

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

***In vitro* und *in vivo* Analyse der
Yersinia enterocolitica
Yop-Translokation mittels
β-Laktamase-Reporter**

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

vorgelegt von
Sandra Cvetanovic
aus Augsburg
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Gabriele Rieder

Priv. Doz. Dr. Konrad Trülzsch

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. H. Bouabe

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2011

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Erkenntnisse aus dem Schrifttum, die ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet und wurden nach ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen. Ferner erkläre ich, dass ich an keiner Universität versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

München, den 09.11.2010

Sandra Cvetanovic

A journey of a thousand miles must begin with a single step.

(Lao Tsu)

Für meine Eltern, die mich meinen Weg haben gehen lassen und mich dabei immer unterstützt haben.

A.	Einleitung	1
A.1	Infektionskrankheiten	1
A.2	Enteropathogene Erreger	2
A.3	Die Gattung <i>Yersinia</i>	3
A.4	<i>Yersinia enterocolitica</i>	5
A.4.1	<i>Eigenschaften und Vorkommen</i>	5
A.4.2	<i>Verbreitung und klinisches Bild der Yersiniose</i>	6
A.5	Wirt-Erreger-Interaktionen	7
A.6	Verteidigungsmechanismen des Wirtes	7
A.7	Evasionsmechanismen der Erreger.....	9
A.7.1	<i>Protein-Sekretionssysteme gram-negativer Bakterien</i>	10
A.7.1.1	TypI-Sekretionssystem (T1SS).....	12
A.7.1.2	TypII-Sekretionssystem (T2SS).....	12
A.7.1.3	TypIII-Sekretionssystem (T3SS).....	13
A.7.1.4	TypIV-Sekretionssystem (T4SS)	14
A.7.1.5	TypV-Sekretionssystem (T5SS)	14
A.7.1.6	TypVI-Sekretionssystem (T6SS)	15
A.7.1.7	Chaperon/Usher-Sekretionssystem.....	15
A.7.1.8	Twin-Arginine-System (TAT)	16
A.8	Der TypIII-Sekretionsapparat bei <i>Yersinia</i>	16
A.8.1	<i>Sekretion und Translokation von Yop-Proteinen</i>	17
A.8.2	<i>Die Yop-Effektorproteine</i>	19
A.8.2.1	YopE	20
A.8.2.2	YopH	20
A.8.2.3	YopM.....	21
A.8.2.4	YopO	22
A.8.2.5	YopP	22
A.8.2.6	YopT.....	23
A.9	Experimentelle Methoden zur Untersuchung der Yop-Sekretions/Translokationssysteme ..	23
A.9.1	<i>Tetracystein-FIAsH</i>	25
A.9.2	<i>β-Laktamase</i>	26
A.10	Zielsetzung der Arbeit	27
B.	Material und Methoden	29
B.1	Material	29
B.1.1	<i>Geräte</i>	29
B.1.2	<i>Chemikalien</i>	30
B.1.3	<i>Kits</i>	31
B.1.4	<i>Enzyme, Gewichts-und Längenstandards</i>	31
B.1.5	<i>Nährmedien</i>	32

B.1.6	<i>Antibiotika und Medienzusätze</i>	32
B.1.7	<i>Bakterienstämme</i>	32
B.1.8	<i>Plasmide</i>	33
B.1.9	<i>Primer</i>	34
B.1.10	<i>Eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien</i>	35
B.1.11	<i>Antikörper</i>	35
B.1.11.1	Primäre Antikörper für die indirekte Immundetektion	35
B.1.11.2	Sekundäre Antikörper für die indirekte Immundetektion	36
B.1.11.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie	36
B.1.12	<i>Mausstämme</i>	36
B.2	<i>Methoden</i>	37
B.2.1	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	37
B.2.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	37
B.2.1.2	Kultivierung und Stammhaltung von <i>Y. enterocolitica</i>	37
B.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	38
B.2.2.1	Präparation von DNA	38
B.2.2.2	Analyse von DNA	38
B.2.2.3	Enzymatische Behandlung von DNA	40
B.2.2.4	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	44
B.2.2.5	Transformation	45
B.2.3	<i>Biochemische Methoden</i>	47
B.2.3.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	47
B.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
B.2.3.3	Detektion von Proteinen	48
B.2.3.4	Isolierung von sekretierten Yop-Proteinen aus dem Kulturüberstand	50
B.2.3.5	Nitrocefin vermittelter β -Laktamase-Assay	51
B.2.3.6	Lumio™ <i>In-Gel</i> -Färbung zur Detektion des FIAsh-tags	51
B.2.4	<i>Zellbiologische und immunologische Methoden</i>	53
B.2.4.1	Kultivierung von Zelllinien	53
B.2.4.2	Gewinnung von Makrophagen und DCs aus dem Knochenmark	55
B.2.5	<i>Infektionsbiologische Methoden</i>	57
B.2.5.1	<i>In vitro</i> Infektionsversuche	57
B.2.5.2	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	59
B.2.5.3	Immunfärbung für die FACS-Analyse	61
B.2.5.4	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	62
B.2.5.5	Präparation von Gewebe zur <i>in vitro</i> Simulierung der Infektion im 3D Zellverband	62
B.2.6	<i>Mausinfektionsversuche</i>	64
B.2.6.1	Mauspassage von <i>Y. enterocolitica</i> -Stämmen	64
B.2.6.2	Infektion der Mäuse	64
B.2.6.3	Präparation von Einzelzellsuspensionen aus der Milz	64
B.2.6.4	Bestimmung der cfu von Yersinien in der Leber	65

C.	Ergebnisse	66
C.1	Das FIAsH-Reportersystem	66
C.1.1.1	Klonierung von Yop-Tetracystein-Reporter-Yersinien	66
C.1.1.2	Überprüfung der Tetracystein-Reporter-Yersinien im SDS-Gel und mittels Western Blot	69
C.1.1.3	Optimierungsversuche der Lumio TM -Färbung.....	70
C.1.1.4	Mikroskopische Untersuchungen der Tcys-Yop-Fusionsproteine.....	75
C.2	Das β -Laktamase-Reportersystem	77
C.2.1	<i>Klonierungsschema für die Herstellung der verschiedenen YopH/YopE_I-Bla-Reporter-Yersinien</i>	<i>78</i>
C.2.1.1	Überprüfung der Sekretion des YopH-Bla-Fusionsproteins verschiedener <i>Yersinia</i> -Stämme	81
C.2.1.2	Überprüfung der Sekretion der verschiedenen YopE _I -Bla-Fusionsproteine verschiedener <i>Yersinia</i> -Stämme.....	81
C.2.1.3	Wachstumsversuche der Yop-Bla-Reporter-Yersinien.....	83
C.2.2	<i>Etablierung und Optimierung der Versuchsbedingungen für das Bla-Reportersystem in vitro.....</i>	<i>84</i>
C.2.2.1	Unterschiedliche Translokationseffizienz von YopE und YopH-Bla-Reporterproteinen.....	85
C.2.2.2	Das Sekretionsverhalten spiegelt nicht das Translokationsverhalten der Yop-Bla-Reporterproteine wieder.....	86
C.2.2.3	Die β -Laktamase-Aktivität ist translokationsabhängig	88
C.2.3	<i>Der Einfluss von Umweltbedingungen auf die Yop-Translokation in vitro</i>	<i>89</i>
C.2.3.1	Translokationseffizienz ist abhängig von den <i>Yersinia</i> -Prä-Inkubationsbedingungen und vom Zellkulturmedium	89
C.2.3.2	Einfluss von CaCl ₂ und Temperatur auf die Translokation	90
C.2.3.3	Der Einfluss von CaCl ₂ und Temperatur auf die Expression und Sekretion, ohne Zugabe von Sekretionsstimuli	93
C.2.4	<i>Etablierung und Optimierung von Versuchsbedingungen für kinetische Translokationsstudien in vitro.....</i>	<i>94</i>
C.2.4.1	Optimierung der Färbebedingungen für kinetische Studien	95
C.2.4.2	Etablierung von Zellfixierungsbedingungen für kinetische Studien.....	98
C.2.4.3	Kinetische Studien zur Yop-Translokation.....	101
C.2.5	<i>Charakterisierung des YopE-Translokationssignals</i>	<i>102</i>
C.2.6	<i>Zelltyp-spezifisch differentielle Translokationseffizienz von YopH und YopE in vitro..</i>	<i>104</i>
C.2.7	<i>Translokationsverhalten von YopH in vivo.....</i>	<i>107</i>
C.2.8	<i>Yop-Translokation in vivo vs. in vitro.....</i>	<i>110</i>
C.2.8.1	Translokationsrate in Abhängigkeit von MOI und Infektionszeit	111
C.2.8.2	Validierung der MOI-abhängigen Sättigung der Translokation mit verschiedenen <i>Yersinia</i> -Reporter-Stämmen.....	113
C.2.8.3	Translokationsstudien unter anatomisch-ähnlichen <i>in vivo</i> Bedingungen: Gewebe	114
C.2.8.4	Translokationsstudien unter physiologisch-ähnlichen Bedingungen: Infektion im Blut....	116
C.2.8.5	Translokationsstudien im physiologischen Raum: Infektion im Peritonealraum	118

D.	Diskussion	121
D.1	Das FIAsh-Reportersystem	121
D.2	Das β -Laktamase-Reportersystem	125
D.2.1	<i>Das Translokationsverhalten von YopE und YopH ist unterschiedlich</i>	<i>126</i>
D.2.2	<i>Einfluss von verschiedenen Umweltbedingungen auf das Translokationsverhalten in vitro.....</i>	<i>127</i>
D.2.3	<i>Kinetik der Translokation.....</i>	<i>129</i>
D.2.4	<i>Die N-terminalen 18 AS von YopE sind ausreichend für eine Translokation.....</i>	<i>130</i>
D.2.5	<i>Translokationsrate ist abhängig von der MOI</i>	<i>131</i>
D.2.6	<i>Die Yop-Bla-Translokation ist in vitro Zelltyp-unabhängig</i>	<i>131</i>
D.2.7	<i>Die Yop-Bla Translokation ist in vivo Zelltyp-unabhängig.....</i>	<i>133</i>
D.2.8	<i>Die Yop-Translokation in vitro vs. in vivo</i>	<i>135</i>
E.	Zusammenfassung.....	137
F.	Anhang	139
G.	Literaturverzeichnis	141
H.	Danksagung	165

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aktivierung der Wirtsabwehr (mod. nach Medzhitov, 2007)8

Abb. 2: Übersichtsabbildung der chromosomal und plasmidkodierten Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* und ihre Angriffsziele 10

Abb. 3: Darstellung der Protein-Sekretionssysteme gram-negativer Bakterien (mod. nach Desvaux, 2004) 11

Abb. 4: Modell für die Translokation durch das Ysc-Injektisom (mod. nach Cornelis, 2006) 18

Abb. 5: Das FIAsh-Reagenz wird durch die Bindung an den Tetracystein-tag eines Yop-Proteins fluoreszent 25

Abb. 6: Vorgehensweise für die Präparation von Gewebe zur *in vitro* Simulierung 63

Abb. 7: Schema des PCR-Fragments 66

Abb. 8: ET-Klonierung zur Herstellung von Yop-Fusionsproteinen mit Tcys-tag 68

Abb. 9: Sekretion von WA(pYV, YopM-Tcys) und WA(pYV, YopH-Tcys) im Vergleich zum WA(pYV)..... 69

Abb. 10: Versuchsschema für das Anfärben zytosolischer bzw. sezernierter Tetracystein-Yop-Fusionsproteine, d.h. vor der Sekretion (=Lumio™ Prä-Färbung) bzw. nach der Sekretion (=Lumio™ Post-Färbung) 70

Abb. 11: Anfärben der Tcys-Reporterproteine vor und nach der Sekretion 71

Abb. 12: Analyse der Fluoreszenzintensität von WA(pYV, YopH-Tcys) unter unterschiedlichen Färbebedingungen mittels Durchflusszytometrie (FACS) 72

Abb. 13: Sekretionsanalyse der Tetracystein-Reporterproteine unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von CCCP bzw. DMSO 73

Abb. 14: Einfluss von PAβN auf die Lumio™ Prä-Färbung der sezernierten Tetracys-Reporterproteine 75

Abb. 15: Translokation von Tcys-Reporterproteinen, die mit Lumio™ Prä-Färbung unter Anwesenheit von PAβN beladen wurden..... 76

Abb. 16: Das Schema des β-Laktamasesubstrats 78

Abb. 17: Klonierungsschema der Yop-Bla-Reporter-Yersinien 80

Abb. 18: Die Sekretion von YopH-Bla-Fusionsprotein in verschiedenen *Yersinia*-Stämmen 81

Abb. 19: Die Sekretion von verschiedenen YopE_r-Bla-Fusionsproteinen im *Yersinia*-Wildtypstamm WA(pYV): 82

Abb. 20: Sekretion von verschiedenen YopE_r-Bla-Fusionsproteinen von den *Yersinia*-Stämmen WA(pYVΔYopE, pYopE_r-Bla) und WA(pT3SS, pYopE_r-Bla)..... 83

Abb. 21: Wachstumsvergleich der Yop-Bla-Reporter-Yersinien mit den Kontrollstämmen 84

Abb. 22: Translokationseffizienz des YopE und YopH-Bla-Reporterproteins 85

Abb. 23: Untersuchung der Kopienzahl der Reporterplasmide und der sekretierten Menge der Yop-Bla-Reporterproteine 87

Abb. 24: Färbung von Yersinien mit CCF4-AM für 2 h bei 27°C und 37°C 88

Abb. 25:	Translokationsverhalten in Abhängigkeit von den <i>Yersinia</i> -Prä- Inkubationsbedingungen und von verwendeten Zellkulturmedien	90
Abb. 26:	Einfluss von CaCl ₂ und Temperatur auf die Translokation von Yops	92
Abb. 27:	Einfluss von CaCl ₂ und Temperatur auf die Yop-Bla-Sekretion.....	93
Abb. 28:	Unterschiedliche Färbebedingungen und die Wirkung von Probenecid auf Translokationsebene	96
Abb. 29:	Einfluss von Probenecid auf Wachstum und Sekretion der Yersinien	97
Abb. 30:	Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Fixierungsverfahren auf die Bla-Aktivität.....	100
Abb. 31:	Zeitverlauf der Translokation von Yop-Bla-Reporterproteinen.....	101
Abb. 32:	Kinetische Studie der Translokation der Yop-Bla-Reporterproteinen von verschiedenen <i>Yersinia</i> -Stämmen	103
Abb. 33:	Translokation der Yop-Bla-Reporterproteine in verschiedenen Zelltypen der Milz.....	105
Abb. 34:	Prozentuale Verteilung der translozierten Yop-Bla-Reporterproteine in den verschiedenen Zelltypen von Milzzellen.....	106
Abb. 35:	Nachweis der Translokation in Milzzellen, Blutzellen und peritonealen Zellen nach Mausinfektion mit WA(pYV, pYopH-Bla)	108
Abb. 36:	Prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Zelltypen von Milzzellen, Blutzellen und peritonealen Zellen von der Maus (2), infiziert mit WA(pYV, pYopH-Bla)	109
Abb. 37:	Translokation von YopH-Bla (2) in verschiedene Zelltypen	110
Abb. 38:	<i>In vitro</i> Milzversuch mit verschiedenen MOIs und Infektionszeiten	112
Abb. 39:	Vergleich der Translokation von Yop-Bla-Fusionsproteinen von verschiedenen Stämmen in Abhängigkeit zur eingesetzten MOI	113
Abb. 40:	<i>In vitro</i> Translokationsstudien an zerstampfter Leber und Milz.....	115
Abb. 41:	Infektion der Milzzellen mit Yop-Bla-Reporter-Yersinien, im Blut inkubiert.....	117
Abb. 42:	Infektion im Peritonealraum mit den Yop-Bla-Reporter-Yersinien	118
Abb. 43:	Translokation der Yop-Bla-Reporter-Yersinien in verschiedene Zelltypen nach der Infektion im Peritonealraum.....	119

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Anzahl gemeldeter Infektionen in Deutschland (RKI: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch)	3
Tab. 2: Übersicht über bekannte <i>Yersinia</i> -Arten	3
Tab. 3: Verwendete Geräte	29
Tab. 4: Verwendete Chemikalien	30
Tab. 5: Verwendete Kits	31
Tab. 6: Verwendete Enzyme, Gewichts- und Längenstandards	31
Tab. 7: Verwendete Antibiotika und andere Zusätze	32
Tab. 8: Verwendete Bakterienstämme	32
Tab. 9: Verwendete Plasmide	33
Tab. 10: Verwendete Primer	34
Tab. 11: Verwendete eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien	35
Tab. 12: Verwendete primäre Antikörper für die indirekte Immundetektion	35
Tab. 13: Verwendete sekundäre Antikörper für die indirekte Immundetektion	36
Tab. 14: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie	36
Tab. 15: Fluoreszenzeigenschaften von EGFP und FIAsH	124
Tab. 16: Adhäsionsmoleküle verschiedener <i>Yersinia</i> -Spezies	132
Tab. 17: Translozierte Yops verschiedener <i>Yersinia</i> -Spezies in verschiedene Zelltypen der Milz <i>in vitro</i>	132
Tab. 18: Translozierte Yops verschiedener <i>Yersinia</i> -Spezies in verschiedene Zelltypen der Milz <i>in vivo</i>	134
Tab. 19: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) (1X) liquid (<i>low glucose</i>) von Invitrogen	139
Tab. 20: RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) Medium 1640 von Invitrogen	140

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ail	<i>Attachment invasion locus</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APC	Antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäuren
BAL	2,3-Dimercaptopropanol (" <i>British Anti Lewisite</i> ")
BHI	<i>Brain-Heart-Infusion</i>
bidest.	zweifach destilliert
Bla	β -Laktamase
BMDCs	<i>Bone marrow derived dendritic cells</i>
BMDMs	<i>Bone marrow derived macrophages</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CCCP	Carbonyl Cyanid m-Chlorophenylhydrazon
CCF4-AM	Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein 4-Acetoxymethyl
cfu	<i>colony forming unit</i>
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
Cm	Chloramphenicol
C-Terminus	Carboxylterminaler Bereich eines Proteins
d	Schichtdicke
Δ	Delta
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrixproteine
EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (lat.): und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FIAsH	<i>Fluorescein Arsenical Hairpin Binder</i>

g	Gramm
GALT	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
h	Stunde (<i>hour</i>)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His	Histidin
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon-gamma
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
k	Kilo (10^3)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
l	Liter
λ	Wellenlänge
lat.	lateinisch
LB	Luria-Bertani
log ₁₀	Dekadischer Logarithmus
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
M	molar
(^m / _v)	Masse pro Volumen
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mod.	modifiziert
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
n	nano (10^{-9})
N-	Amino-
Nal	Nalidixinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
N-Terminus	Aminoterminaler Bereich eines Proteins
ODx	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
Ω	Ohm
P	Promotor
PaßN	Phenylalanin-Arginyl- β -Naphthylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMF	Protonenmotorische Kraft (<i>Proton Motive Force</i>)
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PP	Peysersche Plaques
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

pYV	<i>Yersinia</i> Virulenz Plasmid
x ^R	X-resistent
Rho	<i>Ras homology</i>
Rho GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	<i>Salmonella, Shigella</i>
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sek	Sekunde
Sm	Streptomycin
Sp	Spectinomycin
sp.	Species
Syc	<i>Specific Yop chaperone</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-isothiocyanat
T3SS	TypIII-Sekretionssystem
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
ün	über Nacht
ÜK	Übernachtkultur
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen, Volumina
($\frac{v}{v}$)	Volumen pro Volumen
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsion A
Ybt	<i>Yersinia</i> baktin
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
Ysc	<i>Yop secretion</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

A. EINLEITUNG

A.1 Infektionskrankheiten

Infektionskrankheiten werden durch pathogene Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilze, verursacht. Die Infektion kann entweder direkt (z.B. über Niesen, Husten oder Muttermilch) oder indirekt (über kontaminierte Lebensmittel und Geräte, oder über Vektoren, wie z.B. Mücken), von Mensch zu Mensch übertragen werden. Zoonosen sind Infektionskrankheiten der Tiere, an denen – nach einer Übertragung – auch Menschen erkranken können (Zooanthroponosen).

Obwohl es eine immens große Artenvielfalt an Mikroorganismen auf der Erde gibt, sind es vergleichsweise nur wenige pathogene Arten, die für Menschen und Tiere Krankheits-erregend und sogar tödlich sein können. Diese pathogenen Mikroorganismen verursachen Infektions- und Parasitenerkrankungen, die laut der WHO („*World Health Organisation*“) auf Platz 2 der Liste der weltweit häufigsten Todesursachen rangieren (aus „*the global burden of disease - 2004 update*“). Die WHO berichtet, dass in Entwicklungsländern mit geringem Einkommen und niedrigem Hygienestandard, wie z.B. in Afrika, diese Infektionskrankheiten sogar Todesursache Nummer 1 sind. 90 Prozent aller Todesfälle, die weltweit pro Jahr zu verzeichnen sind und die mit Infektionskrankheiten im Zusammenhang stehen, gehen auf nur fünf Erkrankungen zurück: Atemwegsinfektionen (4.2 Mio.), Durchfallerkrankungen (2.2 Mio.), HIV/Aids (2.0 Mio.), Tuberkulose (1.5 Mio.) und Malaria (0.9 Mio.) (Daten aus dem WHO-Bericht von 2004).

Eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten, die bis ins späte 19. Jahrhundert grassiert hat und sich wiederholt in schweren Seuchenzügen über ganz Europa und Asien ausgebreitet hat, ist die Pest. Bei einer der drei großen Pestepidemien, die 1347 bis 1351 Europa heimsuchte, kostete sie 25 Millionen Menschen das Leben. Das sind etwa ein Drittel der gesamten damaligen Bevölkerung (Perry and Fetherston, 1997). Die Pest (lat. *pestis* für Seuche, Unglück, Verderben) entvölkerte auf diese Weise, neben lokalen Ausbrüchen, zum Teil ganze Landstriche.

Die heutige Verbreitung der Pest hingegen wird nur noch aus den Vorkommen pestifizierter, wildlebender Nager wie Murmeltiere und Erdhörnchen (weniger durch Haus- und Wanderratten) verursacht. Diese finden sich in Zentralasien, in Ost- und Zentralafrika, in Südamerika und in den Rocky Mountains der USA (Perry and Fetherston, 1997; McDonald *et al.*, 2003). Aus diesem Grund sollte beachtet werden, dass bestimmte Tiere immer noch ein potentielles

Risiko darstellen und bei einem Ungleichgewicht zu Lasten der Hygienebedingungen, die vermeintlich ausgerottete „Seuche“ zu einer realen Bedrohung werden könnte. Zum Beispiel fielen in West-Indien noch Ende des 20. Jahrhunderts tausende Menschen der Pest zum Opfer (Perry and Fetherston, 1997). In Madagaskar werden regelmäßig Ausbrüche registriert (Chanteau *et al.*, 1998; Rahalison *et al.*, 2003), wie z.B. im Jahr 2008 (Süddeutsche Zeitung, <http://www.sueddeutsche.de/panorama/712/429465/text/>), und aus dem Kongo wurden im Jahr 2006 mindestens 42 Todesfälle und mehr als 1000 Pest-Erkrankungen gemeldet. Diese Meldungen am Beispiel der Pest zeigen, dass Infektionskrankheiten eine ernst zu nehmende Herausforderung für das Gesundheitswesen darstellen.

Vor diesem Hintergrund und aufgrund der Entstehung und Verbreitung Antibiotika-resistenter Erreger (Begon *et al.*, 2009) sowie der zunehmenden globalen Bevölkerungsmobilität, dank der heutigen modernen Transportmittel, ist es mehr denn je wichtiger, nicht nur die Übertragungswege der pathogenen Mikroorganismen, sondern auch ihre Infektions- und Pathogenitätsmechanismen zu erforschen, um effektive Strategien zum Schutz und zur Behandlung der Menschen gegen Krankheitserreger zu finden.

A.2 Enteropathogene Erreger

In einem gesunden Organismus und unter normalen physiologischen Umständen besteht ein ökologisches Gleichgewicht zwischen der mikrobiologischen Flora (z.B. Haut- und Darmflora) und dem Wirt. Dieses Gleichgewicht basiert auf einer ausgewogenen Menge an kommensalen Mikroorganismen und dem intakten physiologischen Habitat im Körper (z.B. bronchiale und intestinale Mukosa) (Berg, 1999; Hooper *et al.*, 2001; O'Hara and Shanahan, 2006). Dabei kann die Mikroflora des Darmes viele günstige Effekte auf den Wirt haben (Roediger, 1980; Berg, 1999). Eine wichtige protektive Funktion der normalen physiologischen Darmflora ist das Besiedeln durch exogene Bakterien (z.B. durch kontaminierte Lebensmittel oder Wasser) zu verhindern (Klaasen *et al.*, 1993; Bry *et al.*, 1996), was als Kolonisierungs-Resistenz bezeichnet wird (van der Waaij *et al.*, 1971). Eine Störung der Mikroflora (z.B. durch Antibiotika) erhöht dramatisch die Prädisposition für enteritische Infektionen von invasiven, enteropathogenen Mikroorganismen, wie *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* oder *Yersinia*. Dabei werden die enteropathogenen Erreger meist durch kontaminierte Nahrungsmittel oder Wasser durch mangelnde Hygiene verbreitet. In Deutschland gehören die oben genannten enteropathogenen Mikroorganismen zu den meldepflichtigen Krankheitserregern des Infektionsschutzgesetzes (§6 bzw. §7). In

Tab. 1 wird die Anzahl der gemeldeten Infektionskrankheiten, ausgelöst durch invasive enteropathogene Erreger, der letzten beiden Jahre in Deutschland angegeben. Die Anzahl der wirklichen Fälle, ist wahrscheinlich um ein 10-faches höher als die, die durch das Robert Koch Institut (RKI) registriert wird.

Tab. 1: Anzahl gemeldeter Infektionen in Deutschland (RKI: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch)

Erreger	Anzahl der gemeldeten Erkrankungen	
	2008	2009
<i>Campylobacter</i> -Enteritis	64.742	62.789
Salmonellose	42.921	31.397
<i>E. coli</i> -Enteritis	7.002	6.224
Yersiniose	4.352	3.731
Shigellose	574	617

A.3 Die Gattung *Yersinia*

Während der letzten großen Pestpandemie Ende des 19. Jahrhunderts, gelang es dem schweizerisch-französischen Arzt und Bakteriologen, Alexandre John Yersin, 1894 in Hongkong den Pesterreger aus befallenen Lymphknoten (Bubonen) von Pesttoten zu isolieren und die erste Reinkultur anzuzüchten (Yersin, 1994; Perry and Fetherston, 1997). Ursprünglich als *Pasteurella pestis* bezeichnet, schlug Frederiksen 1964 aufgrund der Ergebnisse biochemischer Vergleichsstudien an verschiedenen Stämmen, die Schaffung einer eigenen Gattung vor, die dem Entdecker zu Ehren „*Yersinia*“ genannt wurde (Frederiksen, 1964). 1974 wurde diese in der Familie der *Enterobacteriaceae* eingeordnet, zu der auch *Escherichia*, *Salmonella* und *Shigella* gehören. Die Gattung *Yersinia* umfasst acht apathogene *Yersinia*-Arten, die früher als *Y. enterocolitica*-ähnliche Bakterien bezeichnet wurden, und drei humanpathogene Arten (s. Tab. 2), die sowohl für Menschen als auch für Tiere von Bedeutung sind (Brenner, 1979; Cornelis *et al.*, 1987a).

Tab. 2: Übersicht über bekannte *Yersinia*-Arten

Humanpathogene Arten	Apathogene Arten	
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia aldovae</i>	<i>Yersinia kristensenii</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia bercovieri</i>	<i>Yersinia mollaretii</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia frederiksenii</i>	<i>Yersinia rohdei</i>
	<i>Yersinia intermedia</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>

Pathogene Yersinien dringen in eukaryotische Wirtszellen ein, überleben und vermehren sich aber im Wirt extrazellulär, im Gegensatz zu den intrazellulären Shigellen und Salmonellen.

Allen pathogenen *Yersinia*-Arten ist das Vorhandensein eines Virulenzplasmids gemein, das essentiell für die Pathogenität ist. Dieses sogenannte pYV-Plasmid (*Yersinia Virulence*) kodiert für eine Vielzahl von Virulenzfaktoren (Cornelis *et al.*, 1989; Straley *et al.*, 1993). Pathogene Yersinien unterscheiden sich von apathogenen durch den Besitz dieses Plasmids, welches unter den humanpathogenen Yersinien konserviert ist.

Im Wesentlichen werden von dem pYV-Plasmid, Gene für zwei wichtige Proteinklassen exprimiert, die *Yersinia* dazu befähigt, Immunabwehrmechanismen (professionelle Phagozytose, Komplementlyse u.a.) zu unterlaufen und sich im Gewebe extrazellulär vermehren zu können. Zum einen handelt es sich um Proteine, die den TypIII-Sekretions- und Translokationsapparat (T3SS) aufbauen und somit die Sekretion und Translokation der zweiten Gruppe von Proteinen, sogenannte Effektorproteine, in die Wirtszelle ermöglichen, welche dort zelluläre Signalkaskaden modulieren (Cornelis, 1998).

Der Erreger der Pest (*Y. pestis*) wird bei der klassischen Infektion durch den Biss des Rattenfloh (*Xenopsylla cheopis*) übertragen (Cavanaugh, 1971). Die Vermehrung der Keime findet in den regionären Lymphknoten statt und führt zur Ausbildung sogenannter Bubonen (gr. bubon = Unterleib; bezeichnet ursprünglich die entzündliche Schwellung von Leistenlymphknoten) mit dem klinischen Bild der Beulenpest. Von diesen Herden kann der Erreger in den Blutkreislauf gelangen, was eine Bakteriämie verursacht. Das Fortschreiten der Infektion führt zu einem Organbefall (z.B. Leber und Milz). Eine Besiedelung der Erreger kann auch in der Lunge erfolgen, was zur Lungenpest führt und somit eine Übertragung durch hoch infektiöse Tröpfchen ermöglicht.

Neben *Y. pestis*, als dem Erreger der Beulen- oder Lungenpest, sind auch die beiden enteropathogenen Arten *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, typische Zoonoseerreger, die in der Natur und vor allem in tierischen Reservoirs weit verbreitet sind. Dabei haben letztere als Krankheitserreger erst in den letzten 30 Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. *Y. pseudotuberculosis* ist primär ein tierischer Erreger, der bei Nagetieren eine Pseudotuberkulose hervorruft, und im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* selten beim Menschen nachgewiesen wird.

A.4 *Yersinia enterocolitica*

A.4.1 Eigenschaften und Vorkommen

Y. enterocolitica ist ein pleomorphes, gram-negatives Stäbchen, das ubiquitär verbreitet ist. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 27°C und 30°C. Sie können sich jedoch aufgrund ihrer Psychrotoleranz auch in einem Temperaturbereich von 4°C bis 43°C fakultativ aerob vermehren. Im Unterschied zu *Y. pestis* sind die enteropathogenen Yersinien unter Anzuchtbedingung unter 30°C, peritrich begeißelt und beweglich (Miller *et al.*, 1988).

Die Spezies *Y. enterocolitica* ist heterogen und umfasst pathogene und apathogene Varianten, die biochemisch und serologisch differenziert werden. Anhand ihrer unterschiedlichen Fähigkeiten, bestimmte Stoffe zu verstoffwechseln (Verstoffwechsellung verschiedener Zucker, Decarboxylierung von Ornithin, Citratverwertung, Voges-Proskauer-Reaktion und Indolbildung) kann eine Differenzierung in sechs Biotypen vorgenommen werden: 1A, 1B, 2, 3, 4 und 5 (Wauters *et al.*, 1987), wobei der Biotyp 1A lange Zeit als apathogen galt, inzwischen aber zunehmend auch als Enteritis-Erreger erkannt wird (Burnens *et al.*, 1996). Dem Biotyp 1B werden humanpathogene Stämme, die vor allem in den USA auftreten, zugeordnet. Die anderen vier, in Europa vorkommende pathogene Stämme, sind in der Regel den Biotypen 2, 3, 4 und 5 zuzuordnen. Innerhalb der Biotypen von *Y. enterocolitica* existieren zahlreiche Serotypen, welche überwiegend anhand der O-Antigene (Bestandteil der Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterienmembran) unterteilt werden. Bisher wurden bei *Y. enterocolitica* 28 Serotypen identifiziert, die sich durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Lipopolysaccharide unterscheiden (Aleksic and Bockemuhl, 1990). Das Vorkommen der Serogruppen kann geographisch eingeteilt werden. Während in Europa vorwiegend Infektionen mit den Serotypen O:3, O:5,27 und O:9 beobachtet werden (Calos and Miller, 1980), sind in den USA vornehmlich die Serotypen O:4,32 O:8, O:13, O:20 und O:21 vorzufinden (Bottone, 1977). Der in Deutschland vorherrschende Serotyp O:3 konnte lange Zeit nur in Europa nachgewiesen werden. Inzwischen wurde aber eine starke Zunahme des Serotyps O:3 auch in den USA festgestellt (Lee *et al.*, 1990; Bissett *et al.*, 1990; Blumberg *et al.*, 1991). *Y. enterocolitica* O:8 Biovar 1B ist in den USA endemisch und wird dort häufig als Erreger intestinaler Yersiniosen nachgewiesen. Dieser ist für die Maus virulenter als Serovar O:3 (Heesemann, 2001). Dabei ist zu erwähnen, dass die O-Antigene nicht Spezies-spezifisch sind, d.h. sie können bei

verschiedenen *Yersinia*-Arten vorkommen. Deshalb sollte die Pathogenität von Isolaten immer auf dem Serotyp und dem Biotyp basieren (Aleksic, 1995).

A.4.2 Verbreitung und klinisches Bild der Yersiniose

Obwohl beide enteropathogene *Yersinia*-Arten vor allem über kontaminierte Lebensmittel übertragen werden und deshalb als Lebensmittelinfektion verursachende Bakterien (engl.: "foodborne"-bacteria) bezeichnet werden, ist die Prävalenz von *Y. enterocolitica* um ein vielfaches höher als die von *Y. pseudotuberculosis*. Die Infektion von Mensch und Tier durch *Yersinia enterocolitica* erfolgt überwiegend oral-alimentär und wird, neben verunreinigtem Wasser oder Milch (Cover and Aber, 1989; Aleksic and Bockemuhl, 1990) primär durch kontaminiertes Schweinefleisch bzw. -zungen und -innereien (Tauxe *et al.*, 1987; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2001), verursacht. Auch über infizierte Blutkonserven können die Keime indirekt übertragen werden und eine Yersinien-Sepsis verursachen, die weitaus gefährlicher als die alimentäre Form sein kann (Jacobs *et al.*, 1989; Aber, 1990). Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist ebenfalls möglich (Strobel *et al.*, 2000). Nach 7 bis 10 Tagen Inkubationszeit kommt es zu dem klinischen Bild der Yersiniose (Hoogkamp-Korstanje and de, 1990; Bottone, 1997). Diese kann sich in verschiedenen Symptomen äußern, wie akute Enteritis (Bauchschmerzen, Fieber, wässriger Durchfall, Erbrechen u.a.), Pseudoappendizitis (auch mesenteriale Lymphadenitis genannt = Schwellung der Lymphknoten), Ileitis ("Pseudo-Crohn" = Dünndarmentzündung) und Enterokolitis (Entzündung des Dün- und Dickdarms). In der Regel verläuft die Yersiniose meist selbstlimitierend, kann aber in seltenen Fällen bei Patienten mit einer Grunderkrankung (z.B. Diabetes mellitus, Leberzirrhose) zu septischen Infektionen mit Leberabszessen, Endokarditis oder Osteomyelitis (Knochenentzündung) führen (Rabson *et al.*, 1975). Der schwere septikämische Verlauf wird vor allem bei Patienten mit einer Immunsuppression beschrieben. Als sekundäre immunpathologische Folgeerkrankungen können extraabdominale Symptome, wie Arthritis, Arthralgien (Gelenkschmerzen), und das *Erythema nodosum* sowie andere Hauterscheinungen beobachtet werden (Dequeker *et al.*, 1980). Die Yersiniose ist einer der häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen in Deutschland und gehört seit 2001 nach §7 des Infektionsschutzgesetzes zu den meldepflichtigen Erkrankungen (s. Tab. 1).

A.5 Wirt-Erreger-Interaktionen

Eine Infektion setzt eine Reihe von Mechanismen voraus, die ein Erreger an einer Wirtszelle durchführt. Das Anheften (Adhäsion) ist der erste Schritt, der das Eindringen (Invasion) ermöglicht, eine Ansiedlung (Kontamination) und Wachstum des Erregers nach sich zieht und letztendlich in einer Vermehrung und Ausbreitung (Organotropie) der Mikroorganismen in einem Makroorganismus mündet. Um dies alles bewerkstelligen zu können, haben pathogene Mikroorganismen zahlreiche Virulenzfaktoren, wie Adhäsine (Hagberg *et al.*, 1981; Hoiczky *et al.*, 2000), Invasionsfaktoren (Sansonetti *et al.*, 1982; Kuhn and Goebel, 1995), Effektorproteine (Menard *et al.*, 1996; Galan, 1996; Cornelis and Wolf-Watz, 1997), Toxine (Pai and Mors, 1978; Guarino *et al.*, 1987; Delor *et al.*, 1990; Delor and Cornelis, 1992) oder Eisentransportsysteme (Perry and Brubaker, 1979; Williams, 1979; Haag *et al.*, 1993), die es ihnen ermöglichen den Wirtsorganismus erfolgreich zu kolonisieren.

A.6 Verteidigungsmechanismen des Wirtes

Das Immunsystem ist ein dynamisches und komplexes System, das das Ziel verfolgt, den Wirtsorganismus von pathogenen Organismen und Krebszellen zu befreien (Lippolis, 2008). Die schädlichen Effekte mikrobieller Infektionen werden von einer Reihe von Verteidigungsmechanismen des Wirtes bekämpft. Dabei gibt es in höheren Vertebraten zwei Klassen von Verteidigungsstrategien: die angeborene und die erworbene Immunität (s. Abb. 1).

Anders als die erworbene Abwehr, ist die angeborene eine phylogenetisch konservierte Immunität, die in allen mehrzelligen Organismen vorzufinden ist (Kabelitz and Medzhitov, 2007). Sie ist kein einheitliches System, sondern ein Kollektiv von bestimmten Subsystemen und Barrieren, die verschiedene Funktionen in der Wirtsabwehr innehaben. Dazu zählen mechanische und physiologische Barrieren wie Haut und Mukosa, aber auch die zellvermittelte Gegenwehr durch Phagozytose (durch Makrophagen, Granulozyten und Monozyten). Dabei sind entzündliche Reaktionen (hervorgerufen durch Zytokine) genauso ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems, wie auch das Komplementsystem (zuständig für Inaktivierung und Opsonierung von Toxinen und Erregern), sowie die antimikrobiellen Proteine (wie Defensine, Cathelicidine und Lysozym). Damit stellt die angeborene Immunität die erste Verteidigungslinie gegen die Invasion von Erregern dar. Eine wesentliche Rolle bei der Erkennung von Erregern spielen dabei zellspezifische Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, sogenannte PRRs (Pattern Recognition Receptors), die hoch-konservierte Strukturen vieler Mikroorganismen, sog. PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) erkennen. Zu diesen Rezeptoren gehören u.a. C-

Typ Lektin Rezeptoren (CLRs), sowie Toll-like Rezeptoren (TLRs). Diese erkennen Moleküle mikrobiellen Ursprungs, wie Lipopolysaccachride, Peptidoglykan, Lipoteichonsäuren und Zellwand-Lipoproteine sowie nicht-methylierte Cytidin-Guanin-Dinukleotide (CpG) in einem bestimmten Sequenzkontext mikrobieller DNA.

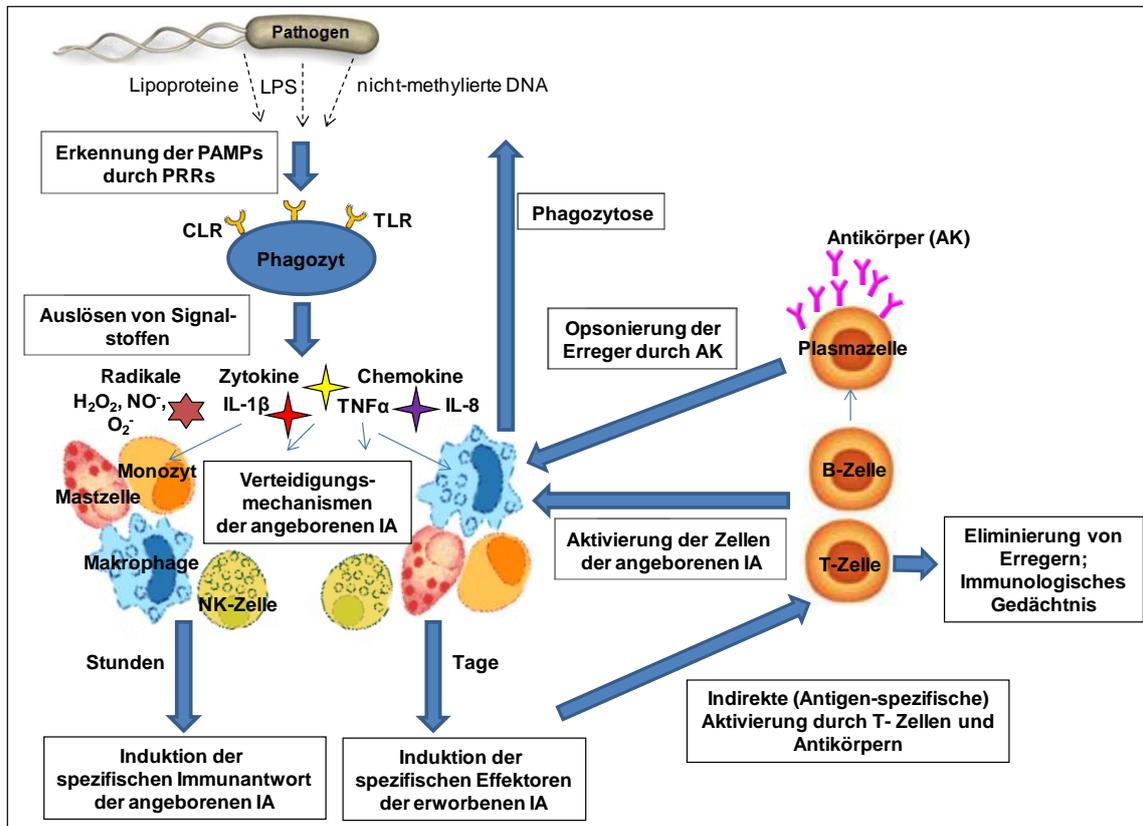


Abb. 1: Aktivierung der Wirtsabwehr (mod. nach Medzhitov, 2007)

Die Wirtsabwehr gegen pathogene Mikroorganismen erfordert eine Koordination von verschiedenen Immunabwehrwegen. Diese Wege werden ausgelöst durch das Erkennen von PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) durch PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) der angeborenen Immunabwehr (IA). Dies löst wiederum eine Entzündungsreaktion aus, wodurch Leukozyten an den Infektionsherd rekrutiert werden, die z.B. antimikrobielle Effektoren produzieren, um entweder direkt die pathogenen Erreger unschädlich zu machen oder die Immunantwort der erworbenen Immunabwehr (IA) induziert wird. Die T-Zellen und B-Zellen werden Antigen-spezifisch aktiviert. Plasmazellen produzieren Antikörper, die die Mikroorganismen oder ihre Toxine opsonieren und so zu deren Inaktivierung führen.

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität wird die erworbene Immunität durch Antigen-Rezeptoren vermittelt, die in einer klonalen Vielfalt auf T und B-Lymphozyten verteilt sind (B-Zell Rezeptoren und T-Zell Rezeptoren), um auf die ständige Variabilität der Pathogene reagieren zu können. Außerdem bildet das adaptive Immunsystem die Grundlage für das immunologische Langzeit-Gedächtnis. Die adaptive Abwehr ist die spezifische Antwort auf ein Antigen, das in den meisten Fällen erst durch Zellen der angeborenen Immunabwehr (wie Makrophagen und DCs) prozessiert und präsentiert werden soll. Aktivierte T-Helfer-

Zellen stimulieren ihrerseits die Phagozytose- und Antigenpräsentationsaktivitäten der Makrophagen und dendritischer Zellen (DCs). Desweiteren opsonieren die von Plasmazellen-produzierten Antikörper die Erreger und erleichtern damit die Phagozytose durch Makrophagen. Damit bedingen sich beide Arme des Immunsystems (s. Abb. 1).

Erst durch ein gut koordiniertes Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunabwehr wird eine effektive Immunreaktion des Körpers ermöglicht (Borghans *et al.*, 1999). Dabei ist ein optimales Gleichgewicht zwischen der Sensitivität und der Intensität der Immunantwort wichtig, um eine spezifische und gerichtete Eliminierung von gefährlichen Mikroorganismen und Krebszellen zu ermöglichen, ohne dabei eigene Zellen oder Gewebe zu schädigen (Krishnamoorthy and Honn, 2006).

A.7 Evasionsmechanismen der Erreger

Um die Wirtsabwehr zu überwinden und eine lokal begrenzte Vermehrung oder eine systemische Ausbreitung im Wirt zu ermöglichen, haben pathogene Bakterien eine Vielzahl von Virulenzfaktoren evolviert, die in die Umgebung abgegeben oder in die Wirtszelle injiziert werden. Viele Virulenzfaktoren sind oft auf mobilen genetischen Elementen kodiert, wie Plasmide und genomische Inseln, um innerhalb oder zwischen verschiedenen Bakterien-Arten übertragen werden zu können (Hacker and Carniel, 2001). Je nach Nische, die pathogene Erreger besiedeln, haben Virulenzfaktoren eine breite Angriffspalette: Durchdringen der Oberflächenepithelien, Anlagern an Zelloberflächen und/oder der extrazellulären Matrix, Eindringen in intrazelluläre Kompartimente, Beschaffung von Eisen, Umgehung von Wirts-Abwehrmechanismen und die Übertragung auf einen anderen Wirt (Finlay and Falkow, 1997). Dies wird ermöglicht u.a. durch Toxine, hydrolytische Enzyme, extrazelluläre Polysaccharide, Pili, Adhäsine und andere Oberflächenstrukturen, sowie Sekretions- und Translokationssysteme, welche spezielle Effektorproteine direkt in die Wirtszelle befördern. In Abb. 2 werden Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* dargestellt, die für die Pathogenität essentiell sind. Auf einige dieser Virulenzfaktoren wird im folgenden Kapitel noch näher eingegangen.

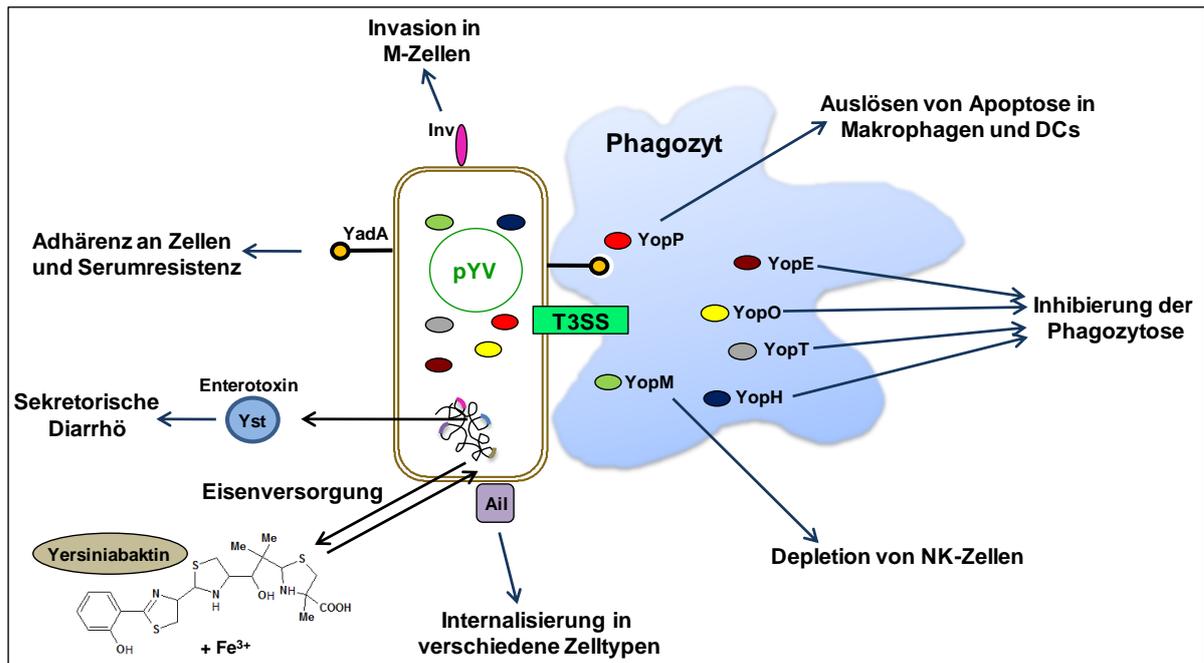


Abb. 2: Übersichtsabbildung der chromosomal und plasmidkodierte Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* und ihre Angriffsziele

Die chromosomal kodierte Virulenzfaktoren sind: Invasin (Inv), das Enterotoxin Yst, Ail (*Attachment invasion locus*) und das Siderophor Yersiniabaktin. Die pYV-Plasmid kodierte Virulenzfaktoren sind: das *Yersinia* Adhäsion YadA und die Yops (*Yersinia outer proteins*). Alle zusammen tragen zur Pathogenität von *Y. enterocolitica* bei (siehe Details im Text).

A.7.1 Protein-Sekretionssysteme gram-negativer Bakterien

Bakterien benutzen verschiedene Sekretionssysteme, um Proteine aus ihrem Zytoplasma in den extrazellulären Raum zu transportieren, in ihre Plasmamembran oder in die der Wirtszelle zu integrieren oder aber direkt ins Zytoplasma der Wirtszelle zu injizieren. Bei gram-negativen Bakterien müssen zwei Membranen (innere und äußere Membran) überwunden werden, um Substrate vom Zytoplasma nach außen zu befördern. Dabei kann der Sekretionsprozess in einem Schritt oder in zwei Schritten ablaufen. Im letzteren Fall können zwei Sekretionssysteme an dem Transport beteiligt sein, wobei das eine die Substrate ins Periplasma transportiert (über das *Secretion* (Sec)-System oder das *Twin-Arginine Translocation* (TAT)-Sekretionssystem), und das andere die Substrate schließlich über die äußere Membran in die extrazelluläre Umgebung oder direkt in die Zielzelle befördert.

Aufgrund ihrer Funktion und Transportwege werden in gram-negativen Bakterien mindestens sechs Hauptgruppen bakterieller Sekretionssysteme unterschieden (s. Abb. 3). Vier dieser Sekretionssysteme (TypII-, TypIV-, TypV- und Chaperone/Usher-Sekretionssysteme) stellen ein terminales Glied eines sogenannten generellen Sekretionsweges (GSP: *General*

Secretion Pathway) dar, bei dem der Transport über die innere Membran ins Periplasma vom Sec-System vollzogen wird (s. Abb. 3) (Henderson and Nataro, 2001; Sandkvist, 2001; Holland, 2004; Kostakioti *et al.*, 2005; Thanassi *et al.*, 2005).

Obwohl gram-positive Bakterien nur eine Membran besitzen, haben einige Spezies, namentlich die Mykobakterien eine Zellwand, die aus wachsartigen Substanzen und Mykolsäuren besteht. Aus diesem Grund kodieren die Genome dieser Bakterien-Spezies spezielle Sekretionssysteme, die in TypVII-Sekretionssysteme zusammengefasst werden (Abdallah *et al.*, 2007). In gram-positiven Bakterien und in *Archaea* werden das Sec- und das TAT-System dafür benutzt, um die Proteine über eine Plasmamembran zu sezernieren (Albers *et al.*, 2006), während in gram-negativen Bakterien die beiden Systeme für den Proteinexport in das Periplasma verantwortlich sind.

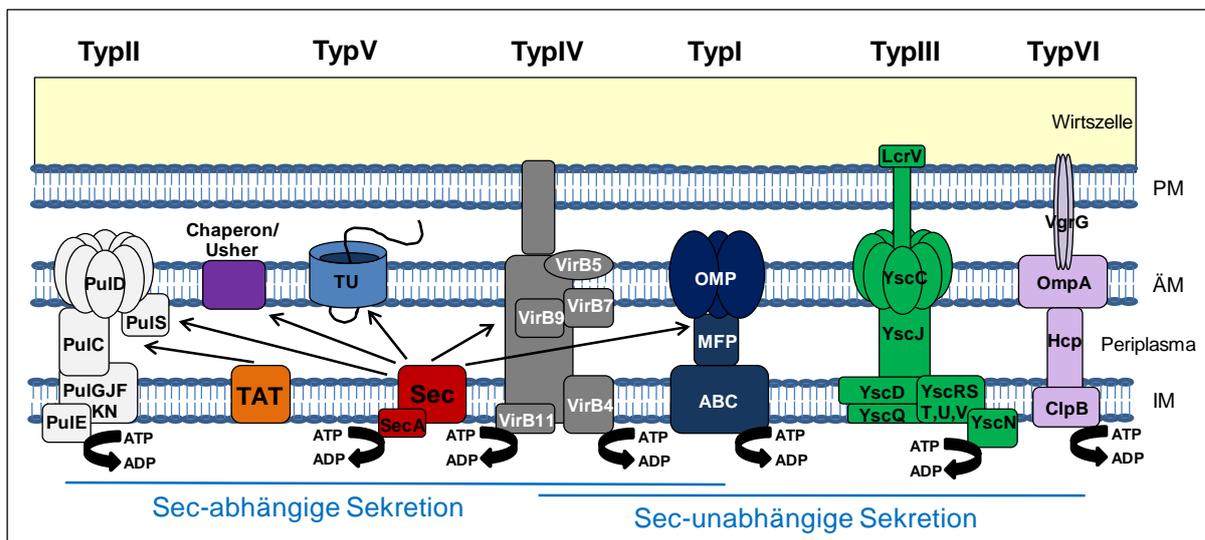


Abb. 3: Darstellung der Protein-Sekretionssysteme gram-negativer Bakterien (mod. nach Desvaux, 2004)

Drei der sechs Hauptgruppen bakterieller Sekretionssysteme (TypII, TypIV und TypV) sind abhängig vom Sec-System, welches Proteine über die innere Membran transportiert. Eine ähnliche Funktion kommt dem TAT-System zu, das vom T2SS benutzt wird. Die Sekretion von Proteinen durch das TypIV-System kann auch in vielen Fällen Sec-unabhängig erfolgen. In einigen Bakterien erfolgt der Transport für bestimmte Substrate über T1SS auch Sec-abhängig. Das komplexe TypIII-Sekretionssystem von pathogenen Bakterien transloziert hauptsächlich Effektorproteine direkt in die Wirtszelle. Das TypVI-Sekretionssystem ist noch weitgehend unerforscht. (Abkürzungen: ÄM: äußere bakterielle Membran; IM: innere bakterielle Membran; PM: Plasmamembran der Wirtszelle; TU: translocation unit; ABC: *ATP-binding cassette protein*; MFP: *membrane fusion protein*; OMP: *outer membrane channel-forming protein*). Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

Im folgenden Kapitel werden die Sekretionssysteme der gram-negativen Bakterien im Einzelnen beschrieben.

A.7.1.1 Typl-Sekretionssystem (T1SS)

Das Typl-Sekretionssystem kann in einem Sec-unabhängigen Mechanismus Toxine, Proteasen und Lipasen sekretieren (Holland *et al.*, 2005), was z.B. in *Pasteurella haemolytica* und in *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben wurde (Hueck, 1998). Es besteht aus drei Komponenten: einem ABC-Protein (ATP-Binding Cassette protein), dem MFP (Membrane Fusion Protein) und dem OMP (Outer Membrane channel-forming Protein) (Delepelaire, 2004; Holland *et al.*, 2005) (s. Abb. 3). Das MFP verbindet das OMP mit dem ABC und bildet einen transperiplasmatischen Kanal, der die äußere Membran durchdringt (Thanassi and Hultgren, 2000; Holland *et al.*, 2005). Damit wird der Transport über beide Membranen in einem Schritt ermöglicht (Holland *et al.*, 2005). Der Typl-Apparat ist ein rein sekretorisches System, bei dem die sekretierten Enzyme in den extrazellulären Raum transportiert werden. Der TolC-HlyD-HlyB-Komplex der uropathogenen *E. coli* ist ein gut beschriebenes Beispiel für das T1SS. Dabei wird das hämolytische Toxin, HlyA, sekretiert (Uhlen *et al.*, 2000). Kürzlich wurde auch eine Sec-abhängige Typl-Sekretion für Dispersin, einem Oberflächenprotein von enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) beschrieben. Dispersin wird zunächst Sec-abhängig ins Periplasma transportiert, bevor es über die MFP- und OMP-Komponenten des T1SS an die Bakterienoberfläche sekretiert wird (Nishi *et al.*, 2003).

A.7.1.2 TyplI-Sekretionssystem (T2SS)

Der Mechanismus des T2SS wurde anhand der Pullulanase (Pul)-Sekretion von *Klebsiella oxytoca* gut beschrieben und stellt einen Sec-abhängiger Mechanismus dar (s. Abb. 3). Er wurde als genereller Sekretionsweg (General Secretion Pathway, GSP) bezeichnet (Pugsley, 1993), da er bei allen lebenden Organismen gefunden wurde und eine Vielzahl von Proteinen transportiert (Cao and Saier, Jr., 2003). Die über dieses System exportierten bzw. sekretierten Proteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz, die während des Transportes über die Zytoplasmamembran von einer Signalpeptidase abgespalten wird. Danach faltet sich das Protein im Periplasma in seine aktive Form (Lee and Schneewind, 2001). Für den Transport von Proteinen über das TyplI-Sekretionssystem sind neben Membranproteinen, eine an die Zytoplasmamembran assoziierte ATPase und Chaperone erforderlich (Sandkvist, 2001). Die wichtigen Bestandteile des Sec-Systems wurden anhand der Translokase von *E. coli* identifiziert. Diese bestehen aus einem heterotrimeren Proteinkomplex (SecYEG), der in der inneren Membran integriert ist, der zytoplasmatischen ATPase (SecA) und einigen Hilfsproteinen (Benach *et al.*, 2003). Virulenzfaktoren, die via T2SS sekretiert werden, sind z.B. das ADP-ribosylierende Toxin von *E. coli* oder das Cholera toxin von *Vibrio cholerae* (Cianciotto, 2005).

A.7.1.3 TypIII-Sekretionssystem (T3SS)

Die Translokation durch das TypIII-Sekretionssystem erfolgt Sec-unabhängig und erlaubt die Sekretion von zytoplasmatisch synthetisierten Proteinen in einem Schritt (ohne eine Zwischenstufe im Periplasma) über beide bakterielle Membranen (Hueck, 1998) (s. Abb. 3). Aber anders als das T1SS, das die Proteine nur in den extrazellulären Raum transportiert, transloziert das TypIII-Sekretionssystem darüber hinaus Virulenzfaktoren direkt in das Zytosol eukaryotischer Zellen (Tampakaki *et al.*, 2004; Mota and Cornelis, 2005; Yip *et al.*, 2005; Cornelis, 2006). In den meisten Fällen sind die T3SS-Gene entweder auf Pathogenitätsinseln (z.B. SPI bei *S. typhimurium*) oder auf Plasmiden (z.B. Virulenzplasmid von *S. flexneri* und pathogener Yersinien) kodiert (Gophna *et al.*, 2003). Die Maschinerie des T3SS wird als Injektisom bezeichnet und ist zu dem Flagellen-Syntheseapparat homolog, was auf einen gemeinsamen Ursprung schließen lässt (Nguyen *et al.*, 2000; Cianciotto, 2005; Cornelis, 2006). Der T3S-Apparat zeigt einen sehr komplexen Aufbau (schematisch anhand des Injektisoms von Yersinien in Abb. 3 gezeigt) und setzt sich aus mindestens 25 verschiedenen Proteinuntereinheiten zusammen, wobei die meisten in der inneren Membran lokalisiert sind (Hueck, 1998; Cianciotto, 2005). Diese bilden eine Reihe von Basalringen, die die innere und äußere Membran durchspannen und in einer Art Injektionsnadel enden (Cornelis, 2006; Blocker *et al.*, 2008). Der Mechanismus, mit dessen Hilfe die Substrate von dem T3S-Apparat erkannt werden ist immer noch nicht geklärt. Im Allgemeinen werden zwei mögliche Mechanismen vorgeschlagen: (1) Die Erkennung und Rekrutierung der T3SS-Substrate nach ihrer Translation über ihre N-terminale Signalsequenz, oder (2) auf RNA-Ebene während der Translation über mRNA-Signale (Ramamurthi and Schneewind, 2003a; Ramamurthi and Schneewind, 2003b). Wobei neuere Studien eher das erstere Modell favorisieren (Cornelis, 2002a; Karavolos *et al.*, 2005). Ferner sind Chaperone beim Sekretionsprozess von vielen Effektorproteinen beteiligt. Diese dienen nicht nur zur Faltung bzw. Entfaltung der Effektoren, um durch den Sekretionsapparat passieren zu können, sondern könnten auch an der Erkennung der Effektoren als Substrat für den Sekretionsapparat beteiligt sein (Ghosh, 2004). Bei *Shigella* z.B. bilden die *mxi*- und *spa*-Genprodukte einen TypIII-Sekretionsapparat, über den die *ipa*-Genprodukte ins extrazelluläre Medium abgegeben werden (Bahrani *et al.*, 1997). Dabei wird die Translokation von Ipa-Proteinen durch den Kontakt des Bakteriums mit Epithelzellen induziert (Menard *et al.*, 1994; Watarai *et al.*, 1995). Das T3SS von Yersinien wird in einem separaten Kapitel eingehend beschrieben.

A.7.1.4 TypIV-Sekretionssystem (T4SS)

Im Vergleich zu anderen Sekretionssystemen ist das T4SS einzigartig in der Fähigkeit DNA zusammen mit Proteinen in Wirtszellen zu translozieren (Winans *et al.*, 1996; Christie and Cascales, 2005). Dabei sind T4SS in der Lage, verschiedene DNA-Protein-Komplexe in anderen Bakterienzellen, in Hefe, Pflanzen oder in das externe Medium zu transportieren (Hamilton *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Das VirB-System der Agrobakterien (z.B. *A. tumefaciens*) besitzt die Fähigkeit, T-DNA in pflanzliche Zellen zu transferieren, was in einem krebsartigen Wachstum mündet. Dabei kann das IncQ Plasmid RSF1010 sowohl in pflanzliche als auch in andere bakterielle Zellen vermitteln (Bohne *et al.*, 1998). Mehrere VirB-Proteine bilden hier einen großen Komplex, der das Periplasma durchspannt (s. Abb. 3). Viele pathogene Organismen haben ein homologes VirB-Sekretionssystem, wie *Helicobacter pylori* (CAG, ComB), *Pseudomonas aeruginosa* (TraS/TraB), *E. coli* (Tra) und *Bordetella pertussis* (Ptl) (Finlay and Falkow, 1997; Fischer *et al.*, 2002; Hubber *et al.*, 2007). Obwohl diese Systeme funktionelle Ähnlichkeiten besitzen, haben sie nicht alle dieselbe Gen-Ausstattung (Saier, Jr., 2006). Der Export von DNA über das T4SS durch die VirB und Konjugationssysteme erfolgt meist in einem Schritt vom Zytoplasma in die Umwelt, während der Export des Pertussis-Toxins von *B. pertussis*, in zwei Schritten vollzogen wird (Winans *et al.*, 1996). Nachdem das Protein über die innere Membran mittels Sec-System transportiert wurde, faltet es sich im Periplasma und gelangt dann über den TypIV-Komplex und dem äußeren Pilus nach außen.

A.7.1.5 TypV-Sekretionssystem (T5SS)

Eine sehr große Anzahl von Proteinen werden über den TypV-Sekretionsmechanismus sekretiert (Henderson *et al.*, 1998; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004; Dautin and Bernstein, 2007). Die meisten sekretierten Proteine sind Virulenzfaktoren von pathogenen Erregern (Henderson *et al.*, 2004). Da die Substrate in den meisten Fällen ihren eigenen Transport bewerkstelligen, wurden sie als Autotransporter bezeichnet. Sie zeichnen sich durch vier gemeinsame Charakteristika aus: einer Signalsequenz am N-Terminus, einer Passagier-Domäne, einer Binder-Region (*linker*) und der C-terminalen β -Domäne (Henderson *et al.*, 1998). Die Signalsequenz dient der Erkennung durch das Sec-System, welches das Protein (Autotransporter) ins Periplasma transportiert (s. Abb. 3). Anschließend wird die Signalsequenz abgespalten und die β -Domäne baut sich in die äußere Membran ein und bildet β -Barrel-Strukturen (TU= *translocation unit*), die eine Pore formen. Durch die Pore wird nun die Passagier-Domäne geschleust und gelangt so an die Oberfläche des Bakteriums

(Henderson *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 2004). Proteine, die über das T5SS sekretiert werden, sind Adhäsine, wie das AIDA-I und Ag43 von *E. coli*, Hia von *Haemophilus influenzae* oder das YadA von *Y. enterocolitica*. Toxine, wie das VacA von *H. pylori* und Proteasen wie das IgA von *Neisseria gonorrhoeae* werden ebenfalls von dem Autotransporter in den extrazellulären Raum befördert.

A.7.1.6 TypVI-Sekretionssystem (T6SS)

Als letztes wurde die T6SS-Maschinerie beschrieben, dass auch ein Injektisom ausbildet (Pukatzki *et al.*, 2007) mit dem es, wie die T3S- und T4S-Apparate, Effektorproteine direkt in das Zytoplasma von Wirtszellen injizieren kann (Bingle *et al.*, 2008; Shrivastava and Mande, 2008; Cascales, 2008; Filloux *et al.*, 2008) (s. Abb. 3). Bevor es im Jahr 2006 als Sekretionssystem erkannt wurde, wurde es auf Pathogenitätsinseln von gram-negativen Bakterien identifiziert. Es stellte sich heraus, dass mehr als $\frac{1}{4}$ der sequenzierten bakteriellen Genome Gene für das T6SS enthalten. Das TypVI-Sekretionssystem wird für die Virulenz für Humanpathogene, wie *V. cholerae* und *P. aeruginosa* (Ma *et al.*, 2009), als auch für Pflanzenpathogene, wie *Pectobacterium atrosepticum* und *A. tumefaciens*, benötigt (Liu *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008). Der erste Nachweis, dass T6SS lösliche Effektorproteine sekretiert, lieferten Arbeiten an dem Pflanzenerreger *Rhizobium leguminosarum*. Demnach benutzen diese Bakterien das T6SS, um das Protein RbsB zu sekretieren (Bladergroen *et al.*, 2003). In zahlreichen gram-negativen Bakterien, die das T6SS besitzen, konnten homologe Proteine zu RbsB identifiziert werden, wie z.B. in einigen *Vibrio*-Spezies, in *A. tumefaciens* und *Aeromonas hydrophila* (Pukatzki *et al.*, 2009). Dabei sind RbsB-Proteine in verschiedenen biologischen Prozessen involviert, wie Stickstoff-Fixierung, Ribose-Aufnahme und Chemotaxis (Pukatzki *et al.*, 2009).

A.7.1.7 Chaperon/Usher-Sekretionssystem

Das Chaperon/Usher-Sekretionssystem ist ein terminaler Zweig des generellen Sekretionsweges (GSP) (s. Abb. 3). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Biogenese von Fimbrien (Pili) in Bakterien, wie z.B. die P- und Typ1-Pili von pathogenen *E. coli*. Das Operon, welches für die Fimbrienbiogenese kodiert, enthält auch Gene für spezifische Chaperone und sog. „Usher“-Proteine (engl. für „Platzanweiser-Proteine“). Diese „Usher“-Proteine enthalten eine zentrale Domäne, die als β -Stränge in die äußere Membran inseriert sind und eine Pore bilden. Mittels des Sec-Systems werden nun die Pili-Untereinheiten durch die innere Membran transportiert. Im Periplasma angelangt werden sie von ihren spezifischen Chaperonen gebunden, welche die frühzeitige Assemblierung der Pili im Periplasma

verhindert. Die anschließende Interaktion zwischen den Chaperonen und „Usher“-Proteinen führt zur Freisetzung der Pili-Untereinheiten, die durch die Poren-bildenden „Usher“-Proteine an die Bakterienoberfläche gelangen, wo sie schließlich zu gereiften Pili assemblieren (Thanassi *et al.*, 1998; Thanassi and Hultgren, 2000; Sauer *et al.*, 2004; Saier, Jr., 2006).

A.7.1.8 Twin-Arginine-System (TAT)

Neben dem Sec-System, ermöglicht das sog. TAT-System (*Twin-Arginine Translocation*) einen alternativen Mechanismus für den Transport von Proteinen ins Periplasma (Muller, 2005) (s. Abb. 3). Aber im Unterschied zum Sec-System, welches auf Proteine mit einer sehr geringen Strukturierung beschränkt ist (Pugsley, 1993), vermag das TAT-System vollständig gefaltete Proteine über die innere Membran zu transportieren (Berks *et al.*, 2005). Die Maschinerie der TAT-Sekretion erkennt ein konserviertes und für den Transport wichtiges Sequenzmotiv, das namensgebende „*twinarginine*“-Motiv (S-R-R-x-F-L-K). In der Regel besteht es aus zwei benachbarten Arginin-Aminosäuren in der N-terminalen Region (Berks, 1996; Brink *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 2001; Hinsley *et al.*, 2001). Außerdem transportiert das TAT-System nur mittels Protonengradienten gefaltete Proteine, während das Sec-System zusätzlich zum Protonengradienten ATP hydrolysiert, um ungefaltete Proteine über die Zytoplasmamembran zu translozieren (Muller, 2005; Papanikou *et al.*, 2007).

A.8 Der TypIII-Sekretionsapparat bei *Yersinia*

Der Ysc (*Yop secretion*)-Apparat der Yersinien ist aus 25 Proteinen, einschließlich der Regulatorproteine aufgebaut, die von den vier nebeneinander liegenden Operons *virA*, *virB*, *virC* und *virG* auf dem pYV-Plasmid (*plasmid of Yersinia Virulence*) kodiert werden. Er besteht, wie bei den Salmonellen (Kubori *et al.*, 1998), aus einem zylinderartigen Basalkörper, der die Peptidoglykanschicht, sowie die innere und äußere Bakterienmembran durchdringt (Cornelis, 2002c) und einer externen nadelähnlichen Struktur, die aus der Bakterienoberfläche herausragt (Hoiczky and Blobel, 2001). Aufgrund dieser nadelähnlichen Struktur wird der Ysc-Apparat auch als Injektisom bezeichnet (s. Abb. 3 und Abb. 4). Der „Sockel“ des Ysc-Apparates wird wahrscheinlich von YscQ gebildet (Morita-Ishihara *et al.*, 2006). Als möglicher Energielieferant für die Yop-Sekretion fungiert YscN, eine ATPase (Woestyn *et al.*, 1994), die mit YscQ interagiert (Jackson and Plano, 2000). Der Basalkörper, der die Proteine vom Zytoplasma der Bakterien durch die Bakterienmembranen transportiert, lässt sich in einen internen Bereich (insetiert in der Zytoplasmamembran) und einen distalen Bereich, der die äußere Membran durchdringt, unterscheiden. Der interne Teil des

zylindrischen Körpers wird wahrscheinlich von den Proteinen YscD (Plano and Straley, 1995), YscR (Fields *et al.*, 1994), YscS, YscT, YscU (Allaoui *et al.*, 1994) und YscV (Plano and Straley, 1993) gebildet. Der distale Bereich wird durch Oligomerisierung des Proteins YscC (Sekretin) gebildet (Plano and Straley, 1993; Koster *et al.*, 1997). Den ganzen Apparat durchzieht ein etwa 2 nm breiter Kanal, durch den die Effektorproteine beim Kontakt mit der Wirtszelle transloziert werden. Den Abschluss des Ysc-Injektisoms bildet eine Nadel, die eine Länge von 60-80 nm hat und aus vielen Monomeren des YscF-Proteins aufgebaut wird (Hoiczuk and Blobel, 2001; Sun *et al.*, 2008). Auf der Spitze der Nadel befinden sich die Proteine, LcrV, YopB und YopD, die ebenfalls durch das T3SS sezerniert werden und für die Porenbildung in der eukaryotischen Zelle verantwortlich sind (Neyt and Cornelis, 1999; Tardy *et al.*, 1999; Marenne *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2005), wodurch Yop (*Yersinia outer protein*)-Effektorproteine schließlich ins Zytosol der Wirtszelle transloziert werden können (Cornelis, 2002b) (s. Abb. 4).

A.8.1 Sekretion und Translokation von Yop-Proteinen

Der Begriff Sekretion impliziert den Transport von Proteinen vom Inneren der Zelle ins extrazelluläre Medium. Translokation steht, im Allgemeinen, für den Transport von Proteinen durch biologische Membranen (Desvaux *et al.*, 2004). Der Einfachheit halber wird aber der Begriff Translokation für den Import von Proteinen mittels des T3SS über die Plasmamembran ins Zytosol der Wirtszelle, verwendet (Persson *et al.*, 1995). Im diesem letzteren Zusammenhang wird auch in dieser Arbeit der Begriff Translokation verwendet.

Die Yop-Sekretion kann *in vitro* ausgelöst werden, wenn Yersinien bei einer Temperatur von 37°C in einem Ca²⁺-freien Nährmedium kultiviert werden (Heesemann *et al.*, 1983; Heesemann *et al.*, 1986; Michiels *et al.*, 1990). Der Temperaturanstieg bewirkt die Expression von VirF als Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von *ysc* und *lcr* Genen induziert. Es wird angenommen, dass der Sekretionskanal des Ysc-Injektisoms in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen durch YopN, LcrG und TyeA verstopft ist (Forsberg *et al.*, 1991; Skrzypek and Straley, 1995; Iriarte *et al.*, 1998; Sarker *et al.*, 1998). Werden die Ca²⁺-Ionen chelatiert, wird YopN freigesetzt, sodass der Sekretionskanal geöffnet wird und die Yop-Proteine in den Kulturüberstand sezerniert werden. YopN spielt damit eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Translokation, indem es den Sekretionskanal solange unter Verschluss hält, bis das Bakterium an der Wirtszelle „angedockt“ hat (Forsberg *et al.*, 1991).

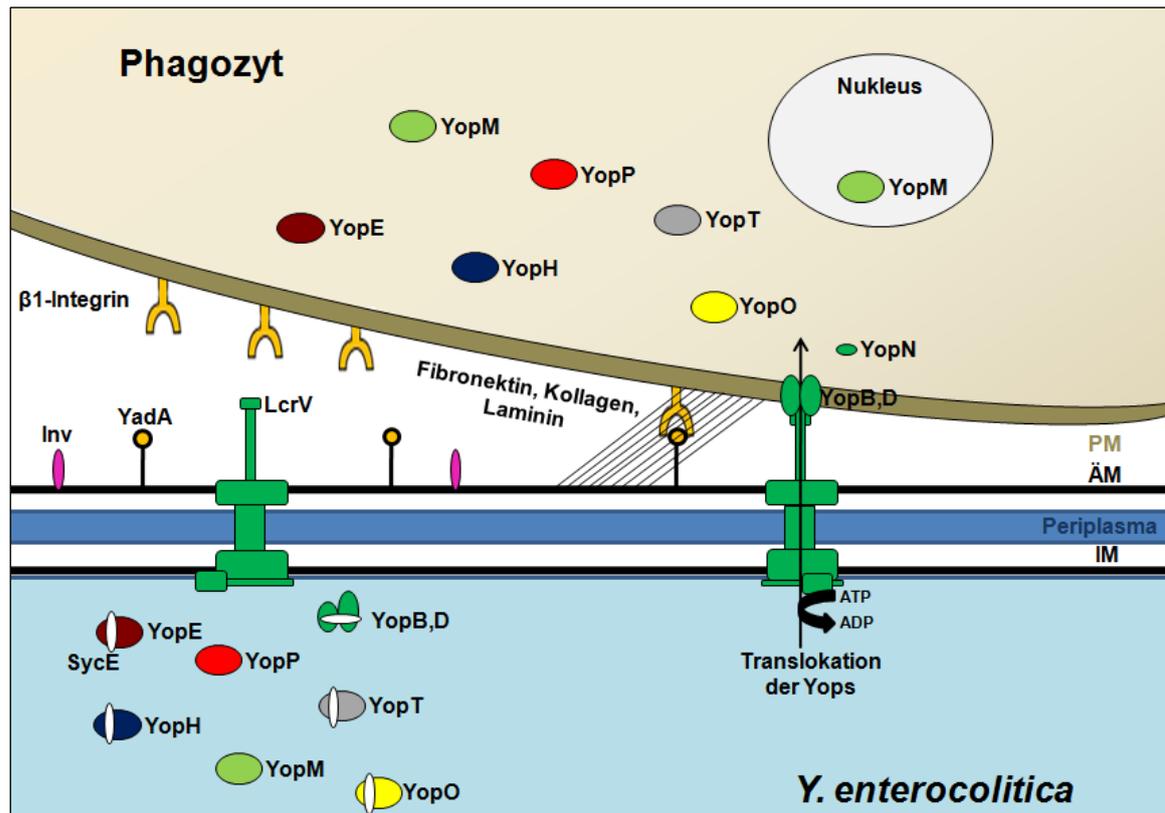


Abb. 4: Modell für die Translokation durch das Ysc-Injektisom (mod. nach Cornelis, 2006)

Bei 37°C wird das Ysc-Injektisom gebildet. Es durchspannt beide bakterielle Membranen (IM und ÄM), endet in einem Nadelkomplex an der Oberfläche und synthetisiert Yops, die vorher an ihr zugehöriges Chaperon im Zytosol der Bakterien akkumulierten. Bei Kontakt mit einer Wirtszelle kommt es zur Interaktion zwischen dem Adhäsion Inv und β1-Integrin, welches die Invasion vor allem in M-Zellen vermittelt. YadA interagiert mit Molekülen der extrazellulären Matrix (Kollagen, Fibronectin oder Laminin), welche die YadA-β1-Integrin-abhängige Invasion vermittelt. LcrV, YopB und YopD bilden eine Pore in der Plasmamembran (PM) der Wirtszelle. Dabei wird die Blockade durch YopN aufgehoben, sodass die Yops unter ATP-Hydrolyse von ihren Chaperonen entfernt werden und entfaltet durch den Injektisomskanal in das Zytosol der Wirtszelle transloziert werden.

Die Translokation von Yops hingegen findet nur dann statt, wenn *Yersinia* unter Vermittlung von Inv oder YadA, Kontakt mit der eukaryotischen Zelle aufnimmt (Rosqvist *et al.*, 1990; Cheng and Schneewind, 2000), wobei im Gegensatz zu YadA, das Vorhandensein von Inv nicht absolut notwendig ist (Persson *et al.*, 1995). Interessanterweise induziert der Kontakt der Yersinien mit der Wirtszelle eine gerichtete (polarisierte) Injektion der Yops ins Zytosol, d.h. die Sekretion und der Transfer von Yops findet nur an der Bakterium-Zell-Kontaktstelle statt (Rosqvist *et al.*, 1994; Pettersson *et al.*, 1996). Wie bei der Calcium-abhängigen Sekretion, spielen YopN, LcrG und TyeA eine wichtige Rolle auch bei der Regulation der gerichteten Translokation von Yops (Forsberg *et al.*, 1991; Iriarte *et al.*, 1998; Sarker *et al.*, 1998). Die Yops werden im entfalteten Zustand durch den Sekretionskanal in das Zytosol der Wirtszelle gebracht (Cornelis, 2002c; Aepfelbacher *et al.*, 2007; Trosky *et al.*, 2008) (s. Abb. 4). Einige Yop-Proteine benötigen für ihre Sekretion und Translokation die Mitwirkung ihrer

spezifischen, pYV-kodierten Chaperone. Mit Hilfe eines Mini-pYV Plasmids (pT3SS), welches nur die Gene des TypIII-Sekretionsapparates und YadA, nicht aber die Gene für Yops, enthält, konnte gezeigt werden, dass YopP und YopM keine Chaperone für ihre Sekretion und Translokation benötigen. Dagegen konnten YopE, YopT und YopH nur dann sekretiert und transloziert werden, wenn ihre jeweiligen Chaperone (SycE, SycT oder SycH) ebenfalls exprimiert wurden (Trulzsch *et al.*, 2003). Vor Kurzem wurde auch für das YopO das Chaperon, SycO, identifiziert (Letzelter *et al.*, 2006).

Für die Translokation sind LcrV und die beiden Translokatoren YopB und YopD essentiell (Hakansson *et al.*, 1996; Pettersson *et al.*, 1999; Tardy *et al.*, 1999; Fields *et al.*, 1999; Holmstrom *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass diese Proteine eine Pore bilden durch die die Effektoren in das Zytosol der Wirtszelle gelangen können (Neyt and Cornelis, 1999; Tardy *et al.*, 1999). YopB und YopD verfügen über hydrophobe Domänen, die eine Interaktion mit der Zellmembran von Wirtszellen vermuten lässt (Hakansson *et al.*, 1993; Cornelis, 2002b). Dabei sind bereits geringe Mengen an YopB und YopD ausreichend, um eine erfolgreiche Translokation von Yop-Proteinen zu gewährleisten (Edqvist *et al.*, 2007). Während YopB und YopD für die Porenbildung verantwortlich sind, sind mehrere LcrV-Moleküle an der Spitze der Nadel vermutlich nicht nur für deren korrekte Einlagerung in der Zielmembran wichtig (Cornelis and Wolf-Watz, 1997; Mueller *et al.*, 2005; Goure *et al.*, 2005), sondern auch für die Größe der Pore verantwortlich (Holmstrom *et al.*, 2001). Außerdem besitzt LcrV eine immunsuppressive Wirkung, indem es die Interleukin (IL)-10-Produktion induziert (Sing *et al.*, 2002; Heesemann *et al.*, 2006). Alle drei Proteine werden sowohl in das extrazelluläre Medium sezerniert als auch in eukaryotische Zellen transloziert (Lee and Schneewind, 1999; Lee *et al.*, 2000).

A.8.2 Die Yop-Effektorproteine

Die pathogenen Yersinien, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* verfügen über bislang sechs bekannte Yop-Effektorproteine YopE, YopH, YopM, YopO, YopP und YopT. Diese werden über das T3SS in die eukaryotische Zielzelle transloziert und ermöglichen den Yersinien die Wirtsabwehr zu unterdrücken. Dadurch können sie extrazellulär persistieren und sich vermehren (Galan and Bliska, 1996; Cornelis *et al.*, 1998). Infektionsversuche mit verschiedenen *yop*-Mutanten haben gezeigt, dass jedes Yop spezifische Funktionen an Zielmolekülen in der Wirtszelle erfüllt und alle Yop-Proteine, in einer synergistischen Art und Weise, eine erhöhte Resistenz gegen Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) und Makrophagen bewirken (Grosdent *et al.*, 2002; Heesemann *et al.*, 2006; Trosky *et al.*, 2008).

A.8.2.1 YopE

YopE ist ein 23 kDa großes Protein, mit einer N-terminalen TypIII-Sekretions-Signalsequenz, gefolgt von einer Chaperon-Bindungsdomäne, und einer C-terminalen Effektor-domäne. Das Chaperon SycE ist notwendig für die Sekretion und Translokation von YopE (Wattiau and Cornelis, 1993; Wattiau *et al.*, 1994). YopE induziert die Depolymerisierung der Aktin-Mikrofilamente und führt damit zur Zerstörung der Zytoskelettstruktur. Dies resultiert wiederum in einem Abrunden bzw. Ablösen der eukaryotischen Zellen von der extrazellulären Matrix und zur Abschwächung der Phagozytose-Fähigkeit der Zellen (Rosqvist *et al.*, 1990). YopE fungiert als GTPase aktivierendes Protein (GAP), welches die GTPase-Aktivität der Rho-GTPasen, insbesondere Rac1 und RhoG inaktiviert und somit diese Rho-GTPasen im GDP-Bindungszustand hält (Pawel-Rammigen *et al.*, 2000; Black and Bliska, 2000; Andor *et al.*, 2001; Aepfelbacher, 2004). Eine weitere Funktion von YopE liegt in der Regulierung der inflammatorischen Antwort gegenüber der *Yersinia*-Infektion (Schotte *et al.*, 2004). Die Deaktivierung von Rac1 durch YopE hat einen inhibitorischen Effekt auf Caspase-1, das wiederum für die Reifung von Pro-Interleukin-1 β in Makrophagen zuständig ist. IL-1 β ist ein wichtiges Zytokin, das einen zentralen Botenstoff in der Immunantwort darstellt. Noch ist YopE in seinen Wirkungen auf eukaryotische Zielmoleküle nicht vollständig aufgeklärt, sodass die Möglichkeit besteht, noch weitere Targets zu entdecken (Aili *et al.*, 2003).

A.8.2.2 YopH

YopH ist ein etwa 50 kDa großes Protein. Es enthält eine N-terminale TypIII-Sekretions-Signalsequenz (1-17 AS), eine Chaperon-Bindungsdomäne (18-70 AS) für SycH, und eine C-terminale katalytische Domäne (190-468 AS) mit einer Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTPase)-Aktivität, die eine hohe Sequenzhomologie zu den katalytischen Domänen der eukaryotischen PTPasen aufweist (Zhang, 2003). Der N-Terminus enthält eine Phosphotyrosin-Bindungsdomäne, welche die Erkennung von Tyrosin-phosphorylierten Substraten vermittelt (Guan and Dixon, 1990; Guan and Dixon, 1991; Black and Bliska, 1997; Ivanov *et al.*, 2005). Die Tyrosin-Phosphatase-Aktivität von YopH zielt auf eine Reihe von Signalkaskaden ab, die sowohl für die angeborene als auch für die erworbene Immunabwehr wichtig sind (Juris *et al.*, 2002; Cornelis, 2002c; Aepfelbacher, 2004). Dabei sind die meisten Zielproteine von YopH entweder Kinasen oder Regulatorproteine, die in den frühen Phasen der Immunantwort in hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle spielen. YopH interagiert u.a. mit Proteinen des fokalen Adhäsionskomplexes (Persson *et al.*, 1999). Dies bedingt eine Dephosphorylierung der eukaryotischen Adhäsionsregulatorproteine FAK (Focal Adhesion

Kinase), p130^{Cas} (Crk-assoziiertes Substrat), Paxillin und Fyb (Fyn-bindendes Protein), die Bestandteile des fokalen Adhäsionskomplexes sind (Persson *et al.*, 1997; Black and Bliska, 1997; Black *et al.*, 1998; Hamid *et al.*, 1999) und auch an der Signaltransduktion des β 1-Integrin-Rezeptors beteiligt sind. Die Folge davon ist die Auflösung des fokalen Adhäsionskomplexes, was folglich die Inhibierung der Integrin-vermittelten Phagozytose bewirkt (Black and Bliska, 1997; Hamid *et al.*, 1999; Deleuil *et al.*, 2003).

A.8.2.3 YopM

YopM ist der einzige Yop-Effektor, der keine bisher bekannte Enzymaktivität besitzt. Die Sequenz von YopM, besitzt eine variable Anzahl von 12-20 LRRs (*Leucine-Rich Repeats*) und ist sehr heterogen zwischen den *Yersinia*-Arten. Dies resultiert in YopM-Proteinen mit verschiedenen großen Molekulargewichten (Mulder *et al.*, 1989; Leung and Straley, 1989). Vier YopM-Monomere bilden zusammen einen Hohlzylinder (Evdokimov *et al.*, 2001). YopM wird nach der Translokation u.a. in den Nukleus der Wirtszelle via Vesikel-assoziiertem Transport gebracht (Skrzypek *et al.*, 1998; Skrzypek *et al.*, 2003). Die genaue Funktion von YopM im Nukleus ist aber noch unklar. McDonald und Kollegen haben gezeigt, dass YopM mit zwei zellulären Kinasen, RSK1 (p90 *Ribosomal S6 protein Kinase1*) und PRK2 (*Protein Kinase C-like2*) interagiert und diese aktiviert (McDonald *et al.*, 2003). Funktionelle Studien über die beiden Kinasen RSK1 und PRK2 lassen darauf schließen, dass sie eine regulatorische Wirkung auf das Zytoskelett, die Translation und die Zellproliferation haben. Es wird vermutet, dass YopM durch die Komplexbildung mit RSK1 und PRK2 möglicherweise Zytoskelettveränderungen hervorrufen könnte, was aber noch hypothetisch ist und durch zukünftige Experimente geklärt werden muss. Dennoch ist aber YopM ein essentieller Virulenzfaktor. Es konnte gezeigt werden, dass YopM unerlässlich für eine systemische Infektion in Mäusen ist (Trulzsch *et al.*, 2004). Kerschen und Kollegen zeigten, dass YopM die Depletion von NK-Zellen im Blut und Milz von *Yersinia pestis*-infizierten Mäusen hervorruft (Mulder *et al.*, 1989; Kerschen *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass, im Gegensatz zu YopM-defizienten Yersinien, die Infektion von Mäusen mit YopM-kompetenten Yersinien die Induktion mehrerer Zytokine, wie IL-15, IL-15-Rezeptor (IL-15R), IL-12, IL-18, IL-1 β und TNF- α in Makrophagen bzw. IFN- γ und IL-15R in NK-Zellen inhibiert (Kerschen *et al.*, 2004). Da IL-15 und IL-15R eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen spielen (Waldmann and Tagaya, 1999), wird vermutet, dass die YopM-induzierte Depletion von NK-Zellen in der Beeinträchtigung der Expression von IL-15 und IL-15R begründet liegt.

A.8.2.4 YopO

YopO (YpkA in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) ist ein ca. 81 kDa großes Protein. Die YopO-Sekretion kann Chaperon-unabhängig vonstatten gehen (Trulzsch *et al.*, 2003; Letzelter *et al.*, 2006). Dagegen scheint seine Translokation in die Zielzellen vom Chaperon SycO abhängig zu sein (Letzelter *et al.*, 2006). YopO besitzt eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität (Galyov *et al.*, 1993). Es wird durch Autophosphorylierung von zwei Serin-Resten (Ser-90 und Ser-95), N-terminal von der Kinase-Domäne, aktiviert. Dabei konnte gezeigt werden, dass monomeres G-Aktin als Kofaktor für die Autophosphorylierung und damit für die Aktivierung von YopO *in vitro* fungiert (Juris *et al.*, 2002; Trasak *et al.*, 2007). In der C-terminalen Region von YopO wurde eine Rac1-Bindedomäne gefunden, die strukturell und funktionell den GDIs (Guanidine nucleotide Dissociation Inhibitors) der Rho-GTPasen ähnelt (Prehna *et al.*, 2006). GDIs sind negative Regulatoren der GTPasen, die essentiell sind für die Relokalisierung von GTPasen zwischen Zytoplasma und Plasmamembran (Michaelson *et al.*, 2001; Richman *et al.*, 2004). Obwohl funktionelle Studien bisher kein klares Bild über die *in vivo* Relevanz von YopO aufzeigen konnten und auch bisher keine *in vivo* Substrate der Kinase bekannt sind, kommt es bei transfizierten HeLa-Zellen (mit YopO exprimierendem Vektor) zu einem Abrunden und zu einer Bildung von verzweigten „Retraktionsfasern“, was zu einer Zerstörung des Aktinzytoskeletts führt (Juris *et al.*, 2000; Wiley *et al.*, 2006).

A.8.2.5 YopP

YopP (YopJ in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) ist ein 33 kDa großes Protein, dem Deubiquitinase- und Acetyltransferase-Aktivitäten zugeschrieben werden (Zhou *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006). YopP inhibiert die Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) wie, ERK, JNK und p38 (Ruckdeschel *et al.*, 1997; Orth *et al.*, 1999) sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Schesser *et al.*, 1998; Boland and Cornelis, 1998; Ruckdeschel *et al.*, 1998). Dadurch wird die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie, TNF α durch Makrophagen (Boland and Cornelis, 1998; Palmer *et al.*, 1998) und IL-8 durch Epithel- und Endothelzellen unterdrückt (Schesser *et al.*, 1998; Boland and Cornelis, 1998; Denecker *et al.*, 2002). Da die Signalwege der MAPK und von NF- κ B nicht nur für die Produktion von Zytokinen, sondern auch für das zelluläre Überleben, wichtig sind, wird angenommen, dass die YopP-abhängige Blockierung der MAPK- und NF- κ B-Aktivitäten, neben der Drosselung der Zytokinproduktion, die Apoptose in dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen indirekt induziert (Mills *et al.*, 1997; Monack *et al.*, 1997; Boland and Cornelis, 1998; Ruckdeschel *et al.*, 2001; Erfurth *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005).

A.8.2.6 YopT

YopT, ein 36 kDa großes Protein, wird von *Y. pestis* und *Y. enterocolitica* aber nur von wenigen Stämmen von *Y. pseudotuberculosis* exprimiert (Iriarte and Cornelis, 1998; Viboud *et al.*, 2006a; Viboud *et al.*, 2006b). Die Sekretion und Translokation von YopT ist abhängig von seinem spezifischen Chaperon, SycT (Trulzsch *et al.*, 2003). Die Effekte von YopT in infizierten Zellen gleichen denen von YopE: Auflösung von Stressfasern, Abrunden der Zellen und die Inhibierung der Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen (Grosdent *et al.*, 2002; Cornelis, 2002c; Wong and Isberg, 2005). Die zytotoxische Wirkung von YopT wurde erstmals von Iriarte und Cornelis (Iriarte and Cornelis, 1998) beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass YopT eine Cystein-Protease-Aktivität besitzt, welche für die proteolytische Abspaltung des C-terminalen Cysteins von Rho-GTPasen wie, RhoA und Rac, verantwortlich ist. Dadurch dissoziieren diese GTPasen von der Membran und können ihre Funktion beim Aufbau von Aktinfasern nicht mehr ausüben (Zumbihl *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2002; Aepfelbacher *et al.*, 2005; Wong and Isberg, 2005).

A.9 Experimentelle Methoden zur Untersuchung der Yop-Sekretions/Translokationssysteme

Die Yops wurden anfangs als Proteine der äußeren Membran von Yersinien beschrieben (Straley and Brubaker, 1981; Portnoy *et al.*, 1981). Heesemann und Kollegen konnten dann feststellen, dass unter bestimmten Bedingungen (Inkubation bei 37°C und Depletion von Ca²⁺-Ionen), Yops auch im Überstand der Bakterien durch Sekretion abgegeben werden (Heesemann *et al.*, 1984; Heesemann *et al.*, 1986). Schließlich lieferten Michiels und Kollegen den Nachweis, dass Yops keine membranverankerten, sondern tatsächlich sekretierte Proteine sind (Michiels *et al.*, 1990). Demzufolge stellte sich die Frage nach den Angriffszielen der sekretierten Yops. Die Feststellung, dass Yops ihre Zytotoxizität und Anti-Phagozytose-Aktivität (z.B. durch YopE und YopH) nur bei direktem Yersinien-Zell-Kontakt induzieren können (Rosqvist *et al.*, 1990) und nicht etwa die einfache Zugabe von Bakterien-freien Yops, sondern erst ihre Mikroinjektion in die Zellen zytotoxische Wirkung zeigt (Rosqvist *et al.*, 1991), sowie nicht zuletzt dass YopH Wirtszellproteine dephosphoryliert (Bliska *et al.*, 1991; Bliska *et al.*, 1992), führte zu der Annahme, dass die Angriffsziele von Yops innerhalb der Wirtszelle liegen und deshalb Yops direkt ins Zytosol der Wirtszelle injiziert werden müssen. Der experimentelle Nachweis von Yop-Translokation ist aber ein schwieriges Unterfangen. Mittels Zellfraktionierungs- und immunfluoreszenzmikroskopischen Studien konnte zwar gezeigt werden, dass YopE und YopH direkt ins Zytosol transloziert

werden (Rosqvist *et al.*, 1994; Persson *et al.*, 1995), jedoch sind solche Nachweisverfahren sehr aufwendig und darüber hinaus sind viele Kontrollen notwendig, um Artefakte ausschließen zu können. Sory und Cornelis etablierten dagegen eine andere indirekte Methode zur Analyse von Translokationsprozessen, basierend auf ein Reporterenzym (Sory and Cornelis, 1994). Sie fusionierten die kodierende Sequenz für die katalytische Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase-Domäne (CyaA) (abgeleitet vom Hämolyisin-Adenylatcyclase Toxin, Cyclolysin, von *Bordetella pertussis*) an den C-Terminus der 130 AS langen N-terminalen Sequenz von YopE (YopE-Cya). Die Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase katalysiert in Anwesenheit von Calmodulin die Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus ATP. Da *Yersinia* kein Calmodulin produzieren, kann die Cyclase-Aktivität (Anstieg der cAMP-Konzentration) nur bei erfolgreicher Translokation von YopE-Cya ins Zytosol (wo zelluläres Calmodulin vorhanden ist) gemessen werden. Mit dem Cya-Reportersystem konnten nicht nur weitere Yops auf ihre mögliche Translokation hin überprüft, sondern auch die Rolle verschiedener *Yersinia*-Proteine bei dem Translokationsprozess untersucht werden. So konnte nachgewiesen werden, dass z.B. YopM, YopH, YopT, YopP und YopO, nicht aber YopN und YopB, in die Wirtszelle transloziert werden. Darüber hinaus konnten mit Hilfe dieses Systems die nötigen minimalen Yop-Aminosäuresequenzen für die Translokation identifiziert werden (Sory *et al.*, 1995; Boland *et al.*, 1996; Iriarte and Cornelis, 1998; Iriarte *et al.*, 1998; Schesser *et al.*, 2000).

Inzwischen wurden, je nach Fragestellung (betreffend Sekretion oder Translokation), auch weitere analoge Reportersysteme getestet und eingesetzt, wie z.B. die β -Galaktosidase, die alkalische Phosphatase und Luziferase (Michiels and Cornelis, 1991; Bergman *et al.*, 1994; Pettersson *et al.*, 1996; Jacobi *et al.*, 1998; Jacobi *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden auch nichtenzymatische Reportersysteme zur Analyse der Translokation und/oder Sekretion eingesetzt, wie das autofluoreszierende Protein GFP (Jacobi *et al.*, 1998), der Elk-Tag (Day *et al.*, 2003) und der Glykogen-Synthase-Kinase (GSK)-Tag (Garcia *et al.*, 2006). Der Elk-Tag ist 35 AS lang und besteht aus der nuklearen Lokalisationssequenz (NLS) des Simian Virus 40 Tumorantigens, das mit einer kurzen Aminosäuresequenz des eukaryotischen Transkriptionsfaktors Elk-1 fusioniert ist. Elk-fusionierte Yops können nur bei erfolgreicher Translokation an einem spezifischen Serin-Rest des Elk-Tag phosphoryliert, und mittels phosphospezifischem Elk-Antikörper detektiert werden. GSK-Tag ist ein 13 AS langes, phosphorylierbares Peptid, das von der humanen GSK-3-Kinase abgeleitet wurde. Analog zum Elk-Tag-Reportersystem, resultiert der Nachweis der Translokation der GSK-Tag-markierten bakteriellen Effektorproteine in ihrer Phosphorylierung durch Wirtszell-spezifische

Kinasen. Die Translokation kann dann mittels phosphospezifischen GSK-3-Antikörpern detektiert werden.

Kürzlich wurden zwei neue Fluoreszenz-basierte Reportersysteme, das FIAsH-System und das β -Laktamase-Reportersystem, die es erlauben Reporteraktivität auf zellulärer Ebene zu messen, publiziert. Diese beiden Reportersysteme werden im folgenden Kapitel detaillierter vorgestellt.

A.9.1 Tetracystein-FIAsH

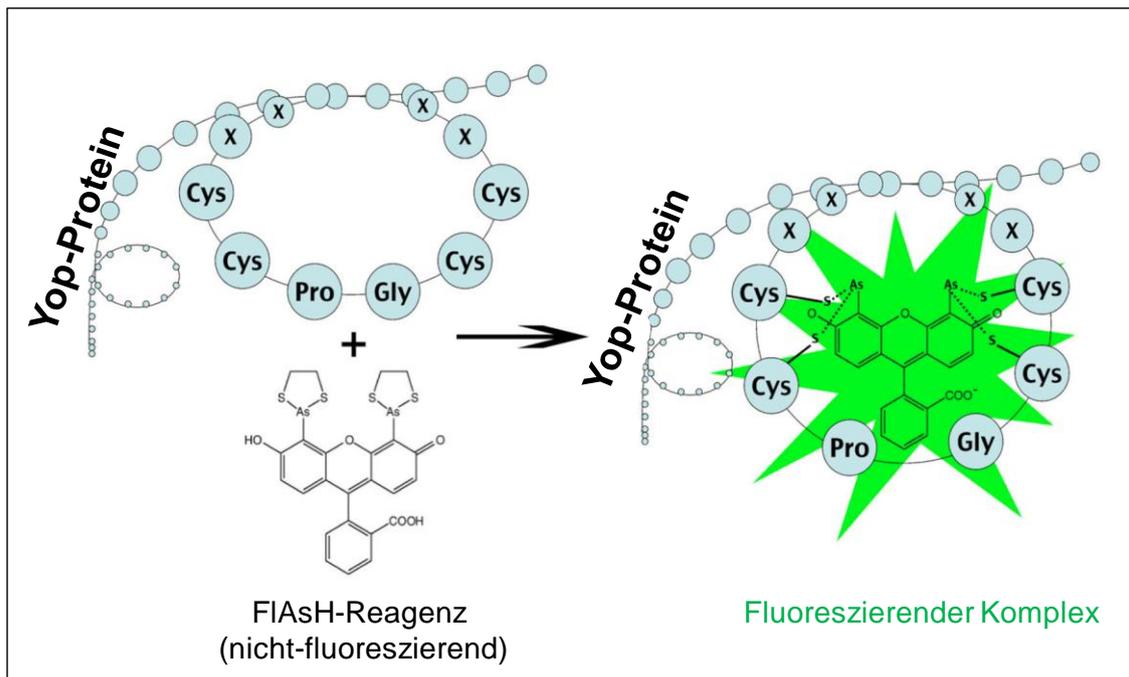


Abb. 5: Das FIAsH-Reagenz wird durch die Bindung an den Tetracystein-tag eines Yop-Proteins fluoreszent

Das LumioTM-Reagenz ist an 1,2-Ethandithiol (EDT) prekomplexiert und wird dadurch stabilisiert. Beim Anfärben wird das EDT durch die Tetracysteine verdrängt, da das Peptid CCPGCC eine höhere Affinität zum LumioTM-Reagenz hat als das EDT. Es werden vier kovalente Bindungen geformt. Die zwei Arsengruppen des LumioTM-Substrats binden an den zwei Thiolgruppen des Tetracystein-tags.

Das FIAsH-System (Fluorescein Arsenical Hairpin Binder) wurde 1998 in der Gruppe von Roger Tsien entwickelt (Griffin *et al.*, 1998) und besteht aus einem kleinen membran-gängigen Fluorescein-Molekül, das As(III) an den Positionen 4' und 5' substituiert hat (s. Abb. 5). Dabei ermöglichen die beiden Arsengruppen eine beträchtliche Affinität und Spezifität von FIAsH gegenüber dem Tetracysteinmotiv. Das Motiv beinhaltet vier Cysteine und besitzt die Sequenz Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys, wobei für Xaa jede beliebige Aminosäure, ausgenommen Cystein, stehen kann. FIAsH wird unter Palladiumacetat-Katalyse aus 4',5'-Bis-(acetoxymmercuri)-Fluorescein und Arsen(III)-Chlorid synthetisiert. Anschließend wird das

Reaktionsprodukt mit einem Überschuss an 1,2-Ethandithiol (EDT) zu FIAsh-EDT₂ umgesetzt (Griffin *et al.*, 1998). Aus dem nicht-fluoreszenten Reaktionsprodukt FIAsh-EDT₂ entsteht ein stark fluoreszenter Komplex, wenn die beiden EDT-Moleküle gegen Tetracystein enthaltende Peptide ausgetauscht werden (s. Abb. 5). Der Proteinkomplex emittiert bei 528 nm, was als grüne Fluoreszenz detektiert werden kann. In Eukaryoten wurde die FIAsh-Färbung bereits erfolgreich angewendet (Gaietta *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnte die Translokation von FIAsh-angefärbten Tetracystein-fusionierten bakteriellen Effektorproteinen nach der Translokation in eukaryotischen Zellen detektiert werden (Cambronne *et al.*, 2004; Enninga *et al.*, 2005). Ferner konnten mit dieser Methode Zeitraffer-Studien durchgeführt werden, die es ermöglichten die Sekretion der Effektoren von *S. flexneri* und von *S. typhimurium* in eukaryotische Zellen in Real-Zeit zu beobachten (Enninga *et al.*, 2005; VanEngelenburg and Palmer, 2008).

A.9.2 β -Laktamase

Das β -Laktamase-Reportersystem ist ein enzymatisches Detektionssystem und benutzt das Enzym TEM-1- β -Laktamase. Dabei wird die β -Laktamase (Bla), ohne N-terminaler Signalsequenz, an bakterielle Effektoren fusioniert, um die Sekretion bzw. Translokation dieser verfolgen zu können (Charpentier and Oswald, 2004). Die TEM-1- β -Laktamase ist 29 kD groß, die häufigste Plasmid-kodierte β -Laktamase und der Hauptgrund für die Resistenz von Bakterien gegen β -Laktam-Antibiotika (Wiedemann *et al.*, 1989). Das Enzym spaltet die Amid-Bindung des 4-gliedrigen β -Laktam-Rings von Penicillinen, Cephalosporinen oder anderen β -Laktam-Antibiotika und hebt damit deren antimikrobielle Wirkung auf (s. Abb. 16). Es ist auch aktiv, wenn es an einem heterologen Protein fusioniert ist (Zlokarnik, 2000). Es gibt kein Ortholog in Eukaryoten und eine Überexpression von Bla wirkt nicht toxisch auf eukaryotische Zellen. Die Effizienz von Bla als Fluoreszenz-basiertes Reportersystem wurde durch Zlokarnik und Kollegen etabliert, die ein zellpermeables, fluoreszierendes Substrat aus Coumarin, Cephalosporin und Fluorescein (CCF2-AM bzw. CCF4-AM) entwickelten, das β -Laktamase-Aktivität mit hoher Sensitivität in eukaryotischen Zellen nachweisen lässt (Zlokarnik *et al.*, 1998). Im intakten CCF4-Substrat führt die Anregung von Coumarin (Donor) bei 409 nm zu einem FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) auf Fluorescein (Akzeptor). Dadurch wird Fluorescein angeregt und strahlt grünes Licht aus (detektierbar bei 520 nm). Da β -Laktamase die Hydrolyse des CCF4-Substrats katalysiert, wird das FRET unterbrochen und das Emissionsspektrum wird von grün (520 nm) nach blau (450 nm) verschoben (s. Abb. 16). Mittels CCF4-Substrats kann die Bla-Reporteraktivität sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch im FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) gemessen

werden (Knapp *et al.*, 2003). Das Bla-Reportersystem konnte erfolgreich zur Analyse der Genexpression *in vivo* benutzt werden (Raz *et al.*, 1998). Ferner konnten mit diesem Reportersystem die Translokation des Flagellins von *Salmonella typhimurium* durch das T3SS in das Zytosol von Makrophagen nachgewiesen werden (Sun *et al.*, 2007). Weiterhin konnten mittels des Bla-Reporters die Zelltypen identifiziert werden, die nach *in vivo* Infektion mit Salmonellen oder Legionellen (die Bla-Effektor-Fusionsproteine exprimieren und translozieren), angesteuert werden (Geddes *et al.*, 2007; de Felipe *et al.*, 2008).

A.10 Zielsetzung der Arbeit

Die meisten Erkenntnisse über die Translokation von Yops und ihre Wirkungen wurden durch *in vitro* Versuche gewonnen. Zwar konnten damit die Translokationsmechanismen bis zu einem gewissen Grad geklärt und diverse Funktionen von Yops identifiziert werden, jedoch ist es noch weitgehend unklar, ob und in wieweit diese Erkenntnisse eine Relevanz für das *in vivo* Infektionsgeschehen haben. Zum Beispiel konnten durch *in vitro* Versuche wichtige Anti-Wirt-Funktionen für YopP, YopE, YopO und YopT entdeckt werden. Diese schließen u.a. die Inhibierung der MAPK- und NF- κ B-Signalwege und die Induktion von Apoptose in DCs und Makrophagen durch YopP, sowie die Zerstörung des Zytoskeletts und Inhibierung der Phagozytose durch YopE, YopO und YopT ein (Heesemann *et al.*, 2006; Trosky *et al.*, 2008). Diese identifizierten Funktionen stehen in perfekter Übereinstimmung mit der Lebensart von Yersinien, die sich hauptsächlich extrazellulär vermehren. Erstaunlicherweise zeigen jedoch *Yersinia enterocolitica*-Mutantenstämme, in denen YopP, YopE, YopO oder YopT deletiert wurden, im frühen Verlauf der experimentellen Mausinfektion nur schwachen bis gar keinen Virulenzverlust (Trulzsch *et al.*, 2004). Ein YopT-defizienter *Y. enterocolitica*-Stamm zeigt sogar eine leicht erhöhte Virulenz gegenüber Wildtyp-Yersinien WA(pYV). Dieses Beispiel an Widersprüchlichkeiten zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen, neben der weitestgehenden Unkenntnis über die Art und den Umfang der tatsächlichen Zielzelltypen, in denen Yops *in vivo* injiziert werden, zeigen die Notwendigkeit, die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse neu unter *in vivo* Bedingungen zu evaluieren bzw. zu ergänzen. Voraussetzung hierfür ist aber die Etablierung von Versuchssystemen, die *in vivo* Studien ermöglichen.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Etablierung von Reportersystemen, welche die Untersuchung der Sekretion bzw. der Translokation der Yop-Effektorproteine von *Y. enterocolitica* *in vivo* bzw. *ex vivo* ermöglichen.

Es wurden zwei verschiedene Reportersysteme gegenüber gestellt und hinsichtlich ihrer Effizienz untersucht: das FIAsh-Reportersystem und das β -Laktamase-Reportersystem. Diese beiden Systeme wurden ausgewählt, weil ihre Reporteraktivität direkt in intakten, lebenden Einzelzellen detektiert werden kann. Dies ist eine Voraussetzung für die Identifizierung der Yop-translozierten Zelltypen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Dagegen kann die Reporteraktivität von Reporterenzymen, wie Adenylatcyclase, β -Galaktosidase, alkalische Phosphatase und Luziferase, sowie der Wirtszell-abhängig phosphorylierbare Elk-Tag und GSK-Tag, nur in Zell-Lysaten gemessen werden.

Die Ziele dieser Arbeit umfassen u.a. folgende Punkte:

- Generierung von Konstrukten mit Tetracysteintag (Tcys)- und β -Laktamase (Bla)-fusionierten Yops. Hierfür wurden stellvertretend für die Yop-Translokation, YopE, YopH und YopM von *Y. enterocolitica* mit den Reporter-Tags fusioniert. YopE gehört zu der Yop-Gruppe, die entbehrlich für *Yersinia*-Virulenz in der Maus sind. YopH und YopM hingegen gehören zu der Yop-Gruppe, die unabdingbar für *in vivo* Virulenz sind.
- Die Yop-Tcys- oder Yop-Bla-Reporterproteine sollen in verschiedenen *Y. enterocolitica*- (Mutanten-) Stämmen exprimiert werden, um die Rolle bestimmter *Yersinia*-Faktoren bei der Translokation zu untersuchen.
- *In vitro* Versuche mit den beiden Reportersystemen. Dabei sollten Infektionsversuche mit Zelllinien (wie HeLa-Zellen) und primären Zellen, wie Knochenmark-abgeleitete Makrophagen (BMDMs) und DCs (BMDCs), sowie kinetische Studien durchgeführt werden.
- Das Reportersystem, das *in vitro* erfolgreich funktioniert hat, sollte für *in vivo* Versuche eingesetzt werden. Dabei sollten Mäuse mit Yop-Bla- und/oder Yop-Tcys-enthaltenden *Yersinia*-Stämmen infiziert werden, und die Yop-translozierten Zelltypen *ex vivo* identifiziert werden.

B. MATERIAL UND METHODEN

B.1 Material

B.1.1 Geräte

Tab. 3: Verwendete Geräte

Gerät	Typ und Hersteller
Brutschränke	BBD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer	FACSCanto II, BD, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer DNA	Agagel Standard G45/1, Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer Protein	Mini-Protean 3, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland Hofer SE 400, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Fluoreszenzimager	FLA-3000, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Fluoreszenzmikroskope	Leitz DM RBE, Leica, Mannheim, Deutschland Olympus BX61, Olympus, Hamburg, Deutschland
French Press	SLM-AMINCO, Spectronic Instruments, French Press Pressure Cells (Typ 40K Manual-Fill-Cell, FA-030) und Cell Press, New York, USA
Geldokumentationssystem/ UV-Transilluminator	Herolab, E.A.S.Y.RH., Molekulare Trenntechnik, Wiesloch, Deutschland
Homogenisator	HOG2, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Microplate reader	Fluostar Optima, BMG Labtech, Jena, Deutschland
pH-Meter	pH211 Microprocessor pH-Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Präzisionswaagen	Sartorius Basic Plus (BP 615) und Sartorius BL 1500S, Göttingen, Deutschland,
Spektralphotometer	Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Schüttelinkubatoren	Certomat R, B. und BS-1, B Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland Xcella E24R, New Jersey, USA
Spannungsgeräte	Power Pac 1000, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Sterilwerkbänke	Heraeus, HS12, Hanau, Deutschland
Thermocycler	Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, Foster City, CA, USA
Thermoschüttler	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transferapparatur	Multiblot, C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland Sigma, 3K30B und 1K15B Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland Optima™ TL Ultracentrifuge, Beckman Instruments, Inc. CA, USA

B.1.2 Chemikalien

Tab. 4: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller/Lieferant
Agarose	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Albumin Fraktion V	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BHI (Brain Heart Infusion)-Medium	Oxoid, Hampshire, England
Bis-Acrylamid	SERVA, Heidelberg, Deutschland
5-(und -6)-Carboxyfluorescein	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
CCCP (carbonyl cyanid m-chlorophenylhydrazon)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Combactam	PFIZER PHARMA, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R250	Biomol, Hamburg, Deutschland
Digitonin	Fluka, Buchs, Schweiz
di-Natriumtetraborat-Decahydrat	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (Dulbecco's modified eagle media)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FCS (fötales Kälberserum)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 37 %	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (N-2[Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
7-hydroxycoumarin-3-carboxylsäure	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	peqlab, Erlangen, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
LB (Luria Bertani)-Agar	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
LB (Luria Bertani)-Medium	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
LPS	Quadragech Diagnostics, England
Milchpulver	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocefin	Oxoid, Hampshire, England
OptiMEM	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PAβN (Phenylalanin arginin β-naphthylamid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PCR Nukleotid Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Probenecid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Spectinomycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenamid)	Biomol, Hamburg, Deutschland
TrypanBlau (BenzaminBlau)	OMNI Life science, Bremen, Deutschland
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

B.1.3 Kits

Tab. 5: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Bug Buster	Novagen, Darmstadt, Deutschland
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Fugene Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Gel Extraction Kit	OMNI Life science, Bremen, Deutschland
Nucleo Spin Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nucleobond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Presto Spin D Bug	Molzym, Bremen, Deutschland
Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Venor Gem	Minerva biolabs, Berlin, Deutschland

B.1.4 Enzyme, Gewichts-und Längenstandards

Tab. 6: Verwendete Enzyme, Gewichts-und Längenstandards

Bezeichnung	Hersteller
BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
BioMix Red	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
DNA-Längenstandard (Ready Load™ 1 kb) O'Gene Ruler 1 kb	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland
Expand high fidelity polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proteingrößenstandard (SeeBlue [®] Plus2, prestained)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (complete)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Proteinase K (fungal)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
Shrimp alkaline phosphatase	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
Taq-Polymerase	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland

B.1.5 Nährmedien

Die hergestellten Nährlösungen wurden durch Autoklavieren bei 121°C und 1 bar für 20 min sterilisiert. Durch Zugabe von 15 g Agar pro Liter Nährlösung wurden feste Nährböden hergestellt. Nach dem Autoklavieren wurde der Agar im Wärmeschrank bei 60°C flüssig gehalten, sodass er in Petrischalen gegossen werden konnte. Die Anzucht von *E. coli* erfolgte im LB-Medium, die Anzucht von *Y. enterocolitica* hingegen in BHI-Medium.

LB-Medium: 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl

BHI-Medium (*Brain Heart Infusion*): 37 g BHI-Fertigmischung auf 1 l H₂O_{bidest.}

B.1.6 Antibiotika und Medienzusätze

Selektion von Bakterienstämmen erfolgte mit Hilfe verschiedener Antibiotika Resistenzen. Antibiotika wurden als Stammlösungen angesetzt, steril filtriert (Sterilfilter der Porengröße 0,22 µm, Millipore, Bedford, England) und bei -20°C gelagert. Die Stammlösungen (s. Tab. 9) wurden den Nährmedien nach Abkühlen auf weniger als 55°C zugesetzt.

Tab. 7: Verwendete Antibiotika und andere Zusätze

Antibiotikum	Abkürzung	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	Amp ^R	H ₂ O _{bidest.}	100	100
Carbenicillin	Cb	50 % Ethanol	50	250
Chloramphenicol	Cm ^R	70 % Ethanol	20	20
Gentamicin	Gm	H ₂ O _{bidest.}	100	100
Kanamycin	Kan ^R	H ₂ O _{bidest.}	50	50
Nalidixinsäure	Nal	0,5 N NaOH	60	60
Spectinomycin	SH ^R	H ₂ O _{bidest.}	50	50
Streptomycin	Sm ^R	H ₂ O _{bidest.}	100	100
andere Zusätze		Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
CaCl ₂		H ₂ O _{bidest.}	100 mM	0,2 mM; 1 mM
EGTA		H ₂ O _{bidest.}	500 mM	5 mM
Glukose		H ₂ O _{bidest.}	20 %	0,1-0,2 %
IPTG		H ₂ O _{bidest.}	1 M	1 mM
MgCl ₂		H ₂ O _{bidest.}	1 M	10 mM

B.1.7 Bakterienstämme

Tab. 8: Verwendete Bakterienstämme

Stammbezeichnung	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>endA1 hsdR17(r_k-m_k+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^R) relA1 Δ(lacZYA-argF)_{U169} (φ80lacZdM15)</i>	Hanahan, 1983
S17-1λpir	<i>λpir⁺ tra⁺, Km^R</i>	Miller und Mekalanos, 1988

<i>Y. enterocolitica</i>		
WA(pYV)	Klinisches Isolat WA-314, Serotyp O:8, Biogruppe 1B mit Virulenzplasmid pYVO8	(Heesemann and Laufs, 1983)
WA-C	Plasmidloses Derivat von WA-314, Serotyp O:8, Biogruppe 1B	(Heesemann and Laufs, 1983)
WA(pT3SS)	WA-C mit Plasmid pT3SS, SH ^R	(Trulzsch <i>et al.</i> , 2003)
WA(pYVΔYopE)	WA-314Δ <i>yopE</i> , Kan ^R	(Trulzsch <i>et al.</i> , 2003)
WA(pYVΔYopH)	WA-314Δ <i>yopH</i> , Kan ^R	(Trulzsch <i>et al.</i> , 2003)
WA(pYV, pEGFP)	WA-314 mit pACYC184+ <i>gfp</i> , Cm ^R	Stammsammlung MvPI
WA(pYV, YopH-Tcys)	pYV mit <i>yopH</i> -Tetracystein-tag, Kan ^R	diese Arbeit
WA(pYV, YopM-Tcys)	pYV mit <i>yopM</i> -Tetracystein-tag, Kan ^R	
WA(pYV, pYopH-Bla)	WA-314 mit Plasmid pACYC184: <i>sycH-yopH-bla</i> , Cm ^R	
WA(pYVΔYopH, pYopH-Bla)	WA-C mit den Plasmiden pYVΔ <i>yopH</i> und pACYC184: <i>sycH-yopH-bla</i> , Cm ^R , Kan ^R	diese Arbeit
WA(pT3SS, pYopH-Bla)	WA-C mit den Plasmiden pT3SS und pACYC184: <i>sycH-yopH-bla</i> , SH ^R , Cm ^R ,	
WA(pYV, pYopE _r -Bla)	WA-314 mit Plasmid pACYC184: <i>sycE-yopE_r</i> (YopE-Hybride)- <i>bla</i> , Cm ^R ,	
WA(pT3SS, pYopE _r -Bla)	WA-C mit den Plasmiden pT3SS und pACYC184: <i>sycE-yopE_r</i> (YopE-Hybride)- <i>bla</i> , SH ^R , Cm ^R	
WA(pYVΔYopE, pYopE _r -Bla)	WA-C mit den Plasmiden pYVΔ <i>yopE</i> und pACYC184: <i>yopE_r</i> (YopE-Hybride)- <i>bla</i> , Kan ^R , Cm ^R	

B.1.8 Plasmide

Tab. 9: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pcDNA3.1	Expressionsvektor, Amp ^R	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pKD46	Red System: Rekombinasen red α und red β , Exonucleaseinhibitor red γ , ParaB, Amp ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKOBEG	Red System: Rekombinasen red α und red β , Exonucleaseinhibitor red γ , Arabinose induzierbarer Pbad Promotor, Cm ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pACYC177	Klonierungsvektor Amp ^R , Kan ^R	Chang und Cohen, 1978
pACYC184	Klonierungsvektor Cm ^R , Tet ^R	Chang und Cohen, 1978
pYV	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8	(Heesemann and Laufs, 1983)
pYVΔYopE	Kan ^R -Kassette im <i>yopE</i> -Gen	(Trulzsch <i>et al.</i> , 2003)
pYVΔYopH	Kan ^R -Kassette im <i>yopH</i> -Gen	(Trulzsch <i>et al.</i> , 2003)
pYVYopH-Tcys	Kan ^R -Kassette und Tetracystein-tag, C-terminal am <i>yopH</i> -Gen	diese Arbeit
pYVYopM-Tcys	Kan ^R -Kassette und Tetracystein-tag, C-terminal am <i>yopM</i> -Gen	diese Arbeit

pYopH-Bla	<i>yopH</i> in <i>HindIII/BamHI</i> -Schnittstelle von pACYC184 <i>bla</i> in <i>BamHI/Sall</i> von pACYC184	von C. Gerke zur Verfügung gestellt; C-terminal pYopH ₅₂₄ -Bla
pYopE _i -GFP	<i>sycE-yopE_i</i> (YopE-Hybride) in <i>HindIII/BamHI</i> Schnittstelle von pACYC184 <i>gfp</i> in <i>BamHI/Sall</i> von pACYC184	(Jacobi <i>et al.</i> , 1998)
pYopE _i -Bla	<i>sycE-yopE_i</i> (YopE-Hybride) in <i>HindIII/BamHI</i> -Schnittstelle von pACYC184 <i>bla</i> in <i>BamHI/Sall</i> von pACYC184	diese Arbeit

B.1.9 Primer

In Tab. 10 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer aufgeführt. Verwendet wurden Primer (entsalzt, lyophilisiert und HPLC-gereinigt) der Firmen Metabion (Martinsried, Deutschland), Thermo Electron GmbH und biomers.net (Ulm, Deutschland). Die Konzentration von 100 pmol/μl wurde durch Lösen mit H₂O_{bidest.} eingestellt.

Tab. 10: Verwendete Primer

Primer	5` - 3` Sequenz	Verwendung
Bla- <i>BamHI</i> -For.	CGGGATCCCACCCAGAAACGCTGGTG A	Amplifikation Bla
Bla- <i>Sall</i> -Rev.	ACGCGTCGACTTACCAATGCTTAATCA GTGAG	Amplifikation Bla
Bla-456-Rev.	GGCATCGTGGTGTACGCTCGTC	Sequenzierung
Bla-45-Rev.	CCCCTCGTGCACCCAACTG	Sequenzierung
pACYC184-1356-For.	CAGAGCAAGAGATTACGCGCAG	Sequenzierung
pACYC184-2312-Rev.	GCGACAGGCCGATCATCGTCGCGC	Sequenzierung
SycE-256-For.	GTGCCCCCGACCTCGTC	Sequenzierung
YopH-384-For.	CCGCTAAGCTATTGCAAAGCACGG	Sequenzierung
YopH-878-For.	CCGCAGTACGCGCCGATC	Sequenzierung
YopH-ET-For.	ATGTTCTGATTAAGTTGGCTGAAGGAC AAGGGCGACCATTATTAATA GCGGTGGCTGTTGTCCTGGCTGTTGC TAATCACTGACACCCTCATCAGTG	Klonierung: Tetracys- tag
YopH-ET-Tcys-Rev.	AGCGTATATATCTTAGTAATTTTATTTA CTCATAGGAATAAATATTTACACGTCA AGTCAGCGTAATGCTC	Klonierung: Tetracys- tag
YopH-Ident.-For.	GTGTTGGCCGTAAGTGCACAAC	Überprüfung des Tetracys-tag
YopH-Ident.-Rev.	CCAGTGGGACGAACTGGCGA	Überprüfung des Tetracys-tag
YopH- <i>HindIII</i> - Transfekt.-For.	CCAAGCTTGTTATGGATAACTTATCA TTAAGCGATCTTCAT	Exprimierung von Tetracys-tag in Zellen
YopH- <i>BamHI</i> - Transfekt.-Rev.	CGGGATCC/TTAAGGCTCCATGCAACA GCCAGGACAACAGTTCAGGAAGCTAT TTAATAATGGTCGCCCTT	Exprimierung von Tetracys-tag in Zellen

YopM-ET-For.	ATGAATTTGCTCATGAGACTATAGACA AACTTGAAGATGATGTTTTGAGGGTG GCTGTTGTCCTGGCTGTTGCTAGTCA CTGACACCCTCATCAGTG	Klonierung: Tetracyc- tag
YopM-ET-Tcys-Rev.	CCAAGCTTCAGGAAAAGCTGTTGC ATAAGTTCTGTGAAGGTTGTCTGCATC AGATTTCCCCTCCGTCAAGTCAGCGTA ATGCTC	Klonierung: Tetracyc- tag
YopM-HindIII- Transfekt.-For.	CCCAAGCTTGTTATGGATTATGGTTTT GTTTGAATGA	Exprimierung von Tetracyc-tag in Zellen
YopM-BamHI- Transfekt.-Rev.	CGGGATCCTTA/AGGCTCCATGCAACA GCCAGGACAACAGTTCAGGAACTCAA AACATCATCTTCAAGTTT	Exprimierung von Tetracyc-tag in Zellen

B.1.10 Eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien

Tab. 11: Verwendete eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium
HeLa	Humane Epithelzellen; Zervix-Karzinom-Zelllinie (adhärent)	DMEM, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 % HEPES
HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen 293 (adhärent)	DMEM, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 % HEPES
GX3-GM-CSF-Zellen	Zur Ausdifferenzierung von DCs aus Knochenmarkzellen	DMEM, 10 % FCS, 1 mg/ml G418, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

B.1.11 Antikörper

B.1.11.1 Primäre Antikörper für die indirekte Immundetektion

Tab. 12: Verwendete primäre Antikörper für die indirekte Immundetektion

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp und Herkunft	Hersteller
anti-Bla	gegen Bla gerichtet	Maus, monoklonal	Abcam, Cambridge, England
anti-YopE	gegen YopE gerichtet	Kaninchen-Hyperimmunserum	Konrad Trülzsch, MvPI
anti-YopH	gegen YopH gerichtet	Kaninchen-Hyperimmunserum	Konrad Trülzsch, MvPI
anti-YopM	gegen YopM gerichtet	Kaninchen-Hyperimmunserum	Konrad Trülzsch, MvPI
anti-YadA (P1-8)	gegen YadA gerichtet	Maus, monoklonal	MvPI

B.1.11.2 Sekundäre Antikörper für die indirekte Immundetektion

Tab. 13: Verwendete sekundäre Antikörper für die indirekte Immundetektion

Bezeichnung	Spezifität	Hersteller
HRP anti-Maus IgG (aus Schaf)	IgG mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert, gegen IgG aus Maus gerichtet	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
HRP anti-Kaninchen IgG (aus Esel)	IgG mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert, gegen IgG aus Kaninchen gerichtet	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

B.1.11.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tab. 14: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugat	Hersteller
anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor 647	BD, Heidelberg, Deutschland
B220 (CD45R)	PE	BD, Heidelberg, Deutschland
CD4	PerCP	BD, Heidelberg, Deutschland
CD8	APC	BD, Heidelberg, Deutschland
CD11c	APC Alexa 750	BD, Heidelberg, Deutschland
CD45	APC-Cy7	BD, Heidelberg, Deutschland
F4/80	PE-Cy5	BD, Heidelberg, Deutschland
Ly6C-6G	PE	BD, Heidelberg, Deutschland

B.1.12 Mausstämme

BALB/c und C57Bl/6 Mäuse wurden von Harlan/Winkelmann (Horst, Niederlande) bezogen und in dem Tierstall des Max von Pettenkofer-Institutes gehalten. Die beschriebenen Experimente wurden mit 6-10 Wochen alten und vitalen BALB/c bzw. C57Bl/6-Mäusen (meist Weibchen) durchgeführt.

B.2 Methoden

B.2.1 Mikrobiologische Methoden

B.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden in einem Schüttelinkubator bei 37°C in LB-Medium über Nacht angezogen. Auf Agarplatten ausgestrichene Stämme wurden ebenfalls bei 37°C in einem Brutschrank über Nacht inkubiert. Bei Bedarf wurden die Flüssig- und Festmedien mit den entsprechenden Zusätzen versehen (s. Tab. 9). Zur Langzeitlagerung wurden Stammkulturen aus flüssigen Übernachtskulturen angelegt. Die Konservierung der Stämme erfolgte im Einfriermedium bei -80°C.

Einfriermedium: LB-Medium mit 15 % (v/v) Glycerin (autoklaviert)

B.2.1.2 Kultivierung und Stammhaltung von *Y. enterocolitica*

Yersinia-Kulturen wurden bei 27°C in flüssigem BHI-Medium, ggf. mit Antibiotikum, unter Schütteln kultiviert. Die auf Agarplatten (ggf. *Yersinia*-Selektiv-CIN-Agarplatten) ausgestrichenen Stämme wurden ebenfalls bei 27°C über Nacht inkubiert. Zur Lagerung der *Yersinia*-Stämme wurde eine Übernachtskultur 1:40 in BHI-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,4-0,5 inkubiert. Die Bakterien wurden bei 4.000 g für 10 min abzentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Nach mindestens einem Tag wurden aus den jeweiligen Aliquots 100 µl entnommen und die Bakterienzahl durch Ausplattieren mehrerer Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension auf selektiven Yersinien-Agar (CIN-Agar, Oxoid, Hampshire, England) ermittelt und als koloniebildende Einheiten (*colony forming unit* = cfu) erfasst. Die cfu der eingefrorenen Yersinienstämme lag in der Regel zwischen 1x10⁸ und 1x10⁹ pro 100 µl Probe. Für Maus-Infektionsversuche wurde aus einem Aliquot die gewünschte Infektionsdosis, ggf. nach entsprechender Verdünnung, hergestellt.

B.2.1.2.1 Messung der optischen Dichte

Die Zelldichte von Bakterien in Flüssigkultur wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600 nm}) bestimmt. Dabei diente das jeweilige Nährmedium als Leerwert. Bakterienkulturen mit einer OD_{600 nm} ≥ 1,0 wurden mit dem Medium verdünnt, um eine größere Meßgenauigkeit zu gewährleisten.

B.2.2 Molekularbiologische Methoden

B.2.2.1 Präparation von DNA

Zur analytischen Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde die Übernachtskultur (ca. 5 ml) jeweils mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht inkubiert. Mit Hilfe des *Nucleo Spin Plasmid Kit* wurden bis zu 20 µg (aus 5 ml Bakterienkultur) Plasmid-DNA isoliert. Für die Isolierung großer Plasmidmengen von etwa 300-500 µg (aus 100 ml Bakterienkultur) wurde das *Nucleobond Xtra Midi Kit* verwendet. Es wurde nach den jeweiligen Anweisungen des Herstellers verfahren. Beide Systeme beruhen auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und dem unterschiedlichen Verhalten von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA im alkalischen Milieu. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (s. B.2.2.2.5) und wurde bei -20°C gelagert.

B.2.2.2 Analyse von DNA

B.2.2.2.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kann ein DNA-Fragmentgemisch entsprechend ihrer unterschiedlichen Größen aufgetrennt werden. Dabei wandern negativ geladene DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode und werden aufgrund ihrer Molekularmasse in der Agarosematrix aufgetrennt. Die relative Mobilität des DNA-Fragmentes steht in linearer Abhängigkeit vom Logarithmus der Molekularmasse. Das bedeutet, je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller wandert es durch die polymerisierte Agarose. Je nach DNA-Molekulargewicht wurde eine Agarosekonzentration gewählt, in der eine optimale Auftrennung der Fragmente gewährleistet wurde. Dabei trennen hochprozentige Agarosegele besser kleinere, niederprozentige Gele besser größere DNA-Fragmente auf. Daher wurden für die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten Agarose-Flachbettgele mit einer Agarosekonzentration von 0,8 bis 1,5 % (m/v) eingesetzt. Das zusätzliche Auftragen eines geeigneten Längenstandards ermöglicht die Bestimmung der jeweiligen Fragmentgrößen. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt, auf das Gel geladen und die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 80-120 V für ca. 1 h (je nach Fragmentgröße) durchgeführt.

6x Auftragspuffer: 50 % (v/v) Glycerin; 0,1 mM EDTA; 0,25 % (m/v) Bromphenolblau; pH 7,0

10x TAE: 40 mM Tris/HCl, pH 8,0; 5 mM Essigsäure; 1 mM EDTA

B.2.2.2.2 Visualisierung von DNA

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Agarosegel in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml H₂O_{bidest.}) ca. 15 min angefärbt (je nach Frischegrad des Ethidiumbromid-Wassers). Das in der DNA eingelagerte Ethidiumbromid wird durch die Fluoreszenzanregung mit UV-Licht ($\lambda=260$ nm) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte durch den UV-Transilluminator.

B.2.2.2.3 Präparation von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente und der Färbung im Ethidiumbromid-Bad wurde unter dem UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells die gewünschte Bande als Blöckchen aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Unter Verwendung des *Gel Extraction Kit* wurde nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt und mit H₂O_{bidest.} eluiert.

B.2.2.2.4 Fällung von DNA

Die Ethanolfällung dient der Reinigung von DNA-Lösungen, z.B. nach einem Restriktionsverdau oder der Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen. Natriumacetat (pH 5,2) wurde zu der DNA-Lösung in der Endkonzentration von 0,3 M zugegeben. Es wurde gut gemischt und das 2,5 fache Volumen an kaltem EtOH_{abs.} zugegeben, erneut gut gemischt und durch eine 30 minütige Inkubation bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C für 30 min wurde der Überstand dekantiert und das DNA-Pellet mit kaltem 70 %igem EtOH gewaschen. Die Lösung wurde abermals bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert und das Pellet unter der Sterilwerkbank solange getrocknet, bis die Ethanolreste vollständig verdampft sind. Anschließend wurde die DNA im gewünschten Volumen an H₂O_{bidest.} aufgenommen und bei -20°C gelagert.

B.2.2.2.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde in Quarzküvetten (d=1 cm) bei einer Verdünnung von 1:50 gemessen. Als Nullwert diente H₂O_{bidest.}. Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm (Absorptionsmaximum). Durch eine zusätzliche Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm, können Verunreinigungen der DNA durch Proteine gemessen werden. Der Quotient $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ verringert sich mit zunehmender Verunreinigung der DNA-Probe und beträgt bei sehr reiner DNA annähernd 1,8.

B.2.2.2.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzen und das Leseraster klonierter PCR-Fragmente wurden mittels Sequenzierung überprüft. Sequenzierungsvorgänge wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden entweder 30-100 ng/µl Plasmid-DNA oder 10-50 ng/µl des PCR-Produkts benötigt. Standardprimer wurden von GATC gestellt, spezielle Primer mussten dem Sequenzieransatz mit einer Konzentration von 10 pmol/µl zugesetzt werden. Mit der „DNAMan Software“ (Lynnon Biosoft, Quebec, Kanada) wurde die gelieferte Sequenz mit der entsprechenden Referenz-Sequenz verglichen.

B.2.2.3 Enzymatische Behandlung von DNA

B.2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der spezifischen Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes, die zu Klonierungs-, Mutagenese- oder auch zu Analysezwecke benötigt wird. Zuerst kommt es zu einer Denaturierung, d.h. der Doppelstrang der Ausgangs-DNA wird durch Erhitzen bei 95°C in zwei Einzelstränge getrennt. Danach lagern sich die Primer bei einer Temperatur unter 70°C an die komplementären Einzelstränge an (Hybridisierung). Mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase kommt es nun zur Verlängerung der Primer in Gegenwart von Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs) entlang der DNA-Matrize (Elongation). Die so entstandenen DNA-Doppelstränge werden im nächsten Zyklus wiederum aufgeschmolzen (Denaturierung). Dieser Zyklus von Denaturierung, Anlagerung und Elongation wird ca. 30-35-mal wiederholt und führt so zu einer exponentiellen Amplifikation des entsprechenden DNA-Fragments. Bei der Festlegung der Temperatur zur Hybridisierung der Primer muss deren Schmelztemperatur berücksichtigt werden. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass sie einen möglichst identischen Schmelzpunkt zwischen 52°C und 65°C hatten. Die Temperatur zur Primeranlagerung wurde so gewählt, dass sie 2-4°C unter der Schmelztemperatur lag. Eine Elongationsphase von 5-10 Minuten am Ende der Reaktion ermöglicht das Auffüllen noch unvollständiger DNA-Abschnitte (Saiki *et al.*, 1988). Dabei hängt die Kettenverlängerung von der Länge des zu amplifizierenden Fragments sowie von der eingesetzten Polymerase ab (15 kb/sek bis 2 kb/min). Die PCR-Reaktion wurde in einem automatisierten Thermocycler durchgeführt. Für die Klonierung von PCR-Produkten in bestimmte Vektoren, wurden die Primer mit bestimmten Restriktionschnittstellen und einen Überhang von mindestens 3 Basen (CGC oder ATA) entworfen. Diese Überhänge erlauben eine bessere Erkennung von den entsprechenden Enzymen,

sodass die Bindung und Spaltung der Schnittstellen effizienter ist. Die PCR-Produkte wurden mittels *PCR-Purification Kit* gereinigt und über die passenden Restriktionsschnittstellen in die gewünschten Vektoren kloniert.

B.2.2.3.2 PCR direkt nach der Bakteriolyse

Zur schnellen und einfachen Identifizierung von positiven Klonen, die den Vektor mit dem gewünschten DNA-Fragment enthalten, wurde eine PCR direkt an den Lysaten der einzelnen Bakterienkolonien durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, dass Produkte von einer Größe von 300-600 bp einen positiven Klon markierten. Die einzelnen Bakterienkolonien wurden jeweils in 50 µl LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert und bei 37°C unter leichtem Schütteln für ca. 1 h inkubiert. Für die PCR wurde 2 x *BioMix Red* verwendet, das neben einer Polymerase und Nukleotiden einen roten Auftragspuffer enthält. Pro 20 µl Ansatz wurden 0,2 µl 50 mM MgCl₂, 0,6 µl reines DMSO, 1 µl Rückwärts- und Vorwärtsprimer (je 10 pmol) zugegeben und mit bidest. Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Jeweils 1 µl der Bakteriensuspension wurde zu 19 µl Master-Mix zugegeben, und für die PCR eingesetzt.

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Zu Beginn der Amplifikation wurde eine Anfangsdenaturierung bei 95°C für 1 min und 50 sek vorgeschaltet. Die Denaturierung bei 95°C erfolgte für 40 sek, anschließend die Anlagerung der Oligonukleotide an die einzelnen DNA-Stränge bei 55-60°C für 20 sek und die abschließende Elongation bei 72°C für 30 sek (ca. 1 min pro 1 kb DNA), wobei dieser Zyklus 40-50-mal wiederholt wurde. Auf den letzten Zyklus folgten 5 min Extension bei 72°C, um die Polymerisierung zu vervollständigen. Nach der beendeter Amplifikation wurden die Proben direkt auf das Agarosegel aufgetragen.

B.2.2.3.3 PCR zur Herstellung von yop-Mutanten mit Tetracystein-tag mittels homologer Rekombination (ET-Klonierung)

Die ET-Klonierung wurde erstmals an *E. coli* entwickelt (Zhang *et al.*, 1998) und ermöglicht eine direkte Mutagenese, ohne die aufwendige Konstruktion von Plasmiden, wie sie bei den klassischen Klonierungsstrategien erforderlich ist. Das Prinzip der ET-Klonierung beruht auf der homologen Rekombination eines PCR-Fragments mit der entsprechenden homologen Sequenz zum Genabschnitt im Chromosom oder auf einem Plasmid. Ein zusätzlich eingeführtes Plasmid, pKD46, kodiert für zwei Rekombinasen red α und red β , sowie einen Exonukleaseinhibitor red γ . Diese werden durch den Arabinose induzierbaren Promotor P_{araB} kontrolliert. In die mit pKD46 ausgestatteten Bakterien wird ein lineares PCR-Fragment (Sequenz für die Kanamycin-Resistenzkassette, die beidseitig durch homologe Sequenzen

des anzusteuernenden Gens flankiert ist) transformiert. Das PCR-Fragment kann dann mit dem entsprechenden Genabschnitt auf dem Plasmid (pYV) homolog rekombinieren. Die Primer enthalten neben den homologen Sequenzen des anzusteuernenden Gens, an ihren 3'-Enden komplementäre Sequenzen zur Kanamycin-Kassette. Die optimale Länge der Primer beträgt 50 bp. Der Tetracystein-tag wurde in dem Vorwärtsprimer, zwischen dem Homologiearm und der Kanamycinkassette eingebaut.

DNA-Abschnitte von bestimmten Yop-Genen, die mit einer für Tetracystein-tag kodierenden Sequenz fusioniert sind, wurden mittels *Expand high fidelity PCR System* amplifiziert. Dieses PCR System beinhaltet ein Enzymgemisch, bestehend aus einer thermostabilen Taq DNA-Polymerase und einer thermostabilen Tgo DNA-Polymerase, die für das Korrekturlesen zuständig ist (Fehlerhäufigkeit liegt bei ca. $4,8 \times 10^{-6}$ pro eingebauter Base).

Für die PCR wurden standardmäßig jeweils 10 µl 2 mM dNTP-Mix (100 µM jedes einzelnen dNTPs; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), je 1 µl der Primer (100 µM), 10xPuffer und 2,5 U der *Expand high fidelity polymerase* eingesetzt und mit $H_2O_{\text{bidest.}}$ auf 100 µl aufgefüllt. Als Matrize dienten jeweils Verdünnungen vom Vektor pACYC177.

Die PCR-Bedingungen verliefen wie folgt: Zu Beginn der Amplifikation wurden 5 min Anfangsdenaturierung bei 94°C vorgeschaltet. Die Denaturierung bei 94°C erfolgte für 5 min, anschließend die Anlagerung der Oligonukleotide bei 54-58°C für 2 min und die abschließende Extension bei 72°C für 2 min, wobei dieser Zyklus 35 mal wiederholt wurde. Auf den letzten Zyklus folgten 7 min Extension bei 72°C, um die Polymerisierung zu vervollständigen. Der Erfolg der PCR wurde über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (s. B.2.2.2.1).

B.2.2.3.4 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind in der Lage, bestimmte DNA-Abschnitte der doppelsträngigen DNA (sog. Palindrome) zu erkennen und diese spezifisch zu schneiden. Die so entstandenen Teilstücke besitzen charakteristische Enden, die anschließend ein gezieltes Zusammenbringen mit anderen DNA-Fragmenten ermöglichen. Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) empfohlenen Puffersystem. Bei einem Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurde pro 1 µg Plasmid-DNA 1-3 U Enzym eingesetzt. Die Inkubationszeit für einen vollständigen Verdau der Plasmide betrug 2-16 h bei 37°C. Mehrfachspaltungen wurden, soweit möglich, in einem Puffer durchgeführt. Zur Analyse des Restriktionsansatzes wurde eine elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel durchgeführt. Wenn ein herausgeschnittenes DNA-Fragment zur weiteren Klonierung benötigt wurde, wurde es nach der Gelelektrophorese als Blöckchen

aus dem Gel geschnitten und extrahiert (s. B.2.2.2). PCR-Produkte, die Restriktionsschnittstellen an ihren 5'-Enden aufwiesen, und damit in den Zielvektor kloniert werden sollten, wurden über Nacht verdaut. Nach der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen bei 65°C bzw. 80°C für 20 min, wurden die PCR-Produkte direkt für die Ligation in den Zielvektor verwendet (s. übernächster Abschnitt). Auch der Zielvektor wurde über Nacht mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten und vor der Ligation wurden diese inaktiviert, um jegliche Störung der Ligation zu vermeiden.

B.2.2.3.5 Dephosphorylierung von DNA

Damit linearisierte Vektor-DNA nicht religieren kann wurden die 5'-Phosphatgruppen am Vektorende durch die Behandlung mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) abgespalten. Dabei wurde der Reaktionsansatz mit 1 U/µl Enzym im entsprechenden Puffersystem eingesetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch ein 15 minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert. Die so behandelte Vektor-DNA wurde für die Ligation eingesetzt (s. nächster Abschnitt).

B.2.2.3.6 Ligation

Bevor eine DNA-Sequenz (Insert) in einen Vektor kloniert werden kann, müssen beide, Vektor und Insert kompatible Enden aufweisen, über die das Insert in den Vektor ligiert werden kann.

Die Ligation erfolgte mittels T4-DNA-Ligase in einer Konzentration von 5 U/µl im jeweiligen Ligasepuffer bei Raumtemperatur für ca. 3 h oder bei 16°C über Nacht. Das DNA-Fragment wurde im Überschuss zum Ligationsansatz gegeben, meist in einem Verhältnis 1:5 Vektor zu Insert, wobei maximal 100 ng Vektor bei 20 µl Reaktionsvolumen eingesetzt wurden. Das Mengenverhältnis wurde entweder über die Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt oder photometrisch bestimmt. Nach beendeter Ligation wurde die Ligase durch Inkubation für 15 min bei 65°C inaktiviert und nach dem Abkühlen wurde der Ligationsansatz für die Transformation verwendet (s. B.2.2.5).

B.2.2.3.7 Zwischenklonierung

Bestimmte DNA-Fragmente wurden in gewünschte Vektoren über entsprechende Restriktionsschnittstellen ligiert oder zuerst unter Verwendung von *TOPO TA Cloning Kit* in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor zwischenkloniert, bevor sie in die jeweiligen Expressionsvektoren ligiert wurden. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Dieser Vektor wurde vom Hersteller linear mit einem 5'-T-Überhang geliefert. Um PCR-Produkte in

diesen Vektor zu ligieren, wurden 3´A-Überhänge an die „*blunt-ends*“ der PCR-Produkte angefügt. Dazu wurde dem PCR-Produkt 1 µl *Taq*-Polymerase und 1 µl dATPs zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 72°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde das PCR-Produkt für die Ligation eingesetzt. Nach der Transformation des Ligationsansatzes in chemisch kompetente *E. coli* und der darauf folgenden Inkubation, wurde der Transformationsansatz auf Selektionsplatten (LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert. Die gewachsenen Transformanden wurden auf den klonierten DNA-Bereich hin kontrolliert. Positive Klone wurden entweder durch die PCR direkt nach der Bakteriolyse oder durch eine Plasmidpräparation mit anschließendem Verdau durch Restriktionsenzyme, ermittelt.

B.2.2.4 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

B.2.2.4.1 Herstellung Calcium-kompetenter E. coli-Zellen

Für die Transformation wurden *E. coli*-Zellen verwendet, die durch die SEM-Herstellung (*Simple and Efficient Method*) eine hohe Transformationsfrequenz ($1-3 \times 10^9$ cfu/µg Plasmid-DNA) besitzen. Eine Übernachtskultur wurde ca. 1:100 ($OD_{600\text{ nm}} 0,005$) in 250 ml LB-Medium verdünnt und in einem 2 l Kolben bei 18°C unter starkem Schütteln (150-200 g) bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 kultiviert. Nach Erreichen dieses OD-Werts wurden die Bakterien 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 5.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 80 ml eiskalter TB-Lösung resuspendiert, wiederum 10 min auf Eis inkubiert und erneut für 10 min bei 5.000 g und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet vorsichtig in 20 ml eiskalter TB-Lösung resuspendiert und DMSO wurde bis zu einer Endkonzentration von 7 % zugegeben. Nach einem erneuten Inkubieren der Zellen für 10 min auf Eis, wurden die nun kompetenten Bakterien in spezielle Einfriergefäße zu je 200 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff (-198°C) eingefroren und gelagert.

TB-Puffer: 10 mM Pipes; 15 mM $CaCl_2$; 250 mM KCl, pH 6,7; 55 mM $MnCl_2$ (Endkonzentration)

B.2.2.4.2 Herstellung elektrokompetenter Yersinien

Eine ÜK wurde 1:40 in 100 ml BHI-Medium und entsprechendem Antibiotikum verdünnt und bei 27°C bis zu einer OD_{600} von 0,3 bis 0,5 angezogen und anschließend 10-15 min auf Eis inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C mit vorgekühlten Geräten und Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert (10 min bei 4.200 g) und zweimal mit 30 ml $H_2O_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Ein letzter Waschschrift erfolgte in 10 %igem Glycerin. Je nach Größe des gewonnenen Pellets wurden die nun elektrokompetenten Zellen in 0,5-1,5 ml 10 %iger Glycerin-Lösung resuspendiert, zu je 100 µl in vorgekühlte autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert, in Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

B.2.2.4.3 Herstellung elektrokompetenter Yersinien für die homologe Rekombiantion

Für die ET-Klonierung zur Herstellung von Mutanten die mit einem Tetracystein-tag an einem Yop-Protein versehen wurden, wurden zuerst elektrokompetente Yersinien hergestellt (wie im letzten Abschnitt beschrieben), in die dann der Vektor pKD46 elektroporiert wurde. Nach der Transformation wurden die Klone auf Amp^R-Agarplatten selektioniert. Nach Überprüfung der Transformanden durch eine Plasmid-Präparation (s. B.2.2.1) wurde ein als positiv identifizierter Klon erneut elektrokompetent gemacht. Dabei wurde eine ÜK 1:40 in LB-Medium verdünnt, Ampicillin mit einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben sowie mit 0,1 % L-Arabinose, zur Induktion der Rekombinasefunktionen, versetzt. Die Bakteriensuspension wurde bei 27°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,4 inkubiert, anschließend für 10-15 min auf Eis gestellt und dann dreimal je 10 min bei 4.200 g und 4°C in autoklavierter eiskalter 10 %iger Glycerin-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsvorgang wurde das Bakterienpellet, je nach Größe, in 300-500 µl 10 %igem Glycerin aufgenommen, zu je 100 µl aliquotiert und direkt für eine Transformation bereitgestellt. Die restlichen Aliquots wurden sofort schockgefroren und bei -80°C gelagert.

B.2.2.5 Transformation

B.2.2.5.1 Transformation von E. coli mittels Calcium-Methode

Ein Aliquot Calcium-kompetenter Bakterien (s. B.2.2.4.1) wurde auf Eis aufgetaut mit 1-10 µl einer Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 90 sek und eine weitere Inkubation auf Eis für etwa 5 min. Die Bakteriensuspension wurde mit 800 µl vorgewärmten SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37°C regeneriert. Davon wurden 100 µl direkt von der Bakteriensuspension abgenommen und auf eine entsprechende Selektionsagarplatte ausplattiert. Der Rest der Bakteriensuspension wurde bei 5.000 g für 30 sek abzentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt, die Bakterien in dem verbleibenden Medium (ca. 50 µl) resuspendiert und auf eine weitere Selektionsagarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Als Kontrollen wurden Transformationsansätze ohne Plasmid mitgeführt.

SOC-Medium: 2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; autoklavieren;
10 mM MgCl₂ x 6H₂O und 1 M MgSO₄ x 7H₂O, sterilfiltriert; 2 mM Glukose, sterilfiltriert

B.2.2.5.2 Transformation elektrokompetenter Yersinien

Ein Aliquot elektrokompetenter Yersinien wurde auf Eis aufgetaut und in eine gereinigte und vorgekühlte Transformationsküvette transferiert. Es wurde die zu transformierende Plasmid-DNA oder der Ligationsansatz zugegeben und in einem Elektroporationsgerät bei einer

Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 μ F und einem Widerstand von 200 Ω elektroporiert. Die Zeit des Strompulses betrug etwa 4-5 msek. Die elektroporierten Bakterien wurden in 1 ml BHI-Medium überführt und 1 h bei 27°C geschüttelt. Anschließend wurden direkt 100 μ l der Zellsuspension auf eine entsprechende Selektionsplatte ausplattiert. Der Rest der Zellsuspension wurde bei 5.000 g für 30 sek abzentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt, die Bakterien in dem verbleibenden Medium resuspendiert und auf eine weitere Selektionsagarplatte ausplattiert. Diese beiden Platten wurden für 1-2 Tage bei 27°C inkubiert.

B.2.3 Biochemische Methoden

B.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Um die Proteinmenge zu bestimmen, wurde die Proteinquantifizierung nach Bradford angewandt. Dafür wurde ein Farbstoff-Konzentrat (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) verwendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch die Bindung des sauren Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau an Proteine kommt es zu einem Farbumschlag von rotbraun zu blau, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 595 nm liegt. Die Absorption wurde photometrisch bestimmt und mit Hilfe einer Eichgeraden, die mit einer Stammlösung aus BSA (1-50 µg) angefertigt wurde, konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

B.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nicht nur DNA-Moleküle können im elektrischen Feld auf Grund ihrer Ladung durch die Elektrophorese aufgetrennt werden, sondern auch Proteine. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine zunächst im SDS-Probenpuffer bei 95°C für 5 min gekocht (denaturiert). Das in dem Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert dabei vorhandene Disulfidbrücken zwischen Cysteinen, während das anionische Detergenz SDS die Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Strukturen der Proteine löst, wodurch die Proteine komplett entfaltet werden. Dadurch dass SDS an die Polypeptide quantitativ bindet (ein Molekül SDS pro zwei Aminosäurereste), wird die Eigenladung der Proteine überdeckt. Es entstehen Mizellen mit konstanter negativer Ladung. Dadurch wandern die Moleküle auf einem elektrischen Feld zur Anode und werden proportional zur Größe des Polypeptids und somit zum Molekulargewicht getrennt. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach dem Protokoll von Laemmli (1970). Die Laufrichtung verlief vertikal und besaß eine Länge von etwa 6 cm (kleine Gele; Mini Protean 3, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) bzw. 15 cm (große Gele; Hoefer SE 400, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Trenn- und Sammelgele wurden nach dem Protokoll von Sambrook *et al.*, (1989) angefertigt. Bei kleinen Gelen wurde die Auftrennung bei 150 V für ca. 1 h und 15 min durchgeführt, während die großen Gele bei 250 V etwa 3 h liefen. Als Größenstandard wurde der BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder oder der SeeBlue® Plus2, prestained verwendet (s. Tab. 10). Nach dem Gellauf wurden die Proteine entweder für einen anschließenden Immunoblot auf Nitrozellulose einer oder PVDF-Membran transferiert oder

die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Blau sichtbar gemacht (s. nächste Abschnitte).

Trenngel 10 %:	3,7 ml 30 %iges Acrylamid; 5,0 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 200 µl 10 %iges SDS; 20 µl TEMED; 40 µl APS; 1,1 ml H ₂ O _{bidest.}
Sammelgel 3 %:	0,37 ml 30 %iges Acrylamid, 1,1 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 50 µl 10 %iges SDS, 20 µl TEMED; 20 µl APS; 0,85 ml H ₂ O _{bidest.}
10x Lauffuffer:	25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS
2x SDS-Probenpuffer:	125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 0,3 mM Bromphenolblau; 2 % (m/v) β-Mercaptoethanol

B.2.3.3 Detektion von Proteinen

B.2.3.3.1 Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel für ca. 45 min mit der Coomassie-Lösung bei RT unter mechanischem Schwenken gefärbt. Dabei bindet dieser Triphenylmethanfarbstoff unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitengruppen von Polypeptiden. Zur anschließenden Entfärbung wurde das Gel mit der Entfärbelösung mehrere Male gewaschen, bis das Gel entfärbt, die Proteinbanden aber sichtbar blau markiert waren. Mit Hilfe eines mit aufgetragenen Proteinmarkers konnten die Molekulargewichte der Proteine bestimmt werden.

Coomassie Blau-Färbelösung:	0,1 % <i>Coomassie Brilliant Blue</i> R250 in 40 % Methanol und 7 % Essigsäure
Entfärbelösung:	50 % (v/v) Methanol; 7,5 % (v/v) Essigsäure

B.2.3.3.2 Proteintransfer auf Membranen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im SDS-Gel, wurden die Proteine mit Hilfe des elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulose bzw. eine PVDF-Transfermembran übertragen (Elektroblot) und immobilisiert, wobei das Trennungsmuster der Proteine erhalten bleibt. Im Gegensatz zur Nitrozellulose-Membran wurde die PVDF-Membran zuerst auf beiden Seiten für etwa 5 sek in Methanol geschwenkt. Nachdem Gel und Transfermembran im Blotpuffer für 5-10 min äquilibriert wurden, wurden sie luftblasenfrei zwischen zwei Blotpuffer-getränkten Schwämmen und zwei Lagen „Whatmanpapier“ gelegt und in eine Tankblotkammer eingesetzt, die mit Blotpuffer gefüllt wurde. Der Proteintransfer aus einem Gel erfolgte unter Kühlung bei 80 V für 30-45 min. Wenn gleichzeitig zwei Gele geblotet wurden, fand der Transfer bei 100 V für 1 h statt. Bei dem Transfer von großen SDS-Gelen wurde über Nacht bei 4°C und bei 40 V für etwa 16 h geblotet.

1x Blotpuffer:	25 mM Tris; 190 mM Glycin; 10-20 % Methanol (v/v) (nur bei PVDF-Membran)
-----------------------	--

B.2.3.3.3 PonceauS Rot-Färbung

Die PonceauS Rot-Färbung ermöglicht das reversible Anfärben von immobilisierten Proteinen einer Transfermembran und stellt dadurch eine Kontrolle des Proteintransfers dar. Die Membran wurde nach dem Transfer etwa 1-2 min mit PonceauS Rot-Färbelösung geschwenkt und anschließend unter Wasser solange gespült, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Der Proteinstandard oder spezielle Banden in den Proben wurden bei Bedarf mit Bleistift markiert. Ansonsten konnte sofort mit der Immundetektion begonnen werden und die unspezifischen Proteinbindestellen auf der Membran mit der Blockierungslösung abgesättigt werden, ohne die rote Färbung vorher vollständig abzuwaschen.

PonceauS Rot: 2 % Ponceau in 3 % Trichloressigsäure

B.2.3.3.4 Indirekte Immundetektion von Proteinen (Western Blot, Elektroblob)

Die Detektion von Proteinen in einem Immunoblot beruht auf einer Bindung eines spezifischen Antikörpers an das entsprechende Antigen. Diese Methode wurde durchgeführt, um in *Y. enterocolitica* oder in *E. coli* exprimierte Proteine spezifisch nachweisen zu können. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die freien Bindungsstellen geblockt, bevor die Membran mit dem spezifischen Primärantikörper inkubiert wurde. Daher wurden die Membranen entweder 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht in Blockierungspuffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für etwas 5 min mit TBS-T-Puffer erfolgte die Bindung des Erstantikörpers unter leichtem Schwenken bei RT für 1 h. Hierzu wurde der Primärantikörper 1:1.000 bzw. 1:5.000 in TBS-T-Puffer verdünnt und pro Membran, transferiert von kleinen SDS-Gelen, in einem Volumen von 10 ml eingesetzt (bei großen Membranen 25 ml). Nach der Inkubation wurde nicht-gebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen in TBS-T für je 5 min entfernt. Zur Detektion des ersten Antikörpers wurde die Membran dann für 1 h mit einem zweiten Antikörper inkubiert, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet und gleichzeitig mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) konjugiert ist. Der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus bzw. Kaninchen wurde 1:10.000 in TBS-T-Puffer verdünnt, eingesetzt. Nach erneutem Waschen, wurde die Membran mit Detektions-Reagenzien 1 und 2 (im Verhältnis 1:1 gemischt) des ECL-Kits für 2 min bei RT unter leichtem Schwenken versetzt. Anschließend wurde die Membran in handelsüblicher Haushaltsfolie eingewickelt und in einer Autoradiographie-Kassette fixiert. Die Chemilumineszenz bei der ECL-Färbung entsteht durch die Zugabe von Peroxidasesubstrat und Luminol zum Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Peroxidase ist ein Enzym, dass die Oxidation von Luminol katalysiert und damit Licht emittiert, welches auf Autoradiographie-Filme (Fuji Foto Film, Düsseldorf, Deutschland)

sichtbar gemacht werden kann. Für die Belichtung wurden mehrere Autoradiographie-Filme je nach Stärke des Luminiszenzsignals unterschiedlich lang belichtet. Die Entwicklung der belichteten Filme erfolgte automatisch in einem Entwicklungsgerät.

TBS-T: 40 mM Tris/HCl pH 7,4; 200 mM NaCl; 0,1 % Tween-20

Blockierungspuffer: 10 % Milchpulver und 1 % BSA in TBS-T

B.2.3.3.5 „Strippen“ einer Blot-Membran

Um dieselbe Blotmembran, die bereits schon mit Antikörpern beladen und entwickelt wurde auch mit anderen Antikörpern zur Detektion anderer Proteine inkubieren zu können, musste der spezifisch gebundene Primärantikörper entfernt werden, was als sog. „Strippen“ bezeichnet wird. Dazu wurde die Transfermembran mit „Strip“-Puffer für 30 min in einem 50°C heißen Wasserbad inkubiert. Das in der „Strip“-Lösung enthaltene SDS und DTT führen zur Denaturierung des Antikörpers. Anschließend wurde die Membran 2x mit TBS-T gewaschen, um die Membran von der restlichen „Strip“-Flüssigkeit zu befreien. Danach wurde erneut für 1 h oder bevorzugt über Nacht geblockt. Nach dem Blocken wurde, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, weiter verfahren.

„Strip“-Puffer: 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7; 2 % SDS; 50 mM DTT (frisch zugeben)

B.2.3.4 Isolierung von sekretierten Yop-Proteinen aus dem Kulturüberstand

Bei einer Temperatur von 37°C und unter Ca²⁺-Mangel erfolgt im BHI-Medium die Sekretion der Yop-Proteine (sog. freigesetzte Proteine, FP) in den Kulturüberstand (Heesemann *et al.*, 1986). Eine *Yersinia*-Übernachtskultur (27°C, Zusatz von Antibiotika) wurde 1:40 in BHI-Medium verdünnt und bei 37°C für 2 h inkubiert. Die Stimulation der Sekretion erfolgte durch Zugabe von EGTA, Glukose und MgCl₂ bei 37°C für weitere 3 h. Danach wurden die Bakterien für 15 min bei 4.200 g und 4°C zentrifugiert und die sekretierten Proteine im Kulturüberstand mit TCA gefällt (s. B.2.3.4.2). Aus dem übrig gebliebenen Pellet wurde ein Zellysat hergestellt (s. nächster Abschnitt).

Stimulationssupplemente: 5 mM EGTA; 0,2 % (^m/_v) Glukose; 10 mM MgCl₂

B.2.3.4.1 Herstellung von Zellysaten

Das Bakterienpellet wurde mit 200 µl *Bug Buster* versetzt und für etwa 30 min bei RT schwenkend lysiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 16.000 g für 20 min bei 4°C entfernt. Vom Überstand wurden 20 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in 20 µl Probenpuffer gelöst und aufgeköcht. Dieses Zellysat wurde neben den freigesetzten Yop-Proteinen auf ein SDS-Gel aufgetragen und bildet die Kontrolle des intakten Bakteriums.

B.2.3.4.2 Trichloressigsäure-Fällung (TCA)

Die TCA-Fällung ist eine denaturierende Fällung der Proteine aus dem Kulturüberstand und wird angewendet, um Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufzutrennen und zu detektieren. Zum Präzipitieren der Proteine wurde der Kulturüberstand mit 10 %iger ($\%_v$) Trichloressigsäure versetzt und über Nacht auf Eis bei 4°C gefällt. Danach wurde bei 14.000 g und 4°C für 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Säure im Pellet wurde mit eiskaltem Aceton herausgewaschen und bei 12.000 g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Der letzte Waschschrift erfolgte mit $H_2O_{bidest.}$ Das Pellet wurde in Probenpuffer aufgenommen, aufgeköcht und auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. B.2.3.2) und analysiert.

B.2.3.5 Nitrocefin vermittelter β -Laktamase-Assay

Um zu überprüfen, ob die in den hergestellten Yop-Bla-Konstrukten exprimierte β -Laktamase sezerniert wird oder um die Aktivität der β -Laktamase messen zu können, wurde das Substrat Nitrocefin eingesetzt. Nitrocefin ist ein chromogenes Cephalosporin mit einem Extinktionsmaximum bei $\lambda = 390$ nm (gelb). Wird die Amidbindung des β -Laktamrings durch eine β -Laktamase hydrolysiert, so verschiebt sich das Extinktionsmaximum von gelb nach rot (486 nm). Das lyophilisierte Nitrocefinpulver wurde in 1,9 ml Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) und 0,1 ml Dimethylsulphoxid gelöst, gut gemischt, in lichtundurchlässige Eppendorfgefäße portioniert und bei -20°C gelagert.

Von den Reporter-Yersinien wurden die sekretierten Yops aus dem Kulturüberstand isoliert (s. B.2.3.4). Anschließend wurden je 100 μ l der Kulturüberstände in schwarzen 96er Mikrotiterplatten mit durchsichtigen Böden pipettiert und kurz bevor die Platte in den *microplate reader* (Fluostar Optima, BMG Labtech, Jena, Deutschland) gelegt wurde, wurden je 5 μ l der Nitrocefin-Lösung zugegeben. Sofort nach der Zugabe des Nitrocefins wurde die Intensität des jeweiligen Farbumschlages photometrisch bestimmt.

B.2.3.6 Lumio™ *In-Gel-Färbung zur Detektion des FIAsh-tags*

Die Lumio™ *In-Gel-Färbung* (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) basiert auf der FIAsh (*Fluorescein Arsenical Hairpin Binder*)-Technologie, die arsenhaltige Reagenzien benutzt, um am Tetracysteinmotiv von Proteinen zu binden und diese somit zu detektieren (Griffin *et al.*, 1998). Das dabei verwendete Lumio™ *Green-Detection*-Reagenz enthält zwei Arsengruppen und ist nicht fluoreszent. Erst durch die Bindung an den Tetracystein-tag in der jeweiligen *yop*-Sequenz, wird eine Fluoreszenz erzeugt, die im SDS-Gel mittels Fluoreszenzimager detektiert werden kann.

Das Färben der Yop Proteine, die mit dem Tetracysteinmotiv fusioniert sind, erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Dazu wurden sekretierte Yop-Proteine, fusioniert mit einem Tetracystein-tag, aus dem Überstand von Yersinienstämmen gewonnen (s. B.2.3.4). Das Fusionieren des Tetracystein-tags am spezifischen Yop-Protein erfolgte mittels ET-Klonierung, wie in Kapitel B.2.2.6 beschrieben.

Aus 2 ml sekretiertem Überstand wurde das gewonnene Pellet nach Fällung mit TCA (s. B.2.3.4.2) in 20 µl 1x Lumio™ Gel-Probenpuffer resuspendiert. Zu den Proteinproben wurden 0,2 µl Lumio™ *Green-Detection*-Reagenz hinzugefügt, gut gemischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben nach dem Abkühlen kurz abzentrifugiert und 2 µl Lumio™ *In-Gel-Detection-Enhancer* wurde hinzugefügt, gut gemischt und 5 min bei RT stehen gelassen. Von den angefärbten Proteinproben wurden jeweils 10 µl auf 10-12 % SDS-Gele (s. B.2.3.2) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Beenden des Gellaufes wurde das Gel auf den Fluoreszenzimager aufgelegt und die Fluoreszenz detektiert und dokumentiert. Dieselben Proben wurden auf ein zweites SDS-Gel aufgetragen und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Der Western Blot (s. B.2.3.3.2) gab Aufschluss über die Sekretion von Yop-Proteinen, fusioniert mit Tetracystein-tag, im Vergleich zu Yop-Proteinen vom *Yersinia*-Wildstamm WA(pYV). Da mit dieser Lumio™-Färbung sekretierte Proteine, außerhalb der Bakterienzelle, angefärbt werden, wird sie im Folgenden auch Lumio™-Post-Färbung benannt.

B.2.4 Zellbiologische und immunologische Methoden

B.2.4.1 Kultivierung von Zelllinien

B.2.4.1.1 Kultivierung von HeLa und HEK-293-Zellen

HeLa (Epithelzellen des Cervixkarzinoms von Henrietta Lacks) sowie HEK-293 (Human embryonic kidney)-Zellen wurden in 13 ml Voll-Medium in Gewebekulturflaschen (80 cm², 175 cm², NUNC, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ gesättigter Atmosphäre kultiviert. Sollten konfluente Zellen passagiert werden, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit sterilem PBS durch vorsichtiges Schwenken gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA (1x, Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) beschichtet und für ca. 2 min bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Untergrund wurde durch Klopfen gegen die Kulturflasche unterstützt und das Trypsin wurde durch Zugabe von 5 ml Voll-Medium inaktiviert, sowie das zytotoxische EDTA gebunden. Die abgelösten Zellen wurden bei 400 g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in entsprechender Verdünnung im Kulturmedium resuspendiert und dann in frische Kulturflaschen überführt.

Voll-Medium: DMEM mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES

B.2.4.1.2 Kultivierung von GM-CSF exprimierenden GX3-Zellen

GX3-Zellen sind Zellen, die mit murinem GM-CSF-Gen stabil transfiziert sind (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) und dieses Zytokin in den Kulturüberstand sekretieren. Dieser Faktor wird zur Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen aus Knochenmarkzellen benötigt. Die Anzucht der GX3-GM-CSF-Zellen erfolgte in einer 75 cm² Zellkulturflasche mit 12 ml Medium unter Zugabe von G418, wobei die Zellen beim Erreichen einer Zelldichte von ca. 70-80 % auf zwei Flaschen verteilt wurden. Ein Teil der Zellen wurde weggefroren. Dabei wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in Einfriermedium resuspendiert und auf Kryoröhrchen verteilt, die sofort bei -80°C gelagert wurden. Der Rest der Zellen wurde auf 175 cm² Kulturflaschen überführt, je 100 ml Medium ohne G418 zugegeben, gut verteilt und solange bei 37°C inkubiert, bis die Zellen kurz vor dem Absterben waren, was etwa 10 Tage dauerte. Das Medium wurde bei 300 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert. Der GM-CSF enthaltende Zell-Überstand wurde in 50 ml Falcontubes aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Einfriermedium: 45 % FCS; 10 % DMSO in DMEM

B.2.4.1.3 Kultivierung von M-CSF exprimierenden L929-Zellen

L929-Zellen sind murine Fibroblasten, die M-CSF (*Monocyte Colony Stimulating Factor*) in den Kulturüberstand sekretieren, welches die Differenzierung von Knochenmarkzellen zu Monozyten induziert. Die adhärenen L929-Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und nach 3 Tagen trypsiniert, abzentrifugiert und auf mehrere Flaschen verteilt. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen erneut trypsiniert, abzentrifugiert und auf die doppelte Menge an Zellkulturflaschen verteilt. Nun wurden bei ca. 50 %iger Konfluenz alle zwei Tage der Überstand gesammelt und frisches Medium auf die Zellen gegeben. Dies wurde solange wiederholt, bis sich die Zellen vom Boden abgelöst haben (etwa 3-mal). Der gesammelte Kulturüberstand wurde zuerst durch einen Faltenfilter, danach durch eine Sterilfiltermembran mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert und in Aliquots zu je 50 ml bei -20°C eingefroren.

Kulturmedium: 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin; 10 % FCS;
50 µM β-Mercaptoethanol in DMEM

B.2.4.1.4 Zellzahlbestimmung

Um Versuche miteinander vergleichen zu können, wurden genau definierte Zellzahlen eingesetzt. Die Zellzahl wurde im Anschluss an die Trypsinierung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Färbung wurde die Zellsuspension 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung (0,5 % in PBS) gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der nur die zerstörte Zellmembran von toten Zellen durchdringen kann und diese tiefblau färbt. Dadurch können tote Zellen von den lebenden Zellen unterschieden werden. Es wurden mindestens zwei der vier Großquadrate (in je 4 x 4 Quadrate unterteilt) unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen pro ml wurde mit folgender Formel ermittelt: Mittelwert der vier Quadrate x Verdünnungsfaktor x 10⁴.

B.2.4.1.5 Kryokonservierung der Zellen

Die Zellen (10⁶-10⁷) wurden 5 min bei 400 g sedimentiert, in vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und zunächst für 24 h bei -20°C, dann bei -80°C gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Zellen erfolgte sehr schnell, um die toxische Wirkung von DMSO zu verhindern. Daher wurde die Zellsuspension zuerst in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, in 37°C vorgewärmtem Medium gewaschen und anschließend in der entsprechenden Gewebekulturflasche bei 37°C kultiviert.

Einfriermedium: 10 % DMSO, 20 % FCS in DMEM

B.2.4.2 Gewinnung von Makrophagen und DCs aus dem Knochenmark

Tibia- und Femurknochen wurden aus den Mäusen präpariert und von Geweberesten befreit. Die Sehne zwischen Ober- und Unterschenkelknochen wurde durchtrennt und die Knochen durch kurzes Schwenken in Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden die Knochen mit viel PBS gespült und die jeweiligen Knochenenden unter sterilen Bedingungen abgeschnitten. Das Knochenmark wurde mit einer Injektionsnadel (0,45 µm Durchmesser) und kaltem PBS ausgespült und im Falcon auf Eis gesammelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit PBS für 10 min bei 400 g und 4°C gewaschen. Anschließend wurden die Zellen, je nach Ausdifferenzierungsart, in M-CSF-Medium (für Makrophagen) oder in GM-CSF-Medium (für DCs) resuspendiert, gezählt und in bakteriologische Petrischalen (5x10⁶ pro Schale und 10 ml Medium) bei 37°C und 5 % CO₂ gesättigter Atmosphäre inkubiert.

B.2.4.2.1 Ausdifferenzierung zu DCs

Zur Ausdifferenzierung der Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen (DCs) wurde ein GM-CSF konditioniertes Medium verwendet (Lutz *et al.*, 1999). Drei Tage nach der Knochenmarksentnahme wurden den Zellen 10 ml frisch angereichertes Medium zugefügt. Nach weiteren 3 und 4 Tagen wurden jeweils 10 ml des Kulturüberstandes abzentrifugiert, das Zellpellet in frisch angereichertem Medium sanft resuspendiert und zurück in die Petrischale zu der adhärenen Fraktion gegeben. Schließlich sollten am 9. Tag etwa 75 % der Zellen zu dendritischen Zellen ausdifferenziert sein. Die nicht adhärenen Zellen wurden mit Medium vorsichtig vom Plattenboden gespült, in ein Falcontube überführt und abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit DMEM, ohne GM-CSF und FCS, gewaschen, in diesem resuspendiert und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert, um dann in Versuch genommen zu werden.

DC-Medium: 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin; 10 % FCS; 15 % GM-CSF;
50 µM β-Mercaptoethanol in DMEM

B.2.4.2.2 Ausdifferenzierung zu Makrophagen

Zur Ausdifferenzierung zu Makrophagen aus isolierten Knochenmarkszellen wurde M-CSF konditioniertes Medium (LCCM) verwendet. Ein Tag nach der Knochenmarksentnahme wurden nicht-adhärenente Zellen abgespült, ausgezählt und 5x10⁶ Zellen pro Zellkulturschale ausgesät. Am dritten Tag wurde 1x Volumen an M-CSF-Medium zugegeben und für weitere 5 Tage bebrütet. Schließlich waren die Zellen 8 Tage nach der Knochenmarksentnahme zu Makrophagen ausdifferenziert. Die Zellen wurden durch gründliches Pipettieren

aufgenommen, mit DMEM, ohne LCCM und FCS, gewaschen und in diesem für weitere 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für Versuche eingesetzt.

M-CSF-Medium: 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin; 10 % FCS; 15 % LCCM;
50 µM β-Mercaptoethanol in DMEM

B.2.5 Infektionsbiologische Methoden

B.2.5.1 *In vitro* Infektionsversuche

B.2.5.1.1 Vorbereitung von Yersinien für *in vitro* Infektionsversuche

Eine Übernachtskultur von *Y. enterocolitica* wurde 1:40 in einem Endvolumen von 5 ml BHI-Medium verdünnt und 90 min bis 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Es wurde 2,5 mM CaCl₂ zugegeben, um eine Yop-Sekretion in den Kulturüberstand zu inhibieren, aber dennoch die Yop-Synthese zu induzieren. Nach der Inkubation wurden die Kulturen für 5 min auf Eis gestellt, anschließend 10 min bei 4.500 g zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in dem jeweiligen Infektionsmedium resuspendiert. Danach wurde die optische Dichte bei $\lambda=600$ nm gemessen. Um sicher zu stellen, dass eine Infektion mit einer definierten Bakterienkonzentration durchgeführt wird, wurde eine Bakterienzahl von 5×10^7 Yersinien/15 μ l mit der Formel:

$$x = \frac{\text{gemessene OD}_{600\text{nm}} * \text{Volumen}}{0,36} - \text{Volumen}$$

bestimmt. Die Infektion der eukaryotischen Zellen wurde je nach Bedarf mit einer MOI (*multiplicity of infection* = Verhältnis von Anzahl der Bakterien zur Anzahl eukaryotischer Zellen) von 5, 25, 50 oder 100 durchgeführt.

B.2.5.1.2 Infektion von Zellen

Ein Tag vor dem Infektionsexperiment wurden Deckgläschen mit Ethanol abgeflammt und in Mikrotiterplatten (NUNC, Wiesbaden, Deutschland) gelegt, bevor wachsende konfluente Zellen mit einer bestimmten Zellkonzentration (von $0,5 \times 10^5$ bis 2×10^5 Zellen/Napf) ausgesät wurden. Dabei wurde das entsprechende Zellvolumen auf die Deckgläschen tropfenförmig aufgebracht und durch leichtes Schwenken gut verteilt. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden mit dem entsprechenden Zellkulturmedium so aufgefüllt, dass $\frac{2}{3}$ der Vertiefung gefüllt war. Am Tag der Infektion wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen, um Antibiotika-Rückstände zu entfernen, und anschließend mit dem entsprechendem Medium (DMEM ohne Zusätze, OptiMEM oder HBSS, Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bedeckt. Die *Y. enterocolitica*-Stämme, mit denen die Infektion erfolgte, wurden wie oben beschrieben, vorbereitet. Für die Infektion der Zellen wurde die Menge der Bakterien in die Mikrotiterplatten gegeben, die dem jeweils gewünschten Verhältnis von Bakterien zu Zellen entsprach. Die Bakterien wurden bei 100 g für 5 min auf

die Zell-Monoschicht zentrifugiert und die Mikrotiterplatten bei 37°C inkubiert. Die Infektion wurde beendet, indem das Medium abgesaugt wurde und die Zellen mit 3,7 % Formaldehyd/PBS für 10 min bei RT fixiert wurden. Dann folgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS. Um die Hintergrundfluoreszenz von überschüssigen Aldehydgruppen zu minimieren, wurden die Zellen 20 min mit 50 mM NH₄Cl inkubiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden vorsichtig aus den Näpfen genommen und umgekehrt, auf mit Mowiol-Tropfen versehenen Objektträgern, luftblasenfrei aufgelegt. Die Ränder der Deckgläschen wurden mit Nagellack versiegelt, um die Haltbarkeit der Präparate zu verlängern. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61, Olympus, Hamburg, Deutschland). Die Präparate wurden im Kühlschrank unter Lichtabschluss gelagert.

Mowiol: 6 mg Glycerol; 2,4 mg Mowiol; 12 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 8,5; 6 ml H₂O_{bidest.}

B.2.5.1.3 Invasions-Test mit HeLa-Zellen

Der Invasions-Test soll Aufschluss darüber geben, welche *Yersinia*-Stämme beim Infizieren der HeLa-Zellen extrazellulär bzw. intrazellulär bleiben und somit zeigen ob sie phagozytiert werden oder nicht. Dies wiederum lässt auf die Virulenz des jeweiligen *Yersinia*-Stamms schließen, denn nicht phagozytierte *Yersinia* sind virulenter als die *Yersinia*-Stämme, die phagozytiert werden (pYV-kodierte Phagozytoseresistenz).

Die HeLa-Zellen wurden einen Tag vor Versuchsbeginn in 24 Mikrotiterplatten mit 0,5x10⁵ Zellen/Napf ausgesät. Am nächsten Tag wurden die *Yersinia* für die Infektion vorbereitet (s. B.2.5.1.1) und auf eine OD_{600 nm} von 0,1 geeicht. Die Infektion wurde in DMEM mit einer MOI 50 an HeLa-Zellen durchgeführt. Dafür wurde das Medium zusätzlich mit 20 mM HEPES und 0,4 % BSA supplementiert. Dabei wurden die Bakterien auf die Zellen gegeben und bei 200 g für 3 min zentrifugiert, um den Kontakt der Bakterien mit den Zellen zu beschleunigen. Die einzelnen Infektionsversuche wurden jeweils in dreifacher Ausfertigung durchgeführt. Zusätzlich erfolgte mit jedem Stamm die Infektion der Zellkulturen bei 27°C und 37°C. Zur Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit der *Yersinia*-Stämme auf die HeLa-Zellen wurden die Infektionsansätze bei RT für 90 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst (0,05 % Trypsin/0,53 mM EDTA) und mit Lysepuffer für 15 min bei RT behandelt. Alle Stämme wurden unverdünnt und in den Verdünnungen 10⁻² und 10⁻⁴ auf Selektionsmedium ausplattiert und für 24-48 h bei 27°C bebrütet. Zur Bestimmung der intrazellulären Bakterien hingegen wurden die Infektionsansätze für 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Gentamicin mit einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert, um alle

extrazellulären Bakterien abzutöten. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten nach der zusätzlichen Gentamicin-Inkubation ebenso behandelt wie die Mikrotiterplatten bei RT. Nach der Inkubation wurden die Kolonien auf allen Platten ausgezählt und pro Stamm und Temperatur der Mittelwert der adhärirten (27°C) und intrazellulären (37°C) Bakterien ermittelt.

Lyse-Puffer: 0,1 % Triton-X-100 in 1x PBS

B.2.5.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Bestimmung der Lokalisation von bestimmten Proteinen in einer eukaryotischen Zelle mittels Immunfluoreszenz, wurden die Zellen für den Infektionsversuch mit verschiedenen Yersinien-Reporter-Stämmen vorbereitet. Dazu wurden die jeweiligen Zellen, (s. B.2.4.1.4) in einer bestimmten Zellzahl ausgesät, sowie für Infektionsversuche vorbereitet (s. B.2.5.1.2). Dabei wurden entweder Tetracycyl-Reporter-Yersinien mit der Lumio™ *In-Cell*-Färbung (s. B.2.5.2.1) oder Yop-Bla-Reporter-Yersinien mit CCF4-AM (s. B.2.5.2.3) behandelt. Nach dem Infektionsende und der intrazellulären Färbung wurden die Zellen fixiert und auf Objektträgern mittels Mowiol geklebt (s. B.2.5.1.2). Anschließend wurden die Präparate mikroskopiert (Olympus BX61).

B.2.5.2.1 Lumio™ In-Cell-Färbung zur Detektion des FIAsh-tags

Das Lumio™ *In-Cell-Green*-Reagenz ist ein FIAsh-Reagenz (*Fluorescein Arsenical Hairpin Binder*), und ist ein nicht fluoreszierendes, arsenhaltiges Derivat von Fluorescein (Griffin *et al.*, 1998). Das Reagenz ist membranpermeabel und bindet mittels seiner beiden Arsengruppen an das Tetracycylmotiv. Die resultierende Fluoreszenz wurde mit einem FITC-Filter im Mikroskop (Olympus BX61) detektiert. Das Versuchsvorgehen wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die *Yersinia*-Stämme wurden für die Infektion, wie im Abschnitt B.2.5.1.1 beschrieben, vorbereitet. Anschließend wurde das Bakterienpellet in einer 1x Lumio™ Färbelösung resuspendiert und für 30-60 min bei RT geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in OptiMEM aufgenommen, um dann mit der entsprechenden MOI die Zellen zu infizieren (s. B.2.5.1.2). Die Infektion wurde für verschiedene Zeitabstände durchgeführt. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen in PBS gewaschen, fixiert, in Mowiol eingedeckelt (s. B.2.5.1.2) und unter dem Mikroskop als grüne Fluoreszenz beobachtet.

Da die zytoplasmatischen Tcys-Reporterproteine der lebenden Bakterienzelle angefärbt werden, wird die Färbung im Folgenden als Lumio™-Prä-Färbung bezeichnet.

B.2.5.2.2 DAPI-Färbung

DAPI (4'-6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch Einlagerung in die DNA den Zellkern markiert. Dafür wurden die Zellen mit 10 µg/ml für 2-5 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach dem anschließenden Waschvorgang wurden die Zellen mit 3,7 % Formaldehyd fixiert und mit Mowiol eingedeckelt (s. B.2.5.1.2). Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop und wurde als blaue Fluoreszenz gemessen.

B.2.5.2.3 β -Laktamase-Assay

Das Substrat CCF4-AM (Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein [Typ4] -Acetoxymethyl), das für den β -Laktamase-Assay verwendet wurde, wurde von Invitrogen bezogen. CCF4-AM besteht aus den zwei Fluorophoren, Hydroxycoumarin und Fluorescein, welche über ein Cephalosporin-Molekül miteinander verbunden sind. Im intakten, nicht gespaltenen Substrat führt die Anregung vom Donor Coumarin bei 409 nm zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auf den Akzeptor Fluorescein. Dadurch wird Fluorescein angeregt und strahlt grünes Licht aus, das bei 520 nm detektiert werden kann. Die β -Laktamase katalysiert nun die Hydrolyse des Substrats, was zur Trennung von Coumarin und Fluorescein, und damit zur Unterbrechung des FRET führt. Die Anregung von Coumarin führt dann zur Emission vom blauen Licht und wird bei 447 nm gemessen.

Das gelieferte pulverisierte CCF4-AM wurde in 1 mM DMSO gelöst und in lichtundurchlässigen Eppendorfgefäßen zu je 20-40 µl Aliquots bei -20°C gelagert. Das Anfärben der Zellen mit dem β -Laktamase-Kit wurde nach dem Protokoll von Invitrogen durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die adhärennten Zellen eine Konfluenz von 60-80 % besaßen. Die *6x Substrate Loading Solution* wurde vor Gebrauch wie folgt frisch angesetzt: 12 µl CCF4-AM wurden zu 60 µl Lösung B zugegeben, gut gemischt und anschließend 934 µl von der Lösung C hinzugefügt. Um ein besseres Halten des Substrats in der Zelle zu gewährleisten, und somit den Rücktransport zu inhibieren, wurde Probenecid, ein Anionen-Transport-Inhibitor, mit einer Endkonzentration von 2,5 mM zugegeben. Für die Herstellung der *1x Substrate Loading Solution* wurde die *6x Substrate Loading Solution* mit HBSS verdünnt und so auf die Zellen gegeben, dass diese gut mit der Flüssigkeit bedeckt waren. Anschließend wurden die Zellen für 90 min bei RT, im Dunkeln unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit HBSS vorsichtig gewaschen und mit 3,7 % Formaldehyd fixiert und auf Objektträger gebracht (s. B.2.5.1.2), falls die Fluoreszenz-Analyse mit dem Mikroskop erfolgen sollte. Die Analyse der β -Laktamase-Aktivität erfolgte durch die Anregung bei einer Wellenlänge von 409 nm. Wenn β -Laktamase in den Zellen

vorhanden war, resultierte das in eine blaue Fluoreszenz bei 447 nm. Das Fehlen einer β -Laktamase-Aktivität hingegen zeigte sich an der Emission von einer grünen Fluoreszenz bei 520 nm.

Sollten die mit den Reporter-Yersinien infizierten Zellen im FACS analysiert werden, wurde folgendermaßen vorgegangen: Nachdem die Zellen in Mikrotiterplatten mit Yersinien infiziert wurden, wurde dieses Zellgemisch nach der Infektion vorsichtig in Eppendorfgefäße überführt, um darin die CCF4-Färbung in Anwesenheit von 2,5 mM Probenecid durchzuführen. Anschließend wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben, mit 3,7 % Formaldehyd für 15 min bei 4°C fixiert und nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer, wurden die Zellen im FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden im FACSCanto II (BD, Heidelberg, Deutschland) analysiert und mit Hilfe der „FlowJo-8.4.6 Software“ (Tree Star Inc, San Carlos, CA, USA) ausgewertet. Die Ratiometrische Bestimmung wurde ebenfalls vorgenommen, indem der Anteil an blau fluoreszierenden Zellen errechnet wurde, wenn die grün fluoreszierenden Zellen auf 100 % gesetzt wurden.

Probenecid (180 mM): 25 g Probenecid in 219 ml 400 mM NaOH und 219 ml 100 mM NaPO₄, pH 8,0

FACS-Puffer: 2 % FCS und 0,09 % Azid in PBS

B.2.5.3 Immunfärbung für die FACS-Analyse

Die indirekte Immunfluoreszenz erfolgte nach der Infektion von Zellen mit Yop-Bla-Reporter-Yersinien. Nachdem die Zellen mit dem β -Laktamase-Substrat gefärbt worden waren (s.o.), wurden diese mit spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenantigene behandelt, um zu bestimmen, welche Zelltypen β -Laktamase positiv sind. Nachdem die CCF4-gefärbten Zellen gewaschen wurden, wurden die Immunglobulin-Fc-Rezeptoren geblockt, indem 0,25 μ g anti-Fc γ II/III/10⁶ Zellen und 2,5 mM Probenecid zum FACS-Puffer zugefügt wurde und die Zellen darin für 20 min bei 4°C inkubiert wurden. Anschließend wurde auf diesen Blockierungspuffer das jeweilige Antikörpergemisch dazu gegeben. Dabei können bei richtiger Antikörper-Zusammenstellung mehrere Oberflächenmarker gleichzeitig angefärbt werden. Alexa Fluor 647, APC, APC-Alexa 750, APC-Cy7, PE, PE-Cy5 oder mit PerCP-konjugierte Antikörper gegen spezifische Oberflächenantigene (s. Tab. 12) wurden 1:100 im FACS-Puffer mit 2,5 mM Probenecid verdünnt eingesetzt und für 30-40 min bei 4°C inkubiert. Nach der Immunfärbung wurden die Zellen, wenn nicht anders erwähnt, mit 3,7 % Formaldehyd fixiert (s. B.2.5.2.3), 2x mit FACS-Puffer gewaschen und schließlich in diesem aufgenommen. Die Zellen wurden bis zu ihrer FACS-Analyse (s. nächster Abschnitt) bei 4°C aufbewahrt.

B.2.5.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Mit einem FACS-Gerät (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) kann die relative Zellgröße, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Dazu werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim Passieren jeder einzelnen Zelle das Licht in einem bestimmten Winkel gestreut wird und Aufschluss über die Beschaffenheit der Zelle zulässt. Die jeweiligen Fluorochrome mit denen die Zellen gefärbt wurden, absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte *Photomultiplier* in elektrische Signale umgewandelt, die Auskunft über die Anzahl der fluoreszierenden Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität geben. Durch das Schleusen („*Gaten*“) wurde die Zellpopulation eingeschlossen. So konnten vereinzelte gewebefremde Zellen, Zellfragmente und Verschmutzungen von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Nur die eingeschlossenen Zellen wurden weiter analysiert. Für die FACS-Analyse wurden meist aus dem Knochenmark isolierte (s. B.2.4.2), und zu dendritischen (BMDCs) oder Makrophagen (BMDMs) ausdifferenzierten Zellen, oder aus der Milz präparierte Einzelzellsuspensionen (s. B.2.6.3) hergenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „*FlowJo-8.4.6 Software*“.

B.2.5.5 Präparation von Gewebe zur *in vitro* Simulierung der Infektion im 3D Zellverband

Um die Yop-Translokation zwischen den zweidimensionalen Infektionsbedingungen *in vitro* einem Infektionsgeschehen, dass *in vivo* herrscht, zu vergleichen, wurde die Infektion unter physiologisch und anatomisch-ähnlichen Bedingungen im Gewebe durchgeführt. D.h. der eher kompakte, drei-dimensionale Zellverband einer *in vivo* Infektion wurde simuliert. In der Abb. 6 wurden die einzelnen Schritte für die Präparation der eingesetzten Organe (dargestellt anhand der Leber) dokumentiert. Die Leber wurde aus der Maus präpariert, in 1 ml kaltem PBS sofort auf Eis gestellt und möglichst schnell verarbeitet. Hierfür wurde die Leber halbiert (1), in einem Napf einer 24iger Mikrotiterplatte gelegt (2) und mit Hilfe eines sterilen Spritzenstempels vorsichtig zerstampft (3), sodass die dreidimensionale Struktur der Gewebszellverbände weitgehend erhalten bleibt. Die Yop-Bla-Reporter-Yersinien wurden mit je 1×10^9 Bakterien in einem sehr kleinen Volumen (in 50 μ l PBS) auf die zerriebene Leber verteilt (4) und für 3 h bei 37°C inkubiert. Nach der Infektion wurde das Gewebe durch einen Zellsieb (40 μ m) homogenisiert und die Zellen bei 4°C für 5 min und 300 g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer für 10 min bei RT lysiert.

Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit CCF4-AM und Probenecid für 90 min bei RT beladen (s. B.2.5.2.3) und danach im FACS analysiert (s. B.2.5.4).

Erythrozyten-Lysepuffer: 8,29 g NH_4Cl ; 0,783 g NH_4HCO_3 ; 0,0371 g EDTA in 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$.

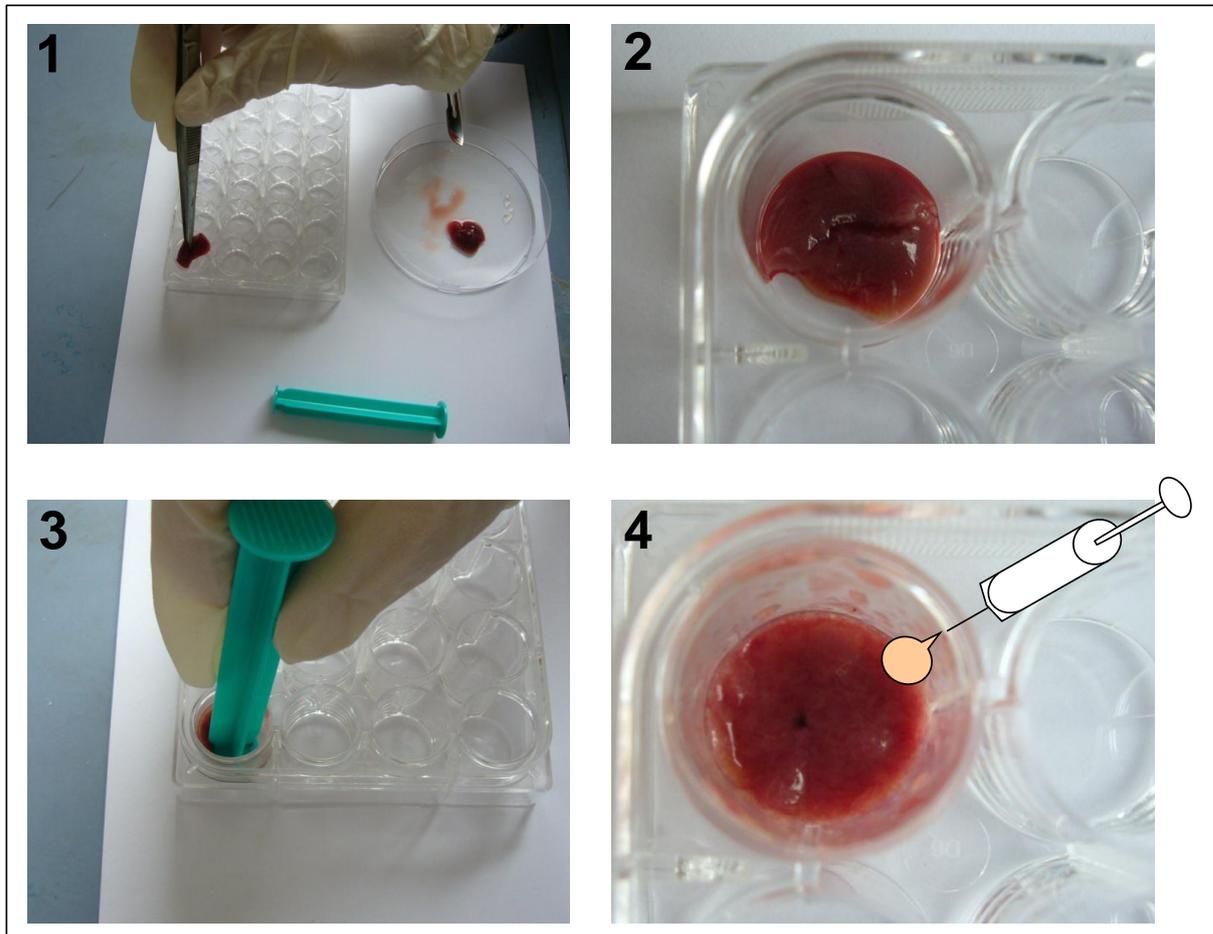


Abb. 6: Vorgehensweise für die Präparation von Gewebe zur *in vitro* Simulierung

Die Leber wird halbiert (1), in einem Napf einer 24iger Mikrotiterplatte gelegt (2) und vorsichtig zerstampft (3). Die Yop-Bla-Reporter-Yersinien wurden mit je 1×10^9 Bakterien in 50 μl PBS auf die zerriebene Leber verteilt (4) und für 3 h bei 37°C inkubiert.

B.2.6 Mausinfektionsversuche

B.2.6.1 Mauspassage von *Y. enterocolitica*-Stämmen

Die Mauspassage von *Yersinia*-Stämmen wurde mit einer cfu (*colony forming unit*) von 1×10^6 , intraperitoneal (i.p.) in Balb/c Mäusen durchgeführt. Nach 24 h wurden die Bakterien durch Spülung der Bauchhöhle mit 5 ml PBS reisoliert, auf *Yersinia* selektiv Agar (CIN-Agar) ausplattiert und bei 27°C inkubiert. Nach einem Tag konnten in dem roten CIN-Agar „Kuhaugen“-artige Kolonien festgestellt werden, die von den Yersinien gebildet werden. Jeweils eine Kolonie wurde gepickt, in 200 ml BHI-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 27°C angezogen. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert und wie in Abschnitt B.2.1.2 beschrieben, in Aliquots bei -80°C eingefroren. Aus diesen passagierten Stämmen wurde die jeweilige Plasmid-DNA isoliert (s. B.2.2.1) und sequenziert, um die Integrität der eingeführten genetischen Modifikation dieser Stämme zu überprüfen. Außerdem wurde die Sekretion der Yop-Effektorproteine (s. B.2.3.4) in den Stämmen mittels SDS-Gel kontrolliert (s. B.2.3.2).

B.2.6.2 Infektion der Mäuse

Ein Aliquot der tiefgefrorenen, mauspassagierten *Y. enterocolitica*-Stämme wurde auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden pelletiert (4°C, 5.000 g, 10 min) und mit kaltem PBS gewaschen. Eine intraperitoneale Infektion wurde mit einer Konzentration von 1×10^4 bis 5×10^5 cfu pro 100 µl durchgeführt. Den Mäusen wurden mit einer sterilen Spritze 100 µl der jeweiligen Yersinien-Suspension in die Bauchhöhle gespritzt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Bakterienflüssigkeit austrat, um nicht die Infektionsdosis zu verfälschen. Wenn die Mäuse länger als 24 h infiziert wurden, wurden sie täglich beobachtet. Am Ende des Infektionsversuches wurden die Mäuse durch Vergasung mit CO₂ getötet und die Milz, die für die Präparation von Einzelzellsuspensionen (s. B.2.6.3) verwendet wurde, entnommen. Zur Überprüfung der Infektionseffizienz wurde auch die Leber entnommen und die Anzahl der Yersinien in der Leber bestimmt (s. B.2.6.4).

B.2.6.3 Präparation von Einzelzellsuspensionen aus der Milz

Die Milz wurde aus der Maus präpariert, in 1 ml kaltem PBS sofort auf Eis gestellt und möglichst schnell verarbeitet. Mit Hilfe des Stempels einer Einmalspritze wurde die Milz durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm in ein Falcontube gedrückt, während mit PBS gut gespült wurde. Danach wurde die gewonnene Zellsuspension durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 µm passiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 5 min bei

300 g sedimentiert. Zur osmotischen Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in PBS resuspendiert und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Im Anschluss wurden die Zellen nach der Behandlung mit dem CCF4-AM-Substrat (s. B.2.5.2.3) und der Oberflächenimmunfärbung (s. B.2.5.3) im FACS analysiert (s. B.2.5.4).

B.2.6.4 Bestimmung der cfu von Yersinien in der Leber

Nachdem die infizierten Mäuse getötet wurden, wurden Milz und Leber heraus präpariert und in ein mit PBS gefülltes, 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und sofort auf Eis gestellt. Während die Milz für den weiteren Versuchsverlauf verwendet wurde (s. B.2.6.3), diente die Leber der Überprüfung der Infektionseffizienz. Dazu wurde die Leber in drei Teile geschnitten, auf 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt, mit 1 ml PBS gefüllt und mit je einem Stahlkugeln (*Stainless Steel Beads*, 5 mm Durchmesser; Qiagen, Hilden, Deutschland) versehen. Die Gefäße wurden in die Vorrichtung der Schwingmühle des Homogenisators eingespannt. Die Homogenisierung der Organproben erfolgte für 2 min bei einer Amplitude von 90. Es wurden Verdünnungsreihen der Organsuspensionen auf CIN-Agarplatten ausplattiert und bei 27°C für 24 h inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden ausgezählt und die mittleren cfu-Werte für das entnommene Organ ermittelt.

C. ERGEBNISSE

C.1 Das FIAsh-Reportersystem

C.1.1.1 Klonierung von Yop-Tetracyclin-Reporter-Yersinien

Als Verfahren für die Herstellung der Fusionsproteine YopM- und YopH-Tetracyclin-tag wurde die Rekombinationsmethode der ET-Klonierung benutzt (s. B.2.2.3.3). Die kodierende Sequenz für das Tetracyclin-tag (Tcys), bestehend aus den sechs Aminosäuren: Cystein-Cystein-Prolin-Glycin-Cystein-Cystein (C-C-P-G-C-C), wurde am 3'-Ende von YopM bzw. YopH, unmittelbar vor dem Stopcodon, mit dieser Methode kloniert. In Abb. 7 ist das generierte PCR-Fragment, welches für die ET-Klonierung verwendet wurde, schematisch dargestellt.



Abb. 7: Schema des PCR-Fragments

Das PCR-Fragment besteht aus einer Kanamycin-Resistenzkassette und dem sechs Aminosäuren langen Tetracyclin-tag (CCP-GCC), die zusammen von zwei Homologiearmen (50 bp) der anzusteuernenden *yop*-Gensequenz flankiert sind.

Für die Generierung des PCR-Fragments für die ET-Klonierung wurde der Rückwärts-Primer für die Kanamycin-Resistenzkassette (21 bp), abgeleitet von dem Plasmid pACYC177 (*accession number* X06402), eingesetzt. Der verwendete Vorwärts-Primer (50 bp) ist zusammengesetzt aus der Sequenz komplementär zum 3'-Ende von YopM bzw. YopH, ohne das jeweilige Stopcodon, gefolgt von der kodierenden Sequenz für das Tetracyclin-tag, dann einem Stopcodon, und anschließend einer 21 bp langen Sequenz der Kan^R-Kassette. Die Primer-Sequenzen sind im Material und Methoden-Teil (s. Tab. 8) aufgelistet. Die Sequenzen von YopM und YopH auf dem pYV-Plasmid wurden aus der Sequenz pYVa127/90 (*accession number* AY150843) abgeleitet. Als Matrize für die PCR diente der Vektor pACYC177. Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel eluiert und gereinigt (s. B.2.2.2.3). Reste des Templates vom pACYC177-Vektor im Reaktionsansatz wurden durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* entfernt. Das PCR-Fragment wurde anschließend durch ethanolische Fällung gereinigt (s. B.2.2.2.4) und schließlich in 10 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Die PCR-Produkte wurden in einen L-Arabinose-behandelten *Yersinia*-Wildstamm WA(pYV)

(s. Tab. 6), welcher das Plasmid pKD46 enthält, durch Elektroporation transformiert (s. B.2.2.4.3). Die pKD46-kodierten und durch L-Arabinose induzierbaren Rekombinasen bewirken den Austausch des Zielgenes mit dem PCR-Produkt mittels homologer Rekombination (s. B.2.2.3.3). Die Selektion erfolgte auf Kanamycin-haltigem Medium. Die Integration der transformierten DNA-Fragmente wurde mittels PCR mit Kontrollprimern (Yop-Ident.-For. und Yop-Ident.-Rev.; s. Tab. 8) getestet. Zusätzlich wurden die pYV-Plasmide der Tetracystein-Reporter-Yersinien isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Bam*HI verdaut. Dieser Restriktionsverdau liefert ein spezifisches Bandenmuster, das im Agarosegel überprüft wurde. Dabei wurden die entstandenen Bandenmuster zwischen dem pYV-Plasmid des Wildstamms mit denen der *yop*-Mutanten verglichen. Dadurch konnten unerwünschte Rekombinationen in den pYV-Plasmiden der Tetracystein-Reporter-Yersinien ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Die Integrität der Yop-Tetracystein-tag-Sequenzen wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

Da das pKD46-Plasmid für die weitere Arbeit stören könnte, wurde der Vektor aus den Tetracystein-Reporter-Yersinien durch einen Temperaturwechsel auf 37°C wieder entfernt (hitzeempfindlicher *oriR101*). Die so gewonnenen Tetracystein-Reporter-Yersinien wurden als WA(pYV, YopM-Tcys) und WA(pYV, YopH-Tcys) bezeichnet. Der Ablauf der ET-Klonierung in *Yersinia enterocolitica* zur Herstellung von Yop-Fusionsproteinen mit dem Tetracystein-tag ist in Abb. 8 dargestellt.

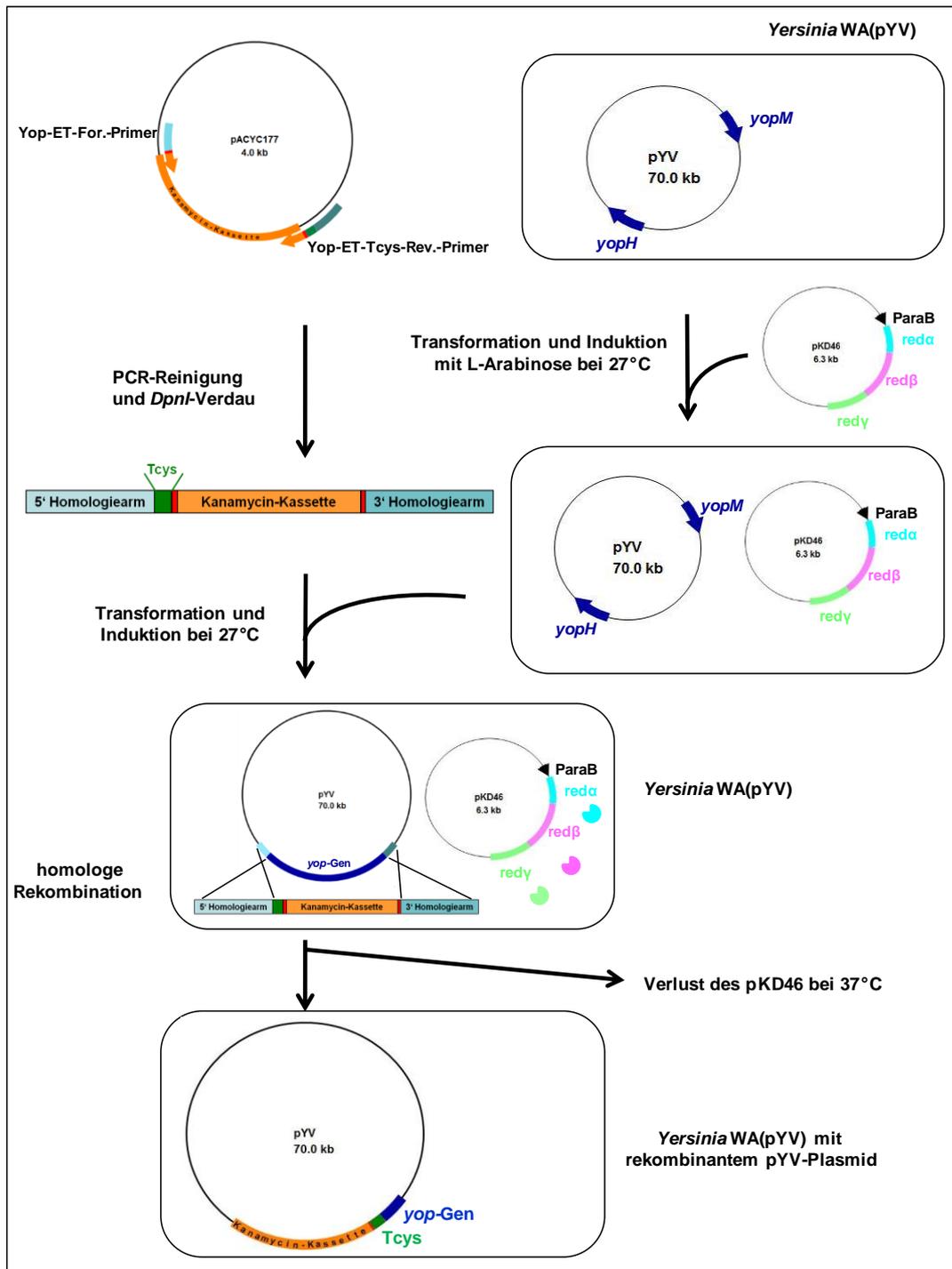


Abb. 8: ET-Klonierung zur Herstellung von Yop-Fusionsproteinen mit Tcys-tag

Das PCR-Fragment besteht aus 5'-Homologiearm, Tetracycline-tag (Tcys), Kanamycin-Kassette, und 3'-Homologiearm, deren Sequenzen durch die Primer festgelegt waren. Das Plasmid pKD46 wurde in den *Yersinia*-Wildstamm WA(pYV) transformiert und durch Zugabe von 0,1 % Arabinose wurde die Expression der Rekombinasen red α und red β sowie des Exonuklease-Inhibitors red γ bei 27°C induziert. Nach Transformation des pKD46 enthaltenen *Yersinia*-Wildstamms WA(pYV) mit dem PCR-Fragment, wurde das endogene yop-Gen mittels homologer Rekombination durch das PCR-Fragment ersetzt. Die Selektion der Tetracycline-Reporter-*Yersinien* erfolgte durch die Kanamycin-Resistenz. Durch einen Temperaturwechsel auf 37°C kam es zum Verlust des pKD46-Plasmids.

C.1.1.2 Überprüfung der Tetracystein-Reporter-Yersinien im SDS-Gel und mittels Western Blot

Die Expression der Tetracystein-Yop-Fusionsproteine wurde mittels Fluoreszenzimager und Western Blot-Analyse (s. Abb. 9B und C) untersucht. Die sekretierten Proteine der Tetracystein-Reporter-Yersinien wurden aus dem Kulturüberstand isoliert (s. B.2.3.4), mit TCA gefällt (s. B.2.3.4.2) und mit dem Lumio™-Reagenz behandelt (s. B.2.3.6). Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der Proteine im SDS-Gel (s. B.2.3.2) und anschließend das „Scannen“ des Gels in einem Fluoreszenzimager (s. Abb. 9B und C).

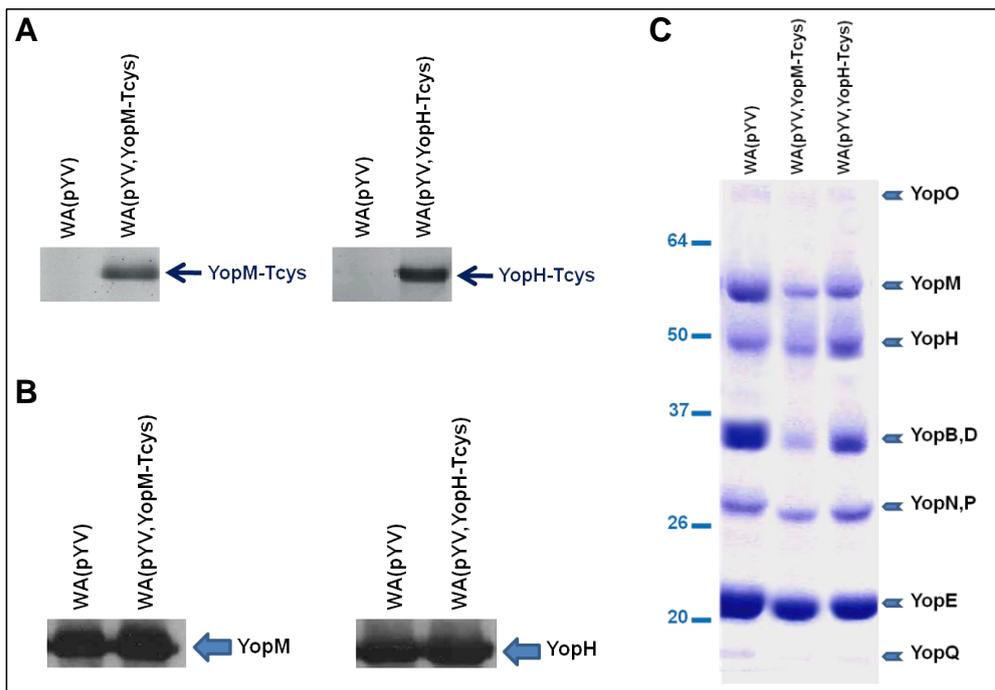


Abb. 9: Sekretion von WA(pYV, YopM-Tcys) und WA(pYV, YopH-Tcys) im Vergleich zum WA(pYV)

Die Übernachtskulturen der entsprechenden Bakterienstämme wurden 1:40 in BHI verdünnt und für 2 h bei 37°C inkubiert, bevor Stimulationssupplemente (s. B.2.3.4) zugefügt und für weitere 2 h inkubiert wurde. Anschließend wurden die Bakterienstämme mit TCA gefällt. Die ausgefällten Proteine wurden mit der Lumio™ Post-Färbung behandelt und auf 12%ige SDS-Gele aufgetrennt. Die Gele wurden im Fluoreszenzimager „gescannt“ (A) mit Coomassie gefärbt (C) oder auf eine PVDF-Membran „geblotet“ (B). Die Detektion der Yops erfolgte mit polyklonalem anti-YopM bzw. anti-YopH Antiserum (1:10.000 verdünnt) und einem HRP gekoppelten Sekundärantikörper (1:10.000 verdünnt).

Abb. 9A zeigt, dass nur die ausgefällten Proteine aus den Kulturüberständen der Tetracystein-Reporter-Yersinien, nicht aber die des Wildtyps, jeweils eine fluoreszierende Bande im Fluoreszenzimager aufweisen. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den fluoreszierenden Banden auch um das jeweilige Yop-Tcys-Fusionsprotein handelt, wurde das SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen und mit polyklonalen Antiseren gegen YopM bzw. YopH behandelt (s. Abb. 9B). Die Überlagerung der Immunoblots mit den

Fluoreszenzimaginer-Bildern zeigt eine Überlappung der fluoreszierenden Banden der WA(pYV, YopM-Tcys) und WA(pYV, YopH-Tcys) mit den jeweiligen Antikörper-angefärbten Proteinbanden. Damit konnte die Expression und die Sekretion der YopM-Tcys- und YopH-Tcys-Fusionsproteine nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob in den Tetracystein-Reporter-Yersinien die Sekretion der Yop-Effektorproteine beeinträchtigt ist, wurden die sekretierten Proteine der Kulturüberstände dieser Stämme ausgefällt, auf ein SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Abb. 9C zeigt, dass das Bandenmuster der sekretierten Proteine Tetracystein-Reporter-Yersinien WA(pYV, YopM-Tcys) und WA(pYV, YopH-Tcys) dem des Wildtyps WA(pYV) entspricht.

C.1.1.3 Optimierungsversuche der Lumio™-Färbung

Die Yop-Tcys-Proteine der Tetracystein-Reporter-Yersinien lassen sich sowohl nach der Sekretion als isolierte Proteine (Lumio™ Post-Färbung, s. B.2.3.6), als auch bereits in lebenden Bakterienzellen (intrazellulär) anfärben (Lumio™ Prä-Färbung, s. B.2.5.2.1). Es wurde ein Vergleich zwischen den Fluoreszenzintensitäten der beiden Färbungsstrategien durchgeführt. Die Färbungsstrategien sind in Abb. 10 schematisch dargestellt.

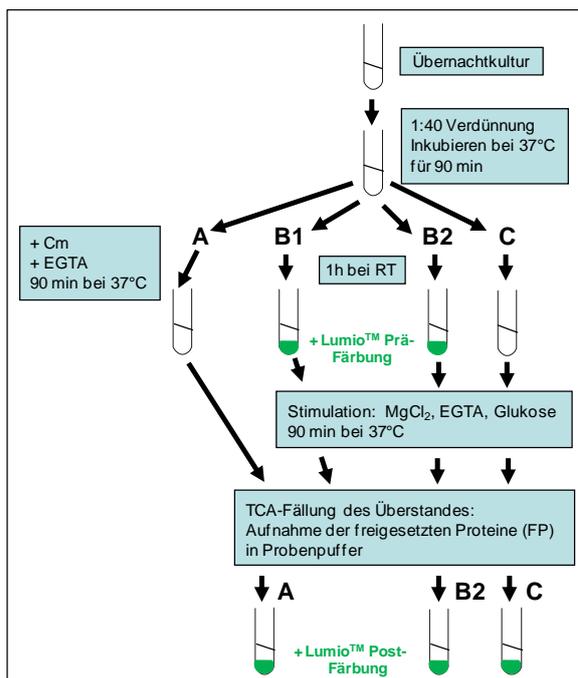


Abb. 10: Versuchsschema für das Anfärben zytosolischer bzw. sezernierter Tetracystein-Yop-Fusionsproteine, d.h. vor der Sekretion (=Lumio™ Prä-Färbung) bzw. nach der Sekretion (=Lumio™ Post-Färbung)

A= negative Kontrolle: Zugabe von Chloramphenicol (Cm; 100 µg/ml) und 5 mM EGTA für 90 min, anschließend Färbung (Lumio™ Post-Färbung); B1= Färbung vor der Sekretion (Lumio™ Prä-Färbung); B2= sowohl Färbung vor der Sekretion als auch nach der Sekretion; C= Färbung nach der Sekretion (Lumio™ Post-Färbung)

Sowohl bei WA(pYV, YopM-Tcys) als auch bei WA(pYV, YopH-Tcys) wird die höchste Fluoreszenzintensität gemessen, wenn die mit Tetracystein-tag versehenen Yop-Proteine nach der Sekretion gefärbt werden (s. Abb. 11; B2 und C). Dagegen lassen sich die Tcys-Reporterproteine vor der Sekretion, also innerhalb der lebenden Bakterienzelle, nur schwach anfärben (B1).

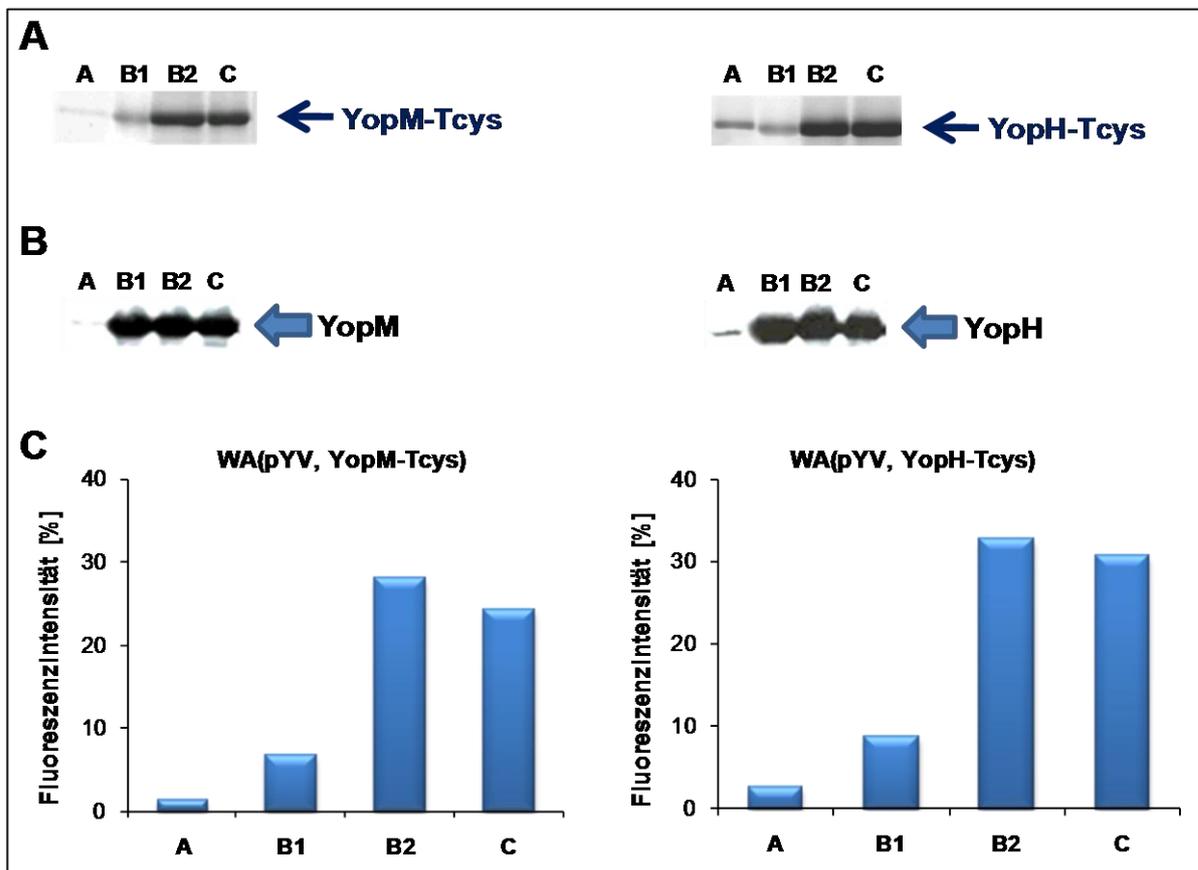


Abb. 11: Anfärben der Tcys-Reporterproteine vor und nach der Sekretion

Es wurde ein Sekretionstest von WA(pYV, YopM-Tcys) und WA(pYV, YopH-Tcys) unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, wobei die Tcys-Reporterproteine vor der Sekretion (Lumio™ Prä-Färbung; Probe B1) oder nach der Sekretion (Lumio™ Post-Färbung; Proben A, B2 und C) angefärbt wurden. Probe A = negative Kontrolle. Details siehe Abb. 10. Die Proteine wurden auf ein SDS-Gel aufgetrennt, im Fluoreszenzimager quantitativ abgebildet (A) und die Fluoreszenzintensität der Banden mit Hilfe der „AIDA Image Analysis Software“ quantifiziert (C). Anschließend wurden die Gele für die Western Blot-Analyse mit der Immunfärbung gegen YopM und YopH (1:10.000 verdünnt) verwendet (B).

Um das intrazelluläre Anfärben der Tcys-Reporter-Yersinien zu erhöhen, wurden Optimierungsversuche mit unterschiedlichen Färbebedingungen durchgeführt, um eine höhere Fluoreszenzintensität zu erreichen (s. Abb. 12). Dabei wurden die Yersinienstämme, wie im Abschnitt B.2.5.1.1 beschrieben, für die Färbung vorbereitet. Die Färbungsansätze wurden jedoch mit weiteren unterschiedlichen Komponenten (Glukose, MgCl₂, CaCl₂, CCCP, EGTA) supplementiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die

verschiedenen Ansätze im FACS analysiert. Als Positivkontrolle wurde ein EGFP exprimierender Yersinienstamm WA(pYV, pEGFP) verwendet.

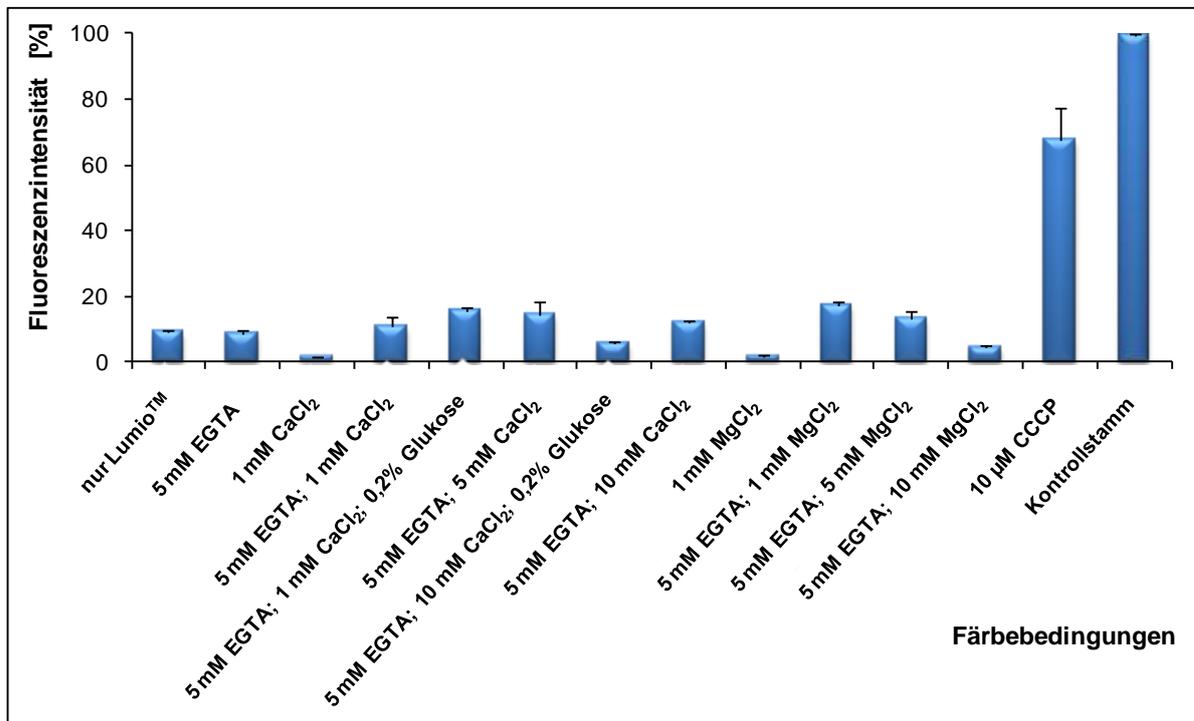


Abb. 12: Analyse der Fluoreszenzintensität von WA(pYV, YopH-Tcys) unter unterschiedlichen Färbebedingungen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Es wurden unterschiedliche Zusätze zu der Lumio™ Prä-Färbung zugegeben und anschließend über eine FACS-Analyse die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer Lumio™ Prä-Färbung ohne Zugaben gemessen. In dem Säulendiagramm sind die Prozentzahlen aus zwei Experimenten \pm Standardabweichung dargestellt. Kontrollstamm: EGFP exprimierende Yersinien WA(pYV, pEGFP).

Abb. 12 veranschaulicht die Fluoreszenzintensität der Tetracystein-Reporter-Yersinien unter Verwendung der verschiedenen Zusätze. Eine signifikante Erhöhung (um etwa das 6 fache) der Fluoreszenzintensität konnte nur bei Zugabe von CCCP (Carbonyl-cyanid-m-Chlorophenylhydrazon) erzielt werden. Sie blieb jedoch deutlich unter der Fluoreszenzintensität der EGFP-Reporter-Yersinien. CCCP ist ein Protonophor, welches membrangängig ist und den Protonen-Gradienten und damit die „Proton motiv force“ (PMF) der Membran reduziert bzw. aufhebt (Gathmann *et al.*, 2006). Die Absenkung bzw. Aufhebung des Membranpotenzials könnte zu einer verstärkten Aufnahme des Farbstoffes oder das Verhindern des Efflux des Farbstoffes aus der Bakterienzelle führen.

Da CCCP den Protonen-Gradienten der Bakterienmembran beeinflusst, stellte sich die Frage, ob dies Auswirkungen auf die Sekretion der Yops haben könnte. Um dies zu überprüfen, wurde ein Sekretionstest mit den Tetracystein-Reporter-Yersinien in Anwesenheit steigender Konzentrationen von CCCP (10 µM, 25 µM und 50 µM)

durchgeführt. Dabei wurden die Bakterienkulturen 90 min bei 37°C vorinkubiert, anschließend wurde in Anwesenheit von CCCP die Sekretion induziert, indem EGTA, Glukose und MgCl₂ zugefügt und für weitere 90 min bei 37°C inkubiert wurde (s. B.2.3.4). Nach der TCA-Fällung (s. B.2.3.4.2), wurden die sekretierten Proteine mit der Lumio™ Post-Färbung behandelt auf SDS-Gele aufgetragen (s. B.2.3.2), im Fluoreszenzimager quantitativ aufgenommen und die Fluoreszenzintensität der Probenbanden mittels „AIDA Image Analysis Software“ analysiert. Anschließend wurden die SDS-Gele mit Coomassie gefärbt (s. B.2.3.3.1).

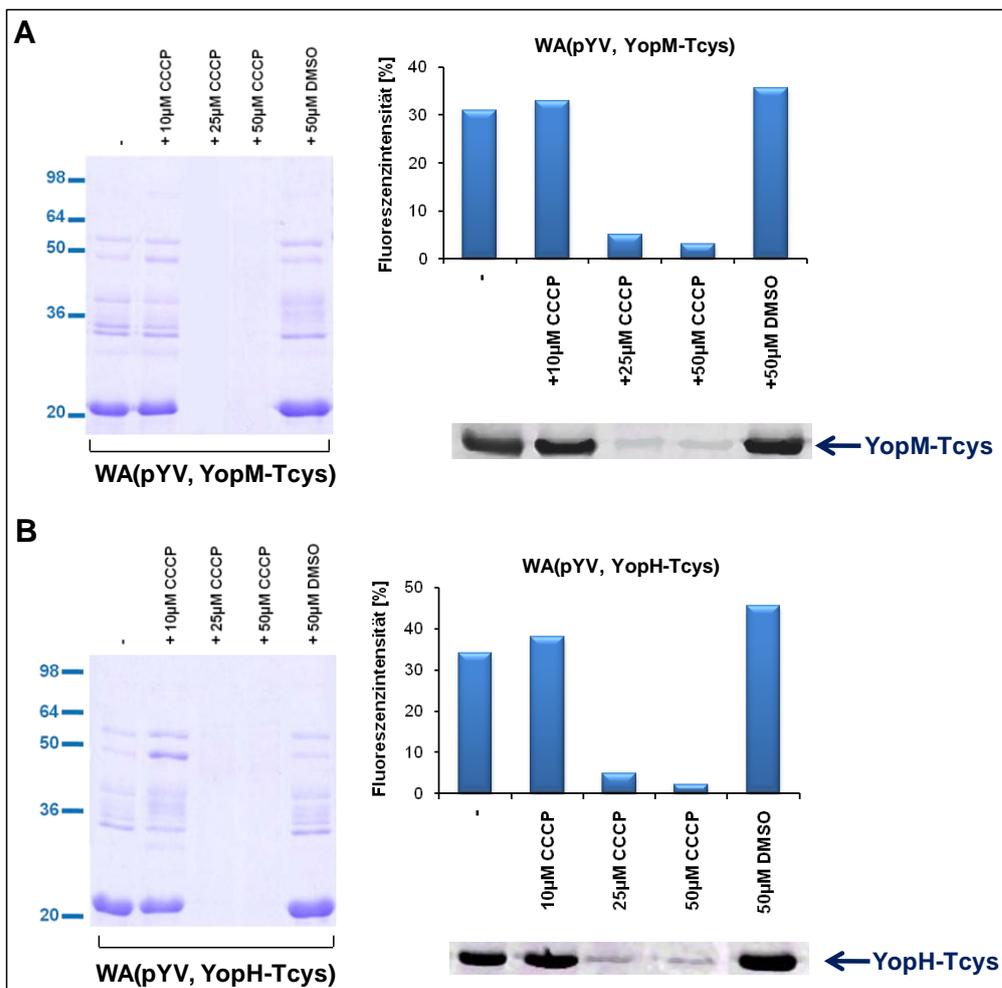


Abb. 13: Sekretionsanalyse der Tetracyclin-Reporterproteine unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von CCCP bzw. DMSO

Der Sekretionstest wurde unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von CCCP bzw. DMSO an beiden Tetracyclin-Reporter-Yersinien durchgeführt. Die freigesetzten Proteine wurden mit TCA gefällt, mit der Lumio™ Post-Färbung behandelt und auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die freigesetzten Proteine von WA(pYV, YopM-Tcys) (A) und WA(pYV, YopH-Tcys) (B) wurden im Fluoreszenzimager analysiert und die Intensität der Banden wurde mit Hilfe der „AIDA Image Analysis Software“ quantifiziert.

Wie aus den mit Coomassie-gefärbten SDS-Gele in Abb. 13A und B ersichtlich ist, wurde die Sekretion von Yops in Anwesenheit von 25 µM und 50 µM CCCP vollständig inhibiert.

Dagegen hat die CCCP-Konzentration von 10 μM keinen inhibitorischen Effekt auf die Sekretion, vielmehr zeigt die Quantifizierung der Reporteraktivität der Yop-Tcys-Reporterproteine (YopM-Tcys und YopH-Tcys) eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von 10 μM CCCP (s. Abb. 13A und B, jeweils rechts). Dieser positive Effekt auf die Sekretion könnte jedoch auf die Präsenz von DMSO (Dimethylsulfoxid), einem organischen Lösungsmittel, in dem CCCP gelöst ist, zurückzuführen sein, da auch die Sekretion in Anwesenheit von DMSO allein zur verstärkten Sekretion geführt hat.

Eine weitere Möglichkeit den Farbstoff in den Bakterien zu halten, könnte mittels des Einsatzes von Efflux-Inhibitoren erreicht werden. Phenylalanin-arginin β -naphthylamid (PA β N) ist ein Efflux-Inhibitor, der eine inhibitorische Wirkung auf Efflux-Mechanismen in verschiedenen gram-negativen Bakterien aufweist (Pages *et al.*, 2005). Schließlich tragen Efflux-Mechanismen zur Antibiotika-Resistenz bei, indem sie toxische Komponenten aus der Bakterienzelle ausschleusen (Hasdemir *et al.*, 2004).

Die Yersinien-Reporter-Stämme wurden vor der Induktion der Yop-Sekretion mit dem LumioTM-Reagenz in Anwesenheit von 25 μM PA β N beladen. Dabei wurde der Inhibitor zu unterschiedlichen Zeitpunkten entweder 15 min oder 30 min vor der LumioTM-Reagenz-Zugabe der Färbung zugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen mit PBS gewaschen und in frischem BHI aufgenommen, um die Yop-Sekretion mit EGTA, Glukose und MgCl_2 -Zugabe zu induzieren (s. B.2.3.4). Nach der Induktion der Sekretion wurden die sekretierten Proteine isoliert, mit TCA gefällt (s. B.2.3.4.2), auf SDS-Gele aufgetrennt und anschließend wurde die Fluoreszenz der Reporter-Banden im Fluoreszenzimager analysiert (s. Abb. 14). Zum Vergleich der intrazellulären Färbung (LumioTM Prä-Färbung) wurden die Tetracystein-Yop-Reporterproteine auch nach der Induktion der Yop-Sekretion mit dem LumioTM-Reagenz in Anwesenheit von 25 μM PA β N beladen (LumioTM Post-Färbung).

Wie in Abb. 14 gezeigt, bewirkt die Zugabe von PA β N, ein um mehr als 30 %iges Erhöhen der intrazellulären Anfärbbarkeit der Tetracystein-Yop-Reporterproteine, wenn PA β N über eine Zeitdauer von 45 min zugegeben wurde. Bei einer längeren Einwirkzeit von 60 min konnte sogar eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um mehr als 40 % detektiert werden. Mit der Zugabe von PA β N zur LumioTM Prä-Färbung, konnte sogar eine stärkere Fluoreszenzintensität als bei der LumioTM Post-Färbung ohne Zugabe von PA β N, erzielt werden.

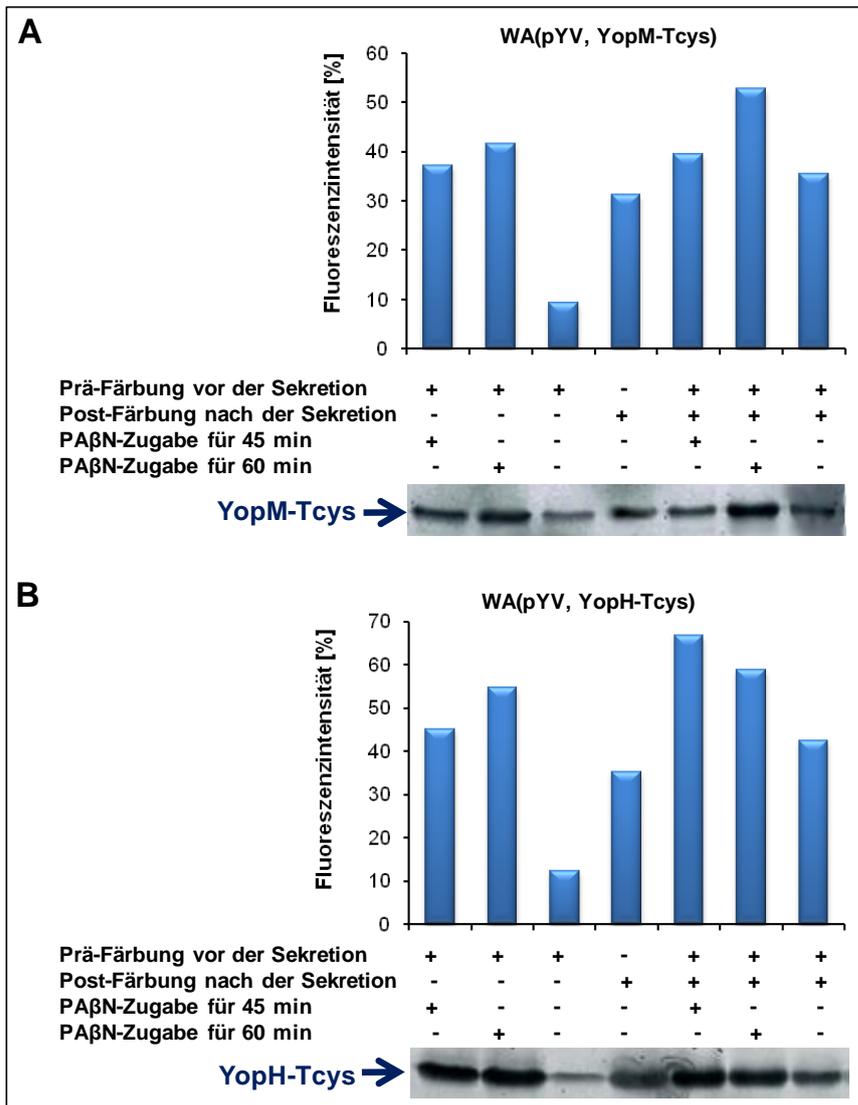


Abb. 14: Einfluss von PAßN auf die Lumio™ Prä-Färbung der sezernierten Tetracycyl-Reporterproteine

Die Bakterien wurden für 2 h bei 37°C inkubiert. 25 µM PAßN wurde vor der Stimulation der Sekretion zugegeben. Dabei wurde PAßN entweder 15 oder 30 min lang inkubiert, bevor das Lumio™-Reagenz zugegeben wurde und die Lumio™-Prä-Färbung für 30 min durchgeführt wurde. Die sekretierten Proteine wurden isoliert und auf SDS-Gele aufgetrennt. Die Lumio™-Post-Färbung erfolgte hingegen nach der Sekretion mit bzw. ohne die Zugabe von PAßN. Die Gele wurden im Fluoreszenzimager analysiert und die Fluoreszenzintensitäten mittels „AIDA Image Analysis Software“ quantifiziert. Einfluss von PAßN auf die Fluoreszenzintensität von WA(pYV, YopM-Tcys) (A). Einfluss von PAßN auf die Fluoreszenzintensität von WA(pYV, YopH-Tcys) (B).

C.1.1.4 Mikroskopische Untersuchungen der Tcys-Yop-Fusionsproteine

Trotz der vielen Versuche, optimierte Bedingungen für das Anfärben der Tetracycyl-Reporter-Yersinien innerhalb der lebenden Bakterienzelle (Lumio™ Prä-Färbung) zu finden, ist eine optimale Fluoreszenzintensität der beiden Tetracycyl-Reporter-Yersinien nicht gelungen. Da mit der Zugabe von PAßN eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität der Tetracycyl-Reporterproteine innerhalb der lebenden Bakterienzelle erreicht werden konnte,

was mit Hilfe des Fluoreszenzimagers gemessen werden konnte (s. Abb. 14), wurde der Einfluss des Efflux-Inhibitors PA β N auf die Fluoreszenzintensität auf Zellkultur-Ebene mikroskopisch untersucht. HeLa-Zellen wurden einen Tag vor der Infektion mit $0,5 \times 10^5$ Zellen/Napf ausgesät (s. B.2.5.1). Die entsprechenden Bakterienkulturen wurden, wie im Abschnitt B.2.5.1.1 beschrieben, vorbereitet. Vor der Infektion der Zellen mit den Tetracycline-Reporter-Yersinien (MOI 50), wurden die Bakterien mit 25 μ M PA β N und der intrazellulären Lumio™ Prä-Färbung für 60 min bei RT beladen. Mit dem Wildstamm infizierte und nicht-infizierte HeLa-Zellen wurden ebenfalls mit PA β N und der Lumio™ Prä-Färbung behandelt und dienten als negative Kontrolle. Nach einer Infektion von 60 min wurden die Zellen mit 3,7 % Formaldehyd fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Wie aus der Abb. 15 zu sehen ist, lässt sich zwar die Fluoreszenz der Tcys-Reporter-Yersinien gut detektieren, jedoch bewirkt die Zugabe von PA β N anscheinend auch ein Anfärben des Wildstamms WA(pYV) mit dem Lumio™-Reagenz, was erkennbar in eine schwache Fluoreszenz resultiert. Ein weiteres Problem zeigt die Autofluoreszenz der Zellen. Dabei machte es keinen Unterschied, ob neben HeLa-Zellen auch andere Zellen verwendet wurden, wie z.B. J774, Cos-7, HEK-293 oder BMDCs (Daten nicht gezeigt).

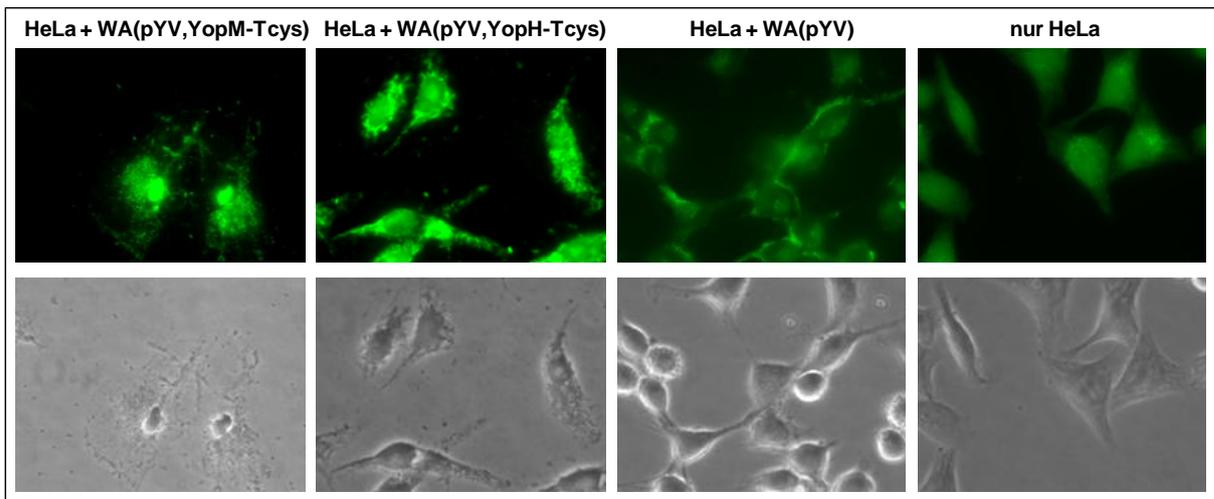


Abb. 15: Translokation von Tcys-Reporterproteinen, die mit Lumio™ Prä-Färbung unter Anwesenheit von PA β N beladen wurden

Übernachtskulturen wurden 1:40 in BHI verdünnt und mit 2,5 mM CaCl₂ 2 h bei 37°C inkubiert. Nach einer OD_{600 nm}-Bestimmung wurden die Tcys-Reporter-Yersinien in Anwesenheit von 25 μ M PA β N mit der Lumio™ Prä-Färbung für 60 min bei RT beladen. Der Wildstamm WA(pYV) und nicht-infizierte HeLa-Zellen wurden ebenfalls unter PA β N-Zugabe mit der Lumio™ Prä-Färbung behandelt. HeLa-Zellen wurden mit einer MOI 50 infiziert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

Um Translokationsstudien durchführen zu können und das Translokationsverhalten verschiedener Yops untersuchen zu können, wurde daher ein anderes Reportersystem verwendet, das β -Laktamase (Bla)-Reportersystem.

C.2 Das β -Laktamase-Reportersystem

β -Laktamasen sind bakterielle Enzyme, die den β -Laktam-Ring von den β -Laktamantibiotika, wie Penicilline und Cephalosporine spalten können (Sykes and Matthew, 1976) und somit deren Wirkungsweise inaktivieren.

Das β -Laktamase-Reportersystem beruht auf dem indirekten Enzymnachweis über das fluorogene Substrat CCF4-AM (Coumarin Cephalosporin Fluorescein 4-Acetoxymethyl) (Zlokarnik *et al.*, 1998). CCF4-AM besteht aus zwei Fluorophoren (7-hydroxy-Coumarin und Fluorescein), die über das Cephalosporin-Molekül miteinander verbunden sind. Die vier Esterbindungen an dem Substrat bewirken erhöhte Lipophilie, sodass CCF4-AM die Zellmembran passieren kann. Sobald es ins Zytoplasma gelangt, bewirken die zytoplasmatischen Esterasen eine Hydrolyse der Esterbindungen. Es entstehen negative Ladungen und durch den Verlust der lipophilen Ester-Reste kann die so entstandene polyanionische Form des CCF4 nicht mehr über die Zellmembran nach außen rückdiffundieren, sodass der Farbstoff in der Zelle verbleibt. Im intakten CCF4-Molekül führt die Anregung des Donorchromophors Coumarin bei 409 nm zu einer Photonenübertragung auf den benachbarten Akzeptor Fluorescein, was in einer Emission von grüner Fluoreszenz bei 520 nm resultiert (FRET; Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer). Ist in der Zelle jedoch das Enzym β -Laktamase vorhanden, so wird der β -Laktam-Ring von CCF4 gespalten und das Fluorescein wird vom Cephalosporin-Molekül freigesetzt. Dies verhindert FRET, da Coumarin (Donor) und Fluorescein (Akzeptor) getrennt wurden. Die Anregung des Donors wird nicht auf das Fluorescein übertragen, sondern das angeregte Coumarin emittiert selbst und kann als blaue Fluoreszenz bei 447 nm detektiert werden (s. Abb. 16). Neben einer einfachen Detektierbarkeit, ist dieses Reportersystem gekennzeichnet durch eine hohe Sensitivität. Dabei reichen etwa 50 β -Laktamase-Moleküle aus, um eine Veränderung im Emissionsmuster zu beobachten (Zlokarnik *et al.*, 1998; Qureshi, 2007).

Das CCF4-Substrat und seine Spaltung können ratiometrisch unter dem Mikroskop, im Fluoreszenz-Platten-Photometer und im FACS bestimmt werden.

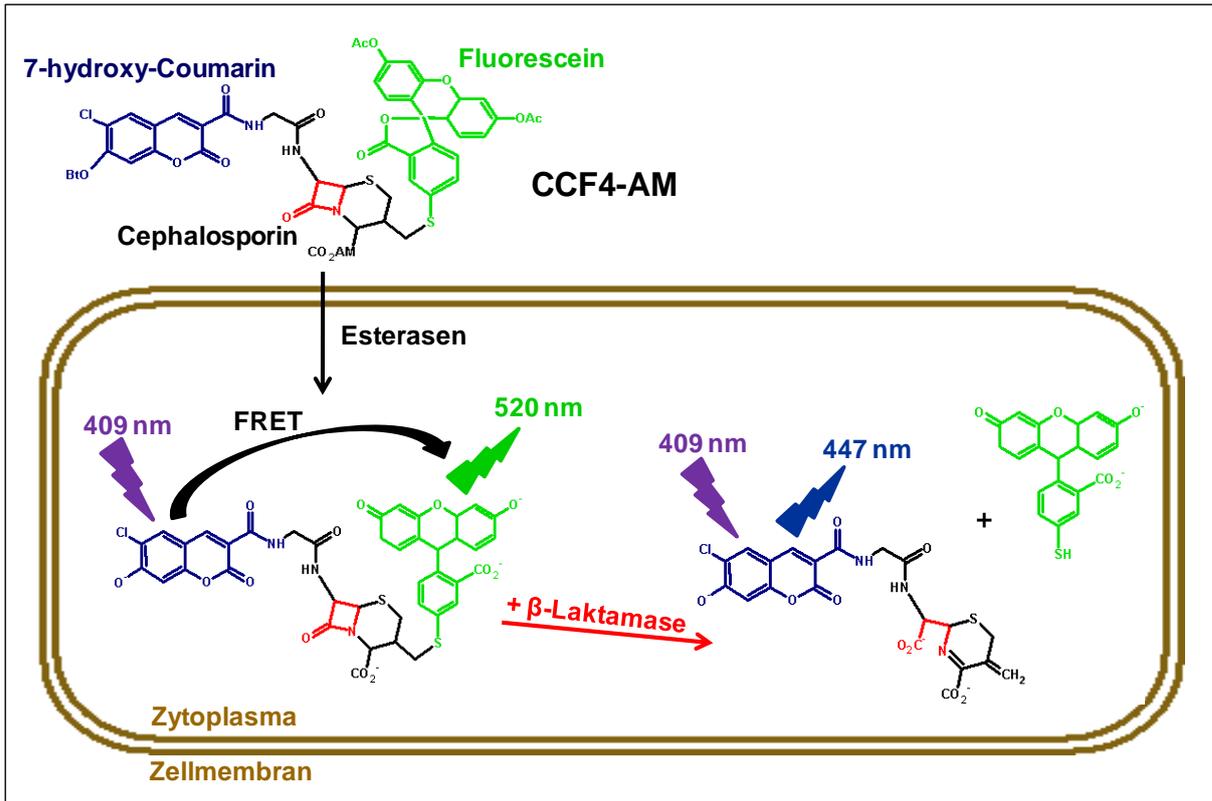


Abb. 16: Das Schema des β -Laktamasesubstrats

CCF4-AM ist ein membrangängiges β -Laktamasesubstrat, bestehend aus zwei Fluorophoren, 7-hydroxy-Coumarin (blau) und Fluorescein (grün), die über ein Cephalosporin-Molekül miteinander verbunden sind. Die Esterverbindungen, Acetyl (Ac), Butyryl (Bt) und Acetoxymethyl (AM) machen das Substrat membrangängig. Zytoplasmatische Esterasen hydrolysieren die Esterverbindungen im Zellinneren. Dadurch wird das Substrat negativ geladen und verbleibt im Zytoplasma. Im intakten CCF4-Molekül wird die Anregung von Coumarin auf das Fluorescein übertragen (FRET), was in einer grünen Fluoreszenz resultiert. Ist β -Laktamase vorhanden, wird der β -Laktam-Ring des Cephalosporins gespalten und FRET somit unterbrochen. Die Anregung des Coumarins wird als blaue Fluoreszenz detektierbar.

C.2.1 Klonierungsschema für die Herstellung der verschiedenen YopH/YopE_i-Bla-Reporter-Yersinien

Die TEM-1 β -Laktamase (Bla) aus *E. coli* wird als Selektionsmarker für die Ampicillin-Resistenzkassette in zahlreichen Plasmiden eingebaut.

Als Ausgangsplasmid diente ein YopH-Bla-Konstrukt, das von Dr. C. Gerke zur Verfügung gestellt wurde. Die *yopH-bla*-Sequenz wurde in das Tetrazyklinresistenzgen vom Vektor pACYC184 kloniert. Dabei wurde die vollständige Sequenz von YopH (524 AS) verwendet. Das Reporter-Plasmid wurde in den Yersinien-Wildstamm WA(pYV), sowie in die Mutante WA(pYV Δ YopH) und den Minivirulenzplasmid (pT3SS) enthaltenen Stamm WA(pT3SS) (s. Tab. 6) mittels Elektroporation eingeführt.

YopE ist ebenfalls ein Effektorprotein von *Y. enterocolitica*, welches für seine Translokation und Sekretion das Chaperon SycE benötigt. YopE verfügt über eine N-terminale Signalsequenz für die T3SS-abhängige Sekretion und Translokation. Es konnte gezeigt werden, dass die ersten N-terminalen 18 Aminosäuren notwendig und ausreichend für die Sekretion sind, hingegen aber mindestens 50 Aminosäuren für die Translokation benötigt werden (Jacobi *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurden verschieden lange N-terminale Sequenzen von YopE_i (i = 18, 53 oder 138 AS) an das Bla-Protein fusioniert, um die Translokationseffizienz in Abhängigkeit von der Länge der YopE-N-terminalen Sequenz zu untersuchen. Das Gen für die reife Form der β -Laktamase (ohne Signalsequenz) wurde mit Hilfe der Primer Bla-*BamHI*-For. und Bla-*Sall*-Rev. (s. Tab. 8) aus dem Plasmid pBR322 (*accession number* J01749) amplifiziert. Die Sequenz für β -Laktamase wurde anschließend am C-Terminus von den verschieden langen Aminosäuresequenzen des YopE-Proteins fusioniert. Als Ausgangs-Vektor für die Herstellung der YopE-Bla-Reportervektoren dienen die pACYC184-YopE-GFP-Reportervektoren, in denen 18, 53 oder 138 AS lange YopE-Sequenzen an GFP fusioniert waren (Jacobi *et al.*, 1998). Die kodierende Sequenz für das GFP wurde durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *Sall* erhalten, und an dessen Stelle wurde die Bla-Sequenz ligiert. Die pACYC184-YopE_i-Vektoren wurden in den Yersinien-Wildstamm WA(pYV), in die Yersinien-Mutante WA(pYV Δ YopE) und in den Stamm WA(pT3SS) (s. Tab. 6) transformiert (s. Klonierungsschema von Abb. 17).

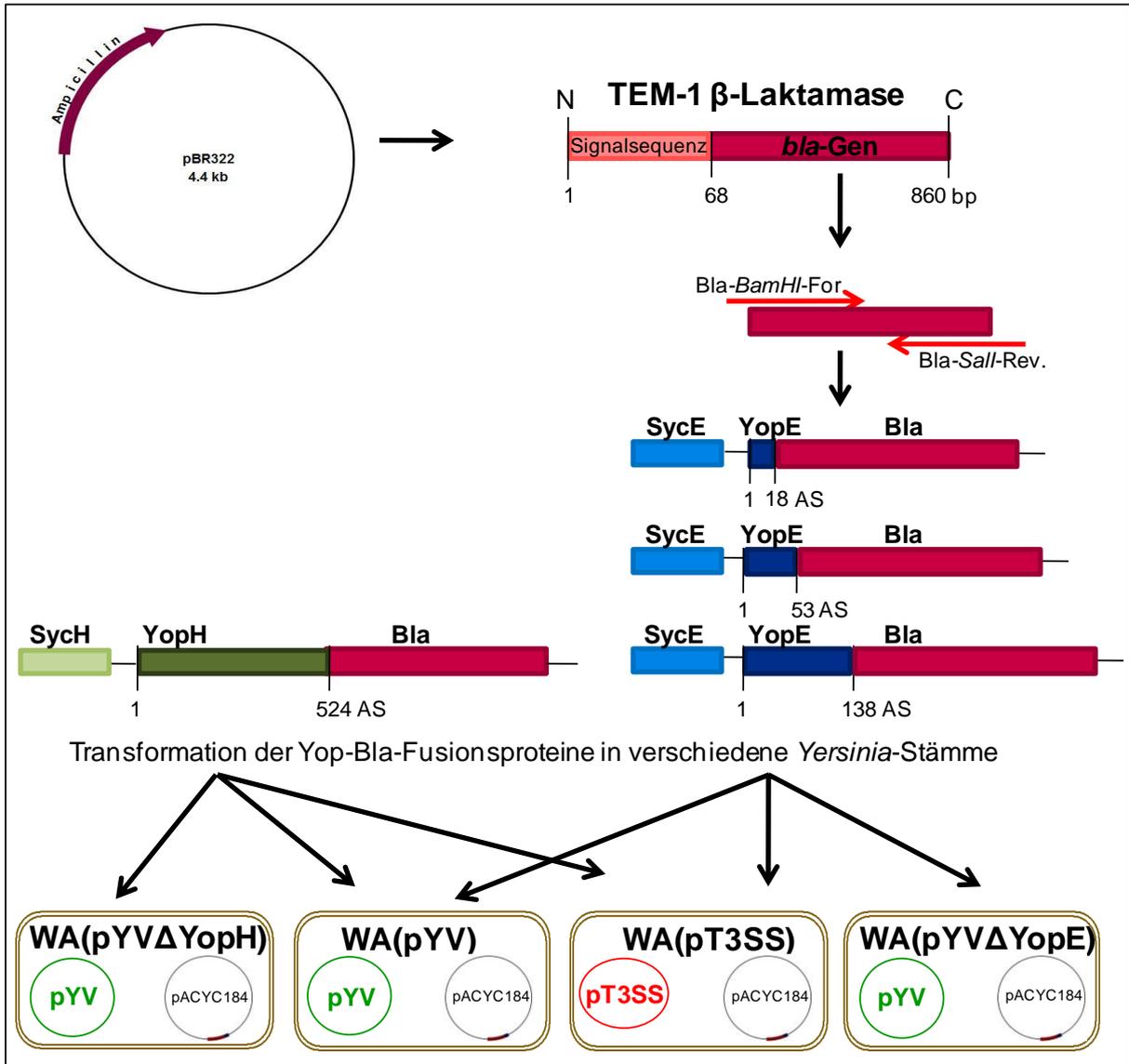


Abb. 17: Klonierungsschema der Yop-Bla-Reporter-Yersinien

Das Gen der TEM-1 β-Laktamase (Bla) wurde aus dem Plasmid pBR322 ohne die Sekretionssignalsequenz mittels PCR amplifiziert und an die verschiedenen langen YopE-Codons (entspricht 18 AS, 53 AS und 138 AS) über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den pACYC184-GFP-Vektor im Austausch gegen GFP kloniert. Dieses Plasmid wurde in die verschiedenen *Yersinia*-Stämme WA(pYV), WA(pYVΔYopE) und WA(pT3SS) transformiert und als YopE_i-Bla-Reporter-Yersinien bezeichnet. Das YopH-Bla-Reporterplasmid wurde in WA(pYV), WA(pYVΔYopH) und WA(pT3SS) transformiert und als YopH-Bla-Reporter-Yersinien bezeichnet.

Die einzelnen Klonierungsschritte der so generierten Yop-Bla-Reporter-Yersinien wurden durch Restriktionsanalysen überprüft. Die Integrität der generierten verschiedenen YopE_i-Bla-Reportervektoren wurde durch Sequenzierung überprüft.

C.2.1.1 Überprüfung der Sekretion des YopH-Bla-Fusionsproteins verschiedener *Yersinia*-Stämme

Es wurde ein Sekretionstest der verschiedenen Yop-Bla-Reporter-Yersinien durchgeführt (s. B.2.3.4), die sekretierten Yop-Proteine auf SDS-Gele aufgetragen (s. B.2.3.2) und das Proteinmuster mittels Coomassie-Färbung und Immunoblot (s. B.2.3.3) untersucht (s. Abb. 18). Im Coomassie gefärbten Gel ist eine 79 kDa große Bande zu erkennen (s. Abb. 18A), die bei den Kontrollstämmen WA(pYV), WA(pYVΔYopH) und WA(pT3SS) nicht vorhanden ist. Der Immunoblot (s. Abb. 18B) konnte zeigen, dass es sich dabei um das YopH-Bla-Fusionsprotein handelt.

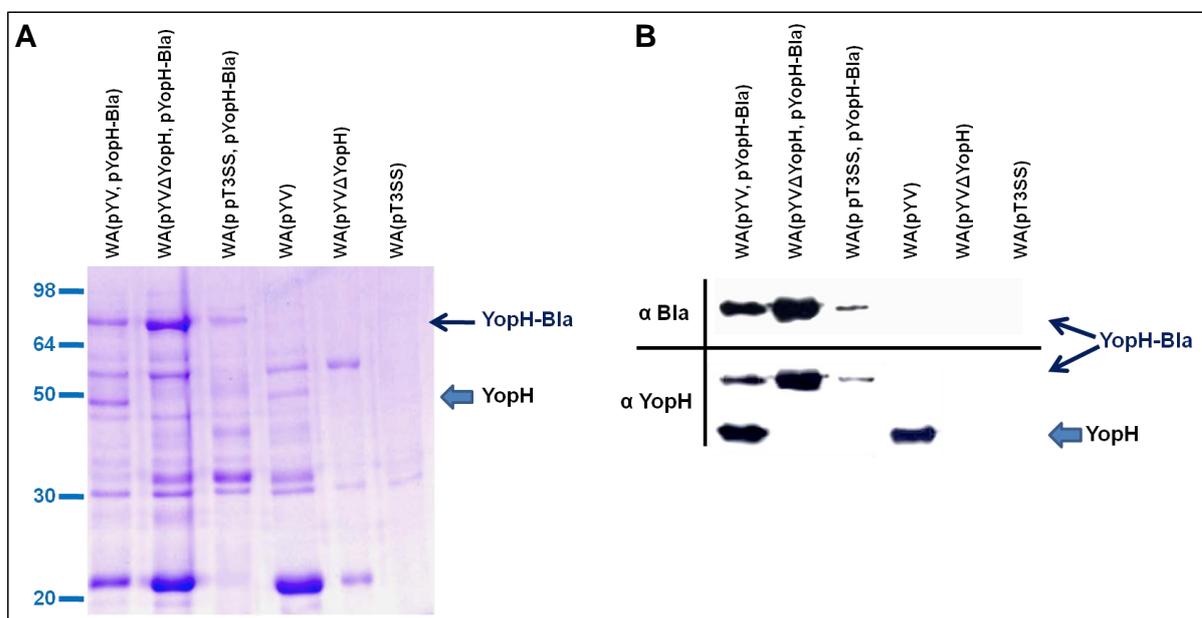


Abb. 18: Die Sekretion von YopH-Bla-Fusionsprotein in verschiedenen *Yersinia*-Stämmen

Sekretierte Proteine wurden aus dem Überstand isoliert, mit TCA gefällt, auf 12% ige SDS-Gele geladen und entweder mit Coomassie gefärbt (A) oder als Immunoblot zuerst mit anti-Bla (1:2.000 verdünnt) und mit monoklonalem anti-Mouse HRP detektiert. Danach wurde die Membran „gestrippt“ und mit anti-YopH (1:10.000 verdünnt) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem HRP gekoppelten anti-Rabbit IgG Antikörper (B).

C.2.1.2 Überprüfung der Sekretion der verschiedenen YopE_i-Bla-Fusionsproteine verschiedener *Yersinia*-Stämme

Die Sekretion der YopE_i-Bla-Fusionsproteine wurde überprüft, indem die sekretierten Proteine aus dem Kulturüberstand durch TCA-Fällung isoliert (s. B.2.3.4; B.2.3.4.2) und im SDS-PAGE aufgetrennt wurden (s. B.2.3.2). Durch Coomassie-Färbung und Western Blot-Analyse (s. B.2.3.3) konnten die Yop-Proteine detektiert werden. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Positionen der YopE_i-Bla-Fusionsproteine der Stämme WA(pYV, pYopE_i-Bla),

WA(pT3SS, pYopE_i-Bla) und WA(pYVΔYopE, pYopE_i-Bla). Wie in Abb. 19 zu erkennen ist, werden alle drei YopE_i-Bla-Fusionsproteine sekretiert. YopE₁₈-Bla erscheint bei etwa 28 kDa, YopE₅₃-Bla bei etwa 32 kDa und YopE₁₃₈-Bla bei etwa 47 kDa im SDS-PAGE. Der Immunoblot (s. Abb. 19B) konnte bestätigen, dass es sich bei diesen Proteinen auch tatsächlich um YopE_i-Bla-Fusionsproteine handelt. Die restlichen Yops werden ebenfalls in den Kulturüberstand sekretiert, aber in signifikant niedriger Menge als beim Wildtyp.

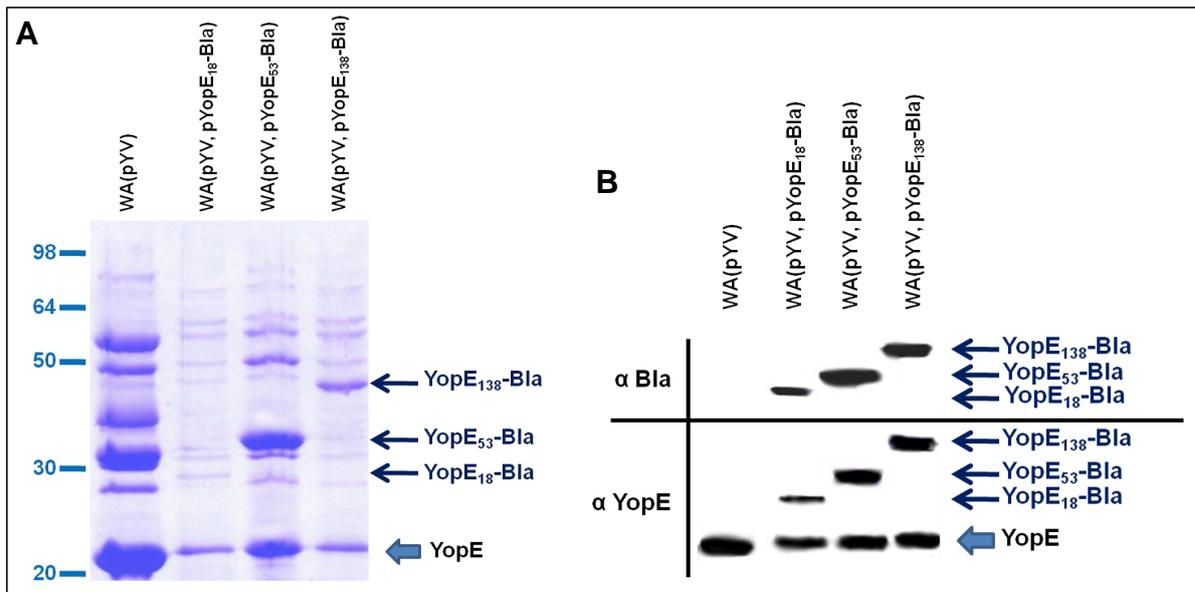


Abb. 19: Die Sekretion von verschiedenen YopE_i-Bla-Fusionsproteinen im *Yersinia*-Wildtypstamm WA(pYV):

Coomassie gefärbtes SDS-Gel (A). Nach der Western Blot-Analyse wurde die Expression der YopE_i-Bla-Fusionsproteine mit anti-Bla (1:2.000 verdünnt) detektiert. Danach wurde die Membran „gestrippt“ und die Detektion der Expression von YopE bzw. YopE_i-Bla mit anti-YopE (1:10.000 verdünnt) überprüft (B).

Auch bei den YopE_i-Bla-Fusionsproteinen in WA(pYVΔYopE) und WA(pT3SS) konnte durch Coomassie-Färbung und Immunoblot, mit spezifischen Antikörpern gegen Bla und YopE, die Sekretion der YopE_i-Bla-Fusionsproteine bestätigt werden (s. Abb. 20).

Dabei kann bei allen *Yersinia*-Stämmen die Beobachtung gemacht werden, dass YopE₅₃-Bla-Fusionsproteine erheblich besser sekretiert werden als YopE₁₈-Bla oder YopE₁₃₈-Bla-Fusionen (Wiedig *et al.*, 2005).

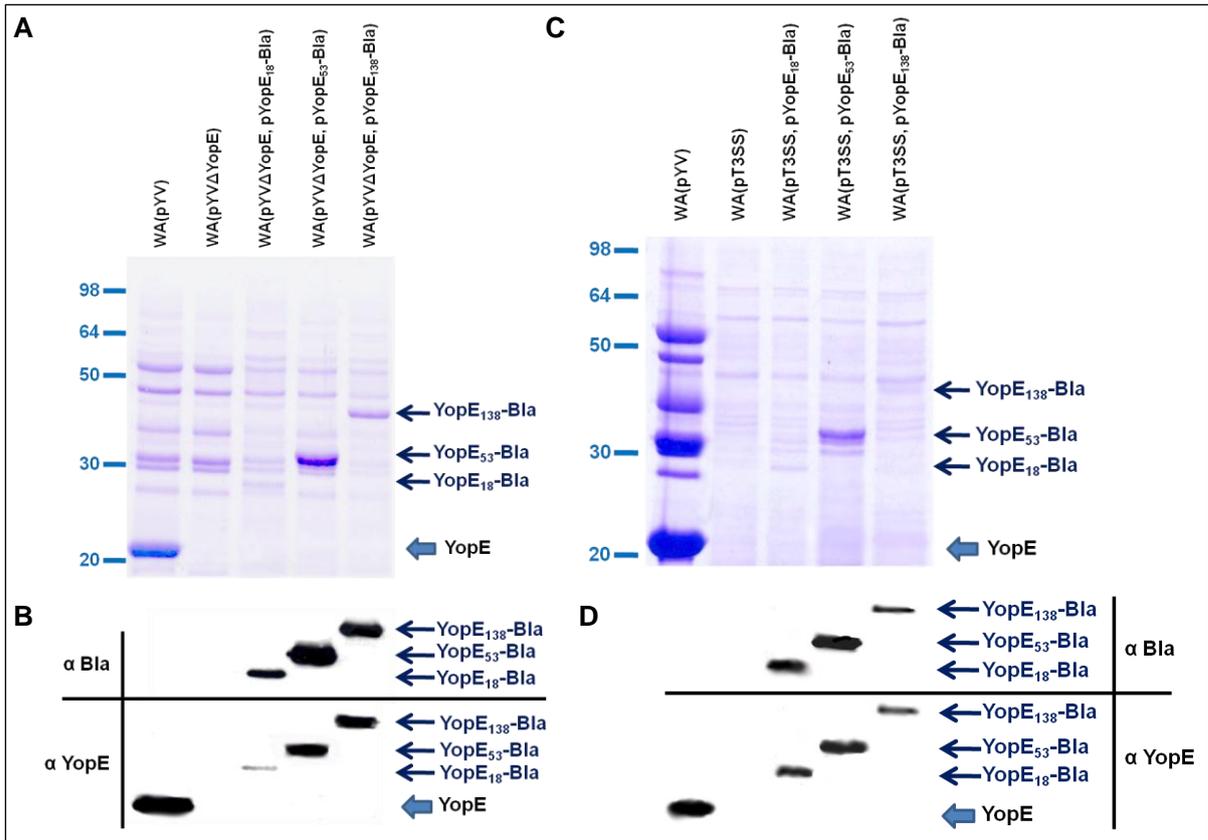


Abb. 20: Sekretion von verschiedenen YopE_i-Bla-Fusionsproteinen von den *Yersinia*-Stämmen WA(pYVΔYopE, pYopE_i-Bla) und WA(pT3SS, pYopE_i-Bla)

Nach dem Sekretionstest wurden die sekretierten Proteine auf 12 %ige SDS-Gele aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (A und C). Die Western Blot-Analyse der sekretierten Proteine wurde zuerst mit anti-Bla (1:2.000 verdünnt) detektiert, dann nach dem „Stripper“ mit anti-YopE (1:10.000 verdünnt) inkubiert (B und C).

C.2.1.3 Wachstumsversuche der Yop-Bla-Reporter-Yersinien

Zur Überprüfung des Wachstums der Yop-Bla-Reporter-Yersinien wurden Wachstumskurven bei 27°C erstellt. Der Wildstamm WA(pYV) und die Yop-Bla-Reporter-Yersinien wurden über Nacht in BHI-Medium angezogen. Nach Einstellung der optischen Dichte auf einen einheitlichen Ausgangswert von $OD_{600\text{ nm}} = 0,05$ wurde alle 30 min das Wachstum der Stämme durch Messung der $OD_{600\text{ nm}}$ über 5 h überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die verschiedenen Yop-Bla-Reporter-Yersinien ein mit WA(pYV) vergleichbares exponentielles Wachstum (log Phase) zeigen (s. Abb. 21). Bei den Yop-Bla-Reporter-Yersinien haben die WA(pT3SS)-Stämme ein langsames Wachstum und weisen am Ende der 5 h-Messung die niedrigsten $OD_{600\text{ nm}}$ -Werte auf. Da eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,36 etwa 10^6 Bakterien/μl entspricht (experimentell ermittelter Wert, Daten nicht gezeigt), weisen die WA(pT3SS)-Stämme einen Unterschied in der Bakterienzahl von etwa $0,5 \times 10^9$ /ml auf. Die Replikationszeit für WA(pYV) entspricht etwa 34 min, für WA(pT3SS) etwa 40 min. Dies würde bei einem Zeitraum von 5 h

ca. 10 Replikationsenden ergeben. Bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,05 entspräche dies einer Bakterienzahl von $3,6 \times 10^5$ Bakterien/ml, wenn die Replikationszeit 30 min beträgt.

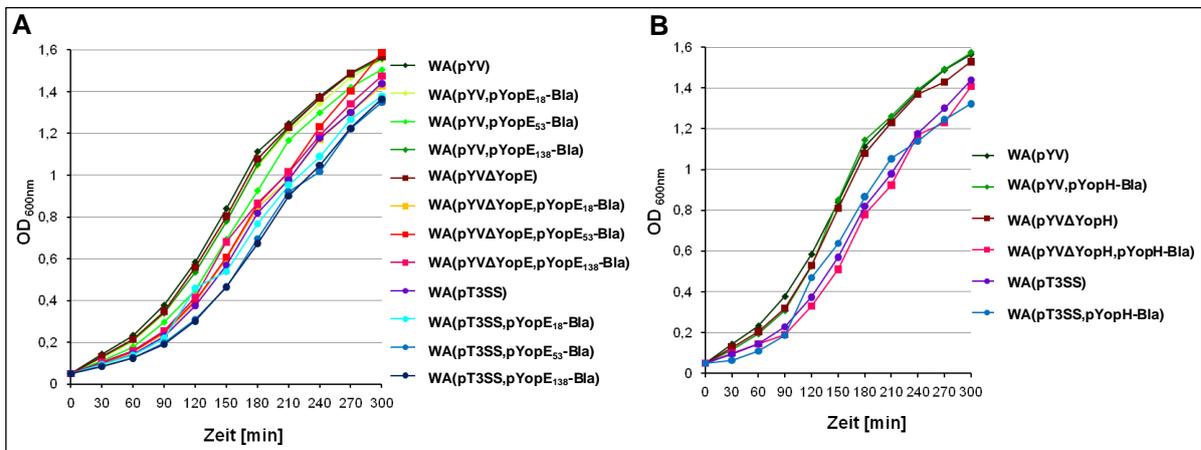


Abb. 21: Wachstumsvergleich der Yop-Blas-Reporter-Yersinien mit den Kontrollstämmen

Alle Stämme wurden auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,05 geeicht (entspricht etwa 5×10^5 Bakterien/ml) und in kleine Erlenmeyer-Kolben bei 27°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Jede 30 min wurden über einen Zeitraum von 5 h jeweils 1 ml entnommen und die optische Dichte gemessen. Alle YopE₁-Blas-Reporterstämme mit den jeweiligen Kontrollen (A). Alle YopH-Blas-Reporterstämme mit den jeweiligen Kontrollen (B).

C.2.2 Etablierung und Optimierung der Versuchsbedingungen für das Blas-Reportersystem *in vitro*

Dendritische Zellen (DCs) sind spezialisierte antigenpräsentierende Zellen und spielen eine maßgebliche Rolle bei der Initiierung und Koordinierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen verschiedene Erreger. Ihre Vorläufer aus Knochenmarkstammzellen gelangen auf dem Blutweg in nicht-lymphatisches Gewebe (z.B. Langerhanssche-Zellen in der Haut). Anschließend wandern sie über Lymphgefäße weiter zu lymphatischen Organen (z.B. Milz und Lymphknoten) und Schleimhäuten. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Yersinien mehrere Funktionen in DCs inhibieren und in ihnen Apoptose induzieren, um so die Immunantwort zu unterdrücken (Schoppet *et al.*, 2000; Erfurth *et al.*, 2004). Im Folgenden soll der Translokationsversuch für dendritische Zellen etabliert werden. Knochenmarkszellen wurden aus Mäusen isoliert (s. B.2.4.2) und *in vitro* zu dendritischen Zellen differenziert (s. B.2.4.2.1). Diese BMDCs (*bone marrow derived dendritic cells*) wurden mit Yersinien infiziert (s. B.2.5.1.1), mit CCF4-AM beladen (s. B.2.5.2.3) und im FACS (s. B.2.5.4) untersucht.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Experimente im Folgenden exemplarisch mit den Yop-Blas-Reporter-Yersinien, WA(pYV, pYopE₁₃₈-Blas) und/oder mit WA(pYV, pYopH-Blas) durchgeführt.

Im Folgenden wird der Hilfsbegriff „Translokationsrate“ als die Menge bzw. Anzahl an Bla-positiven Zellen, in denen Yop-Bla-Reporterproteine transloziert, und somit das Bla-Substrat CCF4 umgesetzt wurde, verstanden.

C.2.2.1 Unterschiedliche Translokationseffizienz von YopE und YopH-Bla-Reporterproteinen

BMDCs wurden für 1 h mit Yop-Bla-Reporter-Yersinien oder dem Wildtyp WA(pYV) mit einer MOI 50 infiziert und anschließend für 90 min bei 37°C mit CCF4-AM und Probenecid unter Lichtabschluss gefärbt (s. B.2.5.2.3). Die Zugabe von Probenecid, einem Anionen-Transport-Inhibitor, soll zusätzlich den Rücktransport von CCF4 aus der Zelle verhindern. Ohne Probenecid konnte keine Beladung der BMDCs mit CCF4-AM erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe der ungefärbten Zellen als Referenz wurde bestimmt, welche Zellen den Farbstoff aufgenommen hatten und welche nicht. Die CCF4-beladenen Zellen (grüne Fluoreszenz) wurden eingeschlossen (s. B.2.5.4), nach der Reporter-Aktivität analysiert und im Säulen-Diagramm dargestellt.

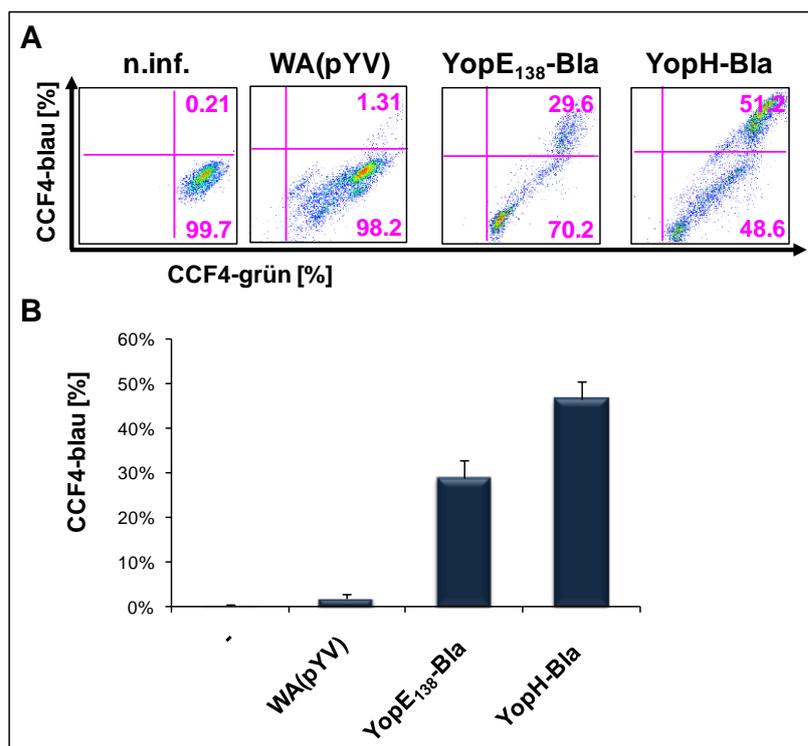


Abb. 22: Translokationseffizienz des YopE und YopH-Bla-Reporterproteins

BMDCs wurden mit verschiedenen Yop-Bla-Reporter-Yersinien mit einer MOI 50 für 60 min bei 37°C infiziert. Nicht infizierte (n.inf.) und mit WA(pYV) infizierte BMDCs wurden als Kontrolle eingesetzt. Die Beladung mit dem Substrat CCF4-AM und Probenecid erfolgte für 90 min nach der Infektion und wurde anschließend im FACS analysiert. Darstellung als „Dot-Plots“ (A). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte des prozentualen Anteils an blauen Zellen \pm Standardabweichungen. Die Mittelwerte stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (B).

In den „Dot-Plots“ (s. Abb. 22A) ist zu sehen, dass die Zellen gut beladen werden konnten, wobei man eine eindeutige Bla-positive Population nur bei den Yop-Bla-Reporter-Yersinien detektieren kann. Es konnte festgestellt werden, dass YopH-Bla deutlich mehr transloziert wird als YopE₁₃₈-Bla (s. Abb. 22B). Nicht infizierte Zellen emittierten nur grüne Fluoreszenz und der Wildtyp zeigte eine minimale, nicht signifikante Bla-Aktivität (s. Abb. 22B). Dies bedeutet, dass für den Nachweis der β -Laktamase-Aktivität, Yop-Bla-Reporterproteine transloziert werden müssen, da die in dem Wildtyp exprimierte β -Laktamase im Periplasma kaum detektiert werden kann (0,3 % \pm Standardabweichung).

C.2.2.2 Das Sekretionsverhalten spiegelt nicht das Translokationsverhalten der Yop-Bla-Reporterproteine wieder

Aufgrund der im FACS gemessenen höheren Translokationsrate von YopH gegenüber YopE (s. Abb. 22) haben wir uns die Frage gestellt, ob auch auf der Sekretionsebene das gleiche Verhalten festzustellen wäre.

Um dies zu überprüfen, wurde die Menge an sekretiertem YopE₁₃₈-Bla und YopH-Bla mittels Sekretionstest (s. B.2.3.4) überprüft. Die ausgefällten sekretierten Proteine wurden auf ein SDS-Gel aufgetrennt und durch einen Immunoblot analysiert. Die Detektion mit dem Bla-Antikörper zeigt, dass YopE₁₃₈-Bla stärker sekretiert wird als YopH-Bla (s. Abb. 23C und D). Um zu überprüfen, ob das beobachtete unterschiedliche Sekretionsverhalten von YopE₁₃₈-Bla und YopH-Bla auch für die nicht-modifizierten Wildtyp-Proteine YopH und YopE gilt, deren Gene in identischer Kopienzahl im *Yersinia*-Wildstamm vorliegen, wurde der Sekretionstest mit dem Wildstamm WA(pYV) durchgeführt (s. B.2.3.4). Die ausgefällten sekretierten Proteine wurden auf ein SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Das Bandenmuster der sekretierten Proteine in Abb. 23B zeigt, dass die Bande von dem Wildtyp-YopE deutlich stärker ist als die vom Wildtyp-YopH, was auf eine generell stärkere Sekretion schließen lässt.

Um auszuschließen, dass nicht eine unterschiedliche Kopienzahl von dem YopH-Bla-Vektor und dem YopE-Bla-Vektor in den transformierten Yop-Bla-Reporter-Yersinien zu einer unterschiedlichen Expression der jeweiligen Yop-Reporter-Gene (Gendosis-Effekt) und infolgedessen zu einer unterschiedlichen Translokations- bzw. Sekretionsrate führt, wurde die relative Menge der YopE- und YopH-Bla-Reporterplasmide in den jeweiligen Reporter-Yersinienstämmen mittels PCR-Analyse verglichen.

Übernachtskulturen von WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) und WA(pYV, pYopH-Bla) wurden 1:50 in BHI verdünnt und nach einer Inkubation von 3 h bei 27°C, wurden die Reporter-Plasmide mit der gleichen cfu-Anzahl aus den Yop-Bla-Reporter-Yersinien isoliert. Anschließend wurde

das Bla-Fragment aus den Reporter-Plasmiden mit den Primern Bla-*BamHI*-For. und pACYC184-2312-Rev. (s. Tab. 8) amplifiziert und verschiedene Verdünnungen des Amplifikates auf dem Agarosegel aufgetrennt. Aus der Abb. 23A ist ersichtlich, dass bei den verschiedenen Verdünnungen von WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) sogar ein etwas stärkeres Bla-Produkt amplifiziert werden konnte, als bei WA(pYV, pYopH-Bla). Die höhere Kopienzahl des YopE₁₃₈-Bla-Reporterplasmids wiederum könnte in eine höhere Expression bzw. Sekretion von YopE resultieren.

Daher lässt sich insgesamt sagen, dass die stärkere Translokationsrate von YopH nicht etwa durch eine größere Plasmid-Menge hervorgerufen wird, und damit einer höheren Expression unterliegt, oder durch eine stärkere Sekretion hervorgerufen wird. Folglich kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das Translokationsverhalten von Yops nicht unbedingt ihr Expressions-/Sekretionsverhalten widerspiegelt.

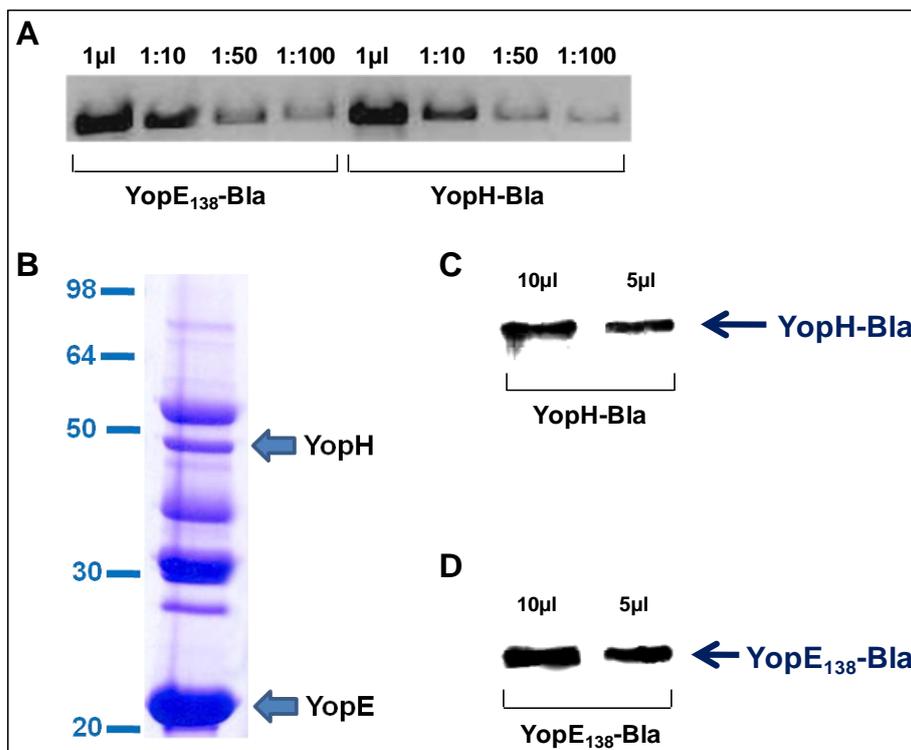


Abb. 23: Untersuchung der Kopienzahl der Reporterplasmide und der sekretierten Menge der Yop-Bla-Reporterproteine

Übernachtskulturen von WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) und WA(pYV, pYopH-Bla) wurden 1:50 in BHI verdünnt und für 3 h bei 27°C inkubiert. Von beiden Kulturen wurden verschiedene Verdünnungen für die PCR zur Amplifikation des Bla-Fragments eingesetzt (A). Die sekretierten Yops von WA(pYV) wurden aus dem Überstand isoliert (s. B.2.3.4), auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (B). Der Sekretionstest wurde mit WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) (D) und WA(pYV, pYopH-Bla) (C) durchgeführt, auf die gleiche OD_{600 nm} eingestellt und mit anti-Bla (1:2.000 verdünnt) inkubiert.

C.2.2.3 Die β -Laktamase-Aktivität ist translokationsabhängig

Um auszuschließen, dass die gemessene blaue Fluoreszenz nicht durch adhärente oder phagozytierte Yop-Bla-Reporter-Yersinien hervorgerufen wird, wurde untersucht, ob die Yop-Bla-Reporter-Yersinien in der Lage sind, das CCF4-AM-Substrat aufzunehmen und umzusetzen. Die Reporter-Yersinien wurden für 90 min bei 37°C mit CaCl₂-Zugabe geschüttelt (s. B.2.5.1.1). Bei 37°C wird die Expression von Yops induziert, Calcium verhindert aber deren Sekretion. Anschließend wurden je 1x10⁸ Bakterien für 2 h bei 27°C oder 37°C mit CCF4-AM inkubiert. Eine erfolgreiche Beladung der Yersinien mit CCF4-AM ist eine Voraussetzung für die Detektion der Bla-Reporteraktivität in den Yersinien. Wie in der Abb. 24 zu sehen ist, konnten die Yersinien weder gut beladen werden, noch konnte eine Umsetzung des CCF4-AM-Substrats in den schwach beladenen Yersinien-Zellen detektiert werden. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die β -Laktamase-Aktivität in den infizierten Zellen der translozierten Yop-Bla-Reporterproteine, und nicht einer möglichen intrabakteriellen Bla-Aktivität, zugrunde liegt.

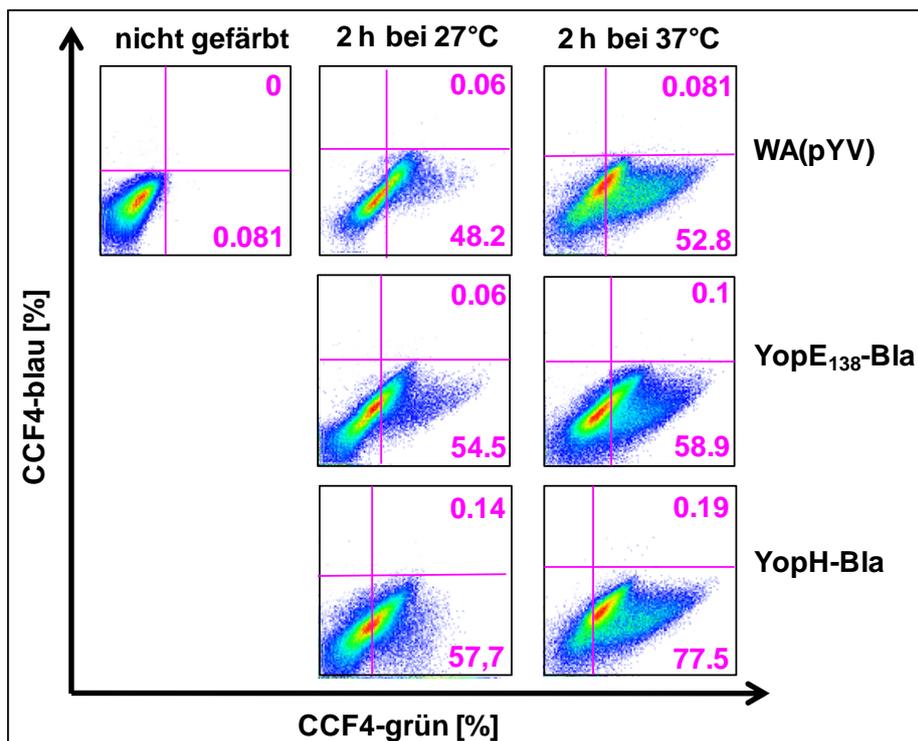


Abb. 24: Färbung von Yersinien mit CCF4-AM für 2 h bei 27°C und 37°C

Der Wildstamm WA(pYV) und die Reporter-Yersinienstämme wurden 1:40 in BHI verdünnt und mit 2,5 mM CaCl₂ für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 1x10⁸ Bakterien mit CCF4-AM und Probenecid für 2 h entweder bei 27°C oder bei 37°C gefärbt. Nach dem Waschen wurden die Bakterien im FACS-Puffer resuspendiert und im FACS gemessen. Die Prozentzahlen zeigen an, wieviele Zellen sich in der Auswahl befinden.

C.2.3 Der Einfluss von Umweltbedingungen auf die Yop-Translokation *in vitro*

Beim Translokationsgeschehen spielen viele verschiedene Faktoren eine Rolle, wie z.B. die herrschenden Temperaturbedingungen oder die Zusammensetzung vom Zellkulturmedium, wie z.B. Calcium-Konzentration, Zuckergehalt, Aminosäuren und Proteine (Lee *et al.*, 2001; Cambronne and Schneewind, 2002). Einige dieser Faktoren wurden auf ihren Einfluss auf die Translokationseffizienz von Yop-Bla-Reporterproteinen hin überprüft.

In den folgenden Versuchen wurden Milzzellen mit Yersinien infiziert, um die heterogene Zellpopulation, wie Lymphozyten, Makrophagen u.a. zu erfassen. Im Gegensatz zu den *in vitro* ausdifferenzierten BMDCs, enthalten die Milzzellen Immunzellen, wie Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophile u.a., mit denen Yersinien *in vivo* Kontakt aufnehmen.

C.2.3.1 Translokationseffizienz ist abhängig von den *Yersinia*-Prä-Inkubationsbedingungen und vom Zellkulturmedium

Um den Einfluss verwendeter Zellkultur-Medien auf die Translokation von Yops zu überprüfen, wurden Einzelzellsuspensionen aus der Milz isoliert (s. B.2.6.3) und entweder in DMEM oder in RPMI-Medium mit einer MOI 20 für 90 min bei 37°C infiziert. Die Prä-Inkubationsbedingungen des Reporterstamms WA(pYV, pYopH-Bla) wurden bezüglich der Temperatur und der Calcium-Konzentration verändert. Die Prä-Inkubation der Yersinien bei 37°C für 90 min dient der Induktion der Expression des Ysc-Injektisoms und der Yops. Die Zugabe von 2,5 mM CaCl₂ soll die Sekretion der exprimierten Yops inhibieren.

Eine Übernachtskultur des Reporterstamms WA(pYV, pYopH-Bla) wurde 1:40 in BHI, mit oder ohne 2,5 mM CaCl₂, verdünnt und bei 27°C oder bei 37°C für 90 min prä-inkubiert, bevor sie für die Infektion mit einer MOI von 20 eingesetzt wurden (s. B.2.5.1.1). Nach der Infektion bei 37°C wurden die Milzzellen mit CCF4-AM für 90 min bei RT beladen und anschließend im FACS-Gerät gemessen.

Wie der Abb. 25 zu entnehmen ist, konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Medien bezüglich der Anzahl an Bla-positiven Zellen festgestellt werden. Die Infektion in RPMI-Medium führte zu einer stärkeren Translokation als in DMEM. Darüber hinaus wurde die Translokation noch weiter erhöht, wenn die Yersinien bei 37°C vor der Infektion inkubiert worden waren. Auch die zusätzliche Zugabe von CaCl₂ bei der Prä-Inkubation der Yersinien führte zu einer höheren Rate an translozierten Zellen. Dieser Effekt konnte unabhängig vom eingesetzten Zellkulturmedium, DMEM oder RPMI, beobachtet werden. Die Prä-Inkubation

der Yersinien bei einer Temperatur von 37°C in Anwesenheit von 2,5 mM CaCl₂, führte infolgedessen zur höchsten Translokationsrate.

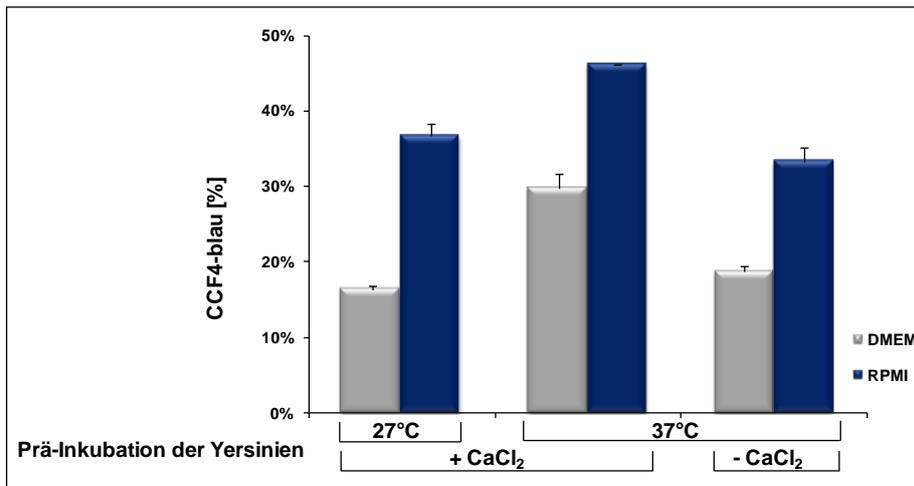


Abb. 25: Translokationsverhalten in Abhängigkeit von den *Yersinia*-Prä-Inkubationsbedingungen und von verwendeten Zellkulturmedien

WA(pYV, pYopH-Bla) wurde bei 27°C oder 37°C unter oder ohne CaCl₂-Zugabe prä-inkubiert und anschließend für die Infektion der Milzzellen mit MOI 20 in DMEM oder RPMI für 90 min bei 37°C eingesetzt. Die Zellen wurden nach der Infektion mit dem Substrat CCF4-AM für 90 min beladen und anschließend im FACS analysiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte des prozentualen Anteils an blauen Zellen.

C.2.3.2 Einfluss von CaCl₂ und Temperatur auf die Translokation

Die Versuche im vorherigen Kapitel haben gezeigt, dass die Prä-Inkubation der Yersinien in CaCl₂-haltigem Medium bei 37°C zu einer verstärkten Translokation geführt hat. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass signifikant mehr Yop-Bla-Reporterproteine transloziert werden, wenn die Infektion in RPMI und nicht in DMEM stattgefunden hat (s. Abb. 25). Ein interessanter Unterschied zwischen RPMI-Medium und DMEM besteht in der enthaltenen Calcium-Konzentration. Während RPMI eine Ca²⁺-Konzentration von 0,4 mM aufweist, enthält DMEM mit 1,8 mM eine viel höhere Calcium-Konzentration (s. Tab. 19 und Tab. 20 im Anhang). Aus diesem Grund soll im Folgenden der Einfluss von Temperatur und CaCl₂ auf die Translokation eingehender überprüft werden. Dazu wurden Milzzellen verwendet (s. B.2.6.3) und mit einer MOI 20 mit WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) oder WA(pYV, pYopH-Bla) und dem Wildstamm als negative Kontrolle infiziert. Die Bakterienkulturen wurden, wie im Abschnitt B.2.5.1.1 beschrieben, für die Infektionsversuche vorbereitet. Dabei wurden die Yersinien bei 27°C oder bei 37°C unter Zugabe von CaCl₂ prä-inkubiert. Um die Versuchsparameter bei der Infektion auf wenige Variable zu reduzieren, wurde die Infektion in PBS mit 5 % FCS in Mikrotiterplatten durchgeführt. So lässt sich die Wirkung von CaCl₂ auf die Translokation differenzierter untersuchen. Verschiedene CaCl₂-Konzentrationen wurden zugegeben und die Zellen entweder bei 27°C oder bei 37°C für 90 min inkubiert.

Nach der Infektion wurden die Zellen mit CCF4-AM für 90 min angefärbt und im FACS analysiert (s. Abb. 26A). Bei der Prä-Inkubation der Yersinien bei 27°C mit anschließender Infektion bei 27°C hat kaum eine Translokation stattgefunden. Die Menge an CCF4-blauen Zellen lag unter 5 %. Dabei spielte es keine Rolle wieviel CaCl₂ bei der Infektion zugegeben wurde. Dagegen führte eine Prä-Inkubation der Yersinien bei 37°C mit anschließender Infektion, ebenfalls bei 37°C, zu einer signifikanten Yop-Bla-Translokation. Dabei lag der Anteil an blauen Zellen nach Infektion mit WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) oder WA(pYV, pYopH-Bla) bei ca. 7 % bzw. bei ca. 20 %. Wenn unter diesen Infektionsbedingungen zusätzlich 0,25 mM oder 0,5 mM CaCl₂ zugegeben wurde, führte dies zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an Bla-positiven Zellen. Sie erreichte z.B. ca. 30 % und 40 %, wenn die Infektion mit WA(pYV, pYopH-Bla) in Anwesenheit von 0,25 bzw. 0,5 mM CaCl₂ stattgefunden hat. Die Zugabe von 2,5 mM CaCl₂ hingegen verminderte drastisch die Translokationsrate bis auf weniger als 5 %. In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss der CaCl₂-Konzentration auf die Translokationseffizienz detaillierter untersucht. Hierfür wurden die Yersinien vor der Infektion bei 27°C oder 37°C für 90 min inkubiert (s. B.2.5.1.1). Die Infektion der Milzzellen erfolgte anschließend unter verschiedenen CaCl₂-Konzentrationen in PBS mit 5 % FCS (s. Abb. 26B). Aus der Abb. 26B ist zu erkennen, dass das Vorhandensein von CaCl₂ bis zu einer Konzentration von 0,5 mM die Translokationsrate um mehr als das zweifache (von ca. 10 % ohne CaCl₂, auf ca. 25 % bei 0,5 mM) steigerte. Ab einer CaCl₂-Konzentration von 1 mM ging die Translokationsrate stark zurück bis sie bei 2,5 mM CaCl₂-Konzentration kaum messbare Werte erreicht hat. Darüber hinaus führte die Prä-Inkubation der Bakterien bei 37°C unter Zugabe der CaCl₂-Konzentrationen von 0 mM bis zu 1,5 mM zu einer leicht erhöhten Translokationsrate im Vergleich zur entsprechenden Prä-Inkubation bei 27°C. Wenn dagegen die Infektion in Anwesenheit von 2 und 2,5 mM CaCl₂ stattfand, erzielten die Reporter-Yersinien, die bei 27°C prä-inkubiert wurden, höhere Translokationsraten als die unter 37°C prä-inkubierten Bakterien. Die Prä-Inkubation der Yersinien bei 27° scheint damit zu einer höheren Toleranz gegenüber höheren CaCl₂-Konzentrationen, in einem Bereich von 2-2,5 mM, hinsichtlich ihres Translokationsverhaltens zu führen.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass eine gewisse Konzentration an CaCl₂ förderlich für die Translokation ist. Dementsprechend könnten die unterschiedlichen Translokationsraten, die mit RPMI und DMEM erzielten wurden (s. C.2.2.1; Abb. 25) zumindest bis zu einem gewissen Grad auf ihren unterschiedlichen Gehalt an Calcium zurückgeführt werden. Ein weiterer Unterschied zwischen diesen Zellkultur-Medien besteht in ihrem Gehalt an Glukose. Das RPMI-Medium enthält 11 mM, DMEM 5,6 mM Glukose. Um zu prüfen, ob auch Glukose einen Einfluss auf die Translokationsrate hat, wurden die

Infektionsversuche in PBS mit 5 % FCS, mit oder ohne Zugabe von 4 mM Glukose durchgeführt. Die normale Glukose-Konzentration im Blut der Maus, als wie auch beim Menschen, beträgt 4-5,5 mM (Chu and Bohlen, 2004). Aus diesem Grund wurde die Zugabe von Glukose mit einer Konzentration von 4 mM gewählt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Translokationsrate nach Glukose-Zugabe nicht signifikant änderte (s. Abb. 26A).

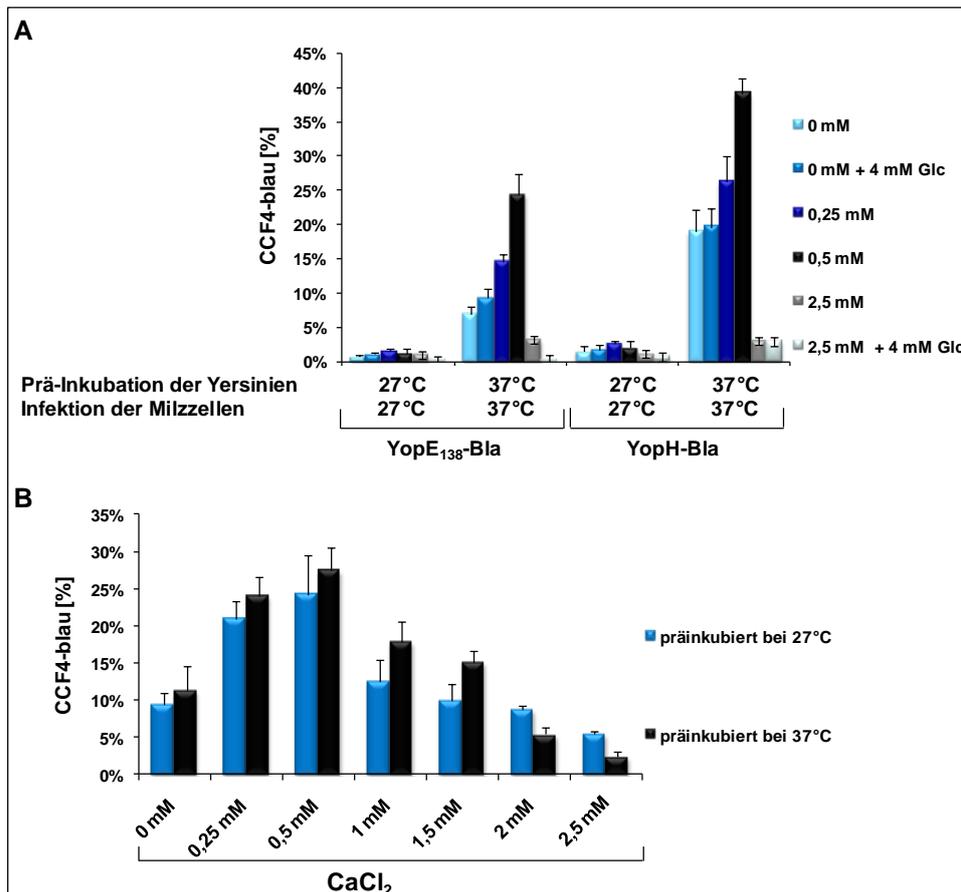


Abb. 26: Einfluss von CaCl₂ und Temperatur auf die Translokation von Yops

Milzzellen wurden in Mikrotiterplatten in PBS + 5 % FCS zu je $1,5 \times 10^6$ /Napf ausgesät. Reporter-Yersinien wurden 1:40 in BHI verdünnt und unter der Zugabe von 2,5 mM CaCl₂ für 90 min entweder bei 27°C oder bei 37°C prä-inkubiert. Milzzellen wurden mit den Reporter-Yersinien (MOI 20) unter verschiedenen CaCl₂- und Glukose (Glc)-Konzentrationen bei 27°C oder 37°C für 90 min infiziert (A). Milzzellen wurden mit WA(pYV, pYopH-Bla) (MOI 20) infiziert und unter verschiedenen CaCl₂-Konzentrationen bei 37°C für 90 min inkubiert (B). Nach der Infektion wurden die Zellen mit CCF4-AM und Probenecid bei RT für 90 min inkubiert und anschließend im FACS analysiert. Die mittleren Prozentanteile der Bla-positiven Zellen sind aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten angegeben.

Der positive Einfluss von CaCl₂ auf die Translokation war überraschend, da bekannt ist, dass Calcium die Sekretion eher inhibiert, und durch den Einsatz von Calcium-Chelatoren die Sekretion *in vitro* induziert werden kann (Heesemann *et al.*, 1986; Forsberg *et al.*, 1991; Rosqvist *et al.*, 1994; Boland *et al.*, 1996; Wiley *et al.*, 2007). Um zu einem direkten Vergleich zwischen dem Translokations- und Sekretionsverhalten, in Abhängigkeit von

Calcium, zu gelangen, wurde ein Sekretionstest unter den selben Calcium- und Temperaturbedingungen wie den obigen Translokationsversuchen durchgeführt, und das Sekretionsverhalten untersucht.

C.2.3.3 Der Einfluss von CaCl_2 und Temperatur auf die Expression und Sekretion, ohne Zugabe von Sekretionsstimuli

Die Bakterienkulturen wurden mit 2,5 mM CaCl_2 bei 27°C oder 37°C für 2 h prä-inkubiert. Anschließend wurden die Yersinien in PBS in Mikrotiterplatten überführt und für weitere 2 h mit der Zugabe von unterschiedlichen CaCl_2 -Konzentrationen (von 0-2,5 mM) bei derselben Temperatur wie schon bei der Prä-Inkubation verwendet, inkubiert. Danach wurden die Proteine im Überstand mit TCA gefällt (s. B.2.3.4.2), die freigesetzten Proteine (FP), sowie die Zelllysate (ZL) auf SDS-PAGE aufgetragen (s. B.2.3.2), anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (s. B.2.3.3.2) und gegen YopE bzw. YopH immungefärbt (s. B.2.3.3.4).

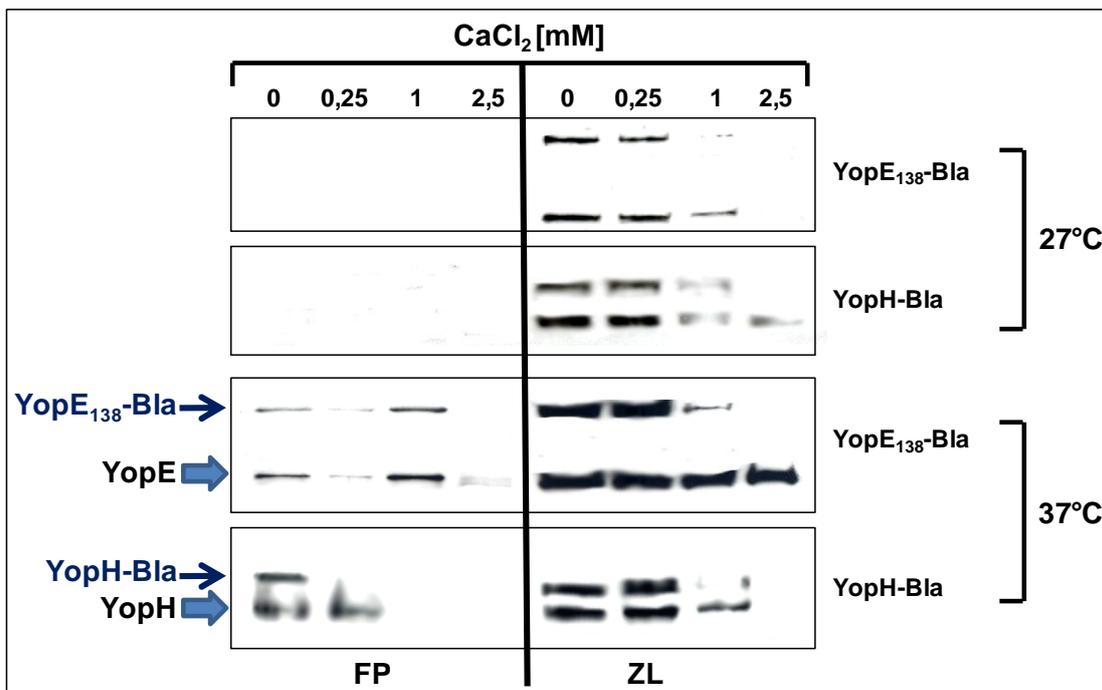


Abb. 27: Einfluss von CaCl_2 und Temperatur auf die Yop-Bla-Sekretion

Die *Yersinia*-Übernachtskulturen wurden 1:40 in BHI verdünnt, auf die gleiche Ausgangs-OD geeicht und für 2 h entweder bei 27°C oder bei 37°C mit Zugabe von 2,5 mM CaCl_2 geschüttelt. Anschließend wurden die Yersinien gewaschen, in PBS in Mikrotiterplatten überführt und unter Zugabe verschiedener CaCl_2 -Konzentrationen (0-2,5 mM) bei entsprechender Temperatur für 2 h inkubiert. Die sekretierten Proteine wurden aus dem Überstand mit TCA gefällt und das Bakterienpellet lysiert. Die Proteinproben aus dem Bakterienpellet (ZL) und dem Bakterienüberstand (FP) wurden in SDS-Gele aufgetrennt und anschließend wurde die Expression bzw. Sekretion von YopE₁₃₈-Bla bzw. YopH-Bla mittels Western Blot untersucht.

Aus der Abb. 27 ist ersichtlich, dass Yops bei 27°C exprimiert werden. Allerdings wird deren Expression mit Zugabe einer höheren Ca^{2+} -Konzentration inhibiert. Die Analyse der

Bakterien-Überstände ergab aber, dass bei 27°C keine Sekretion stattgefunden hat, unabhängig davon, ob CaCl₂ vorhanden war oder nicht. Wenn die Bakterienkulturen dagegen bei 37°C inkubiert wurden, wurden YopH und YopE (als auch YopH-Bla und YopE₁₃₈-Bla) auch ohne Zugabe von Sekretions-Induktoren (EGTA, Glukose, Magnesium) sekretiert. Diese Sekretion wurde durch Zugabe von CaCl₂ negativ beeinflusst, da die Sekretion von YopH schon bei Zugabe von 1 mM CaCl₂ und die von YopE erst bei einer CaCl₂-Konzentration von 2,5 mM ganz inhibiert wurden. Auch die Expression der Yop-Bla-Reporterproteine wird durch eine hohe Ca²⁺-Konzentration inhibiert, wobei auch auf der Expressionsebene das Wildtyp-YopH sensitiver gegenüber dem Einfluss von CaCl₂ zu sein scheint als das Wildtyp-YopE. Während die Expression von YopH bei 2,5 mM CaCl₂ schon ganz inhibiert wurde, war YopE bei derselben CaCl₂-Konzentration noch stark exprimiert. Verglichen mit den Ergebnissen zum Translokationsverhalten in Abhängigkeit von Calcium (s. C.2.3.2), wo z.B. 0,25-0,5 mM CaCl₂ sogar die höchsten Translokationsraten von YopH-Bla induzierte, zeigt dagegen, dass bereits eine CaCl₂-Konzentration von 0,25 mM die Sekretion desselben ganz unterbunden hat. Daraus kann geschlossen werden, dass Calcium eine differentielle Wirkung auf Translokation und Sekretion hat, und die Induktion der Translokation möglicherweise nicht ganz demselben Mechanismus unterliegt wie die der Sekretion.

C.2.4 Etablierung und Optimierung von Versuchsbedingungen für kinetische Translokationsstudien *in vitro*

Um kinetische Studien durchführen zu können, sollte die Infektion zu einem beliebigen Zeitpunkt gestoppt werden und durch die zeitnahe Messung der Umsatzrate des CCF4-Substrats, die Translokationsrate bestimmt werden. Wenn die Beladung der Zellen, die 90 Minuten bei RT andauert, erst nach der Infektion durchgeführt wird, kann das momentane Translokationsgeschehen nicht optimal wiedergespiegelt werden. Denn während der Beladungsphase kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Infektions- und damit der Translokationsprozess tatsächlich gestoppt wurde. Aus diesem Grund scheint das bisher verwendete Post-Beladungsverfahren für kinetische Studien nicht geeignet zu sein. Daher wurden zwei andere Verfahren für ihre Eignung für kinetische Studien getestet:

1. Simultane Beladung und Infektion der Zellen, und
2. Prä-Beladung der Zellen mit dem Substrat vor der Infektion.

Dabei soll die Beladungseffizienz der Zellen mit CCF4-AM, und damit die Reporter-sensitivität, nicht beeinträchtigt werden.

C.2.4.1 Optimierung der Färbebedingungen für kinetische Studien

C.2.4.1.1 *Simultane Beladung und Infektion der Zellen*

BMDCs wurden gleichzeitig mit CCF4-AM beladen und mit WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) (MOI 50), in oder ohne Anwesenheit von 2,5 mM Probenecid, bei 37°C infiziert. Die Infektion wurde nach bestimmten Zeiten gestoppt und die Zellen in 3,7 % Formaldehyd fixiert. In der Abb. 28A sieht man, dass je länger die Infektion andauert, die Zugabe von Probenecid einen signifikanten Unterschied in der Menge an blauen Zellen aufweist. Jedoch sind die Translokationsraten von 1-2,5 % weit unter den erwarteten Werten (s. Abb. 28A), verglichen mit der Translokationsrate von 30 %, wenn die CCF4-Färbung nach der Infektion bei RT stattgefunden hat (s. Abb. 28C). Trotz des Einsatzes von Probenecid scheint CCF4-AM bzw. dessen Produkt, Coumarin, schnell bzw. verstärkt bei 37°C aus der Zelle hinaus befördert zu werden. Ein weiterer Grund, der zusätzlich zu der schwachen Translokationsrate beigetragen haben könnte, könnte die kurze Überlappungsphase zwischen der Beladung, der Yop-Bla-Translokation und der detektierbaren Umsetzungsrate des CCF4-Substrats sein. Eine optimale Beladung der Zellen braucht eine Zeitdauer von ca. 60-90 min. Wenn die Infektion, die schon nach spätestens 90-120 min beendet werden soll, simultan mit der CCF4-AM-Beladung stattfinden würde, wäre die Infektion beendet, wenn gerade eine optimale Beladung mit dem Substrat erreicht werden würde (vorausgesetzt, das Substrat wird weitgehend in der Zelle zurückgehalten).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das simultane Färbungsverfahren nicht das tatsächliche Translokationsgeschehen widerspiegelt, und es damit für kinetische Studien nicht geeignet ist.

C.2.4.1.2 *Beladung der Zellen mit CCF4-AM vor der Infektion*

BMDCs wurden zuerst mit CCF4-AM (mit 2,5 mM Probenecid) für 60 min bei 37°C beladen, bevor sie mit einer MOI 50 für eine unterschiedliche Zeitdauer mit den YopE₁₃₈-Bla-Reporter-Yersinien und dem *Yersinia*-WT-Stamm als Kontrolle infiziert wurden. Die Infektion fand in oder ohne die Anwesenheit von 2,5 mM Probenecid statt. Das Diagramm in Abb. 28B zeigt, dass durch die Prä-Färbung der Zellen die Translokation besser durch das Yop-Bla-Reportersystem detektiert werden kann. Weiterhin ist den Daten zu entnehmen, dass die Zugabe von Probenecid während der Prä-Färbung erforderlich ist. Dagegen führte die Zugabe von Probenecid während der Infektion zu schwächeren Translokationsraten, vor allem in den ersten 60 min. Die Prä-Färbung der Zellen mit CCF4-AM vor der Infektion

erzielte zwar bessere Ergebnisse als die simultane Färbung, allerdings wurde eine signifikante Population an Bla-positiven Zellen erst nach 90 min sichtbar (s. Abb. 28B). Außerdem liegen die Translokationsraten von ca. 10 % nach 60 min immer noch weit unter den erwarteten Werten, die über 30 % liegen, wenn die CCF4-Färbung nach der Infektion bei RT stattgefunden hat (s. Abb. 28C). Darüber hinaus ist nicht bekannt, welche Auswirkungen der Anionen-Transporter-Inhibitor, Probenecid, auf die Zellen und damit auch auf das Infektionsgeschehen hat. Aus diesen Gründen wurde nach weiteren, noch besseren Alternativen gesucht, um kinetische Studien durchführen zu können.

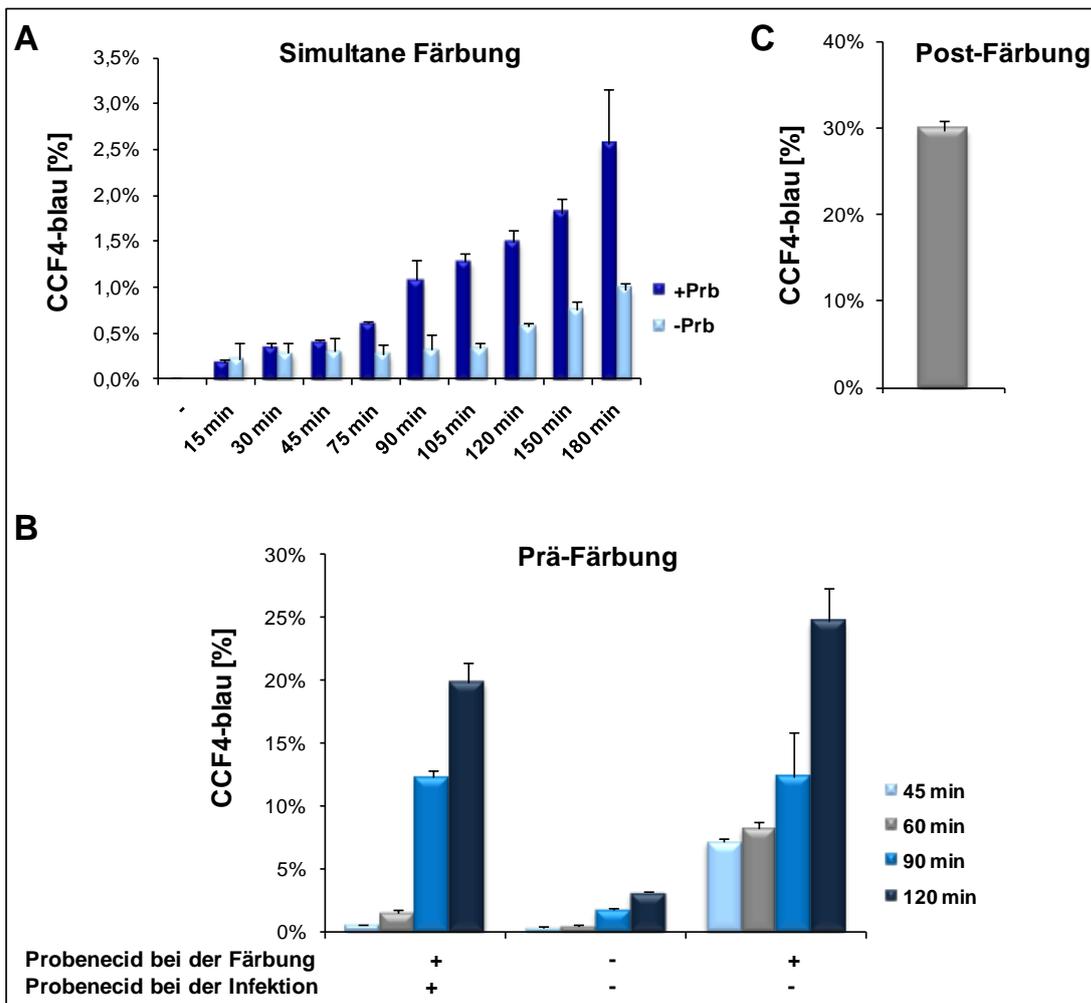


Abb. 28: Unterschiedliche Färbebedingungen und die Wirkung von Probenecid auf Translokationsebene

Eine simultane Färbung und Infektion mit WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) wurde hinsichtlich der Wirkung von Probenecid durchgeführt. +Prb= Zugabe von Probenecid; -Prb= ohne Probenecid. Die Infektion und die Färbung wurden nach unterschiedlichen Zeiten gestoppt (A). BMDCs wurden mit CCF4-AM und 2,5 mM Probenecid 1 h bei 37°C gefärbt, bevor sie mit YopE₁₃₈-Bla-Reporter-Yersinien über verschiedene Zeiträume infiziert wurden (B). Dabei wurde Probenecid zur Färbung und zur Infektion zugegeben oder nur zur Färbung. Als Kontrolle wurden BMDCs ohne Probenecid-Zugabe gefärbt und infiziert. Infektion der BMDCs mit WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) für 1 h und anschließender Post-Beladung mit CCF4-AM und Probenecid (C). Die Mittelwerte wurden aus zwei Versuchen berechnet.

Wie in den Abb. 28A und B gezeigt wurde, ist für eine optimale Beladung der Einsatz des Anionen-Transport-Inhibitors, Probenecid, notwendig. Allerdings, scheint die Zugabe von Probenecid sowohl zur Färbung als auch zur Infektion (s. Abb. 28B), eine geringere Beladung zu bewirken, als wenn Probenecid nur zur Färbung hinzugegeben wird. Falls also die Beladung während oder vor der Infektion stattfinden soll, ist nicht klar, inwieweit Probenecid die Bakterien, und damit die Infektion und Translokation, beeinflussen könnte. Daher soll im Folgenden der Einfluss von Probenecid auf Yersinien untersucht werden. Dabei wurde geklärt, ob die Zugabe von Probenecid, das den Rücktransport von CCF4 aus der Zelle inhibieren soll, einen Einfluss auf das Wachstum sowie auf die Sekretion der Yop-Proteine hat. Das Wachstum der Yop-Bla-Reporter-Yersinien wurde in und ohne Anwesenheit von Probenecid (2,5 mM) über einen Zeitraum von 30 h verglichen (s. Abb. 29A).

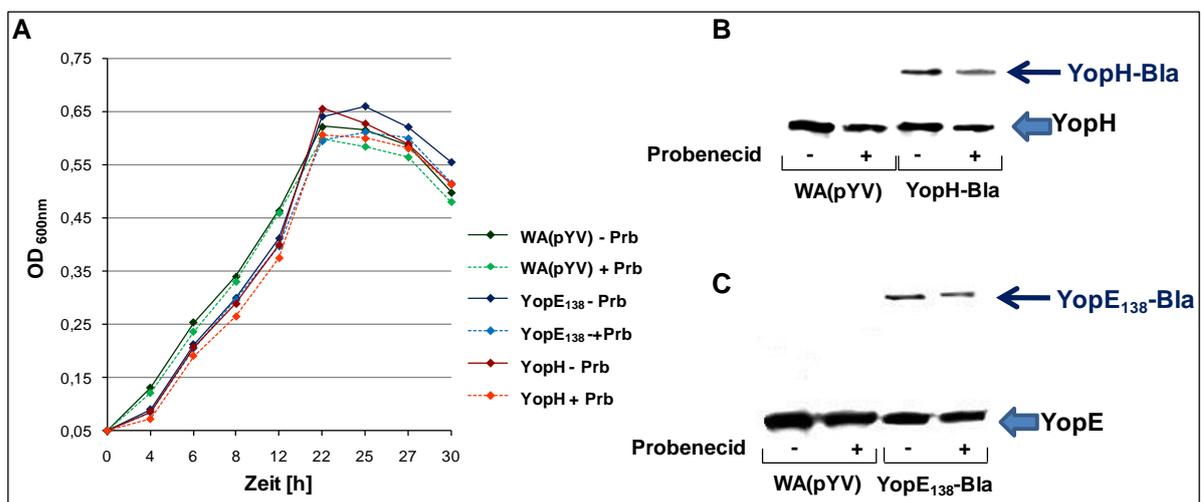


Abb. 29: Einfluss von Probenecid auf Wachstum und Sekretion der Yersinien

Alle Bakterienkulturen wurden auf die gleiche Ausgangs-OD geeicht und im BHI-Medium mit entsprechendem Antibiotikum, bei 27°C, mit oder ohne Zugabe von 2,5 mM Probenecid über einen Zeitraum von 30 h kultiviert. Die OD_{600 nm} wurde zu bestimmten Zeitpunkten gemessen (A). Der Sekretionstest wurde entweder in Anwesenheit von Probenecid (+Prb) oder ohne (-Prb) durchgeführt und die sekretierten Proteine mittels Western Blot und den Antiseren Anti-YopE und Anti-YopH analysiert. Sekretionstest für den Reporter-Stamm WA(pYV, pYopH-Bla) (B). Sekretionstest für den Reporter-Stamm WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) (C).

Aus den Wachstumskurven kann abgelesen werden, dass unter Probenecid-Bedingungen das Wachstum der Yersinien minimal inhibiert wird. Dabei entspricht der mittlere Wert des Unterschieds zwischen der OD_{600 nm} mit und ohne Probenecid nach 30 h 0,048, was einer Bakterienzahl von etwa $1,3 \times 10^5$ entspricht. Desweiteren wurde die Sekretion unter Probenecid-Zugabe überprüft. Dazu wurde ein Sekretionstest in und ohne Anwesenheit von 2,5 mM Probenecid durchgeführt und die freigesetzten Proteine aus dem Überstand isoliert (s. B.2.3.4) und mit TCA gefällt (s. B.2.3.4.2). Nach der SDS-Gelelektrophorese (s. B.2.3.2)

wurden die Proteine auf PVDF-Membranen übertragen (s. B.2.3.3.2) und gegen YopH bzw. YopE (s. B.2.3.3.4) immungefärbt (s. Abb. 29B und C). Der optische Vergleich der Bandensignale von sekretierten YopH-Bla und YopE₁₃₈-Bla zeigt ein um mindestens $\frac{1}{4}$ schwächeres Signal, wenn die Sekretion in Anwesenheit von Probenecid stattfand (s. Abb. 29B und C). Folglich scheint die Anwesenheit von Probenecid die Sekretion zu beeinflussen. Dies könnte wiederum einen negativen Einfluss auf die Translokationsrate zur Folge haben.

C.2.4.2 Etablierung von Zellfixierungsbedingungen für kinetische Studien

Die Yop-Bla-Reporteraktivität konnte am Besten gemessen werden, wenn die Beladung der Zellen erst nach der Infektion, in Anwesenheit von Probenecid, durchgeführt wurde. Wenn sichergestellt werden kann, dass keine weitere Translokation, sowie kein Abbau der translozierten Yops während der 90 minütigen Beladungsphase stattfindet, dann wäre das Post-Beladungsverfahren am Besten geeignet, um kinetische Translokationsstudien durchführen zu können. Eine Möglichkeit dies zu erreichen wäre die Fixierung der Zellen, unmittelbar nach der Infektion und bevor die anschließende Beladung der Zellen mit dem CCF4-AM-Substrat erfolgt. Dadurch sollten sowohl die Translokation als auch jegliche zelluläre Prozesse (wie Abbau von Yops durch Proteasen) sofort nach Infektionsende gestoppt werden.

Aus diesem Grund wurden verschiedene Fixierungslösungen (Paraformaldehyd, Aceton, Glutaraldehyd und Formaldehyd) getestet, inwieweit sie die Zellen fixieren ohne dabei die Bla-Aktivität stark zu beeinträchtigen. BMDCs wurden mit den Reporter-Yersinien in Mikrotiterplatten infiziert, nach einer Stunde in Eppendorfgefäße überführt und sofort mit den unterschiedlichen Fixierungslösungen für 15 min bei 4°C fixiert (s. B.2.5.2.3). Anschließend wurden die Zellen mit CCF4-AM beladen.

Die Zellen konnten zwar trotz ihrer Fixierung gut mit dem CCF4-AM-Substrat beladen werden (Daten nicht gezeigt), aber Abb. 30A zeigt, dass die Bla-Reporteraktivität nur dann enthalten war, wenn die Zellen nach der Infektion mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert wurden. Während der Prozentsatz an Bla-positiven Zellen für die Fixierung mit PFA etwa 26 % beträgt, zeigen dagegen die Fixierungen mit Formaldehyd (FA), Glutaraldehyd (GA) und Aceton (Ac) eine Rate von weniger als 5 %. Somit beeinträchtigen diese die Aktivität von Bla und sind deswegen als Fixierungsmittel völlig ungeeignet.

Da die enzymatische Aktivität von der eingesetzten Konzentration des Fixierungsmittels abhängig ist, wurde als nächstes die niedrigst mögliche Konzentration von PFA ermittelt, die die Zellen fixiert und dabei eine höhere Reporteraktivität erlaubt. BMDCs wurden mit WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) (Infektion mit einer MOI 50 für 1 h bei 37°C) in der Mikrotiterplatte

infiziert, anschließend in Eppendorfgefäße überführt und mit verschiedenen PFA-Konzentrationen (0,25-2 %) fixiert. Zudem wurden zwei Fixierungszeiten eingesetzt (15 min und 30 min bei 4°C), um die optimale Fixierungsdauer zu ermitteln. Aus der Abb. 30B ist zu erkennen, dass eine Fixierung mit 0,25 % PFA die höchste Fluoreszenzrate an CCF4-blauen Zellen aufweist. Dabei bewirkt die Fixierungsdauer (15 oder 30 min) keinen nennenswerten Unterschied in der Rate der Bla-positiven Fluoreszenz (s. Abb. 30B).

Aus den obigen Daten kann geschlossen werden, dass der Einsatz von PFA in einer Konzentration von 0,25 % und einer Fixierungsdauer von 15 min optimale Fixierungsbedingungen darstellen würden, um die Zellen zu fixieren und gleichzeitig eine höchstmögliche Bla-Reporteraktivität beizubehalten. Allerdings muss überprüft werden, ob die Inkubation des Infektionsansatzes mit 0,25 % PFA für 15 min ausreicht, um alle infizierten Yersinien zu fixieren bzw. zu töten. Um dies zu überprüfen, wurden WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) (10^8 Bakterien/100 µl) mit denselben verschiedenen PFA-Konzentrationen, wie bei den obigen Versuchen, für 15 oder 30 min bei 4°C fixiert, auf Agarplatten ausplattiert und nach dem Bebrüten bei 27°C ausgezählt. Der Abb. 30C ist zu entnehmen, dass ab einer PFA-Konzentration von 0,5 %, sowohl bei beiden Fixierungszeiten von 15 min und 30 min, keine Kolonien gewachsen sind. Nur die Fixierung mit 0,25 % PFA scheint nicht alle Yersinien abgetötet zu haben. Allerdings sollte die Anzahl der überlebenden Bakterien, die unter 20 Kolonien lag, und damit eine Überlebensrate von gerade einmal 2×10^{-7} % ausmacht, zu keiner signifikanten Änderung in der Translokationsrate führen. Auf diese Weise scheint die Fixierung der Yersinien mit niedrigen PFA-Konzentrationen für eine kurze Dauer schon bakterizid zu wirken. Da die Fixierung mit PFA die Aktivität der β -Laktamase nicht zu beeinträchtigen scheint, kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass auch der Translokationsapparat-bildende Proteinkomplex seine Aktivität beibehält, und trotz der Fixierung, weitere Yops während der anschließenden CCF4-Beladungsdauer in die Zellen transloziert werden. Um dies indirekt zu überprüfen wurde einen Sekretionstest mit PFA-fixierten Yersinien durchgeführt.

Dazu wurde der Yersinien-Reporterstamm, WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla), 1:40 in BHI verdünnt, für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit verschiedenen PFA-Konzentrationen über einen Zeitraum von 15 und 30 min fixiert. Danach wurde die Sekretion, wie im Abschnitt B.2.3.4 beschrieben, induziert. Die Proteine wurden aus dem Bakterienüberstand mit 10 % TCA gefällt (s. B.2.3.4.2), auf ein SDS-Gel aufgetrennt (s. B.2.3.2) und mit Coomassie gefärbt (s. B.2.3.3.1). Als Kontrolle wurden freigesetzte Proteine von nicht-fixierten WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) mitgeführt. Das Gel in Abb. 30D zeigt, dass die PFA-fixierten Yersinien keine Yops sekretieren (Konzentrationsbereich 0,25-2 mM PFA, Zeitdauer 15 und 30 min).

Hingegen zeigt die positive Kontrolle (letzte Spur in Abb. 30D), dass ohne die Zugabe von PFA, sekretierte Proteine von WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) detektiert werden können.

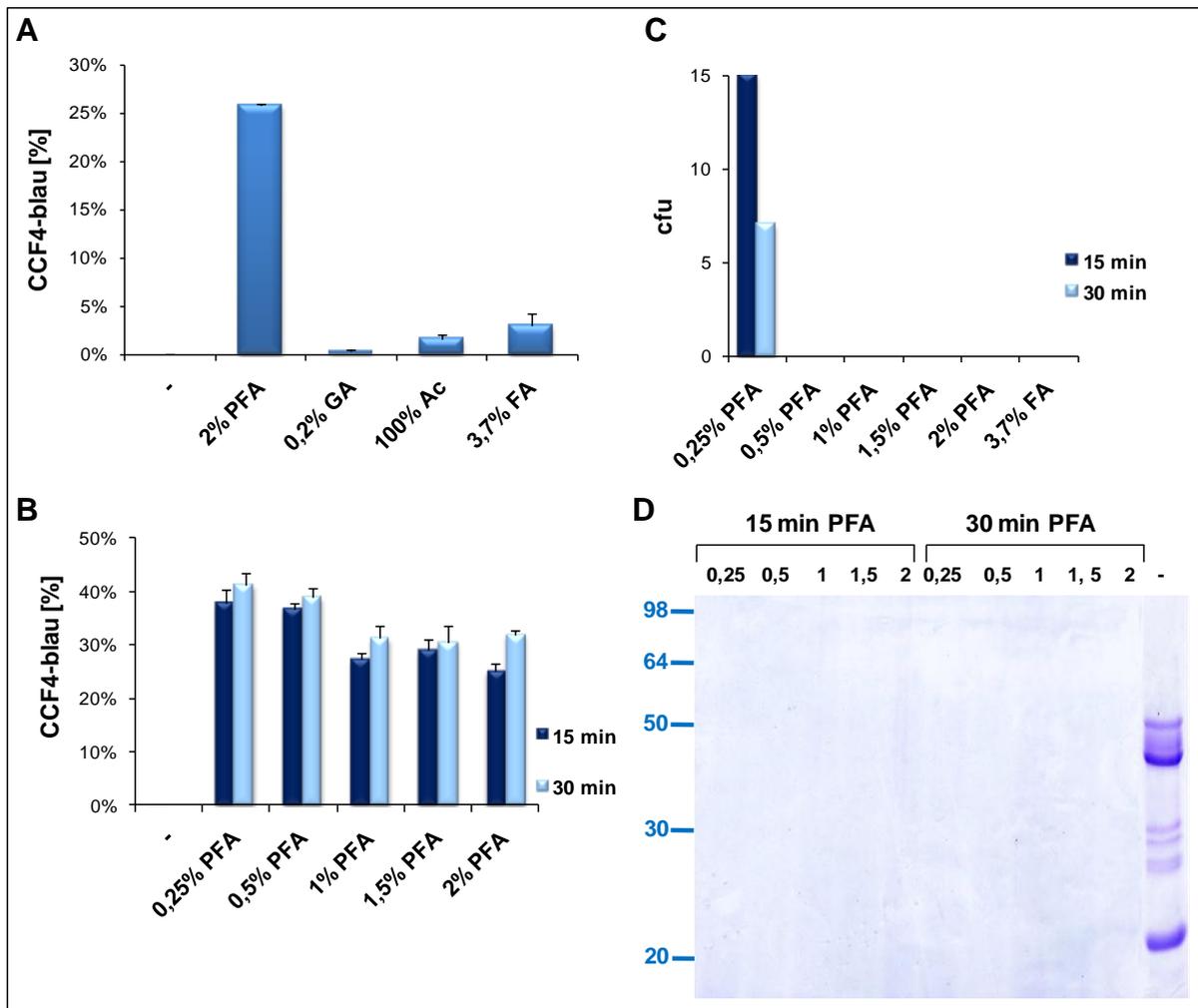


Abb. 30: Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Fixierungsverfahren auf die Bla-Aktivität

BMDCS wurden zu je $1,5 \times 10^6$ ausgesät und mit WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) (MOI 50) bei 37°C für 1 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen in Eppendorfgefäße überführt und mit verschiedenen Fixierungslösungen: PFA=Paraformaldehyd; GA= Glutaraldehyd; Ac= Aceton; FA= Formaldehyd, für 15 min bei 4°C fixiert. Nach den Fixierungen erfolgte die CCF4-Färbung (A). Verschiedene PFA-Konzentrationen dienten zur Fixierung der infizierten BMDCs entweder über 15 oder 30 min bei 4°C mit anschließender CCF4-Färbung. Der prozentuale Anteil blauer Zellen (aus zwei unabhängigen Experimenten) ist als Säulendiagramm dargestellt (B). WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) wurde mit verschiedenen Konzentrationen an PFA, 15 oder 30 min bei 4°C fixiert, ausplattiert, bei 27°C bebrütet und die Kolonien ausgezählt (C). Sekretionstest unter PFA-Fixierung. WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) wurde 1:40 in BHI verdünnt, für 2 h bei 37°C inkubiert und mit verschiedenen Konzentrationen an PFA für 15 oder 30 min fixiert. Danach wurde die Sekretion induziert, die FP mit TCA gefällt und die Proben auf ein SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (D). Die letzte Spur bildet sekretierte Proteine ohne PFA-Zugabe.

Insgesamt können aus den Fixierungsversuchen folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Paraformaldehyd eignet sich schon in einer Konzentration von 0,25-0,5 % hervorragend zur Fixierung von infizierten Zellen bevor sie mit CCF4-AM beladen werden, ohne die Bla-Reporteraktivität signifikant zu beeinträchtigen
2. Schon eine PFA-Konzentration von 0,5 % stellt das Abtöten aller extrazellulären Bakterien sicher
3. Die Fixierung mit PFA unterbindet die Sekretion

Aus diesen Ergebnissen wurden folgende Fixierungsbedingungen für die kinetischen Studien zur Yop-Translokation ausgewählt: Fixierung der Infektionsansätze mit 0,5 % PFA für 15 min vor der Beladung mit CCF4-AM.

C.2.4.3 Kinetische Studien zur Yop-Translokation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die PFA-Fixierung zu keinem signifikanten Verlust der Bla-Aktivität führt, und ausgeschlossen werden konnte, dass nach der Fixierung die Yersinien sekretieren bzw. in die Zellen Yops translozieren können, was die kinetischen Translokationsstudien beeinflussen könnte, wurde die Translokation der Yop-Bla-Reporterproteine in BMDCs (MOI 50) nach verschiedenen Zeitpunkten beobachtet. Dabei wurden die Zellen nach bestimmten Infektionszeiten mit 0,5 % PFA für 15 min bei 4°C fixiert und anschließend mit CCF4-AM und Probenecid für 90 min bei RT gefärbt.

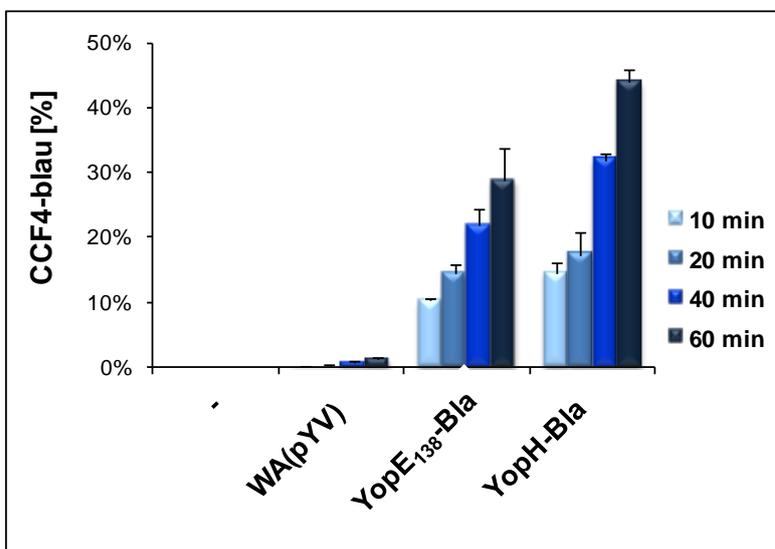


Abb. 31: Zeitverlauf der Translokation von Yop-Bla-Reporterproteinen

BMDCs wurden zu je $1,5 \times 10^6$ ausgesät und mit den Yop-Bla-Reporter-Yersinien bei 37°C (MOI 50) über verschiedene Zeiträume infiziert. Die Zellen wurden aus den Mikrotiterplatten in Eppendorfgefäße überführt und mit 0,5% PFA für 15 min bei 4°C fixiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit CCF4-AM und Probenecid für 2 h bei RT beladen und anschließend im FACS analysiert. Die Mittelwerte wurden aus zwei Versuchen berechnet.

In Abb. 31 ist zu sehen, dass die Translokation sowohl von YopE₁₃₈-Bla als auch von YopH-Bla schon nach 10 min eine detektierbare Konzentration erreicht hat, wobei mehr Zellen mit YopH-Bla transloziert wurden, als mit YopE₁₃₈-Bla. Ferner kann eine kontinuierliche Steigerung der Menge an Bla-positiven Zellen mit zunehmender Infektionszeit festgestellt werden, wobei über die gesamte Kinetik mehr Zellen mit YopH-Bla als mit YopE₁₃₈-Bla transloziert wurden.

C.2.5 Charakterisierung des YopE-Translokationssignals

Frühere Arbeiten zeigten, dass die minimale Aminosäuren-Sequenz, die für die YopE-Sekretion erforderlich ist, die ersten N-terminalen 11-15 AS-Reste umfasst (Sory and Cornelis, 1994; Schesser *et al.*, 1996; Russmann *et al.*, 2003). Die minimale Domäne, die für die Translokation von YopE über die eukaryotische Zellmembran erforderlich ist, umfasst hingegen eine minimale N-terminale Sequenz von 50 AS, die auch einen Teil der Bindungsstelle für das YopE spezifische Chaperon, SycE, beinhaltet (Lee *et al.*, 1998). Allerdings wurde die YopE-Translokationssignalsequenz mittels anderer umstrittener Translokationsversuche untersucht. Vor diesem Hintergrund wurde die Translokation mittels unserer etablierten Bla-Reporter-Yersinien, YopE₁₈-Bla, YopE₅₃-Bla und YopE₁₃₈-Bla, die jeweils die ersten 18, 53 oder 138 N-terminalen AS von YopE enthalten, untersucht. Dabei soll die Effizienz des Translokationssignals von YopE in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund verschiedener *Yersinia*-Stämme und in Abhängigkeit von der Infektionszeit (Kinetik) überprüft werden. Die Yersinien-Reporter-Stämme WA(pT3SS), WA(pYV) und WA(pYVΔYopE) bzw. WA(pYVΔYopH), in denen die Reporter-Konstrukte YopE₁₈-Bla, YopE₅₃-Bla, YopE₁₃₈-Bla oder YopH-Bla transformiert wurden, wurden vor der Infektion bei 37°C unter CaCl₂-Zugabe (2,5 mM) für 90 min prä-inkubiert und anschließend für die Infektion von BMDCs (je 1x10⁶ Zellen/Napf) mit einer MOI 50 bei 37°C eingesetzt. Die Infektion wurde zu bestimmten Zeitpunkten durch die Fixierung mit 0,5 % PFA gestoppt. Die Zellen wurden anschließend mit CCF4-AM und Probenecid (für 90 min bei RT) beladen und im FACS analysiert.

Aus der Abb. 32 ist in allen Reporter-*Yersinia*-Stämmen zu erkennen, dass die ersten 18 AS von YopE ausreichend für die Translokation sind. Es ist sogar eine hohe Translokationsrate von YopE₁₈-Bla im Vergleich zu YopE₁₃₈-Bla zu beobachten, vor allem in den Stämmen, WA(pYVΔYopE) und WA(pT3SS) (s. Abb. 32B und C). Die Translokationsrate vom YopE₅₃-Bla-Fusionsprotein zeigte aber die höchsten Werte unter allen untersuchten YopE-Fragmenten. Sie ist aber dennoch geringer als die vom YopH-Bla-Reporterprotein, mit

Ausnahme von WA(pT3SS)-Reporter-Stämmen, wo YopE₅₃-Bla und sogar YopE₁₈-Bla höhere Translokationsraten als YopH-Bla aufweisen.

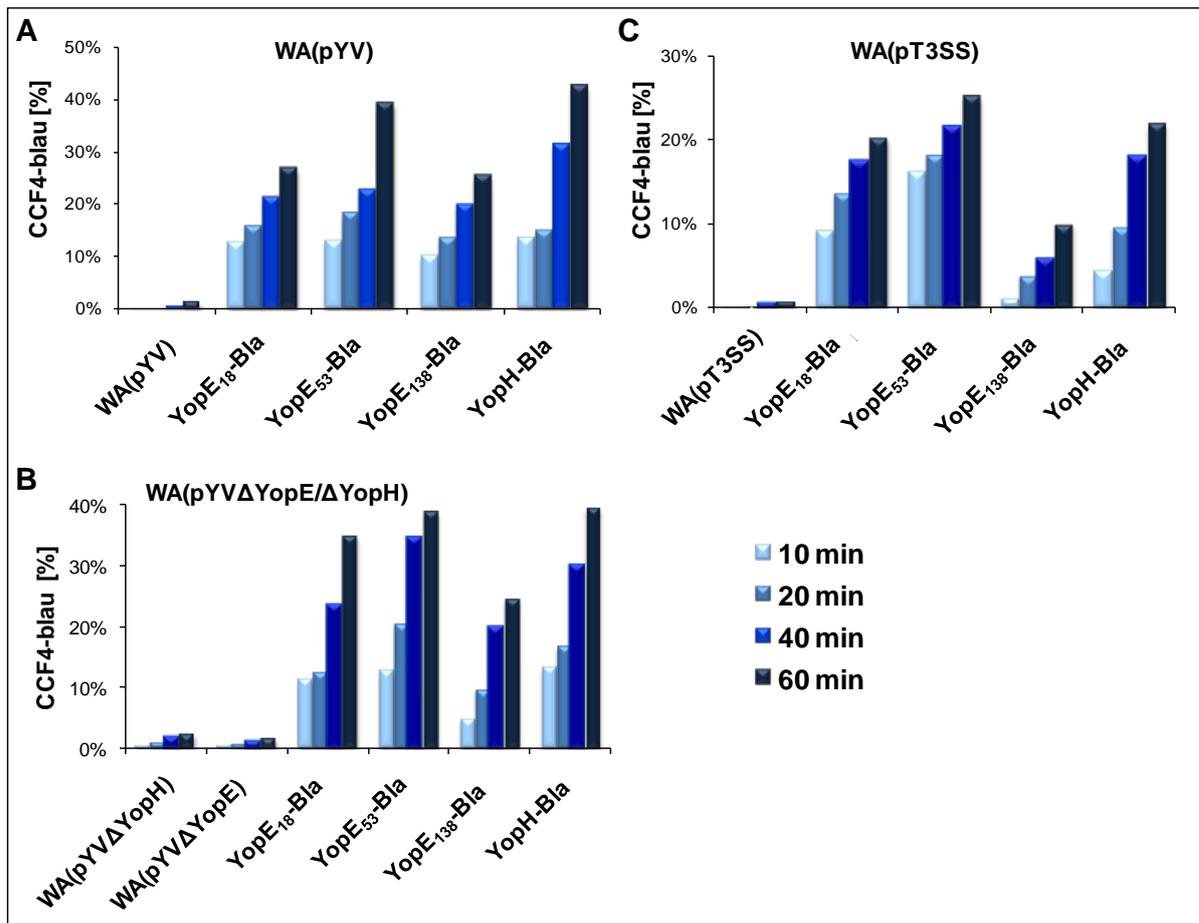


Abb. 32: Kinetische Studie der Translokation der Yop-Bla-Reporterproteinen von verschiedenen *Yersinia*-Stämmen

BMDCs wurden zu je 1×10^6 Zellen/Napf ausgesät und die verschiedenen Yop-Bla-Reporter-Yersinien mit dazugehörigen Kontrollstämmen mit einer MOI 50 für unterschiedliche Zeiten bei 37°C infiziert. Die verschiedenen *Yersinia*-Stämme wurden vor der Infektion 90 min bei 37°C unter 2,5 mM CaCl₂-Zugabe geschüttelt. Nach der jeweiligen Infektion wurde mit 0,5 % PFA für 15 min bei 4°C fixiert und anschließend mit CCF4-AM und Probenecid für 90 min bei RT gefärbt. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Proben im FACS analysiert. Yop-Bla-Reporter-enthaltende WT-Stämme (WA(pYV)) (A). Yop-Bla-Reporter-enthaltende WA(pYVΔYopH)- bzw. WA(pYVΔYopE)-Stämme (B). Yop-Bla-Reporter-enthaltende WA(pT3SS)-Stämme (C).

Abb. 32 zeigt außerdem, dass bei allen *Yersinia*-Stämmen die Anzahl an blauen Zellen mit zunehmender Infektionszeit steigt. Der Vergleich des Translokationsverhaltens zwischen den Yop-Bla-Reporter-enthaltenden WT-Stämmen und den entsprechenden WA(pYVΔYopH)- bzw. ΔYopE)-Stämmen ergab keinen nennenswerten Unterschied bezüglich der Translokationsraten. Dies deutet darauf hin, dass eine Überexpression von Yops nicht zu einer höheren Translokation führt (s. Abb. 32A und B). Die WA(pT3SS)-Reporter-Stämme zeigten geringere Translokationsraten im Vergleich zu den WA(pYV) und WA(pYVΔYopE) bzw.

WA(pYV Δ YopH)-Reporterstämmen (s. Abb. 32C). Die kinetischen Translokationsstudien der verschiedenen Yop-Bla-Reporterstämmen zeigen also, dass die Kinetik der Yop-Translokation, die im WA(pYV)-Stamm charakterisiert wurde (s. C.2.4.3), auch in den WA(pT3SS)-, sowie in den WA(pYV Δ YopE)- und WA(pYV Δ YopH)-Reporter-Stämmen reproduzierbar ist.

C.2.6 Zelltyp-spezifisch differentielle Translokationseffizienz von YopH und YopE *in vitro*

Eine weitere Fragestellung soll in dieser Arbeit untersucht werden, und zwar ob bestimmte Zelltypen des Immunsystems vornehmlich von Yersinien kontaktiert werden oder aber alle Zelltypen gleichermaßen mit den Yops injiziert werden. Hierfür wurde eine Einzelzellsuspension der Milz benutzt, da die Milz nicht nur alle wichtigen Immunzelltypen enthält, sondern auch ein bevorzugtes Zielorgan darstellt, welches von den Yersinien bei systemischer Infektion besiedelt wird.

Aus dem BL6/129Sv-Mausstamm wurden Einzelzellsuspensionen der Milz präpariert (s. B.2.6.3). Die Milzzellen wurden dann mit einer MOI 20 in RPMI-Medium infiziert und nach der CCF4-AM Färbung (+ 2,5 mM Probenecid) mit fluoreszierenden Antikörpern gegen verschiedene Zelltypspezifische Oberflächenantigene markiert. Folgenden Zelltypspezifische Marker wurden verwendet: APC-konjugierter anti-CD11b, als Marker für Phagozyten, PE-Cy5-konjugierter anti-F4/80, dem Marker für Makrophagen, PE-anti-Ly6G, als Marker für Granulozyten, PerCP-konjugierter CD8, der hauptsächlich auf CD8-T-Zellen exprimiert wird, APC-H7-konjugierter anti-CD4, dem Marker von T-Helferzellen, PE-konjugierter anti-B220/CD45R, welcher hauptsächlich auf B-Zellen und einigen DCs exprimiert wird und schließlich APC-konjugierter anti-CD49b, der hauptsächlich auf natürliche Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert wird.

In der Abb. 33 sind die FACS-Ergebnisse als „Dot-Plots“ dargestellt. Milzzellen, die mit dem Yersinienstamm WA(pYV) infiziert wurden, weisen keine signifikante Menge an Bla-positiven Zellen auf (s. Abb. 33A). Im Gegensatz dazu, kann bei den Milzzellen, die mit den beiden Yop-Bla-Reporter-Yersinien, WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) und WA(pYV, pYopH-Bla), infiziert wurden, eine Translokation der Yop-Bla-Reporterproteine in allen Zelltypen nachgewiesen werden (s. Abb. 33B und C).

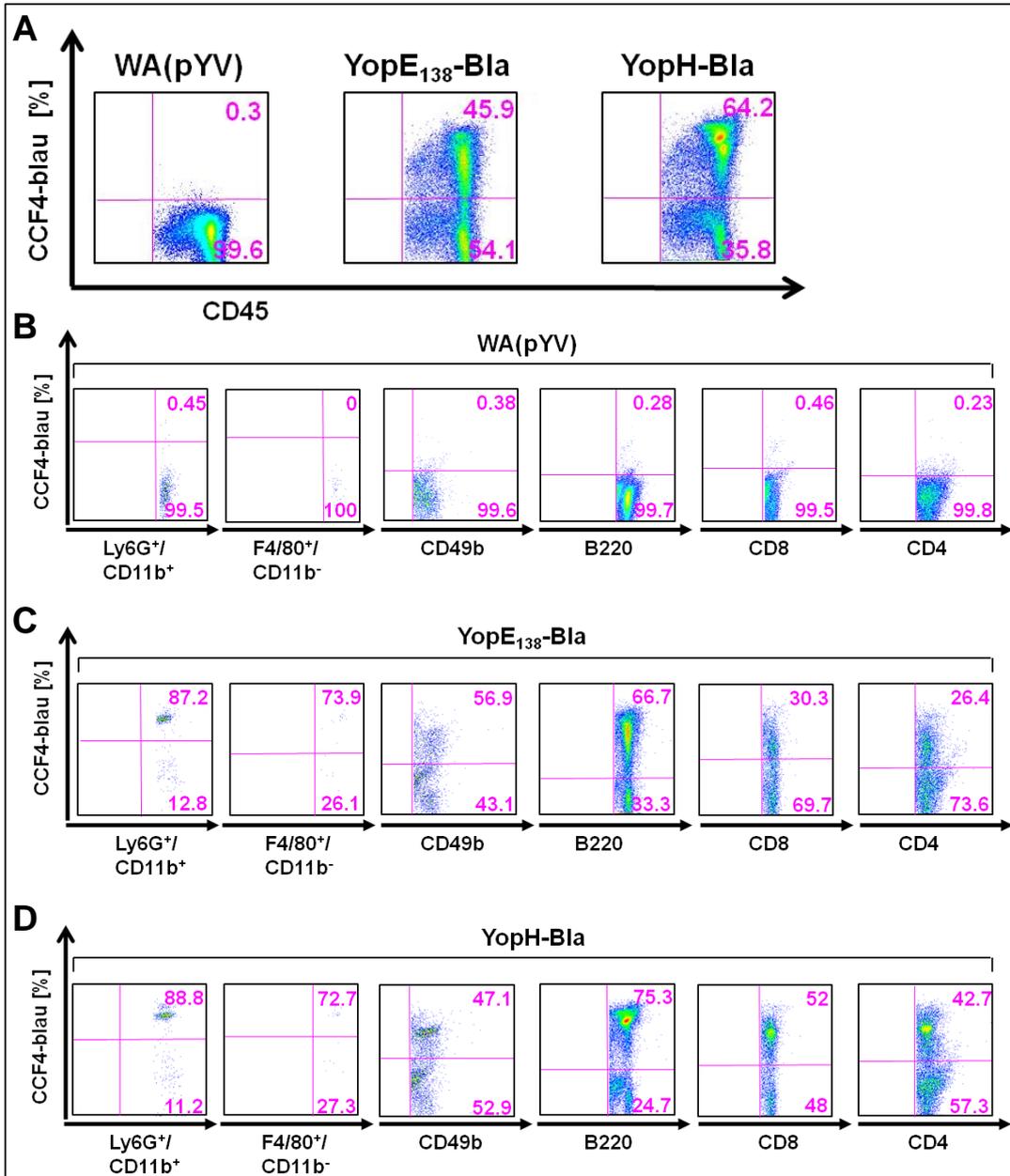


Abb. 33: Translokation der Yop-Bla-Reporterproteine in verschiedene Zelltypen der Milz

Milzzellen wurden isoliert, mit Erythrozyten-Lysepuffer behandelt und zu je 1×10^6 Zellen/80 μ l ausgesät. Die Yersinien wurden vor der Infektion für 90 min bei 37°C unter CaCl₂-Zugabe geschüttelt, bevor sie mit einer MOI 20 auf die Milzzellen gegeben und für 80 min in RPMI-Medium infiziert wurden. Danach erfolgte die Färbung mit CCF4-AM und Probenecid bei 29°C für 75 min. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellpellets im FACS-Puffer/Fc-Block für 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend jeweils mit dem entsprechenden Antikörper-Mastermix für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden sogleich im FACS gemessen. Darstellung der blauen Fluoreszenz in der Punktwolkendarstellung. Die Prozentzahlen der verschiedenen Bla-positiven Zellpopulationen sind in den jeweiligen Quadranten pink unterlegt. Milzzellen wurden bezüglich der Expression von CD45 (Leukozyten-Marker) aussortiert und gegen blaue Fluoreszenz (CCF4-blaue) dargestellt (A). Die einzelnen Zelltypen wurden aus der CD45-positiven Population sortiert und gegen blaue Fluoreszenz dargestellt: nach Infektion der Milzzellen mit WA(pYV) (B), WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) (C) oder WA(pYV, pYopH-Bla) (D). Folgende Zellmarker wurden verwendet: CD11b: Phagozyten, Ly6G: Granulozyten; F4/80: Makrophagen; CD49b: NK-Zellen; CD8: CD8-T-Zellen; CD4: T-Helferzellen; B220: B-Zellen

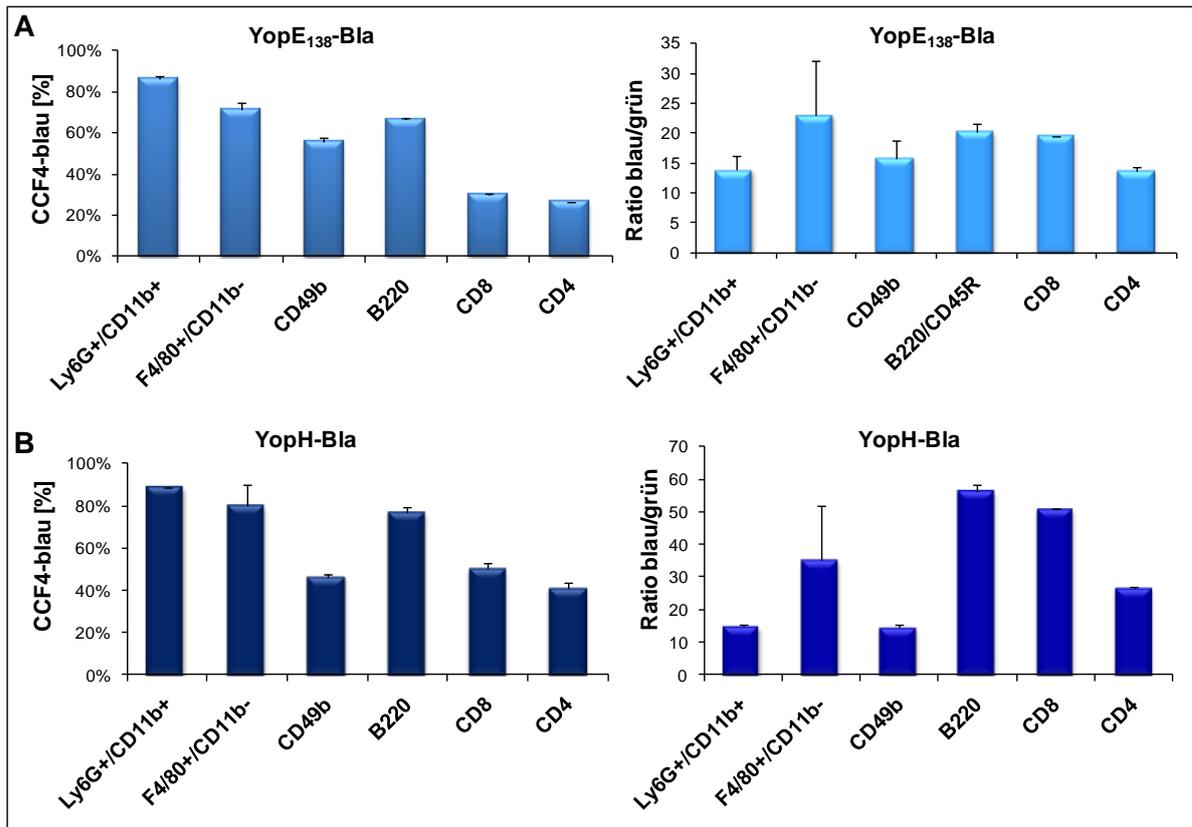


Abb. 34: Prozentuale Verteilung der translozierten Yop-Bla-Reporterproteine in den verschiedenen Zelltypen von Milzzellen

Aus den Ergebnissen der Abb. 33 wurden die mittleren Prozentanteile der verschiedenen Bla-positiven Zelltyppopulationen aus jeweils zweifachen Infektionsansätzen berechnet und als Säulendiagramm dargestellt. Das dazu berechnete blau/grün-Verhältnis (Ratio) wurde ermittelt. Prozentanteile an Bla-positiven Zellen in den einzelnen Zelltypen und die entsprechenden blau/grün-Verhältnisse für WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) infizierte Milzzellen (A). Prozentanteile an Bla-positiven Zellen in den einzelnen Zelltypen und die entsprechenden blau/grün-Verhältnisse für WA(pYV, pYopH-Bla) infizierte Milzzellen (B). Zellmarker siehe Legende Abb. 33

In der Abb. 34 ist die prozentuale Anzahl der blauen Zellen für die einzelnen Zelltypen als Säulen-Diagramm dargestellt. Die einzelnen Zelltypen wurden aus der CD45-positiven Population sortiert und gegen blaue Fluoreszenz dargestellt. Aus den Diagrammen wird ersichtlich, dass bei den Milzzellen, die mit WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) infiziert wurden, die größte Anzahl an Bla-positiven Zellen, die Ly6G⁺/CD11b⁺-Zellen (87,5 %) sind, gefolgt von den F4/80⁺/CD11b⁻-Zellen (73,9 %) und den B220⁺-Zellen (66,7 %). Durch die Ermittlung des Verhältnisses von blauer zur grüner Fluoreszenz, welches ein Maßstab für die Menge an Bla und damit an Yops ist, ist jedoch ersichtlich, dass die Makrophagen (F4/80⁺/CD11b⁻) den höchsten Wert (s. Abb. 34A rechts) und damit auch die höchste Translokationsrate vom YopE₁₃₈-Bla-Reporterprotein aufweisen, gefolgt von B220-positiven Zellen, CD8-positiven Zellen, CD49b-positiven Zellen und schließlich den Ly6G⁺/CD11b⁺-Zellen und CD4-positiven Zellen. Dabei zeigen die letzten beiden Zelltypen eine ähnliche Translokationsrate.

Ein ähnliches Bild der prozentualen Menge an CCF4-blauen Zellen findet sich auch bei den Milzzellen, die mit WA(pYV, pYopH-Bla) infiziert wurden (s. Abb. 34B). Betrachtet man die blau/grün-Verhältnisse, so stellt man fest, dass YopH-Bla stärker in den Makrophagen (F4/80⁺), B220-positiven Zellen, CD8-Zellen und CD4-Zellen als YopE₁₃₈-Bla transloziert wurde (s. Abb. 34B rechts). In den CD49b-positiven sowie den Ly6G⁺/CD11b⁺-Zellen scheint dagegen die Menge an transloziertem YopE₁₃₈-Bla und YopH-Bla ähnlich zu sein.

Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass *in vitro* Yersinien bevorzugt mit Neutrophilen, Makrophagen und B-Zellen Kontakt aufnehmen, wobei nur in Makrophagen, B-Zellen und CD8-T-Zellen auch große Mengen an Yops injiziert werden. Sowohl infizierte, als auch nicht-infizierte Milzzellen haben eine Rate von 3-5 % an Propidiumjodid-positiven Zellen (= tote Zellen). Eine Versuchsreihe mit unterschiedlicher MOI und einer Infektionszeit von 1 h, zeigte erst ab einer MOI von > 50 eine allmählich ansteigende Rate an Propidiumjodid-positiven Zellen, bis sie bei einer MOI 100 etwa 9-10 % betrug (unveröffentlichte Daten von Dr. Bouabe).

C.2.7 Translokationsverhalten von YopH *in vivo*

Nachdem die bevorzugten Zelltypen von infizierten Milzzellen *in vitro* bestimmt wurden, galt es diese Ergebnisse *in vivo* zu validieren. Mäuse wurden mit verschiedenen Infektionsdosen (von 1×10^4 bis 5×10^5) des *Yersinia*-Reporterstamms, WA(pYV, pYopH-Bla), intraperitoneal infiziert (s. B.2.6.2). Als negative Kontrolle dienten Zellproben aus Mäusen, die mit dem *Yersinia*-Wildstamm infiziert wurden. Nach fünf Tagen wurden die Mäuse sakrifiziert und Blut, Milz, sowie peritoneale Zellen entnommen.

Abb. 35 zeigt exemplarisch Bilder von zwei Milze aus zwei mit 5×10^5 WA(pYV, pYopH-Bla) infizierten Mäusen. Während die Milz (1) kleinere Abszesse aufwies, war Milz (2) übersät mit großen Abszessen. Die Ausplattierung von Verdünnungsreihen aus den Milzzell-Suspensionen ergab, dass Milz (1) mit einer cfu von $7,1 \times 10^3$ kolonisiert war, Milz (2) hingegen mit einer cfu von $1,2 \times 10^7$. Da Milz (1) ca. $0,85 \times 10^8$ Zellen und Milz (2) ca. $0,9 \times 10^8$ Zellen enthielt, entspräche der Kolonisierungsgrad der Milz (1) am Tag 5 einer MOI von ca. 0,0008, und das der Milz (2) einer MOI von ca. 0,13. Die gewonnenen Zellen aus Blut, Milz und Peritoneum wurden mit CCF4-AM beladen (s. B.2.5.2.3). Anschließend erfolgte die Immunfärbung der Zelltypspezifischen Oberflächenmarker (s. B.2.5.3). Die Zellen wurden dann fixiert und im FACS analysiert. Bei der negativen Kontrolle sind erwartungsgemäß keine blauen Zellen zu detektieren (s. Abb. 35B). In der Milz (2) sind trotz der starken Besiedlung der Milz mit Yersinien (s. Abb. 35A) gerade einmal ca. 1,5 % der Zellen Bla-positiv. Bei der Milz (1), die eine schwächere *Yersinia*-Kolonisierung aufwies, waren sogar

nur ca. 0,5 % der Zellen Bla-positiv. Die Analyse der aus Blut und Peritoneum isolierten Zellen aus beiden infizierten Mäusen (1) und (2) zeigten keine Bla-positiven Populationen (s. Abb. 35C und D).

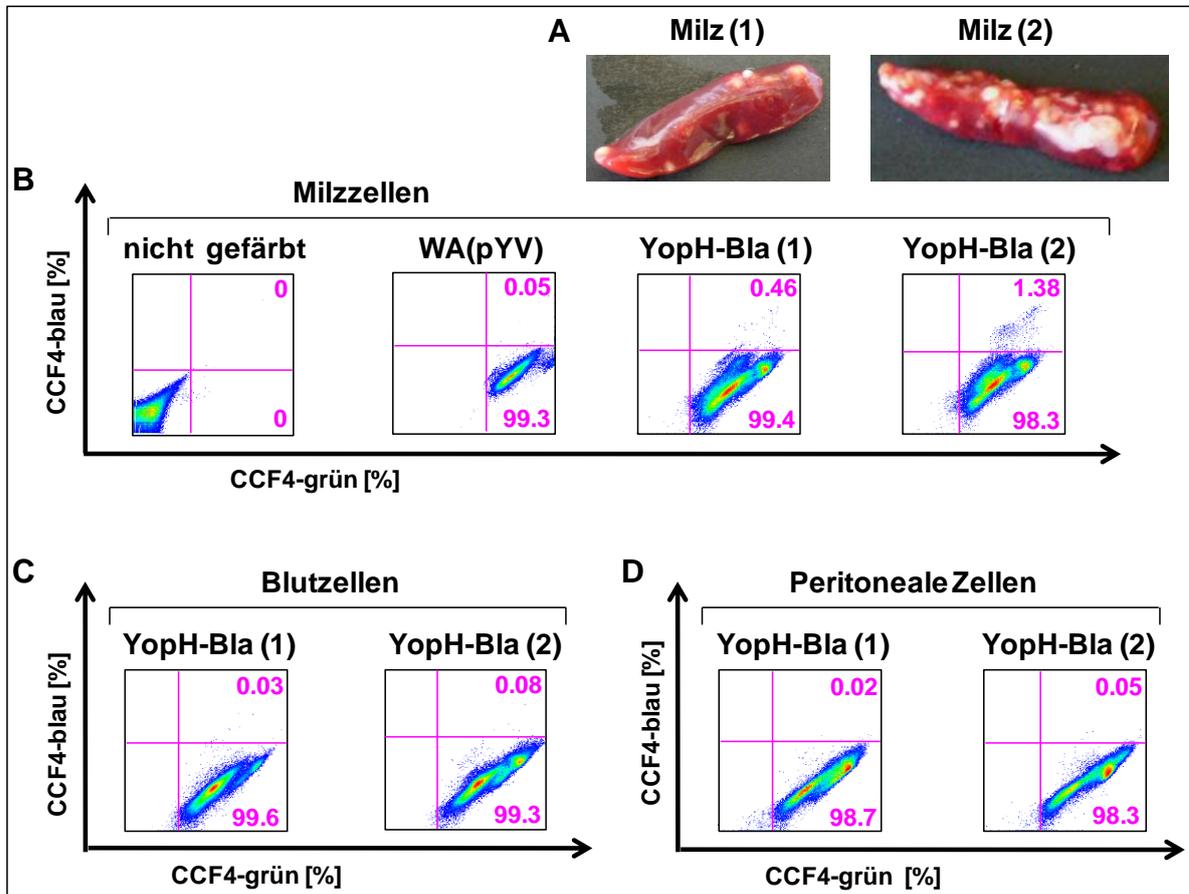


Abb. 35: Nachweis der Translokation in Milzzellen, Blutzellen und peritonealen Zellen nach Mausinfektion mit WA(pYV, pYopH-Bla)

Mäuse wurden intraperitoneal mit 5×10^5 WA(pYV, pYopH-Bla) infiziert. Fünf Tage später wurden die Milze, sowie Blut und peritoneale Zellen entnommen. Photographien der isolierten Milze aus den infizierten Mäusen zeigen, dass Milz (1) weniger Abszesse als Milz (2) hat (A). Die Milze waren jeweils mit $7,1 \times 10^3$ (1) und $1,2 \times 10^7$ (2) kolonisiert. Die isolierten Milzzellen (B), Blutzellen (C) und peritonealen Zellen (D) wurden mit CCF4-AM beladen und im FACS analysiert. Darstellung der grünen und blauen Fluoreszenz als „Dot-Plots“. Die Prozentanteile der CCF4-blauen bzw. CCF4-grünen Zellen sind in den jeweiligen Quadranten angegeben.

Um herauszufinden, ob eine bevorzugte Yop-Injektion in bestimmte Zelltypen stattfindet, wurden zuerst die Populationen der jeweiligen Zelltypen aus den isolierten Milz-, Blut- und peritonealen Zellen der Maus (2) bestimmt.

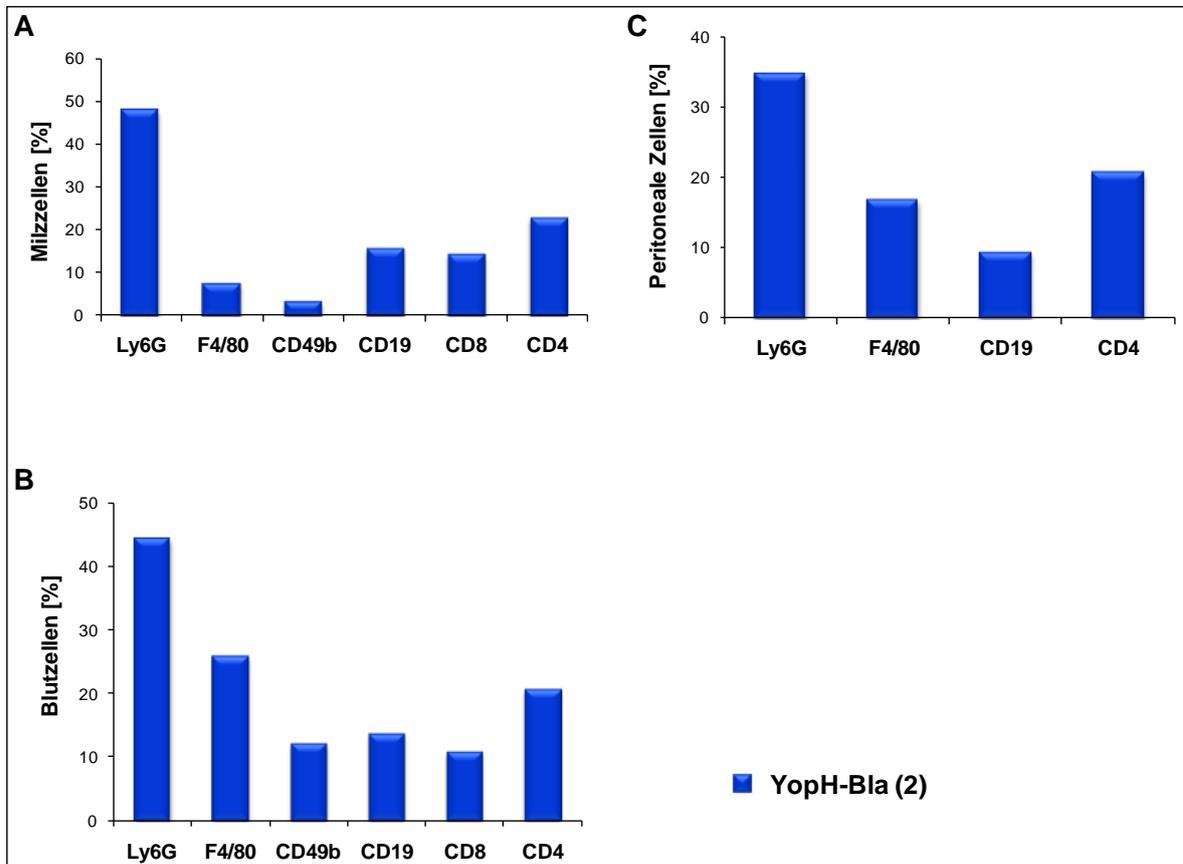


Abb. 36: Prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Zelltypen aus den isolierten Milzzellen, Blutzellen und peritonealen Zellen von der Maus (2), infiziert mit WA(pYV, pYopH-Bla)

Alle Zellsuspensionen stammen aus der Maus (2), deren Milz voller Abszesse war. Es wurden Milzzellen (A), Blutzellen (B) und peritoneale Zellen (C) isoliert, mit CCF4-AM und Probenecid beladen und gegen verschiedene Oberflächenmarker gefärbt. Die Zellen wurden im FACS gemessen, anschließend mit Hilfe der „FlowJo-8.46 Software“ ausgewertet und als Säulen-Diagramme dargestellt. Folgende Zellmarker wurden verwendet: Ly6G: Granulozyten; F4/80: Makrophagen; CD49b: NK-Zellen; CD19: B-Zellen; CD8: CD8-T-Zellen; CD4: T-Helferzellen;

Abb. 36 zeigt die prozentuale Zusammensetzung verschiedener Zelltypen die in Milzzellen, Blutzellen und peritonealen Zellen von Maus (2) vorhanden sind und die mit verschiedenen Oberflächenmarkern markiert wurden. Die Ergebnisse zeigen die Infektionsbedingte, typisch starke Infiltration von Granulozyten (Ly6G). Alle anderen Zelltypen zeigen einen deutlich geringeren Anteil an der Gesamtzellzahl der jeweiligen isolierten Zellen.

Die Analyse der Translokation des YopH-Bla-Reporterproteins in verschiedene Zelltypen zeigt, dass alle untersuchten Zelltypen eine ähnliche Anzahl an CCF4-blauen Zellen aufweisen, wenn auch CD49b-positive Zellen (Hauptmarker von NK-Zellen) eine etwas höhere Bla-positive Zellpopulation von etwa 5,6 % aufweisen (s. Abb. 37A). Die Analyse des Verhältnisses blau/grün, ein Maßstab für die Menge an transloziertem YopH-Bla in eine Zelle, zeigt, dass in CD8-T-Zellen und F4/80-positiven Zellen die höchste Translokation stattfand (s. Abb. 37B).

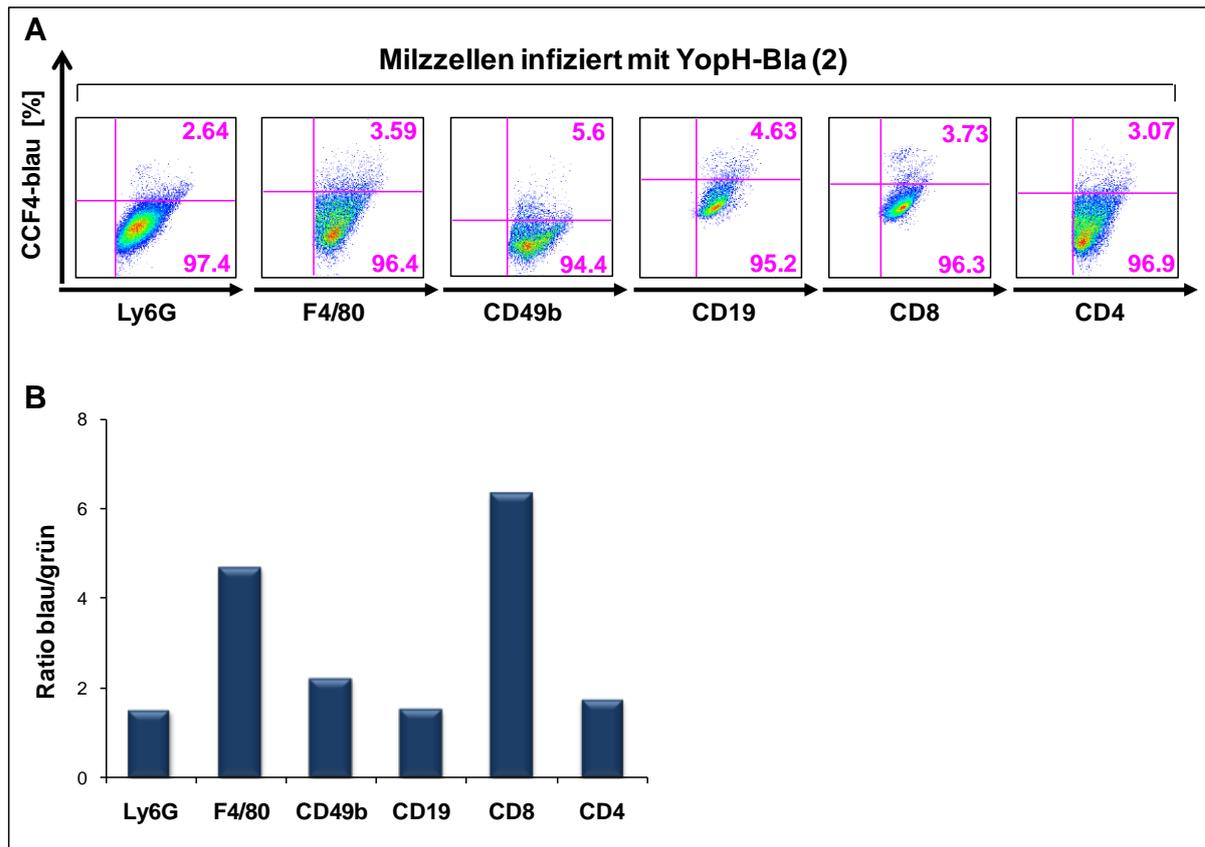


Abb. 37: Translokation von YopH-Bla (2) in verschiedene Zelltypen

Milzzellen aus der mit WA(pYV, pYopH-Bla) infizierten Maus (2) wurden isoliert, mit CCF4-AM beladen, anschließend mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker immungefärbt und im FACS analysiert (A). Die Prozentanteile der verschiedenen Bla-positiven Zellpopulationen sind in den jeweiligen Quadranten angegeben. Die dazu berechneten blau/grün Verhältnisse (Ratio) wurden ermittelt und als Säulendiagramm dargestellt (B).

C.2.8 Yop-Translokation *in vivo* vs. *in vitro*

Die *in vivo* Ergebnisse zum Translokationsverhalten spiegeln nur teilweise die *in vitro* Infektionsdaten wieder (s. C.2.5), wo in Makrophagen, CD8-T-Zellen und B-Zellen die größten Mengen an Yops injiziert wurden. Darüber hinaus wird im Gegensatz zu den *in vitro* Infektionsversuchen mit Milzzellen (s. Abb. 33), *in vivo* in die Granulozyten am schwächsten

transloziert (s. Abb. 37), und das obwohl die Granulozyten den größten Zelltypen-Anteil in der Milz der infizierten Maus darstellten (s. Abb. 36).

Zusammenfassend können folgende Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* Versuchen aufgezählt werden:

- Die Yop-Translokation *in vivo* konnte in ca. 1,5 % der Milzzellen detektiert werden, wohingegen die Yop-Translokation *in vitro* in bis zu 70 % der Milzzellen stattfand.
- Während *in vivo*, Yersinien alle Zelltypen gleich anzusteuern scheinen, finden sich *in vitro* die größte Bla⁺-Populationen bei den Neutrophilen, Makrophagen und B-Zellen.

Der Grund im unterschiedlichen Yop-Translokationsverhalten könnte an den nicht-physiologischen Infektionsbedingungen *in vitro* liegen. Daher wurden die unterschiedlichen Aspekte der Infektionsbedingungen *in vivo* vs. *in vitro* einzeln beleuchtet und untersucht.

C.2.8.1 Translokationsrate in Abhängigkeit von MOI und Infektionszeit

Der Unterschied in der Yop-Translokationsrate *in vivo* vs. *in vitro* könnte von der MOI abhängig sein. *In vitro* wurde in der Regel eine MOI von 20 eingesetzt, wohingegen, die MOI in der Milz von infizierten Mäusen in der Regel durchschnittlich (auf Gesamt-Milzzellen umgerechnet) kleiner als 1 ist. Sie lag z.B. für die Milz (2) bei ca. 0,13 (s. C.2.7; s. Abb. 35). Desweiteren liegt ein Unterschied in der Infektionsdauer, die ebenfalls zu einem unterschiedlichen Translokationsverhalten führen kann. Während die *in vitro* Translokation meist nach 60 min bestimmt wurde, wurde die *in vivo* Translokation erst nach 5 Tagen Infektion gemessen. Diese zwei Parameter wurden in dem folgenden Versuch untersucht.

Milzzellen wurden für 1 h oder 3 h mit unterschiedlicher MOI (5, 10, 25, 50 und 100) von WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) bei 37°C in PBS mit 5 % FCS *in vitro* infiziert. Die infizierten Zellen wurden dann mit CCF4-AM und Probenecid für 90 min bei RT beladen. Anschließend wurden sie mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen Zelltypspezifische Oberflächenmarker gefärbt (s. B.2.5.3).

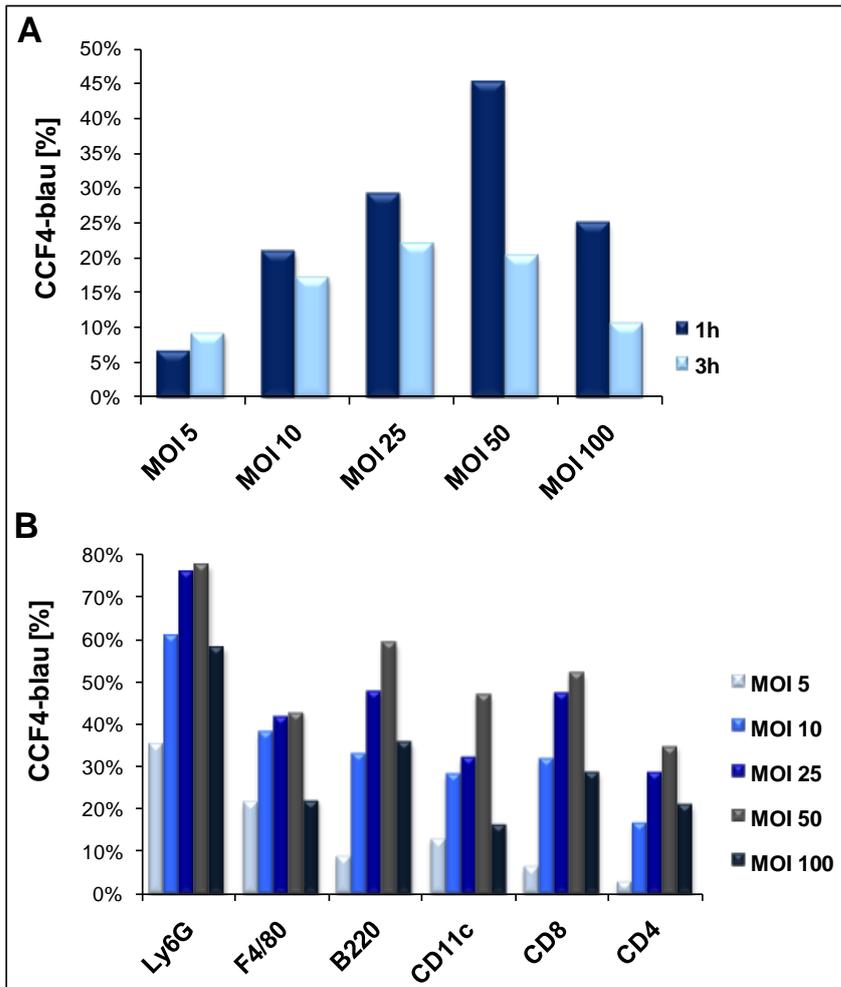


Abb. 38: *In vitro* Milzversuch mit verschiedenen MOIs und Infektionszeiten

Milzzellen wurden in Mikrotiterplatten in PBS + 5% FCS zu je 4×10^6 ausgesät. WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) wurde 1:40 in BHI verdünnt und unter Zugabe von 2,5 mM CaCl₂ für 90 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden verschiedenen MOIs (5, 10, 25, 50, 100) für die Infektion der Milzzellen bei 37°C für 1 h oder für 3 h eingesetzt. Nach der Infektion wurden die Zellen mit CCF4-AM und 2,5 mM Probenecid bei RT für 90 min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker angefärbt und im FACS analysiert. Unterschied zwischen der Translokation zwischen 1 h und 3 h und den eingesetzten MOIs bei den Gesamtzellen (A). MOI-abhängiges Translokationsverhalten auf Zelltyp-Ebene nach 1 h Infektion (B). Folgende Zellmarker wurden verwendet: Ly6G: Granulozyten; F4/80: Makrophagen; B220: B-Zellen; CD11c: dendritische Zellen; CD8: CD8-T-Zellen; CD4: T-Helferzellen;

Abb. 38A zeigt Translokationsraten von Gesamt-Milzzellen, die mit unterschiedlichen MOIs für zwei verschiedene Zeitpunkte (1 h oder 3 h) infiziert wurden. Dabei fällt auf, dass nur bei einer MOI von 5 eine höhere Translokationsrate für die Infektion nach 3 h erreicht wurde. Bei MOIs, die größer als 5 sind, sank dagegen die Translokationsrate mit der größeren Infektionsdauer ab. Insgesamt stieg kontinuierlich die Anzahl der Bla⁺-Zellen mit steigender MOI (bis MOI 50) und fiel bei einer MOI > 50 wieder ab. Dieses MOI-abhängige Translokationsverhalten konnte auch auf Zelltyp-Ebene beobachtet werden (s. Abb. 38B). Dieses Phänomen haben wir als MOI-abhängige Sättigung der Translokation bezeichnet.

C.2.8.2 Validierung der MOI-abhängigen Sättigung der Translokation mit verschiedenen *Yersinia*-Reporter-Stämmen

Um das interessante Phänomen der MOI-abhängigen Sättigung der Translokation zu validieren, wurden weitere verschiedene *Yersinia*-Reporter-Stämme, WA(pT3SS), WA(pYV), und WA(pYVΔYopE/ΔYopH), in denen die Reporter-Konstrukte YopE₁₈-Bla, YopE₅₃-Bla, YopE₁₃₈-Bla oder YopH-Bla transformiert wurden, für Translokationsversuche mit unterschiedlichen MOIs getestet. Die *Yersinia*-Reporter-Stämme wurden vor der Infektion bei 37°C unter CaCl₂-Zugabe für 90 min prä-inkubiert. BMDCs wurden zu je 1x10⁶ Zellen/Napf ausgesät und mit den Yop-Bla-Reporter-*Yersinia* mit unterschiedlichen MOIs für 1 h bei 37°C infiziert.

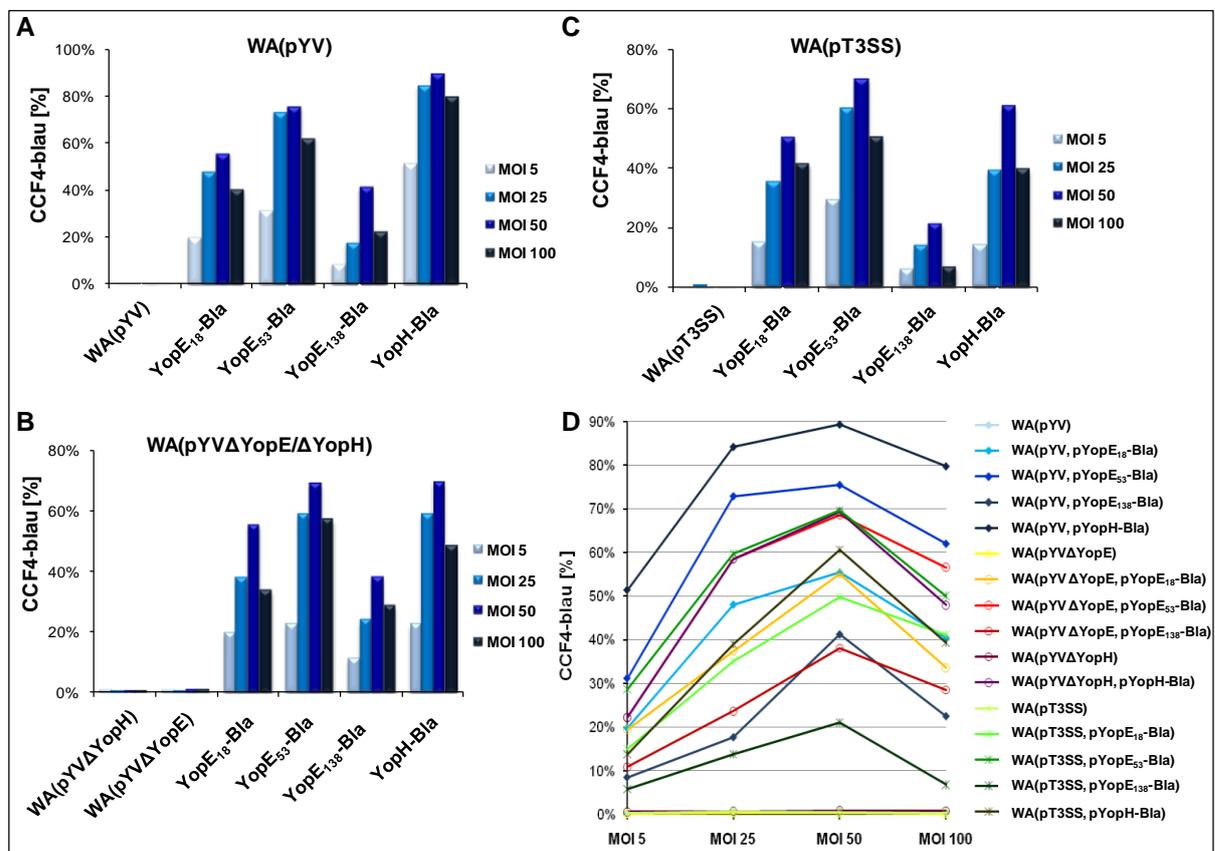


Abb. 39: Vergleich der Translokation von Yop-Bla-Fusionsproteinen von verschiedenen Stämmen in Abhängigkeit zur eingesetzten MOI

BMDCs wurden zu je 1x10⁶ Zellen/Napf ausgesät und mit verschiedenen Yop-Bla-Reporter-*Yersinia* und den dazugehörigen Kontroll-Stämmen mit unterschiedlicher MOI für 1 h bei 37°C infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit CCF4-AM und Probenecid bei RT für 1 h gefärbt und danach mit 3,7 % Formaldehyd fixiert. Yop-Bla-Reporter-*Yersinia*-Stamm WA(pYV) (A). Yop-Bla-Reporter-*Yersinia*-Stämme WA(pYVΔYopE) und WA(pYVΔYopH) (B). Yop-Bla-Reporter-*Yersinia*-Stamm WA(pT3SS) (C). Auftrag des prozentualen Anteils der blauen Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten MOI bei allen Yop-Bla-Reporter-*Yersinia*-Stämmen (D).

Abb. 39 zeigt eine Zunahme der Anzahl an Bla-positiven Zellen bei steigender MOI, die ihren

höchsten Wert bei einer MOI von 50 erreicht hat. Bei einer MOI von 100 fiel die Rate der Bla-positiven Zellen wieder deutlich ab. D.h. bei einer MOI von 50 scheint ein Sättigungspunkt für die Translokation erreicht worden zu sein. Diese MOI-abhängige Sättigung der Translokation konnte bei allen untersuchten *Yersinia*-Reporter-Stämmen festgestellt werden (Abb. 39D).

Außerdem kann festgestellt werden, dass grundsätzlich das YopE₁₃₈-Bla-Reporterprotein in allen *Yersinia*-Stämmen schwächer transloziert wird (bei einer MOI 50 durchschnittlich 40 %), als YopE₁₈-Bla (bei einer MOI 50 durchschnittlich 50 %) und YopE₅₃-Bla (bei einer MOI 50 durchschnittlich 70 %).

Damit kann gezeigt werden, dass auch die MOI und die Infektionsdauer einen Einfluss auf das Translokationsverhalten haben.

C.2.8.3 Translokationsstudien unter anatomisch-ähnlichen *in vivo* Bedingungen: Gewebe

Ein Grund für die beobachteten Unterschiede im Translokationsverhalten von *in vitro* und *in vivo* Bedingungen könnte an den *in vitro* nicht-physiologischen, zwei-dimensionalen, Infektionsbedingungen liegen. *In vivo* sind die infizierenden Bakterien in einem anderen Medium (Blut und/oder Lymphe, sowie interstitielle Flüssigkeit) sowie einem eher kompakten, teilweise festen, drei-dimensionalen Zellverband eingebettet.

Um eine Brücke zwischen *in vitro* und *in vivo* Studien schlagen zu können wurden die Infektionsversuche erneut *in vitro* durchgeführt, aber dieses Mal unter physiologischen und anatomisch-ähnlichen Bedingungen, im Gewebe, simuliert (s. B.2.5.5).

Hierfür wurden Leber und Milz halbiert und im Napf einer 12er Mikrotiterplatte vorsichtig zerstampft, um den direkten Zugang bzw. Kontakt der Bakterien mit der inneren Zellmasse des Gewebes zu ermöglichen, zu der sie in der Regel *in vivo* über Lymph- und/oder Blutgefäße gelangen. Unter diesen Bedingungen ist die dreidimensionale Struktur der Gewebszellverbände weitgehend erhalten geblieben. WA(pYV, pYopH-Bla) und WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) wurden mit je 1×10^9 Bakterien in einem sehr kleinen Volumen (50 μ l) auf die zerriebenen Organe verteilt und für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Infektionsdosis liegt nur knapp über der Bakterienzahl, die in der Milz von infizierten Mäusen nach ca. 5 Tagen Infektion zu finden ist (s. Abb. 35).

Nach der Infektion wurde das Gewebe homogenisiert und lysiert und anschließend mit CCF4-AM und Probenecid beladen (s. B.2.5.2.3).

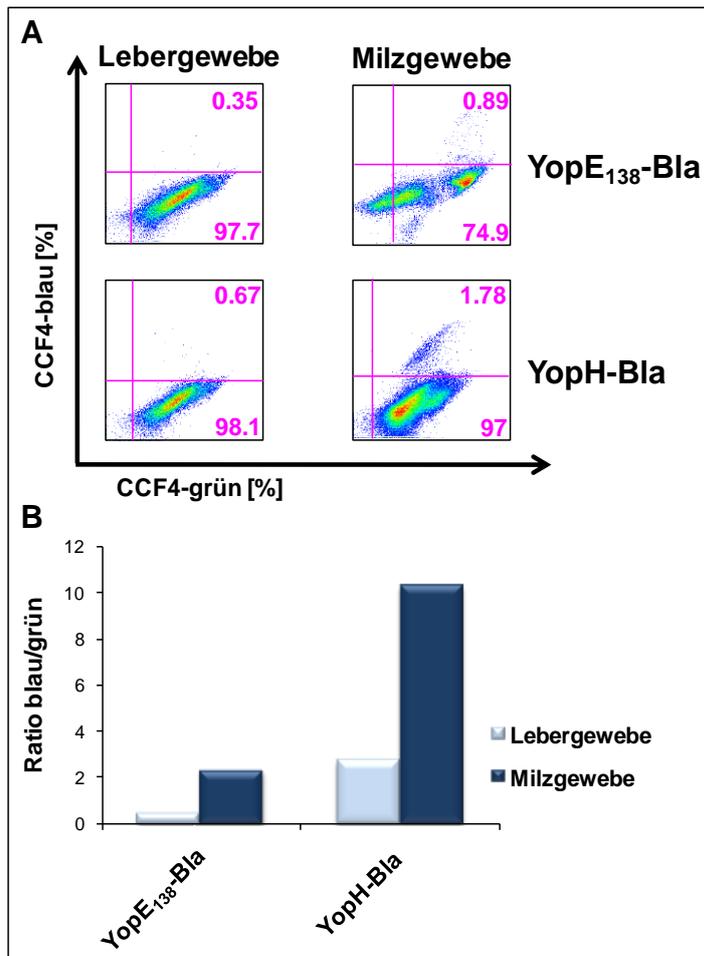


Abb. 40: *In vitro* Translokationsstudien an zerstampfter Leber und Milz

Leber und Milz wurden halbiert, zerstampft und mit einer cfu von 1×10^9 (in 50 μ l) für 3 h bei 37°C infiziert. Danach wurde das Gewebe durch einen Zellsieb homogenisiert und mit Erythrozyten-Lysepuffer behandelt, bevor es mit CCF4-AM und Probenecid für 90 min gefärbt und im FACS analysiert wurde. „Dot-Plot“-Darstellung der CCF4-blauen und CCF4-grünen Zellpopulationen in Milz und Leber (A). Ermittlung des Verhältnisses blau/grün (B).

Abb. 40A zeigt die Translokationsraten in den Zellen der Milz und Leber. Dabei ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Translokationsraten in den beiden Gewebearten zu erkennen, wo mehr Zellen in der Milz als in der Leber Yop-Bla injiziert bekommen haben. Die erhöhte Translokationsrate in dem Milzgewebe zeigt sich auch in den Ratio-Werten in Abb. 40B. Außerdem konnte erneut gezeigt werden, dass YopH-Bla auch im simulierten 3D-Gewebe stärker als YopE₁₃₈-Bla transloziert wird. Dies spiegelt sich auch in den berechneten Werten der Verhältnisse blau/grün wieder (s. Abb. 40B). Interessanterweise ist der Anteil der YopH-Bla-translozierten Zellen in der Milz (s. Abb. 40A) der bei ca. 1,8 % liegt, ähnlich dem der *in vivo* translozierten Milzzellen (s. Abb. 35B). Damit kann gezeigt werden, dass auch die Gewebeart und die drei-dimensionale, feste Struktur des Zellverbandes (Gewebe) einen wichtigen Einfluss auf das Translokationsverhalten hat.

C.2.8.4 Translokationsstudien unter physiologisch-ähnlichen Bedingungen: Infektion im Blut

Ein weiterer Unterschied zwischen *in vitro* und *in vivo* Infektionsbedingungen, der in das unterschiedliche Translokationsverhalten resultiert, könnte auch von der Physiologie des Infektionsmediums abhängig sein. Während die *in vivo* Infektion in extrazellulärer Flüssigkeit, wie z.B. Blut, Lymphe und interstitieller Flüssigkeit stattfindet, wird die *in vitro* Infektion in synthetisierten Zellkulturmedien und in einem künstlichen Umfeld (Plastikware) durchgeführt. Um zu überprüfen, welchen Stellenwert die Inkubation in physiologischer Flüssigkeit hat, wurden Milzzellen als Einzelzellsuspension aus der Milz isoliert (s. B.2.6.3). Gleichzeitig wurde aus derselben Maus Blut direkt aus dem Herzen entnommen und in ein Lithium-Heparin-Röhrchen gefüllt, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Anschließend wurden je 2×10^6 Milzzellen in jeweils 180 μ l Blut mit WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) und WA(pYV, pYopH-Bla) (MOI 20) für 90 min bei 37°C infiziert. Nach der Infektion wurde das Blut-Zellen-Gemisch aus den Mikrotiterplatten gründlich abgenommen, in Falcontubes überführt und mit dem Erythrozyten-Lysepuffer versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit CCF4-AM und Probenecid für 90 min beladen und sofort im FACS gemessen. Aus der Abb. 41A ist einerseits wieder zu erkennen, dass YopH-Bla stärker transloziert wurde (11 %; sowie ein blau/grün-Verhältnis von ca. 8) als YopE₁₃₈-Bla (9 %; blau/grün-Verhältnis von ca. 5), aber andererseits ist die Translokationseffizienz viel niedriger (um etwa $\frac{1}{4}$) als bei den Infektionsversuchen im RPMI-Medium (s. Abb. 41C). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Medium, in dem die Infektion stattfindet, auch einen wichtigen Einfluss auf das Translokationsverhalten hat.

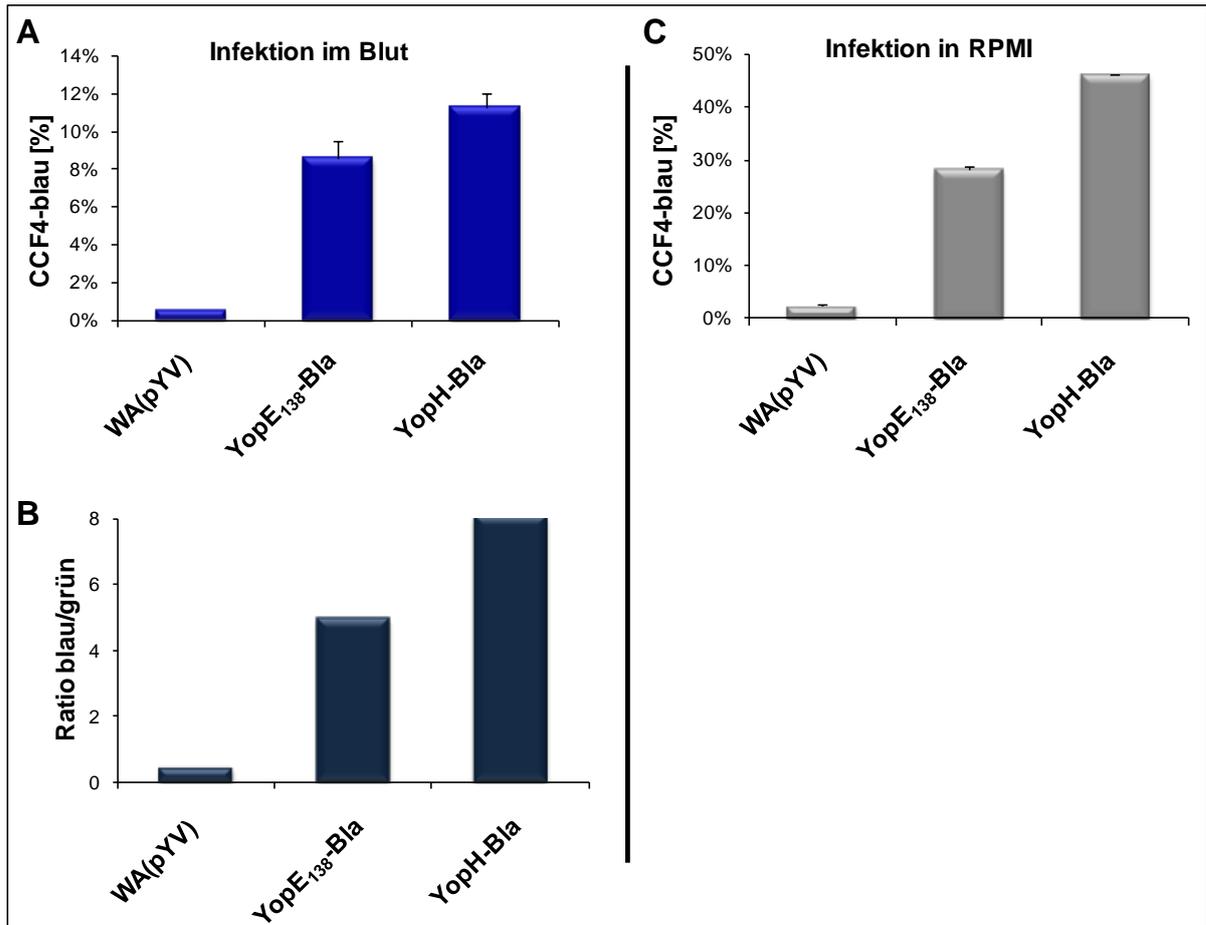


Abb. 41: Infektion der Milzzellen mit Yop-Bla-Reporter-Yersinien, im Blut inkubiert

Milzzellen wurden mit einer MOI 20 in Heparin-Blut für 90 min bei 37°C infiziert (A). Nach der Infektion wurde das Blut-Zellen-Gemisch mit Erythrozyten-Lysepuffer behandelt und anschließend mit CCF4-AM für 90 min beladen. Die Mittelwerte stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Ermittlung des Verhältnisses blau/grün für die Translokation der Yop-Bla-Reporterproteine im Blut als Inkubationsmedium (B). Infektion der Milzzellen in RPMI als Inkubationsmedium (C).

C.2.8.5 Translokationsstudien im physiologischen Raum: Infektion im Peritonealraum

Ein weiterer Unterschied zwischen *in vitro* und *in vivo* Infektionsbedingungen liegt auch in der Beschaffenheit des Infektionsmilieus. *In vitro* wurden die Infektionen in einem künstlichen Umfeld (wie z.B. Kunststoffröhrchen und Mikrotiterplatte) durchgeführt, in der wichtige *in vivo* Komponenten, wie z.B. extrazelluläre Matrix, Blutgefäße, etc. fehlen.

Im Folgenden wurde ein alternativer physiologischer Raum, der Peritonealraum, für den Versuch ausgewählt, um die Rolle des Infektionsraums auf das Translokationsverhalten zu untersuchen.

Dazu wurden den Mäusen 1 ml 10 % Proteose-Pepton in die Bauchhöhle gespritzt, um die Immunzellen in den Peritonealraum zu rekrutieren. Nach 24 h wurden die Yop-Bla-Reporter-Yersinien mit einer cfu von $1,5 \times 10^8$ (in 500 μ l PBS) ebenfalls in die Peritonealhöhle gespritzt. Nach 1,5 h oder 3 h wurde eine peritoneale Spülung durchgeführt. Die peritonealen Zellen wurden für 90 min mit CCF4-AM beladen und anschließend mit fluoreszierenden Antikörpern gegen verschiedene Zelltypspezifische Oberflächenantigene markiert.

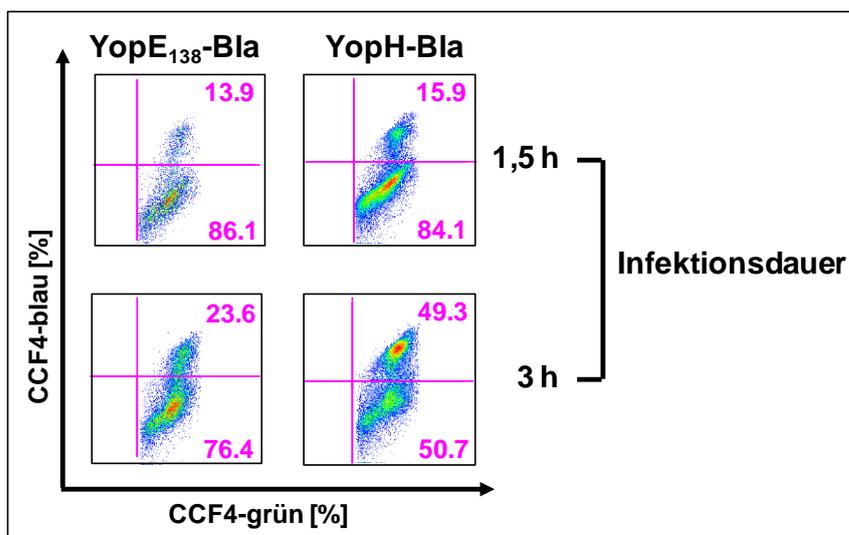


Abb. 42: Infektion im Peritonealraum mit den Yop-Bla-Reporter-Yersinien

4 Mäusen wurde 1 ml 10 % Proteose-Pepton i.p. gespritzt, um die Immunzellen in die Peritonealhöhle zu rekrutieren. Nach 24 h wurden WA(pYV, pYopE₁₃₈-Bla) und WA(pYV, pYopH-Bla) mit einer cfu von $1,5 \times 10^8$ (in 500 μ l PBS) ebenfalls in die Peritonealhöhle gespritzt. Nach 1,5 h oder 3 h wurde eine peritoneale Spülung durchgeführt. Anschließend wurden die peritonealen Zellen für 90 min mit CCF4-AM beladen und mit fluoreszierenden Antikörpern gegen verschiedene Zelltypspezifische Oberflächenantigene markiert. Die Analyse der Bla-Aktivität erfolgte im FACS.

In der Abb. 42 ist zu erkennen, dass bei einer Infektion von 1,5 h die Translokationsraten von YopE₁₃₈-Bla und YopH-Bla in etwa gleich groß sind. Dies zeigt ein anderes Translokationsverhalten im Vergleich zu den *in vitro* Infektionsversuchen, wo YopH-Bla, auch nach 1 h, höhere Translokationsraten als YopE₁₃₈-Bla aufwies (s. C.2.4.3; Abb. 31). Nach einer

Infektion von 3 h, steigen die Translokationsraten für beide Yops an, wobei im Peritonealraum in doppelt so vielen Zellen YopH-Bla als YopE₁₃₈-Bla transloziert wurde. Da $1,5 \times 10^8$ Yersinien für die i.p. Infektion eingesetzt wurden und berücksichtigt man, dass im Peritoneum ca. 10^8 Zellen waren, so entsprach die Infektionsdosis im Peritoneum einer MOI von ca. 1,5. Die *in vitro* Versuche zur Analyse der Rolle der Infektionsdauer auf das Translokationsverhalten ergab zwar, dass die Translokationsrate mit der Infektionsdauer abfällt, dies ist jedoch nur bei MOIs > 5 der Fall (s. C.2.8.1). Bei einer MOI von 5 war die Translokationsrate nach der Infektion von 3 h größer als nach 1 h. Da hier im Translokationsversuch im Peritoneum eine MOI < 5 eingesetzt wurde, entspricht das Infektionsdauer-abhängige Translokationsverhalten im Peritoneum dem *in vitro*.

Um nun zu untersuchen, welche Zelltypen im Peritonealraum von den Reporter-Yersinien kontaktiert werden, wurden verschiedene Zelltypen auf die Bla-Aktivität hin untersucht. Folgenden Zelltypspezifische Marker wurden verwendet: PE-Cy5-konjugierter anti-F4/80, dem Marker für Makrophagen, PE-anti-Ly6G, als Marker für Granulozyten und PE-konjugierter anti-B220/CD45R, welcher hauptsächlich auf B-Zellen und einigen DCs exprimiert wird.

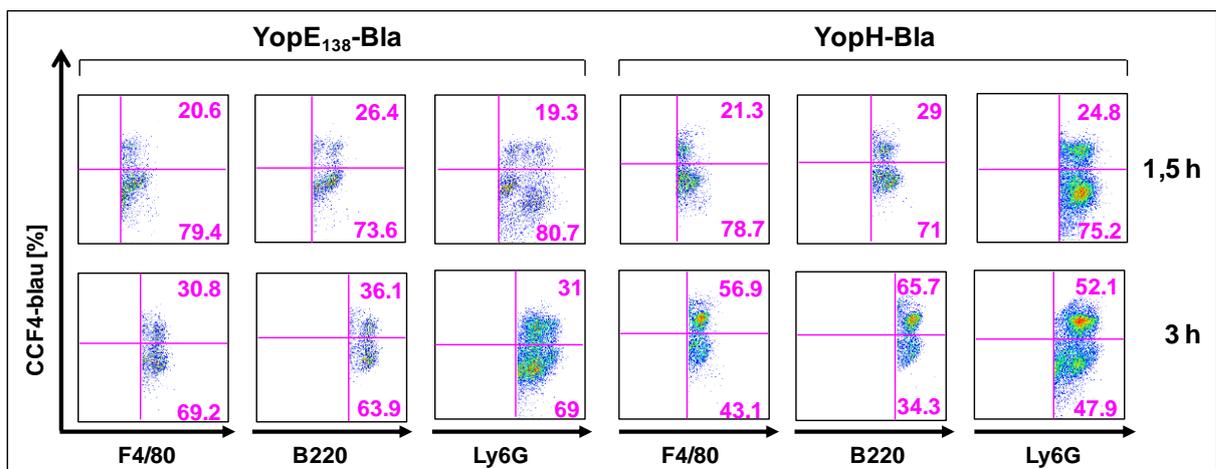


Abb. 43: Translokation der Yop-Bla-Reporter-Yersinien in verschiedene Zelltypen nach der Infektion im Peritonealraum

Peritoneale Zellen wurden nach einer 1,5- und 3 h-Infektion isoliert, mit CCF4-AM beladen und anschließend mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker angefärbt und im FACS analysiert. Die Prozentanteile der verschiedenen Bla-positiven Zellpopulationen sind in den jeweiligen Quadranten angegeben. Folgende Zellmarker wurden verwendet: F4/80: Makrophagen; B220: B-Zellen; Ly6G: Granulozyten;

Aus der Abb. 43 kann festgestellt werden, dass Yersinien auch im Peritoneum alle Zelltypen in annähernd gleichem Ausmaß ansteuern, d.h. es konnte auch hier keine präferenzielle Yop-Injektion in eine der untersuchten Zelltypenpopulationen festgestellt werden.

Dies läßt die Schlußfolgerung zu, dass der Peritonealraum eine gute Alternative zum künstlichen Umfeld, wie Plastikware, für Translokationsversuche darstellt.

Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der gemessenen Bla-Aktivität um phagozytierte Yersinien handelt, die anschließend die Yop-Bla-Reporterproteine freisetzen. Hierzu wurden die Reporterproteine in den WA(pYV Δ LcrD)-Yersinienstamm transformiert und die Translokation gemessen. Dieser Stamm besitzt zwar ein Virulenzplasmid, aber ist unfähig Yops zu sekretieren, da durch die Inaktivierung der Gene für LcrD kein funktionelles T3SS mehr assembliert werden kann (Ruckdeschel *et al.*, 1996). Es konnte keine Reporter-Aktivität, und damit keine Translokation, festgestellt werden (unveröffentlichte Daten von Dr. Bouabe). Somit resultiert die gemessene Bla-Aktivität von der Translokation der Yop-Bla-Reporterproteine.

D. DISKUSSION

Eine Vielzahl verschiedener gram-negativer Bakterienarten, pathogen für Mensch, Tier und Pflanze, haben komplexe Sekretionsmaschinen entwickelt, um verschiedene bakterielle Virulenzproteine direkt in die eukaryotische Wirtszelle zu injizieren (Galan, 2009). Sie erlauben einen direkten Transport bestimmter Effektoren, vom Bakterium in die Wirtszelle, wo sie dort zelluläre Prozesse manipulieren, um so die Infektion und das Wachstum des Pathogens zu fördern.

Unter diesen Sekretionssystemen konnte das TypIII-Sekretionssystem als ein konservierter und gleichzeitig hoch adaptierter Virulenz-Mechanismus beschrieben werden (Galan and Wolf-Watz, 2006). Das Fehlen dieses Sekretionsapparates hat einen großen Einfluss auf die Pathogenese der Infektion (Coburn *et al.*, 2007) und stellt somit eine zentrale Schlüsselrolle für die Virulenz dar.

Da das Translokationsverhalten von Effektorproteinen letztendlich bestimmt ob, wann und wo (d.h. in welchen Organen, Geweben oder Zelltypen) deren Wirkung entfaltet wird, ist es wichtig für das Verständnis dieser dynamischen Prozesse nicht nur quantitative Daten über die Kinetik der TypIII-Sekretion zu sammeln, sondern auch die Konzentration und Verteilung bestimmter Effektoren in den verschiedenen Zelltypen einer Wirtszelle zu untersuchen.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, ein effizientes Reportersystem zu etablieren, welches eine quantitative und qualitative Analyse des Translokationsverhaltens von *Yersinia*-Effektorproteinen *in vitro* sowie *in vivo* ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Reportersysteme, das FIAsH-Reportersystem und das β -Laktamase-Reportersystem, hinsichtlich ihrer Effizienz untersucht. Diese beiden Systeme wurden ausgewählt, weil ihre Reporteraktivität direkt in intakten, lebenden Einzelzellen detektiert werden kann. Dies ist eine Voraussetzung für die Identifizierung der translozierten Yops sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

D.1 Das FIAsH-Reportersystem

Das FIAsH-Reportersystem wurde erstmals von der Arbeitsgruppe von Roger Tsien vorgestellt (Griffin *et al.*, 1998) und beruht auf der hohen Affinität eines kleinen organischen fluoreszierenden Moleküls zu einem Tetracystein-Motiv, einer Abfolge von sechs Aminosäuren (Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys). Mittels homologer Rekombination kann dabei jedes beliebige Gen um die kodierende Sequenz für das Tetracystein-Motiv verlängert werden. Auf diese Weise kann man das endogene Protein durch die markierte Variante

ersetzen. Die Vorteile dieser kurzen Sequenz sind, dass es 1. wie das GFP, als Marker eingesetzt werden kann (Hoffmann *et al.*, 2005) und 2. die Größe der gesamten Markierung nur bei etwa $\frac{1}{40}$ der Größe und Masse von GFP liegt. Große Proteine, wie das GFP sind in der Lage mit den Proteinstrukturen, an die sie fusioniert wurden zu interferieren, sodass es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen kommt (Lisenbee *et al.*, 2003; Andresen *et al.*, 2004).

Durch homologe Rekombination wurde die kodierende Sequenz für das Tetracystein-Motiv (Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys) am 3'-Ende, unmittelbar vor dem Stopcodon vom YopM- und YopH-Gen, inseriert (s. C.1.1.1). Die so etablierten Tetracystein-Reporter-Yersinien, WA(pYV, YopM-Tcys) und WA(pYV, YopH-Tcys), zeigten keine Beeinträchtigung hinsichtlich ihres Sekretionsverhaltens (s. Abb. 9), sowie in ihrer Wachstums- und Invasionsfähigkeit (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der hohen Hintergrundfluoreszenz, die sowohl bei nicht infizierten Zellen als auch bei Zellen, infiziert mit dem Wildstamm (ohne Tetracystein-tag), zu detektieren war (Daten nicht gezeigt), wurden Reduktionsmittel verwendet. Reduktionsmittel, wie 1,2-Ethandithiol (EDT) und 2,3-Dimercaptopropanol (British Anti Lewisite, BAL) reduzieren die Hintergrundfluoreszenz, die u.a. durch unspezifische Substratreaktionen mit endogenen Thiolgruppen entsteht, und erhöhen damit die spezifische Reporteraktivität (Adams *et al.*, 2002; Taguchi *et al.*, 2009). Diese wurden in dem FIAsH-Färbeprotokoll integriert, brachten aber nicht den gewünschten Erfolg.

Ein weiteres Problem, das einer optimalen Beladung der Zellen und höheren Fluoreszenzintensität entgegenwirken kann, ist der aktive Rücktransport des Färbe- oder Reporter-Substrats aus Zellen durch Effluxpumpen. Eine Blockade von aktiven Transportern kann durch die Entkopplung des Protonengradienten erreicht werden. Dies kann z.B. durch den Einsatz von CCCP (Carbonyl Cyanid m-Chlorophenylhydrazon) und PAßN (Phenylalanin-Arginyl- β -Naphthylamid) erfolgen (George, 1996; Thanassi *et al.*, 1997; Hasdemir *et al.*, 2004). Gayet *et al.* beschreiben, dass in *Enterobacter aerogenes* der AcrAB/TolC-Komplex an dem Efflux von Chloramphenicol, Quinolone und Tetrazyklin beteiligt ist (Gayet *et al.*, 2003). Sie zeigten, dass dieses Pump-System durch CCCP und PAßN inhibiert wird. Wir zeigten, dass der Einsatz von CCCP zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität um etwa 20 % führte (s. Abb. 13). Dieses Ergebnis ist um so interessanter, als die Sekretion von Yops intakte protonenmotorische Kraft (PMF) fordert, welche durch CCCP inhibiert wird (Alder and Theg, 2003). Während Wilharm *et al.* beschrieben, dass CCCP eine komplette Inhibierung der TypIII-Sekretion schon bei einer eingesetzten Konzentration von 10 μ M induziert, konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt werden, dass die Sekretion von Yops erst in Anwesenheit von 25 μ M und 50 μ M CCCP vollständig inhibiert wird (s. Abb. 13). Dagegen

konnte bei einer CCCP-Konzentration von 10 μM kein inhibitorischer Effekt auf die Sekretion beobachtet werden, vielmehr konnte anhand der Quantifizierung der Reporteraktivität der Yop-Tcys-Reporterproteine, WA(pYV, YopM-Tcys) und WA(pYV, YopH-Tcys), eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität detektiert werden. Dieser positive Effekt auf die Sekretion könnte jedoch auf die Präsenz von DMSO, in dem CCCP gelöst ist, zurückzuführen sein, da auch in Anwesenheit von DMSO allein eine verstärkte Sekretion zu beobachten war.

Schwefel, ein essentiellen Faktor für das bakterielle Wachstum, kann aus verschiedenen Quellen bezogen werden. Flüchtige organische Schwefelverbindungen, wie das DMSO (Dimethylsulfoxid) sind in der Umwelt weit verbreitet und können von verschiedenen Spezies genutzt werden (Kouzuma *et al.*, 2008). Ein verstärktes Wachstum führt auch zur stärkeren Sekretion von Yops, die dann erst bei einer höheren CCCP-Konzentration inhibiert wird.

PA β N wurde bereits 1999 als erster Breitspektrum-Effluxpumpeninhibitor beschrieben. Diese Substanz aus der Familie der Diamine, die ursprünglich im Rahmen eines Screenings zur Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber dem Fluorchinolon Levofloxacin in RND- (*Resistance Nodulation Division*) Pumpen von überexprimierenden Stämmen von *P. aeruginosa* entdeckt wurde (George, 1996; Renau *et al.*, 1999; Hasdemir *et al.*, 2004), ist bei einer Vielzahl von RND-Transportern gram-negativer Bakterien aktiv (George, 1996; Renau *et al.*, 1999; Hasdemir *et al.*, 2004; Pages *et al.*, 2005). In weiterführenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass PA β N auch selbst ein Substrat von Efflux-Pumpen, als kompetitiver Inhibitor agiert (Pages *et al.*, 2005; Mahamoud *et al.*, 2007). Neuere Studien zeigen jedoch, dass PA β N nicht als Inhibitor, sondern eher als Kompetitor andere Substrate der Efflux-Pumpen verdrängt (Pages *et al.*, 2005; Viveiros *et al.*, 2007; Lomovskaya *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit zeigte der Einsatz von PA β N eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität von Tcys-Proteinen (s. Abb. 14). Das intrazelluläre Anfärben der Tetracystein-Yop-Reporter-Proteine konnte durch die Zugabe mit PA β N verbessert werden und resultierte sogar in einer stärkeren Fluoreszenzintensität als die Tcys-Proteine, die nach der Sekretion angefärbt wurden (LumioTM Post-Färbung), sodass diese Färbungsmethode als vielversprechend angesehen wurde und anschließend im Infektionsmodell auf Zellkultur-Ebene angewendet wurde. Jedoch bewirkte die Zugabe von PA β N nicht nur eine höhere Fluoreszenzintensität bei den Tcys-Reporter-Yersinien, sondern auch ein Anfärben von HeLa-Zellen, die mit dem Wildtyp infiziert wurden (s. Abb. 15). Darüber hinaus fluoreszierten auch nicht-infizierte eukaryotische Zellen bei Anwesenheit von PA β N.

Ein wesentlicher Nachteil von nicht-enzymatischen Reportersystemen, wie das FIAsh-Reportersystem, ist, dass jedes Reporterprotein nur einen Fluorophor bildet. Jedes Tetracyclin-fusionierte Protein kann nur ein Fluorescein-Molekül binden (s. C.1). Hierin liegt der limitierende Faktor vom FIAsh-Reportersystem. Analog zu EGFP (Tsien 1998), welcher über ähnliche Fluoreszenzeigenschaften wie das FIAsh (Griffin *et al.*, 1998) verfügt (s. Tab. 15), ist die nötige Mindestanzahl der Fluorescein-Moleküle, um eine über die Hintergrundfluoreszenz abgehobene spezifische Fluoreszenz zu detektieren, stark von der Menge der Reporterproteine abhängig. Die Fluoreszenzeigenschaften eines Fluorophors sind durch seine Exzitation und Emission charakterisiert. Dabei wird die Energie-Aufnahmefähigkeit (Exzitation) eines fluoreszierenden Moleküls in seinem Extinktionskoeffizienten ϵ , ausgedrückt, während die Emissions-Effizienz eines Fluorophors in der Quantenausbeute definiert wird, welche das Verhältnis zwischen der emittierten Anzahl an Photonen zu der Anzahl an absorbierten Photonen angibt.

Tab. 15: Fluoreszenzeigenschaften von EGFP und FIAsh

Fluoreszenzeigenschaften	EGFP	FIAsh
Extinktionskoeffizient ϵ	55-57.000 cm ⁻¹ /mol ⁻¹	41.000 cm ⁻¹ /mol ⁻¹
Quantenausbeute	0,64	0,49

Schätzungsweise eine Konzentration von 0,1 μ M EGFP (entspricht ca. 1×10^5 EGFP-Moleküle pro Zelle) ist notwendig, um gegen die Autofluoreszenz der Zellen spezifisch detektiert zu werden (Niswender *et al.*, 1995; Patterson *et al.*, 1997; Tsien, 1998). Wegen der ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften von FIAsh und EGFP sollte diese Detektionsgrenze auch für das FIAsh gelten.

Bisher ist noch nicht bekannt, wieviel Yop-Moleküle von einer Bakterienzelle transloziert werden, sodass die Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass es vermutlich deutlich weniger als 10^5 Yop-Moleküle sind. Zumal bei *Salmonella* gezeigt wurde, dass etwa $3-6 \times 10^3$ SipA-Moleküle in die eukaryotische Zelle transloziert werden (Schlumberger *et al.*, 2005).

Es ist allerdings auffallend, dass bei dieser Reportertechnologie eine Reihe von Nachteilen wie schnelles Photobleichen der Fluoreszenz, limitierte Sensitivität, sowie Toxizitätsprobleme beim Beladen der Bakterien mit dem FIAsh-Reagenz, überwiegen. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass extrazelluläre Proteine schlechte Kandidaten für die FIAsh-Färbung sind, da die Cystein-Reste des Tetracyclinmotivs in extrazellulärer Umgebung oxidiert werden und deshalb während dem Export durch das endoplasmatische Retikulum ihre Affinität für das FIAsh-Reagenz verlieren. Außerdem konnte die Aussage verschiedener Autoren bestätigt werden, dass eine FIAsh-bedingte Fluoreszenz nicht nur nach Bindung an ein Tetracyclinmotiv sondern auch an endogene, Cystein-reiche Proteine entsteht (Stroffekova *et al.*, 2001;

Berens *et al.*, 2005; Langhorst *et al.*, 2006; Hearps *et al.*, 2007), weshalb eine FIAsh-Fluoreszenz auch von Proteinen, die nicht mit dem Tetracystein-tag versehen waren, detektiert wurde (s. Abb. 15). Daher erscheint die FIAsh-Methode nur für Proteine, die stark exprimiert werden, anwendbar zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die FIAsh-Reportertechnologie nicht sensitiv genug ist, um die Translokation von Yops (oder generell T3SS-Effektorproteine) zu untersuchen. Trotz des Einsatzes von Efflux-Inhibitoren konnte keine nennenswerte spezifische Fluoreszenz, die sich über die Autofluoreszenz abhebt, gemessen werden. Aus diesem Grund wurde eine andere Methode angewendet, welche die Untersuchung der Yop-Translokation erlaubt.

D.2 Das β -Laktamase-Reportersystem

Während die FIAsh-Reportertechnologie nur ein Fluorophor pro Protein vorsieht, kann ein Enzym-konjugiertes Protein viele fluorogene Substrat-Moleküle umsetzen und damit viele Fluorophore erzeugen. Aus diesem Grund könnte ein enzymatisches Reportersystem den limitierenden Faktor, der sich durch die niedrige Molekülanzahl der translozierten Yop-Reporterproteine ergibt, kompensieren. Es wurde hier das Enzym β -Laktamase (Bla) als Reporter ausgewählt. Die Reporteraktivität kann schon bei 50 β -Laktamase-Molekülen detektiert werden (Zlokarnik *et al.*, 1998; Qureshi, 2007). Darüber hinaus kann die Bla-Reporteraktivität in intakten Zellen, sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch mittels FACS ratiometrisch gemessen werden.

Die kodierende Sequenz für TEM1- β -Laktamase, ohne Signalsequenz, wurde am 3'-Ende der kodierenden Sequenzen von YopE und YopH fusioniert und unter ihrem endogenen Promotor im Vektor pACYC184 inseriert (s. C.2.1). YopH-Bla wurde freundlicherweise von Dr. Gerke zur Verfügung gestellt. Da der N-Terminus von YopE die Domäne für die Protein-Sekretion und Translokation umfasst, wurde in einigen Arbeiten beschrieben, dass die ersten 15 Aminosäuren von YopE für die Sekretion notwendig, jedoch nicht ausreichend für eine Yop-Translokation (Jacobi *et al.*, 1998; Feldman *et al.*, 2002) sind. Aus diesem Grund wurden zusätzlich verschieden lange Aminosäuresequenzen von YopE mit dem *bla*-Gen fusioniert, um die Unterschiede in der Translokation der verschiedenen YopE_n-Konstrukte zu untersuchen. Als Erkennungsdomäne für die TypIII-Sekretion wurden die N-terminalen 18, 53 und 138 Aminosäuren von YopE an die Bla-Sequenz angebracht und in verschiedene *Yersinia*-Stämme transformiert, um ebenfalls einen Vergleich bezüglich der Sekretions- und Translokationsrate zu ziehen.

D.2.1 Das Translokationsverhalten von YopE und YopH ist unterschiedlich

Es konnte gezeigt werden, dass YopH-Bla stärker transloziert wird als YopE₁₃₈-Bla (s. Abb. 22). Das gleiche schwache Translokationsverhalten von YopE₁₃₈-Bla (im Vergleich zu YopH) konnte auch für das YopE₂₁₉-Bla festgestellt werden (unveröffentlichte Daten von Dr. Bouabe).

Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, dass die höhere Translokation von YopH an einer höheren Kopienzahl des YopH-Bla-Reportervektors liegt (s. Abb. 23).

Es bleibt jedoch noch zu klären, ob die unterschiedliche subzelluläre Lokalisierung von YopH und YopE zu der unterschiedlichen intrazellulären Bla-Aktivität führte. Während YopE nach der Translokation Vesikel-assoziiert und perinukleär lokalisiert ist (Rosqvist *et al.*, 1991; Fields *et al.*, 1999), wurde YopH frei im Zytosol der Wirtszelle nachgewiesen (Straley *et al.*, 1993; Bliska *et al.*, 1993; Sory *et al.*, 1995; Black and Bliska, 1997; DeBord *et al.*, 2001; Viboud and Bliska, 2005). Interessanterweise zeigen, die Bla-Reporterproteine von YopE₁₈ und YopE₅₃, bei denen die Membranlokalisierungsdomäne (MLD; 54-75 AS) fehlt (Isaksson *et al.*, 2009) und infolgedessen, im Gegensatz zum Wildtyp-YopE, über das ganze Zytosol verteilt sein sollen (Isaksson *et al.*, 2009), eine höhere Bla-Reporter-Aktivität als YopE₁₃₈-Bla (s. Abb. 32).

Wahrscheinlich, spiegelt die Translokationsrate, nicht unbedingt die Sekretionsrate wieder. Denn sowohl das YopE als auch das YopE₁₃₈-Bla-Fusionsprotein wird stärker sekretiert als das YopH bzw. das YopH-Bla-Fusionsprotein (s. Abb. 23). Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Translokation der einzelnen Yops unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt.

Ein möglicher Mechanismus, der zu diesem unterschiedlichen Translokationsverhalten führen könnte, könnte ein unterschiedlicher Abbau von YopH und YopE sein. Ruckdeschel und Kollegen zeigten, dass eine (Poly)ubiquitylierung von YopE zu dessen schnellerem Abbau führt. Dagegen konnten sie keine Ubiquitylierung von YopH nachweisen (Ruckdeschel *et al.*, 2006). Ferner zeigten sie, dass der Lysin-Rest 75 von YopE für dessen optimale Ubiquitylierung und schnellem Abbau verantwortlich ist. Wurde das Lysin 75 in YopE gegen ein Arginin ausgetauscht, konnte eine erhöhte zelluläre Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp-YopE nachgewiesen werden. Interessanterweise, zeigten die hier untersuchten YopE₁₈-Bla und YopE₅₃-Bla-Reporterstämme eine höhere Reporteraktivität als

YopE₁₃₈-Bla (s. Abb. 32), was mit dem fehlenden Lysin-Rest 75 in den ersten beiden YopE-Fragmenten und damit mit deren langsameren Abbau zu erklären wäre.

Das differentielle Translokationsverhalten von YopE und YopH könnte auch mit der biologischen Relevanz für die Virulenz der Yersinien zusammenhängen. Trulzsch und Kollegen konnten zeigen, dass YopH ein unerlässlicher Virulenzfaktor ist, um eine systemische Erkrankung in der Maus zu erzeugen, während YopE für die Kolonisierung von Milz und Leber entbehrlich ist (Trulzsch *et al.*, 2004; Heesemann *et al.*, 2006). Damit könnte eine Korrelation zwischen dem Translokationsverhalten und dem Beitragsgrad der einzelnen Yops zur Virulenz bestehen. Das bedeutet, je höher der Beitragsgrad eines Effektorproteins zur Virulenz von Yersinien ist, desto stärker (bzw. in größerer Menge) scheint es transloziert zu werden. Einen Zusammenhang zwischen Translokationsverhalten und Virulenz konnten Brodsky und Kollegen für YopJ zeigen. Die Translokationsrate von YopJ in *Y. pseudotuberculosis* war entscheidend für dessen *in vivo* Virulenz. Die Mutation von zwei AS im N-Terminus von YopJ führte zu seiner erhöhten Translokation und resultierte in einer erhöhten Zytotoxizität (Brodsky and Medzhitov, 2008).

Eine weitere mögliche biologische Relevanz für die schwächere Translokation von YopE könnte damit zusammenhängen, dass YopE, als GTPase aktivierendes Protein (GAP), die Aktivität u.a. der Rho-GTPasen inhibiert (Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Black and Bliska, 2000; Andor *et al.*, 2001; Aepfelbacher, 2004). Die Aktivität der Rho-GTPasen ist aber wichtig für eine optimale Translokation von Yops (Mejia E, Bliska JB, Viboud GI, 2008; Martin Köberle *et al.* 2009). Damit scheint es Sinn zu machen, YopE in moderaten Mengen zu injizieren, um keine vollständige Inhibition der Aktivität der Rho-GTPasen und infolgedessen der Translokation von anderen Yops, wie etwa YopH, hervorzurufen, die für die *Yersinia*-Virulenz unerlässlich sind.

D.2.2 Einfluss von verschiedenen Umweltbedingungen auf das Translokationsverhalten *in vitro*

Verschiedene mikrobielle Umweltbedingungen können die Translokation beeinflussen. Dazu zählen Faktoren, wie Temperatur, Calcium-Konzentration, sowie Komponenten der verwendeten Zellkulturmedien, wie z.B. Aminosäuren, Zucker und Proteine (Cambronne and Schneewind, 2002).

Bekannt ist, dass die Sekretion von Yops, in Abwesenheit eukaryotischer Zellen, bei 37°C artifiziell durch die Depletion von Ca²⁺-Ionen ausgelöst werden kann (Heesemann and Laufs, 1983; Heesemann *et al.*, 1986; Michiels *et al.*, 1990). Da die Ca²⁺-Konzentration im

eukaryotischen Zytoplasma niedrig ist, wurde postuliert, dass die niedrige zytosolische Ca^{2+} -Konzentration als physiologischer Induktor der TypIII-Sekretion dient (Lee *et al.*, 2001). Weiterhin wird die Expression der Yops Temperatur-abhängig reguliert, sodass bei einer Erhöhung der Wachstumstemperatur von 27°C auf 37°C das T3SS aktiviert und dadurch die Expression des Sekretionsapparates und der Effektorproteine induziert wird (Cornelis *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1987b).

Wir konnten aber zeigen, dass Yops (anhand von ektopischem YopH-Bla und YopE₁₃₈-Bla), nicht nur, wie bereits bekannt bei 37°C (Straley *et al.*, 1993), sondern auch bei 27°C exprimiert werden (Yersinien wurden in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freies PBS, in Mikrotiterplatten kultiviert). Diese Expression bei 27°C konnte erst bei höherer Calcium-Konzentration (ab 1 mM CaCl_2) inhibiert werden (s. Abb. 27). Allerdings konnte, entsprechend bereits publizierter Daten (Heesemann *et al.*, 1986), keine Sekretion von Yops bei 27°C detektiert werden. Die Expression von Yops (YopH-Bla und YopE₁₃₈-Bla) scheint jedoch nicht alleine durch die Temperatur reguliert zu werden. Die Calcium-Konzentration scheint eine wichtige Rolle bei deren Expressionsregulation zu spielen.

Ferner konnten wir zeigen, dass die Sekretion von YopH-Bla und YopE₁₃₈-Bla bei 37°C auch in Anwesenheit von Calcium (bis 0,5-1 mM) stattfindet (Yersinien wurden in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freies PBS, in Mikrotiterplatten kultiviert) und erst bei einer höheren CaCl_2 -Konzentration im Bereich von 2-2,5 mM unterbunden wird. Dies relativiert das Dogma des „*Low calcium response*“ (Lcr) (Kupferberg and Higuchi, 1958; Brubaker and Surgalla, 1964), wo die Supplementierung des Mediums mit Ca^{2+} -Ionen die Yop-Sekretion ins Medium unterbindet. Der Einfluss von Calcium wurde auch auf das Translokationsverhalten hin untersucht. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine gewisse Konzentration an Calcium einen positiven Einfluss auf die Translokation hat. Bei einer CaCl_2 -Konzentration von 0,25-0,5 mM konnten die höchsten Translokationsraten von YopH-Bla und YopE₁₃₈-Bla erzielt werden. Dieser Calcium-abhängige Translokationsphänotyp könnte auch ein Grund für den festgestellten Unterschied in der Translokationseffizienz zwischen der Infektion in den Zellkulturmedien, DMEM und RPMI, sein (s. Abb. 25). Die Infektion der Zellen in RPMI-Medium zeigte die doppelte Menge an Bla-positiven (Yop-Bla-translozierten) Zellen im Vergleich zu DMEM (s. Abb. 25). Dabei hat DMEM mehr als die zweifache Ca^{2+} -Konzentration als RPMI (s. Tab. 19 und Tab. 20 im Anhang).

Wie ist der differentielle Einfluss von Calcium auf die Translokation zu erklären?

Es ist allgemein bekannt, dass Calcium wichtig für die Virulenz von Yersinien ist, u.a. für die Stabilisierung des pYV-Plasmids (Kupferberg and Higuchi, 1958; Brubaker and Surgalla, 1964; Berche and Carter, 1982). Wir konnten nun hier zeigen, dass die Calcium-abhängige

Virulenz von Yersinien auch in der Erhöhung der Translokationseffizienz von Yops resultieren könnte. Die Mobilisierung von Calcium spielt auch eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen der Immunantwort (Grinstein and Klip, 1989; Vig and Kinet, 2009; Salter and Watkins, 2009). Das Translokationsverhalten von Yops könnte damit eine Anpassung von Yersinien an Calcium-abhängige Aktivitäten der Immunzellen darstellen.

Eine mögliche Verbindung zwischen Calcium und Translokationseffizienz könnten die Rho-GTPasen sein. Wie bereits erwähnt, ist die Aktivität der Rho-GTPasen wichtig für eine optimale Translokation von Yops (Mejia *et al.*, 2008; Koberle *et al.*, 2009). Die Aktivierung von Rho-GTPasen kann durch Calcium induziert werden (Fleming *et al.*, 1999; Pi *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2003).

D.2.3 Kinetik der Translokation

Schon nach 10 min *Yersinia*-Kontakt mit den Zellen konnte eine Translokation nachgewiesen werden (s. Abb. 31). Aus technisch-methodischen Gründen war es nicht möglich, frühere Zeitpunkte zu untersuchen. Aufgrund unserer Ergebnisse, vermuten wir jedoch, dass Yops bereits wenige Minuten nach Kontakt mit den Zellen transloziert werden. Diese schnelle Translokation von YopH-Bla und YopE₁₃₈-Bla korreliert zeitlich mit den einsetzenden Anti-Wirt-Funktionen von YopH und YopE, die schon früh nach Kontakt der Yersinien mit den Zellen zu beobachten sind. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die YopE-abhängige Reduktion der Menge von Rac2-GTP schon 15 min nach einer *Yersinia*-Infektion erfolgt (Songsunthong *et al.*, 2010). Weiterhin setzt die YopH-abhängige Inhibition des „oxidativen burst“ oder der Phosphorylierung von Tyrosin-Proteine schon nach ca. 5-10 min ein (Ruckdeschel *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 1997). Ferner konnten Andersson und Kollegen den direkten Effekt von YopH, die Inhibierung des lokalen Ca²⁺ Signals innerhalb phagozytischer Zellen, in kürzester Zeit von wenigen Minuten nachweisen (Andersson *et al.*, 1999). Die intrazelluläre Erhöhung des Ca²⁺ ist wichtig für das Freisetzen von Granula in den Neutrophilen, der Phagolysosom-Fusion und der oxidativen Aktivierung (Jaconi *et al.*, 1990; Bei *et al.*, 1998). Durch das YopH-vermittelte Blockieren des Ca²⁺-Einstroms wird so letztendlich die Beseitigung von Yersinien verhindert. Dies erklärt die Bedeutung von YopH für das Überleben des Bakteriums und zeigt, dass eine frühe Translokation wichtig ist, um die verschiedenen Verteidigungsmechanismen der Wirtszelle zu durchbrechen. Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass in Abwesenheit von YopH oder YopE, *Yersinia* empfindlich gegenüber Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen in Zellkultur war, was darauf hin deutet, dass die verbleibenden Yops nicht gänzlich die Phagozytose verhindern können (Bliska *et al.*, 1991; Grosdent *et al.*, 2002). Dies untermauert die

Vermutung, dass wichtige Virulenzfaktoren, wie YopH im Besonderen, früh transloziert werden, um das Überleben des Bakteriums zu sichern.

Wir konnten zeigen, dass YopH-Bla während der gesamten Beobachtungszeit stärker transloziert wird als YopE₁₃₈-Bla (s. Abb. 31 und Abb. 32), was die immense Bedeutung von YopH für die Virulenz von *Yersinia* erneut unterstreicht. Black und Bliska formulierten das Konzept, dass YopH und YopE in einer synergistischen Art und Weise das Zytoskelett der Wirtszelle degradieren, wobei YopH vermutlich zuerst den Kontakt zwischen den fokalen Adhäsionen und den Aktinfilamenten löst, während YopE anschließend die Aktinfilamente zerstört und die fokalen Adhäsionen abbaut (Black and Bliska, 1997).

D.2.4 Die N-terminalen 18 AS von YopE sind ausreichend für eine Translokation

Bisher wurde angenommen, dass die ersten N-terminalen 15 Aminosäuren von YopE für die Sekretion notwendig, aber nicht ausreichend für die Translokation von YopE sind (Sory and Cornelis, 1994; Schesser *et al.*, 1996; Feldman *et al.*, 2002; Russmann *et al.*, 2003). Hingegen wurde die minimale Domäne für die Translokation von YopE auf 50 AS bestimmt (Lee *et al.*, 1998), zumal darin auch die erste Hälfte der Bindungsstelle für das Chaperon SycE enthalten ist. Der Effektor YopE wird beispielsweise nur in geringen Mengen synthetisiert und transloziert, wenn sein Chaperon SycE fehlt (Woestyn *et al.*, 1996; Cheng and Schneewind, 1999). Wir konnten jedoch zeigen, dass bereits die ersten N-terminalen 18 AS von YopE ausreichen, um eine Translokation von YopE₁₈-Bla detektieren zu können (s. Abb. 32). Interessanterweise konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass *Yersinia* mit Deletionen der wichtigsten *yop*-Gene (Δ yopHOPEM oder Δ yopTHE), das YopE₁₅-Cya-Protein (Cya = kodierende Sequenz für die katalytische Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase-Domäne) in HeLa-Zellen transloziert (Boyd *et al.*, 2000). Außerdem wurden YopE-Konstrukte, die keine SycE-Bindestellen hatten ebenfalls transloziert. Dies zeigt, dass die Erkennung eines TypIII-translozierten Proteins nicht unbedingt durch Syc Chaperone vermittelt wird und dass das Sekretionssignal in den ersten 15 AS von YopE ausreicht, um durch den Sekretionsapparat durchgeschleust und in die Wirtszelle transloziert zu werden (Ramamurthi and Schneewind, 2002). Zudem war gezeigt worden, dass YopE₅₃-Fusionsproteine erheblich besser sekretiert werden als YopE₁₈- oder YopE₁₃₈-Fusionen (Jacobi *et al.*, 1998; Feldman *et al.*, 2002; Wiedig *et al.*, 2005). Desweiteren wurde mittels eines YopE-CyaA-Reporters gezeigt, dass eine maximale YopE-Fragment-CyaA Translokation von YopE₄₇- bis YopE₁₁₃-Fusionsproteinen zu beobachten ist (Sory *et al.*, 1995). Diese Beobachtung steht im Einklang mit unseren

Ergebnissen, da in allen *Yersinia*-Stämmen die höchste Bla-Aktivität von allen verwendeten YopE-Bla-Reporterproteinen von YopE₅₃-Bla gemessen wurde (s. Abb. 32 und Abb. 39). Dies könnte vermutlich daran liegen, dass YopE₅₃ einerseits vollkommen ausreichend für die Erkennung des Fusionsproteins als TypIII-Substrat ist, und andererseits die Reduktion der Größe des Gesamtproteins die Passage durch den Sekretionsapparat erleichtert.

D.2.5 Translokationsrate ist abhängig von der MOI

Die eingesetzte MOI könnte einen wesentlichen Einfluss auf die Translokationsrate haben. Wir konnten zeigen, dass die Anzahl der Bla-positiven Zellen mit steigender MOI (bis MOI 50) kontinuierlich steigt und ab MOI > 50 wieder fällt (s. Abb. 38). Dieses Phänomen wurde von uns als MOI-abhängige Sättigung der Translokation bezeichnet. Hingegen zeichneten Koberle und Kollegen mit dem *Yersinia*-Stamm O:9 eine Sättigungskurve mit zunehmender MOI, wobei aber die Bla-Aktivitätsrate nicht abfällt sondern in ein Plateau endet (Koberle *et al.*, 2009). Die MOI-abhängige Sättigung der Translokation könnte an dem unproportionalen Verhältnis zwischen den Yersinien und den Zellrezeptoren (β 1-Integrine) liegen. Dies würde zur Konkurrenz der überzähligen Yersinien um die begrenzten Andockstellen (Integrine) führen. Dabei ist β 1-Integrin wichtig für den *Yersinia*-Zell-Kontakt und für eine effiziente Yop-Translokation (Koberle *et al.*, 2009; Durand *et al.*, 2010).

D.2.6 Die Yop-Bla-Translokation ist *in vitro* Zelltyp-unabhängig

Eine zentrale Fragestellung wurde in dieser Arbeit näher untersucht, ob die Yop Injektion in bestimmten Subpopulationen von Milzzellen bevorzugt stattfindet oder nicht. Die Antwort darauf wäre eine wichtige Voraussetzung zur Interpretation und Gegenüberstellung von späteren *in vivo* Untersuchungen. Da sich unterschiedliche Arbeitsgruppen mit verschiedenen *Yersinia*-Arten mit dieser Thematik beschäftigten, sollen die erzielten Ergebnisse zusammengetragen werden und miteinander verglichen werden. Dabei ist auch zu beachten, dass die drei pathogenen *Yersinia*-Arten unterschiedliche Adhäsionsmoleküle besitzen, die unterschiedliche Rezeptoren auf der Wirtszelle binden können.

In der Tab. 16 sind Adhäsionsmoleküle aufgelistet, die von verschiedenen *Yersinia*-Spezies exprimiert werden. Diese bedingen die Bindung an unterschiedliche eukaryotische Rezeptoren. Während die Adhäsine YadA und Invasin die $\alpha\beta$ 1-vermittelte Adhäsion und Invasion bei enteropathogenen Yersinien vermitteln (Rosqvist *et al.*, 1990; Pepe and Miller, 1993; Skurnik *et al.*, 1994; Marra and Isberg, 1997), sind diese bei *Y. pestis* als Pseudogene inaktiv (Chain *et al.*, 2004). Es wurden jedoch andere Adhäsionsmoleküle bei *Y. pestis*

gefunden (Straley, 1993; Cowan *et al.*, 2000), die wie z.B. das Adhäsion Pla die Invasion in Endothelzellen induzieren (Lahteenmaki *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu der Integrin-vermittelten Rezeptorbindung von YadA und Invasin (Isberg and Barnes, 2001), binden die Adhäsine von *Y. pestis* an andere extrazelluläre Matrixkomponenten von Eukaryonten (Lawrenz *et al.*, 2009).

Tab. 16: Adhäsionsmoleküle verschiedener *Yersinia*-Spezies

Adhäsine	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
YadA	-	+	+
Invasin	-	+	+
pH 6 Antigen, MyfA, Psa	+	+	+
Ail	+	+	+
Pla	+	-	-

In Tab. 17 werden die Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen gegenüber gestellt, die die Frequenzen der Bla-positiven Zellen bei der Translokation von unterschiedlichen Yop-Bla-Reporterproteinen verschiedener *Yersinia*-Arten in verschiedenen Zelltypen der isolierten Milzzellen *in vitro* untersucht haben.

Tab. 17: Translozierte Yops verschiedener *Yersinia*-Spezies in verschiedene Zelltypen der Milz *in vitro*

Zelltypen	<i>Y. pestis</i> C57Bl/6 (Marketon <i>et al.</i> , 2005)		<i>Y. pseudotuber- culosis</i> Balb/c (Durand <i>et al.</i> , 2010)	<i>Y. enterocolitica</i> O:9 C57Bl/6 (Koberle <i>et al.</i> , 2009)	<i>Y. enterocolitica</i> O:8 Bl6/129sv (diese Arbeit)	
	YopM	YopE	YopH	YopE ₅₃	YopH	YopE ₁₃₈
B-Zellen	49 %	55 %	53 %	85 %	75 %	67 %
Granulozyten			40 %	68 %	89 %	87 %
Makrophagen	35 %	34 %	29 %	62 %	73 %	74 %
NK-Zellen				65 %	47 %	57 %
CD8-T-Zellen	20 %	26 %	23 %	58 %	52 %	30 %
CD4-Zellen	35 %	25 %	53 %		43 %	26 %

Dabei können Unterschiede in der Translokationsrate der verschiedenen *Yersinia*-Stämme festgestellt werden. Grundsätzlich wurde aber Bla-Reporteraktivität in allen Zelltypen der Milzsuspension nachgewiesen, was bedeutet, dass Yersinien in alle Zelltypen Yop-Bla-Reporterproteine translozieren. Da die Translokation die Bindung der bakteriellen Adhäsine an eukaryotische Rezeptoren voraussetzt, könnte eine unterschiedliche Translokationsrate der Zelltypen zwischen den verschiedenen *Yersinia*-Arten auch daran liegen, dass bestimmte Rezeptoren eines Zelltyps besser erkannt werden und so die Yop-Translokation kontrollieren (Durand *et al.*, 2010). Die untersuchten unterschiedlichen *Yersinia*-Spezies sind

außerdem mit verschiedenen Adhäsinen ausgestattet (s. Tab. 16) und können damit mit einer unterschiedlichen Präferenz an Wirtszellen binden.

Durch die Ermittlung des blau/grün-Verhältnisses konnte ratiometrisch berechnet werden, dass die größte Menge an Yops in B-Zellen, CD8-T-Zellen und Makrophagen injiziert wurde, was sich auch mit den Ergebnissen von Köberle und Kollegen deckt.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen sagen, dass die Yop Translokation weitestgehend unabhängig vom Zelltyp angenommen werden kann. Es scheint also keine qualitativ präferenzielle Translokation in bestimmte Zellen aufgrund der Expression von Oberflächenproteinen oder der extrazellulären Matrix zu geben, abgesehen davon dass einige Zelltypen eine besondere Yop-Aufnahmefähigkeit haben. Das bedeutet, dass die *in vitro* beobachtete Yop-Translokation Aufschluss über die Häufigkeit des Kontakts zwischen den infizierenden Bakterien und bestimmten Leukozytentypen geben kann.

D.2.7 Die Yop-Bla Translokation ist *in vivo* Zelltyp-unabhängig

Die verschiedenen Wirkungen von Yop-Effektoren konnten nicht nur auf Zellkulturebene nachgewiesen werden (Sory *et al.*, 1995; Grosdent *et al.*, 2002; Brodsky and Medzhitov, 2008), sondern es konnten bestimmte Yops für die Kolonisierung von Gewebe sowie für die Virulenz im Mausinfektionsmodell als essentiell identifiziert werden (Leung *et al.*, 1990; Trulzsch *et al.*, 2004; Trulzsch *et al.*, 2007).

Dennoch konnte bisher noch nicht geklärt werden, wie die beobachteten Effekte von Yops *in vitro* mit ihrer Rolle im Mausinfektionsmodell *in vivo*, in Einklang zu bringen sind. Dabei ist das Identifizieren der Zielzellen der Yop-Translokation während der Infektion *in vivo* ein wichtiger Schritt zum besseren Verstehen wie die verschiedenen Yop-Effektoren an der Virulenz der Yersinien und der Inhibition von Abwehrmechanismen des Wirtes beteiligt sind (Durand *et al.*, 2010).

In vitro Infektionen von Zellkulturen mit *Y. enterocolitica* können nicht unbedingt für das Infektionsgeschehen in einem Gesamtorganismus gleichgesetzt werden. Deshalb sollten sich zukünftige Untersuchungen verstärkt mit der Wirkung von Yops in Zellen bei einer *in vivo* Infektion befassen.

In Tab. 18 werden die Bla-Aktivitäten translozierter Yop-Bla-Reporterproteine, die in bestimmten Zelltypen von verschiedenen Arbeitsgruppen gemessen wurden, aufgelistet.

Während einer Yersinien-Infektion *in vivo* kommt es in der Milz zur Ausbildung von Abszessen (s. Abb. 35), unter Beteiligung von Neutrophilen und mononukleare Phagozyten. Während einer Infektion wandern Makrophagen/Monozyten, NK-Zellen und Granulozyten in die Milz ein (Lukaszewski *et al.*, 2005; Oellerich *et al.*, 2007). Wir konnten feststellen, dass

nach einer Infektionszeit von 5 Tagen die Translokation von YopH-Bla in allen Zelltypen der Milz annähernd gleich war (s. Abb. 37). Berücksichtigt man jedoch den prozentualen Anteil der einzelnen Subpopulationen an der Gesamtzahl der Milzzellen, so ist der Anteil an B-Zellen und Granulozyten an der Gesamtpopulation der blauen Zellen sehr groß (s. Abb. 36). Die Tatsache, dass Rezeptoren, wie β 1-Integrin, für Invasin und YadA von *Y. enterocolitica* auf eine Vielzahl von Zellen, wie Epithelzellen, Neutrophilen, B- und T-Zellen (Brakebusch and Fassler, 2005) vorzufinden sind, könnte teilweise erklären, warum Yops von *Y. enterocolitica* in verschiedenen Zellen des angeborenen (Makrophagen, Granulozyten) und des adaptiven Immunsystems (B- und T-Zellen) transloziert werden.

Tab. 18: Translozierte Yops verschiedener *Yersinia*-Spezies in verschiedene Zelltypen der Milz *in vivo*

Zelltypen	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
	C57Bl/6 (Marketon <i>et al.</i> , 2005)	Balb/c (Durand <i>et al.</i> , 2010)	O:9 C57Bl/6 (Koberle <i>et al.</i> , 2009)	O:8 Bl6/129sv (diese Arbeit)
	YopM	YopH	YopE ₅₃	YopH
B-Zellen		2,5 %	3 %	4,6 %
Granulozyten	1,5 %	25 %	5,8 %	2,6 %
Makrophagen	6,2 %	15 %	13 %	3,6 %
NK-Zellen			7,3 %	5,6 %
CD8-T-Zellen	1 %	2 %	2,8 %	3,7 %
CD4-Zellen	1 %	1 %		3 %

Diese Aussage wurde auch durch die Untersuchungen am *Y. enterocolitica* O:9 Stamm von Köberle und Kollegen unterstützt, die ebenfalls Yop-Translokation in B-Zellen detektieren konnten (Koberle *et al.*, 2009). Dass Yop Translokation im Mausmodell bevorzugt in Granulozyten stattfindet, steht im Einklang mit der Beobachtung, dass *Yersinia*-Abszesse in der Milz verstärkt von Granulozyten umgeben sind (Carter, 1975) und dementsprechend anscheinend den häufigsten Kontakt zu Yersinien haben. Aber auch Makrophagen und NK-Zellen wandern während einer Infektion aktiv in die infizierte Milz ein. Es ist daher nicht überraschend, dass auch diese Zellpopulationen in der Milz, neben B-Zellen, von der Yop-Translokation stark betroffen sind (Autenrieth *et al.*, 1993).

Allerdings, konnte bei Untersuchungen mit *Yersinia pestis* keine YopM-Injektion in B-Zellen, sondern vornehmlich in Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen nachgewiesen werden (Marketon *et al.*, 2005). Dabei ist unklar, ob diese unterschiedlichen Ergebnisse den verschiedenen *Yersinia*-Arten, den unterschiedlichen Yop-Bla-Reportern und/oder den verschiedenen Maus-Stämmen zuzuschreiben sind. Auch die Translokationsstudien mit *Y. pseudotuberculosis* zeigten, dass die Yop-Translokation primär in professionellen Phagozyten, denn in B-oder T-Zellen vorzufinden ist (Durand *et al.*, 2010), wobei die Mäuse

nicht wie bei allen anderen Gruppen intraperitoneal sondern oral mit einer hohen Infektionsdosis von 2×10^9 cfu infiziert wurden, was ebenfalls einen Einfluss auf die translozierten Zielzellen haben könnte. Erwähnenswert ist, dass bei Marketon und Kollegen als auch bei Durand und Kollegen eine große Zellpopulation nicht mit Substrat beladen war, was darauf hindeutet, dass es sich um tote Zellen handelt. Da CCF4 (bzw. CCF2) nur in vitalen Zellen verbleibt (Marketon *et al.*, 2005), könnten sich solche toten Zellen der Analyse entziehen. Auch die Yop-Translokationsstudien mit dem *Y. enterocolitica* O:9 Stamm, weisen große Unterschiede zu unserem Versuchsablauf auf. Es wurde das YopE₅₃-Bla-Fusionsprotein (in der vorliegenden Arbeit wurde YopH-Bla für die *in vivo* Infektionen eingesetzt) im nicht Maus-virulenten Stamm O:9 (Hancock *et al.*, 1986; Vogel *et al.*, 1993; Ruiz-Bravo *et al.*, 2001) verwendet. Dieser Stamm kann das Yersiniabaktin nicht synthetisieren, welches für die Eisenversorgung der Yersinien notwendig ist. Infektionen mit dem O:9 Stamm benötigen deshalb eine Behandlung mit dem Siderophor Desferrioxamin, um eine Infektion mit hoher Keimlast hervorrufen zu können (Koberle *et al.*, 2009). Aber als Nebenwirkung von Desferrioxamin ist eine immunsupprimierende Wirkung bekannt (Schubert and Autenrieth, 2000). Dadurch steigt die Anzahl an Bakterien in den Organen an (Robins-Browne and Prpic, 1985; Lesic *et al.*, 2002), was zu einer möglichen Beeinflussung der verschiedenen Zellpopulationen in der Milz führen könnte. Desweiteren wurde mit einer cfu von 5×10^5 intravenös für 2 Tage infiziert.

Auch wenn sich die Menge an translozierten Yops in den Zelltypen zwischen den verschiedenen *Yersinia*-Arten unterscheidet, sowie Unterschiede in den Mausstämmen und verwendeten Yop-Bla-Fusionsproteinen vorliegen, kann festgestellt werden, dass die Yop-Translokation in allen Zelltypen stattfindet. In weiterführenden Studien sollten alle Zelltypen einzeln isoliert und mit derselben MOI der Reporter-Yersinien infiziert werden, um die Translokationseffizienz zwischen den einzelnen Zelltypen zu vergleichen. Unter diesen gleichen Bedingungen könnte es einen Aufschluss darüber geben, ob es eine Präferenz gegenüber bestimmten Zelltypen gibt.

D.2.8 Die Yop-Translokation *in vitro* vs. *in vivo*

Während die Yop-Translokation *in vitro* bei bis zu ca. 70 % der Milzzellen nachzuweisen war (s. Abb. 33), konnte *in vivo* nur in ca. 1,5 % der Milzzellen (s. Abb. 35) β -Laktamase-Aktivität gemessen werden. *In vitro* fanden sich die größten Bla-positiven Populationen bei B-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen im Gegensatz zu der *in vivo* Infektion, bei der alle Zelltypen eine ähnliche Bla-positive Population aufwiesen. Aufgrund dieser Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen wurde von uns die Vermutung aufgestellt, dass der Grund für

das unterschiedliche Yop-Translokationsverhalten an den nicht-physiologischen Infektionsbedingungen *in vitro* liegen könnte. Um diese Hypothese zu bestätigen wurden die einzelnen nicht-physiologischen Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* definiert und untersucht.

1. Wir konnten durch die *in vitro* Simulierung eines 3D-Modells anhand einer Infektion von Milz und Leber zeigen, dass die Anatomie des Infektionsmodells einen Einfluss auf das Translokationsverhalten hat. Die Translokationsraten sind im vollständigen Organ viel niedriger als in der Einzelzellsuspension (s. Abb. 40). Hier konnte außerdem gezeigt werden, dass in verschiedenen Organen (Leber und Milz) die Yop-Translokation unterschiedlich ist.
2. Das Translokationsverhalten könnte auch maßgeblich von der Beschaffenheit bzw. der chemischen Zusammensetzung des Infektionsmediums bestimmt sein. Während die *in vivo* Infektion in extrazellulärer Flüssigkeit, wie z.B. Blut und interstitielle Flüssigkeit stattfindet, wird die *in vitro* Infektion in synthetisierten Zellkulturmedien durchgeführt. So konnten wir zeigen, dass wenn die Infektion im Blut durchgeführt wird, die Translokationseffizienz viel niedriger ist als im Zellkulturmedium (s. Abb. 41).
3. Einen wichtigen Aspekt der biologischen Beschaffenheit bildet auch der Raum, in dem eine Infektion stattfindet. So findet unter *in vitro* Bedingungen die Infektion in einem künstlichen Umfeld (z.B. Mikrotiterplatte) statt, während sich eine *in vivo* Infektion im physiologischen Raum, dem Körper im Ganzen und in den einzelnen Kompartimenten im Speziellen, abspielt. Indem wir die Infektion zuerst *in vivo* im peritonealen Raum (i.p. Infektion) durchführten, und erst danach die peritonealen Zellen isoliert und ihre Bla-Reporteraktivität gemessen haben, konnten wir den Gebrauch eines künstlichen Infektionsraumes umgehen. Wir konnten zeigen, dass eine *in vivo* Infektion in der Bauchhöhle eine gute Alternative zu der *in vitro* Infektion in der Mikrotiterplatte ist (s. Abb. 42). Mit diesem Versuch konnte bestätigt werden, dass bei einer MOI < 5 und zunehmender Infektionszeit die Anzahl an Bla-positiven Zellen zunimmt, wie bereits unter *in vitro* Bedingungen beobachtet (s. Abb. 38A). Da hier im Translokationstest im Peritonealraum eine MOI unter 5 eingesetzt wurde, entspricht das infektionsdauerabhängige-Translokationsverhalten im Peritoneum dem *in vitro*. Auch im Peritonealraum wird Yop-Bla Zelltyp-unabhängig transloziert, was die *in vivo* Daten somit bestätigt (s. Abb. 43).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass das Translokationsverhalten wichtigen physiologischen Faktoren und Bedingungen unterliegt, sodass das Infektionsgeschehen *in vitro* letztendlich nur einen Hinweis liefert, aber nicht das reale Infektionsgeschehen *in vivo* widerspiegelt.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Yersinia enterocolitica ist durch die Expression zahlreicher Pathogenitätsfaktoren in der Lage, systemische Infektionen zu verursachen. Von zentraler Bedeutung ist dabei das auf dem pYV Virulenzplasmid kodierte Yop Virulon, das aus einem TypIII-Sekretionssystem und den Yops (*Yersinia outer proteins*) besteht. Bisher sind sechs Yops bekannt, die die Abwehrmechanismen des Wirtes unterdrücken. Die Untersuchung bakterieller Effektoren und deren Translokation, sowie Wechselwirkungen mit zellulären Gegenspielern, sind von großer Bedeutung, um nicht nur die Infektion als Ganzes zu verstehen, sondern auch mögliche neue Therapiestrategien entwickeln zu können.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Reportersysteme, FIAsH und β -Laktamase, etabliert, um die Yop-Translokation in lebenden Zellen *in vitro* sowie *in vivo* zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass das FIAsH-System nicht sensitiv genug ist, um eine Translokation messen zu können. Hingegen konnte mit dem β -Laktamase-(Bla)-Reportersystem nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo*, die Translokation der Yop-Bla-Reporterproteine des virulenten *Y. enterocolitica* Stamms WA-314, Serotyp O:8, in verschiedenen Zelltypen gemessen werden. Außerdem wir zeigen, dass die Translokation von verschiedenen Faktoren (wie z.B. MOI und Umweltbedingungen) abhängt. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Calcium einen positiven Einfluss auf die Translokation, nicht aber auf die Sekretion hat. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass YopE₁₃₈-Bla stärker sekretiert, jedoch schwächer transloziert wird als YopH-Bla. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Sekretionsverhalten nicht das Translokationsverhalten widerspiegelt.

Darüber hinaus könnte eine Korrelation zwischen dem Translokationsverhalten von YopH-Bla und YopE₁₃₈-Bla und ihrem jeweiligen Beitragsgrad zur Virulenz bestehen.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die ersten 18 N-terminalen Aminosäuren von YopE ausreichend sind, um YopE₁₈-Bla in die Wirtszelle zu translozieren.

Mit Hilfe von kinetischen Studien, konnten wir zeigen, dass die Yop-Bla-Translokation schon in den ersten Minuten nach Kontakt der Yersinien mit den Zellen stattfindet, und diese mit steigender Infektionszeit zunimmt. Diese frühe Translokation korreliert mit den bekannten, früh ansetzenden Anti-Wirt-Funktionen von Yops.

Wir konnten eine MOI-abhängige Sättigung der Yop-Translokationsrate beobachten, die von der Infektionsdauer sowie der Bakterienmenge abhängt. Dabei nimmt die Translokationsrate mit zunehmender MOI (< 50) zu und nimmt bei einer MOI > 50 ab.

Wir konnten zeigen, dass *in vitro* als auch *in vivo*, YopH-Bla in allen Zelltypen der Milz transloziert wird. Dabei ist für die *in vivo* Untersuchung eine sehr hohe Infektionsdosis und

eine sehr starke Kolonisierung der Milz, Voraussetzung für die Detektion der Bla-Reporteraktivität. Es konnte gezeigt werden, dass das Infektionsgeschehen im Zellverband (3D-Struktur, Gewebe) die Translokationsrate negativ beeinflusst und niedriger ist, als in der Einzelzellsuspension. Desweiteren wurde nach Inkubation der Milzzellen im Blut eine schwächere Translokationsrate von Yop-Bla-Reporterproteinen gemessen, als nach Inkubation in synthetischen Zellkulturmedien. Um die Infektionsbedingungen den realen *in vivo* Bedingungen anzugleichen, konnten wir die Infektion im Peritonealraum als echte Alternative zu den *in vitro* Infektionsbedingungen vorstellen.

Zusammengefasst wurde mit diesem Projekt ein Bla-Reportersystem etabliert, das geeignet ist, um die Yop-Translokation durch *Y. enterocolitica* nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* nachzuweisen.

F. ANHANG

Tab. 19: *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X) liquid (low glucose)* von Invitrogen

Komponenten	Molekulargewicht	Konzentration [mg/l]	mM
Aminosäuren			
Glycin	75	30	0,4
L-Argininhydrochlorid	211	84	0,398
L-Cystin 2xHCl	313	63	0,201
L-Glutamin	146	580	3,97
L-Histidinhydrochlorid-H ₂ O	210	42	0,2
L-Isoleucin	131	105	0,802
L-Leucin	131	105	0,802
L-Lysinhydrochlorid	183	146	0,798
L-Methionin	149	30	0,201
L-Phenylalanin	165	66	0,4
L-Serin	105	42	0,4
L-Threonin	119	95	0,798
L-Tryptophan	204	16	0,0784
L-Tyrosin	181	72	0,398
L-Valin	117	94	0,803
Vitamine			
Cholinchlorid	140	4	0,0286
D-Calciumpantothenat	477	4	0,00839
Folsäure	441	4	0,00907
Niacinamid	122	4	0,0328
Pyridoxinhydrochlorid	204	4	0,0196
Riboflavin	376	0.4	0,00106
Thiaminhydrochlorid	337	4	0,0119
i-Inositol	180	7.2	0,04
Anorganische Salze			
Calciumchlorid (CaCl ₂ -2xH ₂ O)	147	264	1,8
Eisennitrat (Fe(NO ₃) ₃ 9xH ₂ O)	404	0.1	0,000248
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ -7xH ₂ O)	246	200	0,813
Kaliumchlorid (KCl)	75	400	5,33
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	84	3700	44,05
Natriumchlorid (NaCl)	58	6400	110,34
Di-Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ -2xH ₂ O)	154	141	0,916
Andere Komponenten			
D-Glukose (Dextrose)	180	1000	5,56
Phenol Rot	376,4	15	0,0399
Natriumpyruvat	110	110	1

Tab. 20: RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium 1640 von Invitrogen

Komponenten	Molekulargewicht	Konzentration [mg/l]	mM
Aminosäuren			
Glycin	75	10	0,133
L-Arginin	174	200	1,15
L-Asparagin	132	50	0,379
L-Aspartat	133	20	0,15
L-Cystin	240	50	0,208
L-Glutamat	147	20	0,136
L-Glutamin	146	300	2,05
L-Histidin	155	15	0,0968
L-Hydroxyprolin	131	20	0,153
L-Isoleucin	131	50	0,382
L-Leucine	131	50	0,382
L-Lysinhydrochlorid	183	40	0,219
L-Methionin	149	15	0,101
L-Phenylalanin	165	15	0,0909
L-Prolin	115	20	0,174
L-Serin	105	30	0,286
L-Threonin	119	20	0,168
L-Tryptophan	204	5	0,0245
L-Tyrosin	181	20	0,11
L-Valin	117	20	0,171
Vitamine			
Biotin	244	0.2	0,00082
Cholinechlorid	140	3	0,0214
D-Calciumpantothenat	477	0.25	0,00052
Folsäure	441	1	0,00227
Niacinamid	122	1	0,0082
Para-Aminobenzoessäure	137	1	0,0073
Pyridoxinhydrochlorid	206	1	0,00485
Riboflavin	376	0.2	0,00053
Thiaminhydrochlorid	337	1	0,00297
Vitamin B12	1355	0.005	0,00000
i-Inositol	180	35	0,194
Anorganische Salze			
Calciumnitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{xH}_2\text{O}$)	236	100	0,424
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{xH}_2\text{O}$)	246	100	0,407
Kaliumchlorid (KCl)	75	400	5,33
Natriumbicarbonat (NaHCO_3)	84	2000	23,81
Natriumchlorid (NaCl)	58	6000	103,45
Natriumhydrogenphosphat	142	800	5,63
Andere Komponenten			
D-Glukose (Dextrose)	180	2000	11,11
Glutathion (reduziert)	307	1	0,00326
Phenol Rot	376.4	5	0,0133

G. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, *et al.* Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 2007; **5** (11):883-91.
- Aber RC. Transfusion-associated *Yersinia enterocolitica*. *Transfusion* 1990; **30** (3):193-5.
- Adams SR, Campbell RE, Gross LA, *et al.* New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc* 2002; **124** (21):6063-76.
- Aepfelbacher M. Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of *Yersinia*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; **152**:65-77.
- Aepfelbacher M, Trasak C, Ruckdeschel K. Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb Haemost* 2007; **98** (3):521-9.
- Aepfelbacher M, Zumbihl R, Heesemann J. Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by YopT of *Yersinia*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; **291**:167-75.
- Aili M, Telepnev M, Hallberg B, Wolf-Watz H, Rosqvist R. In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity. *Microb Pathog* 2003; **34** (6):297-308.
- Albers SV, Szabo Z, Driessen AJ. Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nat Rev Microbiol* 2006; **4** (7):537-47.
- Alder NN, Theg SM. Energy use by biological protein transport pathways. *Trends Biochem Sci* 2003; **28** (8):442-51.
- Aleksic S. Occurrence of *Y. enterocolitica* antigens O:3, O:9 and O:8 in different *Yersinia* species, their corresponding H antigens and origin. *Contrib Microbiol Immunol* 1995; **13**:89-92.
- Aleksic S, Bockemuhl J. [Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections]. *Immun Infekt* 1990; **18** (6):178-85.
- Allaoui A, Woestyn S, Sluiter C, Cornelis GR. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol* 1994; **176** (15):4534-42.
- Andersson K, Magnusson KE, Majeed M, Stendahl O, Fallman M. *Yersinia pseudotuberculosis*-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. *Infect Immun* 1999; **67** (5):2567-74.
- Andor A, Trulzsch K, Essler M, *et al.* YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* 2001; **3** (5):301-10.
- Andresen M, Schmitz-Salue R, Jakobs S. Short tetracysteine tags to beta-tubulin demonstrate the significance of small labels for live cell imaging. *Mol Biol Cell* 2004; **15** (12):5616-22.

- Autenrieth IB, Hantschmann P, Heymer B, Heesemann J. Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiology* 1993; **187** (1-2):1-16.
- Bahrani FK, Sansonetti PJ, Parsot C. Secretion of Ipa proteins by *Shigella flexneri*: inducer molecules and kinetics of activation. *Infect Immun* 1997; **65** (10):4005-10.
- Begon M, Telfer S, Smith MJ, *et al.* Seasonal host dynamics drive the timing of recurrent epidemics in a wildlife population. *Proc Biol Sci* 2009; **276** (1662):1603-10.
- Bei L, Hu T, Qian ZM, Shen X. Extracellular Ca²⁺ regulates the respiratory burst of human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1404** (3):475-83.
- Benach J, Chou YT, Fak JJ, *et al.* Phospholipid-induced monomerization and signal-peptide-induced oligomerization of SecA. *J Biol Chem* 2003; **278** (6):3628-38.
- Berche PA, Carter PB. Calcium requirement and virulence of *Yersinia enterocolitica*. *J Med Microbiol* 1982; **15** (3):277-84.
- Berens W, Van Den BK, Yoon TJ, *et al.* Different approaches for assaying melanosome transfer. *Pigment Cell Res* 2005; **18** (5):370-81.
- Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 1999; **473**:11-30.
- Bergman T, Erickson K, Galyov E, Persson C, Wolf-Watz H. The IcrB (yycN/U) gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in Yop secretion and shows high homology to the spa gene clusters of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1994; **176** (9):2619-26.
- Berks BC. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* 1996; **22** (3):393-404.
- Berks BC, Palmer T, Sargent F. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* 2005; **8** (2):174-81.
- Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* 2008; **11** (1):3-8.
- Bissett ML, Powers C, Abbott SL, Janda JM. Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency, and serogroup distribution. *J Clin Microbiol* 1990; **28** (5):910-2.
- Black DS, Bliska JB. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J* 1997; **16** (10):2730-44.
- Black DS, Bliska JB. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* 2000; **37** (3):515-27.

- Black DS, Montagna LG, Zitsmann S, Bliska JB. Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the Yersinia tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. *Mol Microbiol* 1998; **29** (5):1263-74.
- Bladergroen MR, Badelt K, Spaink HP. Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Mol Plant Microbe Interact* 2003; **16** (1):53-64.
- Bliska JB, Clemens JC, Dixon JE, Falkow S. The Yersinia tyrosine phosphatase: specificity of a bacterial virulence determinant for phosphoproteins in the J774A.1 macrophage. *J Exp Med* 1992; **176** (6):1625-30.
- Bliska JB, Galan JE, Falkow S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 1993; **73** (5):903-20.
- Bliska JB, Guan KL, Dixon JE, Falkow S. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential Yersinia virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88** (4):1187-91.
- Blocker AJ, Deane JE, Veenendaal AK, *et al.* What's the point of the type III secretion system needle? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105** (18):6507-13.
- Blumberg HM, Kiehlbauch JA, Wachsmuth IK. Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica O:3 infections: use of chromosomal DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1991; **29** (11):2368-74.
- Bohne J, Yim A, Binns AN. The Ti plasmid increases the efficiency of Agrobacterium tumefaciens as a recipient in virB-mediated conjugal transfer of an IncQ plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95** (12):7057-62.
- Boland A, Cornelis GR. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect Immun* 1998; **66** (5):1878-84.
- Boland A, Sory MP, Iriarte M, *et al.* Status of YopM and YopN in the Yersinia Yop virulon: YopM of Y. enterocolitica is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J* 1996; **15** (19):5191-201.
- Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ. How specific should immunological memory be? *J Immunol* 1999; **163** (2):569-75.
- Bottone EJ. Yersinia enterocolitica: a panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Crit Rev Microbiol* 1977; **5** (2):211-41.
- Bottone EJ. Yersinia enterocolitica: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* 1997; **10** (2):257-76.
- Boyd AP, Lambermont I, Cornelis GR. Competition between the Yops of Yersinia enterocolitica for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* 2000; **182** (17):4811-21.
- Brakebusch C, Fassler R. beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more. *Cancer Metastasis Rev* 2005; **24** (3):403-11.

- Brenner DJ. Speciation in *Yersinia*. *Contrib Microbiol Immunol* 1979; **5**:33-43.
- Brink S, Bogsch EG, Edwards WR, Hynds PJ, Robinson C. Targeting of thylakoid proteins by the delta pH-driven twin-arginine translocation pathway requires a specific signal in the hydrophobic domain in conjunction with the twin-arginine motif. *FEBS Lett* 1998; **434** (3):425-30.
- Brodsky IE, Medzhitov R. Reduced secretion of YopJ by *Yersinia* limits in vivo cell death but enhances bacterial virulence. *PLoS Pathog* 2008; **4** (5):e1000067.
- Brubaker RR, Surgalla MJ. THE EFFECT OF CA⁺⁺ AND MG⁺⁺ ON LYSIS, GROWTH, AND PRODUCTION OF VIRULENCE ANTIGENS BY PASTEURELLA PESTIS. *J Infect Dis* 1964; **114**:13-25.
- Bry L, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI. A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* 1996; **273** (5280):1380-3.
- Buchanan G, Sargent F, Berks BC, Palmer T. A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif. *Arch Microbiol* 2001; **177** (1):107-12.
- Burnens AP, Frey A, Nicolet J. Association between clinical presentation, biogroups and virulence attributes of *Yersinia enterocolitica* strains in human diarrhoeal disease. *Epidemiol Infect* 1996; **116** (1):27-34.
- Calos MP, Miller JH. Transposable elements. *Cell* 1980; **20** (3):579-95.
- Cambronne ED, Schneewind O. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: yscM1 and yscM2 regulate yop gene expression by a posttranscriptional mechanism that targets the 5' untranslated region of yop mRNA. *J Bacteriol* 2002; **184** (21):5880-93.
- Cambronne ED, Sorg JA, Schneewind O. Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector yop expression in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 2004; **186** (3):829-41.
- Cao TB, Saier MH, Jr. The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1609** (1):115-25.
- Carter PB. Animal model of human disease. *Yersinia enterocolitica*. Animal model: oral *Yersinia enterocolitica* infection of mice. *Am J Pathol* 1975; **81** (3):703-6.
- Cascales E. The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep* 2008; **9** (8):735-41.
- Cavanaugh DC. Specific effect of temperature upon transmission of the plague bacillus by the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis*. *Am J Trop Med Hyg* 1971; **20** (2):264-73.
- Chain PS, Carniel E, Larimer FW, *et al*. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101** (38):13826-31.
- Chanteau S, Ratsifasoamanana L, Rasoamanana B, *et al*. Plague, a reemerging disease in Madagascar. *Emerg Infect Dis* 1998; **4** (1):101-4.

- Charpentier X, Oswald E. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J Bacteriol* 2004; **186** (16):5486-95.
- Cheng LW, Schneewind O. *Yersinia enterocolitica* type III secretion. On the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells. *J Biol Chem* 1999; **274** (31):22102-8.
- Cheng LW, Schneewind O. Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol* 2000; **8** (5):214-20.
- Christie PJ, Cascales E. Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol* 2005; **22** (1-2):51-61.
- Chu S, Bohlen HG. High concentration of glucose inhibits glomerular endothelial eNOS through a PKC mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287** (3):F384-F392.
- Cianciotto NP. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* 2005; **13** (12):581-8.
- Coburn B, Sekirov I, Finlay BB. Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20** (4):535-49.
- Cornelis G, Laroche Y, Balligand G, Sory MP, Wauters G. *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev Infect Dis* 1987a; **9** (1):64-87.
- Cornelis G, Sory MP, Laroche Y, Derclaye I. Genetic analysis of the plasmid region controlling virulence in *Yersinia enterocolitica* 0:9 by Mini-Mu insertions and lac gene fusions. *Microb Pathog* 1986; **1** (4):349-59.
- Cornelis G, Vanootegem JC, Sluiter C. Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* 1987b; **2** (5):367-79.
- Cornelis GR. The *Yersinia* deadly kiss. *J Bacteriol* 1998; **180** (21):5495-504.
- Cornelis GR. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002a; **3** (10):742-52.
- Cornelis GR. The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol* 2002b; **291** (6-7):455-62.
- Cornelis GR. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* 2002c; **158** (3):401-8.
- Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 2006; **4** (11):811-25.
- Cornelis GR, Biot T, Lambert de RC, *et al.* The *Yersinia* yop regulon. *Mol Microbiol* 1989; **3** (10):1455-9.
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, *et al.* The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; **62** (4):1315-52.

- Cornelis GR, Wolf-Watz H. The Yersinia Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 1997; **23** (5):861-7.
- Cover TL, Aber RC. Yersinia enterocolitica. *N Engl J Med* 1989; **321** (1):16-24.
- Cowan C, Jones HA, Kaya YH, Perry RD, Straley SC. Invasion of epithelial cells by Yersinia pestis: evidence for a Y. pestis-specific invasin. *Infect Immun* 2000; **68** (8):4523-30.
- Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97** (12):6640-5.
- Dautin N, Bernstein HD. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* 2007; **61**:89-112.
- Day JB, Ferracci F, Plano GV. Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by Yersinia pestis yopN, tyeA, syncN, yscB and lcrG deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies. *Mol Microbiol* 2003; **47** (3):807-23.
- de Felipe KS, Glover RT, Charpentier X, *et al.* Legionella eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathog* 2008; **4** (8):e1000117.
- DeBord KL, Lee VT, Schneewind O. Roles of LcrG and LcrV during type III targeting of effector Yops by Yersinia enterocolitica. *J Bacteriol* 2001; **183** (15):4588-98.
- Delepelaire P. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1694** (1-3):149-61.
- Deleuil F, Mogemark L, Francis MS, Wolf-Watz H, Fallman M. Interaction between the Yersinia protein tyrosine phosphatase YopH and eukaryotic Cas/Fyb is an important virulence mechanism. *Cell Microbiol* 2003; **5** (1):53-64.
- Delor I, Cornelis GR. Role of Yersinia enterocolitica Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* 1992; **60** (10):4269-77.
- Delor I, Kaeckenbeeck A, Wauters G, Cornelis GR. Nucleotide sequence of yst, the Yersinia enterocolitica gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. *Infect Immun* 1990; **58** (9):2983-8.
- Denecker G, Totemeyer S, Mota LJ, *et al.* Effect of low- and high-virulence Yersinia enterocolitica strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun* 2002; **70** (7):3510-20.
- Dequeker J, Jamar R, Walravens M. HLA-B27, arthritis and Yersinia enterocolitica infection. *J Rheumatol* 1980; **7** (5):706-10.
- Desvaux M, Parham NJ, Scott-Tucker A, Henderson IR. The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends Microbiol* 2004; **12** (7):306-9.
- Durand EA, Maldonado-Arocho FJ, Castillo C, Walsh RL, Meccas J. The presence of professional phagocytes dictates the number of host cells targeted for Yop translocation during infection. *Cell Microbiol* 2010.

- Edqvist PJ, Aili M, Liu J, Francis MS. Minimal YopB and YopD translocator secretion by *Yersinia* is sufficient for Yop-effector delivery into target cells. *Microbes Infect* 2007; **9** (2):224-33.
- Enninga J, Mounier J, Sansonetti P, Tran Van NG. Secretion of type III effectors into host cells in real time. *Nat Methods* 2005; **2** (12):959-65.
- Erfurth SE, Grobner S, Kramer U, *et al.* *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun* 2004; **72** (12):7045-54.
- Evdokimov AG, Anderson DE, Routzahn KM, Waugh DS. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J Mol Biol* 2001; **312** (4):807-21.
- Feldman MF, Muller S, Wuest E, Cornelis GR. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol* 2002; **46** (4):1183-97.
- Fields KA, Nilles ML, Cowan C, Straley SC. Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect Immun* 1999; **67** (10):5395-408.
- Fields KA, Plano GV, Straley SC. A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (*ysc*) locus lies within the *lcrB* region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 1994; **176** (3):569-79.
- Filloux A, Hachani A, Bleves S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 2008; **154** (Pt 6):1570-83.
- Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; **61** (2):136-69.
- Fischer W, Haas R, Odenbreit S. Type IV secretion systems in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* 2002; **292** (3-4):159-68.
- Fleming IN, Elliott CM, Buchanan FG, Downes CP, Exton JH. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem* 1999; **274** (18):12753-8.
- Forsberg A, Viitanen AM, Skurnik M, Wolf-Watz H. The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 1991; **5** (4):977-86.
- Fredriksson-Ahomaa M, Bucher M, Hank C, Stolle A, Korkeala H. High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in southern Germany: a slaughtering technique problem. *Syst Appl Microbiol* 2001; **24** (3):457-63.
- Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, *et al.* Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 2002; **296** (5567):503-7.
- Galan JE. Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; **209**:43-60.

- Galan JE. Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe* 2009; **5** (6):571-9.
- Galan JE, Bliska JB. Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**:221-55.
- Galan JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 2006; **444** (7119):567-73.
- Galyov EE, Hakansson S, Forsberg A, Wolf-Watz H. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 1993; **361** (6414):730-2.
- Garcia JT, Ferracci F, Jackson MW, *et al.* Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag. *Infect Immun* 2006; **74** (10):5645-57.
- Gathmann S, Rupprecht E, Schneider D. High level expression of a protein precursor for functional studies. *J Biochem Mol Biol* 2006; **39** (6):717-21.
- Gayet S, Chollet R, Molle G, Pages JM, Chevalier J. Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47** (5):1555-9.
- Geddes K, Cruz F, Heffron F. Analysis of cells targeted by *Salmonella* type III secretion in vivo. *PLoS Pathog* 2007; **3** (12):e196.
- George AM. Multidrug resistance in enteric and other gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1996; **139** (1):1-10.
- Ghosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; **68** (4):771-95.
- Gophna U, Ron EZ, Graur D. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 2003; **312**:151-63.
- Goure J, Broz P, Attree O, Cornelis GR, Attree I. Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis* 2005; **192** (2):218-25.
- Griffin BA, Adams SR, Tsien RY. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 1998; **281** (5374):269-72.
- Grinstein S, Klip A. Calcium homeostasis and the activation of calcium channels in cells of the immune system. *Bull N Y Acad Med* 1989; **65** (1):69-79.
- Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP, Cornelis GR. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* 2002; **70** (8):4165-76.
- Guan KL, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 1990; **249** (4968):553-6.

- Guan KL, Dixon JE. Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J Biol Chem* 1991; **266** (26):17026-30.
- Guarino A, Capano G, Malamisura B, *et al.* Production of Escherichia coli STa-like heat-stable enterotoxin by Citrobacter freundii isolated from humans. *J Clin Microbiol* 1987; **25** (1):110-4.
- Haag H, Hantke K, Drechsel H, *et al.* Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of Yersinia enterocolitica. *J Gen Microbiol* 1993; **139** (9):2159-65.
- Hacker J, Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2001; **2** (5):376-81.
- Hagberg L, Jodal U, Korhonen TK, *et al.* Adhesion, hemagglutination, and virulence of Escherichia coli causing urinary tract infections. *Infect Immun* 1981; **31** (2):564-70.
- Hakansson S, Bergman T, Vanooteghem JC, Cornelis G, Wolf-Watz H. YopB and YopD constitute a novel class of Yersinia Yop proteins. *Infect Immun* 1993; **61** (1):71-80.
- Hakansson S, Schesser K, Persson C, *et al.* The YopB protein of Yersinia pseudotuberculosis is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J* 1996; **15** (21):5812-23.
- Hamid N, Gustavsson A, Andersson K, *et al.* YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb Pathog* 1999; **27** (4):231-42.
- Hamilton HL, Dominguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT, Dillard JP. Neisseria gonorrhoeae secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol* 2005; **55** (6):1704-21.
- Hancock GE, Schaedler RW, MacDonald TT. Yersinia enterocolitica infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect Immun* 1986; **53** (1):26-31.
- Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pages JM. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae strains from Turkey. *J Clin Microbiol* 2004; **42** (6):2701-6.
- Hearps AC, Pryor MJ, Kuusisto HV, *et al.* The biarsenical dye Lumio exhibits a reduced ability to specifically detect tetracysteine-containing proteins within live cells. *J Fluoresc* 2007; **17** (6):593-7.
- Heesemann J, Algermissen B, Laufs R. Genetically manipulated virulence of Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* 1984; **46** (1):105-10.
- Heesemann J, Gross U, Schmidt N, Laufs R. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic Yersinia sp. grown in calcium-deficient media. *Infect Immun* 1986; **54** (2):561-7.
- Heesemann J, Keller C, Morawa R, *et al.* Plasmids of human strains of Yersinia enterocolitica: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* 1983; **147** (1):107-15.

- Heesemann J, Laufs R. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J Bacteriol* 1983; **155** (2):761-7.
- Heesemann J, Sing A, Trulzsch K. *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol* 2006; **9** (1):55-61.
- Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 2001; **69** (3):1231-43.
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, a'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; **68** (4):692-744.
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 1998; **6** (9):370-8.
- Hinsley AP, Stanley NR, Palmer T, Berks BC. A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett* 2001; **497** (1):45-9.
- Hoffmann C, Gaietta G, Bunemann M, *et al.* A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2005; **2** (3):171-6.
- Hoiczuk E, Blobel G. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98** (8):4669-74.
- Hoiczuk E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* 2000; **19** (22):5989-99.
- Holland IB. Translocation of bacterial proteins--an overview. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1694** (1-3):5-16.
- Holland IB, Schmitt L, Young J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* 2005; **22** (1-2):29-39.
- Holmstrom A, Olsson J, Cherepanov P, *et al.* LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* 2001; **39** (3):620-32.
- Hoogkamp-Korstanje JA, de KJ. [Clinical aspects, diagnosis and therapy of *Yersinia enterocolitica* infections]. *Immun Infekt* 1990; **18** (6):192-7.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, *et al.* Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; **291** (5505):881-4.
- Hubber AM, Sullivan JT, Ronson CW. Symbiosis-induced cascade regulation of the *Mesorhizobium loti* R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol Plant Microbe Interact* 2007; **20** (3):255-61.
- Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; **62** (2):379-433.

- Iriarte M, Cornelis GR. YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 1998; **29** (3):915-29.
- Iriarte M, Sory MP, Boland A, *et al.* TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of Yersinia Yop effectors. *EMBO J* 1998; **17** (7):1907-18.
- Isaksson EL, Aili M, Fahlgren A, *et al.* The membrane localization domain is required for intracellular localization and autoregulation of YopE in Yersinia pseudotuberculosis. *Infect Immun* 2009; **77** (11):4740-9.
- Isberg RR, Barnes P. Subversion of integrins by enteropathogenic Yersinia. *J Cell Sci* 2001; **114** (Pt 1):21-8.
- Ivanov MI, Stuckey JA, Schubert HL, Saper MA, Bliska JB. Two substrate-targeting sites in the Yersinia protein tyrosine phosphatase co-operate to promote bacterial virulence. *Mol Microbiol* 2005; **55** (5):1346-56.
- Jackson MW, Plano GV. Interactions between type III secretion apparatus components from Yersinia pestis detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **186** (1):85-90.
- Jacob-Dubuisson F, Fernandez R, Coutte L. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1694** (1-3):235-57.
- Jacobi CA, Gregor S, Rakin A, Heesemann J. 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):7772-82.
- Jacobi CA, Roggenkamp A, Rakin A, *et al.* In vitro and in vivo expression studies of *yopE* from Yersinia enterocolitica using the *gfp* reporter gene. *Mol Microbiol* 1998; **30** (4):865-82.
- Jacobs J, Jamaer D, Vandeven J, *et al.* Yersinia enterocolitica in donor blood: a case report and review. *J Clin Microbiol* 1989; **27** (5):1119-21.
- Jaconi ME, Lew DP, Carpentier JL, *et al.* Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J Cell Biol* 1990; **110** (5):1555-64.
- Juris SJ, Rudolph AE, Huddler D, Orth K, Dixon JE. A distinctive role for the Yersinia protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97** (17):9431-6.
- Juris SJ, Shao F, Dixon JE. Yersinia effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol* 2002; **4** (4):201-11.
- Kabelitz D, Medzhitov R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol* 2007; **19** (1):1-3.
- Karavolos MH, Roe AJ, Wilson M, *et al.* Type III secretion of the Salmonella effector protein SopE is mediated via an N-terminal amino acid signal and not an mRNA sequence. *J Bacteriol* 2005; **187** (5):1559-67.

- Kerschen EJ, Cohen DA, Kaplan AM, Straley SC. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect Immun* 2004; **72** (8):4589-602.
- Klaasen HL, Van der Heijden PJ, Stok W, *et al.* Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice. *Infect Immun* 1993; **61** (1):303-6.
- Knapp T, Hare E, Feng L, Zlokarnik G, Negulescu P. Detection of beta-lactamase reporter gene expression by flow cytometry. *Cytometry A* 2003; **51** (2):68-78.
- Koberle M, Klein-Gunther A, Schutz M, *et al.* *Yersinia enterocolitica* targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model. *PLoS Pathog* 2009; **5** (8):e1000551.
- Kostakioti M, Newman CL, Thanassi DG, Stathopoulos C. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J Bacteriol* 2005; **187** (13):4306-14.
- Koster M, Bitter W, de CH, *et al.* The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* 1997; **26** (4):789-97.
- Kouzuma A, Endoh T, Omori T, *et al.* Transcription factors CysB and SfnR constitute the hierarchical regulatory system for the sulfate starvation response in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 2008; **190** (13):4521-31.
- Krishnamoorthy S, Honn KV. Inflammation and disease progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006; **25** (3):481-91.
- Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, *et al.* Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 1998; **280** (5363):602-5.
- Kuhn M, Goebel W. Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Genet Eng (N Y)* 1995; **17**:31-51.
- Kupferberg LL, Higuchi K. Role of calcium ions in the stimulation of growth of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *J Bacteriol* 1958; **76** (1):120-1.
- Lahteenmaki K, Kukkonen M, Korhonen TK. The Pla surface protease/adhesin of *Yersinia pestis* mediates bacterial invasion into human endothelial cells. *FEBS Lett* 2001; **504** (1-2):69-72.
- Langhorst MF, Genisyurek S, Stuermer CA. Accumulation of FIAsh/Lumio Green in active mitochondria can be reversed by beta-mercaptoethanol for specific staining of tetracycline-tagged proteins. *Histochem Cell Biol* 2006; **125** (6):743-7.
- Lawrenz MB, Lenz JD, Miller VL. A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infect Immun* 2009; **77** (1):317-26.
- Lee LA, Gerber AR, Lonsway DR, *et al.* *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *N Engl J Med* 1990; **322** (14):984-7.

- Lee VT, Anderson DM, Schneewind O. Targeting of Yersinia Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol Microbiol* 1998; **28** (3):593-601.
- Lee VT, Mazmanian SK, Schneewind O. A program of Yersinia enterocolitica type III secretion reactions is activated by specific signals. *J Bacteriol* 2001; **183** (17):4970-8.
- Lee VT, Schneewind O. Type III machines of pathogenic yersiniae secrete virulence factors into the extracellular milieu. *Mol Microbiol* 1999; **31** (6):1619-29.
- Lee VT, Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev* 2001; **15** (14):1725-52.
- Lee VT, Tam C, Schneewind O. LcrV, a substrate for Yersinia enterocolitica type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J Biol Chem* 2000; **275** (47):36869-75.
- Lesic B, Foulon J, Carniel E. Comparison of the effects of deferiprone versus deferoxamine on growth and virulence of Yersinia enterocolitica. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46** (6):1741-5.
- Letzelter M, Sorg I, Mota LJ, *et al.* The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J* 2006; **25** (13):3223-33.
- Leung KY, Reisner BS, Straley SC. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of Yersinia pestis in mice. *Infect Immun* 1990; **58** (10):3262-71.
- Leung KY, Straley SC. The yopM gene of Yersinia pestis encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J Bacteriol* 1989; **171** (9):4623-32.
- Li J, Wolf SG, Elbaum M, Tzfira T. Exploring cargo transport mechanics in the type IV secretion systems. *Trends Microbiol* 2005; **13** (7):295-8.
- Lippolis JD. Immunological signaling networks: integrating the body's immune response. *J Anim Sci* 2008; **86** (14 Suppl):E53-E63.
- Lisenbee CS, Karnik SK, Trelease RN. Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic* 2003; **4** (7):491-501.
- Liu H, Coulthurst SJ, Pritchard L, *et al.* Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen Pectobacterium atrosepticum. *PLoS Pathog* 2008; **4** (6):e1000093.
- Lomovskaya O, Zgurskaya HI, Totrov M, Watkins WJ. Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria. *Nat Rev Drug Discov* 2007; **6** (1):56-65.
- Lukaszewski RA, Kenny DJ, Taylor R, *et al.* Pathogenesis of Yersinia pestis infection in BALB/c mice: effects on host macrophages and neutrophils. *Infect Immun* 2005; **73** (11):7142-50.

- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 1999; **223** (1):77-92.
- Ma AT, McAuley S, Pukatzki S, Mekalanos JJ. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* 2009; **5** (3):234-43.
- Mahamoud A, Chevalier J, Ibert-Franco S, Kern WV, Pages JM. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59** (6):1223-9.
- Marenne MN, Journet L, Mota LJ, Cornelis GR. Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb Pathog* 2003; **35** (6):243-58.
- Marketon MM, DePaolo RW, DeBord KL, Jabri B, Schneewind O. Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* 2005; **309** (5741):1739-41.
- Marra A, Isberg RR. Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect Immun* 1997; **65** (8):3412-21.
- Martins A, Spengler G, Rodrigues L, *et al.* pH Modulation of efflux pump activity of multi-drug resistant *Escherichia coli*: protection during its passage and eventual colonization of the colon. *PLoS One* 2009; **4** (8):e6656.
- McDonald C, Vacratsis PO, Bliska JB, Dixon JE. The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* 2003; **278** (20):18514-23.
- Mejia E, Bliska JB, Viboud GI. *Yersinia* controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity. *PLoS Pathog* 2008; **4** (1):e3.
- Menard R, Dehio C, Sansonetti PJ. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol* 1996; **4** (6):220-6.
- Menard R, Sansonetti P, Parsot C. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J* 1994; **13** (22):5293-302.
- Michaelson D, Silletti J, Murphy G, *et al.* Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* 2001; **152** (1):111-26.
- Michiels T, Cornelis GR. Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *J Bacteriol* 1991; **173** (5):1677-85.
- Michiels T, Wattiau P, Bresseur R, Ruyschaert JM, Cornelis G. Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. *Infect Immun* 1990; **58** (9):2840-9.
- Miller VL, Finlay BB, Falkow S. Factors essential for the penetration of mammalian cells by *Yersinia*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1988; **138**:15-39.

- Mills SD, Boland A, Sory MP, *et al.* *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94** (23):12638-43.
- Monack DM, Meccas J, Ghori N, Falkow S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94** (19):10385-90.
- Morita-Ishihara T, Ogawa M, Sagara H, *et al.* Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem* 2006; **281** (1):599-607.
- Mota LJ, Cornelis GR. The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* 2005; **37** (4):234-49.
- Mueller CA, Broz P, Muller SA, *et al.* The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* 2005; **310** (5748):674-6.
- Mukherjee S, Keitany G, Li Y, *et al.* *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 2006; **312** (5777):1211-4.
- Mulder B, Michiels T, Simonet M, Sory MP, Cornelis G. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun* 1989; **57** (8):2534-41.
- Muller M. Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 2005; **156** (2):131-6.
- Neyt C, Cornelis GR. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* 1999; **33** (5):971-81.
- Nguyen L, Paulsen IT, Tchiew J, Hueck CJ, Saier MH, Jr. Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000; **2** (2):125-44.
- Nishi J, Sheikh J, Mizuguchi K, *et al.* The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. *J Biol Chem* 2003; **278** (46):45680-9.
- Niswender KD, Blackman SM, Rohde L, Magnuson MA, Piston DW. Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J Microsc* 1995; **180** (Pt 2):109-16.
- O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; **7** (7):688-93.
- Oellerich MF, Jacobi CA, Freund S, *et al.* *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect Immun* 2007; **75** (8):3802-11.
- Orth K, Palmer LE, Bao ZQ, *et al.* Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* 1999; **285** (5435):1920-3.

- Pages JM, Masi M, Barbe J. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med* 2005; **11** (8):382-9.
- Pai CH, Mors V. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1978; **19** (3):908-11.
- Palmer LE, Hobbie S, Galan JE, Bliska JB. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* 1998; **27** (5):953-65.
- Papanikou E, Karamanou S, Economou A. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* 2007; **5** (11):839-51.
- Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, Kain SR, Piston DW. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 1997; **73** (5):2782-90.
- Pawel-Rammigen U, Telepnev MV, Schmidt G, *et al.* GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* 2000; **36** (3):737-48.
- Pepe JC, Miller VL. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90** (14):6473-7.
- Perry RD, Brubaker RR. Accumulation of iron by yersiniae. *J Bacteriol* 1979; **137** (3):1290-8.
- Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 1997; **10** (1):35-66.
- Persson C, Carballeira N, Wolf-Watz H, Fallman M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* 1997; **16** (9):2307-18.
- Persson C, Nordfelth R, Andersson K, *et al.* Localization of the *Yersinia* PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. *Mol Microbiol* 1999; **33** (4):828-38.
- Persson C, Nordfelth R, Holmstrom A, *et al.* Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. *Mol Microbiol* 1995; **18** (1):135-50.
- Pettersson J, Holmstrom A, Hill J, *et al.* The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* 1999; **32** (5):961-76.
- Pettersson J, Nordfelth R, Dubinina E, *et al.* Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* 1996; **273** (5279):1231-3.
- Pi M, Spurney RF, Tu Q, Hinson T, Quarles LD. Calcium-sensing receptor activation of rho involves filamin and rho-guanine nucleotide exchange factor. *Endocrinology* 2002; **143** (10):3830-8.

- Plano GV, Straley SC. Multiple effects of IcrD mutations in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 1993; **175** (11):3536-45.
- Plano GV, Straley SC. Mutations in *yscC*, *yscD*, and *yscG* prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 1995; **177** (13):3843-54.
- Portnoy DA, Moseley SL, Falkow S. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect Immun* 1981; **31** (2):775-82.
- Prehna G, Ivanov MI, Bliska JB, Stebbins CE. *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* 2006; **126** (5):869-80.
- Price LS, Langeslag M, ten Klooster JP, *et al.* Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *J Biol Chem* 2003; **278** (41):39413-21.
- Pugsley AP. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 1993; **57** (1):50-108.
- Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104** (39):15508-13.
- Pukatzki S, McAuley SB, Miyata ST. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol* 2009; **12** (1):11-7.
- Qureshi SA. Beta-lactamase: an ideal reporter system for monitoring gene expression in live eukaryotic cells. *Biotechniques* 2007; **42** (1):91-6.
- Rabson AR, Hallett AF, Koornhof HJ. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J Infect Dis* 1975; **131** (4):447-51.
- Rahalison L, Ranjalahy M, Duplantier JM, *et al.* Susceptibility to plague of the rodents in Antananarivo, Madagascar. *Adv Exp Med Biol* 2003; **529**:439-42.
- Ramamurthi KS, Schneewind O. Type iii protein secretion in *Yersinia* species. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; **18**:107-33.
- Ramamurthi KS, Schneewind O. Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. *Mol Microbiol* 2003a; **50** (4):1095-102.
- Ramamurthi KS, Schneewind O. *Yersinia yopQ* mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. *Mol Microbiol* 2003b; **50** (4):1189-98.
- Raz E, Zlokarnik G, Tsien RY, Driever W. beta-lactamase as a marker for gene expression in live zebrafish embryos. *Dev Biol* 1998; **203** (2):290-4.
- Renau TE, Leger R, Flamme EM, *et al.* Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. *J Med Chem* 1999; **42** (24):4928-31.

- Richman TJ, Toenjes KA, Morales SE, *et al.* Analysis of cell-cycle specific localization of the Rdi1p RhoGDI and the structural determinants required for Cdc42p membrane localization and clustering at sites of polarized growth. *Curr Genet* 2004; **45** (6):339-49.
- Robins-Browne RM, Prpic JK. Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1985; **47** (3):774-9.
- Roediger WE. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 1980; **21** (9):793-8.
- Rosqvist R, Forsberg A, Rimpilainen M, Bergman T, Wolf-Watz H. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol Microbiol* 1990; **4** (4):657-67.
- Rosqvist R, Forsberg A, Wolf-Watz H. Microinjection of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Biochem Soc Trans* 1991; **19** (4):1131-2.
- Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* 1994; **13** (4):964-72.
- Ruckdeschel K, Harb S, Roggenkamp A, *et al.* *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1998; **187** (7):1069-79.
- Ruckdeschel K, Mannel O, Richter K, *et al.* *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* 2001; **166** (3):1823-31.
- Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Trulzsch K, *et al.* The proteasome pathway destabilizes *Yersinia* outer protein E and represses its antihost cell activities. *J Immunol* 2006; **176** (10):6093-102.
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Lafont V, *et al.* Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect Immun* 1997; **65** (11):4813-21.
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* 1996; **64** (3):724-33.
- Ruiz-Bravo A, Moreno E, Jimenez-Valera M. Intestinal infection of BALB/c mice with *Yersinia enterocolitica* O9 causes major modifications in phenotype and functions of spleen cells. *Microbiology* 2001; **147** (Pt 11):3165-9.
- Russmann H, Gerdemann U, Igwe EI, *et al.* Attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. *Infect Immun* 2003; **71** (6):3463-72.

- Saier MH, Jr. Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* 2006; **214** (2):75-90.
- Salter RD, Watkins SC. Dendritic cell altered states: what role for calcium? *Immunol Rev* 2009; **231** (1):278-88.
- Sandkvist M. Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 2001; **40** (2):271-83.
- Sansonetti PJ, Kopecko DJ, Formal SB. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1982; **35** (3):852-60.
- Sarker MR, Sory MP, Boyd AP, Iriarte M, Cornelis GR. LcrG is required for efficient translocation of *Yersinia* Yop effector proteins into eukaryotic cells. *Infect Immun* 1998; **66** (6):2976-9.
- Sauer FG, Remaut H, Hultgren SJ, Waksman G. Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1694** (1-3):259-67.
- Schesser K, Dukuzumuremyi JM, Cilio C, *et al.* The *Salmonella* YopJ-homologue AvrA does not possess YopJ-like activity. *Microb Pathog* 2000; **28** (2):59-70.
- Schesser K, Frithz-Lindsten E, Wolf-Watz H. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *J Bacteriol* 1996; **178** (24):7227-33.
- Schesser K, Spiik AK, Dukuzumuremyi JM, *et al.* The *yopJ* locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* 1998; **28** (6):1067-79.
- Schlumberger MC, Muller AJ, Ehrbar K, *et al.* Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102** (35):12548-53.
- Schoppet M, Bubert A, Huppertz HI. Dendritic cell function is perturbed by *Yersinia enterocolitica* infection in vitro. *Clin Exp Immunol* 2000; **122** (3):316-23.
- Schotte P, Denecker G, Van Den BA, *et al.* Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J Biol Chem* 2004; **279** (24):25134-42.
- Schubert S, Autenrieth IB. Conjugation of hydroxyethyl starch to desferrioxamine (DFO) modulates the dual role of DFO in *Yersinia enterocolitica* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; **7** (3):457-62.
- Shao F, Merritt PM, Bao Z, Innes RW, Dixon JE. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 2002; **109** (5):575-88.
- Shrivastava S, Mande SS. Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes. *PLoS One* 2008; **3** (8):e2955.

- Sing A, Roggenkamp A, Geiger AM, Heesemann J. Yersinia enterocolitica evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 2002; **168** (3):1315-21.
- Skrzypek E, Cowan C, Straley SC. Targeting of the Yersinia pestis YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* 1998; **30** (5):1051-65.
- Skrzypek E, Myers-Morales T, Whiteheart SW, Straley SC. Application of a Saccharomyces cerevisiae model to study requirements for trafficking of Yersinia pestis YopM in eucaryotic cells. *Infect Immun* 2003; **71** (2):937-47.
- Skrzypek E, Straley SC. Differential effects of deletions in IcrV on secretion of V antigen, regulation of the low-Ca²⁺ response, and virulence of Yersinia pestis. *J Bacteriol* 1995; **177** (9):2530-42.
- Skurnik M, el TY, Saarinen M, Jalkanen S, Toivanen P. YadA mediates specific binding of enteropathogenic Yersinia enterocolitica to human intestinal submucosa. *Infect Immun* 1994; **62** (4):1252-61.
- Songsunghong W, Higgins MC, Rolan HG, Murphy JL, Meccas J. ROS-inhibitory activity of YopE is required for full virulence of Yersinia in mice. *Cell Microbiol* 2010; **12** (7):988-1001.
- Sory MP, Boland A, Lambermont I, Cornelis GR. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the cyaA gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92** (26):11998-2002.
- Sory MP, Cornelis GR. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from Yersinia enterocolitica into HeLa cells. *Mol Microbiol* 1994; **14** (3):583-94.
- Straley SC. Adhesins in Yersinia pestis. *Trends Microbiol* 1993; **1** (8):285-6.
- Straley SC, Brubaker RR. Cytoplasmic and membrane proteins of yersiniae cultivated under conditions simulating mammalian intracellular environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78** (2):1224-8.
- Straley SC, Skrzypek E, Plano GV, Bliska JB. Yops of Yersinia spp. pathogenic for humans. *Infect Immun* 1993; **61** (8):3105-10.
- Strobel E, Heesemann J, Mayer G, *et al.* Bacteriological and serological findings in a further case of transfusion-mediated Yersinia enterocolitica sepsis. *J Clin Microbiol* 2000; **38** (7):2788-90.
- Stroffekova K, Proenza C, Beam KG. The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins. *Pflugers Arch* 2001; **442** (6):859-66.
- Sun P, Tropea JE, Austin BP, Cherry S, Waugh DS. Structural characterization of the Yersinia pestis type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. *J Mol Biol* 2008; **377** (3):819-30.

- Sun YH, Rolan HG, Tsolis RM. Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Biol Chem* 2007; **282** (47):33897-901.
- Sykes RB, Matthews M. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; **2** (2):115-57.
- Taguchi Y, Shi ZD, Ruddy B, *et al.* Specific biarsenical labeling of cell surface proteins allows fluorescent- and biotin-tagging of amyloid precursor protein and prion proteins. *Mol Biol Cell* 2009; **20** (1):233-44.
- Tampakaki AP, Fadouloglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ, Kokkinidis M. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* 2004; **6** (9):805-16.
- Tardy F, Homble F, Neyt C, *et al.* *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J* 1999; **18** (23):6793-9.
- Tauxe RV, Vandepitte J, Wauters G, *et al.* *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* 1987; **1** (8542):1129-32.
- Thanassi DG, Cheng LW, Nikaido H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1997; **179** (8):2512-8.
- Thanassi DG, Hultgren SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12** (4):420-30.
- Thanassi DG, Saulino ET, Hultgren SJ. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr Opin Microbiol* 1998; **1** (2):223-31.
- Thanassi DG, Stathopoulos C, Karkal A, Li H. Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review). *Mol Membr Biol* 2005; **22** (1-2):63-72.
- Trasak C, Zenner G, Vogel A, *et al.* *Yersinia* protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process. *J Biol Chem* 2007; **282** (4):2268-77.
- Trosky JE, Liverman AD, Orth K. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* 2008; **10** (3):557-65.
- Trulzsch K, Oellerich MF, Heesemann J. Invasion and dissemination of *Yersinia enterocolitica* in the mouse infection model. *Adv Exp Med Biol* 2007; **603**:279-85.
- Trulzsch K, Roggenkamp A, Aepfelbacher M, *et al.* Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int J Med Microbiol* 2003; **293** (2-3):167-77.
- Trulzsch K, Sporleder T, Igwe EI, Russmann H, Heesemann J. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* 2004; **72** (9):5227-34.
- Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**:509-44.
- Uhlen P, Laestadius A, Jahnukainen T, *et al.* Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells. *Nature* 2000; **405** (6787):694-7.

- van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk L. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)* 1971; **69** (3):405-11.
- VanEngelenburg SB, Palmer AE. Fluorescent biosensors of protein function. *Curr Opin Chem Biol* 2008; **12** (1):60-5.
- Viboud GI, Bliska JB. YERSINIA OUTER PROTEINS: Role in Modulation of Host Cell Signaling Responses and Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2005; **59**:69-89.
- Viboud GI, Mejia E, Bliska JB. Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Cell Microbiol* 2006b; **8** (9):1504-15.
- Viboud GI, Mejia E, Bliska JB. Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Cell Microbiol* 2006a; **8** (9):1504-15.
- Vig M, Kinet JP. Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol* 2009; **10** (1):21-7.
- Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, *et al.* Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One* 2007; **2** (4):e365.
- Vogel U, Autenrieth IB, Berner R, Heesemann J. Role of plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* in humoral immunity against secondary *Y. enterocolitica* infection in mice. *Microb Pathog* 1993; **15** (1):23-36.
- Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**:19-49.
- Watarai M, Tobe T, Yoshikawa M, Sasakawa C. Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness. *EMBO J* 1995; **14** (11):2461-70.
- Wattiau P, Bernier B, Deslee P, Michiels T, Cornelis GR. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91** (22):10493-7.
- Wattiau P, Cornelis GR. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ohe secretion of YopE. *Mol Microbiol* 1993; **8** (1):123-31.
- Wauters G, Kandolo K, Janssens M. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* 1987; **9**:14-21.
- Wiedemann B, Kliebe C, Kresken M. The epidemiology of beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1989; **24 Suppl B**:1-22.
- Wiedig CA, Kramer U, Garbom S, Wolf-Watz H, Autenrieth IB. Induction of CD8+ T cell responses by *Yersinia* vaccine carrier strains. *Vaccine* 2005; **23** (42):4984-98.
- Wiley DJ, Nordfeldth R, Rosenzweig J, *et al.* The Ser/Thr kinase activity of the *Yersinia* protein kinase A (YpkA) is necessary for full virulence in the mouse, mollifying

- phagocytes, and disrupting the eukaryotic cytoskeleton. *Microb Pathog* 2006; **40** (5):234-43.
- Wiley DJ, Rosqvist R, Schesser K. Induction of the *Yersinia* type 3 secretion system as an all-or-none phenomenon. *J Mol Biol* 2007; **373** (1):27-37.
- Williams PH. Novel iron uptake system specified by CoIV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1979; **26** (3):925-32.
- Winans SC, Burns DL, Christie PJ. Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol* 1996; **4** (2):64-8.
- Woestyn S, Allaoui A, Wattiau P, Cornelis GR. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol* 1994; **176** (6):1561-9.
- Woestyn S, Sory MP, Boland A, Lequenne O, Cornelis GR. The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol* 1996; **20** (6):1261-71.
- Wong KW, Isberg RR. *Yersinia pseudotuberculosis* spatially controls activation and misregulation of host cell Rac1. *PLoS Pathog* 2005; **1** (2):e16.
- Wu HY, Chung PC, Shih HW, Wen SR, Lai EM. Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 2008; **190** (8):2841-50.
- Yersin A. [Bubonic plague in Hong Kong. 1894]. *Rev Med Suisse Romande* 1994; **114** (5):393-5.
- Yip CK, Kimbrough TG, Felise HB, *et al.* Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* 2005; **435** (7042):702-7.
- Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP, Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* 1998; **20** (2):123-8.
- Zhang Y, Ting AT, Marcu KB, Bliska JB. Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with *Yersinia*. *J Immunol* 2005; **174** (12):7939-49.
- Zhang ZY. Chemical and mechanistic approaches to the study of protein tyrosine phosphatases. *Acc Chem Res* 2003; **36** (6):385-92.
- Zhou H, Monack DM, Kayagaki N, *et al.* *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. *J Exp Med* 2005; **202** (10):1327-32.
- Zlokarnik G. Fusions to beta-lactamase as a reporter for gene expression in live mammalian cells. *Methods Enzymol* 2000; **326**:221-44.
- Zlokarnik G, Negulescu PA, Knapp TE, *et al.* Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* 1998; **279** (5347):84-8.

Zumbihl R, Aepfelbacher M, Andor A, *et al.* The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* 1999; **274** (41):29289-93.

H. DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann für die Möglichkeit diese Arbeit am Lehrstuhl für Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Institutes durchführen zu können, sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

Meinem Betreuer Dr. Hicham Bouabe für das große Interesse am Gelingen dieser Arbeit. Ohne die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei etlichen Experimenten, seinen laufenden Anregungen, seiner ständigen Unterstützung und seiner unendlichen Geduld wäre die Dissertation nicht in dieser Form möglich gewesen.

Yunying Liu, die immer hilfsbereit war und mir vorallem bei den Mausversuchen sehr geholfen hat.

Allen Mitarbeitern des MvPIs, die durch Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit zum guten Arbeitsklima beigetragen haben. Hervorheben möchte ich besonders Bettina Sedelmaier-Erlenfeld, Janja Trcek und Julia Batzilla.

Anette Schulz und Katja Vlasova für das „Leihen“ von Mäusen und Antikörpern.

Den Virologen vom zweiten Stock, insbesondere Dietlind Rose für die angenehmen Kaffeepausen, Grillabende und Ausflüge.

Meinen Freunden, die mir immer mit viel Verständnis zur Seite standen. Ein besonderes Dankeschön an Marion und Renate, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und für mein seelisches Wohl sorgten!

Meinen Eltern, für ihre Zuversicht, ihren unerschütterlichen Glauben in mich und für die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit.

Meinem Bruder und seiner Frau, sowie meiner Tante für die stetige liebevolle Unterstützung.

Georg, der mit mir alle Höhen und Tiefen einer Doktor-Arbeit durchlebt hat und mich den ganzen Weg als „Mitleidender“ begleitet hat.