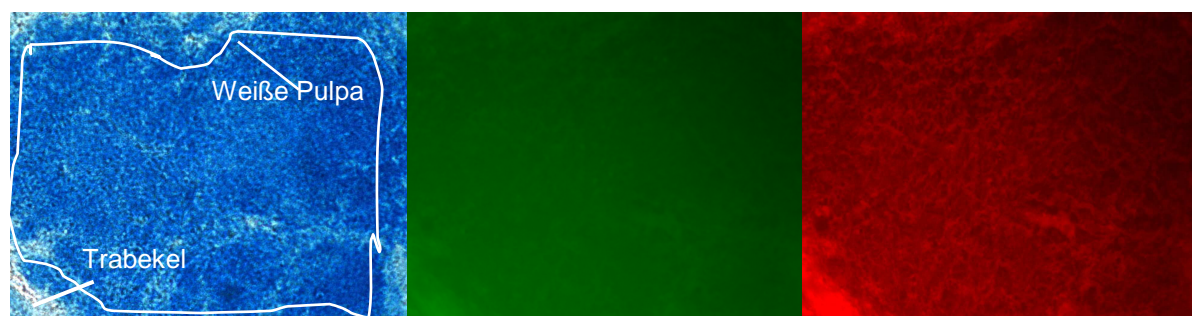


Abbildung 3-7: Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop eines 5  $\mu\text{m}$  dicken Milzschnittes nach i.p.-Infektion mit WA[pYV08::RFPexp] und WA[pYV08::GFP] mit Methylenblau gefärbt (ohne Yersinien).

Zum Beweis, dass es sich bei den auf den Bildern zu sehenden Bakterien um *Y. enterocolitica* bzw. *S. Typhimurium* handelte, wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung Yersinien bzw. Salmonelle kenntlich gemacht [53, 70]. Dabei wurden auf 8 µm dicke Gewebeschnitte Kaninchenantiseren gegen das Yersiniaadhesin YadA bzw. gegen Oberflächenantigene der Salmonellen aufgetragen und für zwei Stunden inkubiert. Nach Waschen der Proben mit PBS wurde der zweite Antikörper (mit Cy<sup>TM</sup>5 konjugiert) aufgetragen und nach einer Stunde Inkubation wurden die Schnitte erneut abgewaschen, dann getrocknet und mit Deckgläschen abgedichtet. Auf den Schnitten ließ sich neben dem Rot und Grün der fluoreszierenden Bakterien nun auch das Blau des Antikörpers, der spezifisch für die jeweiligen Bakterien ist, erkennen (s. Abb. 3-8 und 3-9 S.35). Statt größerer Mikrokolonien, wie sonst bei Yersinien üblich, sind in Abbildung 3-8 einzelne Bakterien zu erkennen, was durch die vergleichbare Dünne des Gewebeschnitts von 8 µm bedingt ist.

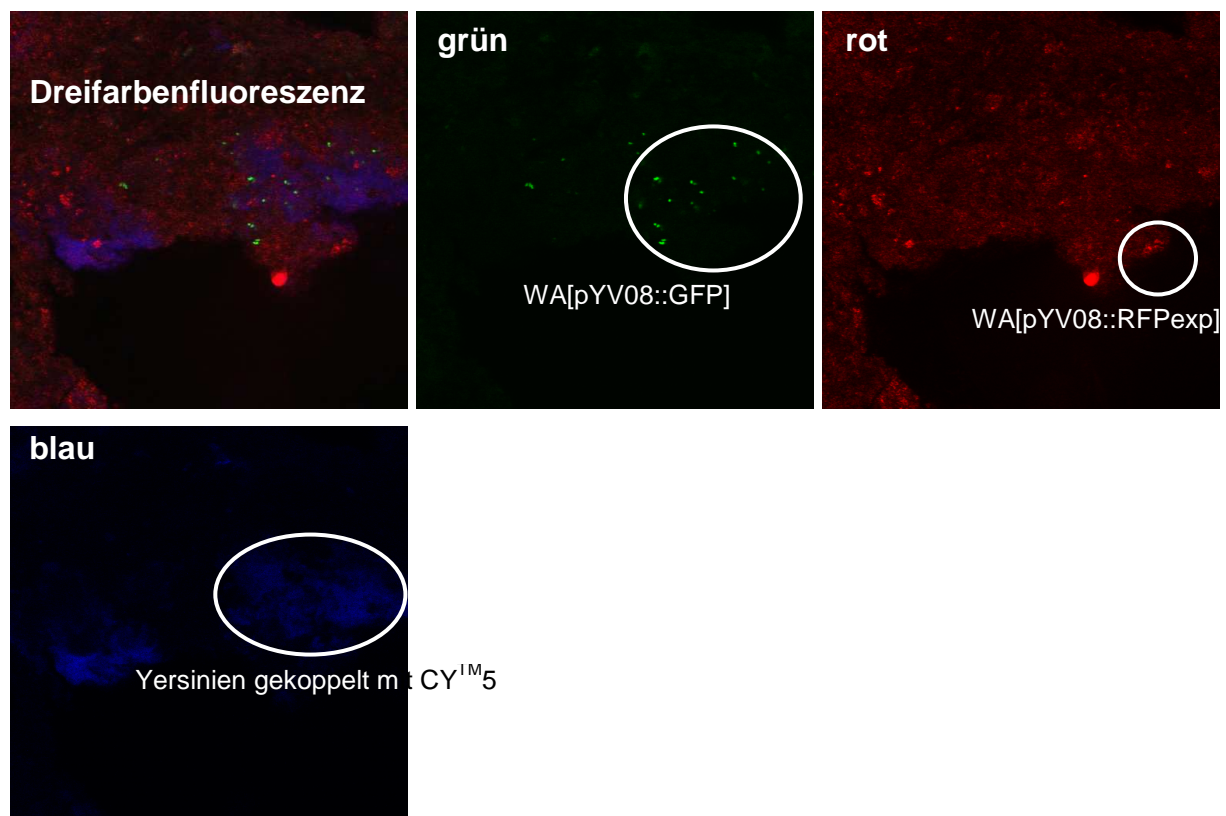


Abbildung 3-8: Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop von einem 8 µm dicken Gewebeschnitt der Milz nach i.v.-Infektion mit WA[pYV08::GFP] und WA[pYV08::RFPexp] und Immunfluoreszenz mit spezifischem Yersinienantikörper gegen YadA und dem zweiten Antikörper gekoppelt mit dem blaufluoreszierenden Cy<sup>TM</sup>5.

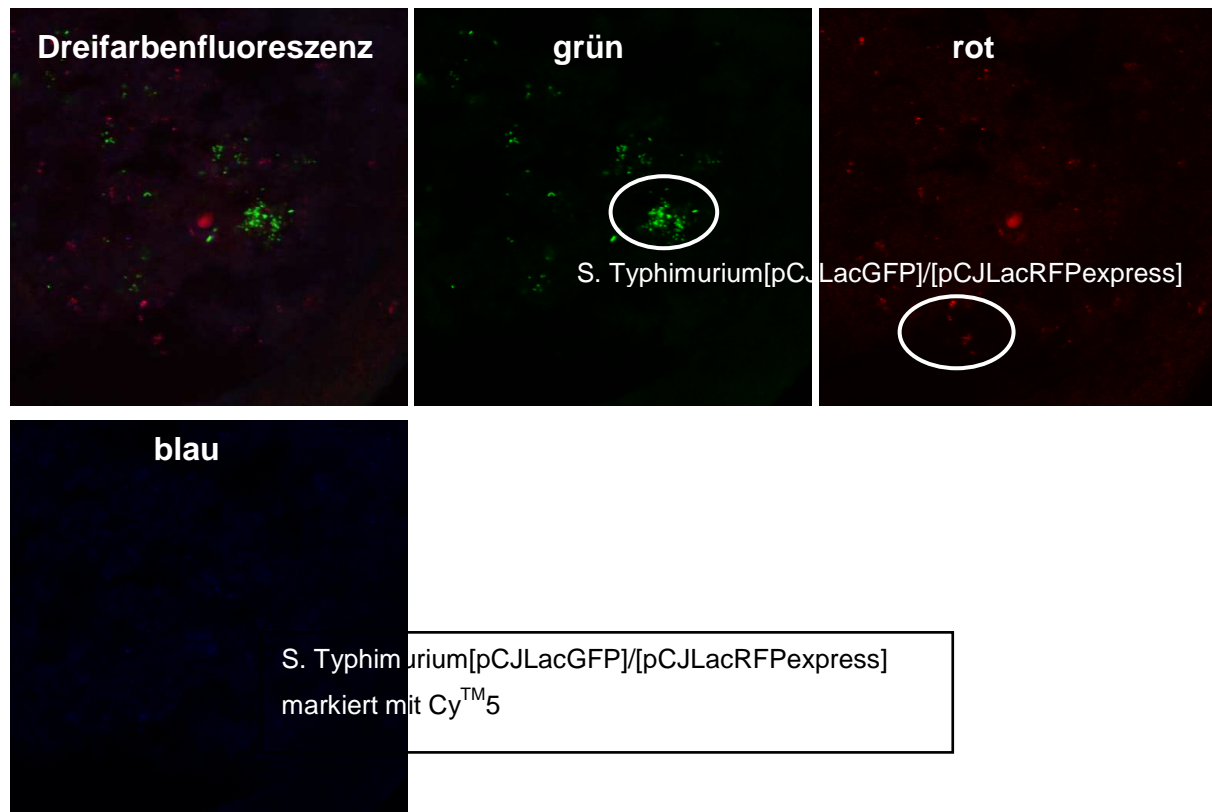


Abbildung 3-9: Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop von einem 8 µm dicken Milzschnitt nach i.p.-Infektion von *S. Typhimurium*[pCJLacRFPexpress bzw. pCJLacGFP] und darauffolgender Anfärbung mit spezifischem Antikörper gegen Oberflächenantigene von *S. typhimurium* und Kopplung mit blau fluoreszierendem Cy<sup>TM</sup>5.

### 3.1.1.3 Optimierung der Fluoreszenzstabilität

Zunächst wurden Infektionsversuche mit WA[pYV08::pGFP] und WA[pYV08::pRFPexp] durchgeführt. Dafür wurden die Gene des GFP und RFPexpress aus dem sich stark replizierenden sogenannten „high-copy“-Vektor pUC mit den Restriktionsenzymen Sal I und Sst I herausgeschnitten und in das „low-copy“-Plasmid pACYC 184 integriert und in WA[pYV08] transformiert (s.S. 36 Abb. 3-10). Bei Infektionen mit diesen Bakterien befürchtete man allerdings, bedingt durch das Plasmid pACYC 184, zwei negative Effekte. Die Plasmide könnten sich als instabil herausstellen, weil sie während der Zellteilung schlecht repliziert werden und nicht weitervererbt werden, sodass die Bakterien ihre Fluoreszenz verlieren. In vivo nach 5-tägiger oraler Infektion mit WA[pYV08,pRFPexp] und WA[pYV08,pGFP] enthielten

aber noch immer 99 % von 525 ausgestrichenen Klonen das Plasmid, sodass sich die Instabilität nicht bestätigte. Aber um absolut sicher zu sein, dass alle Bakterien die Fluoreszenz beibehalten, war es notwendig, die Gene für die Fluoreszenz nicht auf einem niedrig kopierenden zusätzlichen Plasmid pACYC184, sondern im Virulenzplasmid pYV selber einzubringen.

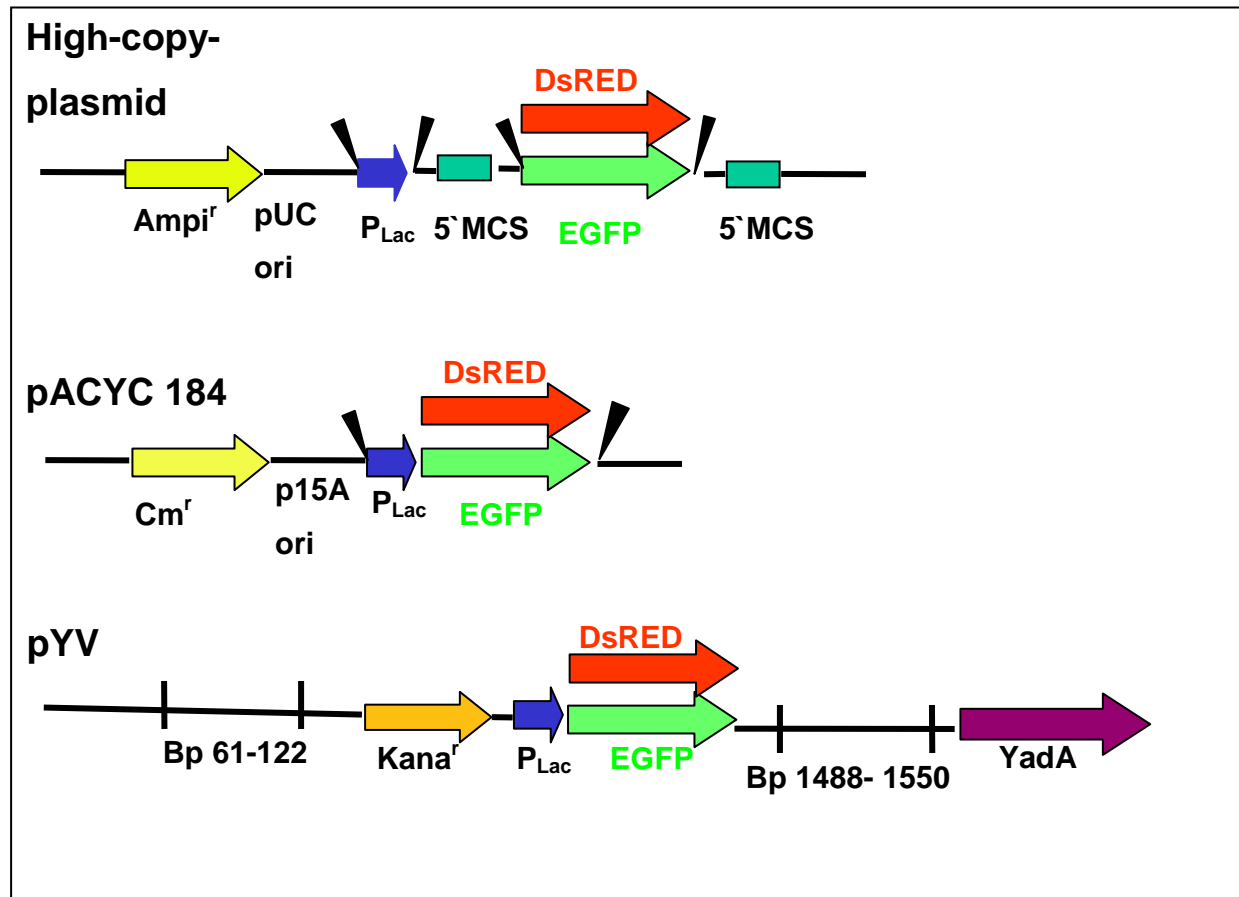


Abbildung 3-10: Verschiedene Plasmide, mit denen Bakterien Fluoreszenz entwickeln können: High-Copy-Plasmid, Low-Copy-Plasmid pACYC 184 und Virulenzplasmid „pYV“ mit GFP bzw. RFPexp und den entsprechenden Insertionsstellen. Für eine stabile Fluoreszenz wurde das Fluoreszenzplasmid zusammen mit einer Kanamycinkassette in den Bereich stromabwärts von  $YadA$  (Bp 61 – 1550) inseriert. Die Pfeile zeigen die Restriktionsschnittstellen für Xba I an.

Um das RFP bzw. GFP mit dem LacZ-Promotor in das pYV zu integrieren, wurde die Technik des so genannten „ET-Klonierens“ eingesetzt, bei der durch eine homologe Rekombination das Insert in den Vektor eingesetzt wird (s. S. 25 Abb. 2-1 , S.36

Abb.3-10). Dazu wurden die GFP- bzw. RFPexpress-Fragmente aus dem jeweiligen Plasmid pCJ-LacGFP bzw. pCJ-LacRFPexpress geschnitten. Die Fragmente wurden mit einer Kanamycinkassette ligiert und transformiert. Nach einer Plasmidisolierung wurden an die entstandenen Plasmide Sequenzen von den Basenpaaren 61-122 und 1488-1550 bei der roten Fluoreszenz bzw. 61-111 und 1501-1550 bei der grünen Fluoreszenz stromabwärts von YadA mittels PCR-Armen kloniert, die zum betreffenden Abschnitt auf dem pYV-Plasmid homolog waren. Das gereinigte Fragment wurde dann in Yersinien des Stamms WA[pYV08;pKD46] transformiert. Dieser Stamm besitzt ein zusätzliches Plasmid, das für die Rekombinasen Red $\alpha$  und Red $\beta$  kodiert, sodass durch eine Rekombination der homologen Arme auf pYV und Plasmid GFP bzw. RFPexpress in das Virulenzplasmid integriert wurde (vgl. S. 24/25). Diese verschiedenfarbig fluoreszierenden Bakterien lassen sich unter dem Fluoreszenzmikroskop gut erkennen.

Allerdings ist die Produktionsrate der Reportergene so niedrig, dass anhand der UV-Lampe alleine keine Unterscheidungen mehr bezüglich der Fluoreszenz einzelner Kolonien auf Agarplatten auszumachen sind. Außerdem ist die Fluoreszenz der Mikrokolonien in den verschiedenen Organen schwächer als bei Bakterien, die die Plasmide pCJLacGFP bzw. pCJLacRFPexpress besitzen (s. S. 38 Abb. 3-11).

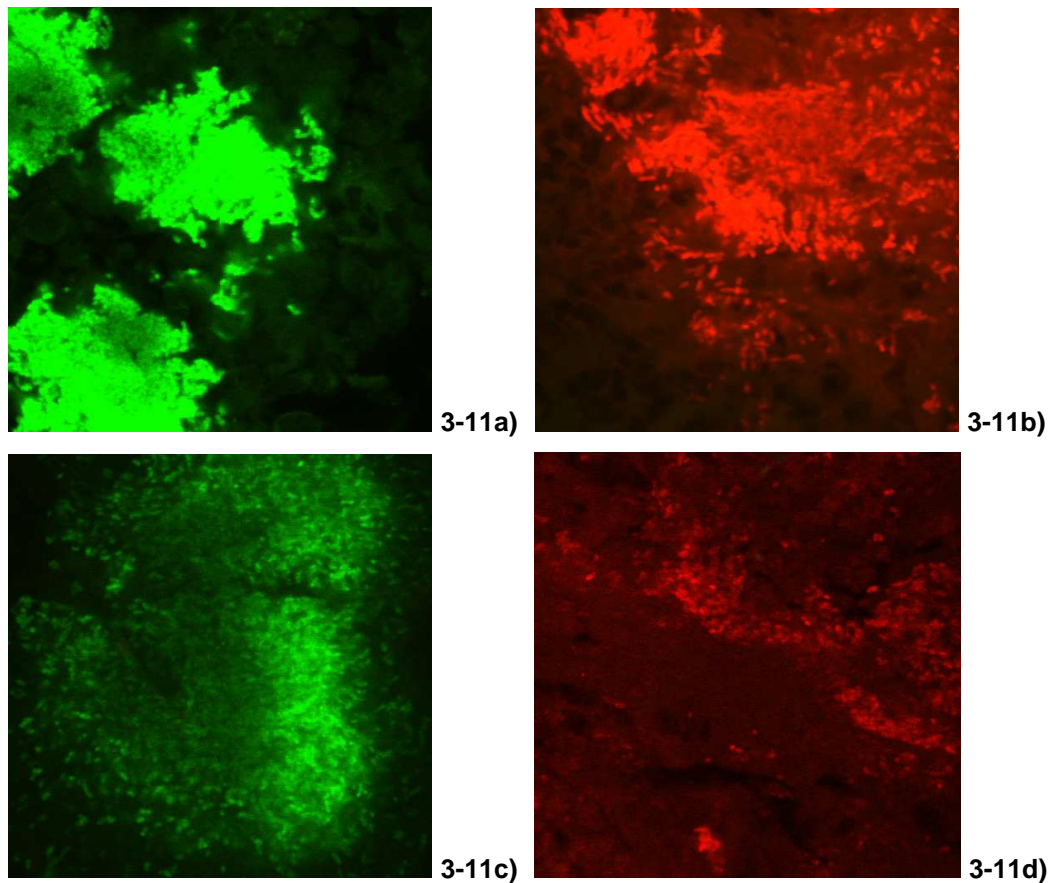


Abbildung 3-11a-d): Mikrokolonien in der Milz 3 Tage nach i.p.-Infektion mit a) WA[pYV08,pGFP] und b) WA[pYV08,pRFPexp] bzw. mit c) WA[pYV08::GFP] und d) WA[pYV08::RFPexp] ((d) wurde mit 1,5-facher Intensität des Lasers und der 40x-Objektiv aufgenommen). Die Intensivität der Fluoreszenz nimmt ab.

Ein weiteres Problem des zusätzlichen Plasmids ist sein Einfluss auf die Teilungsfähigkeit der Bakterien. Es kommt zu einem langsameren Wachstum, als bei denjenigen Bakterien, die das Plasmid nicht besitzen, bzw. bei denen die Gene für die Fluoreszenz im Virulenzplasmid „pYV“ integriert sind (s.S.39 Abb. 3-12).

Im Vergleich wuchsen von den Bakterien mit Plasmid bei 15 Mäusen nach 3-tägiger oraler Infektionsdauer mit einer Infektionsdosis von  $5 \times 10^9$  CFU durchschnittlich  $3,5 \times 10^8$  in der Milz,  $3,9 \times 10^6$  in den Peyerschen Plaques und  $2,6 \times 10^7$  im Darm. Dagegen waren  $1,4 \times 10^9$  in der Milz,  $2,2 \times 10^8$  im Darm und  $1,4 \times 10^8$  in den Peyerschen Plaques bei den 13 Mäusen, die mit solchen Bakterien, bei denen die Gene in das Virulenzplasmid integriert waren, infiziert worden waren. Nur das Wachstum in der Leber bildete eine Ausnahme. Hier waren es mit  $1,2 \times 10^9$  gegen  $4,5 \times 10^8$  mehr Bakterien mit Plasmid, die rückisoliert werden konnten. Jedoch spielt für die hier angestrebten Untersuchungen diese Plasmid-bedingte Reduktion der Vermehrungsrate keine Rolle,

da zunächst nur die Wachstums- und Disseminationsart der Yersinien im Gewebe dargestellt werden sollte.

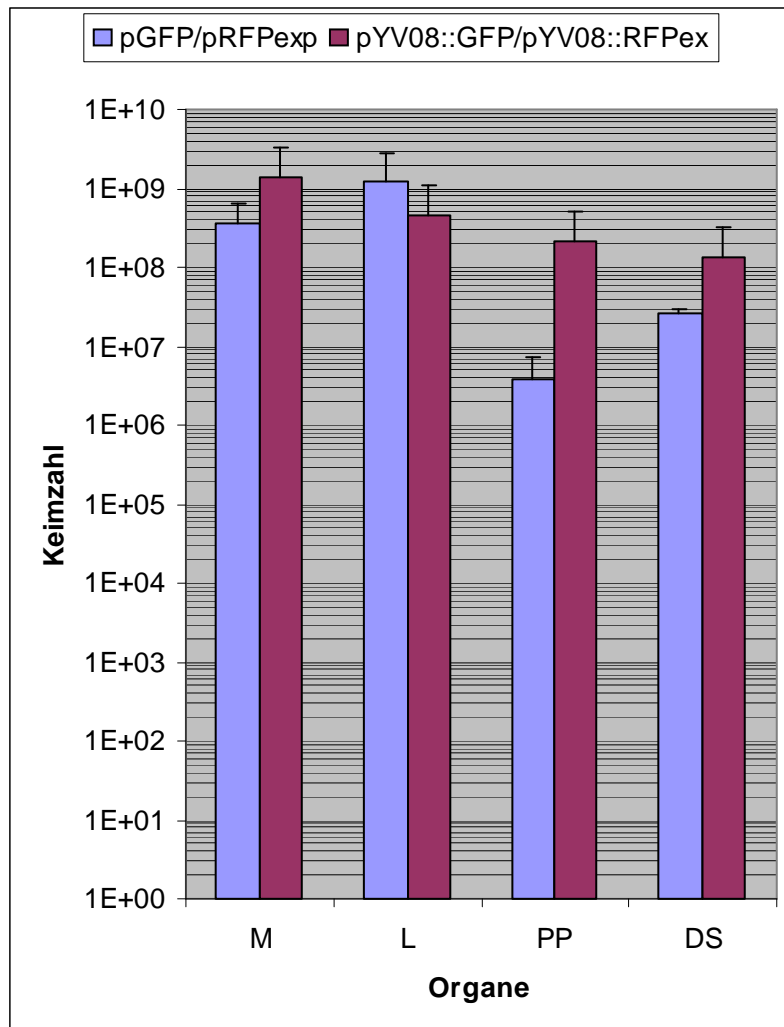


Abbildung 3-12: Anzahl der aus Milz, Leber, Peyerschen Plaques und Darm rückisolierten Bakterien WA[pYV08,pGFP] bzw. WA[pYV08,pRFPexp] im Vergleich zur Anzahl von rückisolierten WA[pYV08::GFP] bzw. WA[pYV08::RFPexp] nach oraler Infektion mit einer Infektionsdosis von  $5 \times 10^9$  CFU.

### 3.1.2 Untersuchungen zur Mikrokoloniebildung

Um herauszufinden, wie sich Yersinien in oral infizierten Mäusen ausbreiten, wurden weibliche Balb/c-Mäuse über drei verschiedene Infektionswege mit einer Mischung aus WA[pYV08::GFP] und WA[pYV08::RFPexp] im Verhältnis 1:1 infiziert und die entnommenen Organe so verarbeitet, wie im „Material- und Methoden“-Teil beschrieben.

Repräsentative Aufnahmen von Kryomikrotomschnitten der Milz-, Leber- und Peyerschen Plaques sind in Abbildung 3-13a bis 3-13e S. 40/41 gezeigt:

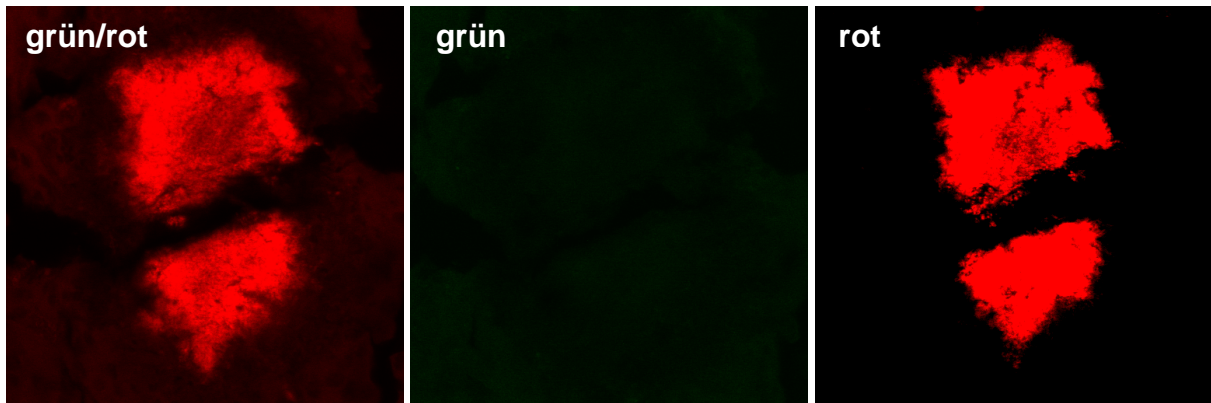


Abbildung 3-13a

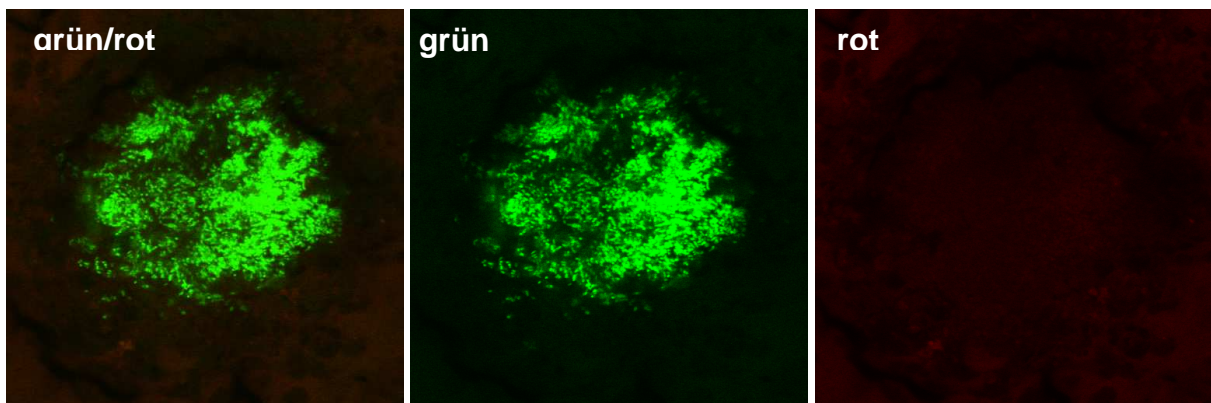


Abbildung 3-13b

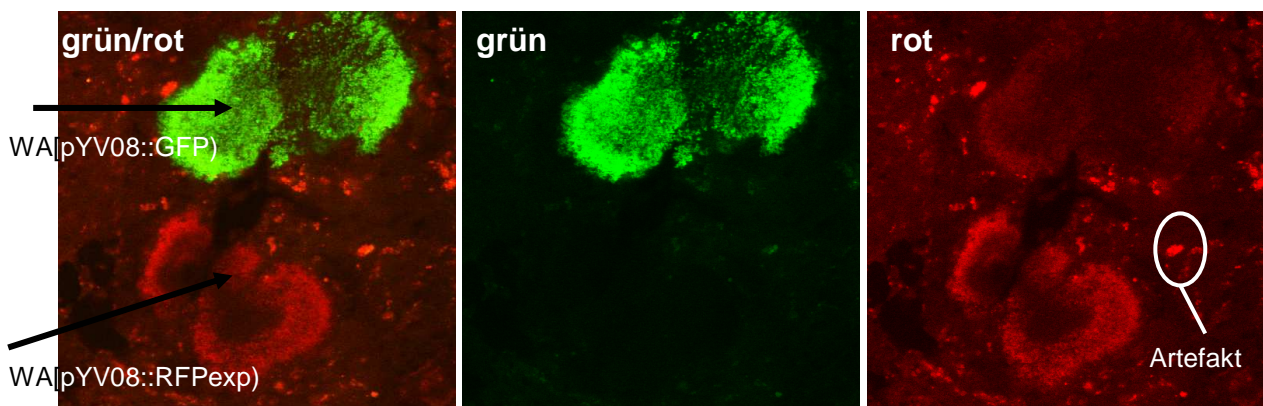


Abbildung 3-13c

Abbildungen 3-13 a-c): Kryomikrotomschnitte a)b) der Leber und c) der Milz 5 Tage nach oraler Mischinfektion von WA[pYV08::GFP] und WA[pYV08::RFPexp] mit WA[pYV08::GFP] oder/und WA[pYV08::RFPexp]-Mikrokolonien aufgenommen mit dem konfokalen Lasermikroskop (25- $\mu$ m-Gewebeschnitt, 40-fachen Vergrößerung).



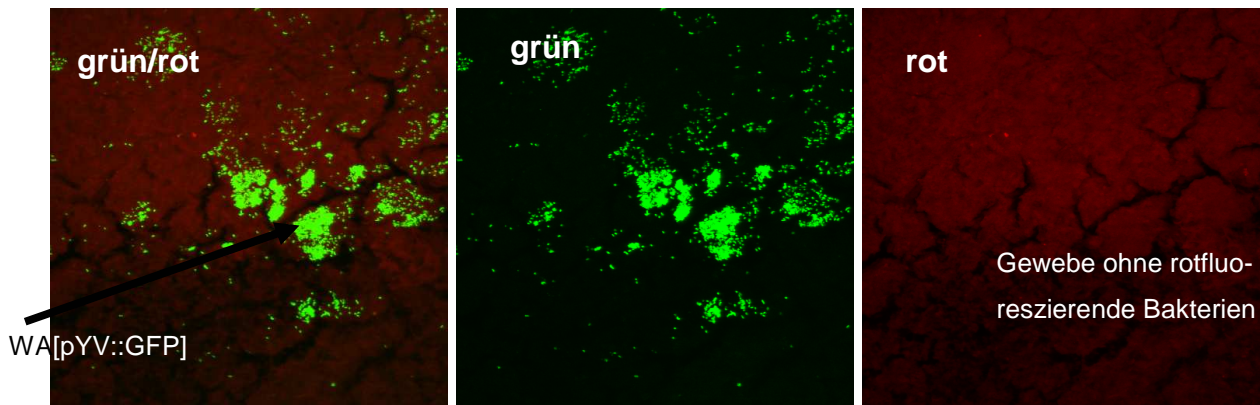


Abbildung 3-13d

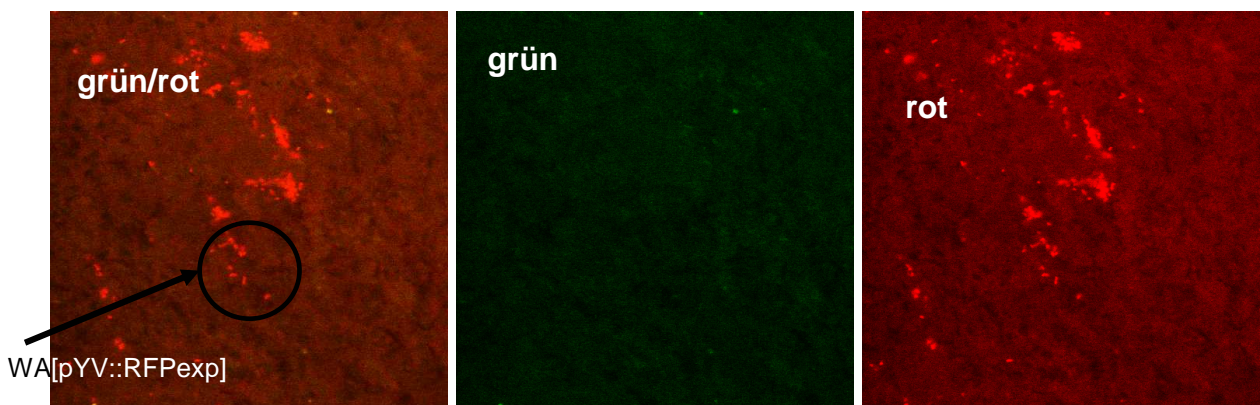


Abbildung 3-13e

Abbildungen 3-13 d,e): Kryomikrotomschnitte eines Peyerschen Plaques mit d) WA[pYV08::GFP] und e) WA[pYV08::RFPexp] nach 5 Tagen oraler Mischinfektion mit WA[pYV08::GFP] und WA[pYV08::RFPexp], aufgenommen mit dem konfokalen Lasermikroskop (40-fachen Vergrößerung).

Auf den mikroskopischen Bildern sind von allen entnommenen Organen immer nur einfarbige Mikrokolonien zu erkennen. Eine Kolonie besteht entweder nur aus WA[pYV08::GFP] oder aber nur aus WA[pYV08::RFPexp]. Dies lässt den Schluss zu, dass aus einem einzigen Bakterium eine klonale Mikrokolonie entstanden ist. Würden mehrere Bakterien an einem Ort wachsen, dann müssten auch grün-rot gemischte (nicht klonale) Abszesse zu sehen sein.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Peyersche Plaques. Dies bedeutet, dass nur wenige Bakterien in einen Peyerschen Plaques eindringen und auch hier klonale Mikrokolonien bilden. Ebenso scheinen von den Peyerschen Plaques nur wenige Yersinien in Milz und Leber zu disseminieren.

Dass nur so wenige Bakterien Milz und Leber zur Besiedelung erreichen, wurde durch ein weiteres Experiment bestätigt. Es wurden Mäuse mit rot und grün fluoreszierenden Yersinien simultan infiziert, wobei aber der Anteil von roten zu grünen Bak-

terien im Verhältnis von 1 WA[pYV08::GFP]:100 WA[pYV08::RFPexp] und 1:10 bzw. 100 WA[pYV08::GFP]:1 WA[pYV08::RFPexp] und 10:1 in der Infektionsdosis variiert wurde. In Organen solcher Mäuse wurden um so mehr grüne Abszesse bzw. Peyersche Plaques mit grün fluoreszierenden Bakterien gefunden, je höher der Anteil der WA[pYV08::GFP] in der Infektionsdosis vorhanden waren. Umgekehrt ließen sich ungefähr 10 bzw. 100 mal so viele rote Abszesse nach Infektion von mehr WA[pYV08::RFPexp] in der Infektionsdosis detektieren.

In den Organen der Mäuse, die auf intraperitonealem bzw. intravenösem Weg infiziert wurden, sahen die Mikrokolonien in Struktur und Form ähnlich aus. Nur in der Ausbreitung unterschieden sie sich wie folgt: Bei den intravenös infizierten Mäusen waren die Mikrokolonien großflächiger und häufiger als bei den intraperitoneal infizierten Mäusen (s.S.43 Abb. 3-15a)b)). Bei der intraperitonealen Infektion hingegen war die Zahl der Mikrokolonien sowohl in der Milz als auch in der Leber deutlich höher, als nach oraler Infektion (s. Abb.3-14a)b)).

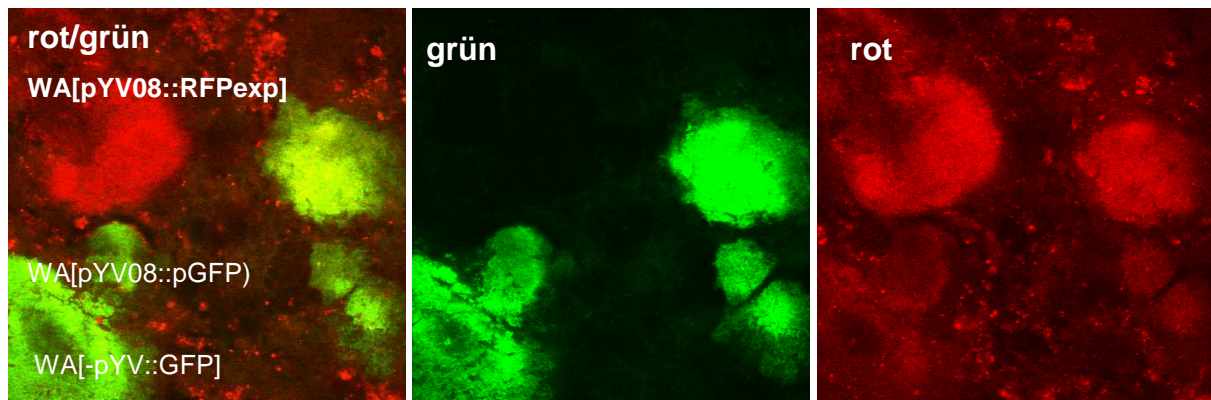


Abbildung 3-14a)

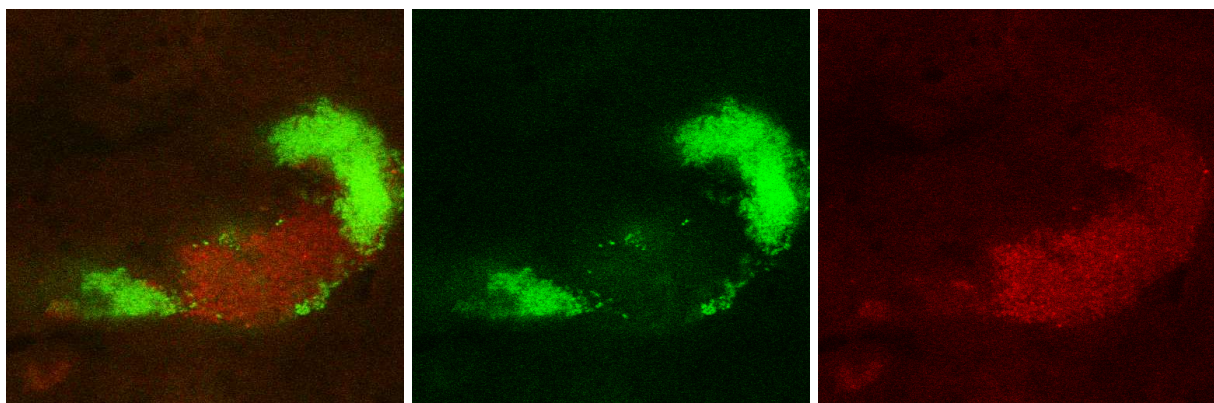


Abbildung 3-14b)

Abbildungen 3-14 a) b): Mikrokolonien a) in der Milz und b) in der Leber nach 3-tägiger i.p.-Infektion mit WA[pYV08::GFP] und WA[pYV08::RFPexp], aufgenommen mit dem konfokalen Lasermikroskop (25- $\mu$ m-Gewebeschnitt, 40-fachen Vergrößerung).

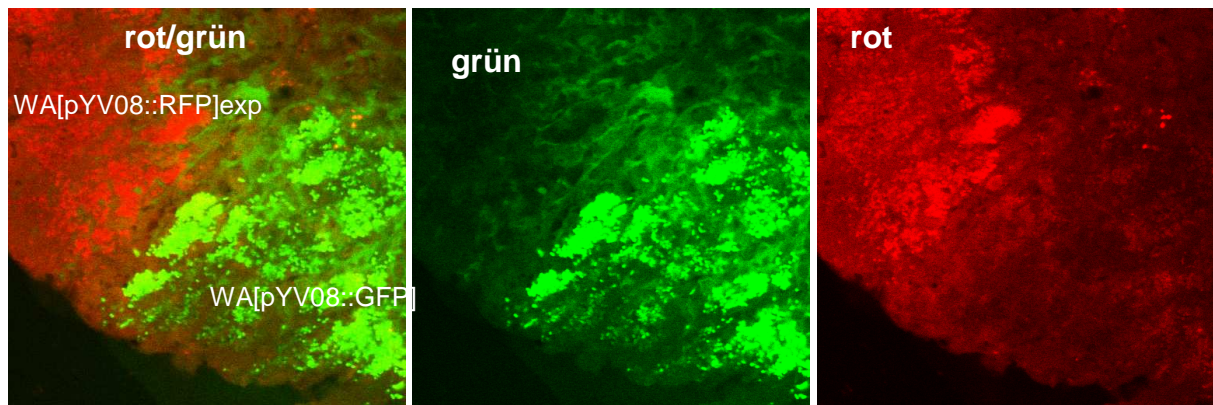


Abbildung 3-15a)

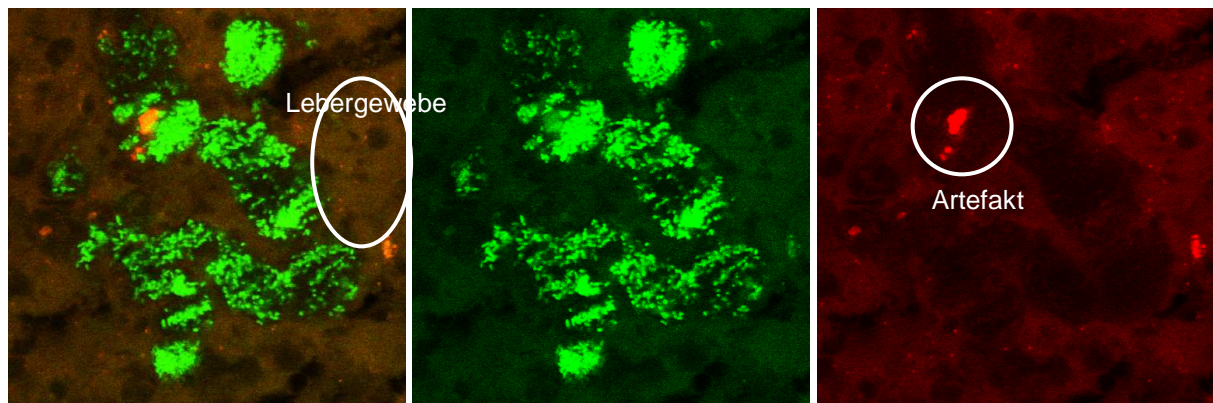


Abbildung 3-15b)

Abbildungen 3-15 a) b): Mikrokolonien a) in der Milz und b) in der Leber mit WA[pYV08::GFP] und WA[pYV08::RFPexp] 3 Tage nach i.v.-Mischinfektion mit WA[pYV08::GFP] und WA[pYV08::RFPexp], aufgenommen mit dem konfokalen Lasermikroskop (25- $\mu$ m-Gewebeschnitt, 63-fache Vergrößerung).

### 3.1.3 Infektionsversuche mit *Salmonella* Typhimurium

Die Yersinia-Mausinfektionsversuche zeigten, dass sehr wenige Bakterien aus dem Darm in die Peyerschen Plaques gelangen und dass die Mikrokolonien klonal sind. Daraus resultierte die Frage, ob dies für enteropathogene Bakterien allgemein gültig ist, oder ob andere invasiv darmpathogene Bakterien wie Salmonellen auf andere Weise die Mukosa penetrieren und in die Organe disseminieren. In dieser Arbeit wurden zum Vergleich Mausinfektionen mit *Salmonella* Typhimurium durchgeführt. Mäuse wurden, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, mit *S.*Typhimurium [pCJLacGFP] und *S.*Typhimurium[pCJLacRFPexp] infiziert und die entnommenen Organe für Gewebeschnitte und zur Bestimmung der Keimzahl verwandt.

Folgende fluoreszenzmikroskopische Darstellungen von infizierten Kryomikrotomschnitten konnten gewonnen werden (s. Abb. 3-16 a-c)):

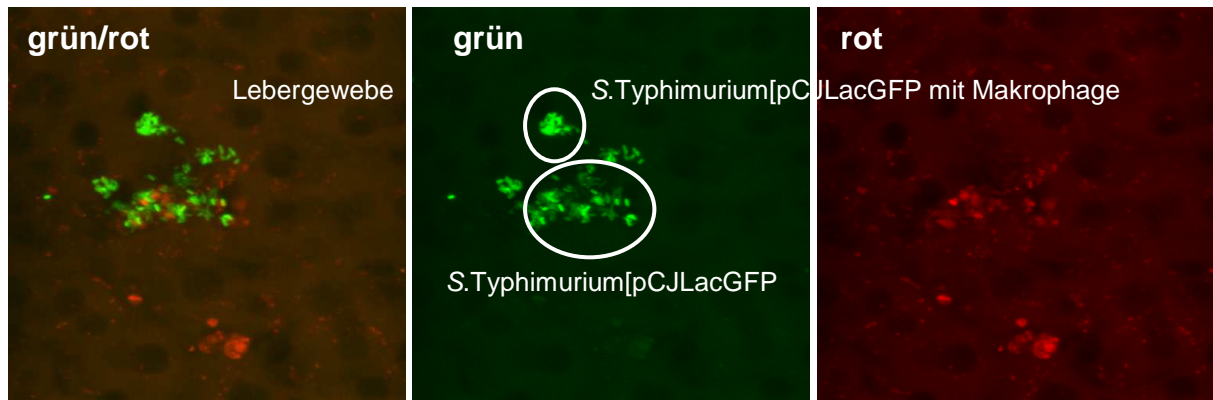


Abbildung 3-16a)

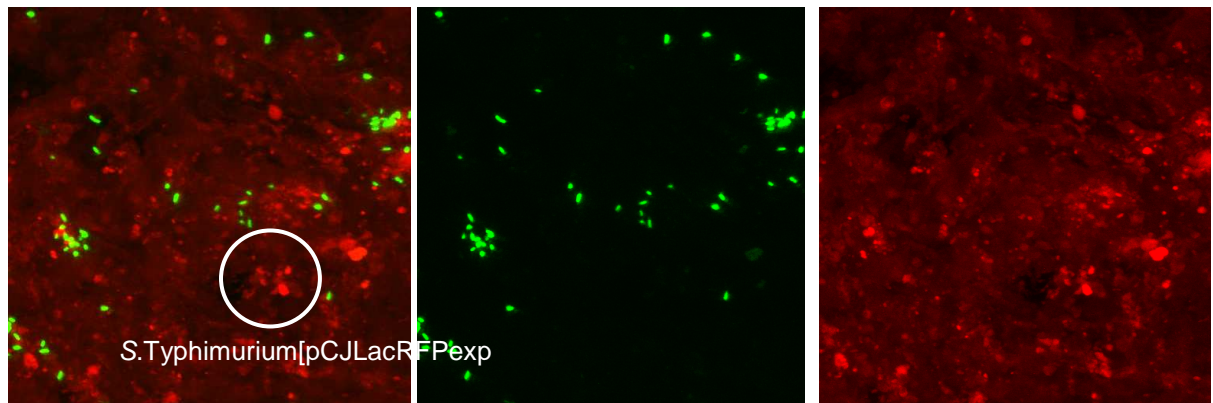


Abbildung 3-16b)

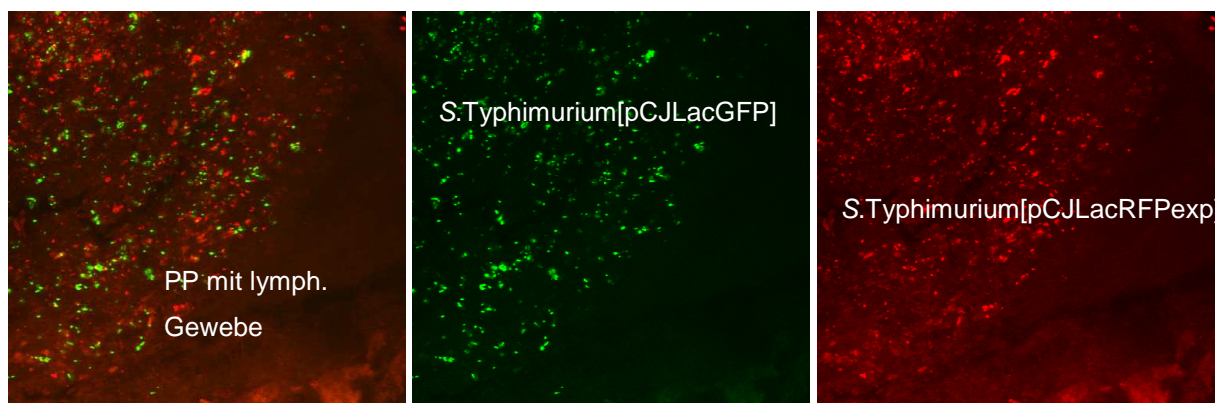


Abbildung 3-16c)

Abbildung 3-16a)b)c): Kryomikrotomschnitte der Leber (a), Milz (b) und der Peyerscher Plaques (c). 5 Tage nach oraler Infektion mit *S. Typhimurium*[pCJLacGFP] und *S. Typhimurium*[pCJLacRFPexp] (25- $\mu$ m-Gewebeschnitt, konfokales Lasermikroskop, mit 63-facher (a) und 40-facher (b,c) Vergrößerung).

Auf den Gewebeschnitten bietet sich ein anderes Bild als nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Es sind keine einzelnen Mikrokolonien zu detektieren. Die Salmonellen sind gleichmäßig über das gesamte Organ wie ein „Sternenhimmel“ verteilt, teilweise sind sie eng zusammengedrängt innerhalb von Makrophagen zu finden. Letzteres wurde allerdings nicht mittels weiterer Experimente bestätigt.

In den Peyerschen Plaques detektiert man eine Vielzahl von rot und grün fluoreszierenden Salmonellen, sodass man annehmen kann, dass viele Bakterien über M-Zellen oder Dendritische-Zellen aus dem Darm in die Plaques gelangen. Da Salmonellen hauptsächlich intrazellulär zu finden sind, werden zahlreiche Salmonellen von einem Makrophagen makropinozytiert. Ob die Dissemination über Makrophagen verläuft oder extrazellulär über den Blut- oder Lymphstrom kann hier nicht entschieden werden. Jedoch scheinen einzelne Makrophagen GFP- und RFP-Salmonellen aufzunehmen.

Bei intraperitonealen und intravenösen Infektionen wurden ähnliche Bilder beobachtet (s. Abb. 3-17a-d)).

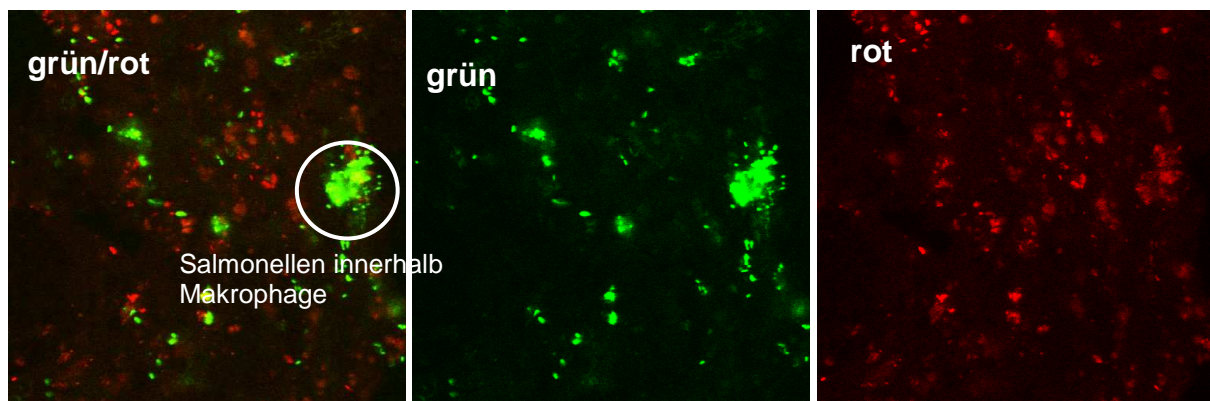


Abbildung 3-17a

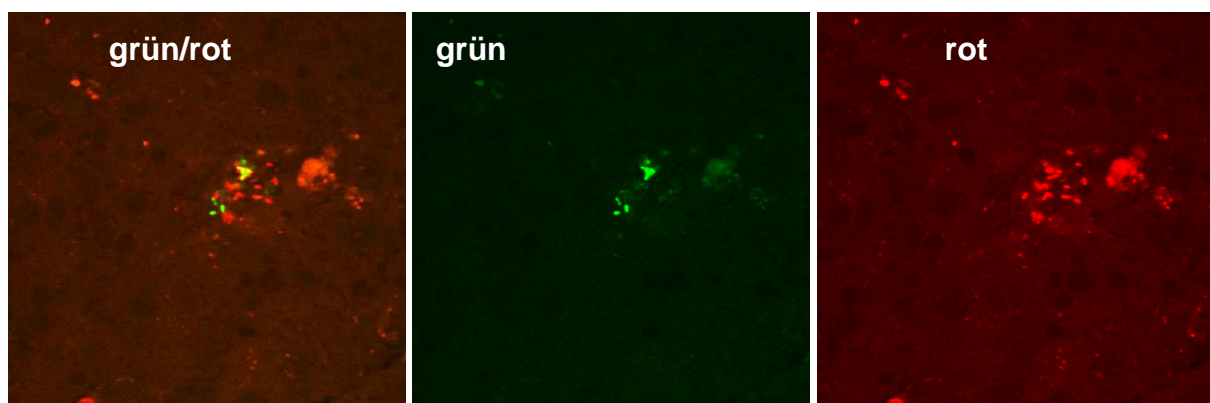


Abbildung 3-17b

Abbildungen 3-17a)b): Kryomikrotomschnitte der Milz (a) und der Leber (b) 3 Tage nach i.p.-Infektion mit *S. Typhimurium*[pCJLacGFP] und *S. Typhimurium*[pCJLacRFPexp] (25- $\mu$ m-Gewebeschnitt, konfokales Lasermikroskop, 40-fache (b) und 63-fache (a) Vergrößerung).

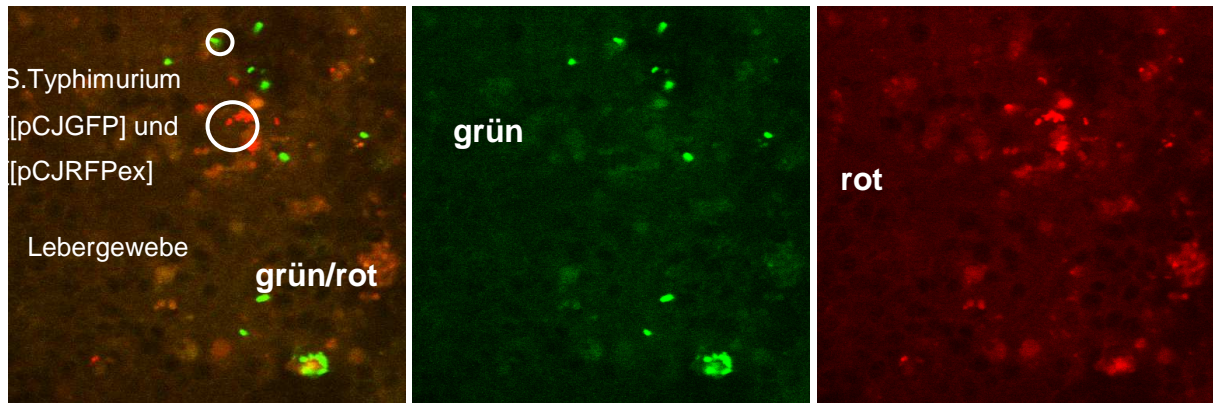


Abbildung 3-17c

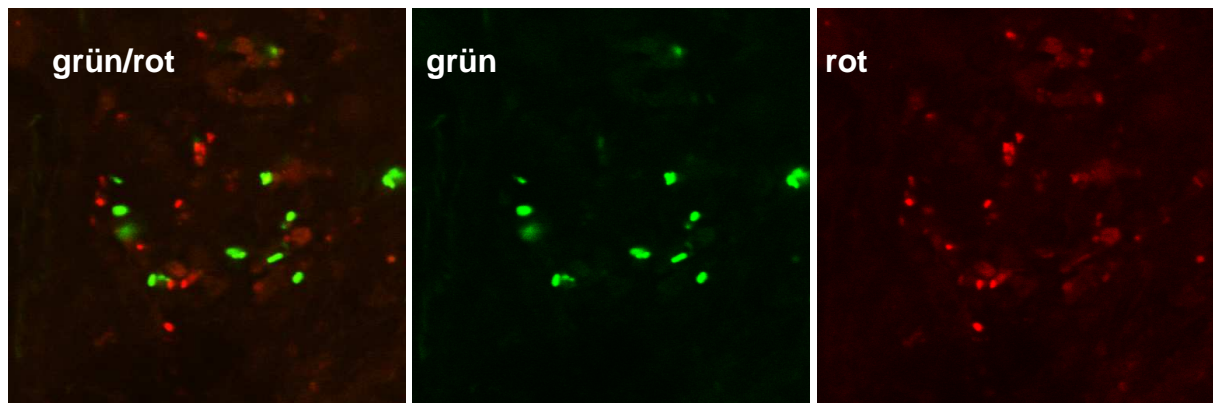


Abbildung 3-17d

Abbildungen 3-17c)d): Kryomikrotomschnitte der Milz (c) und der Leber (d) 3 Tage nach i.v.-Infektion mit *S. Typhimurium*[pCJLacGFP] und *S. Typhimurium*[pCJLacRFPexp] (25- $\mu$ m-Gewebeschnitt, 40-fache (c) bzw. 63-fache (d) Vergrößerung des konfokalen Lasermikroskops).

## 3.2 Yersiniabaktin-Kreuzfütterungsversuche durch Koinfektion von Mäusen

Hochvirulente, mausletale Yersinienstämme stellen zur Eisenaufnahme das Siderophor Yersiniabaktin her. Die für die Synthese, Regulation und für die Aufnahme des Yersiniabaktins verantwortlichen Gene sind auf der HPI kodiert. Auf dieser HPI sind verschiedene durch Eisen regulierte Gene (iron-repressable-genes/irp) identifiziert worden. Eines von diesen für die Synthese verantwortlichen Genen, das *irp1*, ist essentiell für die Produktion von Yersiniabaktin [41].

Die Mutante *WAirp1*[pYV08] ist im Vergleich zum Wildtyp stark attenuiert, da sie das Siderophor Yersiniabaktin nicht produzieren kann. Daraus resultiert die Frage, ob die *irp1*-Mutante ihre Virulenz wiedergewinnt, wenn sie durch einen Yersiniabaktinproduzierenden Stamm in der koinfizierten Maus „gefüttert“ wird (Kreuzfütterung).

Ob der Stamm *WA*[pYV08] dazu in der Lage ist, „sein“ Yersiniabaktin an die *irp1*-Mutante zu verfüttern, sollte im Mausinfektionsmodell durch Koinfektion überprüft werden.

Hierfür wurden weibliche Balb/c-Mäuse mit einem Gemisch aus Wildtyp *WA*[pYV08] und Mutante *WAirp1*[pYV08] im Verhältnis 1:1 intraperitoneal, intravenös bzw. per os infiziert. Die Bakterien wurden wie im „Material- und Methoden“-Teil beschrieben aus infizierten Organen quantitativ durch Ausplattierung bestimmt. Die Ergebnisse nach 3 (i.p.; i.v.) bzw. 5 (oral) Tagen Infektion sind in Abbildung 3-18 S. 48 dargestellt.

In der Intraperitoneallavage konnten 23% der rückisolierten Yersinien als *WAirp1*[pYV08] identifiziert werden. Das war der höchste Anteil an rückisolierten *irp1*-Mutanten. In der Darmspülung wurden 8% als *irp1*-Mutante identifiziert, aus Peyerschen Plaques 7%, währenddessen Organe wie Milz und Leber mit ca. 2 - 4% bzw. 2 - 7% den geringsten Anteil an *WAirp1*[pYV08] enthielten.

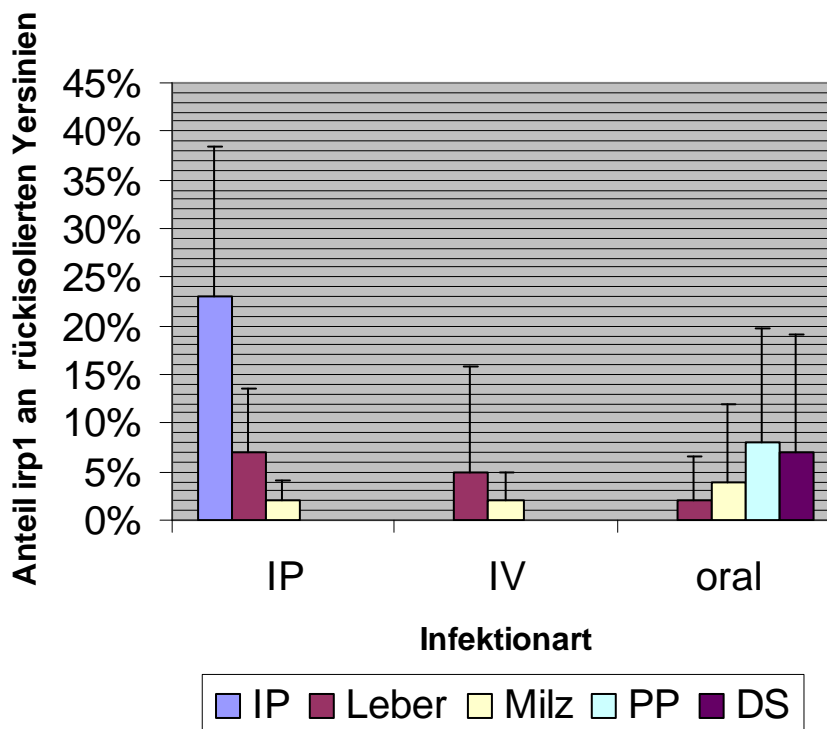


Abbildung 3-18: Prozentualer Anteil des Stammes *WAirp1*[pYV08] an den aus der Maus rückisolierten Yersinien 3 Tage nach intraperitonealer (IP,  $1 \times 10^7 / 1 \times 10^7$  cfu) und intravenöser (IV,  $5 \times 10^5 / 5 \times 10^5$  cfu) und 5 Tage nach oraler ( $5 \times 10^9 / 5 \times 10^9$ ) Mischinfektion von 96 Mäusen (60x IP, 23x IV, 10x oral) mit *WA*[pYV08] und *WAirp1*[pYV08] im Verhältnis 1:1.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die *irp1*-Mutante bedeutend geringere Überlebenschancen bzw. eine geringere Nettovermehrungsrate in der Maus hat als der *WA*[pYV08] Stamm.

Um abschätzen zu können, ob es nach einer Mischinfektion zu einer stärkeren Virulenz und damit zu einem größeren Anteil an *WAirp1*[pYV08] kommt, als es bei einer Infektion nur mit der *irp1*-Mutante der Fall ist, wurden Maus-infektionen mit *WA*[pYV08] bzw. mit *WAirp1*[pYV08] durchgeführt (CFU bei i.p.-Infektion:  $1 \times 10^7$ , i.v.-Infektion:  $5 \times 10^5$ ; bei oraler Infektion  $5 \times 10^9$ , bei Mischinfektion wurde jeweils die Hälfte



der genannten Infektionsdosen pro Stamm verwandt und mit der des anderen Stammes zusammengenommen).

Die größere Anzahl an Bakterien wurde wie erwartet unabhängig vom Infektionsweg bei den Mäusen gefunden, die mit dem Wildtyp alleine infiziert worden waren (s. Abb. 3-19). Hier fanden sich zwischen  $1 \cdot 10^7$  und  $1 \cdot 10^{10}$  WA[pYV08], was im Mittel den Zahlen in Abbildung 3-19 entspricht. Im Vergleich dazu lagen die Keimzahlen in Leber und Milz bei Mischinfektionen mit der *irp1*-Mutante 3 bis 4 log-Stufen niedriger als beim WA[pYV08]-Stamm.

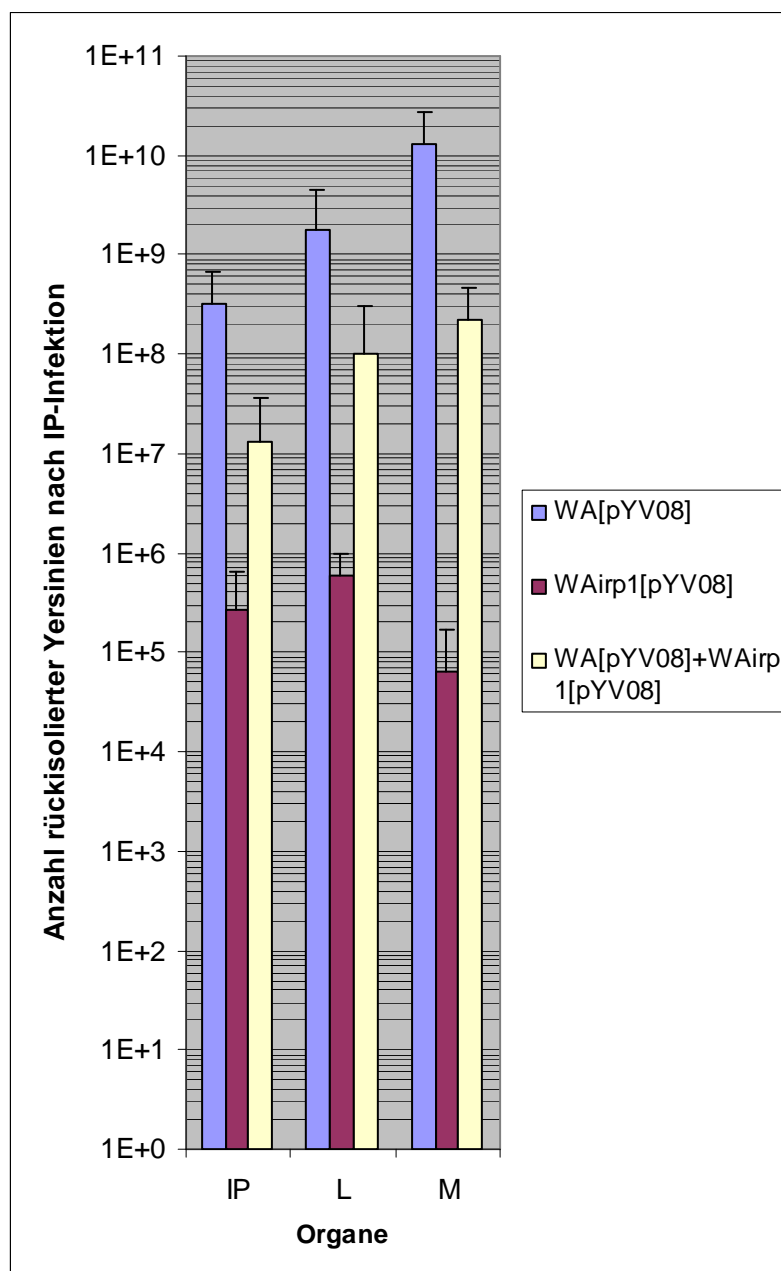


Abbildung 3-19: Übersicht über die Zahl aller rückisolierten Yersinien aus Intraperitoneal-Spülung, Milz und Leber 3 Tage nach i.p.-Infektion von 7 Mäusen mit WA[pYV08], 8 Mäusen mit WAirp1[pYV08] und 27 Mäusen mit WA[pYV08] + WAirp1[pYV08] (CFU  $1 \cdot 10^8$ ) in logarithmischer Darstellung. (IP: Peritoneallavage  
L: Leber  
M: Milz)

Um zu zeigen, dass die Mutante nach einer WA[pYV08]/WA $irp1$ [pYV08]-Mischinfektion durch WA[pYV08] mit Yersiniabaktin gefüttert wird, mussten die prozentualen Anteile der Mutante von allen rückisolierten Yersinien und die absoluten Werte der rückisolierten Yersinien nach Mischinfektion verglichen werden (s.S.48 Abb. 3-18). Ein Anteil der  $irp1$ -Mutante von 23% in der IP-Lavage nach IP-Infektion bedeutet eine absolute Zahl der rückisolierten Mutante von  $1,3 \cdot 10^7$  Bakterien. Im Vergleich dazu wurden nach alleiniger Infektion mit WA $irp1$ [pYV08] aber im Durchschnitt nur  $3 \cdot 10^6$  Bakterien nachgewiesen. Dies entspricht einer 30-fach höheren Zahl von Mutanten nach Mischinfektion. In den anderen Organen wurden weit höhere, in einzelnen Versuchen bis zu  $10^5$ -fache Steigerungsraten der Anzahl von  $irp1$ -Mutanten nachgewiesen.

Nach i.p.-Infektion konnten im Mittelwert  $3 \cdot 10^6$  WA $irp1$ [pYV08] Mutanten nach Mischinfektion und  $3 \cdot 10^5$  nach alleiniger Infektion aus IP-Lavage,  $7 \cdot 10^6$  bzw.  $6 \cdot 10^5$  aus Leber und  $4 \cdot 10^6$  bzw.  $6 \cdot 10^4$   $irp1$ -Mutanten aus der Milz rückisoliert werden (s. Abb. 3-20).

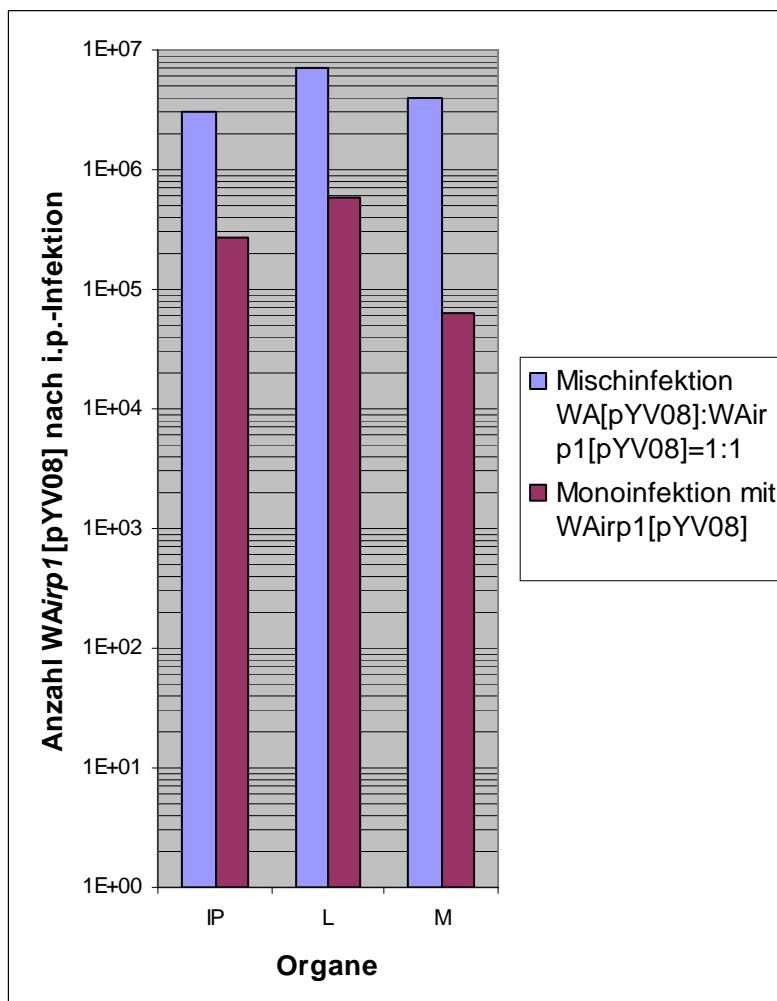


Abbildung 3-20: Anteil von WA $irp1$ [pYV08] nach dreitägiger i.p.-Mischinfektion mit WA[pYV08] im Verhältnis 1:1 von 27 Mäusen und Monoinfektion mit WA $irp1$ [pYV08] von 8 Mäusen; Infektionsdosis  $1 \times 10^7$  CFU. (IP: Intraperitoneallavage; L: Leber; M: Milz)

Ein ähnliches Ergebnis wurde nach intravenöser Applikation beobachtet (s. Abb. 3-21).

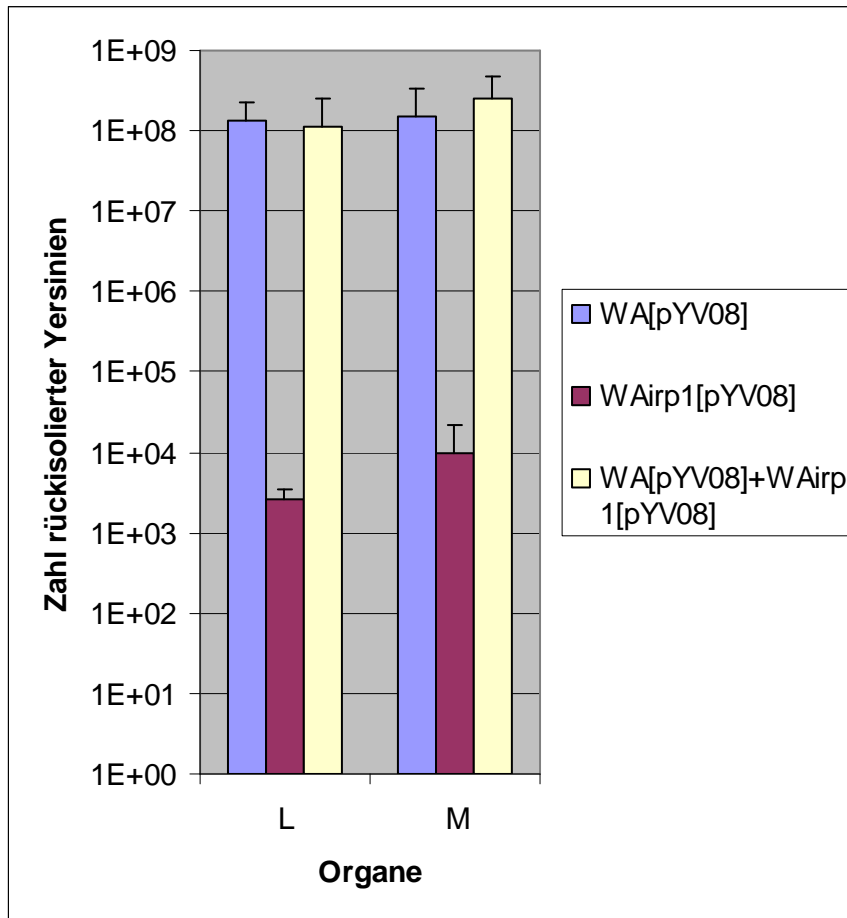


Abbildung 3-21: Anzahl rückisolierter Yersinien: Monoinfektion mit WA[pYV08], Monoinfektion mit WAirp1[pYV08] und Mischinfektion (1:1; 3 d nach i.v.-Infektion von 24 Mäusen. (L: Leber; M: Milz)

Nach i.v.-Infektion konnten im Mittel  $6 \cdot 10^6$  *irp1*-Mutanten nach Mischinfektion bzw.  $3 \cdot 10^3$  *irp1*-Mutanten nach Monoinfektion aus der Leber und  $6 \cdot 10^6$  bzw.  $1 \cdot 10^4$  aus der Milz rückisoliert werden (s.S.52 Abb.3-22).

Diese Ergebnisse, dargestellt in den Abbildungen 3-18 bis 3-22, zeigen, dass die Mutante um ein Vielfaches besser dazu in der Lage ist, sich zu vermehren, wenn gleichzeitig auch der Wildtyp vorhanden ist. Daraus lässt sich folgern, dass eine Fütterung von WAirp1[pYV08] mit Yersiniabaktin durch WA[pYV08] stattfindet. Das Ausmaß des Fütterungsprozesses ist abhängig von Infektionsweg und Art des Organs.

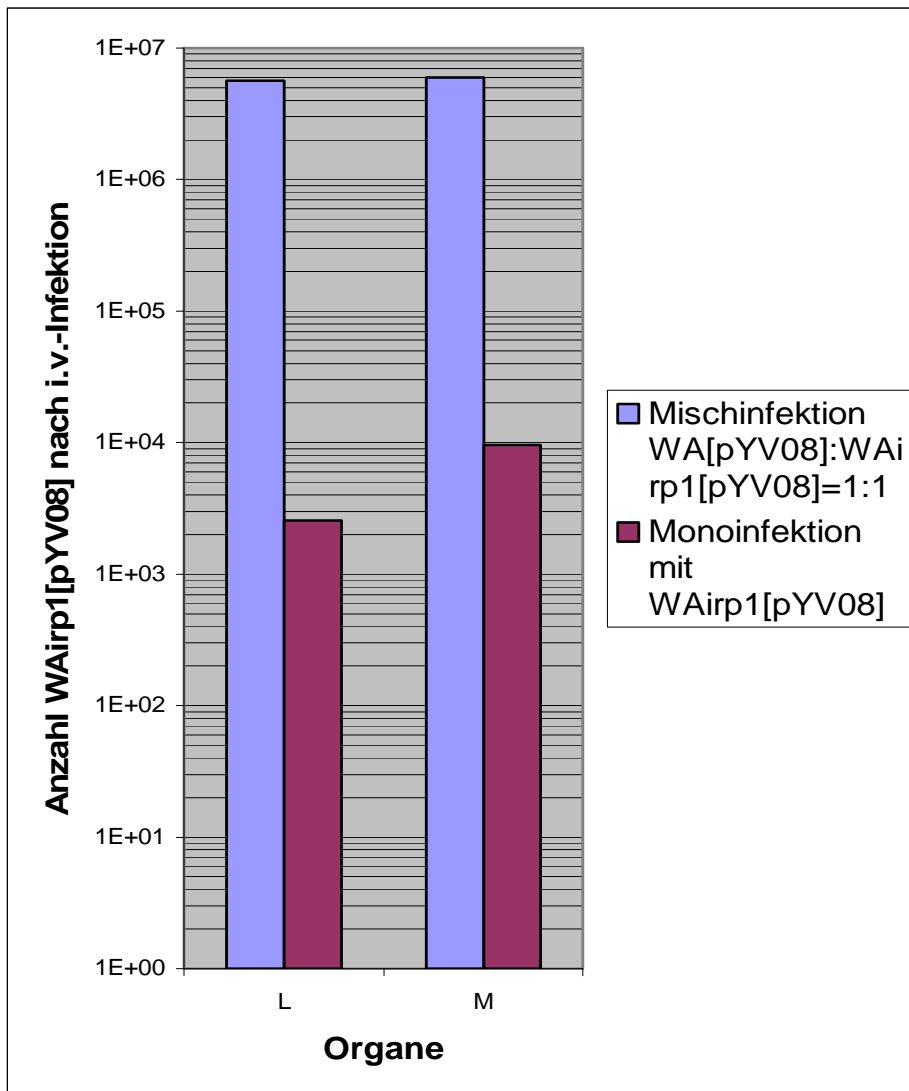


Abbildung 3-22: Anzahl *WAirp1*[pYV08] 3 Tage nach i.v.-Mischinfektion mit *WA*[pYV08] von 4 Mäusen und nach Monoinfektion von 18 Mäusen, Infektionsdosis  $5 \times 10^5$  CFU. (L: Leber; M: Milz)

Abschließend sollte geklärt werden, ob das Mischungsverhältnis von *irp1*-Mutante zu Wildtyp in der Infektionsdosis Einfluss auf das verbesserte Überleben der *irp1*-Mutante hat.

Hierzu wurde wiederum weiblichen Balb/c-Mäusen eine Mischung aus *WA*[pYV08] und *WAirp1*[pYV08] im Verhältnis 100:1 und 1:100 intraperitoneal appliziert (Gesamtzahl:  $1 \times 10^7$ ). Die von den nach drei Tagen getöteten Mäusen entnommenen Organe wurden homogenisiert, ausplattiert und aus der Anzahl der gewachsenen Kolonien auf Agar mit Nalidixin bzw. Nalidixin-Chloramphenicol-Kanamycin die Gesamtzahl von *WA*[pYV08] bzw. von *WAirp1*[pYV08] bestimmt.

Die Auszählung der Kolonien ergab, dass bei der Infektion mit  $WA[pYV08]:WA_{irp1}[pYV08] = 1:100$  ein relativ hoher Anteil der *irp1*-Mutanten rückisoliert werden konnte (s. Abb. 3-23): 46% aus der IP-Lavage, 11% aus der Leber und 1% aus der Milz. Bei den Mäusen mit dem umgekehrtem Verhältnis  $WA[pYV08]:WA_{irp1}[pYV08] = 100:1$  wuchsen hingegen mit nur 0 - 1% kaum oder keine Mutanten.

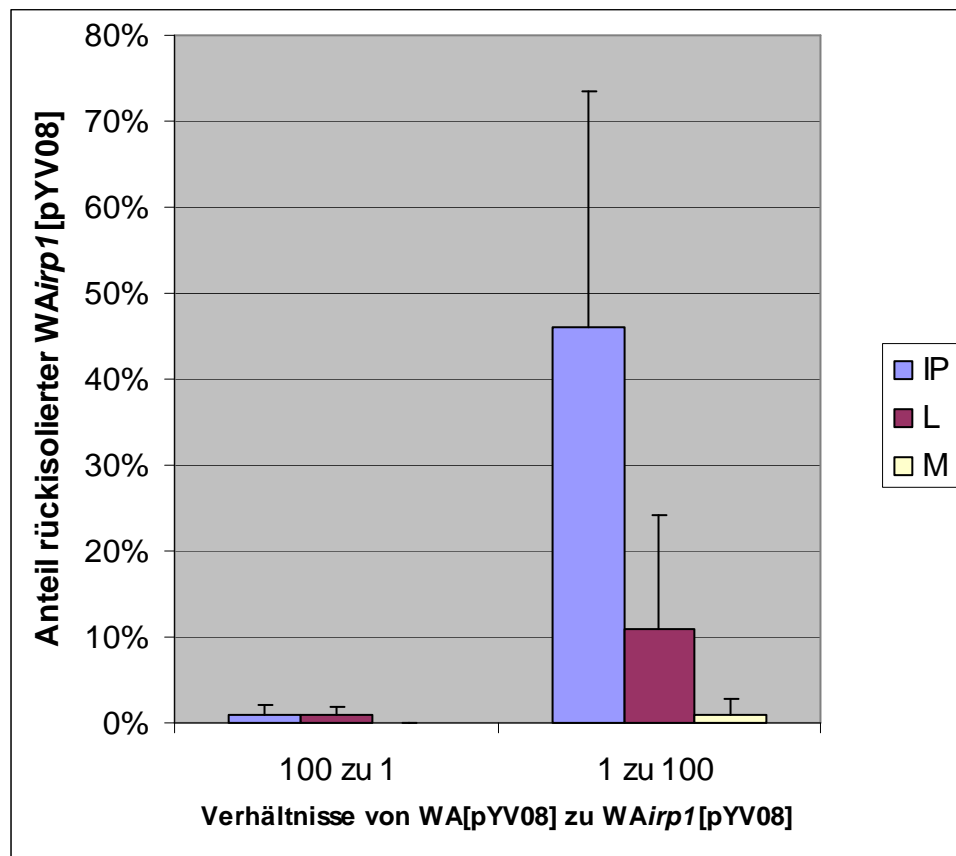


Abbildung 3-23: Dargestellt ist der Anteil von *WAirp1[pYV08]*-Mutanten aus Intraperitoneallavage (IP), Leber (L) und Milz (M) von intraperitoneal infizierten Mäusen ( $2 \times 10^7$  Yersinien) mit *WA[pYV08]* und *WAirp1[pYV08]* im Mischungsverhältnis 100:1 bzw. 1:100 3 Tage post infectionem.

Diese Ergebnisse lassen zunächst vermuten, dass sich vor allem bei den Infektionen mit dem Verhältnis  $WA[pYV08]:WA_{irp1}[pYV08] = 1:100$  ein Yersiniabaktineffekt bemerkbar macht. Wenn man allerdings die absoluten Keimzahlen an rückisolierten Bakterien mit einbezieht, dann wird deutlich, dass diese Veränderungen in dem Verhältnis von Wildtyp zu Mutante sich negativ auf eine mögliche Fütterung der Mutante mit Yersiniabaktin auswirken. Es werden um ein 2- bis 3-faches weniger *irp1*-Mutanten rückisoliert, als es bei der alleinigen Infektion mit *WAirp1[pYV08]* der Fall

ist. Bei der Mischinfektion mit  $WA[pYV08]: WA_{irp1}[pYV08]= 100:1$  wurden  $2 \cdot 10^7$  Bakterien in der IP-Lavage und jeweils eine Kolonie aus Leber und Milz registriert. Bei der Infektion mit dem Verhältnis  $1 WA[pYV08]: 100 irp1$  wurden  $6 \cdot 10^6$  Bakterien in IP-Lavage,  $3 \cdot 10^6$  in der Leber und  $7 \cdot 10^5$  in der Milz ausgezählt (s. Abb. 3-24). Wenn beide Bakterienstämme im Verhältnis 1:1 infiziert werden, konnten im Vergleich dazu relativ viele *irp1*-Mutanten isoliert werden. Es waren  $2 \cdot 10^7$   $WA_{irp1}[pYV08]$  aus der IP-Lavage,  $2 \cdot 10^7$   $WA_{irp1}[pYV08]$  aus der Leber und  $7 \cdot 10^7$   $WA_{irp1}[pYV08]$  aus der Milz. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine Fütterung stattfinden kann, wenn beide Bakterienstämme im gleichen Mischungsverhältnis ( $WA[pYV08] : WA_{irp1}[pYV08] = 1:1$ ) der Maus appliziert werden.

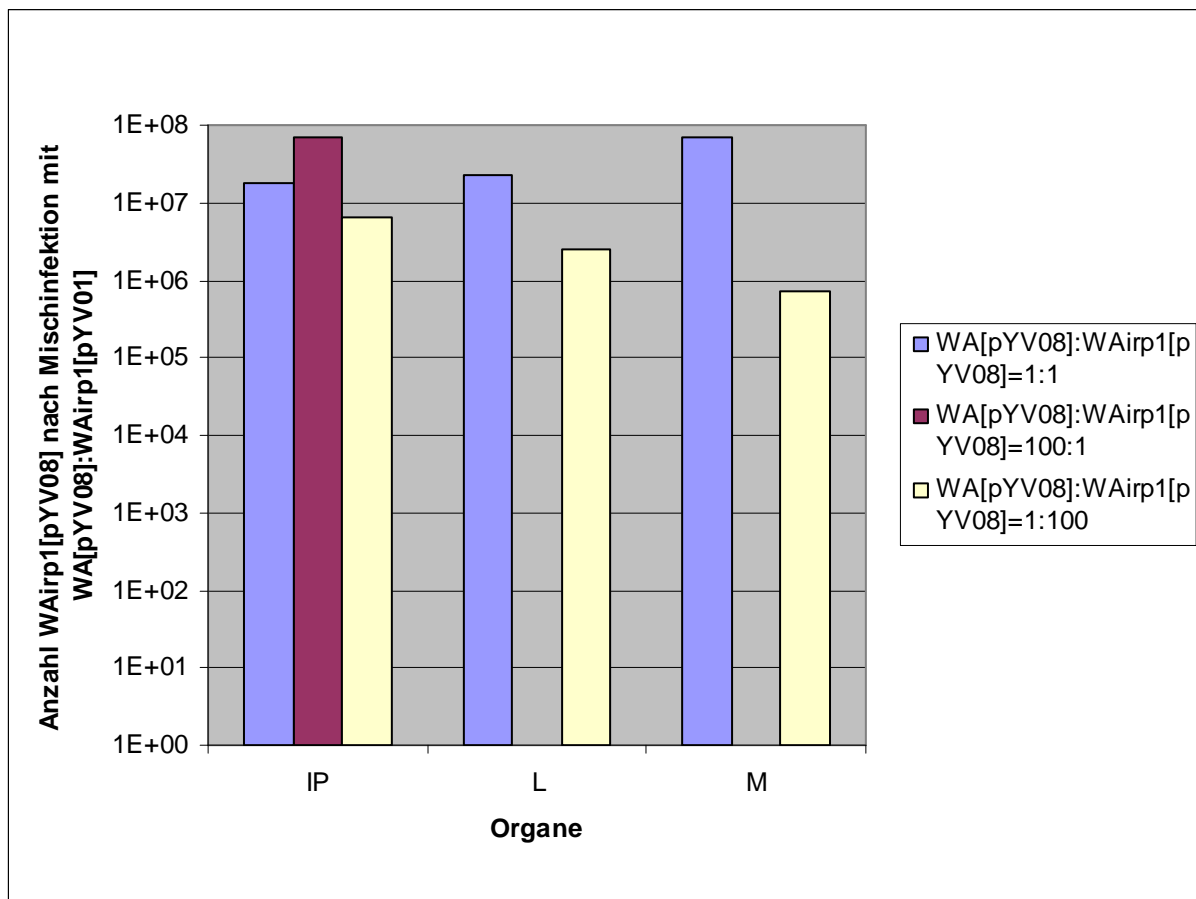


Abbildung 3-24: Anzahl von rückisolierten  $WA_{irp1}[pYV08]$  nach Veränderung des Mischungsverhältnisses von  $WA_{irp1}[pYV08] : WA[pYV08]= 1:100$  bzw.  $100:1$  im Vergleich zu der Anzahl von  $WA_{irp1}[pYV08]$  nach i.p.-Monoinfektion bei insgesamt 45 Mäusen (27 Mäuse mit  $WA[pYV08]:WA_{irp1}[pYV08]=1:1$ , 9 Mäuse mit  $WA[pYV08]:WA_{irp1}[pYV08]=100:1$  und 9 Mäuse mit  $WA[pYV08]:WA_{irp1}[pYV08]=1:100$ )

### 3.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Yersinien im Gewebe nach Mischinfektion

Unter der Annahme, dass der WA[pYV08] Stamm die Mutante *WA<sub>irp1</sub>[pYV08]* mit Yersiniabaktin versorgt und so das Wachstum im Mausgewebe fördern kann, sollten Mutantenkolonien in der Nähe einer WA[pYV08]-Kolonie bedeutend größer sein als Mutantenkolonien in größerer Entfernung von Yersiniabaktinproduzierenden Mikrokolonien. Hierzu wurden Mäuse mit WA[pYV08,pRFPexp], einem rot fluoreszierenden WA[pYV08]-Stamm, zusammen mit der grün fluoreszierenden *irp1*-Mutante intraperitoneal infiziert. Drei Tage später wurden die Organe entnommen, Kryomikrotomschnitte angefertigt und die fluoreszierenden Mikrokolonien fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Folgende Bilder konnten dabei mit dem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen werden (s. Abb. 3-25).

Da die Anzahl der *WA<sub>irp1</sub>[pYV08]*-Mikrokolonien im Vergleich zu der von WA[pYV08]-Mikrokolonien sehr klein war, bereitete es Schwierigkeiten, Bilder von Abszessen anzufertigen, auf denen gleichzeitig rot- und grün-fluoreszierende Mikrokolonien sichtbar waren. Unter 5 verschiedenen Milzen fanden sich nur 3 Schnitte, die rot und grün fluoreszierende Mikrokolonien zeigten.

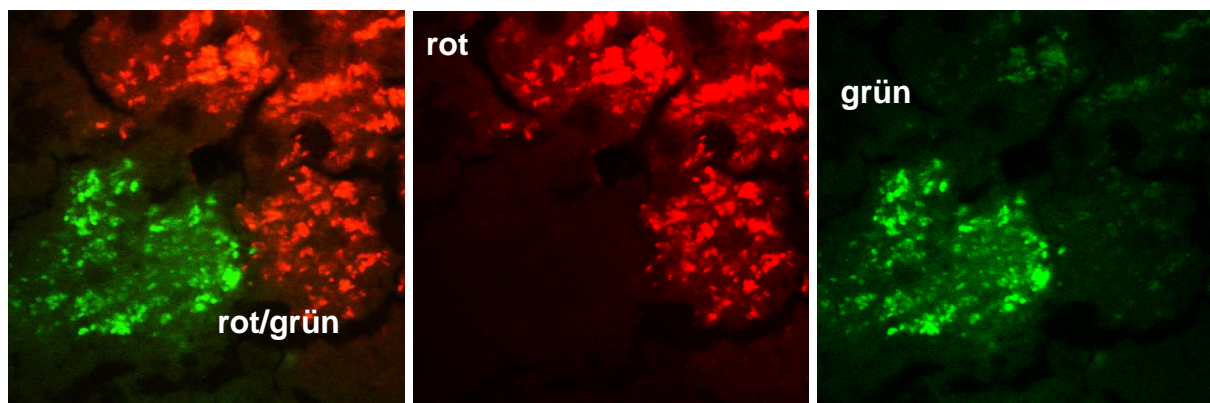


Abbildung 3-25: Mikrokolonien von WA[pYV,pRFPexp] (rot) und *WA<sub>irp1</sub>[pYV08]* (grün) in der Milz nach oraler Mischinfektion im Verhältnis 1:1 nach 5 Tagen.

In Abbildung 3-25 sieht man eine große *WA<sub>irp1</sub>[pYV08]* grün-fluoreszierende Mikrokolonie umgeben von drei WA[pYV08] rot-fluoreszierenden Mikrokolonien in einem Milzschnitt. Offensichtlich wird das Wachstum von *WA<sub>irp1</sub>[pYV08]* vom Yersiniabaktin-produzierendem WA[pYV08] gefördert. Daneben wurden isolierte kleinste Mikrokolonien von *WA<sub>irp1</sub>[pYV08]* gesehen, die nur aus wenigen Bakterien bestanden, was auf fehlende Fütterung hinweisen könnte.

## 4 Diskussion

### 4.1 Darstellung von fluoreszierenden Yersinien im Gewebe von infizierten Mäusen

*Yersinia enterocolitica* als enteropathogener Erreger wird über kontaminierte Lebensmittel oral aufgenommen. Im terminalen Ileum werden die Yersinien über M-Zellen in die Peyerschen Plaques transloziert und disseminieren von dort in Organe wie Leber, Milz und Lunge.

Bisher konnte nicht geklärt werden, wie viele Yersinien überhaupt durch das Darmepithel hindurchgelangen, auf welchem Weg die Bakterien in Milz und Leber gelangen und ob klonale Mikrokolonien in diesen Organen gebildet werden. Diese Arbeit sollte zu diesen Fragen Antworten finden.

Um die Mikrokoloniebildung studieren zu können, wurden in die Bakterien Plasmide mit Genen, die für das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) oder das Rot-fluoreszierende Protein (RFP) kodieren, eingebracht.

#### 4.1.1 Optimierung der RFP- Expression für Mausinfektion

Das Reporter-gen GFP kam zur mikroskopischen Detektion von Yersinien im Mausinfektionsversuch zur Anwendung. Um zwischen zwei gleichen Stämmen unterscheiden zu können, eignete sich zusätzlich der Einsatz des fluoreszierenden Proteins RFP. Es wurden verschiedene Versionen des RFP getestet [47]:

1. Das ursprüngliche RFP ließ sich nach der Infektion von Mäusen mit Yersinien, die ein Plasmid mit einem RFP-Gen enthielten, nicht detektieren. Es könnte sein, dass die Faltung der Tertiärstruktur, die zu einem Tetramer führt, zu langsam ist.
2. Das von Clontech entwickelte RFP2 war in seiner Reifungszeit und seiner Fluoreszenzstärke durch eine Punktmutation im Genom wesentlich verbessert worden (s. S. 30/31 Abb.3-1a)b) und 3-2a)b)) [5]. In den durchgeführten Mausinfektionsversuchen waren die Bakterien innerhalb von drei Tagen nach der Organentnahme und Lagerung der Organteile bei -4°C unter dem Mikroskop anhand ihrer Fluoreszenz sichtbar. Allerdings waren trotz der starken Fluoreszenz diese Proteine nicht ge-



eignet, da auch hier die Entwicklungszeit bis zur Fluoreszenz zu lange für in-vivo-Experimente war.

3. Das RFPexpress wird genauso wie RFP und RFP2 von Licht der Wellenlänge 557 nm angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge 579 nm aus. Da das Licht von GFP im niedrigeren Wellenlängenbereich von 488 nm für die Anregung und von 507 nm für die Emission liegt, lassen sich die rot fluoreszierenden Bakterien gut von den grün fluoreszierenden Bakterien abgrenzen. Mit diesem entwickelten Reporterprotein lassen sich Infektionsversuche durchführen, da die Bakterien sofort nach Organentnahme so stark fluoreszieren, dass man sie detektieren kann. Die Fluoreszenz nimmt zusätzlich bis zur vollen Entfaltung ihrer Intensität innerhalb des ersten Tages nach Kryomikrotomie noch weiter zu (s. S.31 Abb.3-2a)b)).

Es stellte sich heraus, dass RFPexpress am besten für Yersinieninfektionsversuche geeignet ist. Für weitere Arbeiten sind jedoch noch Verbesserungen, hauptsächlich was die Intensität der roten Fluoreszenz betrifft wünschenswert. Es wäre bei Mischinfektionsversuchen von großem Nutzen, wenn die Fluoreszenz so intensiv wäre, dass man schon in den Kulturen oder aber auf den Nährböden mit den ausplattierten Bakterien erkennen könnte, welche Farbe die Bakterien haben.

#### **4.1.2 Optimierung der Fixierungsmethode für Gewebe mit fluoreszierenden Bakterien**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mit Gewebeschnitten von Mausorganen gearbeitet, die mit Bakterien, bei denen die Reportergene RFP und GFP im Virulenzplasmid pYV integriert waren, besiedelt waren. Um mittels Fluoreszenzmikroskopie eine optimale Darstellung der Gewebestruktur und der einzelnen Bakterien im Gewebeschnitt zu erlangen, musste erst eine geeignete Fixierungsmethode gefunden werden, sodass die Schnitte auch zu einem späteren Zeitpunkt noch weiter betrachtet werden konnten.

1. Nach verschiedenen Fixierungen mit Aceton, Methanol und Formalin zeigte sich, dass für eine möglichst genaue Abgrenzung der Bakterien voneinander Formalin am besten geeignet war, da es die Intensität der GFP-Fluoreszenz nicht negativ beeinflusste und die Hintergrundfluoreszenz nicht verstärkte.

2. Um die Gewebestruktur am besten darzustellen, sollte Aceton benutzt werden. Diese Fixierung zeigte auch auf die Fluoreszenz der Bakterien keine negativen Auswirkungen, obschon eine etwas stärkere Hintergrundfluoreszenz als bei der Fixierung mit Formalin beobachtet wurde.

3. Der Einsatz von Methanol stellte sich als sehr ungünstig heraus, da die GFP-Fluoreszenz fast vollständig verloren ging. Bei Fixierung mit Methanol wurde zusätzlich die Gewebestruktur teilweise zerstört.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich für die Betrachtung von Mikrokolonien unter dem Mikroskop am besten formalinfixierte Gewebeschnitte eignen, wobei, wenn die Schnitte nicht für längere Zeit haltbar gemacht werden sollen, die Betrachtung von vollkommen unbehandeltem, unfixiertem Gewebe die besten Resultate erbringt.

Wenn man das Gewebe sowohl im Hellfeldmikroskop als auch die Bakterien in diesem Gewebe im Fluoreszenzmikroskop darstellen möchte, so können wir als Gewebefärbung das Methylenblau empfehlen. Bei der HE-Färbung wird die Fluoreszenz durch Quenching so stark vermindert, dass die Bakterien nicht mehr detektierbar sind.

### 4.1.3 Konstruktion stabil fluoreszierender Yersinien

Die Gensequenzen für die fluoreszierenden Proteine befanden sich ursprünglich auf Plasmiden, die sich mit einer hohen Anzahl pro Zelle replizieren. Vor das RFP bzw. das GFP ist ein Lac-Promotor ligiert, für den Yersinien keinen Repressor besitzen, sodass das GFP-Gen konstitutiv exprimiert wird.

Solche sich stark replizierenden Plasmide sind für Infektionsversuche ungünstig, da diese zu einem verlangsamten Wachstum der Yersinien führen. Aus diesem Grund wurden folgende 2 Versuchsansätze gemacht:

1. GFP und RFP wurden zunächst in das Plasmid pACYC184 integriert, das in geringer Kopienzahl (5-10) vorliegt. Die hergestellten Plasmide pCJGFP und pCJRFPexp wurden in WA[pYV08] transformiert und die Transformanten für Mausinfektionen eingesetzt. Die Auswertung der Infektionsversuche zeigte, dass ungünstige Effekte mit den Reporterplasmiden verbunden waren:

- I. Auch mit diesen "low copy" Plasmiden wurden die Bakterien in ihrer Teilungs- und Vermehrungsfähigkeit gestört, was sich an einer teilweise bis zu 10-fach geringeren Zahl von rückisolierten WA[pYV08,pRFPexp] bzw. WA[pYV08,pGFP] gegenüber dem Wildtyp zeigte (s. S.39 Abb. 3-12).
  - II. Es kommt vor, dass die Yersinien das Plasmid verlieren und so nicht mehr fluoreszieren. Da aber fünf Tage nach Infektion die aus Mausgewebe rückisolierten Yersinien noch zu 99% das Reporterplasmid pGFP bzw. pRFP trugen, kann der 1%-ige Verlust der Reporterplasmide bei der Ergebnisauswertung vernachlässigt werden.
2. Um eine weitere Verbesserung zu erzielen wurden die Gene GFP und RFPexpress mit ihrem Lac-Promotor mittels ET-Klonieren in das Virulenzplasmid „pYV“ integriert. Bei WA[pYV08::RFPexp] und WA[pYV08::GFP] konnte man sicher sein, dass die Fluoreszenz nicht verloren geht, da Yersinien nicht ihr eigenes Virulenzplasmid abstoßen. Ein Effekt dieser Integration ins „pYV“ zeigte sich allerdings darin, dass durch geringe Kopienzahl des pYV-Plasmids (1-3 wird angenommen) die Fluoreszenz weniger intensiv war, sodass die Bakterien in vitro weder mit bloßem Auge noch unter UV-Licht anhand ihrer Fluoreszenz zu unterscheiden waren. Da aber unter dem Mikroskop immer noch eine deutliche Fluoreszenz erkennbar war, erlaubten die Mutanten sinnvolle Infektionsversuche (s. S.38 Abb. 3-11, S.40 Abb.3-13).

#### **4.1.4 Mechanismus der Mikrokoloniebildung bei *Y.enterocolitica***

Es wurden Mäuse mit fluoreszierenden WA[pYV08::GFP] und WA[pYV08::RFPexp] im Verhältnis 1:1 oder 1:100 bzw. 100:1 infiziert, von den zu einem späteren Zeitpunkt entnommenen Organen wurden Gewebeschnitte angefertigt und diese unter dem konfokalen Lasermikroskop betrachtet.

Alle Mikrokolonien, die in den Organen Milz, Leber und Peyersche Plaque beobachtet werden konnten, waren nur von Bakterien einer Farbe, wurden also entweder von WA[pYV08::GFP] oder aber von WA[pYV08::RFPexp] gebildet. Dies weist darauf hin, dass eine einzelne Mikrokolonie wahrscheinlich auch von nur einer Yersinienzelle gebildet wird (klonale Mikrokolonien). Würde zur Entstehung einer

Mikrokolonie mehr als eine Yersinie benötigt, so müssten grün und rot gemischte Kolonien zu sehen sein.

Abhängig vom Infektionsweg und dem betrachteten Organ sind verschieden viele und verschieden große Mikrokolonien zu erkennen. Die meisten und die größten Mikrokolonien sind in der Milz zu finden. Nach i.v.-Infektion sind sie eher großflächig auf das Organ verteilt und wachsen ineinander, ohne sich dabei zu vermischen. Vor allem bei i.p.-Infektion und oraler Infektion sind in der Leber weniger Bakterien und um ein vielfaches kleinere Kolonien zu finden. Die Peyerschen Plaques unterscheiden sich hinsichtlich des Mikrokoloniebildungsmechanismus von den zwei anderen genannten Organen. Hier sind nicht viele verschiedene Kolonien von verschiedenfarbig fluoreszierenden Yersinien auszumachen, sondern es wird in der Regel ein Peyerscher Plaque nur von einer Mikrokolonie (einfarbig) kolonisiert.

Folglich sollten die einfarbigen Mikrokolonien durch Vermehrung einer Yersinienzelle entstanden sein. Innerhalb einer Maus sind wiederum sowohl rot als auch grün fluoreszierende Mikrokolonien in Peyersche Plaques zu finden in einem Verhältnis, das dem von WA[pYV08::GFP] zu WA[pYV08::RFPexp] in der Infektionsdosis entspricht.

Dass man pro Peyerschen-Plaque nur Bakterien einer einzigen Farbe findet, lässt vermuten, dass nur einzelne Yersinien aus dem Darm durch die M-Zellen in die Peyerschen Plaques gelangen. Ein M-Zelle sollte demnach nicht mehrere Yersinien translozieren, denn dann müssten grün/rote Kolonien in den Peyerschen Plaques beobachtet werden (s.S.61 Abb. 4-1). Aus einer Menge von  $10^8$  Bakterien im Darm gelingt es offensichtlich nur sehr wenigen, sich durch M-Zellen translozieren zu lassen. Ob dies dadurch bedingt ist, dass nur ein Bakterium erfolgreich transloziert wird, oder aber die M-Zellen nach Kontakt mit einer Yersinie anderen M-Zellen „mitteilen“, keine Bakterien mehr durchzulassen, wie in Abbildung 4-1b) dargestellt, ist unklar. Denkbar wäre auch, dass die Yersinien nicht über die M-Zellen sondern über Dendritische-Zellen in die Submukosa gelangen (s. Abb. 4.1-c).

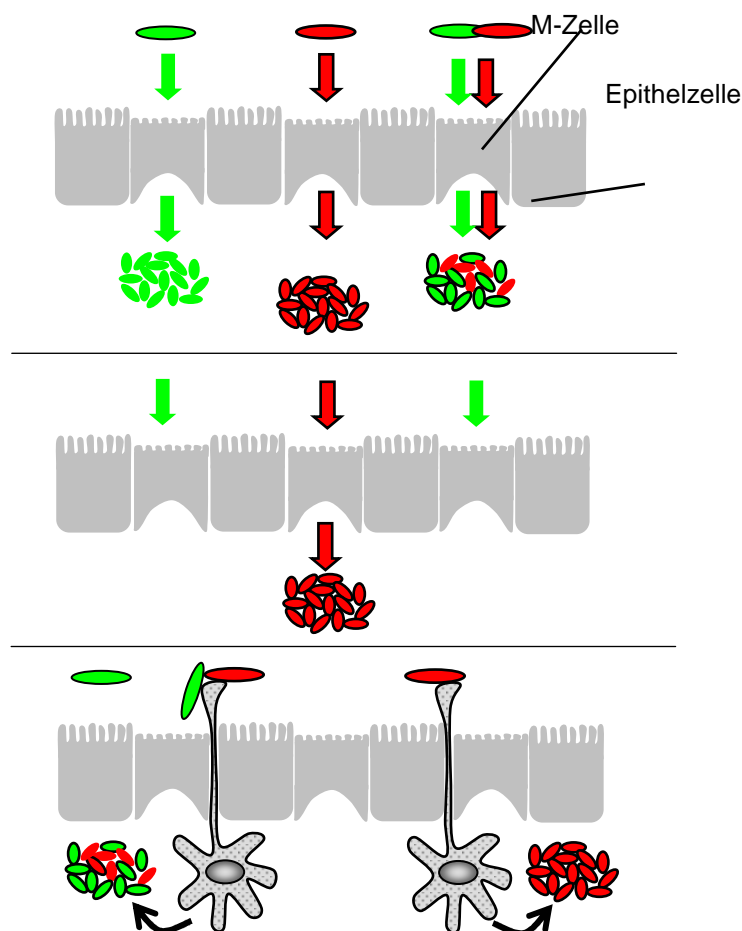


Abbildung 4-1a-c): Schema zu 3 verschiedenen Varianten, wie *Y. enterocolitica* vom Darmlumen durch die Darmwand in die Peyerschen Plaques übertritt:

a) Jede M-Zelle schleust jeweils ein oder zwei Bakterien durch.

b) Wenn ein Bakterium schon auf eine M-Zelle getroffen ist, werden die anderen M-Zellen in ihrer Translokationsaktivität gehemmt.

c) Dendritische-Zelle zwischen den Mukosazellen greifen durch die Darmwand hindurch und translozieren ein oder mehrere Bakterien.

Dass nur so wenige Bakterien transloziert werden, steht im Widerspruch zu dem, was von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde [19, 38, 43]. Hanski et al. und auch Clark et al. hatten ihre Ergebnisse dahingehend interpretiert, dass in zeitlicher Reihenfolge immer mehr Yersinien aus dem Darmlumen durch das Darmepithel gelangen. Im allgemeinen wurde davon ausgegangen, dass mehrere von den der Maus verabreichten Yersinien durch das Darmepithel in die Peyerschen Plaques gelangen. Dies konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegt werden.

Welche der Hypothesen zur Translokation von *Yersinia enterocolitica* sich als richtig erweisen wird, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Ob nur ein Bakterium durch die M-Zellen transloziert wird, weil es ausreichend Invasin exprimiert, oder ob die M-Zellen nicht in der Lage sind, mehre Bakterien aufzunehmen, oder ob nur wenige M-Zellen aktiv sind, oder in wieweit Dendritische-Zellen eine Rolle spielen, muss noch geklärt werden. Nachdem nicht nur in den Peyerschen Plaques, sondern auch

in den übrigen Organen monoklonale bzw. einfarbige Mikrokolonien gefunden wurden, kann diese Art von Mikrokoloniebildungsmechanismus nicht nur auf einer Auswahl der Yersinien beruhen, die vom Darmlumen in die Plaques gelangen, sondern es müssen weitere Mechanismen dafür sorgen, dass immer nur einzelne Bakterien an einen Ort gelangen. Bislang konnte also noch immer nicht geklärt werden, auf welche Weise und auf welchem Weg die Yersinien im Körper disseminieren und in die Organe gelangen.

#### 4.1.5 Gewebedissemination von Salmonellen

Der Yersiniainfektionsprozess sollte mit dem von Salmonellen im Mausmodell verglichen werden. Hierzu wurde *Salmonella* Typhimurium mit den Plasmiden pCJLacGFP und pCJLacRFPexp transformiert und Mäusen appliziert. Da sich Salmonellen intrazellulär vermehren, Yersinien aber extrazellulär, zeigte sich bei Gewebeschnitten der nach 3 und 5 Tagen entnommenen Organe ein komplett anderes Bild als bei *Yersinia enterocolitica*. Es gab keine Salmonella-Mikrokolonien, sondern es wurden über das ganze Organ verteilt vereinzelte Salmonellen identifiziert (s. S.44-46 Abb. 3-16, 3-17). Es fanden sich immer rote und grüne Salmonellen zusammen in einer Zelle.

Leider konnte mittels konfokaler Laseraufnahmen nicht differenziert werden, ob sich die Bakterien innerhalb von Makrophagen oder anderen Zellen der Immunabwehr des Wirtes wie z.B. dendritischen Zellen oder Neutrophilen befanden.

Auch hier war die Anzahl der zu detektierenden Bakterien abhängig vom Infektionsweg. Nach i.p.-Infektion konnte die größte Salmonellenanzahl in Milz und Leber nachgewiesen werden. Nach oraler Infektion waren in einem Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung meist nur 2-6 Bakterien in der Leber zu erkennen. Auch in den Peyerschen Plaques waren im 40x-Objektiv über den ganzen Gewebeschnitt sehr viele Bakterien und zwar sowohl rot als auch grün fluoreszierende, zu sehen (s. S.45 Abb.3-16c)). Die Ergebnisse bestätigen, dass Salmonellen einen anderen Mechanismus der Invasion, Dissemination und Vermehrung als Yersinien haben. Wenn die Peyerschen Plaques solch ein gemischt farbiges Bild ergeben, dann weisen die Ergebnisse daraufhin, dass eine viel größere Anzahl von Salmonellen das Darmepithel überwinden kann und disseminiert, als es bei Yersinien der Fall ist. Es lässt sich

weiter folgern, dass *Salmonella* Typhimurium nicht nur über M-Zellen transloziert wird, sondern auch über einen aktiven Aufnahmemechanismus (das translozierte SopE induziert Makropinozytose) durch das Darmepithel in das darunter liegende Darmgewebe gelangen kann. Dies muss allerdings in weiteren Versuchen mit Salmonellen genauso wie mit Yersinien und bei genauerer Betrachtung des Darmepithels unter dem Mikroskop erst noch genauer untersucht werden.

Interessant wäre es zu untersuchen, ob sich bei Koinfektion von Yersinien und Salmonellen ein anderes histopathologisches Bild ergibt, das auf eine gegenseitige Beeinflussung der beiden unterschiedlichen Erreger hinweisen könnte.

## 4.2 Untersuchungen zur Yersiniabaktin-Kreuzfütterung von Yersinien im Mausinfektionsmodell

Eisen ist für alle Lebewesen ein überlebenswichtiges Element [13]. In Bakterien sind mittlerweile über 80 verschiedene Mechanismen der Eisenaufnahme bekannt. Yersinien nutzen Ferrooxamin, Hämin und, was für diese Arbeit von Bedeutung ist, das Yersiniabaktin (Ybt) zur Eisenversorgung. Nur hochvirulente Stämme wie *Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis* und *Y.enterocolitica* der Biogruppe 1B können Ybt produzieren [15]. Unter den Genen für die Produktion von Yersiniabaktin sind verschiedene *irp*-Gene (iron-repressable-proteins) identifiziert worden. Für eine *irp1*-Mutante (WA*irp1*kan[pYV08]) konnte im Mausinfektionsmodell eine geringere Virulenz nachgewiesen werden [41]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob im Mausinfektionsmodell eine Yersiniabaktinkreuzfütterung durch WA[pYV08] an die *irp1*-Mutante zur Virulenzsteigerung führt.

Es wurden 5-tägige orale, 3-tägige intraperitoneale und intravenöse Einzelinfektionen und Mischinfektionen mit WA[pYV08] und WA*irp1*[pYV08] in verschiedenen Verhältnissen zueinander im etablierten Mausinfektionsmodell durchgeführt. Durch differenzielle Keimzahlbestimmung der Milz, Leber, Peyersche Plaques, von Intraperitoneallavage und Darmspülung auf antibiotikahaltigem Agar konnten die Anzahl und der Anteil an rückisolierten WA[pYV08] und *irp1*-Mutante bestimmt werden.

Es zeigte sich, dass je nach Organ und Infektionsweg eine 10- bis 10000-fach höhere Anzahl an WA*irp1*[pYV08] nach Mischinfektion im Vergleich zu der nach Einzelin-

fektion rückisoliert werden konnte. Das weist daraufhin, dass tatsächlich eine Kreuzfütterung des Yersiniabaktins vom Wildtyp an die Mutante stattfindet, was eine Ybt-Produktion während der Infektion voraussetzt.

Wie Jacobi et al. [44] zeigten, ist die Yersiniabaktinsynthese in der Milz hochgeregelt und in Darm und Peyerschen Plaques nur schwach aktiv. Dies wird durch die Kreuzfütterungsexperimente bestätigt, die in Milz und Leber eine selektive Erhöhung des Verhältnisses von *irp1*-Mutante zu WA[pYV08] nachweisen.

Aus den hier gewonnenen Daten lässt sich demnach der Anstieg der Anzahl an *irp1*-Mutante in Darm und Peyerschen Plaques so nicht erklären.

Unklar bleibt auch, in welchem Teil des Körpers und in welchem zeitlichen Ablauf ein solcher Fütterungsprozess stattfinden soll. Nachdem mikroskopisch nur auf vereinzelt Gewebeschnitten der Milz nah beieinander liegende Mikrokolonien zu sehen waren, die einmal vom Wildtyp und einmal von der Mutante gebildet wurden, ist anzunehmen, dass die Fütterung nicht nur im Organ selbst vonstatten geht. Dafür müssten Wildtyp und Mutante, räumlich gesehen, näher beieinander liegen.

Durch Experimente, bei denen das Verhältnis von Mutante zu Wildtyp bei Mischinfektionen zwischen 1:100 und 100:1 variiert worden waren, ließ sich zeigen, dass es keinen positiven Effekt auf den Fütterungsprozess hatte, wenn einer der beiden Stämme in der Überzahl vorlag. Es scheint, dass es von Vorteil ist, wenn auf eine Mutante auch in etwa ein Wildtyp trifft. Demnach scheint ein WA[pYV08] nicht ausreichend viel Yersiniabaktin zu produzieren, um das Siderophor an eine große Anzahl von Bakterien weitergeben zu können.

Zusammenfassend haben die Experimente gezeigt, dass die *ipr1*-Mutante im Mausinfektionsmodell von der Anwesenheit des Yersiniabaktin-produzierenden Stammes WA[pYV08] profitiert, was sehr wahrscheinlich auf Kreuzfütterung zurückzuführen ist.



## 5 Zusammenfassung

Diese Arbeit ist in zwei Teile gegliedert und befasst sich mit der Analyse von Invasion, Dissemination und Vermehrung von *Y. enterocolitica* und *S. Typhimurium* im Mausinfektionsmodell unter Verwendung der GFP- und RFP-Reporterplasmide und mit der Yersiniabaktinkreuzfütterung im Mausinfektionsmodell.

1. Im ersten Teil der Arbeit wurde der Mechanismus der Darminvasion von *Y. enterocolitica* im Vergleich zu dem von *S. Typhimurium* untersucht. Dazu war bislang bekannt, dass enteropathogene Keime über kontaminierte Nahrungsmittel oral aufgenommen werden und im terminalen Ileum über M-Zellen in die darunter liegenden Peyerschen Plaques transloziert werden. Von den Peyerschen Plaques ausgehend disseminieren die Bakterien dann in Organe wie Leber, Milz und Lunge und bilden dort Infektionsherde.

Bislang konnte noch nicht geklärt werden, in welchem Ausmaß Yersinien und Salmonellen über die Mukosabarriere invadieren und wie der weitere Vermehrungs- und Disseminationsmechanismus abläuft.

Es konnte nun durch Koinfektionsexperimente von Mäusen mit Yersinien, die einerseits das grün fluoreszierende Protein GFP und andererseits das rot fluoreszierende Protein RFP als Reporter gen im pYV exprimierten, gezeigt werden, dass nur vereinzelt Yersinienzellen in die Peyerschen Plaques gelangen. Ein einzelner Peyerscher Plaque wird dann vermutlich durch Vermehrung eines einzelnen Bakteriums besiedelt. Die entstehenden Mikrokolonien führen zur weiteren klonalen Dissemination in Milz und Leber, wo weitere klonale Mikrokolonien gebildet werden.

Im Unterschied zu *Y. enterocolitica* bildet *S. Typhimurium* keine monoklonalen Mikrokolonien, sondern verteilt sich fast homogen im Gewebe, wobei die Mehrzahl der Salmonellen intrazellulär lokalisiert ist. Bereits in die Peyerschen Plaques gelangen eine große Zahl von Bakterien, sodass eine grün/rot gemischte Verteilung von Salmonellen in diesem Organ zu beobachten ist.

Um die unterschiedlich fluoreszierenden Bakterien detektieren zu können, musste der RFP-Reporter optimiert werden. Es musste zunächst aus den verschiedenen kommerziell erhältlichen rot fluoreszierenden Proteinen das für in-vivo-Versuche geeignete RFP gefunden werden. Von dem ursprünglichen RFP, dem Nachfolger RFP2 und dem späteren Nachfolger RFPexpress ließ sich nur das Letztere im Mausinfekti-

onsmodell anwenden. Dieses zeigte eine ausreichende Fluoreszenzintensität und eine ausreichend schnelle Reifung.

Außerdem zeigte sich, dass die Reportergene, wenn sie sich auf einem Plasmid mit einer niedrigen Kopienzahl befinden, zu 99% repliziert werden, sodass dies keinen Einfluss auf die Detektion der Bakterien hatte und aus diesem Grund keine Integration des RFP-Gens in das pYV Plasmid der Yersinie notwendig geworden wäre.

Um die Gewebeschnitte bestmöglich unter dem Lasermikroskop darstellen zu können, wurde als Fixierungslösung Formalin oder Aceton und als Gewebefärbung Methylblau als brauchbar bewertet. Nach einer Fixierung mit Methanol und einer Gewebefärbung mit Hämatoxylin-Eosin ließ sich wenig bis gar keine Fluoreszenz mehr beobachten. Zusätzlich kam es zu einer störend starken Hintergrundfluoreszenz. Für künftige Arbeiten lässt sich die Intensität der Fluoreszenz für den Einsatz von RFP im in-vivo-Modell verbessern. Vor das RFP könnte ein stärkerer Promotor ligiert werden, der auch im pYV-Plasmid eine höhere Expression zur Folge hätte.

2. Es ist bekannt, dass Eisen von Lebewesen für viele Stoffwechselfvorgänge benötigt wird und daher für das Überleben essentiell ist. Bakterien, die teilweise in einer sehr eisenarmen Umgebung überleben müssen, haben verschiedene Systeme zur Eisenaufnahme entwickelt. Yersinien nutzen unter anderem das Siderophor Yersiniabaktin.

Es konnte gezeigt werden, dass es in Koinfektionsversuchen mit dem Wildtyp WA[pYV08] und der Mutante WA $irp1$ [pYV08] zu einer Zunahme der Virulenz der Mutante kommt. Dieses Ergebnis kann derart interpretiert werden, dass in vivo eine Yersiniabaktinfütterung von WA[pYV08] zu WA $irp1$ [pYV08] stattfindet und damit das Wachstum von der Mutante im Gewebe verbessert wird.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aleksic, S. and J. Bockemuhl, *Microbiology and epidemiology of Yersinia infections*. Immun Infekt, 1990. 18(6): S.178-85.
2. Baenkler F., Fießl, Goeckenjan, Hamm, Harenberg, Hebe, Hengstmann, Hörl, Klingmüller, Köster, Küchenhoff, Kuck, Ludwig, Matzdorff, Nienaber, *Innere Medizin*. 1 ed. Duale Reihe, ed. MLP. 2001, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
3. Bagg, A., and J.B. Neilands, *Molecular mechanism of regulation of siderophoremediated iron assimilation*. Microbiol. Rev, 1987. 51: S.509-518
4. Baird, G.S., D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien, *Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. 97(22): S.11984-9.
5. Bevis, B.J. and B.S. Glick, *Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed)*. Nat Biotechnol, 2002. 20(1): S.83-7.
6. Blei, F. and D.R. Puder, *Yersinia enterocolitica bacteremia in a chronically transfused patient with sickle cell anemia. Case report and review of the literature*. Am J Pediatr Hematol Oncol, 1993. 15 (4): S.430-4.
7. Bottone, E.J., *Yersinia enterocolitica: a panoramic view of a charismatic microorganism*. CRC Crit Rev Microbiol, 1977. 5 (2): S.211-41.
8. Bottone, E.J., *Yersinia enterocolitica: the charisma continues*. Clin Microbiol Rev, 1997. 10(2): S.257-76.
9. Bottone, E.J., *Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates*. Microbes Infect, 1999. 1(4): S.323-33.
10. Bouza, E., et al., *Yersinia enterocolitica Septicemia*. Am J Clin Pathol, 1980. 74 (4): S.404-9.
11. Braun, V., and G. Winkelmann, *Microbial iron transport: structure and function of siderophores*. Prog. Clin. Biochem. Med, 1987. 5: S.67-99.
12. Brenner, D.J., *Speciation in Yersinia*. Contrib Microbiol Immunol, 1979. 5: S. 33-43.
13. Bullen, J.J. and C.G. Ward, *Iron and infection*. Br Med J (Clin Res Ed), 1988. 296 (6635): S.1539.

14. Calderwood, S.B. and J.J. Mekalanos, *Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid.* J Bacteriol, 1988. 170 (2): S.1015-7.
15. Carniel, E., I. Guilvout, and M. Prentice, *Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B Yersinia enterocolitica.* J Bacteriol, 1996. 178(23): S.6743-51.
16. Centers for Disease Control and Prevention. *Alfalfa sprouts-- Arizona, California, Colorado, and New Mexico, February-April, 2001.* Jama, 2002. 287(5): S. 581-2.
17. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression.* Science, 1994. 263(5148): S.802-5.
18. Chang, A.C.Y., and S.N. Cohen, *Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the the P15A cryptic miniplasmid.* J Bacteriol, 1978. 134: S.1141-1156.
19. Clark, M.A.a.M.A.J., *Intestinal M cells and their role in bacterial infection.* Int J Med Microbiol. Int J Med Microbiol, 1998. 66: S.1237-43.
20. Cody, C.W., et al., *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green- fluorescent protein.* Biochemistry, 1993. 32 (5): S.1212-8.
21. Cornelis, G., et al., *Yersinia enterocolitica, a primary model for bacterial invasiveness.* Rev Infect Dis, 1987. 9 (1): S.64-87
22. Cornelis, G.R., et al., *The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome.* Microbiol Mol Biol Rev, 1998. 62 (4): S.1315-52.
23. Cornelis, G.R., *Yersinia type III secretion: send in the effectors.* J Cell Biol, 2002. 158 (3): S.401-8.
24. Datsenko KA, Wanner BL, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products,* 2000. 97 (12 ): S.6640-5.
25. De Almeida A.M.P., G.A., Guilvour I., Itean I., Baranton G., Carniel E., *Chromosomal irp2 gene in Yersinia: distribution, expression, deletion and impact on virulence.* Microb. Pathog, 1993. 14: S.9-21.
26. Delor, I. and G.R. Cornelis, *Role of Yersinia enterocolitica Yst toxin in experimental infection of young rabbits.* Infect Immun, 1992. 60 (10): S.4269-77.
27. Dequeker, J., R. Jamar, and M. Walravens, *HLA-B27, arthritis and Yersinia enterocolitica infection.* J Rheumatol, 1980. 7 (5): S.706-10.

28. El Tahir, Y. and M. Skurnik, *YadA, the multifaceted Yersinia adhesin*. Int J Med Microbiol, 2001. 291 (3): S.209-18.
29. Ezaki, T., [*Report on Salmonella nomenclature of judicial commission during IUMS general meeting in Paris*]. Kansenshogaku Zasshi, 2002. 76 (10): S. 839-4.
30. Frederiksen, W. *A study of some Yersinia pseudotuberculosis-like bacteria ("Bacterium enterocoliticum" and Pasteurella X)*. in *14th Scandinavian Congress on Pathology and Microbiology*. 1964. Oslo, Norway.
31. Gripenberg-Lerche, C., et al., *Role of YadA in arthritogenicity of Yersinia enterocolitica serotype O:8: experimental studies with rats*. Infect Immun, 1994. 62 (12): S.5568-75.
32. Gross, L.A., et al., *The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(22): p. 11990-5
33. Grutzkau, A., et al., *Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by Yersinia enterocolitica and other enteroinvasive bacteria*. Gut, 1990. 31(9): S.1011-5.
34. Haag, H., et al., *Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of Yersinia enterocolitica*. J Gen Microbiol, 1993. 139 (Pt 9): S. 2159-65.
35. Hacker, J., Heesemann, J., *Molecular infection biology*. 1 ed. 2000, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. S.334-339.
36. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J. Mol. Biol., 1983. 166: S.557-580.
37. Hansen-Wester, I., B. Stecher, and M. Hensel, *Analyses of the evolutionary distribution of Salmonella translocated effectors*. Infect Immun, 2002. 70 (3): S. 1619-22.
38. Hanski, C., et al., *Determinants of invasion and survival of Yersinia enterocolitica in intestinal tissue. An in vivo study*. Med Microbiol Immunol, 1989. 178 (5): S.289-96.
39. Heesemann, J., *Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic Yersinia species*. FEMS. Microbiol. Lett., 1987. 48: S.229-233.
40. Heesemann, J., et al., *Virulence of Yersinia enterocolitica is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer mem-*

- brane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity.* Mol Microbiol, 1993. 8 (2): S.397-408.
41. Igwe, E.I., et al., *Rational live oral carrier vaccine design by mutating virulence-associated genes of Yersinia enterocolitica.* Infect Immun, 1999. 67 (10): S.5500-7.
42. Iriarte, M. and G.R. Cornelis, *Molecular determinants of Yersinia pathogenesis.* Microbiologia, 1996. 12(2): S.267-80.
43. Isberg, R.R. and P. Barnes, *Subversion of integrins by enteropathogenic Yersinia.* J Cell Sci, 2001. 114 (Pt 1): S.21-28
44. Jacobi, C.A., et al., *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, 2001. 69 (12): S.7772-82.
45. Kayser, F.B., K.; Eckert, J.; Zinkernagel, R., *Medizinische Mikrobiologie.* 10. ed. 2001, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S.300-303.
46. Knapp, W., *Die Gattung Yersinia-Yersiniosen.* In H. Brandis and G. Pulverer (ed.). Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 1988. S.348-358.
47. Matz, M.V., et al., *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species.* Nat Biotechnol, 1999. 17 (10): S.969-73.
48. Miller, V.L. and S. Falkow, *Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells.* Infect Immun, 1988. 56 (5): S. 1242-8.
49. Mollaret, H.H., *[A new field in pathology: Yersinia enterocolitica infections].* Ann Biol Clin, 1972. 30 (1): S.1-6.
50. Moncure, C.W., et al., *Comparative histopathology in mouse typhoid among genetically diverse mice.* Int J Exp Pathol, 1998. 79 (3): S.183-92.
51. Mülhardt, C., *Molekularbiologie/Genomics.* 3 ed. Der Experimentator. 2002, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. S. 267.
52. Nakoneczna, I. and H.S. Hsu, *The comparative histopathology of primary and secondary lesions in murine salmonellosis.* Br J Exp Pathol, 1980. 61(1): S. 76-84.
53. Odinet, P.T., Meis, J.F.G.M., Hoogkamp-Korstanje, J.A.A., Melchers, W.J.G., *In situ localisation of Yersinia enterocolitica by catalysed reporter deposition signal amplification.* Clin Pathol 1998;51:444-449.

54. Ormo, M., et al., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 1996. 273 (5280): S.1392-5.
55. Pai, C.H. and V. Mors, *Production of enterotoxin by Yersinia enterocolitica*. Infect Immun, 1978. 19 (3): S.908-11.
56. Pelludat, C., et al., *The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of Yersinia enterocolitica: organization and siderophore-dependent regulation*. J Bacteriol, 1998. 180 (3): S.538-46.
57. Perry, R.D., and R.R. Brubacker, *Accumulation of iron by yersiniae*. J. Bacteriol., 1979. 137: S.1290-1298.
58. Perry, R., Fetherston, JD., *Yersinia pestis Etiologic agent of plague*. Clin Microbiol Rev, 1997 (10): S.35.
59. Rabsch W., A.H., Kingsley R., Prager R., Tschäpe H., Adams G., Bäumler A., *Salmonella enterica Serotype Typhimurium and Its Host-Adapted Variants*. Infection and Immunity, 2002. 70 (5): S.2249-2255.
60. Rabson, A.R., A.F. Hallett, and H.J. Koornhof, *Generalized Yersinia enterocolitica infection*. J Infect Dis, 1975. 131(4): S.447-51.
61. Rakin, A., et al., *The pesticin receptor of Yersinia enterocolitica: a novel virulence factor with dual function*. Mol Microbiol, 1994. 13 (2): S.253-63
62. Richter-Dahlfors, A., A.M. Buchan, and B.B. Finlay, *Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo*. J Exp Med, 1997. 186 (4): S.569-80.
63. Roggenkamp, A. et al., *Substitution of two histidine residues in YadA protein of Yersinia enterocolitica abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence*. Mol Microbiol, 1995. 16 (6): S.1207-19.
64. Ropp, J.D., et al., *Aequorea green fluorescent protein analysis by flow cytometry*. Cytometry, 1995. 21(4): S.309-17.
65. Simon, R., U. Priefer and A. Puhler, *A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria*. Biotechnology, 1988. 1: S.784-785.
66. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification, and properties of aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusa, Aequorea*. J. Cell. Comp. Physiol., 1962. 59: S.223-239.

67. Schleifstein, J.I., and M.B. Coleman, *An unidentified microorganism resembling B. lignieri and Pasteurella pseudotuberculosis, and pathogenic for man.* J. Med, 1939. 39: S.1749-1753.
68. Staggs, T.M. and R.D. Perry, *Identification and cloning of a fur regulatory gene in Yersinia pestis.* J Bacteriol, 1991. 173 (2): S.417-25.
69. Steipe, B., and A. Skerra, *Das grün fluoreszierende Protein.* Biospektrum, 1997. 3 (1): S.28-30.
70. Veena, M.S., van Vuurde, J.W.L., *Indirect immunofluorescence colony staining method for detecting bacterial pathogens of tomato.* Journal of Microbiological Methods 49 (2002) 11 – 17.
71. Wall, M.A., M. Socolich, and R. Ranganathan, *The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed.* Nat Struct Biol, 2000. 7 (12): S.1133-8.
72. Wuorela, M. et al., *Yersinia enterocolitica serotype O:3 alters the expression of serologic HLA-B27 epitopes on human monocytes.* Infect Immun, 1997. 65 (6): S.2060-6.
73. Yersin, A., *La bubonique peste a Hong Kong.* Ann. Inst. Pasteur Paris, 1894. 8: S.662-667.
74. Zhang, S. et al., *Molecular pathogenesis of Salmonella enterica serotype typhimurium- induced diarrhea.* Infect Immun, 2003. 71 (1): S.1-12.



## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

---

Name: Alexandra Wendler geborene Bach  
Geburtsdatum/ -ort: 26.07.1977 in Trier  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Berufliche Ausbildung

---

seit 6/2006 Assistenzärztin in der Frauenklinik Harlaching, München  
2/2005 - 6/2006 Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe  
Klinikum Kaufbeuren-Ostallgäu

### Universitäre / Schulische Ausbildung

---

4/2000 - 12/2004 Klinischer Studienabschnitt der Medizin an der LMU,  
München, Abschluss 3. Staatsexamen  
4/1998 - 4/2000 Vorklinischer Studienabschnitt der Medizin an der  
Universität Gießen, Abschluss Physikum  
9/1997 - 3/1998 Studium der Volkswirtschaft an der Universität Bonn  
5/1996 Abitur

### Praktisches Jahr

---

6/2004 - 9/2004 Pädiatrie im „Hauerschen Kinderspital“, LMU München  
2/2004 - 5/2004 Chirurgie im Innenstadt-Klinikum der LMU, München  
12/2003 - 2/2004 Innere Medizin in der „Medizinischen Poliklinik“, LMU  
München  
10/2003 - 12/2003 Innere Medizin im „Memorial Sloan-Kettering Cancer  
Center“, New York

## Dissertation und Publikationen

- 7/2001- 1/2003 Stipendiatin im Graduiertenkolleg „Infection and Immunity“ des „Max-von-Pettenkofer-Instituts“ der LMU zur Fertigung der Dissertation über „*Yersinia enterocolitica*“ Doktorvater: Prof.Dr.Dr.med. Jürgen Heeseman
- 11/2003 Paper: Jacobi C., Bach A., Eberl L., Steidle A., Heesemann J.: „Detection of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone in mice infected with *Yersinia enterocolitica* serotype O8“, Infection and Immunity, 2003 Nov
- 10/2002 Poster: DGHM-Kongress 2002, Heidelberg, Bach A., Jacobi C., Heesemann J., „Kinetics of abscess formation by *Yersinia enterocolitica* in the mouse infection model“

## Sonstiges

- 7/1996 - 8/1997 Soziales Jahr Mexiko
- 4/1993 - 7/1996 Mitglied im Kader des Deutschen Ruderverbandes

München, den 10.11.2006

Alexandra Bach