

**Untersuchungen zur Interaktion und Modulation
von *Yersinia enterocolitica* mit neutrophilen Granulozyten in Suspension
und im dreidimensionalen Kollagengel**



DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

**der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von
Beate Czech

2011

Dissertation eingereicht am: 30.11.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung

2. Gutachter: Prof. Dr. Anton Hartmann

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde.

München, den

Beate Czech

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind unter folgendem Titel veröffentlicht:

Freund, S., Czech, B., Trulzsch, K., Ackermann, N., and Heesemann, J. (2008) Unusual, virulence plasmid-dependent growth behavior of *Yersinia enterocolitica* in three-dimensional collagen gels. *J Bacteriol* 190: 4111-4120.

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Yersinia</i>	1
1.2	Verbreitung und Klinik von <i>Y. enterocolitica</i>	2
1.3	Virulenz und Pathogenese von <i>Y. enterocolitica</i>	2
1.3.1	Enterotoxin Y-ST	3
1.3.2	Yersiniabactin (HPI)	4
1.3.3	Adhäsine.....	4
1.3.4	Typ III Sekretionssystem	9
1.3.5	Yops	10
1.4	Angeborene Immunität und ihre Rolle in der Erkennung und Beseitigung bakterieller Infektionen	24
1.4.1	TLRs.....	24
1.4.2	Neutrophile.....	26
1.4.3	Generierung reaktiver Sauerstoffspezies.....	30
1.5	Ziel der Arbeit	36
2	Material und Methoden	37
2.1	Bakterienstämme und Plasmide.....	37
2.1.1	<i>E. coli</i> Stämme	37
2.1.2	<i>Y. enterocolitica</i> Stämme	37
2.1.3	Plasmide	39
2.2	Oligonukleotide	41
2.3	Nährmedien	41
2.4	Antibiotika.....	42
2.5	Antikörper.....	42
2.6	Enzyme, Molekulargewicht- und DNS-Längenstandards.....	44
2.7	Inhibitoren	45
2.8	Molekularbiologische Kits	45
2.9	Zellkulturen	46
2.9.1	Primäre Zellen und Zelllinien	46
2.9.2	Zellkulturmedien und Zusätze.....	46
2.10	Puffer und Lösungen.....	47
2.10.1	Puffer und Lösungen für molekularbiologische und genetische Methoden.....	47
2.10.2	Puffer und Lösungen für biochemische und analytische Methoden	48

2.10.3	Puffer und Lösungen für zellbiologische und immunologische Methoden	53
2.10.4	Puffer und Lösungen für Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Yersinien mit eukaryotischen Zellen.....	53
2.11	Geräte	53
2.12	Chemikalien und Biochemikalien.....	54
2.13	Mikrobiologische Methoden	56
2.13.1	Kultivierungsverfahren.....	56
2.13.2	Stammhaltung.....	56
2.14	Molekularbiologische und genetische Methoden	56
2.14.1	Plasmidisolierung	56
2.14.2	Gentechnologische Manipulation von DNS.....	56
2.14.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNS	56
2.14.4	DNS-Extraktion aus dem Agarosegel	57
2.14.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	57
2.14.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	57
2.14.7	Kompetente Bakterien und Elektroporation.....	59
2.14.8	DNA-Sequenzanalyse	60
2.14.9	Konstruktion des Plasmids pYopT und des Stammes WA(pT3SS, pYopT)	60
2.15	Biochemische und analytische Methoden.....	60
2.15.1	Isolierung sezernierter <i>Y. enterocolitica</i> Proteine aus dem Kulturüberstand	60
2.15.2	<i>yadA</i> Expression.....	61
2.15.3	<i>inv</i> Expression	61
2.15.4	Herstellung von Zelllysaten	61
2.15.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	61
2.15.6	SDS-PAGE.....	62
2.15.7	2-Dimensionale Gelelektrophorese	62
2.15.8	Färbemethoden	64
2.15.9	Westernblot/Immunoblot	65
2.16	Biophysikalische Methoden.....	66
2.16.1	MALDI-TOF	66
2.17	Methoden zum Arbeiten mit primären Zellen und Zelllinien.....	66
2.17.1	Kultivierung von Zelllinien.....	66
2.17.2	Ausdifferenzierung von HL60 Zellen zu dHL60 Zellen.....	67
2.17.3	Lagerung von Zellen	67

2.17.4	Auftauen von Zellen.....	67
2.17.5	Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer	67
2.18	Zellbiologische und immunologische Methoden.....	68
2.18.1	Gewinnung humaner PMNs aus venösem Blut.....	68
2.18.2	Gewinnung muriner Phagozyten aus unterschiedlichen Kompartimenten der Maus	68
2.18.3	Immunfluoreszenzfärbung	69
2.18.4	Durchflusszytometrische Analyse.....	71
2.19	Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Yersinien mit eukaryotischen Zellen	72
2.19.1	Kultivierung von <i>Y. enterocolitica</i> für <i>in vitro</i> Infektionsversuche	72
2.19.2	Behandlung der Phagozyten für Infektionsversuche.....	72
2.19.3	Beobachtung von Bakterien-Phagozyten Interaktionen im 3D-Kollagengel.....	74
2.19.4	Nachweis der Produktion reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) durch PMNs.....	75
2.19.5	Integrin Blockierung von humanen PMNs.....	75
2.19.6	Inhibition von Signalkaskaden bei humanen PMNs	76
2.20	Tierversuche.....	77
2.20.1	Verwendete Mausstämme	77
2.20.2	Mauspassage von <i>Y. enterocolitica</i> Stämmen	77
2.21	Statistische Auswertung.....	78
3	Ergebnisse	79
3.1	Einfluss von <i>Y. enterocolitica</i> auf die ROS-Produktion von PMNs.....	79
3.1.1	Farbstoffe zur Detektion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS).....	79
3.1.2	Verwendete PMNs	80
3.1.3	Verwendete <i>Y. enterocolitica</i> Stämme	82
3.1.4	Kinetik der ROS Produktion von PMNs infiziert mit <i>Y. enterocolitica</i>	84
3.1.5	Mikroskopische Evaluierung der ROS-Detektion mittels des APF Farbstoffes ..	88
3.1.6	Einfluss der <i>Y. enterocolitica</i> Yops auf die ROS-Produktion von PMNs.....	89
3.1.7	Einfluss der <i>Y. enterocolitica</i> Adhäsine auf die ROS-Produktion von PMNs...	96
3.1.8	Einfluss der <i>Y. enterocolitica</i> Yop-Proteine auf die NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox.....	100
3.1.9	Einfluss von YopP auf die Inhibition der ROS-Produktion von PMNs nach <i>Y. enterocolitica</i> Infektion	104

3.1.10	Signalkaskaden und Rezeptoren beteiligt an der Aktivierung der NADPH-Oxidase in PMNs nach Interaktion mit <i>Y. enterocolitica</i>	106
3.2	Etablierung eines 3D-Kollagengel-Modells zur Analyse der Yersinia-Phagozyten-Interaktion	115
3.2.1	Wachstumsverhalten von <i>Y. enterocolitica</i> im 3D-Kollagengel.....	115
3.2.2	Verhalten der <i>Y. enterocolitica</i> Stämme im 3D-Kollagengel	116
3.2.3	Versuchsaufbau für 3D-Kollagengelstudien	119
3.2.4	Migration von Phagozyten und deren Interaktion mit <i>Y. enterocolitica</i> Stämmen im 3D-Kollagengel.....	121
3.2.5	Mikroskopische Bestimmung der ROS-Produktion von humanen PMNs nach Interaktion mit <i>Y. enterocolitica</i> Stämmen im 3D-Kollagengel-Modell.....	127
4	Diskussion	131
4.1	Evaluierung der Agenzien zum Nachweis der ROS-Produktion.....	132
4.2	Einfluss der Yop-Effektoren auf die ROS-Produktion.....	134
4.3	Rezeptoren und Signalkaskaden, die zum „ <i>priming</i> “ und zur Aktivierung der ROS-Produktion in Neutrophilen führen	139
4.4	Einfluss der Yops auf die NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox.....	143
4.5	Das 3D-Kollagengelmodell zur Beobachtung von Yersinien-Phagozyten-Interaktionen.....	146
5	Zusammenfassung.....	149
6	Literaturverzeichnis.....	151
7	Danksagung.....	188

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APF	<i>p</i> -Aminophenyl-3'-Fluoreszein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BMDM	„bone marrow derived macrophages“
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CGD	„chronic granulomatous disease“
CLSM	„confocal laser scanning microscopy“
d	„day“
Da	Dalton
D-MEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DTT	Dithiothreitol
ECL-Lösung	„enhanced chemiluminescence“-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri
etc.	Et cetera
FCS	„fetal calf serum“
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
g	Gramm
h	Stunde
hB-PMN	humane Blut-PMNs
H ₂ O _{dest.}	einfach destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest.}	doppelt destilliertes Wasser
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (mol/l)
m	milli (10 ⁻³)
MFI	„mean fluorescence intensity“
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	„multiplicity of infection“
MW	Molekulargewicht

mBM-PMN	murine Knochenmarks-PMNs
μ	mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
mPEPN	murine Proteosepeton-rekrutierte PMN
n	nano (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PMN	polymorphonukleare Neutrophile
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPL	Proteosepeptonlösung
PRR	„ <i>pattern-recognition receptor</i> “
PVDF	Polyvinylidendifluoride
RFP	„ <i>red fluorescent protein</i> “
ROS	„ <i>reactive oxygen species</i> “
rpm	„ <i>rounds per minute</i> “
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
T _M	Schmelztemperatur
U	Unit (Enzymeinheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Über Nacht
V	Volt
(w/v)	Gewichtsanteil („ <i>weight per volum</i> “)
(w/w)	Gewichtsprozent („ <i>weight per weight</i> “)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* gehört zu der Familie der *Enterobacteriaceae* und zur Klasse der γ -*Proteobacteria*. Sie wurde zu Ehren des Schweizer Arztes Alexandre Émile Jean Yersin benannt, der *Y. pestis* 1894 das erste Mal isolierte und die Rolle der Ratten und Rattenflöhe bei der Übertragung der Pest entdeckte. Yersinien sind Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die in einem Temperaturbereich von 4 – 42°C wachsen. Jedoch liegt ihr Temperaturoptimum zwischen 26 und 28°C. Innerhalb der Gattung *Yersinia* wurden 16 Arten beschrieben, 3 davon sind human pathogen: *Y. pestis* als Erreger der Pest und zwei enteropathogene Yersinien, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. (Garrity *et al.*, 2004; Murros-Konttiainen *et al.*, 2011). *Y. enterocolitica* ist peritrich begeißelt und bei 25°C beweglich, bei 37°C ist das Bakterium, wie *Y. pseudotuberculosis* nicht begeißelt und unbeweglich (Bottone *et al.*, 1977) Im Gegensatz dazu ist *Y. pestis* bei 37°C beweglich. Obwohl *Y. pestis* aus *Y. pseudotuberculosis* entstand, variieren diese zwei Arten in ihrer ökologischen Nische und ihrem epidemiologischen Verlauf (Achtman *et al.*, 1999). *Y. pestis* ist ein durch Blut übertragbarer Krankheitserreger, der in der Lage ist Insekten (vor allem den Rattenfloh *Xenopsylla cheopsis*) zu kolonisieren und bei Säugetieren (primär Nagetieren) systemische Infektionen hervorzurufen, ganz im Gegenteil zu seinen in der Umwelt weitverbreiteten enteropathogenen Verwandten (Wren, 2003). *Y. pestis* kommt in 3 Biovaren vor: Antiqua, Mediaevalis und Orientalis, die jeweils für eine der drei Pandemien (Justinianische Pest 5. – 7. Jahrhundert, schwarzer Tod 13. – 15. Jahrhundert, moderne Pest 1870 – heute) verantwortlich sind (Devignat, 1951). Beim Menschen können die Beulenpest, eine systemische Infektion mit *Y. pestis* und die hochansteckende, letale Lungenpest entstehen. *Y. enterocolitica* wird, auf biochemischen Methoden basierend, in 6 Biovare eingeteilt (1A, 1B, 2, 3, 4 und 5) (Wauters *et al.*, 1987), die wiederum in drei Gruppen gegliedert werden können. (1) Als nicht obligat pathogen gelten *Y. enterocolitica* der Biogruppe 1A. Diese können als opportunistisch pathogene Erreger in immunsupprimierten Patienten lokale Infektionen verursachen (Bottone, 1999). Hinsichtlich der Mausvirulenz können (2) die Biovar 1B Yersinien (mausletal) von (3) den Biovarietäten 2 bis 5 (nicht mausletal) abgegrenzt werden. Das Biovar 1B stellt eine geographisch eigene Gruppe dar. Diese Bakterien kommen vor allem in Nordamerika vor und werden deswegen als neue Welt Stämme (*Y. enterocolitica* Subspezies *enterocolitica*) bezeichnet. Die Biovare 2 bis 5 werden meist in Europa und Japan isoliert und werden alte Welt Stämme (*Y. enterocolitica*

Subspezies *paleartica*) genannt (Ibrahim *et al.*, 1993). Serologisch kann *Y. enterocolitica* in 60 Serovare (O- und H-Antigene) unterteilt werden, wobei nur 11 Serotypen als pathogen gelten. Die meisten Infektionen weltweit werden von den Serogruppen O:3 (Biovar 4), O:5,27 (Biovar 2 und 3), O:8 (Biovar 1B) und O:9 (Biovar 2 und 3) verursacht. *Y. enterocolitica* Serovar O:8 produziert, wie auch die übrigen Serotypen des Biovar 1B das Siderophor Yersiniabactin. Die Biosynthese von Yersiniabactin und der Transport werden von Genen der HPI („*high pathogenicity island*“) kodiert (Pelludat *et al.*, 1998). Das Vorhandensein der HPI ist strikt mit der Mausvirulenz assoziiert. *Y. pseudotuberculosis* wird in 21 Serotypen eingeteilt (Wren, 2003). O-Antigene können bei *Y. pestis* nicht nachgewiesen werden, da das Bakterium einen inaktiven O-Genkluster enthält. Somit ist eine Unterteilung in verschiedene Serotypen nicht möglich (Skurnik *et al.*, 2000; Wren, 2003).

1.2 Verbreitung und Klinik von *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica kommt in der Natur weitverbreitet, im Gastrointestinaltrakt von Haus- und Nutztieren, sowie Wasservögeln und deren terrestrischen und aquatischen Lebensräumen vor (Hurvel, 1981). Das Hauptreservoir humanpathogener Serotypen sind Wild- und Hausschwein (Tauxe *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1990; Kellog *et al.*, 1995). *Y. enterocolitica* ist primär ein gastrointestinaler Erreger, der nur unter bestimmten Bedingungen (Immunsuppression, Überangebot an Eisen bzw. Behandlung mit Desferrioxamin) extraintestinal disseminieren kann und eine systemische Infektion hervorruft. Gastrointestinale Infektionen manifestieren sich oft als Enteritis, Enterokolitis, akute mesenterische Lymphadenitis und/oder terminale Ileitis. Häufige Symptome sind Fieber und wässriger, in manchen Fällen, blutiger Durchfall. In der Regel verläuft die Infektion milde und heilt ohne medikamentöse Unterstützung aus. Infektionen mit *Y. enterocolitica* vor allem mit den Serotypen O:3 und O:9 können zu postinfektiösen, extraintestinalen immunpathologischen Folgeerkrankungen, wie reaktive Arthritis (assoziiert mit HLA-B-27), Myocarditis, Glomerulonephritis, Erythema nodosum und der Reiter's Krankheit führen (Bottone, 1999).

1.3 Virulenz und Pathogenese von *Y. enterocolitica*

Die Infektion mit *Y. enterocolitica* erfolgt hauptsächlich oral, über die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln und Wasser (Black *et al.*, 1978; Bockemuhl and Wong, 2003). Auch können kontaminierte Bluttransfusionen eine Infektionsquelle darstellen (Stenhouse *et al.*, 1982). In den meisten Fällen gelangen die Bakterien über Speiseröhre und Magen in den Dünndarm. Im terminalen Ileum überwinden sie die Mukosa des Darmepithels und binden an

Mikrovilli des Bürstensaums bzw. an M-Zellen (spezialisierte Zellen des Follikel-assoziierten Epithels der Peyer Plaques). Nachdem sie die M-Zellen passiert haben, gelangen sie in daruntergelegenes Gewebe wo sie sich extrazellulär vermehren. Von dort aus können sich die Bakterien in regionale Lymphknoten und in Organe wie Leber und Milz ausbreiten und Abszesse bilden. (Bottone, 1999). In seltenen Fällen erfolgt eine Sepsis (Bockemuhl und Roggentin, 2004). *Y. enterocolitica* verfügt über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, um im Wirt der angeborenen Immunabwehr zu widerstehen. Zu den chromosomal kodierten Pathogenitätsfaktoren gehören Inv (Invasin), Ail („*attachment and invasion locus*“), Y-ST (*Y. enterocolitica* Enterotoxin), das Myf-Antigen („*mucoïd Yersinia fibrillae*“) und Yersiniabactin. Desweiteren tragen alle *Y. enterocolitica* Biovare außer *Y. enterocolitica* 1A ein 70 kb großes Virulenzplasmid (Portnoy und Martinez, 1985; Bottone, 1999). Auf diesem liegen Gene für die Synthese eines T3SS (Typ III Sekretionssystems), die T3SS Effektorproteine (Yops: „*Yersinia outer proteins*“) und des YadA („*Yersinia adhesin A*“) (Cornelis, 2002).

1.3.1 Enterotoxin Y-ST

Y. enterocolitica produziert ein hitzestabiles Enterotoxin (Y-ST: „*Yersinia stable toxin*“) (Takao *et al.*, 1984; Takao *et al.*, 1985). Das chromosomal kodierte Y-ST wird als 71 AS langes Pre-Protoxin synthetisiert. Die 18 N-terminalen Aminosäuren (AS) entsprechen einer typischen Signalsequenz. Die zentralen 22 AS werden wahrscheinlich nach der Sekretion entfernt und die folgenden 30 C-terminalen AS stellen das reife Toxin dar (Takao *et al.*, 1984; Guzman-Verduzco und Kupersztoch, 1989; Delor *et al.*, 1990). Y-ST hat strukturelle, funktionelle und immunologische Ähnlichkeit mit dem Methanol-löslichen, hitzestabile Enterotoxin (STI) enterotoxischer *E. coli* Stämme (Pai und Mors, 1978; Boyce *et al.*, 1979; Feeley *et al.*, 1979; Inoue *et al.*, 1983). STI und Y-ST ähneln Guanylin, einem endogenen Aktivator der intestinalen Guanylatzyklase (Currie *et al.*, 1992). Y-ST aktiviert die Guanylatzyklase über den Guanylinrezeptor wodurch die intrazelluläre cGMP-Konzentration in Darmepithelzellen erhöht wird (Inoue *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1980; Guarino *et al.*, 1987). Außerdem stimuliert Y-ST die intrazelluläre IP₃ (Inositol-triphosphat) Konzentration. IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren (IP₃R) und mobilisiert intrazelluläres Kalzium in Rattendarmepithelzellen (Saha *et al.*, 2005). In infizierten jungen Kaninchen ist Y-ST als ein wichtiger Faktor verantwortlich für *Y. enterocolitica*-assoziierte Diarrhö (Delor und Cornelis, 1992). Es ist vermutlich ebenso ein Virulenzfaktor bei humanen Infektionen, da frische klinische Isolate generell Y-ST produzieren (Boyce *et al.*, 1979; Amirmozafari and Robertson, 1993). In Bakterienkulturen kann Y-ST bei Temperaturen unter 30°C detektiert

werden (Boyce *et al.*, 1979; Amirmozafari and Robertson, 1993). Y-ST kann auch bei 37°C bei einer hohen Osmolarität und einem basischen pH produziert werden (Mikulskis *et al.*, 1994).

1.3.2 Yersiniabactin (HPI)

Die HPI („*high pathogenicity island*“), ein chromosomaler Gencluster, wurde als erstes in *Yersinia* spp. beschrieben, später in anderen *Enterobacteriaceae* gefunden und mit deren erhöhter Virulenz in Verbindung gebracht (Rakin *et al.*, 1994; Bearden *et al.*, 1997; Carniel *et al.*, 1992; Schubert *et al.*, 1998; Bach *et al.*, 2000; Olsson *et al.*, 2003). Bei *Y. enterocolitica* enthalten nur Bakterien des Maus-letalen Biovars 1B (Serotypen O:8, O:13, O:20, O:21) eine HPI (Pelludat *et al.*, 1998; Rakin *et al.*, 1999). Auf der ca. 44 kb-großen HPI von *Y. enterocolitica* sind die Gene für Biosynthese, Transport und Regulation des Siderophores Yersiniabactin lokalisiert. Die HPI ist chromosomal in das *asn* t-RNS Gen integriert (Haag *et al.*, 1993, Buchrieser *et al.*, 1998) und besteht aus einem Motilitätsmodul, einer 30,5 kb funktionellen Herzregion und einem in verschiedenen *Yersinia* spp. 5 – 13 kb großem, AT-reichen, variablem Bereich (Rakin *et al.*, 1999). Die Kernregion enthält Gene für die Biosynthese (*ipr1 – ipr5* und *ipr9*), die Aufnahme der Siderophore (*irp6 – 8* und *fyuA*) und einen AraC-ähnlichen Transkriptionsaktivator (*ybtA*). Das Integrasegen *intB* ist Teil des Motilitätsmoduls (Schubert *et al.*, 2004). Die Expression der Biosynthese- und Transportgene wird durch Eisen und dem Aporepressor Fur („*ferric uptake regulator*“) reprimiert. Transkriptionell aktiviert werden die Gene durch YbtA, das seine eigene Transkription reprimiert (Fetherston *et al.*, 1996). Yersiniabactin induziert die Eisenaufnahme. Eisen ist essentiell für das bakterielle Wachstum. In einer Umgebung, wie dem menschlichen Körper ist freies Eisen limitiert. Eisen ist meist an Proteine gebunden. Die bakterielle Expression der HPI Gene wird in solchen Umgebungen erhöht (Chauvaux *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2008).

1.3.3 Adhäsine

1.3.3.1 Myf-Antigen

Das Myf-Antigen produziert von *Y. enterocolitica* ist ein Proteinpolymer zusammengesetzt aus 21 kDa-Untereinheiten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen es als fibrilläre Struktur auf der Bakterienoberfläche (Iriarte *et al.*, 1993). Ein 4,4 kb langer, chromosomaler Abschnitt ist beteiligt an der Myf-Produktion. Dieser enthält drei Gene *myfA*, *myfB* und *myfC*, die als Operon organisiert sind. MyfA stellt die kleinste Fimbrienuntereinheit dar. MyfB wirkt als periplasmatisches Chaperon und MyfC ist ein putatives

Außenmembranprotein (Iriarte *et al.*, 1993). MyfA ist PsaA, der Hauptuntereinheit des pH6 Antigens von *Y. pestis*, zu 44 % identisch (Lindler *et al.*, 1990). Obwohl das Myf-Antigen nur bei pathogenen *Y. enterocolitica* Serotypen gefunden wurde (Diaz *et al.*, 1985; Toyos *et al.*, 1986) ist sein Beitrag zu Virulenz nicht geklärt. Bakterienkulturen geben das Myf-Antigen bei 37°C unter sauren Bedingungen (pH6) in das Medium ab (Iriarte *et al.*, 1993).

1.3.3.2 Invasin

Invasin wird von dem chromosomalen *inv* Gen kodiert und ist ein 92 kDa- (*Y. enterocolitica*) bzw. 103 kDa- (*Y. pseudotuberculosis*) Außenmembranprotein, welches für die Bindung an Epithelzellen verantwortlich ist (Miller und Falkow, 1988; Pepe und Miller, 1990; Isberg, 1987). Bei *Y. pestis* ist die Invasinexpression durch ein 708 bp langes Insertionselement im *inv* Gen unterbrochen (Simonet *et al.*, 1996). Die Expression von *inv* ist abhängig von Temperatur, pH, Osmolarität, Nährstoffen, der bakteriellen Wachstumsphase sowie dem Transkriptionsaktivator RovA. Maximale Expressionsraten werden bei 23°C in der späten exponentiellen bzw. frühen stationären Phase erreicht. Ähnliche Mengen an Inv können auch bei einem sauren pH und 37°C gebildet werden. (Pepe und Miller, 1993; Pepe *et al.*, 1994). RovA hebt die H-NS abhängige Blockierung des *inv* Promotors auf und ermöglicht so die *inv* Transkription (Nagel *et al.*, 2001, Ellison *et al.*, 2004, Ellison und Miller, 2006). Die Transkription von RovA hingegen wird durch den negativen Regulator RovM beeinflusst (Revell *et al.*, 2000; Heroven und Dersch, 2006). Inv spielt bei der Darminvasivität eine wichtige Rolle, indem es die Bindung an β_1 -Integrine der M-Zellen und eine effiziente Translokation der Bakterien über die intestinale Mucosa zu den darunter liegenden Peyer Plaques vermittelt (Clark *et al.*, 1998). Inv bindet an unterschiedliche β_1 -Integrinrezeptoren ($\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$) (Isberg und Leong, 1990). Inv von *Y. pseudotuberculosis* wird zur bakteriellen Intimin/Invasin Familie gezählt, die auf der Zelloberfläche von *Y. enterocolitica* und darmpathogenen *Escherichia coli* (Pathotyp EPEC und EHEC) vorkommen (McGraw *et al.*, 1999). Die N-terminalen 503 AS sind hoch konserviert und sind für die Membranverankerung von Bedeutung (Leong *et al.*, 1990). Im extrazellulären, C-terminalen Teil divergieren die AS-Sequenzen der Intimin/Invasin Familie. Die Kristallstruktur der C-terminalen, exponierten Domäne von *Y. pseudotuberculosis* zeigt vier aneinandergereihte Immunglobulin-ähnliche Domänen (D1 – D4) gefolgt von einer C-Typ Lektin-ähnlichen Domäne (D5, CTLD) (Hamburger *et al.*, 1999). CTLD und D4 bilden eine Superdomäne, welche als Adhäsionsmodul fungiert. Die C-terminalen AS-Reste Asp811 und Asp911 sind für die Bindung des Integrinrezeptors verantwortlich (Leong *et al.*, 1995). D2 ist für die

Dimerisierung der Invasine von Bedeutung. Die Dimersierung der Invasinmoleküle führt zu einer effizienteren Aufnahme der Bakterien (Dersch und Isberg, 1999). Die verminderte Aufnahme von *Y. enterocolitica* durch normale nicht phagozytische Zellen wird auf das Fehlen der D2 Domäne zurückgeführt (Dersch und Isberg, 2000).

1.3.3.3 Ail

Ail („*attachment invasion locus*“) ist ein 17 kDa großes, chromosomal kodiertes Protein (Miller und Falkow, 1988; Miller *et al.*, 1990), welches aus acht transmembranen, amphipathischen β -Faltblättern und vier kurzen extrazellulären Schleifen besteht (Miller *et al.*, 2001) und ausschließlich in pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen gefunden wurde (Miller *et al.*, 1989). Das *Y. enterocolitica* Ail vermittelt eine zellspezifische Invasion von *E. coli* HB101 in verschiedene Zelllinien. Für die Zelllinie CHO liegt eine hohe, für die Zelllinien HEp-2 und HEC1B eine niedrige Invasionsrate vor. (Miller und Falkow, 1988). Desweiteren ist Ail neben YadA verantwortlich für die Serumresistenz von *Y. enterocolitica* (Bliska und Falkow, 1992; Pierson und Falkow, 1993; Biedzka-Sarek *et al.*, 2008). Wird Ail nicht durch LPS-Zuckerseitenketten (O-Antigen und Hexasaccharide der äußeren Kernregion) maskiert kann es die Complementregulatoren Faktor H und C4-Bindeprotein binden und die Complementaktivierung auf der bakteriellen Oberfläche verhindern (Biedzka-Sarek *et al.*, 2008; Kirjavainen *et al.*, 2008). Die extrazellulären Schleifen 2 und 3 (EL2 und EL3) sind für die Serumresistenz, jedoch auch für Adhärenz und Invasion verantwortlich (Miller *et al.*, 2001). Eine *in vivo* Relevanz für Ail ist fraglich, da Infektionsversuche im Mausmodell zeigen, dass *ail*-Mutanten nicht attenuiert sind (Pepe *et al.*, 1995; Wachtel und Miller, 1995).

1.3.3.4 YadA

Das Adhäsın YadA gehört zur Familie der trimeren Autotransporter (Linke *et al.*, 2006) und wird im SDS-PAGE von Außenmembranproteinen als 200 – 240-kDa Bande (Trimer) und 41 – 45-kDa Bande (Monomer) dargestellt (Bolin *et al.*, 1982; Gripenberg-Lerche *et al.*, 1995; Mack *et al.*, 1994; Skurnik *et al.*, 1984). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen es als lollipop-ähnliche Struktur, mit 23 nm Länge (Hoiczky *et al.*, 2000). Das *yadA* Gen ist bei *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* auf dem pYV-Plasmid lokalisiert. *Y. pestis* kann YadA aufgrund einer Leserahmenverschiebung, bedingt durch eine Nukleotiddeletion im *yadA* Gen, nicht produzieren (Rosqvist *et al.*, 1988; Skurnik und Wolf-Watz, 1989). Jedoch wurden vor kurzem zwei chromosomal kodierte YadA-ähnliche Adhäsine in *Y. pestis* beschrieben (Forman *et al.*, 2008). Die Transkription von *yadA* ist temperatur- aber nicht Ca^{2+} -abhängig (Bolin *et al.*, 1982; Skurnik, 1985; Surnik *et al.*, 1984) und wird von

Transkriptionsaktivator VirF bei 37 °C induziert (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992; Skurnik und Toivanen 1992). 270 bp vor dem *yadA* Startcodon liegt ein klassischer σ^{70} -Promotor und die Transkription wird Rho-unabhängig beendet (Skurnik und Wolf-Watz, 1989). YadA ist ein Homotrimer bestehend aus drei, 422 – 455 AS langen Polypeptiden, mit einem Molekulargewicht von ca. 41 – 44 kDa, welche jeweils eine Signalsequenz, eine Kopf-, Hals- und Stieldomäne sowie einen Membrananker besitzen (Hoiczkyk *et al.*, 2000). Während der Translokation zur äußeren Membran wird die 25 AS lange Signalsequenz abgespalten (Bolin und Wolf-Watz, 1984). YadA ist ein multifunktionales Protein mit unterschiedlichen Eigenschaften (Roggenkamp *et al.*, 1995; Roggenkamp *et al.*, 1996). Die drei monomeren, C-terminalen Membranankerdomänen tragen mit ca. 70 AS zu jeweils 4 β -Faltblätter bei, die zusammen eine 12-strängige „ β -barrel“ Pore in der äußeren Bakterienmembran bilden (Desvaux *et al.*, 2004). Ein Glycin (AS 389) im Membrananker ist wichtig für den Transport der Kopf-, Hals- und Stieldomäne, sowie deren Oberflächenexposition und für die optimale Trimerstabilität (Grosskinsky *et al.*, 2007). Letztere und die durch den Membrananker verliehene Serumresistenz sind essentiell für die Mausvirulenz von *Y. enterocolitica*. (Schütz *et al.*, 2010; Ackermann *et al.*, 2008). Alle pathogenen Yersinien sind serumresistent, wobei nur *Y. enterocolitica* unabdinglich YadA dazu benötigt (Balligand *et al.*, 1985; Martinez *et al.*, 1983; Martinez *et al.*, 1989; Pai und DeStephano, 1982; Perry und Burbaker, 1983). YadA bindet Faktor H und das C4-Bindeprotein und blockiert dadurch alle drei Wege der Komplementaktivierung in dem es die Anlagerung von C3b (alternativer Weg) und der C3 Konvertase (C4b2a) (klassischer und Lektin Weg) auf der Bakterienoberfläche bzw. die Ausbildung des membranattakierenden Komplexes (C5b - C9) verhindert (China *et al.*, 1993; Flugel *et al.*, 1994; Pilz *et al.*, 1992; Roggenkamp *et al.*, 1996; Biedzka-Sarek *et al.*, 2008; Kirjavainen *et al.*, 2008). Jedoch wurde die Serumresistenz auch der YadA-Stieldomäne zugeschrieben, an die die Bindung von Faktor H gezeigt wurde (Biedzka-Sarek *et al.*, 2008). Die Binderegion für C4bp ist noch nicht bekannt (Kirjavainen *et al.*, 2008). Die Stieldomänen (AS 195 – 219) bestehen, Serotyp-abhängig, aus einer variablen Anzahl (sechs – neun) 15-meren Wiederholungen und interagieren über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen miteinander. Sie bilden eine rechtshändige „coiled-coil“ Struktur aus (Hoiczkyk *et al.*, 2000) und nehmen eine Abstandshalterfunktion zwischen Kopfdomäne und äußerer Membran ein. Die YadA-Stieldomäne ist an die Länge der T3SS-Injektionsnadel adaptiert, welche die T3SS-abhängige Yop-Translokation beeinflusst (Mota *et al.*, 2005). Die Kristallstruktur zeigt, dass sich der globuläre YadA-Kopf aus 3 Monomeren (AS 26 – 194) zusammensetzt. Jedes Monomer besteht aus neun parallelen β -Faltblättern, die eine linkshändige β -Rolle darstellen

(LPBR = „*left-handed parallel β -roll*“). Der Hals hält die Monomere zusammen und könnte für die Stabilität des Trimers verantwortlich sein (Nummelin *et al.*, 2004). Allerdings wird die hohe Thermostabilität der trimeren Ankerstruktur der 12 β -Faltblätter zugeschrieben. Die Kopfdomäne bindet an extrazelluläre Matrixproteine (Kollagen I, II und IV, Fibronectin und Laminin), Neutrophile (El Tahir und Skurnik, 2001; Heise und Dersch, 2006; Leo *et al.*, 2008; Roggenkamp *et al.*, 2003) und ist an der Autoagglutination von Yersinien beteiligt (Tamm *et al.*, 1993). YadA bindet Kollagen mit hoher Affinität über NSVAIGXXS-Motive die in 8 Wiederholungen in den AS 26 – 195 vorkommen (El Tahir und Skurnik, 2001; Tamm *et al.*, 1993, Roggenkamp *et al.*, 1995). Die besondere Stabilität der Bindung wurde durch ihre Resistenz gegenüber Hitze (20 min, 80°C), einem pH 5 – 10 und einer Harnstoffkonzentration < 3 mol/l gezeigt. Jedoch konnte die Sensibilität gegenüber proteolytischen Enzymen beobachtet werden (Emody *et al.*, 1989, Flugel *et al.*, 1994). Welche Strukturen im Kollagen für die YadA-Bindung essentiell sind, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits soll eine konservierte Region in der α_1 -Kette der Kollagene Typ I und Typ II für die Bindung von Bedeutung sein (Schulze-Koops *et al.*, 1992, Schulze-Koops *et al.*, 1995). Andererseits wird berichtet, dass YadA die dreifach-helikale Struktur des Kollagens ohne Sequenzspezifität erkennt (Leo *et al.*, 2008) und die YadA-Bindestellen im fibrillären Kollagen Abschnitte mit einem hohen Hydroxyprolinanteil und wenig geladenen Aminosäuren sind (Leo *et al.*, 2010). Neben Kollagen bindet YadA immobilisiertes, zelluläres und Plasmafibronectin (Schulze-Koops *et al.*, 1993; Terti *et al.*, 1992) sowie Laminin über das Fragment E1 (Tamm *et al.*, 1993). Weitere Eigenschaften der YadA-Kopfdomäne sind zum einen die Bindung an Neutrophile, die bei *Y. enterocolitica* über die N-terminalen AS 29 – 81 vermittelt wird (Roggenkamp *et al.*, 1996; Ruckdeschel *et al.*, 1996) zum anderen die Autoaggregation, welche in der stationären Phase wahrscheinlich durch hydrophobe Wechselwirkungen stattfindet (Balligand *et al.*, 1985; Skurnik, 1984; Tamm *et al.*, 1993; El Tahir *et al.*, 2000). YadA könnte nötig sein, um Bakterien an die Phagozytenoberfläche zu binden, sodass das T3SS Yops injizieren kann (Bliska *et al.*, 1993; Rosqvist *et al.*, 1991). Desweiteren ist YadA für die Zell- und Gewebsadhärenz (Paerregaard *et al.*, 1991; Skurnik *et al.*, 1994) sowie die Internalisierung von Yersinien in Epithelzellen (Bliska *et al.*, 1993; Yang und Isberg, 1993; Bukholm *et al.*, 1990; Heesemann *et al.*, 1987) verantwortlich. Für die Mausvirulenz ist YadA bei *Y. enterocolitica* Stämmen absolut notwendig (Kapperud *et al.*, 1987; Tamm *et al.*, 1993; Pepe *et al.*, 1995, Roggenkamp, 1995), wobei dessen Rolle bei *Y. pseudotuberculosis* (Bolin und Wolf-Watz, 1984; Han und Miller, 1997) unklar ist und YadA produziert in *Y. pestis* sogar ein Anti-Virulenzfaktor darstellt (Rosqvist *et al.*, 1988).

1.3.4 Typ III Sekretionssystem

Das Typ III Sekretionssystem (T3SS) ist ein Proteininjektionssystem, das für die Virulenz vieler Gram-negativer Bakterien von Bedeutung ist (Galán und Collmer, 1999). Das T3SS erlaubt Yersinien, welche an Wirtszellen binden, Effektorproteine ins Cytosol zu injizieren (Cornelis und Wolf-Watz, 1997; Cornelis und Van Gijsegem, 2000). In *Yersinia spp.* befinden sich die Gene, welche für das T3SS kodieren auf dem pYV-Plasmid. Der T3SS-Apparat, auch Injektisom oder Nadelapparat genannt, besteht aus einem Basalkörper, der die innere und äußere Bakterienmembran sowie die dazwischen liegende Peptidoglykanschicht durchspannt. Daran schließt sich eine „Proteinhohnadel“ von ca. 50 – 60 nm Länge an (Cornelis, 2002). Der Basalkörper besteht an der cytosolischen Seite der inneren Membran aus einem intrazellulären, multimeren Ring, aufgebaut aus YscQ, welcher eine Plattform zur Rekrutierung anderer Proteine, zum Beispiel der ATPase YscN (Woestyn *et al.*, 1994), darstellt. YscV (früher LcrD), YscU, YscR, YscT und YscS sind Proteine, die in Kontakt mit der Cytoplasmamembran stehen. Das periplasmatische Lipoprotein YscJ ist vergleichbar mit FliF, einem Protein, das bei *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium den MS-Ring des Flagellums in der inneren Membran, bildet (Cornelis, 2006). Der distale Teil des Basalkörpers ist eine ringförmige Struktur in der äußeren Membran, mit einer 50 Å großen, zentralen Pore und wird durch die Polymerization des Monomers YscC geformt. Das Lipoprotein YscW, welches selbst in der äußeren Membran verankert ist, assistiert beim Einbau des Sekretins YscC (Koster *et al.*, 1997; Burghout *et al.*, 2004). Zu den extrazellulären Komponenten des T3SS-Apparats gehören YscF, YscO, YscP und YscX (Cornelis und Van Gijsegem, 2000). Die Nadel des Injektisoms ist eine gerade, hohle Röhre mit einer Länge von 58 ± 10 nm und einem inneren Durchmesser von ca. 25 Å (Journet *et al.*, 2003). Sie wird durch eine helikale Polymerisation von 100 – 150 Monomeren des Proteins YscF (6 kDa) aufgebaut (Kubori *et al.*, 2000; Hoiczky und Blobel, 2001; Burghout *et al.*, 2004). YscP kontrolliert die Nadellänge (Journet *et al.*, 2003). STEM („*scanning-transmission electron microscopy*“) Analysen zeigten an der Nadelspitze einen Komplex der durch einen der Translokatoren (LcrV) gebildet wird (Mueller *et al.*, 2005). Ein aktives Injektisom, welches Kontakt mit einer Wirtszelle aufgenommen hat, endet mit einer Translokationspore, die in die Plasmamembran der Wirtszelle inseriert wird. (Hakansson *et al.*, 1996; Neyt und Cornelis, 1999; Blocker *et al.*, 1999). Für den Zusammenbau der Translokatorpore werden drei Proteine YopB, YopD und LcrV benötigt. YopB und YopD haben hydrophobe Domänen, wogegen LcrV ein hydrophiles Protein ist. Fünf Proteine YopN und sein Chaperon SycN, YscB, TyeA und LcrG inhibieren die Sekretion auf unterschiedlichen Stufen in dem sie den Kanal verschließen (Forsberg *et al.*,

1991; Day and Plano, 1998; Iriarte und Cornelis, 1998; Skryzpek und Straley, 1993). Die Nadellänge variiert in unterschiedlichen Bakterienarten und manchmal auch in unterschiedlichen Biotypen (Cornelis, 2006). Wahrscheinlich ist die Nadellänge an die Länge des YadA adaptiert (Mota *et al.*, 2005).

Zusätzlich zu dem Plasmid-kodierten T3SS, besitzen *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* Sertotyp 1B zusätzlich ein chromosomal kodiertes T3SS (Chain *et al.*, 2004; Foulter *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass das Ysa T3SS von *Y. enterocolitica* Sertotyp 1B für eine effiziente Kolonisierung des Gastrointestinaltraktes verantwortlich ist. Eine Reihe von Proteinen wurde identifiziert, welche über das Ysa T3SS sekretiert werden, darunter auch YopE und YopP (Matsumoto and Young, 2006; Young, 2007).

1.3.5 Yops

Die Gene der 6 Effektorproteine YopE, YopH, YopM, YopO, YopP und YopT sind auf dem pYV-Plasmid lokalisiert. Nur wenige *Y. pseudotuberculosis* Stämme verfügen über ein funktionelles *yopT* Gen. Diese Effektoren wirken zusammen, um eine extrazelluläre Infektion zu etablieren und nehmen dabei Einfluss auf das Aktinzytoskelett und verschiedene Signaltransduktionswege der Wirtszellen (Navarro *et al.*, 2005; Viboud and Bliska, 2005). Die Transkription der *yop* Gene erfolgt bei 37°C, geregelt durch den Transkriptionsaktivator VirF. Yop und Ysc Proteine werden zum low calcium response stimulon“ (LCRS) zusammengefasst, da ihre Transkription in Anwesenheit von Ca²⁺ reprimiert ist (Straley *et al.*, 1993; Wattiau *et al.*, 1994).

Yops werden an ihrem Aminoterminus vom Ysc-Injektisom erkannt, jedoch wird keine klassische Signalsequenz während der Sekretion abgespalten (Michiels *et al.*, 1990). Die Sekretionsregulation wird hinsichtlich kotranslationaler oder posttranslationaler Sekretion kontrovers diskutiert (Anderson und Schneewind, 1997; Lloyd *et al.*, 2001). Der Sekretionskanal des T3SS ist zu eng um Proteine gefaltet sekretieren zu können. Somit müssen Proteine kotranslational oder posttranslational transloziert werden (Feldman *et al.*, 2002; Sorg *et al.*, 2005; Quenee und Schneewind, 2007). Die meisten Yops (YopH, YopE, YopT und YopO) benötigen ein Chaperon, um über das T3SS sekretiert zu werden, im Gegensatz zu YopM und YopP (Wattiau und Cornelis, 1993; Wattiau *et al.*, 1994; Viboud und Bliska, 2005; Letzelter *et al.*, 2006). Die Chaperone sind Yop spezifisch und verbleiben nach Sekretion des Yop im Zytosol. Chaperone könnten für eine Hierarchie in der Yop-Sekretion verantwortlich sein (Boyd *et al.*, 2000). Yersinien sekretieren keine Yops, wenn sie in zellfreiem Zellkulturmedium inkubiert werden, für die Sekretion ist immer der Kontakt mit Wirtszellen nötig (Rosqvist *et al.*, 1994; Mota *et al.*, 2005). Ist dieser hergestellt, wurde

zeigt, dass Yops in eine Vielzahl von Zellen injiziert werden können (Boyd *et al.*, 2000). Die Anzahl intrazellulärer Yops wird über einen „*feedback*“ Mechanismus kontrolliert (Cornelis *et al.*, 1987). Sobald die Yops das Bakterium verlassen haben, beginnt die Yop Synthese (Pettersson *et al.*, 1996).

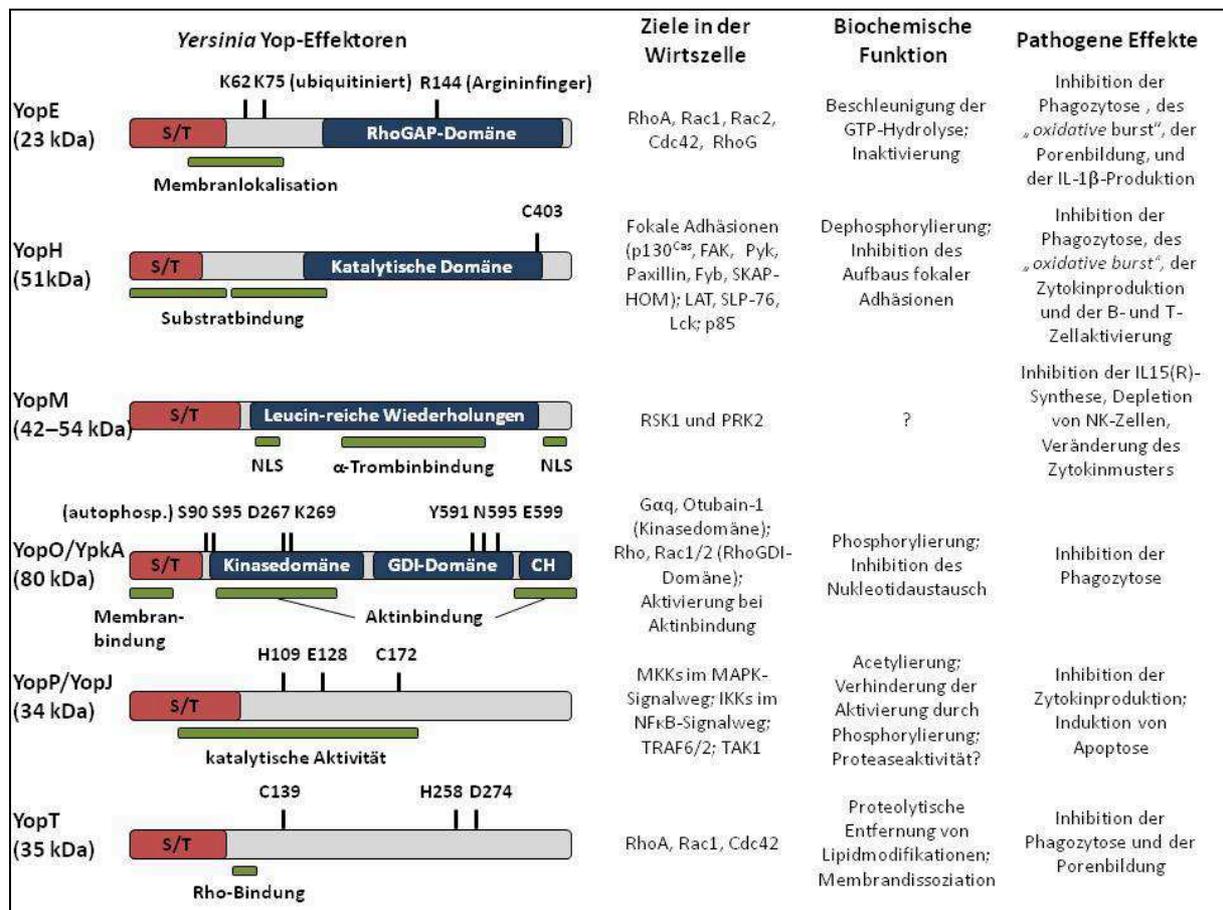


Abb. 1.1 Yersinia Yop-Effektoren: Zusammenfassung der Domänenorganisation, der biochemischen Funktionen und ihrer Rolle in der Pathogenese. Links schematische Darstellung der Yops. Rot: Sekretions- bzw. Translokationsregion. Blau: Effektor-domänen. Grün: funktionale Regionen. Katalytische Aminosäuren sind hervorgehoben. **YopE**: Lysin-63 und -75 können ubiquitiniert werden, Arginin-144 ist essentiell für die GAP- („GTPase-activating protein“) Aktivität. **YopH**: Cystein-403 ist essentiell für die Phosphotyrosinphosphataseaktivität. **YopM**: NLS („nuclear localisation signal“). **YopO/YpkA**: Serin-90 und -95 können autophosphoryliert werden. Asparaginsäure-267 und Lysin-269 sind essentiell für die Kinaseaktivität; Tyrosin-591, Asparagin-595 und Glutaminsäure-599 sind essentiell für die Rho-Bindung der GDI- („guanine nucleotide dissociation inhibitor“) Domäne. **YopP/YopJ**: Histidin-109, Glutaminsäure-128 und Cystein-172 sind essentiell für die Aktivität. **YopT**: Cystein-139, Histidin-258 und Asparaginsäure-274 sind essentiell für die Proteaseaktivität. (Äpfelbacher *et al.*, 2007 und Shao, 2008 modifiziert).

1.3.5.1 YopE

YopE besitzt ein Molekulargewicht von 23 kDa und die Eigenschaft eines GAP („*GTPase activating/accelerating protein*“) (Andor *et al.*, 2001; Black and Bliska 2000; Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000). GAPs greifen in den RhoGTPase Zyklus ein und beschleunigen die Hydrolyse von GTP zu GDP (Bos *et al.*, 2007). GTPasen, die GDP gebunden haben, sind inaktiv und können, auf Grund einer Konformationsänderung, mit ihren Effektorproteinen nicht interagieren. YopE zeigt keine Sequenzhomologie zu eukaryotischen GAPs, jedoch zu anderen bakteriellen Effektoren mit GAP-Aktivität wie ExoS (*P. aeruginosa*) und SptP (*S. enterica*) (Goehring *et al.*, 1999; Fu und Galan, 1999). Das katalytische Zentrum von YopE besitzt einen Argininfinger (R144), der essentiell für die Aktivität des Proteins ist (Scheffzek *et al.*, 1998; Evdokimov *et al.*, 2002). Wird der Argininfinger in YopE durch Alanin ausgetauscht (R144A), geht die GAP-Aktivität verloren (Aili *et al.*, 2003; Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Black und Bliska, 2000; Andor *et al.*, 2001). Yersinien, welche das komplette YopE nicht synthetisieren können, sind in ihrer Virulenz stark attenuiert (Rosqvist *et al.*, 1988).

Die ersten 15 N-terminalen AS des 219-AS-langen YopE beinhalten die Signalsequenz und sind wichtig für die Sekretion. Die AS 15 – 50 stellen die Chaperonbindestelle für SycE dar und sind wichtig für die Translokation (Schesser *et al.*, 1996; Woestyn *et al.*, 1996, Rodgers *et al.*, 2010). Desweiteren sind die AS 54 – 75 (MLD = „*membrane localization domain*“) für die perinukleare Lokalisation von YopE in Wirtszellen verantwortlich (Krall *et al.*, 2004). Yersinien, welche eine Deletion der MLD in YopE enthalten sind in ihrer Virulenz attenuiert, obwohl die YopE GAP-Aktivität erhalten bleibt (Isaksson *et al.*, 2009). Interessanterweise besitzt dieser Aminosäureabschnitt zwei Lysine (K-62 und K-75), wovon letzteres polyubiquitiniert wird und das Protein für die Degradation markiert (Ruckdeschel *et al.*, 2006). In Säugetierzellen ist das 26S-Proteasom für den geregelten Abbau einer Vielzahl von ubiquitinierten, zellulären Proteinen verantwortlich (Glickman und Ciechanover, 2002). Die katalytische GAP Domäne von YopE erstreckt sich über die AS 96 – 219, welche *in vitro* auf die GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 wirkt (Black and Bliska, 2000; Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000). Frühere Studien zeigten, dass sich die Substratspezifität der GAPs *in vitro* von der *in vivo* unterscheidet (Moon und Zheng, 2003; Ridley *et al.*, 1993). Es besteht allgemeiner Konsens darüber, dass YopE *in vivo* RhoA, jedoch vermehrt Rac1 inhibiert (Aili *et al.*, 2006; Ruckdeschel *et al.*, 2006; Andor *et al.*, 2001). Neuste Studien zeigen, dass die RhoG und die Rac2 Aktivität von YopE moduliert wird (Roppenser *et al.*, 2009, Mohammadi und Isberg, 2009, Songsunghong *et al.*, 2010). Rac1 wird von RhoG und dem Elmo/Dock180 Komplex

reguliert. RhoG bindet den Elmo/Dock180-Komplex und stimuliert somit die GEF-Aktivität von Dock180. Dies führt zur Aktivierung von Rac1 (deBakker *et al.*, 2004; Katoh und Negishi, 2003; Lu und Ravichandran, 2006).

Der erstbeschriebene zelluläre YopE-Effekt ist die zytotoxische Wirkung, welche sich in Abrunden der infizierten Zellen sowie deren Ablösen von der extrazellulären Matrix zeigt (Rosqvist *et al.*, 1990). Dieses Phänomen wurde auf die Zerstörung des Aktinzytoskeletts zurückgeführt (Rosqvist *et al.*, 1991). Desweiteren wird YopE eine antiphagozytotische Wirkung zugeschrieben (Rosqvist *et al.*, 1990; Ruckdeschel *et al.*, 1996). Dabei spielt YopE eine stärkere Rolle für die Yersinieninternalisierung unter nicht opsonierten, als unter opsonierten Bedingungen (Grosdent *et al.*, 2002). Die Aktivierung von Rho-GTPasen bewirkt die Phagozytose nach Rezeptoraktivierung (Chimini und Chavrier, 2000; May und Machesky, 2001). Die Aufnahme von nicht opsonierten Yersinien verläuft über β_1 -Integrine und einen Rac1-abhängigen Weg. Im Gegensatz dazu soll die Aufnahme Komplement-opsonierter Bakterien RhoA-abhängig sein (Caron und Hall, 1998; Alrutz *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, dass YopE die ROS („reactive oxygen species“) Produktion hemmt (Songsunghong *et al.*, 2010). Ein weiterer immunologischer Effekt, der Inaktivierung von Rac1 durch YopE, ist die Inhibierung der Caspase-1 vermittelten Reifung und Freisetzung von IL-1 β (Schotte *et al.*, 2004). YopE beeinflusst nicht nur die Immunantwort des Wirts, sondern reguliert auch die T3SS-induzierte Porenbildung von infizierten Zellen (Viboud und Bliska, 2001; Viboud *et al.*, 2003). Es wird diskutiert, dass die Aktinpolymerisation für die Aufrechterhaltung der Pore mitverantwortlich ist und YopE mit seiner antagonistischen Wirkung zum Verschließen der Pore beiträgt (Viboud *et al.*, 2006). Außerdem wird eine synergistische Wirkung von YopE mit anderen Yops beschrieben. Zum einen sind Doppelmutanten YopE/YopH oder YopE/YopT weitaus attenuierter als die jeweiligen Einzelmutanten (Logsdon und Meccas, 2003; Viboud *et al.*, 2006). Zum Anderen wurde gezeigt, dass YopE und YopT kooperieren. Wenn YopE und YopT gleichzeitig in Wirtszellen eingebracht werden, konkurrieren sie um Plasmamembran-gebundenes GTP-beladenes Rac1. YopE vermindert die Konzentration an GTP-geladenem Rac1 an der Plasmamembran, indem es GDP-gebundenes Rac1 (welches eine intakte Isoprenoidgruppe enthält) generiert. Rac1-GDP wird durch die Bindung an GDI („guanine nucleotide dissociation inhibitor“) ins Zytoplasma transportiert. YopT hingegen entfernt das aktive GTP-gebundene Rac1 von der Plasmamembran, indem es den terminalen Geranyl-Geranyl-Cystein-Rest abspaltet. Das aktive Rac1, welches vor der Inaktivierung durch YopE geschützt wurde, sammelt sich im Kern an. Somit werden zwei unterschiedliche Quellen von Rac1

hergestellt. Einerseits eine inaktive zytosolische Fraktion, andererseits eine aktive Fraktion, die im Kern lokalisiert ist (Wong und Isberg, 2005). Jedoch ist nicht bekannt, wie diese zwei Rac1 Reservoirs zur Virulenz von Yersinien beitragen.

1.3.5.2 YopH

YopH ist eine hochaktive Phosphotyrosinphosphatase (PTP) mit einem Molekulargewicht von 51 kDa (Juris *et al.*, 2002). Das 468 AS-lange Protein kann in Domänen mit unterschiedlicher Funktion eingeteilt werden. Der N-Terminus umfasst eine Sekretions-/Translokationsdomäne (AS 1 – 17), eine Chaperonbindestelle (AS 18 – 70) und eine Substratbindedomäne für Tyrosin-phosphorylierte Substrate (Black *et al.*, 1998; Montagna *et al.*, 2001). Die zentrale Region von YopH (AS 130 – 260) interagiert mit dem C-Terminus von Fyb Phosphorylierungs-unabhängig (Yuan *et al.*, 2005). Die katalytische Domäne befindet sich im C-Terminus (AS 206 – 408) und ähnelt in ihrer Struktur katalytischen Domänen, die in eukaryotischen PTP gefunden wurden (Zhang *et al.*, 2003). Die Mutation des kritischen Cysteinrestes (C403) führt zum Erlöschen der katalytischen Aktivität (Black und Blisk, 1997; Persson *et al.*, 1997). Desweiteren zeigt die katalytische Domäne zusätzliche funktionale Eigenschaften, wie eine zweite Phosphotyrosin-Substratbindedomäne, welche mit der vorherbeschriebenen N-terminalen Substratbindedomäne kooperiert (Ivanov *et al.*, 2005). Außerdem enthält die PTP-Domäne eine exponierte Schleife, die YopH an fokale Adhäsionskomplexe lokalisiert (Persson *et al.*, 1999).

YopH hat eine Vielzahl von immunmodulatorischen Effekten. Der bestuntersuchte Mechanismus ist die Inhibition der Internalisierung von Yersinien in Wirtszellen über β_1 -Integrine. Intrazelluläre Strukturen, die zur Aufnahme von Yersinien nach Kontakt auftreten, sind fokale Adhäsionskomplexes. Es wurde gezeigt, dass YopH einzelne Proteine dieses Multiproteinkomplexes in unterschiedlichen Zelltypen dephosphoryliert. Dazu zählen p130^{Cas} („*Crk-associated substrate*“), FAK („*focal adhesion kinase*“), FAK-homolog Pyk, Paxillin, Fyb („*Fyn-binding protein*“) und das Gerüstprotein SKAP-HOM („*Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa homologue*“) (Black and Bliska, 1997; Persson *et al.*, 1997; Viboud und Bliska 2005). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass YopH für die anti-phagozytische Aktivität gegenüber J774 Makrophagen und Neutrophilen verantwortlich ist (Fallman *et al.*, 1995; Ruckdeschel *et al.*, 1996; Andersson *et al.*, 1996, Grosdent *et al.*, 2002). Es wurde festgestellt, dass die Internalisierungsrate in p130^{Cas}-/- Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen nicht erhöht war. Jedoch wurde die YopH vermittelte Deadhäsion verhindert. Daraus wurde geschlossen, dass die p130^{Cas} Dephosphorylierung eher wichtig für einen anti-migratorischen Effekt als anti-phagozytischen Effekt ist (Mogemark *et al.*, 2005).

YopH interagiert auch mit Phagozytose-assoziierten Mechanismen, wie der Ausbildung des „oxidative burst“ (Ruckdeschel *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1995; Bliska und Black, 1995). In Neutrophilen blockiert YopH die Ca^{2+} -Signalkaskade induziert über das Andocken von Invasin an β_1 -Integrine (Persson *et al.*, 1999). Ca^{2+} ist für die Degranulierung in Neutrophilen von besonderer Wichtigkeit und dessen Inhibierung könnte für das Überleben von Yersinien von großer Bedeutung sein. Desweiteren kann YopH die Produktion des proinflammatorischen Chemokins MCP-1 („*macrophage chemoattractant protein 1*“) verhindern. Die Produktion von MCP-1 hängt von der Phosphorylierung von Akt und des Phosphoinositol-3-Kinase-Signaltransduktionsweges ab (Sauvonnet *et al.*, 2002). Außerdem greift YopH in das adaptive Immunsystem ein, in dem es die B- und T-Zellaktivierung inhibiert (Yao *et al.*, 1999; Cornelis, 2002). Es wurde gezeigt, dass YopH an Lck, eine Protein-Tyrosinkinase assoziiert mit frühen Schritten in der T-Zellrezeptoraktivierungskaskade, bindet und sie phosphoryliert (Alonso *et al.*, 2004). YopH reduziert die TCR-stimulierte Erk1/2-Aktivität dramatisch und somit die IL-2-Produktion (Liang *et al.*, 2003). Die T-Zellaktivierung kann desweiteren durch eine Dephosphorylierung von LAT („*linker for activation of T-cells*“) und SLP-76 („*SH2 domain containing leukocyte protein*“) supprimiert werden (Gerke *et al.*, 2005). Außerdem wurde beobachtet, dass YopH Apoptose bei T-Zellen induziert (Bruckner *et al.*, 2005). Neuste Studien beschreiben die Interaktion von YopH mit Gab1, Gab2, p85 und Vav. Im Gegensatz zu p85 werden die drei anderen Proteine nicht dephosphoryliert (de la Puerta *et al.*, 2009).

1.3.5.3 YopM

YopM ist ein Protein mit saurem pI-Wert und einem variablen Molekulargewicht von 42 – 54 kDa je nach Stamm und Serotyp (Cornelis, 2002). Es ist wichtig für die Virulenz pathogener Yersinien (Truelzsch *et al.*, 2004). Die Größenunterschiede ergeben sich durch die Variabilität der Anzahl und Zusammensetzung an Leucin-reichen Wiederholungen (LRR = „*leucin rich repeats*“) (Boland *et al.*, 1998; Evdokimov *et al.*, 2001), welche den zentralen Bereich von YopM bestimmen und für Protein-Protein-Interaktionen notwendig sind. Die Untersuchung der Kristallstruktur ergab, dass sich YopM als Tetramer anordnet und eine hohle zylindrische Struktur bildet (Evdokimov *et al.* 2001). Auf der Suche nach Interaktionspartnern für YopM wurden verschiedene Proteine beschrieben. (1) Angefangen mit humanem α -Thrombin, welches die Thrombin-induzierte Blutplättchenaggregation inhibiert (Reisner und Straley, 1992). Es wurde eine extrazelluläre Rolle von YopM vermutet. Jedoch zeigten darauffolgende Studien, dass YopM mit den anderen Yop-Effektoren über das T3SS in Wirtszellen injiziert wird und ein intrazelluläres Zielprotein wahrscheinlich ist

(Boland *et al.*, 1996). Die ersten drei LRRs und die ersten 32 C-terminalen AS haben Ähnlichkeit mit einem Kern-Lokalisierungssignal (NLS = „*nuclear localisation signal*“) (Benabdillah *et al.*, 2004). In der Tat konnte YopM im Nukleus nachgewiesen werden, (Benabdillah *et al.*, 2004; Skrzypek *et al.*, 1998; Skrzypek *et al.*, 2003). (2) Neuere Studien weisen eine Interaktion von YopM mit α 1-Antitrypsin (AAT) nach, ebenso ein extrazelluläres Protein, das die neutrophile Elastase inhibiert. YopM beeinflusst jedoch die Proteaseaktivität von AAT nicht (Heusipp *et al.*, 2006). Mikroarraystudien zeigen mehrere deregulierte Gene, welche mit zellulärem Wachstum und Zellzykluskontrolle in Verbindung gebracht werden (Sauvonnet *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu hat eine ähnliche zweite Studie diese Ergebnisse nicht bestätigt und keine YopM-regulierten Gene gefunden (Hoffmann *et al.*, 2004). (3) Erste Hinweise auf eine intrazelluläre Funktion ergaben Coimmunpräzipitationen. Diese beschreiben zwei Kinasen als Interaktionspartner, PRK2 („*protein kinase C-like protein 2*“) und RSK1 („*ribosomal S6 protein kinase 1*“). YopM bindet beide Kinasen gleichzeitig in einem trimeren Komplex und kann deren Phosphorylierung stimulieren. PRK2 und RSK1 werden mit Genregulation und dem Zellzyklusverlauf in Verbindung gebracht (McDonald *et al.*, 2003). Weitere Studien schlagen vor, dass YopM die Inaktivierung von RSK1 verhindert, in dem es die Dephosphorylierung seiner aktivierenden Phosphorylierungsstellen blockiert und so eine anhaltende Aktivität des Proteins verursacht (Hentschke *et al.*, 2010). Außerdem konnten die Interaktionsdomänen von YopM mit RSK1 (C-Terminus – LRR12) und mit PRK2 (LRR6 – LRR15) aufgeklärt werden. Beide Domänen sind wichtig für die Induktion von IL10 *in vivo* (McPhee *et al.*, 2010). Desweiteren verändert YopM das Cytokinmuster des Immunsystems im Mausinfektionsmodell und verstärkt somit die Virulenz der Yersinien (McCoy *et al.*, 2010). Zusätzliche Untersuchungen zeigen weitere immunmodulatorische Funktionen von YopM. Zum Beispiel interagiert YopM mit Komponenten des angeborenen Immunsystems, in dem es die Depletion von NK-Zellen verursacht. Wahrscheinlich geschieht dies, in dem die Synthese des IL-15 Rezeptors α (IL-15 α) sowie die Synthese von IL-15 beeinträchtigt wird (Kerschen *et al.*, 2004). Eine weitere Studie, welche von derselben Gruppe ausgeführt wurde beschrieb die Depletion der NK-Zellen nur in der Milz, jedoch nicht in der Leber und wies keine Relevanz für die Yersinia-Infektion nach, jedoch sind Gr1+ polymorphkernige Neutrophile für die YopM-vermittelte Virulenz von Bedeutung (Ye *et al.*, 2009). Außerdem wurde eine vermeintlich neue E3 Ligase (NEL = „*new E3 ligase*“) Domäne im C-Terminus des Proteins gefunden. Somit könnte YopM als eine bakterielle E3 Ubiquitin Ligase fungieren und ein weites Spektrum an Signaltransduktionswegen beeinflussen. Zusätzlich wurde postuliert, dass YopM ein molekulares Mimetikum zu TLR4 LRR sein

könnte und damit eine reduzierte Immunantwort auf LPS verursacht (Soundararaja *et al.*, 2010).

1.3.5.4 YopO

YopO von *Y. enterocolitica* sowie YpkA („*Yersinia protein kinase A*“), das homologe Protein in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*, sind multifunktionale Proteine mit einem Molekulargewicht von 80 kDa, welche eine Serin/Threonin Kinase, eine Aktin-binde und eine GDI-ähnliche Aktivität vereinen. Das 729 AS-lange Protein enthält verschiedene Domänen mit unterschiedlicher Funktion. Die N-terminalen AS 1 – 77 wirken als Sekretions- und Translokationsdomäne und sind auch für die Lokalisierung an die Plasmamembran in der Wirtszelle verantwortlich (Hakansson *et al.*, 1996). Innerhalb des Bakteriums bindet das Chaperon ScyO an den N-Terminus von YopO und verhindert dadurch die Aggregation des Proteins und verdeckt zusätzlich die Membranlokalisierungsdomäne (Letzelter *et al.*, 2006). Als erste Funktion wurde die Serin/Threoninkinaseaktivität beschrieben (Galyov *et al.*, 1993), welche die $G\alpha_q$ Untereinheit heterotrimerer G-Proteine phosphoryliert (Navarro *et al.*, 2007). Die vorhergesagte Kinasedomäne erstreckt sich von der AS 150 bis zur AS 400. Werden die darin befindlichen kritischen AS D-267 und K-269 mutiert erlischt die Kinaseaktivität (Dukuzumuremyi *et al.*, 2000; Trasak *et al.*, 2007). Kristallisationsstudien der C-terminalen AS 434 – 732 weisen auf eine Rac-1 Bindedomäne (AS 434 – 615) hin, welche strukturelle und funktionale Ähnlichkeit zu humanen RhoGDIs („*guanine nucleotide dissociation inhibitor*“) aufweist (Prehna *et al.*, 2006). Die GDI-ähnliche Region in YpkA verhindert den GDP → GTP Austausch in RhoA und Rac-1. Desweiteren führt die Mutation drei kritischer AS Y-591, N-595 und E-599 dazu, dass YpkA nicht mehr an RhoGTPasen binden kann. Zusätzlich werden dadurch einige der zellulären Effekte von YpkA reduziert (Prehna *et al.*, 2006). Die C-terminalen 21 AS (AS 709 – 729) zeigen Homologien zu Coronin einem Aktin bündelnden Protein und sind essentiell für die Aktinbindung (Trasak *et al.*, 2007; Juris *et al.*, 2000). Die Autophosphorylierung von YopO, welche entscheidend für die Phosphorylierung zellulärer Substrate ist, findet nur durch zytoplasmatische Stimulation statt (Juris *et al.*, 2000). Ein Stimulus ist monomeres, globuläres Aktin; jedoch nicht filamentöses Aktin. Der Mechanismus für die Autophosphorylierung von YopO könnte wie folgt ablaufen: YopO bindet mit seiner C- und N-terminalen Bindedomäne Aktin und stimuliert somit die Autophosphorylierung von S-90 und S-95 (Trasak *et al.*, 2007). Ein weiteres YopO Substrat ist Otubain-1 („*ovarian tumor domain ubiquitin aldehyde binding 1*“) (Juris *et al.*, 2006). Otubain-1 ist eine putative Ubiquitinase und assoziiert mit der E3 Ubiquitinligase GRAIL, welche mit der Regulation von Anergie in Lymphozyten in Verbindung gebracht wird (Soares

et al., 2004). YpkA interagiert mit einer post-translational modifizierten Form von Otubain-1, welche mehrere Phosphorylierungsstellen beinhaltet. Otubain-1 stabilisiert aktives RhoA vor der Invasion und begünstigt somit eine erhöhte *Yersinia* Aufnahme. YpkA und Otubain-1 modulieren die Stabilität von RhoA in gegensätzlicher Art und Weise (Edelmann *et al.*, 2010). Die YopO-Aktivität innerhalb von Wirtszellen führt zur Zerstörung von Aktinstressfasern und daraufhin zur Zellabrundung (Hakansson *et al.*, 1996; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000; Trasak *et al.*, 2007; Prehna *et al.*, 2006; Juris *et al.*, 2000; Wiley *et al.*, 2006). Als die unterschiedlichen Funktionen von YopO auf zelluläre Effekte hin untersucht wurden, wurde eine synergistische Wirkung der Kinase- und der RhoGTPasen-binde-Aktivität festgestellt (Trasak *et al.*, 2007; Prehna *et al.*, 2006). Immunologisch wird YopO eine antiphagozytische Funktion zugeschrieben (Grosdent *et al.*, 2002; Wiley *et al.*, 2006). Kürzlich wurde entdeckt, dass die zelluläre Aufnahme von *Yersinien* über YadA durch die YopO-Kinaseaktivität inhibiert wird (Trasak *et al.*, 2007). Weitere Studien zeigen, dass die N-terminale Membranbindedomäne zusammen mit der GDI-ähnlichen Domäne spezifisch in den Rac-vermittelten Phagozytosemechanismus eingreift. YopO führt seine antiphagozytische Aktivität aus, in dem es GDI-freies Rac1 an der Plasmamembran bindet. Damit wird spezifisch die Fc γ R-Internalisierung und nicht die CR3-abhängige Aufnahme blockiert. Dieselbe Gruppe wies die Bindung von Rac2 an YopO nach (Groves *et al.*, 2010). Arbeiten zur Mausvirulenz von YopO/YpkA zeigen widersprüchliche Daten. Die große Diskrepanz der Studien kann damit erklärt werden, dass unterschiedliche *Yersinia*-Stämme, YopO/YpkA-Deletionsmutanten oder Funktionsmutanten, verschiedene Infektionsrouten und unterschiedliche Untersuchungen zur Beurteilung der Virulenz verwendet wurden (Galyov *et al.*, 1993, Wiley *et al.*, 2006; Trulzsch *et al.*, 2004; Prehna *et al.*, 2006; Logsdon und Meccas, 2003; Logsdon und Meccas, 2006).

1.3.5.5 YopP

YopP (in *Y. enterocolitica*), bzw YopJ (in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*), besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa und inaktiviert den NF κ B- und MAPK-Signalweg infizierter Zellen (Boland und Cornelis, 1998; Palmer *et al.*, 1998; Schesser *et al.*, 1998). YopP/YopJ wirkt auf Mitglieder der MAPK-Kinase (MAPKK) Superfamilie, die übergeordnete Aktivatoren der MAPK darstellen. Zusätzlich bindet YopP/YopJ die I κ B-Kinase- β (IKK β), welche die Haupt-NF κ B-aktivierende Kinase in bakteriell-infizierten Zellen ist (Orth *et al.*, 1999). Somit greift YopP/YopJ in Signalkaskaden ein, welche für die angeborene wie für die adaptive Immunantwort von Bedeutung sind. Dies führt zur Inhibition der Produktion verschiedener Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel TNF- α

(„*tumor necrosis factor α* “), IL-8 („*interleukin-8*“), IL-12 („*interleukin-12*“), RANTES („*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*“), MHC-II („*major histocompatibility complex class II*“) und ICAM-1 („*intercellular adhesion molecule-1*) (Schesser *et al.*, 1998; Boland und Cornelis, 1998; Palmer *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2004). Zudem fördert die Modulation zellulärer Signale durch YopP/YopJ die Apoptose in infizierten Makrophagen und Dendritischen Zellen (Palmer *et al.*, 1998; Erfurth *et al.*, 2004). Dies geschieht einerseits durch die Inhibition der MAPK- und NF κ B-Signalkaskade, welche eigentlich einen Schutz vor Apoptose unter multiplen Stresssituationen vermitteln und andererseits durch die zusätzliche Induktion einer LPS-induzierten, sowie TLR4- und TRIF-vermittelten proapoptotischen Antwort, welche Apoptose induziert (Ruckdeschel *et al.*, 2001; Ruckdeschel *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). In HEK293 Zellen konnte die TLR4-induzierte Aktivierung von p38 durch YopJ inhibiert werden (Sweet *et al.*, 2007). Desweiteren wurde gezeigt, dass YopP über die Blockierung des MAPK-Signalwegs die Clathrin-abhängige Endozytose und damit die Antigenaufnahme in dendritischen Zellen inhibiert (Authenrieth *et al.*, 2007). Somit verhindert YopP/YopJ die heterologe Antigenpräsentation von dendritischen Zellen zu CD8 und CD4 T-Zellen (Leibiger *et al.*, 2008; Truelzsch *et al.*, 2005; Truelzsch *et al.*, 2008).

YopJ ähnelt der Struktur von Effektorproteinen, welche in pathogenen Bakterien wie zum Beispiel *S. Typhimurium* (AvrA) und *Xanthomonas campestris* (AvrRxv, AvrBst, und AvrXv4) synthetisiert werden (Hardt und Galan, 1997; Whalen *et al.*, 1993; Ciesiolka *et al.*, 1999). Die Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen dieser Effektorproteine führte zur Identifizierung von drei konservierten AS H109, E128 und C172, der katalytischen Triade, und deren Mutation in YopJ führt zum Funktionsverlust dieses Proteins (Orth *et al.*, 2000).

Lange Zeit wurde postuliert, dass YopP/YopJ eine Cysteinprotease des CE Clans ist und auf zelluläre Ubiquitin- bzw. auf Ubiquitin-ähnlich-modifizierte Proteine wirkt, in dem es Ubiquitin- bzw. Ubiquitin-ähnliche Reste abspaltet. Die Modifizierung von Proteinen mit Ubiquitin über Lysin-48 führt in den proteolytischen Abbau durch das Proteasom während die Lysin-63 Ubiquitinierung für Signalkaskaden wichtig ist (Pickart, 2000). Der NF κ B-Signalweg wird durch Ubiquitinierung auf unterschiedlichen Stufen kontrolliert. NF κ B wird im Zytoplasma durch I κ B α im inaktiven Zustand gehalten. IKK, eine Proteinkinase mit drei Untereinheiten α , β und γ , ist I κ B α im NF κ B-Signalweg übergeordnet. IKK β phosphoryliert I κ B α . Wird I κ B α phosphoryliert, wird es für die Ubiquitinierung und damit für die proteolytische Degradation markiert. Dissoziiertes NF κ B kann daraufhin in den Nukleus translozieren und dort die Transkription mehrerer Gene anregen, welche für die

proinflammatorische Immunantwort wie auch für das Überleben der Zelle verantwortlich sind. Wird YopJ in Zellkulturzellen überexprimiert, wird die Ubiquitinierung von IKK β verhindert (Carter *et al.*, 2003). Zudem gab es Hinweise, dass YopP/YopJ Ubiquitin von verschiedenen kritischen Adapterproteinen der TLR- und TNF-Signalkaskaden TRAF6 („*TNF receptor-associated factor 6*“) und TRAF2 („*TNF receptor-associated factor 2*“) prozessieren kann (Zhou *et al.*, 2005). Die Ubiquitinierung dieser Intermediate reguliert die Zusammensetzung funktionaler Signalkomplexe (Chen, 2005). Die postulierte Deubiquitinierung durch YopP/YopJ könnte die MAPK- und NF κ B-Signalkaskade negativ beeinflussen. Jedoch könnte die Cysteinproteaseaktivität auch ein unspezifischer Effekt sein, der aus der Überexpression von YopP/YopJ in eukaryotischen Zellen resultiert (Mukherjee *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2005).

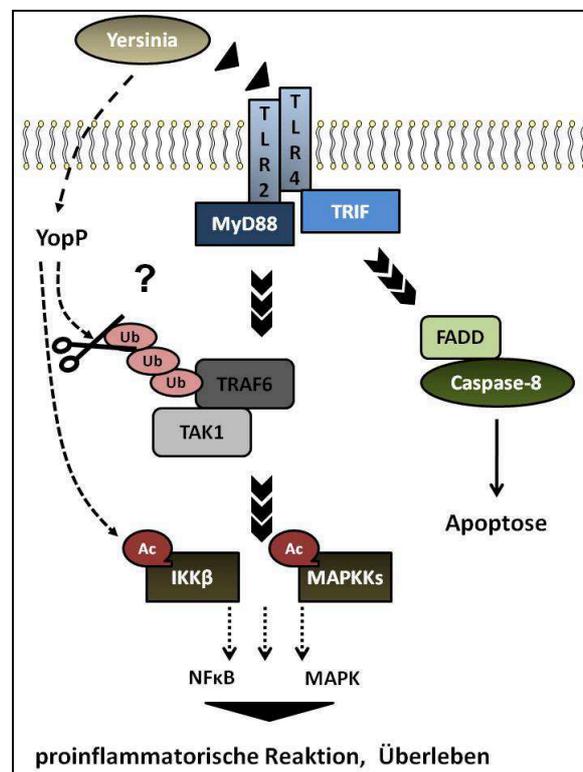


Abb. 1.2 Modulation der Immunantwort durch YopP. Yersinien können über TLR2 und TLR4 die MAPK- und NF κ B-Signalkaskade aktivieren. Transloziertes YopP kann diese Signalwege unterbrechen. Einerseits wurde postuliert, dass YopP als Cysteinprotease die Ubiquitin-Modifizierungen an Signalkomplexen, wie zum Beispiel TRAF6/TAK1 abspalten kann. Andererseits wurde nachgewiesen, dass IKK β und MAPKs durch YopP azetyliert werden und damit ihre Aktivierung verhindert wird. Die Unterdrückung der MAPK- und NF κ B-Signalkaskade führt zu einer zytotoxischen Reaktion, welche die Aktivierung von Apoptose über TLR4, TRIF, FADD und Caspase-8 begünstigt. (Aepfelacher *et al.*, 2007 modifiziert).

Stattdessen wurde herausgefunden, dass YopP/YopJ eine Azetyltransferaseaktivität hat und kritische Serin- und Threoninreste im aktiven Zentrum der Wirtskinasen modifiziert. Es wurde gezeigt, dass YopP/YopJ IKK α/β und MAPKK (MEK-1/2 und MAPKK6) azetyliert und damit die Phosphorylierung von untergeordneten Proteinkinasen verhindert. YopJ transferiert die Azetylgruppe von dem ubiquitär vorkommenden Azetyldonor Azetyl-CoA zu Serin-, Threonin- und Lysinresten der Zielmoleküle (Mittal *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006). Die Azetylierung könnte auch andere Kinasen betreffen. Zum Beispiel inhibiert YopP/YopJ auch übergeordnete Proteine von IKK und MAPKK, wie zum Beispiel TAK1 („*transforming growth factor- β -activating kinase*“), ein zentrales Glied in der TLR-, IL-1- und TNF-Signalkaskade (Haase *et al.*, 2005; Thiefes *et al.*, 2006). Für die vollständige Azetyltransferaseaktivität von YopJ ist IP₆ (Inositol-6-Phosphat) notwendig. Wobei durch Studien mit AvrA, dem YopJ Homolog in *S. Typhimurium*, davon ausgegangen wird, dass IP₆ als allosterischer Aktivator der Enzymaktivität fugiert (Mittal *et al.*, 2010).

Im Gegensatz zu *ex vivo* Studien ist die Rolle von YopP/YopJ während einer systemischen Infektion nicht geklärt. Es liegen kontroverse Meinungen vor in wie weit YopP/YopJ die angeborene proinflammatorische Immunantwort während einer systemischen Infektion beeinflusst (Monak *et al.*, 1998; Trulzsch *et al.*, 2004; Lemaitre *et al.*, 2006; Logsdon and Mecsas, 2006; Brodsky und Medzhitov, 2008; Zhang and Bliska, 2010). Zusätzlich sollte erwähnt werden, dass Unterschiede in der YopP/YopJ-AS-Sequenz verschiedener *Yersinia*-Stämme vorliegen und diese Polymorphismen mit signifikanten Unterschieden in der zytotoxischen Aktivität assoziiert sind (Ruckdeschel *et al.*, 2001; Brodsky und Medzhitov, 2008; Lilo *et al.*, 2008; Zauberman *et al.*, 2007; Zauberman *et al.*, 2009). Jedoch sind *Y. enterocolitica* YopP- und *Y. pseudotuberculosis* YopJ-Deletionsmutanten im Mausinfektionsmodell attenuiert (Trulzsch *et al.*, 2004; Monak *et al.*, 1998).

1.3.5.6 YopT

YopT besitzt ein Molekulargewicht von 35 kDa und ist als Cysteinprotease des CA Clans beschrieben, dessen Mitglieder in Human-, Tier-, Insekten- und Pflanzen-pathogenen Bakterien vorkommen (Brugirard-Ricaud *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2002). Das 322 AS-lange Protein, wird von *Y. enterocolitica* sowie von *Y. pestis*, jedoch nur von wenigen *Y. pseudotuberculosis* Stämmen, synthetisiert (Iriarte und Cornelis, 1998; Viboud *et al.*, 2006). Essentiell für die katalytische Aktivität sind drei AS, C139/H258/D274 (Shao *et al.*, 2002), welche unter Cysteinproteasen des CA Clans konserviert sind (Zhu *et al.*, 2004). YopT interagiert mit Mitgliedern der kleinen GTPasen Familie, RhoA, Rac1 und Cdc42 jedoch

nicht mit humanem Ras. Dabei spaltet es das endständige Cystein der Rho-GTPasen, dessen Thiogruppe mit einem Geranylgeranylrest veräthert ist, ab. Die YopT Protease ist *in vitro* für RhoA aktiver als für Rac1 und Cdc42 (Shao *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 2003). RhoA wird in Epithelzellen durch YopT von der Cytoplasmamembran abgespalten und von seinem cytoplasmatischen Bindepartner GDI-1 („*guanine nucleotide dissociation inhibitor-1*“) getrennt, Rac1 und Cdc42 werden nicht beeinträchtigt (Aepfelbacher *et al.*, 2003). YopT bevorzugt RhoA, jedoch können andere RhoGTPasen wie zum Beispiel Rac1, abhängig vom Zelltyp und den experimentellen Bedingungen auch modifiziert werden (Viboud *et al.*, 2006; Wong und Isberg, 2005). Weitere Untersuchungen ergaben, dass YopT die Isoprenoidgruppe (Farnesyl oder Geranylgeranyl) in Kombination mit einem Abschnitt basischer AS am C-Terminus der RhoGTPasen erkennt (Shao *et al.*, 2003; Fueller *et al.*, 2006). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass nicht nur die katalytische Domäne sondern auch eine vorhergesagte α -Helix (AS 76 – 100) wichtig für die RhoA-Bindung von YopT ist (Sorg *et al.*, 2003).

Morphologisch wird der cytotoxische Effekt von YopT am Abrunden der Wirtszellen erkannt. Dies wird durch die Modifizierung und Inaktivierung von RhoA durch YopT erklärt, was zur Zerstörung der Aktinstressfasern führt (Iriarte und Cornelis, 1998; Cornelis, 2002; Zumbihl *et al.*, 1999). Die Inaktivierung des Aktinzytoskeletts ist mit einer Abschwächung der Phagozytosefähigkeit verbunden. YopT inhibiert die Phagozytose von opsonierten und nicht opsonierten Yersinien durch Neutrophile und Makrophagen (Wong und Isberg, 2005; Grosdent *et al.*, 2002). In humanen Makrophagen wird die Aktin-Reorganisation zu „*phagocytic cups*“ sowie podosomale Adhäsionsstrukturen, welche nötig für die Chemotaxis sind, durch YopT zerstört (Aepfelbacher *et al.*, 2003). Wie durch ihre Substratspezifität erwartet, kooperieren YopE und YopT beim Modulieren von Zellfunktionen. Wie YopE und YopT in der Manipulation von transfiziertem Rac1 kooperieren wird im Kapitel 1.3.5.1 über YopE beschrieben (Wong und Isberg, 2005). Nach einer mehrstündigen Infektion mit ausschließlich YopT translozierenden Yersinien wird von RhoA vollständig der Isoprenyl-Cysteinrest abgespalten und das verkürzte RhoA akkumuliert im Cytosol (Aepfelbacher *et al.*, 2003). Zelluläres RhoA liegt meist als Komplex mit GDI im Zytosol vor. YopT kann RhoA in diesem Komplex *in vitro* nur mit Hilfe von zusätzlichen Faktoren wie PIP₂ (Phosphatidylinositolbiphosphat) modifizieren (Aepfelbacher *et al.*, 2003). Die RhoA-Inaktivierung durch YopT führt zur erhöhten Transkription und Proteinsynthese von RhoB, einem Homolog von RhoA (Hoffmann *et al.*, 2004). Es ist nicht bekannt, ob YopT RhoB modifizieren kann. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass YopT noch andere nicht

beschriebene isoprenylierte Zielproteine spaltet. YopT wurde auch eine immunsupprimierende Eigenschaft zugeschrieben, in dem es die Inhibition der *klf2* Expression aufhebt. KLF2 ist ein immunsuppressiver Transkriptionsfaktor, dessen Synthese über RhoA und Rhophilin inhibiert wird (Dach *et al.*, 2009).

Trotz eingehender Studien ist die Funktion von YopT im Infektionsverlauf noch nicht geklärt. Im Mausmodell ist die YopT-Deletionsmutante nicht attenuiert, sie kolonisiert sogar das Gewebe effizienter als der Wildtypstamm (Trulzsch *et al.*, 2004). Desweiteren kann *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O:3 YopT wegen einer natürlichen Deletion im *yopT* Gen nicht synthetisieren und ist trotzdem mausvirulent. Auf Grund dessen gibt es Vermutungen, dass YopT redundant ist und ein selektiver Druck für die YopT-Inaktivierung bestehen könnte (Viboud und Bliska, 2005).

1.3.5.7 YopQ

YopQ in *Y. enterocolitica* (YopK in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*) ist eine weitere auf dem pYV-Plasmid kodierte Virulenzdeterminante mit einem Molekulargewicht von 18 kDa. Es zählt nicht zu den klassischen sechs oben beschriebenen Effektorproteinen, ist jedoch Teil des Yop-Virulons, dessen Expression und Sekretion somit Ca^{2+} - sowie temperaturabhängig reguliert werden (Straley und Bowmer, 1986; Mulder *et al.*, 1989, Holmström *et al.*, 1995). YopQ benötigt kein Chaperon und seine posttranslationale Sekretion wurde für *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* bestätigt (Holmström *et al.*, 1995; Trcek *et al.*, 2002). Obwohl das Protein keine Sequenzhomologien zu anderen bekannten Proteinen und keine ersichtliche funktionale Domäne aufweist, wurde festgestellt, dass *yopQ*- bzw. *yopK*-Mutanten im Mausmodell attenuiert sind (Straley und Cibull, 1989; Mulder *et al.*, 1989, Holmström *et al.*, 1995). YopQ beeinflusst die Translokation von Yops unabhängig von YopE von der Wirtszelle aus (Dewoody *et al.*, 2011) in dem es die Porengröße reguliert (Holmström *et al.*, 1997). Bis heute ist die genaue Lokalisation von YopQ nicht geklärt. Trotz niedrigerer Expressionsrate im Vergleich zu anderen Yops, die das Protein schwer detektierbar machen (Holmström *et al.*, 1995; Trcek *et al.*, 2002), konnte die Translokation von YopQ in Wirtszellen gezeigt werden (Garcia *et al.*, 2006).

1.4 Angeborene Immunität und ihre Rolle in der Erkennung und Beseitigung bakterieller Infektionen

Vertebraten sind ständig der Bedrohung einer Invasion durch Mikroorganismen ausgesetzt und haben dafür verschiedenste Mechanismen entwickelt, das breite Spektrum an Erregern meist erfolgreich aus dem Körper zu eliminieren (Akira *et al.*, 2006). Die erste Barriere die Mikroorganismen bei Säugetieren überwinden müssen, ist die epitheliale Grenzfläche, welche auf mechanische („*tight junctions*“, Bewegung der Zilien im respiratorischen Trakt, Schleimbildung), chemische (Fettsäuren, niedriger pH, Enzyme, antimikrobielle Peptide) und mikrobielle (normale Hautflora) Art Schutz bietet. Das Immunsystem selbst kann in zwei Bereiche unterteilt werden, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Zu ersterem zählen Granulozyten (Neutrophile, Basophile und Eosinophile), Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und ILLs („*innate-like lymphocytes*“) wie B-1 Zellen, epitheliale $\gamma:\delta$ T-Zellen und NK („*natural killer*“) Zellen (Janeway *et al.*, 2005). Das adaptive Immunsystem ist in einer späteren Phase einer Infektion an der Eliminierung der Erreger beteiligt und zeichnet sich durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Zudem charakterisiert es seine Spezifität, welche durch klonale Selektion eines breiten Repertoires an Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren, generiert durch einen Mechanismus genannt „*gen rearrangement*“, entsteht (Akira *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu basiert der Schutz gegenüber einem breiten Spektrum von Erregern, verliehen durch das angeborene Immunsystem, auf einem limitierten Spektrum an Keimbahn-kodierten Rezeptoren (PRRs = „*pattern-recognition receptors*“). PRRs erkennen PAMPs („*pathogen-associated molecular patterns*“), welche essentielle Strukturen in Mikroorganismen darstellen und somit für diese schwer zu verändern sind. In Säugetieren exponieren bestimmte Zelltypen PRRs auf ihrer Oberfläche, dazu zählen TLRs („*Toll-like receptors*“), NLRs („*nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors*“), RLRs („*retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors*“) und CLR („*C-type lectin receptors*“) (Albiger *et al.*, 2007). Jedoch gibt es auch lösliche PRRs, wie das MBL („*mannan binding lectin*“) des Lektinwegs des Komplement Systems (Roosendaal and Carroll, 2006).

1.4.1 TLRs

TLRs sind evolutionär konserviert und zu TLRs homologe Rezeptoren werden in Pflanzen, Insekten, Würmern (*Caenorhabditis elegans*) und Vertebraten gefunden (Akira und Takeda, 2004; Beutler, 2004; Janeway und Medzhitov, 2002). Das erste Mitglied dieser Familie, genannt Toll, wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, als Genprodukt essentiell

für die Ausbildung embryonaler dorsoventraler Polarität, identifiziert (Anderson *et al.*, 1985) und spielt außerdem eine entscheidende Rolle im Schutz gegen Pilzinfektionen der erwachsenen Fruchtfliege (Lemaitre *et al.*, 1996). Bis heute wurden in Säugetieren 12 verschiedene TLRs, 10 humane (TLR1 – 10) und 12 murine (TLR1 – 9 und TLR11 – 13), beschrieben (Rock *et al.*, 1998). TLRs sind TypI integrale Membranglykoproteine charakterisiert durch eine extrazelluläre Domäne, welche eine variierende Anzahl von LRRs („*leucine-rich-repeats*“) enthält, und eine zytoplasmatische, signalgebende TIR- („*Toll/IL-1R homology*“) Domäne (Bowie and O’Neil, 2000). TLRs werden von einer Vielzahl von myeloiden Zellen (Makrophagen, dendritischen Zellen, Neutrophilen, B und T Zellen) sowie nicht-myeloiden Zellen (Epithelzellen und Fibroblasten) synthetisiert (Albiger *et al.*, 2007). Die Oberflächenexposition von TLRs ist nicht statisch sondern wird als Antwort auf Erreger, bestimmte Zytokine und Stress moduliert. Einige TLRs (TLR 1, 2, 4, 5 und 6) werden auf der Zelloberfläche präsentiert und sind extrazellulär zugänglich. Andere sind (TLR 3, 7, 8 und 9) fast ausschließlich in intrazellulären Kompartimenten, wie z. B. Endosomenmembranen, lokalisiert (Akira *et al.*, 2006). Es wurde mindestens ein Ligand für jeden TLR identifiziert. Jedoch sind TLRs in der Hinsicht ungewöhnlich, dass manche strukturell ganz unterschiedliche Liganden erkennen können. In Tab. 1.1 sind die bakteriellen Liganden zusammengefasst dargestellt, wobei TLRs auch Strukturen von Viren, Pilzen sowie parasitären Würmern und Protozoen erkennen können.

Tab. 1.1 TLRs und ihre bakteriellen Liganden (nach Albiger *et al.*, 2007 modifiziert).

TLR	Mikrobielle Liganden	Spezies
TLR1/TLR2	Triazetylierte Lipopeptide	Bakterien und Mykobakterien
TLR2	Lipoteichonsäuren Atypisches LPS Porine Lipoarabinomannan	Gram-positive Bakterien Gram-negative Bakterien Gram-negative Bakterien Mykobakterien
TLR2/TLR6	Diacylierte Lipopetide Lipoteichonsäuren	Mykoplasmen Gruppe B Streptokokken
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien
TLR5	Flagellin	Gram-positive und Gram-negative Bakterien
TLR9	CpG	Gram-positive, Gram-negative Bakterien und Mykobakterien
TLR11	Unbekannt	Uropathogene <i>E. coli</i>

Die LRR-Motive sind einerseits wichtig für die Rezeptordimerisierung, andererseits für die Erkennung der Liganden. TLRs bilden Homo- bzw. Heterodimere bevor sie stimuliert werden (Triantafyllou *et al.*, 2006). Es wurde für TLR3, TLR5, TLR9 und TLR1/TLR2 eine direkte Bindung des Liganden nachgewiesen, wobei TLR4 LPS durch das assoziierte Molekül MD-2 bindet (Jin *et al.*, 2007; Andersen-Nissen *et al.*, 2007; Ohto *et al.*, 2007; Leonard *et al.*, 2008; Haas *et al.*, 2008). Nachdem die Liganden an die TLRs gebunden haben, findet eine Konformationsänderung statt, welche für die Rekrutierung der TIR-Domänen-enthaltenden Adaptermoleküle zu den TIR-Domänen der TLRs benötigt wird. Es gibt vier Adaptermoleküle: MyD88, TIRAP („*TIR-associated protein*“)/MAL („*MyD88-adaptor-like*“), TRIF („*TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β* “)/TICAM1 („*TIR-domain-containing molecule 1*“) und TRAM („*TRIF-related adaptor molecule*“). Die unterschiedlichen Immunantworten vermittelt durch die verschiedenen TLRs können teilweise durch die selektive Anwendung der einzelnen Adaptermoleküle erklärt werden. MyD88 und TRIF aktivieren zwei Signalwege, welche die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen sowie Typ I IFNs induzieren (Akira *et al.*, 2006).

1.4.2 Neutrophile

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt zu einer Entzündungsreaktion, die essentiell für die schnelle Eindämmung einer Infektion ist. Phagozytische Zellen haben in der ersten akuten Phase einer Infektion eine besondere Bedeutung, da sie eine Vielzahl von Erregern aufnehmen und zerstören können. Diese Zellen werden professionelle Phagozyten genannt und bestehen aus Neutrophilen, Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen (Janeway und Medzhitov, 2002). Unter diesen Zellen sind Neutrophile die wahrscheinlich wichtigsten Zellen in der akuten Phase einer Infektion. Dies bestätigen Berichte über Patienten, welche an einer angeborenen oder erworbenen Neutropenie oder einem Funktionsdefekt der Neutrophilen leiden und dadurch an immer wiederkehrenden, lebensbedrohlichen Infektionen mit Bakterien und Pilzen erkranken (Kaufmann und Steward, 2005). Neutrophile sind die ersten Zellen, die aus der Blutbahn an den Infektionsort rekrutiert werden. Sie gehen aus pluripotenten hematopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark hervor und sind, wenn sie in die Blutbahn entlassen werden, komplett ausdifferenzierte Zellen, ausgestattet mit einem antimikrobiellen Arsenal um Mikroorganismen zu beseitigen. Neutrophile werden auch als PMNs („*polymorphonuclear neutrophils*“) bezeichnet, bezugnehmend auf ihre Morphologie und Anfärbecharakteristika. „Ältere“ Neutrophile besitzen einen einzigartigen polymorphkernigen Nukleus, welcher in 3 – 5 Lappen unterteilt ist und eine Größe von ca. 2 μm im Durchmesser besitzt. Es wird vermutet, dass diese

Anordnung den Nukleus flexibler macht und Neutrophilen damit erlaubt das vaskuläre Endothelium zu passieren (Brinkmann und Zychlinsky, 2007). Frisch aus dem Knochenmark ausgewanderte Neutrophile haben dagegen einen stabförmigen Kern. Ein weiteres morphologisches Kennzeichen der Neutrophilen sind ihre zahlreichen Granula im Zytoplasma. Während der Reifung im Knochenmark werden unterschiedliche Granulatypen angelegt (Borregaard *et al.*, 1995). Diese Granula fungieren als wichtige Reservoirs von antimikrobiellen Proteinen, Proteasen, Komponenten der NADPH-Oxidase, aber auch einer großen Anzahl an Membran-gebundenen Rezeptoren für die endotheliale Adhäsion, extrazelluläre Matrixproteine, bakterielle Produkte und lösliche Entzündungsmediatoren (Faurischou und Borregaard, 2003). Es wird eine Einteilung in drei Granulatypen vorgenommen: primäre oder azurophile Granula entwickeln sich zuerst und enthalten die MPO (Myeloperoxidase), sekundäre oder spezifische Granula entwickeln sich später und werden durch das Fehlen der Peroxidase und der Anwesenheit von Laktoferrin charakterisiert. Tertiäre Granula enthalten einen hohen Anteil an Gelatinase (Borregaard 1997). Desweiteren synthetisieren Neutrophile nur geringe Mengen an RNS und Proteinen und haben im Blut eine kurze Halbwertszeit (ca. 7 h). 50 % der humanen, weißen Blutzellen sind Neutrophile, welche in einem ruhenden Zustand in der Blutbahn zirkulieren (Haen 1995). Während einer Infektion induzieren pro-inflammatorische Mediatoren Veränderungen am vaskulären Endothelium, so dass Neutrophile an ihm entlang rollen, adherieren und es passieren können, um ins darunterliegende Gewebe zu gelangen (Ley *et al.*, 2007). Daraufhin migrieren Neutrophile entlang eines Chemokingradienten bestehend aus dem Komplementspaltprodukt C5a, fMLP („*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine“), IL-8 („interleukin 8“), PAF („platelet activating factor“) oder LTB4 („leukotriene B4“) zur Infektionsstelle (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Im Gewebe migrierende Neutrophile haben eine längerer Lebensdauer (2 – 3 Tage) (Haen 1995).

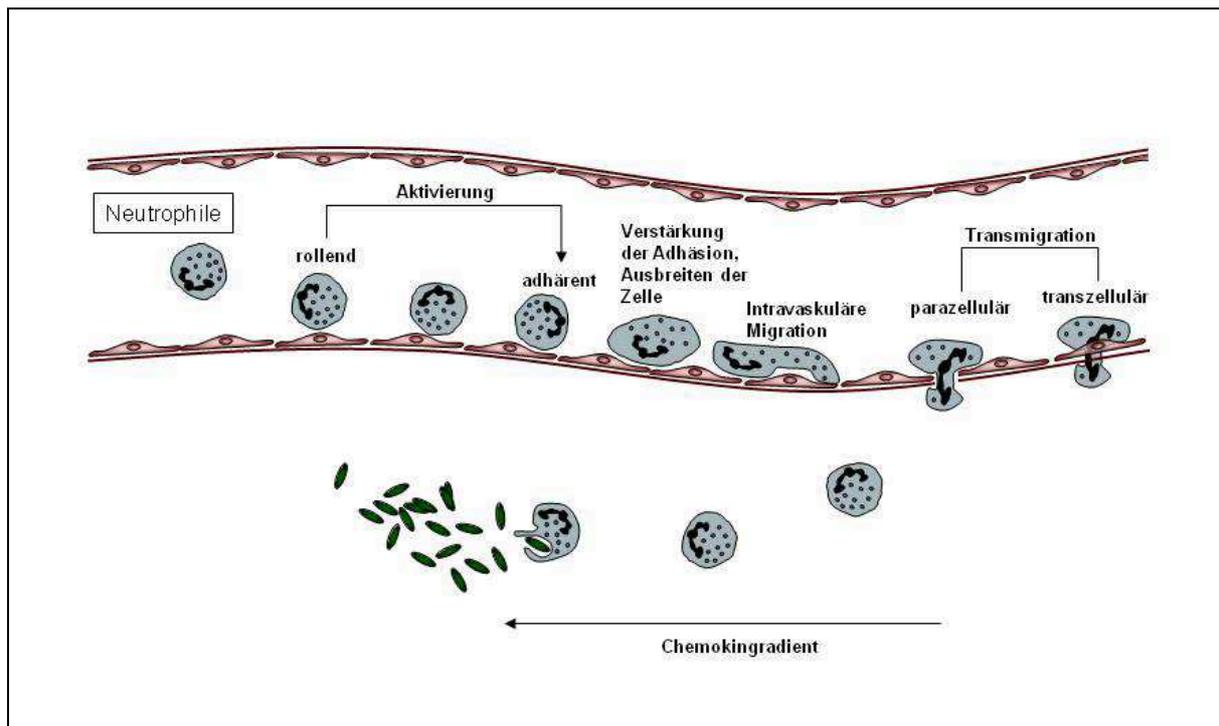


Abb. 1.3 Transmigration von Neutrophilen aus der Blutbahn in das Gewebe zu einem Infektionsherd. Durch die Präsentation von E- und P-Selektinen auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen können Neutrophile über L-Selektine an dem intravaskulären Endothelium entlangrollen. Chemokine und die Signalweitergabe durch Selektine führt zur Integrinaktivierung der Neutrophilen, welche mit Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie (ICAM1 („intercellular adhesion molecule 1“) und VCAM1 („vascular adhesion molecule 1“)) der Endothelzellen interagieren können. Es kommt zum Arrest der Neutrophilen auf dem Endothelium. Daraufhin können Neutrophile die Blutbahn über eine parazelluläre oder transzelluläre Transmigration verlassen und einem Chemokingradienten folgend zum Infektionsherd migrieren (nach Ley *et al.*, 2007, modifiziert).

Am Infektionsherd angekommen werden Erreger direkt von Neutrophilen über TLRs oder, falls mit Komplement (C3b, C4b, iC3b), IgG oder Matrixproteinen (z.B. Fibronectin) opsonisiert, über Complement Rezeptoren (CR1 (CD35), CR3 (Mac-1, $\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18), CR4 ($\alpha_X\beta_2$, CD11c/CD18)), Fc γ Rezeptoren (Fc γ RIIA (CD32) und Fc γ RIIIB (CD16)) oder Integrine (VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$, CD49e/CD29)) erkannt und phagozytiert (Witko-Sarsat *et al.*, 2000, Underhill und Ozinsky 2002; Luo *et al.*, 2007). Das Phagosom fusioniert mit den intrazellulären Granula und zerstört die darin befindlichen Mikroorganismen einerseits durch die Produktion von ROS („reactive oxygen species“) (Sauerstoff-abhängiger Mechanismus) sowie durch antimikrobielle Proteine (Laktoferrin, Lipocalin, Lysozym, α -Defensine, BPI („bactericidal/permeability-increasing protein“), etc.) (Sauerstoff-unabhängiger Mechanismus) (Nathan, 2006).

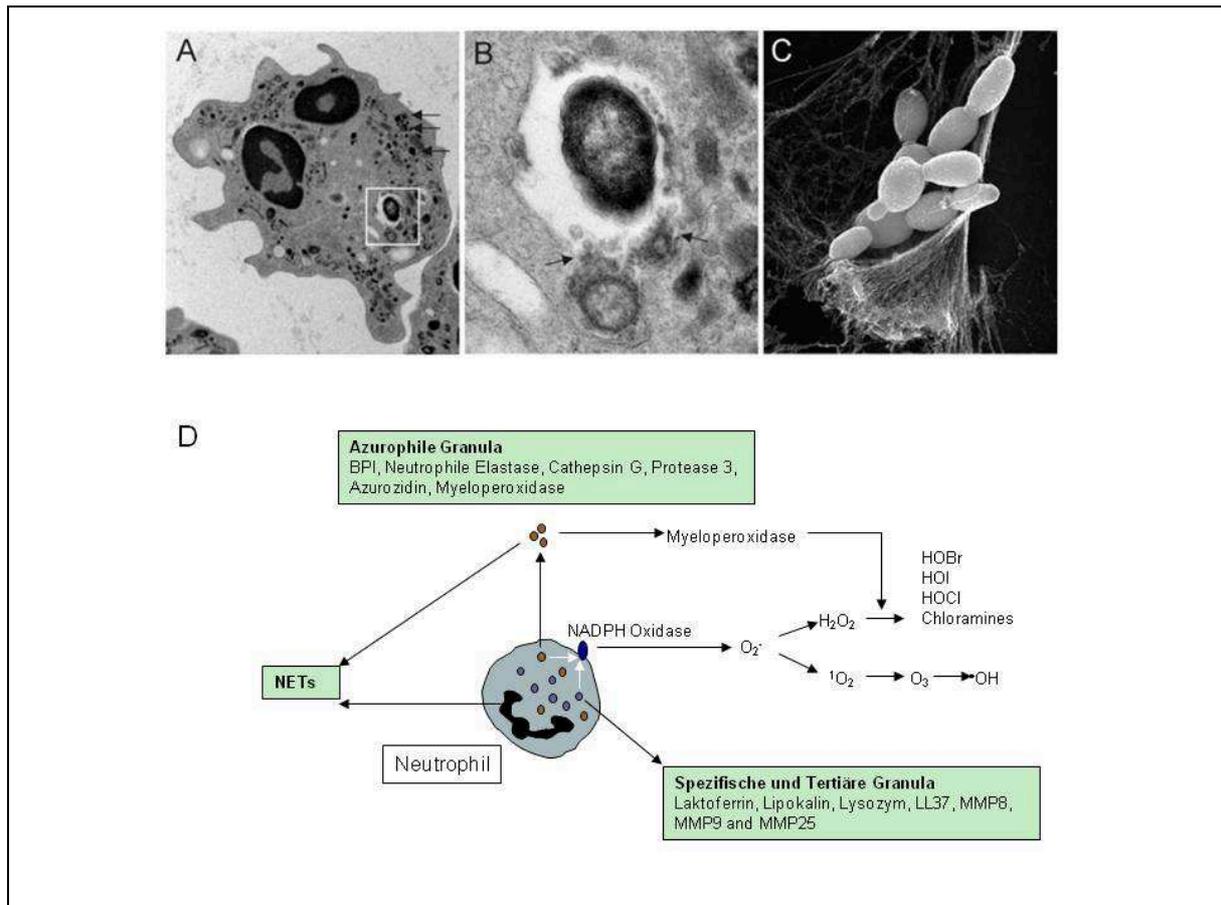


Abb. 1.4 Zusammenfassung antimikrobieller Eigenschaften der Neutrophilen. (A – C) Tötungsmechanismen der Neutrophilen: (A und B) Phagozytose und (C) NETs („nuclear extracellular traps“). (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines humanen Neutrophilen, der ein Bakterium aufgenommen hat. Die Pfeile deuten auf zytoplasmatische Granula. Der Inhalt des weißen Rahmens ist in (B) dargestellt. (B) Ein Bakterium eingeschlossen in einem Phagosom. Die Pfeile zeigen auf Bereiche, an denen Granula ihren Inhalt in das Phagosom abgeben. (C) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Hefezellen von *Candida albicans* gefangen in einem NET. (nach Urban et al., 2006). (D) Antimikrobielle Produkte kommen aus verschiedenen Kompartimenten der Neutrophile: aus azurophilen Granula (primäre Granula), spezifischen Granula (sekundäre Granula), Gelatinase-enhaltenden Granula (tertiäre Granula), der Plasma- und Phagosomenmembran und dem Nukleus. BPI („bactericidal permeability increasing protein“), H_2O_2 (Wasserstoffperoxid), HOBr (hypobromige Säure), HOCl (hypochlorige Säure), HOI (hypoiodige Säure), MMP (Matrixmetalloproteasen), 1O_2 (Singulett-Sauerstoff), O_2^- (Superoxid), O_3 (Ozon), $\cdot OH$ (Hydroxylradikal). (nach Nathan 2006 modifiziert).

Nach Erregerkontakt werden die Neutrophilen aktiviert und es kommt zur Degranulierung (Lehrer und Ganz, 1999), wobei die antimikrobiellen Proteine extrazelluläre Bakterien angreifen können oder Metalloproteasen (MMP8 (Kollagenase), MMP9 (Gelatinase) und MMP25 (Leukolysin)), welche die wichtigsten, strukturellen Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagene, Fibronectin, Proteoglykane und Laminin) abbauen können, freigesetzt werden. MMPs („matrix metalloproteinases“) haben eine zentrale Rolle im Abbau der vaskulären Basalmembran sowie interstitieller Strukturen während der

Neutrophilen-Extravasation und späteren -Migration im Gewebe (Borregaard und Cowland 1997, Owen and Campbell, 1999, Kang *et al.*, 2001). Desweiteren können Neutrophile nach Aktivierung NETs („*nuclear extracellular traps*“) bilden (Brinkmann *et al.*, 2004). NETs bestehen aus Chromatin mit angelagerten Granulaproteinen. Diese Strukturen können Gram-positive, wie Gram-negative Bakterien und Pilze binden (Urban *et al.*, 2006). Die meisten Neutrophile werden nach der Klärung einer Infektion apoptotisch und werden von Makrophagen ohne inflammatorische Reaktion phagozytiert (Savill und Haslett, 1995; Kobayashi *et al.*, 2003). Eine Zusammenstellung der antimikrobiellen Eigenschaften von Neutrophilen ist in Abb. 1.4 dargestellt.

1.4.3 Generierung reaktiver Sauerstoffspezies

Schon in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde ein erhöhter Glukose- und nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch („*respiratory or oxidative burst*“) von Phagozyten, vor allem bei Neutrophilen, während der Phagozytose festgestellt (Baldrige und Gerard, 1933; Sbarra und Karnovsky, 1959). Es zeigte sich, dass aktivierte Neutrophile in ihren Granula ROS („*reactive oxygen species*“) herstellen, welche nach Verschmelzung der Granula mit dem Phagosom effektiv zur Abtötung der Mikroorganismen beitragen und essentiell für ihre Beseitigung sind (Selvaraj und Sbarra, 1966; Babior, 2000). Das Schlüsselenzym der ROS-Produktion ist die Membran-gebundene NADPH-Oxidase („*nicotin-amide adenine dinucleotide phosphate oxidase*“), die ein Elektron von NADPH an der Plasmamembran auf molekularen Sauerstoff überträgt. Somit entsteht das hochreaktive O_2^- (Superoxid) (Clark *et al.*, 1990; Babior, 1982). Superoxid dismutiert entweder spontan oder katalysiert durch eine SOD (Superoxiddismutase) zu H_2O_2 . Das meiste von Neutrophilen produzierte H_2O_2 wird durch die in azurophilen Granula enthaltene MPO (Myeloperoxidase) zur Oxidation von Bromid, Chlorid und Iodid Ionen zur Produktion von HOBr, HOCl und HOI verwendet. Die Reaktion von HOCl mit Aminen erzeugt Chloramine, welche fettlöslich und noch toxischer sind, als das Ausgangsprodukt. Das extrem reaktive $\cdot OH$ (Hydroxylradikal) wird über eine Reduktion von H_2O_2 mit Eisen(II) (Fenton-Reaktion) hergestellt, die ein Teil der Haber-Weiss-Reaktion darstellt. Weitere ROS die in Neutrophilen vorkommen sind 1O_2 (Singulett-Sauerstoff), O_3 (Ozon) und $HOO\cdot$ (Perhydroxylradikal) (Freitas *et al.*, 2009).

1.4.3.1 NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase besteht aus mehreren Komponenten, die in ruhenden Zellen als Membran-gebundene und zytosolische Proteine, vorliegen (Chanock *et al.*, 1994, Babior *et al.*, 1999, El Benna *et al.*, 2005). Die zytosolischen Proteine sind p47phox („*phagocyte oxidase*“), p67phox und p40phox, welche mit der GTPase Rac2 einen Komplex bilden (Groemping *et al.*, 2005). Die Membran-gebundenen Komponenten sind gp91phox („*glycosylated 91 kDa protein*“) auch NOX2 („*NADPH-oxidase 2*“) genannt, und p22phox, die zusammen das Flavocytochrom b_{558} bilden (Vignais, 2002). Die Untereinheit gp91phox ist an der Elektronentransferkette beteiligt und bindet FAD, NADPH und 2 Hämgruppen. Die räumliche Trennung der NADPH-Oxidase-Untereinheiten gewährleistet, dass das Enzym nur in aktivierten Zellen funktionsfähig ist. Werden Neutrophile stimuliert wandern die zytosolischen Komponenten an die Membran, wo sie mit Flavocytochrom b_{558} einen Enzymkomplex, die aktive NADPH-Oxidase, bilden (Abb.1.5) (El Benna *et al.*, 2009). Dieser Prozess ist streng über Protein-Protein-Interaktionen und durch die Phosphorylierung der zytosolischen Untereinheiten reguliert (El Benna *et al.*, 1994; Faust *et al.*, 1995; Quinn und Gauss, 2004; Groemping *et al.*, 2005). In ruhenden Neutrophilen sind 60 – 70 % des Flavocytochrom b_{558} an der Membran der spezifischen Granula, 20 – 25 % an der Membran der tertiären Granula und der übrige Anteil an der Plasmamembran und der Membran sekretorischer Vesikel lokalisiert (Borregarrd *et al.*, 1983; Kjeldsen *et al.*, 1994).

P47phox wird als das organisierende Element der NADPH-Oxidase angesehen, da es dafür verantwortlich ist, den zytosolischen Komplex an die Membran zu bringen (El Benna *et al.*, 2008). Es ist ein 390 AS langes Protein mit einem Molekulargewicht von 44,7 kDa (Lomax *et al.*, 1989; Volpp *et al.*, 1989). P47phox beinhaltet mehrere Proteindomänen: zwei SH3 („*src homology 3*“) Domänen, eine PX („*phox homology*“) Domäne, eine AIR („*autoinhibitory region*“) und eine PRR („*proline-rich region*“) (Abb. 1.6) (Groemping und Rittinger, 2005). Sind Neutrophile im Ruhezustand interagieren die zwei SH3 Domänen intramolekular mit der AIR am C-Terminus des nicht phosphorylierten Proteins und halten p47phox somit in einem autoinhibierten Status (de Mendez *et al.*, 1997; Groemping *et al.*, 2003). Während einer Neutrophilenstimulation, wird p47phox stark phosphoryliert (Segal *et al.*, 1985; Okamura *et al.*, 1988). Dies führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und zur Freigabe der SH3-Domänen, welche daraufhin an die PRR der p22phox binden können (Groemping *et al.*, 2003). Der C-Terminus des p47phox-Proteins enthält multiple Phosphorylierungsstellen, welche sich im Abschnitt 303 bis 379 (Ser303, Ser304, Ser315, Ser320, Ser328, Ser345, Ser348, Ser359, Ser370 und Ser379) befinden (El Benna *et al.*, 1994; El Benna *et al.*, 1996).

Mutationsstudien zufolge ist die Phosphorylierung des Ser379 für die Aktivität der NADPH-Oxidase unabdinglich, wobei eine Einzelmutteration des Ser303, Ser304, Ser328, Ser359 bzw. Ser370 zu einem 50%igem Funktionsverlust der NADPH-Oxidase führt. Zusätzlich wurde durch Doppelmutterationen gezeigt, dass zwei Serinpaare (Ser303 + Ser304 sowie Ser359 + Ser370) für die Aktivität der NADPH-Oxidase nötig sind (Faust *et al.*, 1995; Inanami *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1998). Es wurden weitere Interaktionen weniger definierter p47phox-Domänen mit gp91phox und der p47phox-PX-Domäne mit PI(3,4)-P₂ (Phosphatidylinositol-(3,4)-biphosphat) und Phosphatidsäure beschrieben, welche p47phox zusätzlich an der Zytoplasmamembran gebunden halten.

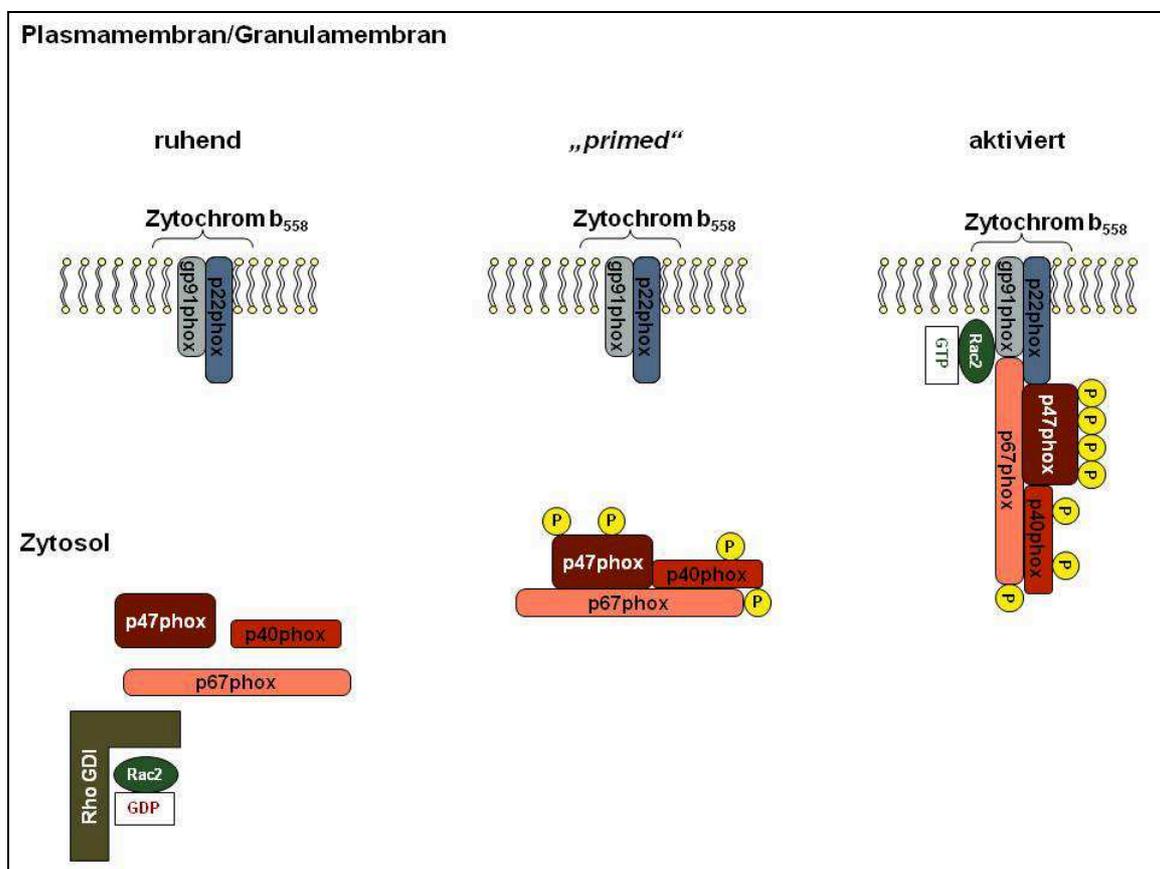


Abb. 1.5 Die Aktivitätsstufen der NADPH-Oxidase. In ruhenden Neutrophilen befinden sich die Membran-gebundenen Untereinheiten der NADPH-Oxidase (gp91phox und p22phox) vor allem in den spezifischen und tertiären Granula. Kommt es zu einer Aktivierung der Neutrophilen können die im Zytosol befindlichen Untereinheiten (p47phox, p40phox und p67phox) von unterschiedlichen Kinasen phosphoryliert werden. Diese bilden mit p29Prx (p29 Peroxiredoxin) einen Komplex und binden zusammen mit Rac2-GTP an Zytochrom b₅₅₈. Kommt es zu einer Vorstimulation der Neutrophilen („priming“) fällt der durch einen sekundären Stimulus ausgelöste „respiratory burst“ stärker aus.

Die p67phox-Untereinheit wird bei einer Aktivierung der Zelle ebenso phosphoryliert, jedoch weniger als p47phox (El Benna *et al.*, 2005). p67phox ist ein 526 AS-langes Protein mit zwei SH3-Domänen, vier Tetratrikopeptid-reichen Regionen, die mit Rac interagieren, einer Aktivierungsdomäne, welche die katalytische Aktivität des Flavocytochrom b₅₅₈ reguliert, einer PB1/PC Domäne, für die Interaktion mit p40phox und einer PRR (Sheppard *et al.*, 2005). P40phox ist ein 339 AS-langes Protein, das durch sein Bindevormögen an p67phox identifiziert wurde (Wientjes *et al.*, 1993) und während einer Neutrophilen Aktivierung kaum phosphoryliert wird (Bouin *et al.*, 1998). Es besitzt eine SH3, eine BP1/BC und eine PX Domäne (Sheppard *et al.*, 2005). P40phox ist nicht notwendig für eine NADPH-Oxidase-Aktivierung in einem zellfreien System, hat jedoch *in vivo* einen positiven Effekt auf die Enzymaktivität. Im Gegensatz dazu sind p47phox, p67phox, Rac1/2 und Flavocytochrom b₅₅₈ essentiell für eine Aktivierung der NADPH-Oxidase in einem zellfreien System wie auch in intakten Zellen (El Benna *et al.*, 2008).

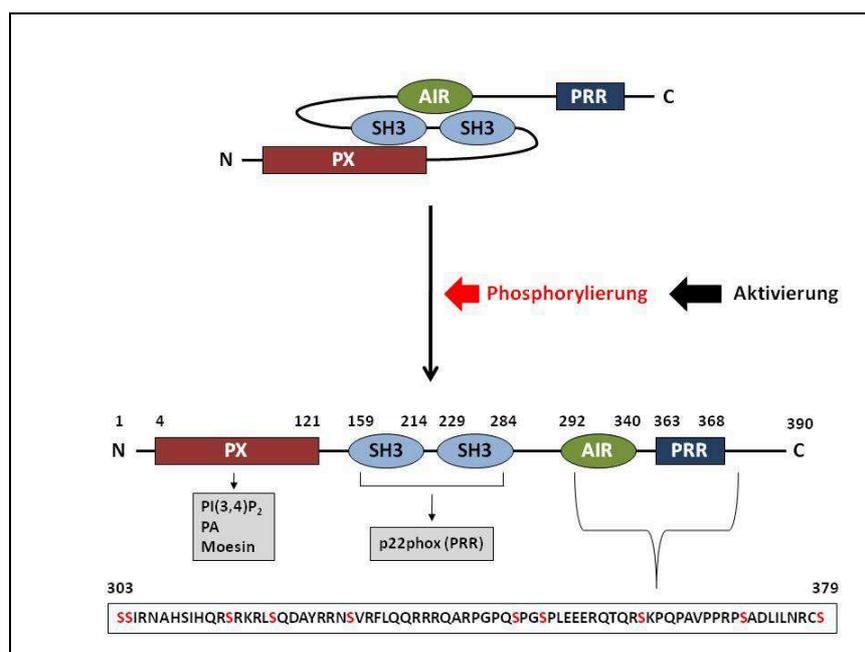


Abb. 1.6 Aktivierung der NADPH-Oxidase Untereinheit p47phox. p47phox besteht aus 390 AS und enthält eine PX („*phox homology*“) Domäne (AS 4 - 121), zwei SH3 („*src homology 3*“) Domänen (AS 159 – 214 (SH3A) und AS 229 – 284 (SH3B)), eine AIR („*autoinhibitory region*“) (AS 292 - 340) und eine PRR („*proline-rich region*“) (AS 363 - 368). Die Phosphorylierung von p47phox induziert eine Konformationsänderung und verändert damit die Interaktion der p47phox-Domänen. Die C-terminale Region beinhaltet 10 mögliche Phosphorylierungsstellen (Serinreste (S) sind in rot hervorgehoben). Im Ruhezustand interagieren zwei p47phox-SH3 Domänen mit der C-terminalen AIR, um das Protein in einem autoinhibierten Modus zu halten. Wird dieser Zustand durch eine Aktivierung und eine darauf folgende Phosphorylierung aufgehoben, können die p47phox-SH3-Domänen an die PRR des p22phox und die p47phox-PX Domäne an

PI(3,4)P₂ (Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat), PA (Phosphatidsäure) und Moesin binden (nach El Benna *et al.*, 2009, modifiziert).

Verschiedene Proteinkinasen wurden mit der Aktivierung der NADPH-Oxidase in Verbindung gebracht. *In vitro* kann p47phox an selektiven Serinen von verschiedenen Proteinkinasen (PKC α , β , γ und ζ ; PKA; Erk2; p38; CKII; AKT; IRAK-4, PAK, src Kinase) phosphoryliert werden. *In vivo* ist eine Kombination aus unterschiedlichen Kinasen (je nach Agonist) an der Phosphorylierung von p47phox und anderen NADPH-Oxidase-Untereinheiten beteiligt. Kinasen, die in intakten Zellen stimulierend wirken sind: PKC β , PKC ζ , PAK, AKT, Erk1/2 und p38 (El Benna *et al.*, 2009).

Die Superoxidproduktion der NADPH-Oxidase kann durch eine vorausgegangene Stimulation („*priming*“) oder Behandlung mit bestimmten Agenzien („*priming agents*“) zu einer erhöhten Superoxidproduktion führen. Diese Agenzien induzieren entweder eine schwache oder gar keine ROS Produktion, jedoch erhöhen sie diese nach einer Exposition mit einem zweiten Stimulus (z.B. fMLP oder Substanzen, die von sich aus keine ROS Produktion auslösen würden) beträchtlich. Es gibt eine Vielzahl von „*priming*“ Produkten, darunter fallen Zytokine (TNF α , GM-CSF, IL-1 β , IL-8, IL-15, IL-18), TLR Agonisten (LPS, Lipoarabinomannane, Lipopeptide, Flagellin, R848, Zymosan), Chemokine (fMLP, C5a, LTB₄, PAF), Kinase-Aktivatoren (z.B. PMA), Kalziumionophore (z.B. A23187), Hemmer des Zytoskelets (z.B. Cytochalasin B) und andere Agenzien (Peroxynitrit, Proteasen, Fibronectin, Substanz P) (El Benna *et al.* 2008). Diese unterscheiden sich in ihrer Effektstärke, ihrer Wirkungszeit, der Signalkaskade, die sie auslösen und dem Effekt, den sie auf die Untereinheiten der NADPH-Oxidase (Phosphorylierungsgrad, Translokation zur Plasmamembran) und die zytoplasmatischen Granula (Degranulierung, Phagosomenbildung) haben (Sheppard *et al.*, 2005). Zusätzlich ist die Konzentration der „*priming*“ Produkte von Bedeutung. Für p47phox konnte ein bestimmtes Serin (S345) nach Stimulation mit TNF- α oder GM-CSF als kritische „*priming*“ Stelle identifiziert werden (Dang *et al.*, 2006).

Die Notwendigkeit einer streng regulierten ROS-Produktion ist an zwei Krankheiten gut ersichtlich. Bei der ALI („*acute lung injury*“) sind Neutrophile an der Pathogenese maßgeblich beteiligt in dem ihre aggressiven ROS körpereigene Strukturen schädigen (Wittels *et al.*, 1974; Ratliff *et al.*, 1971). Die CGD („*chronic granulomatous disease*“) hingegen ist durch das Fehlen der ROS Produktion gekennzeichnet. Dies ist bedingt durch einen Defekt in Genen, welche für die Synthese bestimmter NADPH-Oxidase Untereinheiten kodieren. Das führt bei Betroffenen zu massiven Infektionen mit Bakterien und Pilzen, die sich ohne medikamentöse Behandlung im Körper ungehindert ausbreiten können (Holmes *et al.*, 1967; Roos *et al.*, 1996).

1.5 Ziel der Arbeit

In Patienten mit schweren Grunderkrankungen, wie hämolytischer Anämie oder Hämochromatose, kann es zu einer Septikämie mit YALs (*Yersinia*-Abszess-ähnlichen Läsionen) in Leber und Milz kommen. Auch oral infizierte Mäuse mit *Y. enterocolitica* zeigen YALs in Leber, Milz und den Peyer Plaques. Histologische Untersuchungen zeigen, dass diese YALs aus dicht gepackten extrazellulären *Yersinia*-Mikrokolonien und Neutrophilen bestehen (Carter, 1975; Authenrieth *et al.*, 1993). Die extrazelluläre Replikation von *Y. enterocolitica* wird durch die T3SS-vermittelte Injektion von Yops in phagozytische Zellen der angeborenen Immunantwort ermöglicht. In dieser Arbeit sollte, der Einfluss der Yersinien-Virulenzfaktoren auf die Produktion von ROS in humanen und murinen Neutrophilen untersucht werden. Frühere Studien haben YopH und YopE (Bliska und Black, 1995; Green *et al.*, 1995, Ruckdeschel *et al.*, 1996, Songsunghong *et al.*, 2010) inhibitorische Aktivitäten für die ROS-Produktion zugeschrieben (Proteintyrosinphosphatase YopH, RhoGTPasen aktivierende GTPase (GAP) YopE). Da inzwischen bekannt ist, dass YopP MAP-Kinasenkinasen durch Azetylierung von Serin- und Threoninresten inaktiviert und YopT RhoGTPasen durch proteolytische Abspaltung des C-terminalen Prenyl-Cysteinrestes inhibiert, sollte die Wirkung dieser Yops auf die ROS-Produktion von Neutrophilen untersucht werden. Darüberhinaus sollte die Rolle der Adhäsine YadA und Inv in der Interaktion und ROS-Bildung von Neutrophilen geklärt werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit sollte zur Etablierung eines flexiblen 3D-Kollagen-Matrixsystems führen, um die Interaktion von humanen und murinen Phagozyten mit Yersinien unter Gewebe-ähnlichen Bedingungen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

2.1.1 *E. coli* Stämme

Tab. 2.1 Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5a	<i>E. coli endA1 supE44 hsdR17</i> ($r_k m^+ k$) <i>thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 ($\phi 80lacZ\Delta M15$)	Hanahan, 1983

2.1.2 *Y. enterocolitica* Stämme

Tab. 2.2 Verwendete *Y. enterocolitica* Stämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
WA-314	klinisches Isolat des Serotyp O:8; trägt das Virulenzplasmid pYVO8	Heesemann <i>et al.</i> , 1983
WA-C	pYVO8 ^r Derivat von WA-314	Heesemann <i>et al.</i> , 1983
WA(pT3SS)	WA-C mit pT3SS Plasmid, SH ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
WA(pT3SS, pYopE)	WA(pT3SS) mit pYopE; SH ^R + Cm ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
WA(pT3SS, pYopH)	WA(pT3SS) mit pYopH; SH ^R + Cm ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
WA(pT3SS, pYopM)	WA(pT3SS) mit pYopM; SH ^R + Cm ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
WA(pT3SS, pYopO)	WA(pT3SS) mit pYopO; SH ^R + Cm ^R	Konrad Trülzsch, MvPI München
WA(pT3SS, pYopOP)	WA(pT3SS) mit pYopOP; SH ^R + Cm ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
WA(pT3SS, pYopQ)	WA(pT3SS) mit pYopQ; SH ^R + Cm ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
WA(pT3SS, pYopT)	WA(pT3SS) mit pYopT; SH ^R + Cm ^R	diese Arbeit
WA(pYVΔE)	WA-C mit pYVΔE, Km ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2004
WA(pYVΔH)	WA-C mit pYVΔH, Km ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2004
WA(pYVΔM)	WA-C mit pYVΔM, Km ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2004
WA(pYVΔO)	WA-C mit pYVΔO, Km ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2004
WA(pYVΔP)	WA-C mit pYVΔP, Km ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2004
WA(pYVΔQ)	WA-C mit pYVΔQ, Km ^R	Konrad Trülzsch, MvPI München
WA(pYVΔT)	WA-C mit pYVΔT, Km ^R	Trulzsch <i>et al.</i> , 2004

WA(pRFP)	WA-C mit pRFP, Cm ^R	Sandra Freund, MvPI München
WA(pGFP)	WA-C mit pGFP, Cm ^R	Sandra Freund, MvPI München
WA(pYV, pRFP)	WA-C mit pYV mit pRFP, Cm ^R	Konrad Trülsch, MvPI München
WA(pYV, pGFP)	WA-C mit pYV mit pGFP, Cm ^R	Sandra Freund, MvPI München
WA(pYVΔlcrD)	WA-C mit pYVΔlcrD mit pRFP, Km ^R + Cm ^R	Konrad Trülsch, MvPI München
WA(pYVΔyadA, pRFP)	WA-C mit pYVΔyadA mit pRFP, Km ^R + Cm ^R	Konrad Trülsch, MvPI München
WA(pYVΔE, pRFP)	WA-C mit pYVΔE mit pRFP, Km ^R + Cm ^R	Konrad Trülsch, MvPI München
WA(pYVΔH, pRFP)	WA-C mit pYVΔH mit pRFP, Km ^R + Cm ^R	Konrad Trülsch, MvPI München
WA(pYVΔM, pRFP)	WA-C mit pYVΔM mit pRFP, Km ^R + Cm ^R	Konrad Trülsch, MvPI München
WA(pYVΔO, pRFP)	WA-C mit pYVΔO mit pRFP, Km ^R + Cm ^R	Konrad Trülsch, MvPI München
WA(pYVΔP, pRFP)	WA-C mit pYVΔP mit pRFP, Km ^R + Cm ^R	Konrad Trülsch, MvPI München
WA(pYVΔQ, pRFP)	WA-C mit pYVΔQ mit pRFP, Km ^R + Cm ^R	Konrad Trülsch, MvPI München
WA(pYVΔT, pRFP)	WA-C mit pYVΔT mit pRFP, Km ^R + Cm ^R	Konrad Trülsch, MvPI München
WA(pYVΔlcrD)	WA-C mit pYVΔlcrD, Kana ^R	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 1996
WA(pYVΔyadA)	WA-C mit pYVΔyadA, Kana ^R	Roggenkamp <i>et al.</i> , 1995
WAΔmyf(pYV-tet)	Myf-negative Mutante von WA-C mit pYV-tet, Cm ^R + Tet ^R	Sandra Freund, MvPI München
WAΔinv(pYV)	Invasin-negative Mutante von WA-C mit pYV, Kana ^R	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 1996
WAΔinv(pYVΔyadA)	WA314 defekt in tonB, ohne Invasin, nur Signalsequenz von YadA, Kana ^R , Spec ^R	Virginie Nägele, MvPI München
WAΔinv(pyadA)	WA-CΔinv mit pACYC184:virF mit yadA bp 1-1266 (AS 1-422) über XbaI und BamHI, Cm	Virginie Nägele, MvPI München
WAΔinv	Invasin-negative Mutante von WA-C, Km ^R	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 1996
WAΔmyf	Myf-negative Mutante von WA-C, Cm ^R	Sandra Freund, MvPI München

2.1.3 Plasmide

Tab. 2.3 Liste der Plasmide die zur Transformation von *E. coli* und *Y. enterocolitica* Stämmen verwendet wurden.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pYV	Virulenzplasmid von WA-314	Heesemann <i>et al.</i> , 1983
pYV-tet	Virulenzplasmid von WA314 mit Tet ^R	Sandra Freund, MvPI München
pYVΔ <i>yad</i>	pYVO8, <i>yadA</i> ⁻ , Km ^R -Kassette inseriert in die PstI Schnittstelle des <i>yadA</i>	Roggenkamp <i>et al.</i> , 1995
pYVΔ <i>lcrD</i>	pVYO8 mit Tn5 insertionaler Inaktivierung von <i>lcrD</i>	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 1996
pACYC184	Klonierungsvektor mit geringer Kopien Anzahl pro Zelle, Cm ^R , Tet ^R	Chang und Cohen, 1978
pVirF	pACYC184 mit <i>virF</i> von WA-314 (151 bp vor <i>virF</i> und 86 bp nach <i>virF</i>) über SalI/SphI, Cm ^R	Virginie Nägele, MvPI München
pT3SS	pLAFRII mit 30 kb Sal Fragment von pLCR mit ORF91B ersetzt durch Kan ^R , 2 kb BamHI <i>yadA</i> Fragment und 1,8 kb HindIII, SH ^R	Trülsch <i>et al.</i> , 2003
pYopE	<i>yopE</i> PCR Fragment inseriert in die HindIII Schnittstelle von pACYC184, SH ^R	Trülsch <i>et al.</i> , 2003
pYopH	<i>yopH</i> PCR Fragment inseriert in die HindIII Schnittstelle von pACYC184, SH ^R	Trülsch <i>et al.</i> , 2003
pYopM	<i>yopM</i> PCR Fragment inseriert in die HindIII Schnittstelle von pACYC184, ohne ORF91B, SH ^R	Trülsch <i>et al.</i> , 2003
pYopO	<i>yopO</i> PCR inseriert in die SalI-SphI Schnittstelle von pACYC184, SH ^R	Trülsch <i>et al.</i> , 2003
pYopOP	<i>yopO-P-sycO</i> PCR inseriert in die SalI-SphI Schnittstelle von pACYC184, SH ^R	Trülsch <i>et al.</i> , 2003
pYopQ	<i>yopQ</i> PCR Fragment inseriert in die SalI-HindIII Schnittstelle von pACYC184, SH ^R	Trülsch <i>et al.</i> , 2003

pYopT	pACYC184 mit <i>yopT</i> <i>sycT</i> von WA-314 (239 bp vor <i>YopT</i> und 68 bp nach <i>sycT</i>) über XbaI-SaII, SH ^R	diese Arbeit
pYVΔE	pYVO8 mit <i>yopE</i> ersetzt durch Km ^R -Kassette von pACYC177	Trülsch <i>et al.</i> , 2004
pYVΔH	pYVO8 mit <i>yopH</i> ersetzt durch Km ^R -Kassette von pACYC177	Trülsch <i>et al.</i> , 2004
pYVΔM	pYVO8 mit <i>yopM</i> ersetzt durch Km ^R -Kassette von pUC4k	Trülsch <i>et al.</i> , 2004
pYVΔO	pYVO8 mit <i>yopO</i> ersetzt durch Km ^R -Kassette von pACYC177	Trülsch <i>et al.</i> , 2004
pYVΔP	pYVO8 mit <i>yopP</i> ersetzt durch Km ^R -Kassette von pACYC177	Trülsch <i>et al.</i> , 2004
pYVΔQ	pYVO8 mit <i>yopQ</i> ohne die ersten 150 bp ersetzt durch Km ^R -Kassette von pACYC177	Konrad Trülsch, MvPI München
pYVΔT	pYVO8 mit <i>yopT</i> ersetzt durch Km ^R -Kassette von pACYC177	Trülsch <i>et al.</i> , 2004
pRFP	pACYC184 mit <i>rfp</i> aus pDSredexpress, <i>rfp</i> unter dem <i>lac</i> Promotor, Cm ^R	BD Clontech (Mountain View)
pGFP	pACYC184 mit <i>gfpmut2</i> aus pGFPmut2, <i>gfp</i> unter dem <i>lac</i> Promotor, Cm ^R	Cormack <i>et al.</i> , 1996

2.2 Oligonukleotide

Die in Tabelle 2.4 aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm, Deutschland) hergestellt. Die lyophilisierten und entsalzten Oligonukleotide wurden in sterilem, nukleasefreiem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (pH 7) gelöst und in einer Konzentration von 100 μM (100 pmol/ μl) bei -20°C gelagert.

Tab. 2.4 Verwendete Oligonucleotide. f: Forwärtsprimer. r: Rückwärtsprimer. Restriktionsschnittstellen in der Nukleotidsequenz sind unterstrichen dargestellt. T_M bezeichnet die berechnete Schmelztemperatur in $^\circ\text{C}$.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T_M [$^\circ\text{C}$]	Verwendung
pYV-IP32953-29282-XbaI-f	AAT <u>CTA GAT</u> AAC ATG ACT GTC CCC ATA AG	55,8	Amplifizierung von <i>yopT_{syncT}</i> aus pYVO8
pVYe8081-4746-SalI-r	TAT <u>GTC GAC</u> CAA ATG AGT TAT TAT ATA AAC CAT AT	57,8	Amplifizierung von <i>yopT_{syncT}</i> aus pYVO8
pACYC184-1356-f	CAG AGC AAG AGA TTA CGC GCAG	55,0	Verifizierung einer Insertion in pACYC184
pACYC184-2312-r	GCG ACA GGC CGA TCA TCG TCG CGC	63,9	Verifizierung einer Insertion in pACYC184

2.3 Nährmedien

Die unten aufgeführten Nährmedien wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ angesetzt und anschließend bei 1 bar und 121°C für 15 min autoklaviert.

Luria-Bertani (LB)-Medium

Bacto-Trypton, pH 7,4	10 g/L
Bacto-Hefeextract	5 g/L
NaCl	5 g/L

LB-Agar

LB-Medium mit 15g/L Bacto-Agar

Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium

36 g/L

Einfriermedium

LB-Medium mit 20% Glycerin

SOC-Medium

Bacto-Trypton, pH 7,0	20 g/L
Bacto-Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	0,5 g/L
KCl	250 mM
Glukose (sterilfiltriert)	20 mM

2.4 Antibiotika

Tab. 2.5 Liste der verwendeten Antibiotika und ihre eingesetzten Endkonzentrationen.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	100 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Kanamycin (Km)	50 mg/ml	50 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Tetrazyklin (Tet)	2 mg/ml	20 µg/ml	70% Ethanol
Spectinomycin (Spec)	100 mg/ml	100 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Chloramphenicol (Cm)	20 mg/ml	20 µg/ml	70% Ethanol
Nalidixinsäure (Nal)	60 mg/ml	60 µg/ml	0,5 M NaOH

2.5 Antikörper

Tab. 2.6 Liste der verwendeten Antikörper und ihre eingesetzten Verdünnungen bzw. Konzentrationen.

WB: Westernblot-Anwendung, IF: Immunfluoreszenz-Anwendung, FC: Durchflusszytometrische Anwendung, IA: Inhibierende Anwendung

Antikörper	Eingesetzte Verdünnungen /Konzentrationen	Quelle/Firma
<i>Unkonjugierte Primärantikörper</i>		
Maus anti-YadA 8D1 monoklonaler Antikörper (Epitop: YadA-Stiel-domäne AS-290 – 330)	1:1000 (WB), 1:200 (IF)	Roggenkamp <i>et al.</i> , 2003
Ratte anti-human β_1 Integrin (A1B2) Antikörper (blockierende Funktion)	1:40 (FC), unverdünnt (IA)	Louisa F. Jiménez-Soto, MvPI München
Maus anti-human β_2 Integrin (P4H9) Antikörper (blockierende Funktion)	2 µg / 10 ⁶ Zellen (IA)	Millipore (Schwalbach)
Maus anti-human p47phox (AS 18 – 197) Antikörper	1:200 (WB, IF)	BD Bioscience (Heidelberg)

Kaninchen anti-human p47phox Antiserum (Immunogen: GST-Fusionsprotein des gesamten humanen p47phox Proteins)	1:2000 (WB)	Millipore (Schwalbach)
Kaninchen anti-human phospho-Ser345-p47phox (AS 339 – 350)	1:1000 (WB)	Jamel El-Benna, Université Paris
Ratte anti-Maus CD16/32 Antikörper (blockiert Fc Bindung)	1 µg / 10 ⁶ Zellen (FC)	eBioscience (Frankfurt)
Kaninchen anti-Myf-Antiserum	1:1000 (WB)	Jürgen Heesemann, MvPI München
Kaninchen anti-Invasin-Antiserum	1:1000 (WB)	Ingo Autenrieth (Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, Universitätskrankenhaus Tübingen)
Kaninchen anti-YopE-Antiserum	1:10000 (WB)	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
Kaninchen anti-YopH-Antiserum	1:1000 (WB)	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
Kaninchen anti-YopM-Antiserum	1:1000 (WB)	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
Kaninchen anti-YopO-Antiserum	1:1000 (WB)	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
Kaninchen anti-YopP-Antiserum	1:1000 (WB)	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
Kaninchen anti-YopQ-Antiserum	1:1000 (WB)	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
Kaninchen anti-YopT-Antiserum	1:1000 (WB)	Trulzsch <i>et al.</i> , 2003
Kaninchen anti-human p38 MAP Kinase	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology (Danvers)
Kaninchen anti-human phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antikörper	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology (Danvers)
Kaninchen anti-Ratte p44/42 MAPK (Erk1/2) Antikörper	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology (Danvers)
Maus anti-human phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) monoklonaler Antikörper	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology (Danvers)
Kaninchen anti-human SAPK/JNK Antikörper	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology (Danvers)
Kaninchen anti-human phospho-SAP/JNK (Thr183/Tyr185) Antikörper	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology (Danvers)
Maus anti-β-Aktin Antikörper	1:1000 (WB)	GenScript (Piscataway)
<i>Enzymkonjugierte Sekundärantikörper</i>		
Esel anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat	1:10 000 (WB)	GE Healthcare (München)
Schaf anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat	1:10 000 (WB)	GE Healthcare

Maus anti-β-Aktin IgG2a Peroxidase-Konjugat	1:1000 (WB)	GenScript (Piscataway)
<i>Fluorochromkonjugierte Antikörper</i>		
Hamster anti-Ratte CD29 (β_1 Integrin) FITC-Konjugat	1:60 (FC)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Maus anti-human CD18 (β_2 Integrin) PE-Konjugat	1:25 (FC)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Ratte anti-Maus Ly6G APC-Konjugat	40 ng / 10^6 Zellen (FC)	BD Bioscience (Heidelberg)
Ratte anti-Maus Ly6G PE-Konjugat	40 ng / 10^6 Zellen (FC)	BD Bioscience (Heidelberg)
Ratte anti-Maus F4/80 PE-Cy5-Konjugat	1 μ g / 10^6 Zellen (FC)	eBioscience (Frankfurt)
Maus anti-human CD66abce APC-Konjugat	1:100 (FC)	Milteny Biotec (Bergisch Gladbach)
Maus anti-human CD16 PE-Konjugat	1:100 (FC)	Milteny Biotec (Bergisch Gladbach)
Schaf Anti Maus IgG FITC-Konjugat	1:200 (IF)	Jackson ImmunoResearch (Chester)

2.6 Enzyme, Molekulargewicht- und DNS-Längenstandards

Tab. 2.7 Verwendete Enzyme, Gewicht und Längenstandards.

Enzyme, Gewicht- und Längenstandards	Firma
Bench Mark Prestained Potein Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen (Karlsruhe)
O'Gene RulerTM 1 kb DNA Ladder	Fermentas (St Leon Rot)
Expand High Fidelity PCR System	RocheDiagnostics (Mannheim)
Pfu-Polymerase	Fermentas (St. Leon Rot)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St Leon Rot)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St Leon Rot)

2.7 Inhibitoren

In Tab. 2.8 sind die verwendeten chemischen Inhibitoren und ihre Hemmwirkungen auf spezifische zelluläre Komponenten aufgeführt. Die Konzentration bezieht sich auf die eingesetzte Menge im Experiment.

Tab. 2.8 Liste der verwendeten chemischen Inhibitoren.

Inhibitor	Konzentration	Zielstruktur	Firma
Cytochalasin D	10 μ M	Aktin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
AG18	80 μ M	Tyrosin-spezifische Proteinkinasen	Calbiochem (Darmstadt)
Piceatannol	30 μ M	Syk Kinase	Calbiochem (Darmstadt)
Genistein	10 μ M	Tyrosin-spezifische Proteinkinasen	Sigma_Aldrich (Taufkirchen)
SB203580	10 μ M	p38 Kinase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Wortmannin	1 μ M	PI-3-Kinase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PD98059	50 μ M	MEK1	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

2.8 Molekularbiologische Kits

Die in Tab. 2.9 angegebenen molekularbiologischen Kits wurden zur Plasmid-Isolierung, Extraktion von DNS aus dem Agarosegel, sowie zur Reinigung von PCR-Produkten verwendet.

Tab. 2.9 Verwendete Molekularbiologische Kits.

Kits	Firma
QIAGEN Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
Plasmid DNA Purification Nucleo Bond PC100	Machery-Nagel (Düren)
PCR Clean up, Gel-Extraction Kit Nucleo Spin Extract II	Machery-Nagel (Düren)

2.9 Zellkulturen

2.9.1 Primäre Zellen und Zelllinien

Tab. 2.10 Verwendete eukaryotische Zelllinien und primär Zellen.

Zelllinie/primär Zellen	Zelltyp	Referenz
HL60	Humane akute promyeloide Leukämiezelllinie	Collins et al., 1977
J774A.1	murine Monozyten-Makrophagen- Zelllinie	Ralph <i>et al.</i> , 1976
BMDM	„bone marrow derived macrophages“, aus murinem Knochenmark differenzierte Makrophagen	MvPI München

2.9.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Tab. 2.11 Verwendete Zellkultur und Einfriermedien für eukaryotische Zelllinien und primär Zellen.

Zelllinie	Zellkulturmedium	Einfriermedium
HL60	90 % RPMI 1640 Superior 10 % FCS Superior	70 % RPMI 1640 Superior 20 % FCS Superior 10 % DMSO
J774A.1	90 % D-MEM 10 % FCS	70 % D-MEM 20 % FCS 10 % DMSO
BMDM	82 % D-MEM (4,5g/l Glucose) 10 % FCS 5 % Pferdeserum 1 % Hapes 1 % Na-Pyruvat 1% L-Glutamin 2 ng/ml M-CSF	-

2.10 Puffer und Lösungen

2.10.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische und genetische Methoden

TAE-Puffer für die Agarosegelelektrophorese

Tris	40 mM
Essigsäure	40 mM
EDTA	1 mM

10 x DNA-Probenpuffer

Glycerin	50 %
EDTA	0,1 M
SDS	1 %
Bromphenolblau	0,1 %

Puffer zur Herstellung Ca²⁺-kompetenter Bakterien

TfbI-Puffer

Kaliumacetat	30 mM
RbCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
MnCl ₂	50 mM

Der Puffer wurde auf einen pH von 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt, mit 15 % Glycerin versetzt und sterilfiltriert. Der Puffer muss vor Gebrauch immer frisch hergestellt werden.

TfbII-Puffer

MOPS	10 mM
CaCl ₂	75mM
RbCl ₂	10 mM

Der Puffer wurde auf einen pH 6,5 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt, mit 15 % Glycerin versetzt und sterilfiltriert. Der Puffer muss vor Gebrauch immer frisch hergestellt werden.

2.10.2 Puffer und Lösungen für biochemische und analytische Methoden

2 x SDS-Probenpuffer

Tris-HCl, pH 6,8	125 mM
SDS	4%
Glycerin	20%
β -Mercaptoethanol	12%
Bromphenolblau	0,01%

6 x SDS-Probenpuffer

Tris-HCl, pH 6,8	375 mM
SDS	12%
Glycerin	60%
β -Mercaptoethanol	6%
Bromphenolblau	0,03%

Nicht-denaturierender PMN-Lysepuffer

Tris-HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	150 mM
Sucrose	0,25 M
EGTA	5 mM
Protease Inhibitor Cocktail	1 ml
Triton-X100	0,5%
NaF	25 mM
Na_3VO_4	5 mM
β -Glycerophosphate	5 mM
DNase I	1mg/ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	ad 10 ml

Denaturierender PMN-Lysepuffer

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	2%
Amidosulfobetain-14	2%
Tributylphosphin	2 mM
Tris	20 Mm
Carrier Ampholyte	2%

8,2 g Harnstoff und 3 g Thioharnstoff werden in 20 ml H_2O_{dest} gelöst und 0,2 g Serolit zugegeben. Nach 10 min rühren wird die Lösung gefiltert. Zu dieser Lösung werden 0,4 g CHAPS, 0,4 g Amidosulfobetain-14, 200 μ l Tributylphosphin, 50 mg Tris und 400 μ l Carrier Ampholyte zugegeben und mit H_2O_{dest} auf 20 ml aufgefüllt. In 1 ml Portionen bei $-80^\circ C$ lagern.

10 x SDS-Laufpuffer Für SDS-PAGE

Tris	60 g
Glycin	288 g
SDS	20 g
H_2O_{dest}	ad 2 l

Rehydratisierungslösung für die 2D-Gelelektrophorese

Harnstoff	8 M
CHAPS	2 %
DTT	0,4 %
Carrier Ampholyte	0,5 %

24 g Harnstoff werden in 50 ml H_2O_{dest} gelöst und 0,5 g Serdolit werden zugegeben. Nach 10 min rühren wird die Lösung gefiltert. Zu 48 ml dieser Lösung 1,0 g CHAPS, 250 μ l Träger Ampholyte und einige Körnchen Bromphenolblau zugeben und mit H_2O_{dest} auf 50 ml auffüllen. 2 ml Portionen bei $-80^\circ C$ lagern. Unmittelbar vor der Verwendung wurden 5,6 mg DTT zugegeben.

Äquibrierungs-Puffer für die 2D-Gelelektrophorese

Urea	180g
Glycerin	150 g
SDS	10 g
1,5 M Tris pH 8,8	16,7 ml
H ₂ O _{dest}	ad 500 ml

Puffer für die 2D-Gelelektrophorese

Puffer I Äquibrierungs-Puffer mit 1 % (w/v) DTT

Puffer II Äquibrierungs-Puffer mit 4 % (w/v) Iodacetamid

Agaroseabdichtlösung 0,5 % Agarose in SDS-Laufpuffer
einige Körnchen Bromphenolblau

Coomassie-Lösung zur Färbung von SDS-Gelen

Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
Coomassie Brilliant Blau (CCB) R	0,15 %
H ₂ O _{dest}	ad 1 l

Entfärbelösung für SDS-Gele

Methanol	500 ml
Essigsäure	75 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1 l

Lösungen für die kolloidale Coomassiefärbung nach Neuhoff *et. al.* (1975)**Lösung A**

ortho-Phosphorsäure	2 % (v/v)
Ammoniumsulfat	10 % (w/v)

Zu 768 ml H₂O_{dest} wurden 16 ml ortho-Phosphorsäure gegeben und anschließend 80 g Ammoniumsulfat darin gelöst.

Lösung B

Coomassie Brilliant Blau (CBB) 250G	5 %
--	-----

Es wurde 1 g CBB 250G in 20 ml H₂O_{dest} gelöst.

Lösung C

16 ml Lösung B in Lösung A geben.

Lösung D

CBB 250G	0,08 %
ortho-Phosphorsäure	1,6 %
Ammoniumsulfat	8 %
Methanol	20 %

Unmittelbar vor dem Gebrauch 200 ml Methanol zu Lösung C geben.

Ponceau S Lösung zur reversible Färbung von Proteinen immobilisiert auf PVDF- oder Nitrozellulosemembranen

Ponceau S	0,2 %
Essigsäure	0,2 %

10 x Blotting-Puffer für Westernblot

Tris	60,6 g
Glycin	138,2 g
H ₂ O _{dest}	ad 2 l

Westernblot (Semi-Dry)**Anoden-Lösung I – pH 10,5**

Tris	36,3 g
Methanol	200 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1 l

Anoden-Lösung II – pH 10,4

Tris	3,03 g
Methanol	200 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1 l

Kathoden-Lösung – pH 7,5

ε-Amino Capronsäure	5,2 g
Methanol	200 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1 l

10 x PBS pH 7,4

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
H ₂ O _{dest}	ad 1 l

10 x TBS pH 7,5

Tris	121 g
NaCl	175 g
H ₂ O _{dest}	ad 2 l

TBS-T

10 x TBS pH 7,5	200 ml
Tween 20	2 ml
H ₂ O _{dest}	ad 2 l

Blockierungslösung

Milchpulver	1 g
BSA	0,5 g
H ₂ O _{dest}	ad 100 ml

Immer frisch herstellen.

2.10.3 Puffer und Lösungen für zellbiologische und immunologische Methoden

FACS-Puffer nach Fässler

TrisHCl pH 7,4	24 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM

FACS-Puffer

BSA	0,5%
EDTA	4 mM
	in D-PBS

2.10.4 Puffer und Lösungen für Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Yersinien mit eukaryotischen Zellen

Kollagenstocklösung

7,5 % Natriumbicarbonat	5 µl
10 x D-MEM	10 µl
3 mg/ml Typ I Kollagen	75 µl

2.11 Geräte

Tab. 2.12 Liste verwendeter Laborgeräte.

Gerät	Bezeichnung	Firm
Analysenwaage	440-35N	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Blot-Apperatur	Mini-Trans-Blot	Bio-Rad (München)
Brutschrank	Typ B-20	Hereaus (Hanau)
CLSM	TCS-SP5	Leica Microsystems (Wetzlar)
Elektrophoresekammer für PAGE	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (München)
Elektroporationsgerät	MicroPulser™	Bio-Rad (München)
FACS	BD Facs Canto II	BD Bioscience (Heidelberg)
Filmtwickler	Fujifilm FPM-100A	Fuji (Düsseldorf)
Gelelektrophoresekammer	Mini-SUB ^R Cell GT	Bio-Rad (München)
Geldokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad (München)
Isoelektrische Fokussierungs-Apparat	IPGphor	Bio-Rad (München)

Luminometer	FLUOstar OPTIMA	BGM LABTECH (Jena)
NanoDrop	ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB (Erlangen)
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved 0,1	Marienfeld (Lauda-Königshofen)mm
PCR-Cycler	Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems (Darmstadt)
pH-Meter	DIGITAL-pH-Meter	Bachofer (Reutlingen)
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Bioscience (Freiburg)
Schüttelinkubator		Braun Biotech International (Osterode am Harz)
Semi-Dry Blot-Apperatur	Trans Blot SD	BioRad (München)
Sterilwerkbank	Hereaus HS12	Hereaus (Hanau)
Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschall-Applikator	Sonifier 250	Branson (Danbury)
Ultraschallgerät (Haasen)	UP 50H	Hielscher GmbH (Tiltow)
UV-Schneidetisch		BACHHOFER (Reutlingen)
UV-Transiluminator	Universal Hood II	Bio-Rad (München)
Wasserbad	WB 7	Memmert GmbH + CoKG (Schwalbach)
Zentrifugen		
Kühlzentrifuge	Sigma 3K30	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Standardzentrifuge	5417R	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge	Optima TL	Beckman Coulter (Krefeld)
Cytospin	Cytospin 3	Life-science international (Frankfurt)

Neben den in Tab 2.12 aufgelisteten Geräten wurden Laborstandardgeräte eingesetzt.

2.12 Chemikalien und Biochemikalien

Tab. 2.13 Verwendete Chemikalien und Biochemikalien.

Chemikalie/Biochemikalie	Firma
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid-Bis	Serva (Heidelberg)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Agar	BD Bioscience (Heidelberg)
Ammonium-Persulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bacto-Trypton	Becton Dickenson (Sparks)
Bacto-Hefeextrakt	Becton Dickenson (Sparks)
BD FACS Clean	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Flow	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Shutdownsolution	BD Bioscience (Heidelberg)
Blutagarplatten	Oxoid (Hampshire)

Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
BSA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
CIN-Agar Platten	Oxoid (Hampshire)
Coomassie Brilliant Blue™ R250	Merck (Darmstadt)
DAPI-Mounting Medium Vectashield	Vector laboratories (Burlingame)
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
D-MEM	Invitrogen (Karlsruhe)
D-MEM (10 x; +Earles, -L-Glutamine, - NaHCO₃)	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
D-PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
ECL Western Blotting Reagenz	GE Healthcare (Freiburg)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FcR Blocking Reagent	Milteny Biotec (Bergisch Gladbach)
FCS	Invitrogen (Karlsruhe)
FBS Superior	Biochrom (Berlin)
Fuji Medical X-Ray Film Super Rx	Fuji (Düsseldorf)
Giemsa	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kollagen (TypI) (PureCol®)	Advanced BioMatrix (San Diego)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
NaCl	Roth (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Protein Assay Kit	Bio-Rad (München)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot)
Sterilfilter Millex™ 0,22 µm	Millipore (Bedford)
RPMI 1640	Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI 1640 Superior	Biochrom (Berlin)
SDS	Serva (Heidelberg)
TEMED	Biomol (Hamburg)
Tris	Merck (Darmstadt)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)

2.13 Mikrobiologische Methoden

2.13.1 Kultivierungsverfahren

Sofern nicht anders beschrieben erfolgte die Kultivierung der *Y. enterocolitica* Stämme (Tab. 2.2) bei 27°C in BHI Medium (BD Bioscience, Heidelberg) und der *E. coli* Stämme (Tab. 2.1) bei 37°C in LB-Medium, in einem Schüttelinkubator bei 180 U/min unter aeroben Bedingungen und Zugabe entsprechender Antibiotika.

2.13.2 Stammhaltung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme (Tab. 2.1 und 2.2) wurden in Einfriermedium (2.3) bei -80°C gelagert.

2.14 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.14.1 Plasmidisolierung

Die Isolierung der Plasmid-DNS wurde mit dem QIAGEN Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) und dem Plasmid DNA Purification Nucleo Bond PC100 Kit (Machery Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.14.2 Gentechnologische Manipulation von DNS

Die *in vitro*-Manipulation von DNS-Molekülen, wie Restriktionsspaltungen und Ligationen, wurden unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt.

2.14.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNS

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNS-Molekülen im elektrischen Feld wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Nukleinsäuren wandern dabei aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode und werden in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse und Konformation aufgetrennt. Es wurden Gele mit 1 – 1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer gegossen. Die DNS-Proben wurden mit 1 x DNS-Proben Puffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in Horizontalgelkammern mit 1 x TAE-Puffer bei 80V für 45 – 60 min. Zur Bestimmung der DNS-Fragmentgrößen diente der „O’Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder“ (Fermentas, St. Leon Rot). Anschließend wurden die Gele mit Ethidiumbromid (1 mg/L H₂O_{dest}) angefärbt und durch UV Licht (260 nm) sichtbar gemacht. Zur Detektion wurde ein UV-Transilluminator (Bio-Rad, München) verwendet.

2.14.4 DNS-Extraktion aus dem Agarosegel

DNA-Fragmente wurden mittels des „PCR Clean up, Gel-Extraction Kit Nucleo Spin Extract II“ (Machery-Nagel, Düren) aus dem Agarosegel extrahiert.

2.14.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Proben wurde mit einem Spektralphotometer NanoDrop (PEQLAB, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 230, 260 und 280 nm ermittelt. Die Absorptionsmaxima einzelner Nukleotide in der DNS liegen bei pH 7,0 zwischen 253 nm und 271 nm. Aliquots von Nukleinsäurelösungen wurden für die Extinktionsmessung in 1 cm Quarzküvetten überführt.

Als Grundlage zur Berechnung der vorliegenden DNS-Konzentrationen aus den erhaltenen Absorptionswerten dienen folgende Näherungswerte:

Doppelsträngige (ds) DNS: E260 nm = 1 entspricht 50 µg / ml

Einzelsträngige (ss) DNS: E260 nm = 1 entspricht 33 µg / ml

Einzelsträngige (ss) RNS: E260 nm = 1 entspricht 40 µg / ml

Verunreinigungen der DNS, z.B. durch RNS oder Proteine, können durch die Bestimmung der Extinktion (E) bei 230, 260 und 280 nm und Bildung der Quotienten E260 nm/E280 nm sowie E260 nm/E230 nm festgestellt werden. Der für die Weiterbearbeitung der DNS nötige Reinheitsgrad ist bei folgenden Werten gewährleistet (Marmur *et al.*, 1961):

E260 nm/E280 nm > 1,9 sowie E260 nm/E230 nm > 2,2

2.14.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur *in vitro* Vervielfältigung definierter DNS-Abschnitte wurde die Polymerasekettenreaktion nach Mullis *et al.*, 1986 durchgeführt. Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurde als Matrize Plasmid-DNS (10 - 100 ng) verwendet. Zur schnellen und einfachen Identifizierung von positiven Klonen wurde eine Bakteriolyse vorgenommen. Dazu wurde eine Bakterienübernachtskultur in H₂O_{dest} 1:100 verdünnt, 5 min, bei 100°C aufgeköcht und 1 µl in den Reaktionsansatz eingesetzt. Die zu den Randbereichen des zu amplifizierenden Gens komplementären Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm, Deutschland) hergestellt. Als DNA-Polymerasen wurde die Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim), die Pfu-Polymerase (Fermentas, St. Leon Rot) und für die PCR direkt an Bakterienlysaten der BioMixTM Red (Bioline, Luckenwalde) verwendet. Die Reaktionsansätze und die verwendeten PCR-Programme sind den Tabellen 2.14, 2.15 und 2.16 zu entnehmen.

Tab. 2.14 Reaktionsansatz und –programm für die Expand High Fidelity PCR System.

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm	
DNA (10 – 100 ng)	1 µl	Anfangsdenaturierung	94°C, 5 min
Vorwärts Oligonukleotid (10 pmol/µl)	1 µl		
Rückwärts Oligonukleotid (10 pmol/µl)	1 µl	Denaturierung	94°C, 30 sec
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl	Hybridisierung	50°C, 30 sec 30x
5 x Reaktionspuffer + 15 mM MgCl ₂	10 µl	Elongation	72°C, 2 min
DNS-Polymerase	0,5 µl		
H ₂ O _{dest} ad	50 µl	Finale Elongation	72°C, 7 min

Tab. 2.15 Reaktionsansatz und –programm für die Pfu-Plymerase.

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm	
DNA (10 – 100 ng)	1 µl	Anfangsdenaturierung	95°C, 2 min
Vorwärts Oligonukleotid (10 pmol/µl)	1 µl		
Rückwärts Oligonukleotid (10 pmol/µl)	1 µl	Denaturierung	95°C, 30 sec
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl	Hybridisierung	50°C, 30 sec 30 x
10 x Reaktionspuffer + 20 mM MgSO ₄	5 µl	Elongation	72°C, 2 min
DNS-Polymerase	1 µl		
H ₂ O _{dest} ad	50 µl	Finale Elongation	72°C, 10 min

Tab. 2.15 Reaktionsansatz und –programm für den BioMix™ Red.

Reaktionsansatz	
Biomix Red	12,5 µl
Vorwärts Oligonukleotid (10 pmol/µl)	1 µl
Rückwärts Oligonukleotid (10 pmol/µl)	1 µl
PCR-Wasser ad	25 µl
Reaktionsprogramm	
Anfangsdenaturierung	95°C, 2 min
Denaturierung	95°C, 30 sec
Hybridisierung	50°C, 30 sec 30x
Elongation	72°C, 2 min
Finale Elongation	72°C, 10 min

2.14.7 Kompetente Bakterien und Elektroporation

2.14.7.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde der *Y. enterocolitica* Stamm WA(pT3SS) (Tab. 2.2) verwendet. Eine in BHI (BD Bioscience, Heidelberg) angezogene Übernachtskultur wurde 1:50 in BHI-Medium (250 ml) mit entsprechendem Antibiotikum verdünnt und bei 27°C inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht wurde. Daraufhin wurde die Bakteriensuspension 30 min auf Eis gekühlt, anschließend bei 4000g, 10 min bei 4°C zentrifugiert und zweimal mit 100 ml kaltem H₂O_{dest} gewaschen. Die Zellen wurden ein weiteres Mal in 10 ml 10 % Glycerin in H₂O_{dest} gewaschen und schließlich in 500 µl 10 % Glycerin in H₂O_{dest} aufgenommen, als 50 µl Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.14.7.2 Herstellung Ca²⁺-kompetenter Bakterien

Die Herstellung Ca²⁺-kompetenter Zellen erfolgte für den *E. coli* Stamm DH5α. Die in LB-Medium angesetzte Übernachtskultur wurde 1:50 in LB-Medium (250 ml) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezchtet. Daraufhin wurde die Bakteriensuspension 30 min auf Eis inkubiert, bei 4000g, 10 min bei 4°C zentrifugiert und in 100 ml TfbI-Puffer aufgenommen. Die Bakterien wurden 5 min auf Eis gekühlt, danach in 2,5 ml TBfII-Puffer resuspendiert und weiter 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension als 50 µl Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.14.7.3 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Für die Elektroporation wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und zusammen mit der DNA in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF (time constant > 4 ms). Die Zellen wurden anschließend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1h bei 27°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien auf Selektivplatten mit entsprechendem Antibiotikum angezogen.

2.14.7.4 Transformation Ca²⁺-kompetenter Bakterien

Die Ca²⁺-kompetenten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, mit DNS (10 µl des Ligationansatzes oder ca. 5 ng-Plasmid DNS) 30 min auf Eis gekühlt und 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellen wurden 2 min auf Eis inkubiert, mit 1 ml SOC-Medium versehen und 1 Stunde bei 37°C mit 300 rpm im Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bakterien auf Selektivplatten mit entsprechendem Antibiotikum angezogen.

2.14.8 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchsynthese mit Didesoxynucleotiden. Die Sequenzierung und –auswertung erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz).

2.14.9 Konstruktion des Plasmids pYopT und des Stammes WA(pT3SS, pYopT)

Um die Rolle von *yopT* exprimierender Yersinien ohne den Einfluss anderer Yops untersuchen zu können, wurden *yopT* und *syncT* in das Plasmid pACYC184 kloniert. Dafür wurde das pACYC184 Plasmid, mit den Restriktionsenzymen XbaI und Sall (Fermentas, St Leon Rot) verdaut. Das pYV-Plasmid-Segment, von 239 bp vor *yopT* bis 68 bp nach *syncT*, wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden pYV-IP32953-29282-XbaI-f und pVYe8081-4746-Sall-r amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit XbaI und Sall (Fermentas, St Leon Rot) verdaut und in den XbaI/Sall-gespaltenen Vektor durch Ligation inseriert. Da pACYC184 eine niedrige Kopienzahl, aufweist wurde das konstruierte Plasmid erst in den Ca²⁺-kompetenten *E. coli* Stamm DH5 α transformiert um in angereicherter Kopienzahl weiter in den elektrokompenten *Y. enterocolitica* WA(pT3SS) Stamm transformiert zu werden.

2.15 Biochemische und analytische Methoden

2.15.1 Isolierung sezernierter *Y. enterocolitica* Proteine aus dem Kulturüberstand

Um die Sekretion der Yops verschiedener *Y. enterocolitica* Stämme nachzuweisen, wurde wie von Heesemann *et al.* (1986) beschrieben verfahren. Die Yersinien wurden über Nacht in BHI-Medium (BD Bioscience, Heidelberg), mit entsprechenden Antibiotika bei 27°C angezogen. Die Vorkultur wurde 1:40 in 5 ml BHI Medium, ggf. mit entsprechenden Antibiotika, verdünnt und 2 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde 10 mM MgCl₂, 5 mM EGTA und 0,2% Glukose zugegeben und weitere 3 h bei 37°C geschüttelt. Es wurde die OD₆₀₀ aller Kulturen gemessen und anhand dessen die gleiche Anzahl an Yersinien (eine OD₆₀₀ von 0,3 entspricht einer Zellzahl von 5 x 10⁷ Bakterienzellen/ml) mit 6000g bei 4°C für 15 min abzentrifugiert. Die sezernierten Proteine im Kulturüberstands von ca. 5 x 10⁷ Bakterien wurden mit 10% Trichloressigsäure (TCA) 1 h bzw. übernacht bei 4°C gefällt und bei 14 000g, für 20 min pelletiert. Das Sediment wurde in 1 ml eiskaltem Aceton aufgenommen, 20 min auf Eis gekühlt und zweimal mit Aceton gewaschen (10 min, 4°C, 12 000 g). Nach dem Trocknen der Proteine wurden diese in 30 μ l 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min auf 95°C erhitzt. Auf ein 12%iges SDS-Gel (2.15.6) wurden 15 μ l eines Ansatzes aufgetragen und daraufhin eine Western-Blotanalyse durchgeführt (2.15.9).

2.15.2 *yadA* Expression

Für die Induktion der *yad* Expression wurden *Y. enterocolitica* Stämme zunächst übernacht in BHI-Medium (BD Bioscience, Heidelberg) mit entsprechenden Antibiotika bei 27°C angezogen. Die Kulturen wurden am nächsten Tag 1:40 in RPMI ohne Phenolrot, ggf. mit Antibiotika, verdünnt und für 5 h bei 37°C geschüttelt. 5×10^7 Bakterienzellen (eine OD₆₀₀ von 0,3 entspricht 5×10^7 Bakterienzellen/ml) wurden in 60 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C 5 min erhitzt. Auf einem 10%igen SDS-Gel wurden 15 µl pro Ansatz aufgetragen.

2.15.3 *inv* Expression

Um die *inv* Expression von *Y. enterocolitica* Stämmen zu überprüfen wurden die Bakterien in BHI-Medium (BD Bioscience, Heidelberg) mit entsprechenden Antibiotika übernacht bei 27°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Kulturen 1:40 mit frischem BHI, ggf. mit Antibiotika, verdünnt und für weitere 5 h inkubiert. Daraufhin wurden anhand der OD₆₀₀ 5×10^7 Bakterien (eine OD₆₀₀ von 0,3 entspricht 5×10^7 Bakterienzellen/ml) in 60 ml 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 15 ml eines jeden Ansatzes auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen.

2.15.4 Herstellung von Zellysaten

Um zytosolische Proteine eukaryotischer Zellen mittels Immunpräzipitation analysieren zu können, wurden je nach gewünschter Anwendung Zellysate in Puffern hergestellt, welche die native Struktur der Proteine erhielten bzw. denaturierend wirkten (2.20.2). 1×10^7 eukaryotische Zellen wurden mit 300g, bei 4°C für 5 min pelletiert und in 150 µl Puffer aufgenommen. Zellen, die in nicht-denaturierendem PMN-Lysepuffer aufgenommen wurden, wurden 3 x 15 sec auf Eis ultrabeschallt. Es schloss sich ein Ultrazentrifugationsschritt bei 4°C für 30 min bei 100 000g an. Das klare Lysat wurde in frische vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

2.15.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (1976) mit dem BioRad Protein Assay Kit (2.12) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Eichgerade wurde der Albuminstandard (Pierce, Rockford) verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Anhand der Eichgerade erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben. Jede Probe wurde je nach vorhandener

Probenmenge im Dupli- bzw. Triplikate gemessen. Von Dreifachwerten wurde der Mittelwert bestimmt.

2.15.6 SDS-PAGE

Um Proteine anhand ihres Molekulargewichts elektrophoretisch aufzutrennen wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Methode nach Laemmli, 1970) benutzt. Für die Herstellung der SDS-Gele wurden 0,75, 1,0 bzw. 1,5 mm dicke Flachgele der Größe 8 x 7 cm der Firma Bio-Rad (München) sowie eine Acrylamid/Bis-Acrylamid Lösung 29:1 von SERVA verwendet. Das Sammelgel enthält eine Polyacrylamidkonzentration von 4% wobei die Trenngelkonzentration je nach gewünschter Proteinauftrennung 10%-15% betragen kann. Als Proteinstandard wurde der Standard „BenchMark Prestained“ bzw. „SeeBlue Plus2 Pre-Stained“ (Invitrogen, Karlsruhe) (2.6) verwendet. Die Proben wurden mit 2 x bzw. 6 x SDS-Probenpuffer (2.10.2) versetzt und je nach Anwendung direkt auf das Gel aufgetragen oder vorher 5 min bei 95°C erhitzt. Der Gellauf erfolgte in einer Anlage für Minigele (Mini-PROTEAN 3, BioRad, München) bei konstant 80V für 20 min und anschließend bei 180V für 1-1,5 h in 1x SDS-Laufpuffer (2.10.2). Nach dem Gellauf wurden die Gele in Coomassielösung (2.10.2) gefärbt.

Tab 2.16 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele. Die Angaben gelten für ein Gesamtvolumen von 5 ml.

	10% Trenngel	12% Trenngel	15% Trenngel	4% Sammelgel
H₂O	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml	3,4 ml
30% Acrylamid-Lösung	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml	0,83 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	-	-	0,63 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,005 ml

2.15.7 2-Dimensionale Gelelektrophorese

Die 2-Dimensionale Gelelektrophorese wurde nach Gorg *et al.* (1988) durchgeführt. In der ersten Dimension werden die Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes fokussiert, um daraufhin in einer zweiten Dimension anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt zu werden.

2.15.7.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung wurden IPG Streifen von 7 cm Länge der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Diese müssen vor der Verwendung rehydratisiert werden und auf eine Dicke von 0,5 mm aufquellen. Hierfür wurde die sogenannte „in Gel Rehydratisierung“ durchgeführt. Es wurden 150 µg Protein in einem Volumen von 130 µl eingesetzt. Die Proteinprobe wurde mit dem Rehydratisierungspuffer (2.10.2) versetzt, wobei ein Mischungsverhältnis von 1:1 von Probe zu Rehydratisierungspuffer nicht überschritten werden darf, da sonst die Gesamtleitfähigkeit des Streifens zu hoch wird und das Erreichen des vorgegebenen Spannungsgradienten sowie die Auftrennung der Proteine verhindert wird. Die Proteinprobe wurde im Fokussierungsschlitten (Bio-Rad, München) sorgfältig verteilt. Die IPG Streifen wurden vorsichtig von der Schutzfolie gelöst und mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auf die Probe gelegt, wobei das mit dem „+“ markierten Ende auf die Anode zeigt. Der IPG-Streifen wurden mit 500 µl Mineralöl überschichtet und der Fokussierungsschlitten in die „PROTEAN IEF cell“ (Bio-Rad, München) gestellt. Die Rehydratisierung wurde aktiv bei 50 V für 12 h durchgeführt und die isoelektrische Fokussierung erfolgte ohne Pause im Anschluss. Hierfür wurde folgendes Programm ausgewählt (Tab. 2.17). Nach Ende der Fokussierung wurden die Streifen herausgenommen und entweder bei -80 °C gelagert oder sofort weiterbearbeitet.

Tab 2.17 IPGPhor-Programm für die isoelektrische Fokussierung von IPG-Streifen (70 mm)

Temperatur	20°C		
Maximale Stromstärke	0,05 mA pro IPG-Streifen		
Probenvolumen	130 µl		
	Spannung	Zeit	Bemerkung
R- Rehydrierung	50 V	12 h	aktives Einquellen
S1- Konditionierung	500 V	1 h	entfernt Salzionen und geladene Kontaminationen
S2- Spannungsaufbau	1500 V	30 min	Erhöhung der Spannung bis zur maximalen Voltstärke
S3- Fokussierung	4000 V	8000 Vhrs	Fokussierung
S4	500 V	∞	Verhindert Diffusion der fokussierten Proteine oder Fokussierungsartefakte

2.15.7.2 Äquilibrierung der IPG-Streifen

Die IPG-Streifen müssen vor der SDS-PAGE (2. Dimension) äquilibriert werden, damit die fokussierten Proteine vollständig mit dem SDS interagieren können. Hierfür wurden die Streifen je 15 min zuerst in Puffer I und anschließend in Puffer II (2.10.2) unter schütteln inkubiert. Im ersten Schritt werden Disulfidbrücken durch DTT reduziert und im zweiten Schritt verhindert Iodacetamid durch Alkylierung der Sulfhydrylgruppen eine Reoxidation. Zusätzlich wird freies DTT alkyliert, das sonst bei der SDS-PAGE stören könnte. Die Streifen wurden danach kurz auf Whatman Papier abgetropft und in SDS-Laufpuffer (2.10.2) geschwenkt und waren dann bereit für die SDS-PAGE.

2.15.7.3 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970) (2.15.6), wobei kein Sammelgel gegossen wurde. Es wurden 1,0 mm dicke Flachgele der Größe 7 x 10 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel betrug 12 %. Die Gele wurden mit Hilfe eines Mini-PROTEAN 3 multi-Gießstand der Firma Bio-Rad (München) gegossen. Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden auf das Polyacrylamidgel gelegt und mit einem Spatel vorsichtig auf die Gelfront gedrückt. Ein mit Proteinstandard getränkter Filterpapierstreifen wurde neben den IPG-Streifen auf die Gelfront gelegt und mit Agaroseabdichtlösung (2.10.2) überschichtet. Der Gellauf erfolgte bei konstant 200 V für 45 min. Die Gele wurden im Anschluss entweder mit kolloidalen Coomassie gefärbt oder für den Immunoblot weiterbearbeitet.

2.15.8 Färbemethoden

2.15.8.1 Coomassiefärbung nach Weber und Osborn (1969)

SDS-Gele (2.15.6) wurden 30 min in Coomassie-Lösung (2.10.2) gefärbt und anschließend unter mehrfachem Wechsel der Entfärberlösung (2.10.2) entfärbt bis alle Proteinbanden deutlich zu sehen waren. Daraufhin wurden die Gele in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ rehydriert.

2.15.8.2 Kolloidale Coomassiefärbung nach Neuhoff *et al.* (1985)

Die 2D Gele (2.15.7) wurden übernacht in kolloidaler Coomassie Lösung (2.10.2) gefärbt. Die Entfärbung erfolgt in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$.

2.15.8.3 Ponceau S-Färbung

Die Ponceau S-Färbung dient zum Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen. Die Membran wurde 15 min in Ponceau S-Färbung (2.10.2) geschwenkt und daraufhin mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen. Eine anschließende Immundetektion wird durch eine vorangegangene Färbung nicht gestört.

2.15.9 Westernblot/Immunoblot

Zum Nachweis von Antigenen aus Proteingemischen werden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf geeignete Membranen transferiert (Westernblot). Die so immobilisierten Proteinbandenmuster werden dann mittels Antikörper nach dem ELISA-Prinzip nachgewiesen (Immunoblot).

Nach elektrophoretischer Proteinauftrennung (eindimensional) wurden die SDS-PA-Gele mit einer Nitrozellulose-bzw. in Methanol voraktivierten PVDF-Membranen luftblasenfrei bedeckt und von einer Lage Watmanpapier auf beiden Seiten eingeschlossen. Der Proteintransfer erfolgte in 1 x Blottingpuffer (2.10.2) in einer Mini Trans-Blot Kammer der Firma Bio-Rad (München) bei zwei Gelen für 1 h bei 100 V und bei 1 Gel für 30 min bei 80V.

Der Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen aus 2-dimensionalen Gelen erfolgte in einer Trans-Blot® SD Semi-Dry Cell Kammer der Firma Bio-Rad (München) konstant bei 150 mA für 2 h. Hierfür wurden zuerst 3 Blätter Whatman-Papier mit Anoden-Lösung I (2.10.2), und 6 Blätter Whatman-Papier mit Anodenlösung II (2.10.2) getränkt und auf die Trans-Blot Kammer gelegt. Nach Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol wurde das 2D-Gel kurz in Kathoden-Lösung (2.10.2) geschwenkt und mit 9 in Kathoden-Lösung getränkten Whatman-Papieren bedeckt.

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungen wurden die Membranen für 1 h bei 37°C oder übernacht bei 4°C in Blockierungslösung gelegt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBS-T (2.10.2) erfolgte der Proteinnachweis mit spezifischen Primärantikörpern (Tab. 2.6) für 1 h bei Raumtemperatur. Ungebundene Primärantikörper wurden mit dreimaligem Waschen in TBS-T entfernt. Es schloss sich eine Inkubation für 1 h mit einem Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (Tab. 2.6) an. Nach dreimaligem waschen in TBS-T wurden ungebundene Sekundärantikörper entfernt. Der enzymatische Nachweise der Proteine durch die Reaktion der Peroxidase wurde nach Angaben des Herstellers mit dem „ECL Western Blotting System“ (GE Healthcare, München) durchgeführt. Es wurde ein

Röntgenfilm Typ Fuji Super RX (FUJIFILM, Düsseldorf) zur Belichtung aufgelegt und mit dem Filmentwickler (2.12) entwickelt.

2.16 Biophysikalische Methoden

2.16.1 MALDI-TOF

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden durch MALDI-TOF (*Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time-Of-Flight*) Analyse identifiziert. Hierfür wurden die Proteine manuell mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aus den Gelen ausgestochen. Die anschließende Probenbearbeitung und massenspektrometrische Analyse erfolgte im Labor von Herrn Prof. Imhoff im Adolf-Butenandt-Institut (Schillerstr. 44, 80336 München) der LMU-München in einem Voyager DE STR (Applied Biosystems, Foster City, USA) im reversen Modus. Die Kalibrierung der Peptidmassen erfolgte intern auf die bekannten Massen der Autolysepeptide von Trypsin. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch Herrn Tilman Schlunk und Herrn Pierre Schilcher mit Hilfe der Suchmaschine Mascot.

2.17 Methoden zum Arbeiten mit primären Zellen und Zelllinien

2.17.1 Kultivierung von Zelllinien

2.17.1.1 Kultivierung von J774A.1 Zellen

Die adhärente, murine Monozyten-Makrophagen-Zelllinie J774A.1 (Tab. 2.10) wurde in Zellkulturflaschen (Nunc, Langensfeld) mit 15 ml Zellkulturmedium (Tab. 2.11) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde alle 3 Tage durch frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium ausgetauscht. Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen einmal mit 37°C warmen D-PBS gewaschen und nach Zugabe von 10 ml frischem, 37°C warmen Medium mit einem Zellschaber (BD Bioscience, Heidelberg) von dem Zellkulturflaschenboden gelöst. Zur weiteren Subkultivierung wurden die Zellen in dem Verhältnis 1:4 bzw. 1:10 mit frischem, 37°C warmen Medium verdünnt.

2.17.1.2 Kultivierung von HL60 Zellen

Die humane promyeloide Leukämiezelllinie HL60 (Tab. 2.10) ist nichtadhärent und kann in Suspension kultiviert werden. Die HL60 Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Nunc, Langensfeld) mit 15 ml Zellkulturmedium (Tab. 2.11) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Da diese Zellen eine minimale Zelldichte von 0,5 x 10⁶ Zellen/ml sowie eine maximale Zelldichte von 2 x 10⁶ Zellen/ml nicht unter- bzw. überschreiten dürfen, wurde die

Zellsuspension alle 2 – 3 Tage in 15 ml Falcon-Behältnisse (BD Bioscience, Heidelberg) bei 300g für 5 min pelletiert, in frischem, auf 37°C vorgewärmten Medium aufgenommen, gezählt und mit einer Zelldichte von $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät.

2.17.2 Ausdifferenzierung von HL60 Zellen zu dHL60 Zellen

HL60 Zellen (Tab. 2.10) haben eine vornehmlich promyeloide Morphologie und können mit physiologischen und nicht-physiologischen Agenzien zu Granulozyten-, Monozyten oder Makrophagen-ähnlichen Zellen (dHL60) ausdifferenziert werden. Um PMNs-ähnliche Zellen zu erhalten wurden 1×10^6 Zellen in 15 ml Medium (Tab. 2.11) und 1,25 % (v/v) DMSO versetzt und 5 – 6 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.17.3 Lagerung von Zellen

Eukaryotische Zellen können über mehrere Jahre in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Für diese Kryokonservierung wurden 5×10^6 J774A.1 Zellen und 6×10^6 HL60 Zellen in 1 ml Einfriermedium (Tab. 2.11) aufgenommen und in Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) überführt. Zunächst wurden die Röhrchen in einem mit Isopropanol gefülltem Behältnis über Nacht bei – 80°C eingefroren, dies gewährleistet eine kontrollierte Absenkung der Temperatur um 1°C/min, und danach in einen Stickstofftank überführt.

2.17.4 Auftauen von Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in 10 ml Zellkulturmedium überführt um den zellschädigenden DMSO-Gehalt zu verringern. Die Zellsuspension wurde bei 300g für 5 min pelletiert und in frischem bei 37°C vorgewärmtem Medium aufgenommen. HL60 Zellen wurden einem weiteren Waschschrift unterzogen, da eine Restmenge von DMSO zur Zelldifferenzierung führen könnte. Die Zellen wurden in geeignete Zellkulturflaschen überführt und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.17.5 Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension in 90 µl Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verdünnt. Zellen, die keine intakte Zellmembran aufweisen nehmen den blauen Farbstoff auf. Somit können tote von lebenden Zellen unterschieden werden. Es wurden unter dem Lichtmikroskop 4 Großquadrate ausgezählt, der Mittelwert gebildet und nach folgender Formel die Zellzahl errechnet:

Zellzahl/ml = Mittelwert $\times 10 \times 10^4$

10 = Verdünnungsfaktor

10^4 = (Volumen eines Großquadrats entspricht 10^{-4} ml)

2.18 Zellbiologische und immunologische Methoden

2.18.1 Gewinnung humaner PMNs aus venösem Blut

Zur Gewinnung von venösem, humanem Blut wurde das Multifly[®]-Set (Sarstedt, Nümbrecht), Membranadapter (Sarstedt, Nümbrecht) sowie 2-teilige Einmalspritzen (B.Braun, Melsungen) verwendet. Heparinisiertes Blut sollte im Dunklen bei Raumtemperatur nicht länger als 2 h gelagert werden. 6 ml heparinisiertes Blut (50 U/ml, Heparin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden auf einen Dichtegradienten, bestehend aus 3 ml Histopaque-11191 überschichtet mit Histopaque-10771 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), pipetiert und 30 min ohne Bremse mit 700g bei 4°C zentrifugiert. Um zellschädigende Gradientenbestandteile zu entfernen wurden die PMN-Bande in 10 ml kaltem D-PBS aufgenommen und die Zellen mit 300g für 5 min sedimentiert. Nach einer 30 sec Erythrozytenlyse mit steriler, pyrogenfreier Ampuwa[®]-Spüllösung (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) wurde mit steriler 3,6 % NaCl-Lösung ein isotonisches Milieu wiederhergestellt und mit 300g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in phenolrotfreiem RPMI mit 5 % FCS (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Aus 40 ml heparinisiertem Blut wurden je nach Spender $1-2 \times 10^7$ PMNs isoliert.

2.18.2 Gewinnung muriner Phagozyten aus unterschiedlichen Kompartimenten der Maus

Alle *in vitro* Infektionsversuche wurden mit murinen Phagozyten aus unterschiedlichen Kompartimenten der Maus vorgenommen. Die Zelldifferenzierung erfolgte im FACS nach anfärben mit Antikörpern, welche zellspezifische Oberflächenstrukturen erkennen.

2.18.2.1 Gewinnung von murinen Knochenmarkszellen

Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden die Knochen von Ober- und Unterschenkel der Vorder- und Hinterextremitäten der Maus freigelegt, von Geweberesten befreit und in 70 % Ethanol eingelegt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochenenden abgeschnitten und das Knochenmark mit einer Injektionsnadel (0,45 μ m Durchmesser, B. Braun, Melsungen) und 5 ml D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) herausgespült. Die Zellen wurden bei 300g für 10 min abzentrifugiert, einer Erythrozytenlyse (2.18.1) unterzogen und in phenolrotfreiem RPMI mit 5% FCS (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert.

2.18.2.1.1 Ausdifferenzierung von murinen Knochenmarkszellen zu Makrophagen (BMDM)

Murine Knochenmarkszellen werden wie in 2.18.2.1 beschrieben gewonnen. Die in D-PBS resuspendierten Zellen wurden bei 300g 5 min pelletiert, in M-CSF-haltigem Medium (Tab. 2.11) aufgenommen und 5×10^6 Zellen in 8 ml in Petrischalen ausgesät. Nach 3 und 7 Tagen wurde 4 ml M-CSF-haltiges Medium in jede Petrischale gegeben. Nach 10 Tagen wurde das Medium komplett gewechselt, am 12. Tag wurden wieder 4 ml in jede Petrischale gegeben und am 15. Tag waren die Zellen zu Makrophagen differenziert.

2.18.2.2 Gewinnung von murinen Blutzellen

Zur Gewinnung von Blutzellen wurde aus dem Herz einer kurz vorher getöteten Maus, soviel Blut wie möglich entnommen und in Lithium-Heparin Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) pepitiert. Die Ausbeute beträgt je nach Maus 500 – 800 μ l Blut. Das heparinisierte Blut wurde einer Erythrozytenlyse (2.18.1) unterzogen und in phenolrotfreiem RPMI mit 5% FCS (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert.

2.18.2.3 Gewinnung muriner peritonealer PMNs

Um eingewanderte PMNs aus der Peritonealhöhle isolieren zu können wurden 3 ml 3%ige sterilfiltrierte Proteosepeptonlösung (Difco Laboratoies, Detroit) in den Bauchraum von Mäusen injiziert, um eine sterile Bauchfellentzündung zu induzieren. Die Versuchstiere werden nach 3 Stunden getötet und mit 10 ml D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) einer Peritoneallavage unterzogen. Die gewonnene Zellsuspension wurde sofort auf Eis gestellt und anschließend mit 300g bei 4°C für 5 min pelletiert. Das Zellsediment wurde in phenolrotfreiem RPMI mit 5% FCS (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert.

2.18.3 Immunfluoreszenzfärbung

2.18.3.1 Nachweis von β -Integrinen auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen

Um nachzuweisen ob β_1 - und β_2 -Integrine auf der Zelloberfläche humaner PMNs vorhanden sind, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Integrine mit anschließender FACS-Analyse durchgeführt. Dafür wurden 2×10^5 PMNs (2.18.1) in 40 μ l FACS-Puffer nach Fässler (2.10.3) resuspendiert und 10 μ l FcR-Blockierungsreagenz (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach) für 15 min bei 4°C zugegeben. Für den Nachweis von β_1 -Integrinen wurde Hamster anti-Ratte CD29 FITC-Konjugat (1:60) (Tab. 2.6) oder für β_2 -Integrine Maus anti-human CD18 PE-Konjugat (1:25) (Tab. 2.6) für 1 h bei 4 °C hinzupipetiert. Anschließend

wurde dreimal mit D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) mit 300g für 5 min gewaschen. Die Proben wurden in 200 µl FACS-Puffer nach Fässler aufgenommen und durchflusszytometrisch ausgewertet.

2.18.3.2 Nachweis der Membranlokalisierung der NADPH-Oxidase-Untereinheit

p47phox

Die Membranlokalisierung der NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Dafür wurde das Zellsediment (5×10^5 Zellen) infizierter humaner Neutrophiler (2.19.2) in 100 µl 3,5% PFA-Lösung aufgenommen, 30 min bei 4°C fixiert und daraufhin 1 ml D-PBS zugeben. Die Zellen wurden 5 min mit 300g bei 4°C zentrifugiert und in 100 µl D-PBS aufgenommen, um anschließend mittels Cytospin mit 500 U/min für 3 min auf Objektträger aufgebracht zu werden. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte in gläsernen Färbeschälchen für 5 min in Aceton. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und mit einem Tropfen PBS in Färbeschienen (Thermo Scientific, Cheshire) gespannt. Zuerst wurde für 20 min 50 µl der 1:10 in PBS verdünnten FcR-Blockierungslösung (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach) aufgetragen. Es folgte eine Färbung mit 100 µl 1:200 verdünntem Maus anti-human p47phox Antikörper (BD Bioscience, Heidelberg) (Tab. 2.6) für 1h bei Raumtemperatur. Es wurde dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und daraufhin 100 µl des 1:200 verdünnten Schaf anti-Maus IgG FITC-konjugierten Sekundärantikörpers (Tab. 2.6) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur und 3-fachem Waschen mit 1 ml PBS und einmaligem Waschen mit H₂O_{dest} wurden die Objektträger vollständig getrocknet. Auf die fixierten, gefärbten Zellen wurden 10 µl DAPI Vectorshield Einbettmedium (Vector Laboratories, Burlingame) aufgetropft, ein Deckgläschen aufgelegt und mit Nagellack luftdicht verschlossen.

2.18.3.3 Bestimmung der Reinheit humaner neutrophiler Granulozyten nach

Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation

1×10^6 humane Leukozyten wurden in 100 µl kaltem FACS-Puffer (2.10.3) aufgenommen und dann mit anti-CD66abce-APC Konjugat (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach) 1:100 und anti-CD16-PE Konjugat (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach) 1:100 30 min im Kühlschrank kühl gestellt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Durchflusszytometrisch wurde der prozentuale Anteil an Neutrophilen (CD66abce-APC und CD16-PE positive Zellen) bestimmt (2.18.4).

2.18.3.4 Bestimmung des prozentualen Anteils muriner neutrophiler Granulozyten in Zellsuspensionen gewonnen aus verschiedenen Kompartimenten der Maus

1 x 10⁶ murine Zellen wurden in 100 µl kaltem FACS-Puffer (2.10.3) aufgenommen, mit 1 µg anti-Maus CD16/32 (eBioscience, Frankfurt) versehen und 15 min im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin wurden 40 ng anti-Maus Ly6G APC- oder PE-Konjugat (BD Bioscience, Heidelberg) zugegeben und weitere 30 min im Kühlschrank kühl gestellt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Durchflusszytometrisch wurde der prozentuale Anteil an Neutrophilen (Ly6G-APC bzw. -PE positive Zellen) bestimmt (2.18.4).

2.18.3.5 Nachweis der YadA-Produktion im 3D-Kollagengel

Um YadA auf der Bakterienoberfläche von Mikrokolonien im Kollagengel nachzuweisen, wurden *Y. enterocolitica* Stämme wie in 2.19.1.2 ins Kollagengel eingegossen und bebrütet. Daraufhin wurden die Kollagengele dreimal für 5 min mit D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen, mit 100 µl D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) mit monoklonalem anti-YadA 8D1 (1:200) (Tab. 2.6) überschichtet und 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gele dreimal mit D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) für 5 min gespült, 100 µl des FITC-konjugierten 2. Antikörpers (Schaf anti-Maus IgG FITC, Tab 2.6) in einer 1:200 Verdünnung in D-PBS zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Mikrokolonien wurden dreimal für 5 min mit D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen. Die YadA-Produktion wurde mikroskopisch mit dem konfokalen Mikroskop TCS SP5 (Leica, Wetzlar) mit den Objektiven 63x/1,4 – 0,6 NA und 40x/1,25 – 0,75 NA und dem 10x Okular (630- bzw. 400-fache Vergrößerung) nachgewiesen.

2.18.4 Durchflusszytometrische Analyse

Alle Daten wurden mit dem FACS Canto II (BD Bioscienece, Heidelberg) erhoben. Es wurden 10000 – 50000 Ereignisse pro Probe gemessen. Zunächst wurde die Hauptpopulation mit Hilfe des Größen- (FCS) und des Granularitätsparameters (SSC) im Punktwolkendiagramm festgelegt. Die Fluoreszenzsignale wurden so eingestellt, dass die mittlere Fluoreszenzintensität der ungefärbten Zellpopolulation ungefähr bei einem Wert von 100 lag. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels der FlowJo-8.4.6 Software (Tree Star Inc, San Carlos).

2.19 Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Yersinien mit eukaryotischen Zellen

2.19.1 Kultivierung von *Y. enterocolitica* für *in vitro* Infektionsversuche

Für Infektionsversuche wurden *Y. enterocolitica* Stämme übernacht bei 27°C in BHI-Medium (BD Bioscience, Heidelberg) mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur 1:40 in frischem BHI-Medium mit Antibiotikum verdünnt und 90 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 10 min auf Eis gestellt, bei 4 °C mit 3000g abzentrifugiert und in kaltem D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen. Es wurde die OD₆₀₀ gemessen um die gewünschte „multiplicity of infection“ MOI, welche sich aus dem Quotienten der eingesetzten Anzahl von Yersinien in Suspension und der Zellzahl pro Infektionsansatz errechnet, einzustellen. Wenn nicht anders angegeben entspricht die OD₆₀₀ 0,3 einer *Y. enterocolitica* Kultur ca. 5×10^7 Bakterienzellen/ml.

2.19.1.1 Infektionsversuche in Flüssigkultur

Yersinien wurden für Infektionsversuche in Flüssigkultur wie in 2.19.1 beschrieben behandelt. Vor der Infektion wurde die Bakteriensuspension 10 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt und anschließend eine definierte Bakterienzahl auf die Zellen gegeben.

2.19.1.2 Infektionsversuche im 3D-Kollagengel

Yersinien wurden für Infektionsversuche im 3D-Kollagengel wie in 2.19.1 beschrieben behandelt. Für das Einzelschichtmatrixsystem siehe 2.19.2.2.1. Für das Doppelschichtmatrixsystem (2.19.2.2.2) wurden 20 µl Bakteriensuspension mit 5×10^4 Bakterienzellen mit 40 µl Kollagenstocklösung (2.10.4) vermischt. 60 µl des Bakterienkollagengemisches wurden in einen Napf eines 8-Napfobjektträgers (IBIDI, Martinsried) gegeben und mit einer Pipettenspitze gleichmäßig verteilt. Zur Kollagenpolymerisierung wurde der Objektträger bei 37°C und 5 % CO₂ 30 min inkubiert, daraufhin wurde das Kollagengel mit 200 µl phenolrotfreiem RPMI-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) überschichtet und übernacht bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet.

2.19.2 Behandlung der Phagozyten für Infektionsversuche

2.19.2.1 Infektionsversuche in Flüssigkultur

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.18.1 und 2.18.2 beschrieben vorbereitet und wie in Tab. 2.18 gezeigt in RPMI-Medium mit 5 % FCS in Napfschälchen ausgesät. Daraufhin wurden die Zellen 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Yersinien wie

in 2.19.1 beschrieben zugegeben und unter Schwenken mit den Zellen vermischt. Je nach Versuchsbedingung wurden die Zellen 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 oder 180 min mit den Yersinien zusammen bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet. Im Anschluss wurden die Napfschälchen auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in geeignete, auf Eis stehende Behältnisse überführt und die Näpfe zweimal ausgiebig mit doppeltem Infektionsansatzvolumen D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) gespült. Das Sedimentieren wurde mit 300 g, bei 4°C für 5 min vorgenommen. Das Zellpellet wurde je nach Versuch weiter verarbeitet.

Tab 2.18 Anzahl ausgesäter Zellen pro Napf.

Napfschälchen	Zellzahl	Volumen
6-Napfschälchen	1 – 2 x 10 ⁷ Zellen	1800 µl
24-Napfschälchen	5 x 10 ⁵ – 1 x 10 ⁶ Zellen	180 µl
96-Napfschälchen	1 x 10 ⁵ Zellen	75 µl

2.19.2.2 Infektionsversuche im 3D-Kollagengel

2.19.2.2.1 Einzelschichtsystem

Die Phagozyten wurden, wie in Abschnitt 2.17.2, 2.18.1 und 2.18.2, Yersinien wie in Abschnitt 2.19.1 beschrieben, vorbereitet. 16,5 µl RPMI-Medium mit 5 x 10⁵ – 5 x 10⁷ Bakterien wurden mit 16,5 µl RPMI + 10 % FCS mit 5 x 10⁵ eukaryotischen Zellen und 66 µl Kollagenstocklösung (2.10.4) vermischt. 100 µl des Bakterien-Zell-Kollagengemisches wurde in Zellkulturschalen mit Glasboden der Firma Mattek gleichmäßig verteilt. Zur Kollagenpolymerisierung wurde der Objektträger bei 37°C und 5 % CO₂ 30 min inkubiert, daraufhin wurde das Kollagengel mit 500 µl phenolrotfreiem RPMI-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) überschichtet.

2.19.2.2.2 Doppelschichtsystem

Die Phagozyten wurden wie in Abschnitt 2.18.1 und 2.18.2 beschrieben vorbereitet. Daraufhin wurden 33 µl Zellsuspension (5 x 10⁵ Zellen) mit 66 µl Kollagenstocklösung (2.10.4) vermischt. 100 µl des Zellkollagengemisches wurden über das Bakterienkollagengel (2.19.1.2) in einen Napf eines 8-Napfobjektträgers (IBIDI, Martinsried) geschichtet und vorsichtig mit einer Pipettenspitze gleichmäßig verteilt. Zur Kollagenpolymerisierung wurde der Objektträger bei 37°C und 5 % CO₂ 30 min inkubiert, daraufhin wurde das Kollagengel mit 200 µl phenolrotfreiem RPMI-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) überschichtet.

2.19.3 Beobachtung von Bakterien-Phagozyten Interaktionen im 3D-Kollagengel

Die Beobachtung der Interaktion von Phagozyten mit einzeln liegenden Zellen, Bakterien Ketten und Mikrokolonien verschiedener *Y. enterocolitica* Stämme wurde mit dem konfokalen Mikroskop TCS SP5 (Leica, Wetzlar) sowie dem PerkinElmer Ultraview-System mit Nikon Eclipse TE300 Mikroskop durchgeführt.

Aufnahmen der Interaktionen in Einzelschichtmatrixsysteme wurden ausschließlich am PerkinElmer Ultraview-System mit einem Nikon Eclipse TE300 Mikroskop durchgeführt. Das Mikroskop besitzt eine Nipkow-Scheibe („spinning disc“) zur Aufnahme konfokaler Bilder. Die Bildaufnahme erfolgt mittels Orca ER Kamera. Das Mikroskop ist von einer Umweltkammer umgeben um Parameter (Temperatur, CO₂-Konzentration und Luftfeuchtigkeit) für die „live cell“-Mikroskopie konstant halten zu können. Es wurde ein Laser der Wellenlänge 488 nm zur Anregung von Fluorophoren und der Hellfeldkanal verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels der Ultraview-Software (PerkinElmer). Für die Lebendzellmikroskopie wurden Zellkulturschalen mit Glasboden der Firma Mattek verwendet. Die Beobachtung erfolgte über 30 – 120 min mit einem Bildabstand von 30 sec.

Interaktion von PMNs mit Mikrokolonien verschiedener *Y. enterocolitica* Stämme im Doppelmatrixsystem konnte mit dem konfokalen Microskop TCS SP5 (Leica, Wetzlar) mit den Objektiven 63x/1,4 – 0,6 NA und 40x/1,25 – 0,75 NA beobachtet werden. Dafür wurden in Näpfen eines 8-Napfobjektträgers (IBIDI, Martinsried) Doppelmatrixgele gegossen (2.19.1.2 und 2.19.2.2). Die Migration der PMNs sowie dessen Interaktion mit den Mikrokolonien wurde in 10 – 30 µm optischen Ebenen (Schnittdicke von 0,5 – 1 µm) über eine Dauer von 30 – 120 min beobachtet. Von einem Stapel wurde ca. alle 2 min eine Bildsequenz in maximal 4 Kanälen (Hellfeld, grüne, rote und blaue Fluorescence) erhoben. Für die Lebendzellmikroskopie wurden Einzel- bzw. 8-Napfobjektträger der Firma IBIDI (Martinsried) verwendet.

Yersinien sind zur Visualisierung mit dem Plasmid pRFP bzw. pGFP transformiert worden (Tab. 2.3). PMNs wurden mit APF (2.19.4), 1 µM „CellTracker™ Blue“ CMF₂HC (Invitrogen, Karlsruhe) bzw. mit 0,5 µM „CellTracker™ Green“ CMFDA (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers gefärbt.

2.19.4 Nachweis der Produktion reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) durch PMNs

2.19.4.1 *p*-Amino-Phenyl-3'-Fluoreszein (APF)

Um die intrazelluläre Produktion von Hypochloritanionen (OCl^-), Hydroxylradikalen ($\bullet\text{OH}$) und/oder Peroxynitritanionen (ONOO^-) durch PMNs nachzuweisen, wurden Neutrophile isoliert (2.18.1 und 2.18.2), in phenolrotfreiem RPMI mit 5 % FCS (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und eine APF-Konzentration von 10 μM APF eingestellt. Die Zellen wurden daraufhin wie in 2.19.2.1 beschrieben ausgesät oder wie in 2.19.2.2 beschrieben ins Kollagengel eingegossen.

Infektionsversuche in Flüssigkultur wurden wie in 2.19.2.1 beschrieben mit einer MOI10 durchgeführt und daraufhin wurden die Zellen in FACS-Puffer (2.10.3) aufgenommen. PMNs wurden anhand ihrer Oberflächenmarker markiert (2.18.3.3 und 2.18.3.4) und die Fluoreszenz wurde durchflußzytometrisch gemessen. Es wurde die Anzahl grün leuchtender PMNs sowie der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität bestimmt.

Für Interaktionsstudien im 3D-Kollagengel (2.19.2.2) konnte die Sauerstoffradikalbildung (grüne Fluoreszenz des oxidierten APF-Moleküls) mittels Lebendzellvisualisierung auch im konfokalen Mikroskop (2.19.3) beobachtet werden.

2.19.4.2 Luminol

Um die intra- und extrazelluläre Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} , HOCl , $^{\bullet}\text{NO}$ und/oder ONOO^-) durch PMNs nachweisen zu können wurden Neutrophile isoliert (2.18.1 und 2.18.2), in phenolrotfreiem RPMI mit 5 % FCS (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und eine Luminolkonzentration von 150 μM Luminol eingestellt. Es wurden 1 x 10⁵ Zellen/Napf in 96-Napfschälchen ausgesät und 30 min bei 37°C und 5 % CO_2 bebrütet. Daraufhin wurden die Zellen mit *Y. enterocolitica* Stämmen im Triplikat mit einer MOI10 wie in 2.19.1 und 2.19.1.1 angegeben infiziert. Luminol hat sein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 425 nm. Die Messung erfolgte alle 2 min für 2 h an einem Luminometer FLUOStar OPTIMA (BMG LABTECH, Offenburg) und die Auswertung fand mit der Software Optima V2.10.R7 (BMG LABTECH, Offenburg) statt.

2.19.5 Integrin Blockierung von humanen PMNs

Um Integrine humaner PMNs zu blockieren wurden PMNs aus heparinisiertem humanem Blut wie in 2.18.1 beschrieben isoliert. 1 x 10⁶ Zellen wurden bei 4°C mit 300g für 5 min sedimentiert und in 100 μl anti-human β_1 Integrin (AIIB2) Hybridomazellüberstand (AG Haas, MvPI München), in 100 μl anti-human β_1 Integrin (AIIB2) Hybridomazellüberstand mit

2 µg anti-human β_2 Integrin (P4H9) Antikörper oder in 100 µl phenolrotfreiem RPMI mit 5 % FCS (Invitrogen, Karlsruhe) mit anti-human β_2 Integrin (P4H9) Antikörper im Kühlschrank für 1 h inkubiert. Daraufhin wurde phenolrotfreies RPMI mit 5 % FCS (Invitrogen, Karlsruhe) auf die Ansätze gegeben, eine Konzentration von 10 µM APF (Invitrogen, Karlsruhe) eingestellt und $2,5 \times 10^5$ Zellen/Napf in 180 µl in 24 Napfschälchen ausgesät. Die Infektion mit *Y. enterocolitica* Stämmen wurde für 15 und 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ vorgenommen. Im Anschluss wurden die Napfschälchen auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in geeignete, auf Eis stehende Behältnisse überführt und die Näpfe zweimal ausgiebig mit doppeltem Infektionsansatzvolumen D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) gespült. Es wurde mit 300g, bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100 µl FACS-Puffer (2.10.3) aufgenommen und die Zellen durchflußzytometrisch gemessen.

2.19.6 Inhibition von Signalkaskaden bei humanen PMNs

Um zytosolische Proteine humaner PMNs zu inhibieren, wurden Neutrophile aus heparinisiertem humanem Blut wie in 2.18.1 beschrieben isoliert. 1×10^6 Zellen wurden in 180 µM phenolrotfreiem RPMI mit 5 % FCS (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und mit 10 µM Cytochalasin D, 80 µM AG18, 30 µM Piceatannol, 10 µM Genistein, 10 µM SB203580, 1 µM Wortmannin oder 50 µM PD98059 (Tab. 2.7) und 10 µM APF (Invitrogen, Karlsruhe) versehen. Daraufhin wurden die Zellen in 24-Napfschälchen 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Infektion mit dem *Y. enterocolitica* Stamm erfolgte für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂. Im Anschluss wurden die Napfschälchen auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in geeignete, auf Eis stehende Behältnisse überführt und die Näpfe zweimal ausgiebig mit doppeltem Infektionsansatzvolumen D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe) gespült. Es wurde mit 300g, bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100 µl FACS-Puffer (2.10.3) aufgenommen und die Zellen durchflußzytometrisch gemessen.

2.20 Tierversuche

Tierversuche und Organentnahmen wurden gemäß der geltenden Rechtsgrundlage (Tierversuchsantrag: 55.2-1-54-2531-153-07 und 55.2-1-54-2531-82-07) durchgeführt.

2.20.1 Verwendete Mausstämme

Tab 2.19 Verwendete Mausstämme.

Mausstamm	Herkunft	Anwendung
BALB/c	Janvier, eigene Zucht (MvPI München)	Mauspassage
C57BL/6	Janvier, eigene Zucht (MvPI München)	Organentnahme
MyD88 -/- knockout	ETHZ (Zürich), eigene Zucht (MvPI München)	Organentnahme
TLR1 -/- knockout	Osaka-Uematsu, eigene Zucht (MvPI München)	Organentnahme
TLR2 -/- knockout	Kirsching (TU München), eigene Zucht (MvPI München)	Organentnahme
TLR4 -/- knockout	(TU München), eigene Zucht (MvPI München)	Organentnahme
TLR6 -/- knockout	Osaka-Uematsu, eigene Zucht (MvPI München)	Organentnahme

2.20.2 Mauspassage von *Y. enterocolitica* Stämmen

Um eine Mauspassage von *Y. enterocolitica* Stämmen durchzuführen, wurden die Bakterien wie in 2.19.1 beschrieben vorbereitet. Für virulente Stämme wurden 5×10^5 Zellen in 500 μ l D-PBS, für attenuierte Stämme 5×10^7 Zellen in 500 μ l D-PBS in den Peritonealraum von BALB/c Mäusen injiziert. Nach 16 Stunden wurden die Mäuse getötet und es wurde eine Peritoneallavage vorgenommen. Daraufhin wurden die Zellen 5 min bei 4°C mit 3000g abzentrifugiert und auf CIN-Agarplatten (Oxoid, Hampshire) mit Antibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten wurden 2 Tage bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Es wurden 3 einzeln liegende Kolonien gepickt und in 100 ml BHI-Medium übernacht mit Antibiotikum bei 27°C bebrütet. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis gekühlt, bei 4°C mit 3000g für 5 min sedimentiert, in kaltem 10 ml LB-Medium mit 15 % Glycerin aufgenommen und in 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.21 Statistische Auswertung

Infektionsversuche und durchflusszytometrische Analysen mit eukaryotischen Zellen wurden mindestens dreimal in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Von den Ergebnissen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt, sowie die Signifikanz der Ergebnisse durch den Student T-Test berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von *Y. enterocolitica* auf die ROS-Produktion von PMNs

Y. enterocolitica vermehrt sich extrazellulär im Gewebe und hat, um Infektionen zu etablieren, Mechanismen entwickelt, die angeborene Immunantwort zu schwächen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Yersinien-Virulenzfaktoren auf die Unterdrückung der ROS-Produktion untersucht, einem der effektivsten Mechanismen neutrophiler Zellen mikrobielle Erreger zu eliminieren.

3.1.1 Farbstoffe zur Detektion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS)

Um ROS, produziert durch Neutrophile, nachzuweisen wurden zwei Reagenzien verwendet, Luminol und *p*-Aminophenyl-3'-Fluoreszein (APF).

Luminol als chemiluminometrisches Nachweisreagenz wurde von Allen und Loos (1976) eingeführt. Das hoch sensitive Luminol reagiert mit einer Vielzahl reaktiver Sauerstoffspezies ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , $HOCl$, $\cdot NO$, $ONOO^{\cdot}$) zu einem energiereichen bzw. angeregten Aminophthalatanion, welches dann Licht (maximale Emissionswellenlänge 425 nm) emittiert und in den Ausgangszustand zurückkehrt (Abb. 3.1 A). Mit diesem Substrat werden intra- und extrazellulär gebildete ROS nachgewiesen.

APF wurde von Setsukinai *et al.* (2003) als neuartiges Substrat entwickelt. Es ist spezifischer für definierte ROS und weniger anfällig für Licht-induzierte Autooxidation, als bisher bekannte Fluoreszein-Derivate. APF ist im reduzierten Zustand nicht fluoreszierend und wird nach Oxidation durch Hypochloritanionen ($^{\cdot}OCl$), Hydroxylradikale ($\cdot OH$) und/oder Peroxynitritanionen ($ONOO^{\cdot}$) zum fluoreszierendem Fluoreszein oxidiert (Abb. 3.1 B). Fluoreszein hat eine maximale Anregungswellenlänge von 490 nm und eine maximale Emissionswellenlänge von 515 nm. Mit diesem Fluoreszenzfarbstoff werden intrazellulär produzierte ROS nachgewiesen.

Reagenz	detektierte reaktive Sauerstoffmoleküle	Lokalisierung
Chemiluminometrisch Luminol	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , $HOCl$, $\cdot NO$, $ONOO^{\cdot}$	intrazellulär, extrazellulär
Fluorimetrisch APF	HO^{\cdot} , $ONOO^{\cdot}$, $HOCl$	intrazellulär

A	Luminol	Aminophtalat
		$R_1 = NH_2$ $R_2 = H$

B	APF	Fluoreszein
		$X = NH$

Abb. 3.1 Verwendete Farbstoffe (A) Luminol und (B) APF und ihre chemischen Reaktionen zum Nachweis von ROS.

3.1.2 Verwendete PMNs

Für folgende *in vitro* Infektionsversuche wurden humane und murine PMNs verwendet.

Humane PMNs wurden aus heparinisiertem venösem Blut gesunder Spender durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (2.18.1) (hB-PMNs). Die Reinheit der Zellpopulation wurde durch eine FACS-Analyse mit für PMNs spezifischen Antikörpern (2.18.3.3), anti-CD16-PE und anti-CD66abce-APC, sowie mikroskopisch durch eine Giemsa-Färbung überprüft. Mit beiden Methoden konnten in der Zellsuspension 96 – 98 % der Zellen als PMNs nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Die Vitalität wurde mittels einer Trypanblaufärbung überprüft und betrug 99 %.

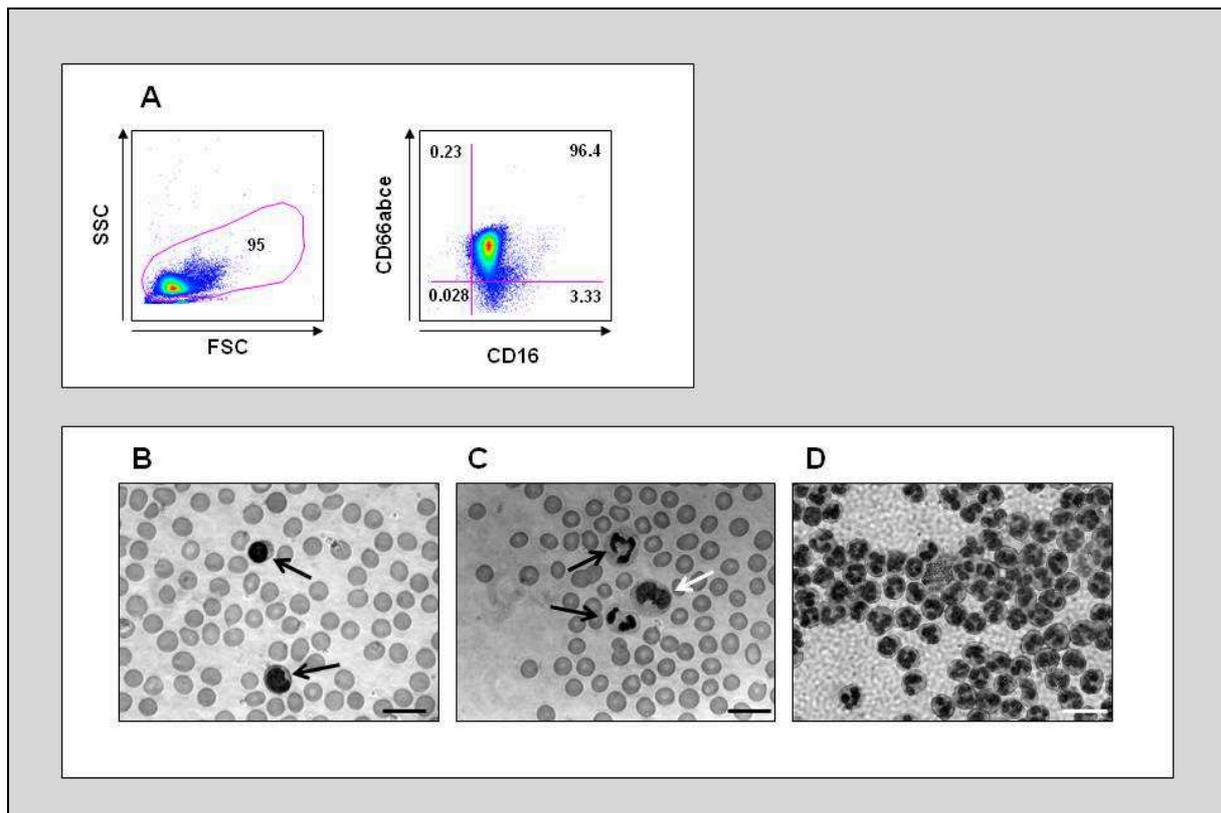


Abb. 3.2 Reinheitsgrad hB-PMNs. (A) FACS-Analyse aufgereinigter Leukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem venösem Blut. hB-PMNs sind mit anti-CD16-PE und anti-CD66abce-APC markiert. (B –D) Giemsa-Färbung. (B und C) Blutausstrich. Zu sehen sind Erythrozyten und (B) Lymphozyten (schwarze Pfeile) sowie (C) hB-PMNs (schwarze Pfeile) und Monozyten (weißer Pfeil). (D) Aufgereinigte hB-PMNs. Der angezeigte Längenstandard entspricht (B – C) 15 µm und (D) 30 µm.

Da für eine effektive Dichtegradientenzentrifugation und Aufreinigung von PMNs mehr als 10 ml Zellsuspension benötigt werden und aus einer Maus in der Regel nicht mehr als 1 ml Blut gewonnen werden kann, wurden, um murine PMNs zu untersuchen, Knochenmarkszellen oder nach Induktion einer sterilen Peritonitis, Zellen aus einer Peritoneallavage, verwendet (2.18.2). Da es trotzdem einen erheblichen Zellverlust bedeuten würde diese Zellen mittels einer Dichtegradientenzentrifugation aufzureinigen, wurden alle Infektionsversuche mit murinen Mischzellpopulationen durchgeführt und eine spätere Differenzierung im FACS vorgenommen. Der verwendete Antikörper hierfür war Ly-6G-PE bzw. -APC (2.18.3.4). Eine Peritonitis wurde für 3 Stunden durch eine Proteoseptonlösung (PPL) induziert (2.18.2.3). In dieser Zeit wandern PMNs in den Bauchraum ein. Der prozentuale Anteil an mPEPNs (murine Proteosepton-rekrutierte PMNs) der Peritoneallavage betrug für alle verwendeten Mausstämme (C57BL/6, TLR1 $-/-$, TLR2 $-/-$, TLR4 $-/-$, TLR6 $-/-$) $61,49\% \pm 7,12$. Eine Ausnahme stellte die MyD88 $-/-$ „knock out“ Maus dar. In diesem Fall konnten $20,42\% \pm 3,97$ mPEPNs festgestellt werden. Der prozentuale

Anteil an mBM-PMNs (Knochenmarks-PMNs) betrug bei C57BL/6 im Knochenmark $53 \% \pm 4,36$ (Abb. 3.3). MBM-PMNs sind im Gegensatz zu mPEPNs nicht vorstimuliert, da sie noch keine Transmigration durchgeführt haben und nicht mit Entzündungsmediatoren in Kontakt gekommen sind.

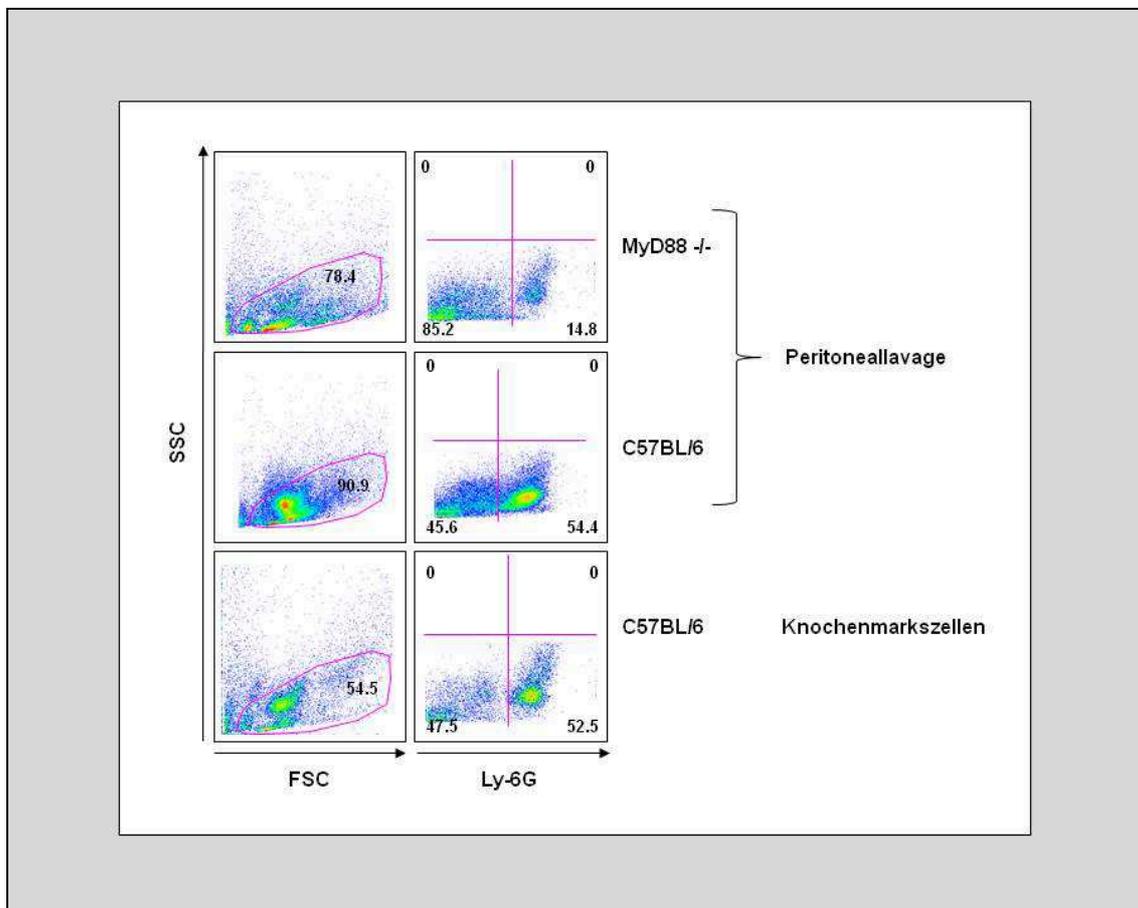


Abb. 3.3 Murine PMNs. FACS-Analyse muriner PMNs gewonnen aus dem Knochenmark (mBM-PMNs) bzw. einer Peritoneallavage nach PPL-Stimulation (mPEPN). Es wurde der Granulozytenmarker Ly-6G-PE/-APC verwendet.

3.1.3 Verwendete *Y. enterocolitica* Stämme

Es wurden neben dem Wildtypstamm WA(pYV) unterschiedliche *Y. enterocolitica* Mutanten verwendet. Diese können in drei große Gruppen aufgeteilt werden: WA(pYV Δ X) (*yop*-Deletionsmutanten), Adhäsion-Deletionsmutanten und WA(pT3SS, pYopX) (*yop*-Einzelmutanten). Alle Stämme wurden auf das Genprodukt des deletierten bzw. eingefügten Gens untersucht. Für WA(pYV Δ X) und WA(pT3SS, pYopX) wurden die Bakterien in einem Ca^{2+} -Mangelmedium kultiviert, um die Yop-Sezernierung zu induzieren. Die Proteine wurden aus dem Kulturüberstand mittels TCA gefällt (2.15.1). Um die Außenmembranproteine YadA, Invasin und Myf nachzuweisen, wurden spezielle Anzuchtbedingungen gewählt

(2.15.2, 2.15.3) und daraufhin ein Zelllysate hergestellt. Die Proteine wurden durch 10 oder 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die gewünschten Proteine über spezifische Antikörper (Tab. 2.6) detektiert. Für alle verwendeten Mutanten konnte das Fehlen bzw. die Produktion des Genproduktes des deletierten bzw. eingefügten Gens bestätigt werden (Abb. 3.4).

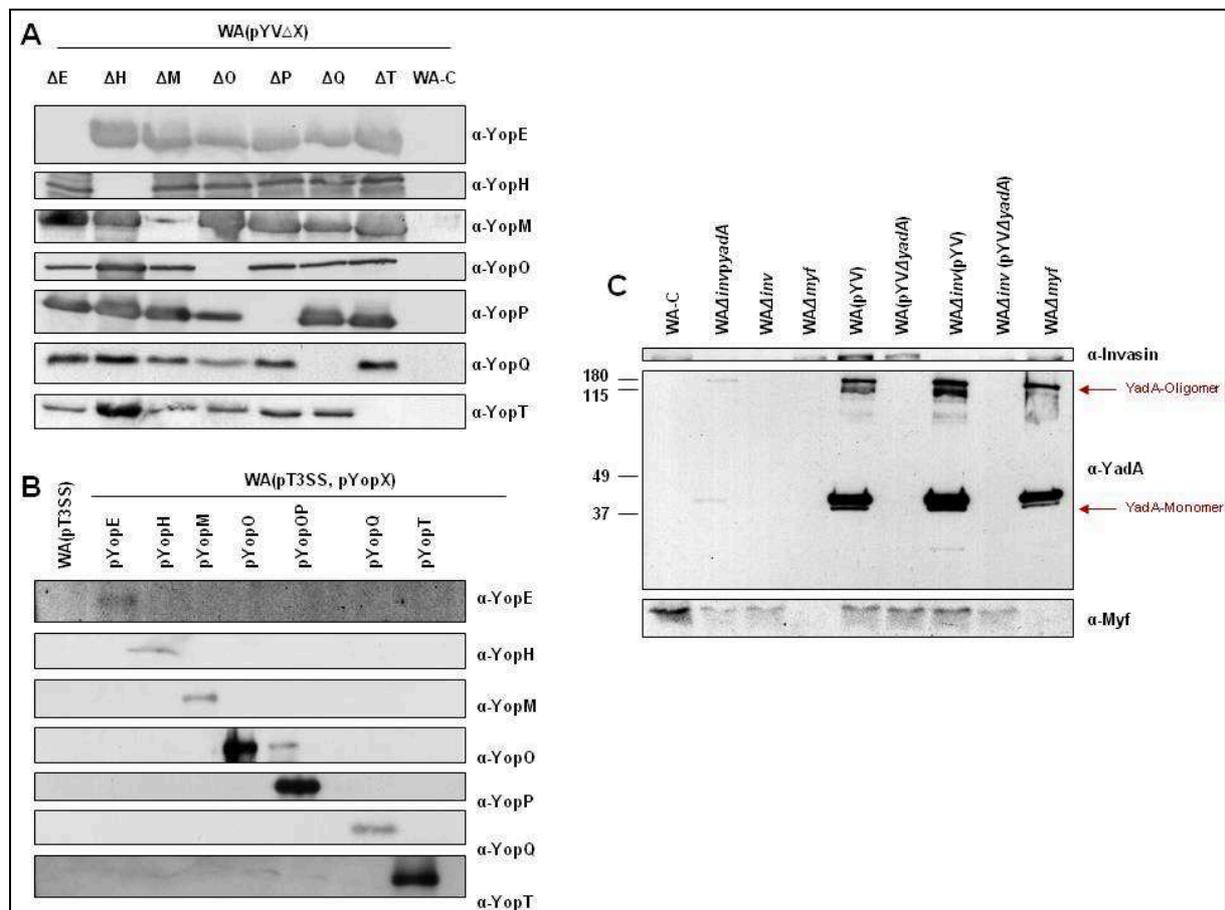


Abb. 3.4 Verwendete *Y. enterocolitica* Stämme. (A) WA(pYVΔX), (B) WA(pT3SS, pYopX) und (C) Adhäsions-Deletionsmutanten. (A und B) Sezernierte Yops bzw. (C) Zelllysate wurden auf ein 12%iges, für die YadA- und Invasin-Detektion auf ein 10%iges SDS-PAGE, aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Immunoblots wurden mit den Primärantikörpern Kaninchen anti-YopH/M/O/P/Q/T-Seren (1:1000), mit Kaninchen anti-YopE-Serum (1:10000), mit Maus anti-YadA 8D1-Antikörper (1:1000), mit Kaninchen anti-Myf-Serum (1:1000) und mit Kaninchen anti-Invasin Serum (1:1000) sowie mit den Sekundärantikörpern Schaf anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat (1:10000) und Esel anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat (1:10000) inkubiert.

3.1.4 Kinetik der ROS Produktion von PMNs infiziert mit *Y. enterocolitica*

Es wurden Zeitverläufe der ROS-Produktion von PMNs mit dem klassischen ROS-Detektionsreagenz Luminol und dem neuen ROS-Fluoreszenzindikator APF erstellt. Es wurden hB-PMNs (2.18.1) und mPEPNs (2.18.2.3) verwendet. Die PMNs wurden mit dem virulenten ROS-unterdrückenden Stamm WA(pYV) (Negativkontrolle) bzw. dem T3SS-defekten, ROS-induzierenden Stamm WA(pYV Δ lcrD) (Positivkontrolle) infiziert.

3.1.4.1 Luminol

PMNs wurden mit 150 μ M Luminol versetzt (2.19.4.2). Nach der Infektion mit den oben angegebenen *Y. enterocolitica* Stämmen (MOI10) wurde das emittierte Licht über 2 h alle 2 min in einem Luminometer gemessen.

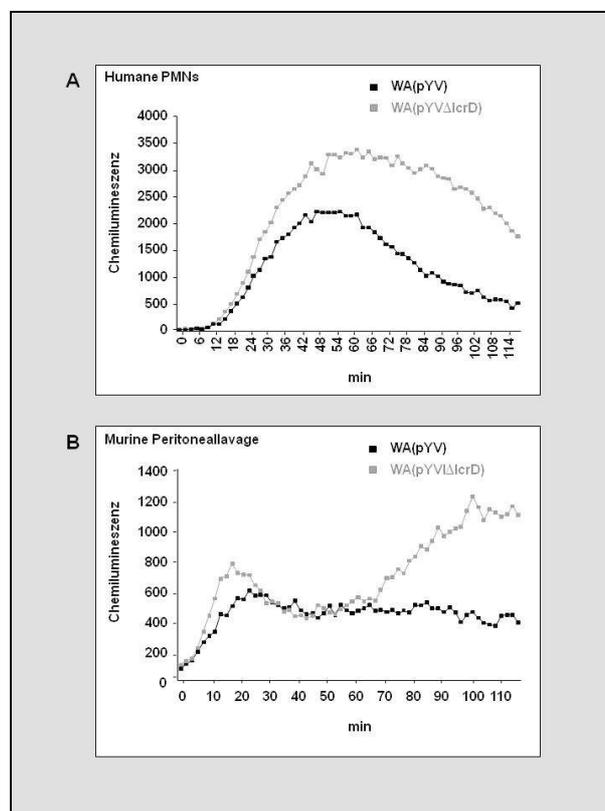


Abb. 3.5 Intra und extrazelluläre ROS-Produktion. 1×10^5 Zellen wurden mit 150 μ M Luminol versetzt. (A) hB-PMNs. (B) mPEPNs. Infiziert wurde mit einer MOI10 für 2 h mit WA(pYV) und WA(pYV Δ lcrD). Dargestellte Werte sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen.

Für hB-PMNs konnte die bereits bekannte ROS-Produktionskinetik (Ruckdeschel, *et al.*, 1996) für Infektionen mit WA(pYV) und WA(pYV Δ lcrD) reproduziert werden (Abb. 3.5A). hB-PMNs die mit WA(pYV) infiziert wurden zeigten eine geringere intra- und extrazelluläre ROS-Produktion mit einem Maximalwert von $2231 \text{ AE} \pm 413$ nach 48 min, als hB-PMNs,

welche mit WA(pYV Δ lcrD) infiziert wurden und einen Maximalwert von 3382 AE \pm 274 nach 62 min aufwiesen.

Für mPEPNs wurde die Zellsuspension der Peritoneallavage verwendet. Diese beinhalteten 58 % \pm 10,15 mPEPNs. Der Zeitverlauf der ROS-Produktion für Zellen infiziert mit WA(pYV Δ lcrD) zeigte zwei Maxima, einen bei 760 AE \pm 133 nach 18 min und einen bei 1204 \pm 37 nach 102 min. Peritoneale Zellen, welche mit WA(pYV) infiziert wurden produzierten weniger reaktive Sauerstoffradikale, was durch kleinere Chemilumineszenzwerte angezeigt ist. Der Maximimalwert von 582 AE \pm 133 wurde nach 24 min erreicht, gefolgt von einem Plateau mit leicht abfallenden Werten von 500 AE bis 350 AE (Abb. 3.5B).

Die Luminolkinetik der mPEPNs unterscheidet sich durch ihre zwei Maxima von der Kinetik der hB-PMNs. Verschiedene Gründe (Vorstimulation der mPEPNs, die Mischzellpopulation mit weiteren ROS-produzierenden Zellen, wie z. B. Makrophagen oder grundlegende Spezies-spezifische Ungleichheiten muriner und humaner PMNs) können für diese Unterschiede verantwortlich sein. Im Weiteren Verlauf dieser Arbeit werden Luminolveruche nur noch für hB-PMNs durchgeführt, da deren Ergebnisse aufgrund fehlender Vorstimulation besser ausgewertet werden können.

3.1.4.2 APF

PMNs wurden mit 10 μ M APF 30 min. (2.19.4.1) und daraufhin mit den *Y. enterocolitica* Stämmen WA(pYV) bzw. WA(pYV Δ lcrD) (MOI10) 0, 5, 15, 30, 60 und 120 min inkubiert. Die ROS-Produktion der PMNs wurde durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse bestimmt (2.18.4). Die PMN-Population wurde anhand von Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen Oberflächenproteine, für humane Zellen anti-CD16-PE und anti-CD66abce-APC (2.18.3.3), für murine Zellen anti-Ly-6G-PE (2.18.3.4), ermittelt.

Als erstes wurde der prozentuale Anteil an ROS-produzierenden PMNs ermittelt (Abb. 3.6 A und B; 3.7 A und B). Dieser stieg nach Infektionsbeginn mit dem T3SS-defekten Stamm WA(pYV Δ lcrD) von 0% stetig an, erreichte nach 60 min einen maximalen Wert von 98 % für hB-PMNs und 66 % für mPEPNs und blieb 120 min nachweisbar. Für die Infektion mit WA(pYV) stieg der prozentuale Anteil an ROS-produzierenden PMNs auf einen maximalen Wert von 65 % nach 60 min (hB-PMNs) und 47 % nach 30 min (mPEPNs) an. Dieser fiel daraufhin nach 120 min bei hB-PMNs auf 34 % und bei mPEPNs auf 3 % ab. Eine Propidiumiodidfärbung zeigte, dass 98% der PMNs nach einer zweistündigen Infektion noch intakt waren (Abb. 3.8). Dies deutet auf einen Efflux des oxidierten APFs bei PMNs infiziert mit dem virulenten ROS-unterdrückenden Stamm WA(pYV) hin, welcher wahrscheinlich bei

PMNs infiziert mit dem T3SS-defekten Stamm WA(pYV Δ lcrD) durch die nicht unterdrückte, fortwährende Produktion von ROS ausgeglichen wird.

Da APF-positive PMNs nach Kontakt mit Yersinien entstehen (qualitativer Nachweis) sollte die Fluoreszenzintensität der PMNs über die Anzahl der zell-assoziierten Yersinien und ihre ROS-inhibierende Aktivität bestimmt werden (quantitativer Nachweis). Deshalb wurde auch der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität der fluoreszierenden, ROS-produzierenden PMNs bestimmt (Abb. 3.6 C und Abb. 3.7 C). Wurde mit WA(pYV Δ lcrD) infiziert, zeigte sich ein Anstieg der Fluoreszenzintensität auf den Wert von 409 AE bei hB-PMNs nach 30 min, dagegen wurde bei mPEPNs der maximale Wert von 441 AE erst nach 60 min erreicht. Nach 120 min fiel die Fluoreszenzintensität bei hB-PMNs auf 250 AE und bei mPEPNs auf 247 AE. Bei einer Infektion mit WA(pYV) zeigte sich eine schwächere Fluoreszenzintensität, verglichen mit der Fluoreszenzintensität der PMNs infiziert mit WA(pYV Δ lcrD). Bei hB-PMNs trat dies bereits nach 15 min und bei mPEPNs nach 30 min ein. Der Maximalwert der Fluoreszenzintensität bei PMNs infiziert mit WA(pYV) betrug bei hB-PMNs nach 30 min 216 AE sowie bei mPEPNs 264 AE. Nach 120 min konnte keine Fluoreszenz mehr beobachtet werden.

Es wird ein höherer Prozentsatz an hB-PMNs, als an mPEPNs stimuliert, ablesbar an dem Prozentsatz an fluoreszierenden Zellen. Der Unterschied im geometrischen Mittel der Fluoreszenzintensität, der an zeitlichen Messpunkten, an denen die Anzahl an fluoreszierenden Zellen nicht variiert, beobachtet werden kann, kann als Yop-Effekt bezeichnet werden. Dieser kann bis zu 30 min bestimmt werden. Für weitere Studien wird aus diesem Grund eine Infektionszeit von 30 min verwendet. Der Yop-Effekt ist bei mPEPNs kleiner als bei hB-PMNs. Außerdem setzt die Wirkung der Yops bei mPEPNs später ein. Unterschiedliche Gründe (bessere Adhärenz der Yersinien an hB-PMNs bzw. eine effektivere oder schnellere Yop Translokation) könnten dafür verantwortlich sein.

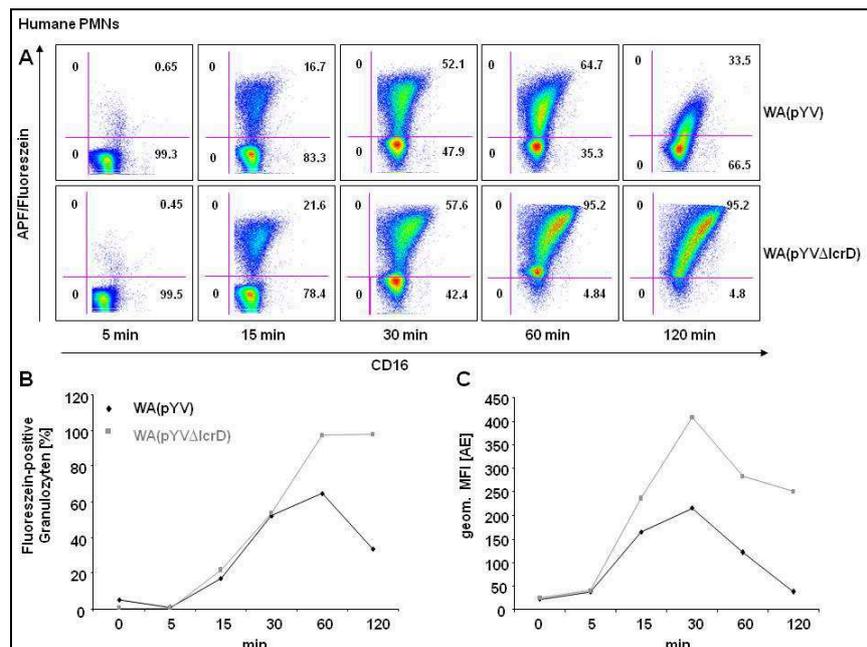


Abb. 3.6 Intrazelluläre ROS-Produktion hB-PMNs. 1×10^6 Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ APF 30 min inkubiert, mit WA(pYV) bzw. WA(pYVΔlcrD) (MOI10) für 0, 5, 15, 30, 60 und 120 min infiziert und daraufhin durchflusszytometrisch analysiert. (A) Punktwolkendiagramm hB-PMNs (CD16- und CD66abce-positive Zellen). (B) Prozentualer Anteil an ROS-produzierender hB-PMNs. (C) Geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität.

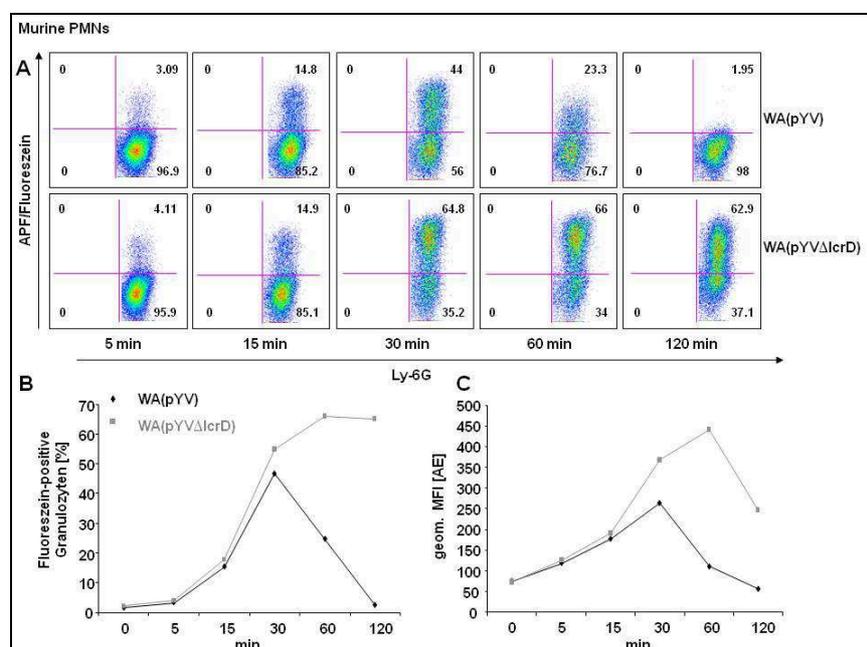


Abb. 3.7 Intrazelluläre ROS-Produktion mPEPNs. 1×10^6 Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ APF 30 min inkubiert, mit WA(pYV) bzw. WA(pYVΔlcrD) (MOI10) für 0, 5, 15, 30, 60 und 120 min infiziert und daraufhin durchflusszytometrisch analysiert. (A) Punktwolkendiagramm mPEPNs (Ly-6G-positive Zellen). (B) Prozentualer Anteil an ROS-produzierender mPEPNs. (C) Geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität.

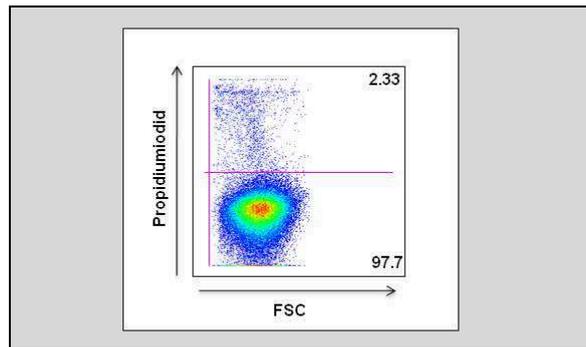


Abb. 3.8 Propidiumiodidfärbung. Punktwolkendiagramm einer durchflusszytometrischen Analyse hB-PMNs. 1×10^6 Zellen wurden 2 h mit WA(pYV) (MOI10) infiziert und daraufhin 1 min mit $1\mu\text{g}$ Propidiumiodid inkubiert.

3.1.5 Mikroskopische Evaluierung der ROS-Detektion mittels des APF Farbstoffes

Zur näheren Charakterisierung des APF-Reagenzes wurden 5×10^5 hB-PMNs mit $10 \mu\text{M}$ APF für 30 min inkubiert und mit rot fluoreszierenden *Y. enterocolitica* Stämmen, die unterschiedliche Derivate des pYV-Plasmids und ein RFP-kodierendes Plasmid enthalten (WA(pYV, pRFP), WA(pYV Δ lcrD, pRFP), WA(pYV Δ E, pRFP), WA(pYV Δ H, pRFP), WA(pYV Δ M, pRFP), WA(pYV Δ O, pRFP), WA(pYV Δ P, pRFP), WA(pYV Δ Q, pRFP) und WA(pYV Δ T, pRFP)) für 30 min infiziert. Anschließend wurden die Zellen mittels Konfokaler-Laser-Mikroskopie analysiert (Abb. 3.9). Bei allen *Y. enterocolitica* Stämmen konnten phagozytierte Bakterien und eine ROS-Produktion beobachtet werden. Die Anzahl an grünen Zellen pro Gesichtsfeld war für alle Mutanten in etwa gleich. Da es sich um nicht fixierte Lebendzellen handelte, war es durch die Bewegung der PMNs schwierig genau vergleichbare Präparate zu erhalten um Phagozytoseraten zu ermitteln. Das Fixieren der Präparate mit 3,5% PFA führte zum Fluoreszenzverlust der Zellen. Wurden die Zellen auf Eis aufbewahrt, konnte die Fluoreszenz der Zellen erhalten werden, jedoch verteilte sich das Fluoreszein im Zytosol der PMNs und eine genaue Lokalisierung des Farbstoffes war nicht mehr möglich. Für die quantitative Beurteilung der ROS-Produktion stellte sich die FACS-Analyse als geeignetere und sensitivere Methode, als die Evaluierung mit der Software des konfokalen Lasermikroskops heraus. Die Abbildung 3.9 A zeigt repräsentative Aufnahmen ROS-produzierender hB-PMNs infiziert mit dem virulenten Kontrollstamm WA(pYV, pRFP) und dem T3SS-defekten aktivierenden Kontrollstamm WA(pYV Δ lcrD, pRFP). Die Bilder zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede sichtbar sind. Umgesetztes APF-Reagenz zu Fluoreszein konnte in Yersinien-enthaltenden Phagosomen und einzelnen Vesikeln beobachtet werden. Wurde die ROS-Produktion mit 40 nM PMA (Rezeptor-unabhängig) stimuliert, konnte 2 min nach Zugabe die ersten fluoreszierenden Vesikel detektiert werden. Nach 10 min waren die PMNs gefüllt mit Fluoreszein enthaltenden Vesikeln (Abb. 3.9 B).

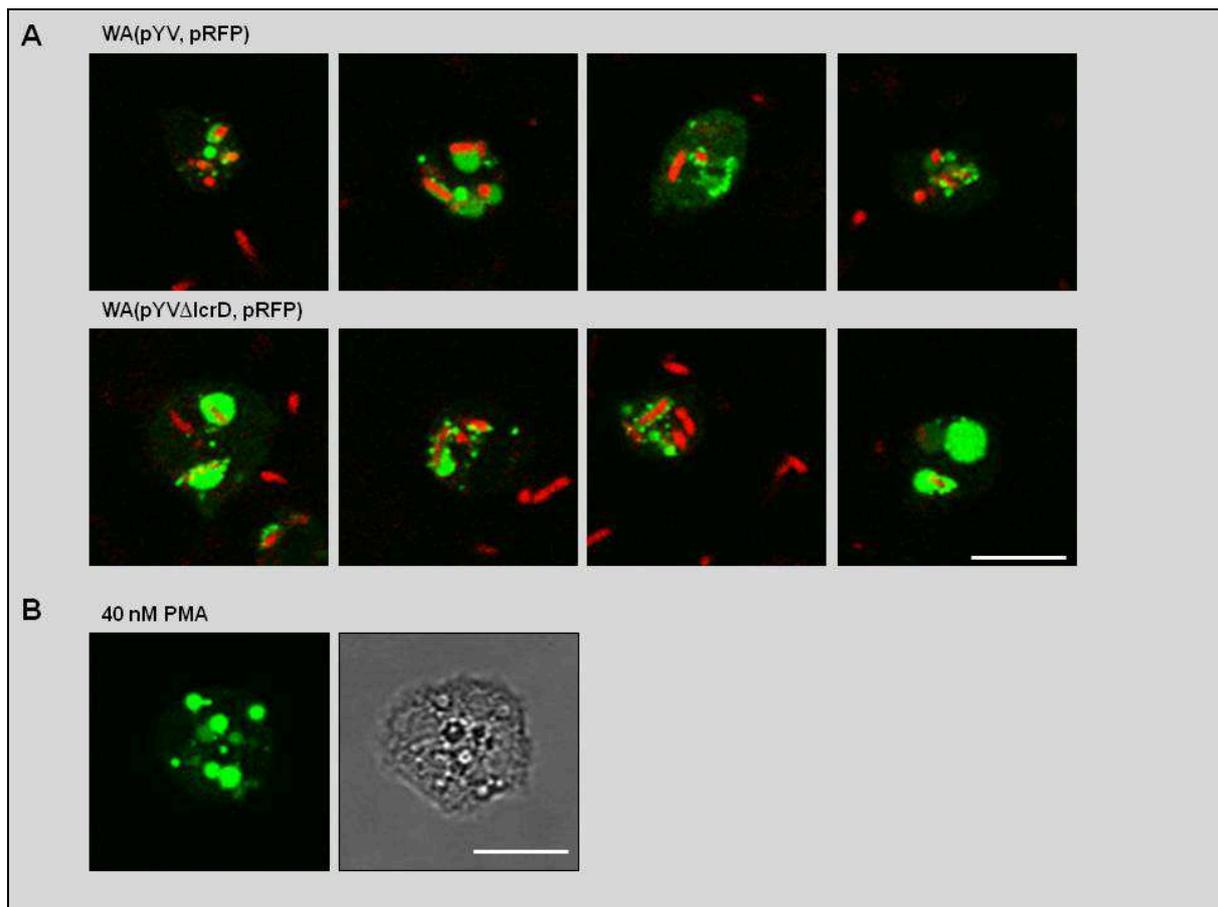


Abb. 3.9 Konfokalmikroskopische Bilder ROS-produzierender PMNs. HB-PMNs wurden mit 10 μ M APF 30 min inkubiert. (A) Infektion mit WA(pYV, pRFP) und WA(pYV Δ lcrD, pRFP) (MOI10) für 30 min. (B) Stimulation mit 40 nM PMA nach 10 minütiger Inkubation bei 37°C + 5% CO₂. Der Größenbalken entspricht (A und B) 10 μ m.

3.1.6 Einfluss der *Y. enterocolitica* Yops auf die ROS-Produktion von PMNs

Vorangegangene Versuche zeigten, dass *Y. enterocolitica* Yops einen Einfluss auf die ROS-Produktion von PMNs ausüben. Um die Beteiligung der einzelnen Yops zu untersuchen, wurden Infektionsversuche mit Mutantenstämmen durchgeführt, die aufgrund einer Gendeletion jeweils ein *yop* nicht exprimieren können (WA(pYV Δ X)) (Tab. 2.2). Es wurden Yersinia-Neutrophil-Studien mit den ROS-Detektionsreagenzien APF und Luminol durchgeführt.

3.1.6.1 Luminol-Studien mit WA(pYV Δ X) Mutanten

Luminol detektiert intra- und extrazellulär produzierte reaktive Sauerstoffspezies. Es wurden hB-PMNs (2.18.1) mit 150 μ M Luminol (2.19.4.2) versehen und mit den Stämmen WA(pYV), WA(pYV Δ lcrD), WA(pYV Δ E), WA(pYV Δ H), WA(pYV Δ M), WA(pYV Δ O),

WA(pYVΔP), WA(pYVΔQ) und WA(pYVΔT) mit einer MOI10 infiziert. Die Messung der Lichtemission erfolgte alle 2 min für 2 h mit einem Luminometer.

Für hB-PMNs konnte die bereits bekannte ROS-Produktionskinetik (Ruckdeschel *et al.*, 1996) für Zellen, die mit WA(pYV) (max. 2231 AE ± 413, 48 min) und WA(pYVΔlcrD) (max. 3382 AE ± 274, 62 min) infiziert wurden, reproduziert und bestätigt werden. HB-PMNs, welche mit WA(pYVΔX) infiziert wurden, zeigten eine höhere ROS-Produktion als die, die mit dem virulenten Stamm WA(pYV) (Negativkontrolle) (Abb. 3.10) infiziert wurden. Die Maxima der ROS-Produktion konnten zwischen 48 und 58 min beobachtet werden. HB-PMNs infiziert mit WA(pYVΔP) (max. 4091 AE ± 680, 50 min) zeigten die höchste intra- und extrazelluläre ROS-Produktion. Für hB-PMNs infiziert mit WA(pYVΔO) (max. 2746 AE ± 153, 58 min) und WA(pYVΔT) (max. 2845 AE ± 383, 58 min) konnten die geringsten Werte beobachtet werden. Alle anderen Infektionsansätze mit den Stämmen WA(pYVΔE) (max. 3374 AE ± 44, 54 min), WA(pYVΔH) (max. 3432 AE ± 234, 48 min), WA(pYVΔM) (max. 3226 AE ± 308, 50 min) und WA(pYVΔQ) (max. 3496 AE ± 424, 58 min) gruppierten sich um die Werte des Stammes WA(pYVΔlcrD) (Positivkontrolle) und zeigten eine mittlere ROS-Produktion. Der Einfluss der WA(pYVΔX) auf die ROS-Produktion mPEPNs wurde mit dem Luminolreagenz aus Gründen, die in 3.1.4.1 beschrieben sind, nicht untersucht.

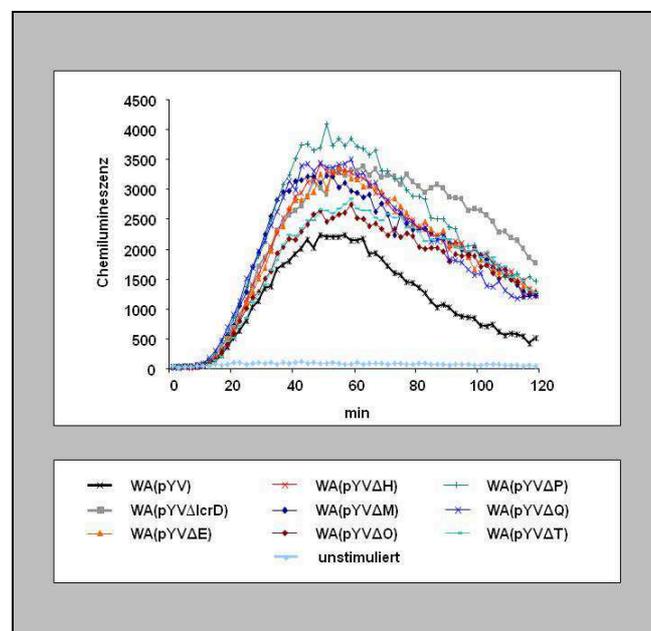


Abb. 3.10 Intra- und extrazelluläre ROS-Produktion humaner PMNs infiziert mit WA(pYVΔX). 1×10^5 hB-PMNs wurden mit 150 μ M Luminol versetzt. Es wurde mit den Stämmen WA(pYV), WA(pYVΔlcrD), WA(pYVΔE), WA(pYVΔH), WA(pYVΔM), WA(pYVΔO), WA(pYVΔP), WA(pYVΔQ) und WA(pYVΔT) mit einer MOI10 infiziert und die Lichtemission alle 2 min für 2 h gemessen. Dargestellte Werte sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen.

3.1.6.2 APF-Studien mit WA(pYVΔX) Mutanten

Um die intrazelluläre ROS-Produktion von PMNs nachzuweisen, wurden hB-PMNs (2.18.1), murine Knochenmarks- (2.18.2.1) und peritoneale Zellen (2.18.2.3) verwendet und mit 10 μM APF (2.19.4.1) inkubiert. Die Infektion wurde für 30 min bei 5 % CO₂ und 37°C mit einer MOI10 mit den Stämmen WA(pYV), WA(pYVΔlcrD), WA(pYVΔE), WA(pYVΔH), WA(pYVΔM), WA(pYVΔO), WA(pYVΔP), WA(pYVΔQ) und WA(pYVΔT) durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert (2.18.4). Die PMN-Population wurde anhand von Fluorchrom-markierten Antikörpern (für humane Zellen anti-CD16-PE und anti-CD66abce-APC (2.18.3.3), für murine Zellen anti-Ly-6G-PE (2.18.3.4)) gegen Oberflächenproteine bestimmt. Es wurden der prozentuale Anteil an Fluoreszenzpositiven PMNs und der relative Mittelwert der Fluoreszenzintensität in Prozent angegeben. Alle WA(pYVΔX) sowie WA(pYV) und WA(pYVΔlcrD) erzeugten in 60 – 80 % der hB-PMNs ein positives APF-Signal (Abb. 3.11 A). PMA konnte als stärkster Stimulus 99 % ± 0,21 der hB-PMNs zur ROS-Produktion anregen. Werden die relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten von hB-PMNs, die mit unterschiedlichen WA(pYVΔX) infiziert wurden, verglichen, zeigen 3 Stämme WA(pYVΔlcrD), WA(pYVΔH) und WA(pYVΔP) eine signifikante Erhöhung der relativen MFI bezogen auf WA(pYV) (Abb. 3.11 B). HB-PMNs infiziert mit den Stämmen WA(pYVΔE) und WA(pYVΔQ) zeigten ebenfalls eine höhere relative MFI (54% ± 5,05 und 83% ± 5,03) im Vergleich zu WA(pYV) (43 % ± 15,85). Die Stämme WA(pYVΔM), WA(pYVΔO) und WA(ΔT) zeigen mit den Werten 35% ± 2,03, 29 ± 2,61 und 38 ± 2,66 keine Erhöhung der relativen MFI im Bezug auf WA(pYV).

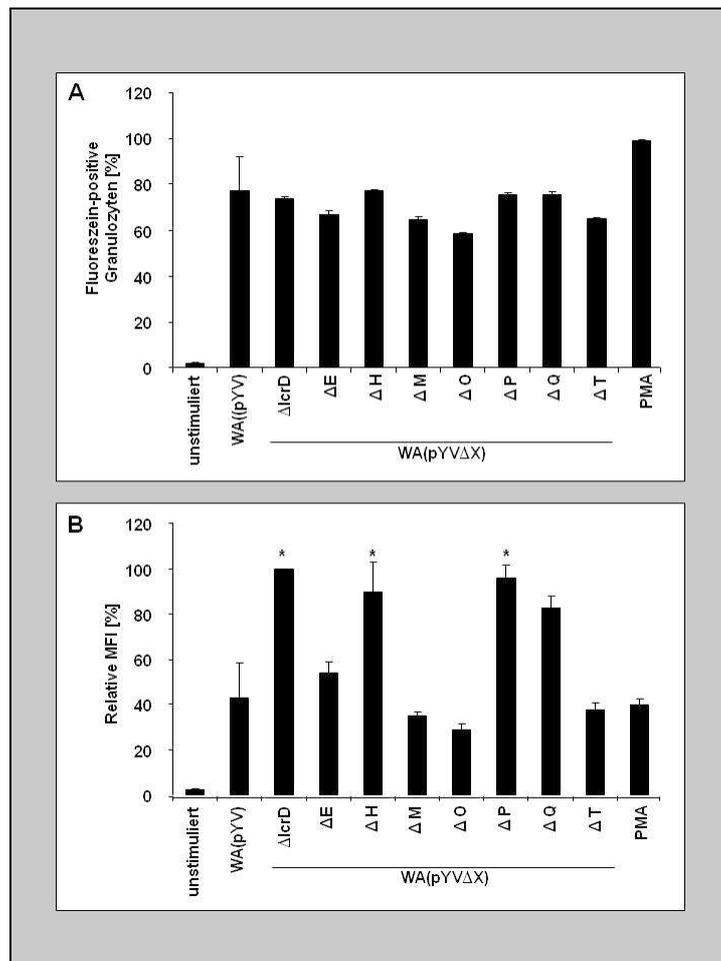


Abb. 3.11 Intrazelluläre ROS-Produktion humaner PMNs infiziert mit WA(pYVΔX). Durchflusszytometrische Analyse von 1×10^6 hB-PMNs versetzt mit $10 \mu\text{M}$ APF und infiziert mit WA(pYV), WA(pYVΔlcrD), WA(pYVΔE), WA(pYVΔH), WA(pYVΔM), WA(pYVΔO), WA(pYVΔP), WA(pYVΔQ) und WA(pYVΔT) für 30 min bei 37°C und 5 % CO_2 . (A) prozentualer Anteil an Fluorescein-positiven hB-PMNs. (B) Relative mittlere Fluoreszenzintensität in Prozent. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente dargestellt. * $p < 0,05$.

Murine peritoneale Zellen infiziert mit den Stämmen WA(pYVΔlcrD) $83 \% \pm 1,03$, WA(pYVΔE) $78 \% \pm 1,10$ und WA(pYVΔH) $79 \% \pm 1,91$ zeigen einen signifikant höheren Prozentsatz an Fluorescein-positiven mPEPNs bezogen auf die Anzahl an fluoreszierenden mPEPNs, welche mit WA(pYV) $61 \% \pm 5,02$ infiziert wurden (Abb. 3.12 A). Infektionsansätze mit den übrigen WA(pYVΔX) zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an Fluorescein-positiven mPEPNs im Vergleich zu WA(pYV). Eine signifikante Erhöhung der relativen mittleren Fluoreszenzintensität konnte bei mPEPNs festgestellt werden, die mit den Stämmen WA(pYVΔlcrD) 100% , WA(pYVΔE) $52 \% \pm 3,85$, WA(pYVΔH) $85 \% \pm 8,47$, WA(pYVΔP) $39 \% \pm 2,03$, WA(pYVΔQ) $42 \% \pm 2,64$ und WA(pYVΔT) $30 \% \pm 3,54$ infiziert wurden (Abb. 3.12 B). Infektionsansätze mit

WA(pYVΔM) 30 % ± 2,25 und WA(pYVΔO) 22% ± 1,59 zeigten keinen Unterschied in ihrer relativen MFI zu dem Infektionsansatz mit WA(pYV).

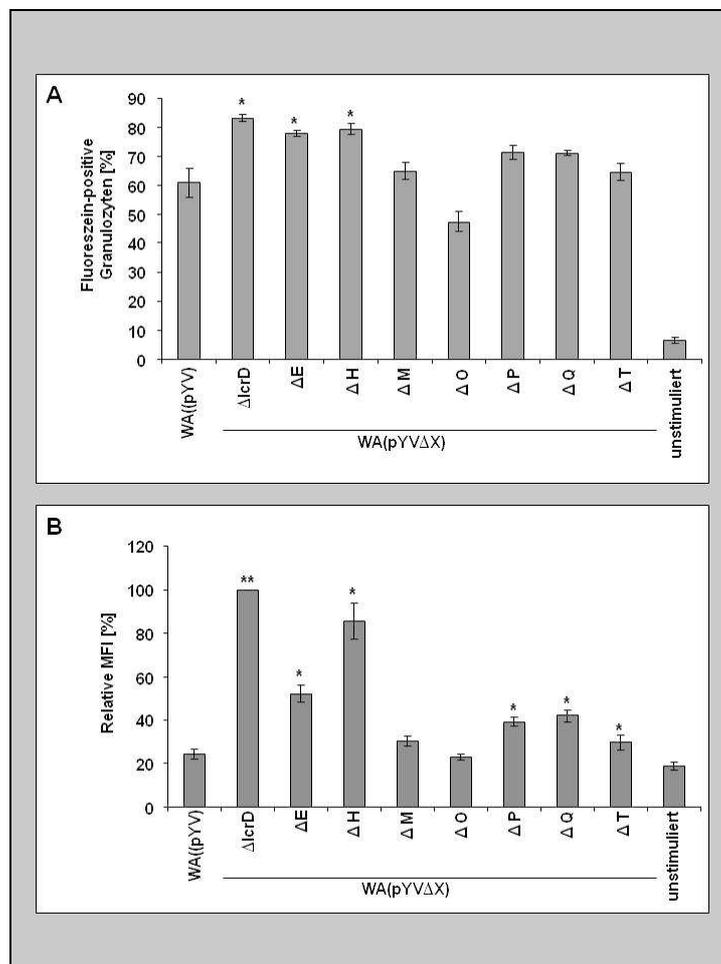


Abb. 3.12 Intrazelluläre ROS-Produktion muriner PMNs infiziert mit WA(pYVΔX). Durchflusszytometrische Analyse von 1×10^6 peritonealen Zellen versetzt mit $10 \mu\text{M}$ APF und infiziert mit WA(pYV), WA(pYVΔlcrD), WA(pYVΔE), WA(pYVΔH), WA(pYVΔM), WA(pYVΔO), WA(pYVΔP), WA(pYVΔQ) und WA(pYVΔT) für 30 min bei 37°C und 5 % CO_2 . (A) prozentualer Anteil an Fluorescein-positiven mPEPNs. (B) Relative mittlere Fluoreszenzintensität in Prozent. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente dargestellt. * $p < 0,05$.

Der signifikant höhere Prozentsatz an Fluorescein-positiven mPEPNs infiziert mit den Stämmen WA(pYVΔlcrD), WA(pYVΔE) und WA(pYVΔH) verglichen mit WA(pYV), kann bei hB-PMNs nicht beobachtet werden. Bei mPEPNs und hB-PMNs hat, bei einer Infektion mit *Y. enterocolitica* Stämmen, die Deletion der Gene *yopE*, *yopH*, *yopP* und *yopQ* eine Erhöhung der relativen MFI zur Folge. Bei mPEPNs zeigen die Deletion von *yopH* und *yopE*, bei hB-PMNs die Deletionen von *yopH*, *yopP* und *yopQ* den größeren Effekt nach Yersinien-Infektion.

Murine und humane PMNs wurden aus unterschiedlichen Kompartimenten des jeweiligen Organismus isoliert. MPEPNs sind im Gegensatz zu hB-PMNs extravadiert und können als vorstimuliert (*primed*) bewertet werden. Es wurde untersucht, ob die oben genannten Unterschiede der ROS-Produktion nach Infektion mit WA(pYVΔX) ihre Erklärung im unterschiedlichen Aktivitätszustand der PMNs finden. Da die Ausbeute an murinen Blut-PMNs pro Maus sehr gering ist, wurden Knochenmarkszellen (Abb. 3.13) verwendet, welche ähnlich der Blut-PMNs im Ruhezustand vorliegen.

Murine Knochenmarkszellen, die mit WA(pYVΔX) infiziert wurden wiesen zwischen 8 und 14 % Fluoreszein-positive mBM-PMNs auf (Abb. 3.13 A). Die Stämme WA(pYVΔlcrD) (14 % ± 1,65) und WA(pYVΔP) (12 % ± 1,21) zeigen eine signifikante Erhöhung des Anteils an ROS-produzierenden mBM-PMNs im Vergleich zu WA(pYV) (9 % ± 0,6). Knochenmarkszellen zeigen einen signifikant geringeren Anteil an Fluoreszein-positiven mBM-PMNs (8 -14 %) im Vergleich zu mPEPNs (47 – 83 %). Im Bezug auf die relative MFI für Infektionsansätze mit gleichen *Y. enterocolitica* Stämmen konnte zwischen den mBM-PMNs und den PEPNs, außer für den Infektionsansatz mit WA(pYVΔH) (mBM-PMNs: 50 % ± 1,36, mPEPNs: 85 % ± 8,47), kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.13 B).

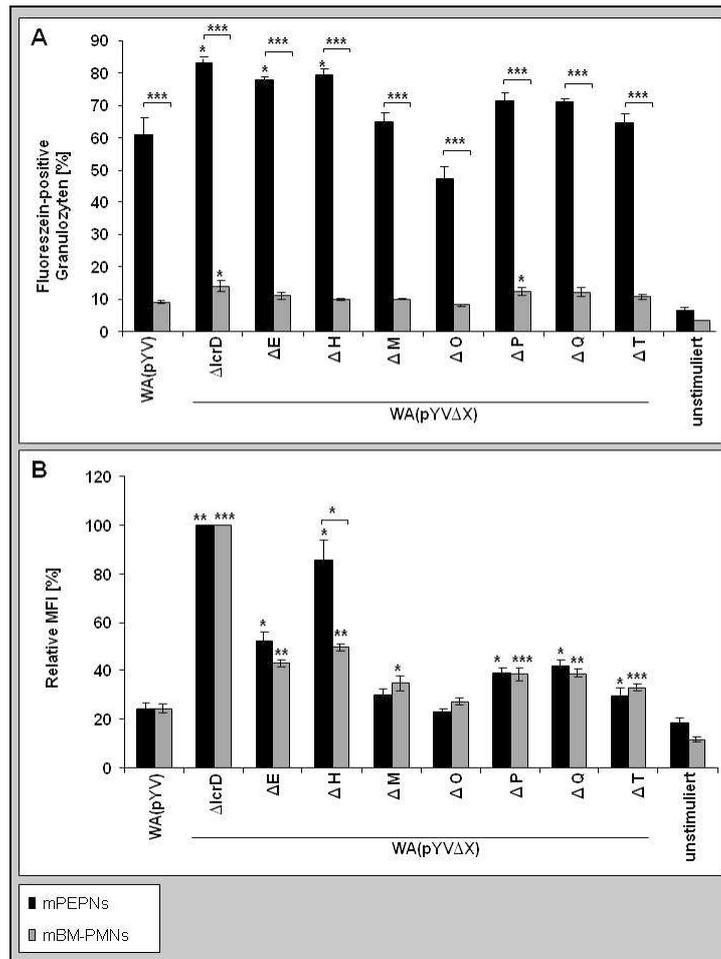


Abb. 3.13 Vergleich zwischen mPEPNs und mBM-PMNs.

Durchflusszytometrische Analyse von 1×10^6 Knochenmarks- und peritonealen Zellen versetzt mit $10 \mu\text{M}$ APF und infiziert mit WA(pYV), WA(pYVΔIcrD), WA(pYVΔE), WA(pYVΔH), WA(pYVΔM), WA(pYVΔO), WA(pYVΔP), WA(pYVΔQ) und WA(pYVΔT) für 30 min bei 37°C und 5 % CO_2 . (A) prozentualer Anteil an Fluoreszein-positiven mPMNs. (B) Relative mittlere Fluoreszenzintensität in Prozent. Die Ergebnisse sind als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ und *** $p < 0,0001$.

3.1.7 Einfluss der *Y. enterocolitica* Adhäsine auf die ROS-Produktion von PMNs

In diesem Abschnitt wird der Einfluss verschiedener *Y. enterocolitica* Adhäsine (Invasin, YadA und Myf) auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies beschrieben. Adhäsine mit denen es zu einer produktiven Interaktion mit PMNs kommt, führen zur Phagozytose und damit zur ROS-Produktion. Adhäsine mit schwacher Aktivität sollten die ROS-Produktion weniger anregen, als Adhäsine mit starker Aktivität. Inv bindet an $\alpha\beta_1$ -Integrine und sollte einen hohen ROS-Wert ergeben. Von YadA ist bekannt, dass es eine hohe Spezifität für Neutrophilenrezeptoren hat, allerdings ist der Rezeptor unbekannt. Über die Interaktion von Neutrophilen mit Myf ist nichts bekannt. Passive Yersinien-PMN-Interaktionen führen nicht zur Phagozytose und ROS werden nicht gebildet.

Für die Untersuchungen wurden zwei Mutantengruppen, einerseits pYV-negative ($WA\Delta inv$, $WA\Delta inv(pyadA)$ und $WA\Delta myf$) andererseits pYV-positive ($WA\Delta inv(pYV)$, $WA(pYV\Delta yadA)$, $WA\Delta inv(pYV\Delta yadA)$ und $WA\Delta myf(pYV)$) Adhäsine-Deletions-Mutanten, verwendet (Tab. 2.2). Es wurden Studien mit den ROS-Detektionsreagenzien APF und Luminol durchgeführt.

3.1.7.1 Luminol

Zur Detektion von intra- und extrazellulär produzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS-total) wurde Luminol verwendet. Es wurden hB-PMNs (2.18.1) mit 150 μ M Luminol (2.19.4.2) versehen und mit den Stämmen WA-C, $WA\Delta inv$, $WA\Delta inv(pyadA)$, $WA\Delta myf$, WA(pYV), $WA\Delta inv(pYV)$, $WA(pYV\Delta yadA)$, $WA\Delta inv(pYV\Delta yadA)$ und $WA\Delta myf(pYV)$ mit einer MOI10 infiziert. Die Messung der Lichtemission erfolgte alle 2 min für 2 h in einem Luminometer (Chemilumineszenzwerte CL wurden in arbiträren Einheiten AE angegeben).

Der Vergleich der ROS-Produktion von hB-PMNs, die mit pYV-negativen Adhäsine-Deletionsmutanten infiziert wurden, ergab, dass YadA das dominierende bzw. bevorzugte Adhäsine für hB-PMNs ist (Abb. 3.14 A). HB-PMNs infiziert mit $WA\Delta inv(pyadA)$, zeigten die höchste ROS-Produktion mit einem maximalen Chemilumineszenzwert von 3327 AE \pm 286 nach 46 min. dagegen führten Infektionen mit $WA\Delta inv$ (max. 343 AE \pm 225, 38 min), WA-C (max. 607 AE \pm 136, 40 min) und $WA\Delta myf$ (max. 788 AE \pm 3, 46 min) zu einer geringeren Chemilumineszenz. Das YadA für die ROS-Produktion ein wichtiger Faktor ist zeigen auch Infektionsversuche mit pYV-positiven Adhäsine-Deletionsmutanten (Abb. 3.14 B). ROS-Produktionskinetiken von hB-PMNs, die mit *yadA*-negativen Stämmen infiziert wurden weisen einen flacheren Verlauf aus ($WA(pYV\Delta yadA)$ max. 558 AE \pm 25, 44 min; $WA\Delta inv(pYV\Delta yadA)$ max. 245 AE \pm 40, 36 min), als die mit *yadA*-positiven Stämmen

(WA(pYV) max. 2231 AE \pm 413, 48 min; WA Δ inv(pYV) max. 2240 AE \pm 107, 46 min und WA Δ myf(pYV) max. 2110 AE \pm 186, 50 min). Die doppelte Deletion von *yadA* und *inv* wirkt sich zusätzlich auf die ROS-Produktion aus (WA Δ inv(pYV Δ yadA) max. 245 AE \pm 40, 36 min).

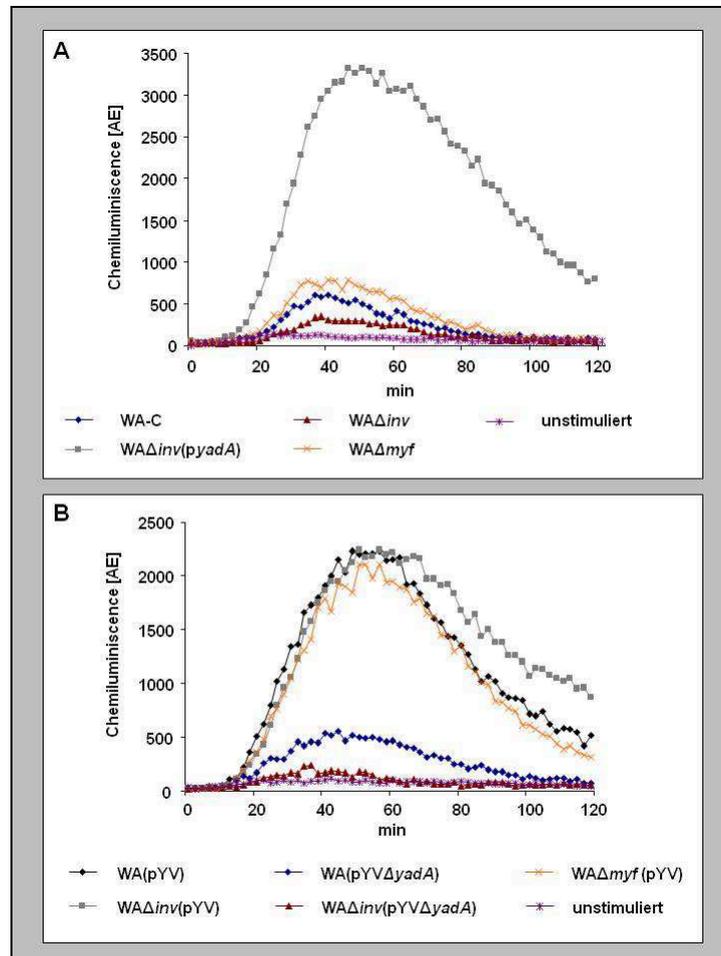


Abb. 3.14 Intra- und extrazelluläre ROS-Produktion humaner PMNs infiziert mit WA- und WA(pYV)-Adhäsins-Deletionsmutanten. 1×10^5 hB-PMNs wurden mit 150 μ M Luminol versetzt. Es wurde mit den Stämmen WA-C, WA Δ inv, WA Δ inv(*pyadA*), WA Δ myf, WA(pYV), WA Δ inv(pYV), WA(pYV Δ yadA), WA Δ inv(pYV Δ yadA) und WA Δ myf(pYV) mit einer MOI10 infiziert und die Lichtemission alle 2 min für 2 h gemessen. Dargestellte Werte sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen. (A) pYV-negative Adhäsins-Deletions-Mutanten. (B) pYV-positive Adhäsins-Deletions-Mutanten.

3.1.7.2 APF

Um die intrazelluläre ROS-Produktion von PMNs nachzuweisen wurden hB-PMNs (2.18.1) und murine peritoneale Zellen (2.18.2.3) verwendet und mit 10 μ M APF (2.19.4.1) versehen. Die Infektion wurde für 30 min bei 5 % CO₂ mit einer MOI10 mit den Stämmen WA-C, WA Δ inv, WA Δ inv(*pyadA*), WA Δ myf, WA(pYV), WA Δ inv(pYV), WA(pYV Δ yadA), WA Δ inv(pYV Δ yadA) und WA Δ myf(pYV) durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert (2.18.4). Anhand von Fluorchrom-markierten Antikörpern

(für humane PMNs anti-CD16-PE und anti-CD66abce-APC (2.18.3.3), für murine PMNs anti-Ly-6G-PE (2.18.3.4)) gegen Oberflächenproteine wurde die PMN-Population bestimmt. Es wurden der prozentuale Anteil an Fluoreszein-positiven PMNs und der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität in Prozent angegeben.

Mit dem APF-Reagenz kann, für hB-PMNs und mPEPNs infiziert mit pYV-negativen Adhäsion-Deletionsmutanten (Abb. 3.15 A und C, Abb. 3.16 A und C), ein starker Effekt für YadA nachgewiesen werden. Wird *yadA* exprimiert steigt der prozentuale Anteil an ROS-produzierenden PMNs sowie deren Fluoreszenzintensität signifikant. Für hB-PMNs infiziert mit $WA\Delta inv(pyadA)$ bedeutet dies $86 \% \pm 0,93$ und für mPEPNs $77 \% \pm 2,36$ an fluoreszierenden Zellen im Gegensatz zu PMNs die mit $WA\Delta inv$ infiziert wurden (hB-PMNs: $14 \% \pm 3,18$, mPEPNs: $10 \% \pm 1,67$). Die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität beträgt für hB-PMNs $1584 \text{ AE} \pm 176$ und für mPEPNs $832 \text{ AE} \pm 35$ im Vergleich zu PMNs die mit $WA\Delta inv$ infiziert wurden (hB-PMNs: $64 \text{ AE} \pm 7,85$, mPEPNs: $107 \text{ AE} \pm 6,56$). Ein geringerer jedoch signifikanter Effekt kann für *Inv* beobachtet werden. MPEPNs wie hB-PMNs infiziert mit $WA\Delta inv$ zeigen eine Reduktion des prozentualen Anteils an ROS-produzierenden PMNs sowie deren Fluoreszenzintensität verglichen mit PMNs infiziert mit WA-C (hB-PMNs: $28 \% \pm 2,72$, $310 \text{ AE} \pm 74$; mPEPNs: $40 \% \pm 2,20$, $323 \text{ AE} \pm 6,03$). Das Fehlen des *myf* Gens ($WA\Delta myf$) hatte auf den prozentualen Anteil von ROS-produzierenden PMNs (hB-PMNs: $26 \% \pm 6,80$, mPEPNs: $42 \% \pm 1,15$) sowie auf die Fluoreszenzintensität (hB-PMNs: $337 \text{ AE} \pm 32,15$, mPEPNs: $305 \text{ AE} \pm 11,36$) keine Auswirkung. Hierfür gelten die Werte der Infektionsansätze mit WA-C als Referenz.

Für PMNs infiziert mit pYV-positiven Adhäsion-Deletionsmutanten (Abb. 3.15 B und D; Abb. 3.16 B und D) konnte für hB-PMNs und mPEPNs ein deutlicher YadA-Effekt nachgewiesen werden. Ist das *yadA* Gen deletiert kann bei einer Infektion mit $WA(pYV\Delta yadA)$ eine Reduktion des prozentualen Anteils an ROS-produzierenden hB-PMNs ($60 \% \pm 1,71$) und der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität ($274 \text{ AE} \pm 106,72$) nachgewiesen werden, welche signifikant zu Werten einer Infektion mit $WA(pYV)$ ($85 \% \pm 0,32$; $892 \text{ AE} \pm 104,01$) ist. Die Deletion des *inv* Gens hat nur Auswirkungen auf die ROS-Produktion von hB-PMNs im Zusammenspiel mit einer *yadA*-Deletion ($WA\Delta inv(pYV)$ $85 \% \pm 0,32$, $840 \text{ AE} \pm 200$; $WA\Delta inv(pYV\Delta yadA)$ $10 \% \pm 1,37$, $71 \text{ AE} \pm 16,53$). *Myf* hat bei hB-PMNs keinen Einfluss auf die ROS-Produktion. Dies zeigte eine Infektion von hB-PMNs mit $WA\Delta myf(pYV)$ ($82 \% \pm 1,35$, $772 \text{ AE} \pm 161$) im Vergleich mit $WA(pYV)$ ($85 \% \pm 0,47$, $892 \text{ AE} \pm 104$).

MPEPNs infiziert mit $WA(pYV\Delta yadA)$ zeigen eine Reduktion im prozentualen Anteil an Fluoreszein-positiven Zellen ($46 \% \pm 2,91$) im Vergleich zu mPEPNs infiziert mit $WA(pYV)$

(54 % \pm 1,83). Die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität bleibt jedoch gleich (WA(pYV Δ yadA) 227 AE \pm 21,22; WA-C(pYV) 197 AE \pm 14,53). Inv alleine hat keine Auswirkung auf die ROS-Produktion (WA Δ inv(pYV) 61 % \pm 3,86; 281 AE \pm 21,52), jedoch im Zusammenspiel mit YadA (WA Δ inv(pYV Δ yadA) 12 % \pm 1,67, 129 AE \pm 17,95). MPEPNs infiziert mit WA Δ myf (pYV) zeigen im prozentualen Anteil ROS-produzierender Zellen (70 % \pm 3,56) und in der Fluoreszenzintensität (485 AE \pm 34, 83) einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu WA(pYV).

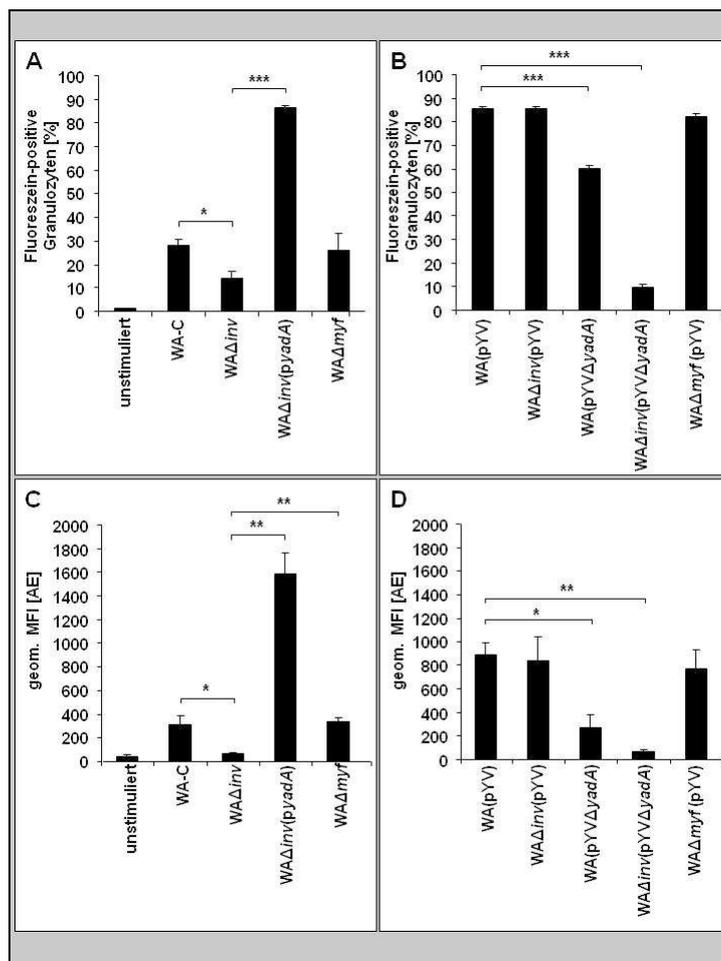


Abb. 3.15 Intrazelluläre ROS-Produktion humaner PMNs infiziert mit *Y. enterocolitica* WA- und WA(pYV)-Adhäsins-Deletionsmutanten. Durchflusszytometrische Analyse von 1×10^6 hB-PMNs versetzt mit 10 μ M APF und infiziert mit WA-C, WA Δ inv, WA Δ inv(pYV), WA Δ myf, WA(pYV), WA Δ inv(pYV), WA(pYV Δ yadA), WA Δ inv(pYV Δ yadA) und WA Δ myf(pYV) für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂. (A und C) pYV-negative Adhäsins-Deletionsmutanten. (C und D) pYV-positive Adhäsins-Deletionsmutanten. (A und B) prozentualer Anteil an Fluorescein-positiven hB-PMNs. (C und D) Geometrische mittlere Fluoreszenzintensität in arbiträren Einheiten (AE). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ und *** $p < 0,0001$.

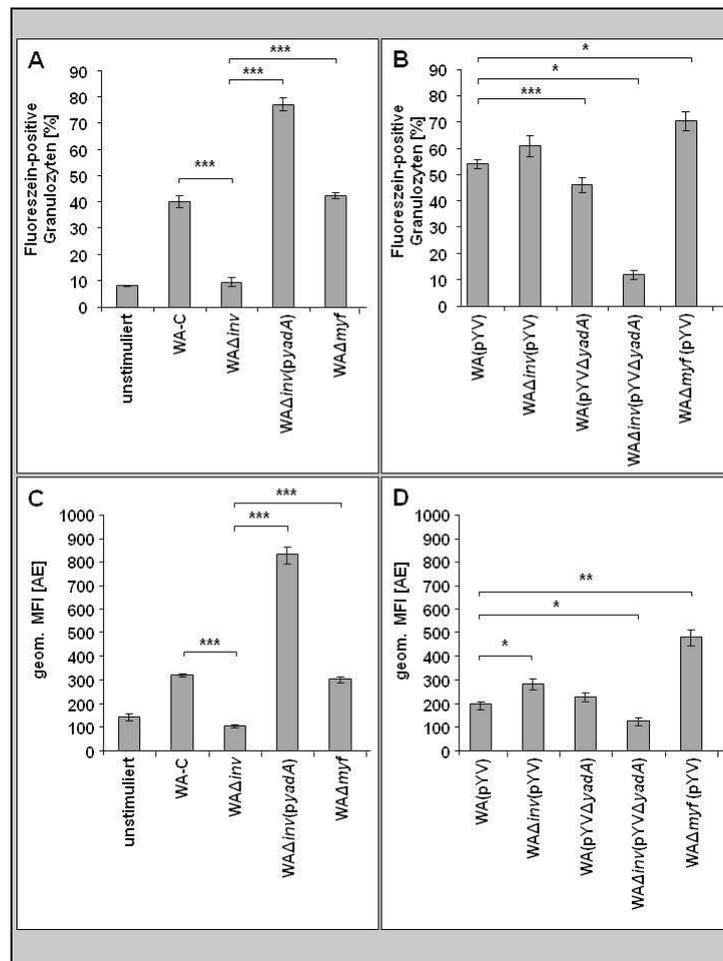


Abb. 3.16 Intrazelluläre ROS-Produktion muriner peritonealer PMNs infiziert mit *Y. enterocolitica* WA- und WA(pYV)-Adhäsins-Deletionsmutanten. Durchflusszytometrische Analyse von 1×10^6 muriner peritonealer Zellen versetzt mit 10 μ M APF und infiziert mit WA-C, WA Δ inv, WA Δ inv(pyadA), WA Δ myf, WA(pYV), WA Δ inv(pYV), WA(pYV Δ yadA), WA Δ inv(pYV Δ yadA) und WA Δ myf(pYV) für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂. (A und C) pYV-negative Adhäsins-Deletionsmutanten. (C und D) pYV-positive Adhäsins-Deletionsmutanten. (A und B) prozentualer Anteil an Fluoreszeins-positiven mPEPNs. (C und D) Geometrische mittlere Fluoreszenzintensität in arbiträren Einheiten (AE). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ und *** $p < 0,0001$.

3.1.8 Einfluss der *Y. enterocolitica* Yop-Proteine auf die NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox

In ruhenden PMNs befinden sich die NADPH-Oxidase-Untereinheiten, räumlich getrennt voneinander, an der Plasma- bzw. Granula-/Vesikelmembran (Flavozytochrom b₅₅₈: p22phox und gp91phox) sowie verteilt im Zytosol (p47phox, p40phox und p67phox). Als Reaktion auf einen geeigneten Stimulus, werden die zytosolischen Komponenten aktiviert und von den Membran-ständigen Komponenten an der Membran zur aktiven NADPH-Oxidase gebunden. Dies gewährleistet, dass schädliche Sauerstoffmoleküle nur lokalisiert produziert werden können. Dieser Prozess wird streng von Protein-Protein-Interaktionen und der

Phosphorylierung der zytosolischen Untereinheit p47phox reguliert (El Benna *et al.*, 1994; Faust *et al.*, 1995; Quinn und Gauss, 2004; Groemping und Rittinger 2005). P47phox wird als das organisierende Element der NADPH-Oxidase angesehen (El Benna *et al.*, 2008).

3.1.8.1 Phosphorylierungsgrad von p47phox nach Infektion von humanen PMNs mit *Y. enterocolitica*

Während der Aktivierung von Neutrophilen wird die zytosolische Untereinheit der NADPH-Oxidase p47phox vielfach phosphoryliert. In ruhenden PMNs ist unphosphoryliertes p47phox sehr basisch ($pI > 9$) (Okamura *et al.*, 1988). Werden Neutrophile aktiviert verringert sich der pI von p47phox und es können mehrere phosphorylierte Isoformen detektiert werden. Findet die Stimulation mit PMA über PKC statt, können acht bis neun Phosphorylierungsstadien von p47phox beobachtet werden (Rotrosen und Leto, 1990; El Benna *et al.*, 1994).

Um den Phosphorylierungsgrad von p47phox nach Infektion mit *Y. enterocolitica* und den Einfluss der Yops bestimmen zu können, wurde das Zelllysate von hB-PMNs nach Infektion mit WA(pYV) bzw. WA(pYV Δ lcrD) mit 2-dimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit anti-human p47phox Antiserum detektiert. Als Auftragskontrolle wurde ein Teil des Zelllysats in einem 1-dimensionalen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran elektrophoretisch überführt und ebenfalls mit anti-human p47phox Antiserum sowie einem anti- β -Aktin Antikörper detektiert.

Die Auftragskontrolle zeigt, dass für jedes Zelllysate gleichviel Gesamtprotein aufgetragen wurde, dies wurde exemplarisch an den gleichstarken Banden der detektierten Proteine Aktin und p47phox veranschaulicht (Abb. 3.17 A). Das Zelllysate unstimulierter hB-PMNs zeigt im basischen Bereich zwei dominante und eine weniger ausgeprägte Proteinspezies von p47phox. Im Zelllysate infizierter PMNs lassen sich weitere Phosphorylierungsstufen beobachten. In beiden Fällen können 8 Stadien unterschieden werden, die jedoch in unterschiedlicher Ausprägung vorkommen. Tendenziell zeigt der Infektionsansatz mit WA(pYV) mehr p47phox im basischen Bereich und der Infektionsansatz mit WA(pYV Δ lcrD) zeigt mehr p47phox im sauren Bereich (Abb. 3.17 B). Dies deutet auf eine Phosphorylierungsinhibition der p47phox Untereinheit durch Yops hin.

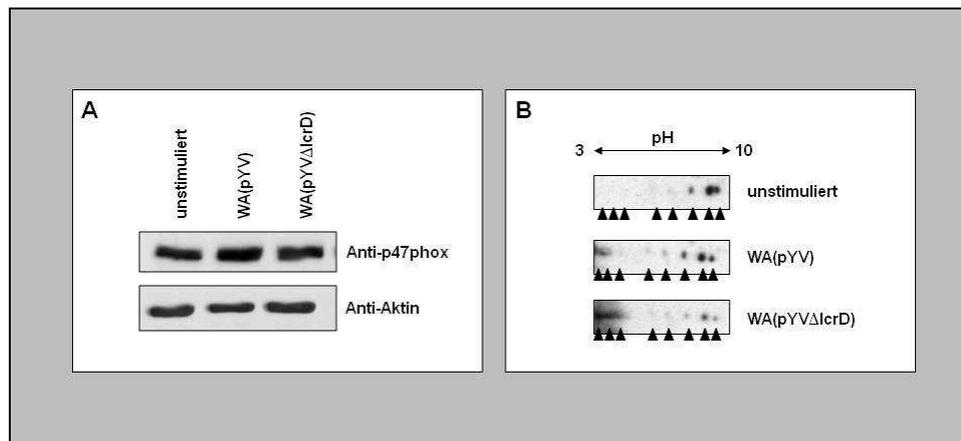


Abb. 3.17 Phosphorylierungsgrad von p47phox nach Infektion von humanen PMNs mit *Y. enterocolitica*. 1×10^7 hB-PMNs wurden mit WA(pYV) oder WA(pYVΔlcrD) mit einer MOI10 für 30 min bei 37°C infiziert. (A) Das Zellysate von 5×10^5 hB-PMNs wurde in einem 12 % SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit den Primärantikörpern Kaninchen anti-human p47phox Antiserum (1:2000) und Maus anti-β-Aktin (1:1000). Als Zweitantikörper dienten Esel anti-Kaninchen bzw. Schaf anti-Maus IgG Peroxidase Konjugate (1:10 000). (B) Das Zellysate von 5×10^6 Zellen wird auf IPG-Streifen (pH3 – 10) isoelektrisch fokussiert, in einem 12 % SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit dem Primärantikörpern Kaninchen anti-human p47phox Antiserum (1:2000) und dem Zweitantikörper Esel anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugate (1:10 000). Schwarze Pfeile zeigen die phosphorylierten Isoformen von p47phox.

3.1.8.2 Membranlokalisierung der NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox

Eine Aktivierung der Untereinheit p47phox hat dessen Membranlokalisierung zur Folge. Um die Membranlokalisierung der zytosolischen NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox nach der Infektion von hB-PMNs mit *Y. enterocolitica* WA(pYVΔX) nachzuweisen, wurden hB-PMNs (2.18.1) für 30 min entweder mit PMA, als Kontrolle stimuliert oder mit WA(pYV), WA(pYVΔlcrD), WA(pYVΔE), WA(pYVΔH), WA(pYVΔM), WA(pYVΔO), WA(pYVΔP), WA(pYVΔQ) oder WA(pYVΔT) für 30 min mit einer MOI10 infiziert. Die hB-PMNs wurden daraufhin mit 3,5 % PFA fixiert, auf Objektträger zentrifugiert und mit Aceton permeabilisiert. Der Immunfluoreszenznachweis erfolgte mit einem p47phox-spezifischen Primär- und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper (2.18.3.2).

Eine starke grüne Fluoreszenz und somit eine starke Membranlokalisierung von p47phox konnte für hB-PMNs infiziert mit WA(pYVΔlcrD), WA(pYVΔH) und WA(pYVΔP) nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Für Infektionsansätze mit PMA, WA(pYVΔE), WA(pYVΔM) und WA(pYVΔQ) konnten geringere Mengen an membranlokalisiertem p47phox beobachtet werden. Unstimulierte hB-PMNs sowie mit WA(pYVΔO), WA(pYVΔT) oder WA(pYV) infizierte hB-PMNs zeigen keine grüne Fluoreszenz. Diese Ergebnisse

stimmen mit denen der APF-Studien (Abb. 3.11) überein. Die Menge an produzierten ROS korreliert mit der Membranlokalisierung von p47phox bei hB-PMNs, wobei YopH und YopP die ROS-Produktion bzw. die Bildung der NADPH-Oxidase hemmen.

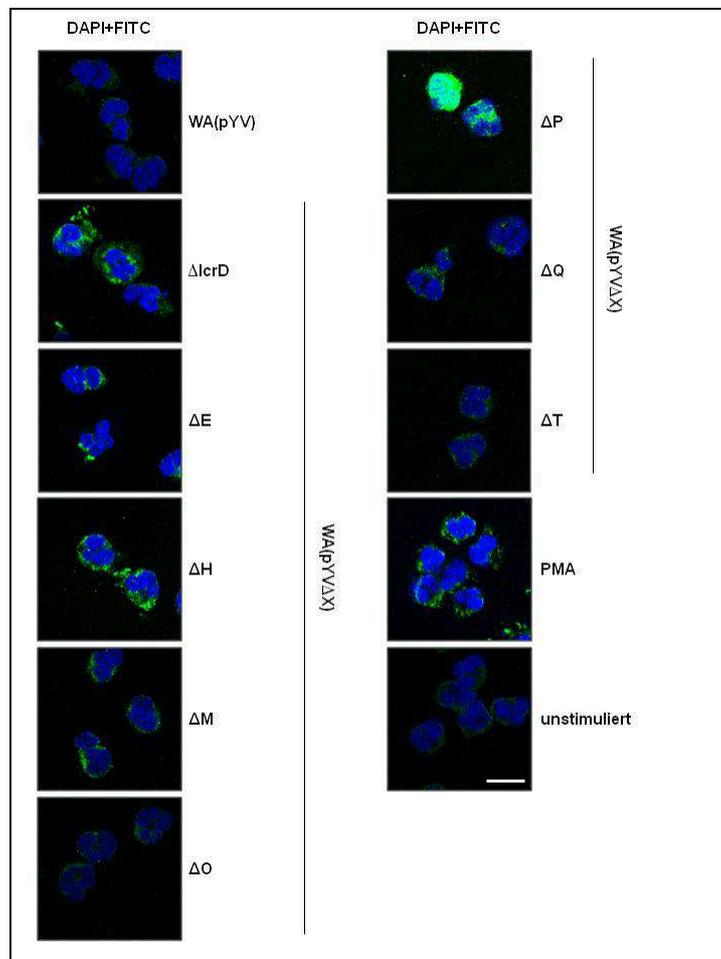


Abb. 3.18 Membranlokalisierung der NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox. 5×10^5 hB-PMNs werden mit WA(pYV), WA(pYVΔlcrD), WA(pYVΔE), WA(pYVΔH), WA(pYVΔM), WA(pYVΔO), WA(pYVΔP), WA(pYVΔQ) oder WA(pYVΔT) für 30 min mit einer MOI10 bei 37°C und 5 % CO₂ infiziert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit dem Primärantikörper Maus anti-human p47phox (AS18 – 197) (1:200) und dem FITC-konjugiertem Sekundärantikörper Schaf anti-Maus IgG (1:200) durchgeführt. Der Größenbalken entspricht 10 μm.

3.1.9 Einfluss von YopP auf die Inhibition der ROS-Produktion von PMNs nach *Y. enterocolitica* Infektion

Da in vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit YopP als ein Effektor identifiziert wurde, der zur Inhibition der ROS-Produktion in hB-PMNs nach *Y. enterocolitica* Infektion beiträgt, wurde die Wirkungsweise dieses Yops genauer untersucht.

3.1.9.1 Einfluss von YopP auf die Phosphorylierung der MAPKinasen p38 und Erk1/2

Es wurde beschrieben, dass die MAPKs p38 und Erk1/2 beim „*priming*“ der NADPH-Oxidase-Untereinheiten und in der Aktivierung der NADPH-Oxidase beteiligt sind (Sheppard *et al.*, 2005, El Benna *et al.*, 2008). Um zu untersuchen, ob diese MAPKs in hB-PMNs bei Interaktion mit *Y. enterocolitica* eine Rolle spielen und ob YopP auf diese Signalwege Einfluss nimmt, wurden hB-PMNs mit WA(pYV), WA(pYV Δ lcrD) und WA(pYV Δ P) für 30 min mit einer MOI10 infiziert und daraufhin solubilisiert (2.15.4). Die zytosolischen Proteine wurden in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt (2.15.6), auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.15.9) und die Phosphorylierung von p38 bzw. Erk1/2 mit spezifischen Antikörpern (Tab. 2.6) detektiert.

Es wurde gezeigt, dass die MAPK p38 und Erk1/2 in unstimulierten wie in infizierten hB-PMNs in gleicher Menge vorliegen (Abb. 3.19 A und B). Bei hB-PMNs, die mit dem sekretionsdefekten Stamm WA(pYV Δ lcrD) infiziert wurden, konnte Phospho-p38 MAPK und Phospho-Erk1/2 MAPK nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, wurde eine Phosphorylierung von p38 und Erk1/2 im Zelllysate von hB-PMNs infiziert mit WA(pYV) nicht beobachtet. Bei einer Infektion mit WA(pYV Δ P) kann eine Phosphorylierung von p38 und in geringer Konzentration von Erk1/2 gezeigt werden. Dies lässt darauf schließen, dass YopP inhibierend in die Signalkaskade, die zur Phosphorylierung von p38 führt und weniger in die Signalkaskade von Erk1/2 eingreift.

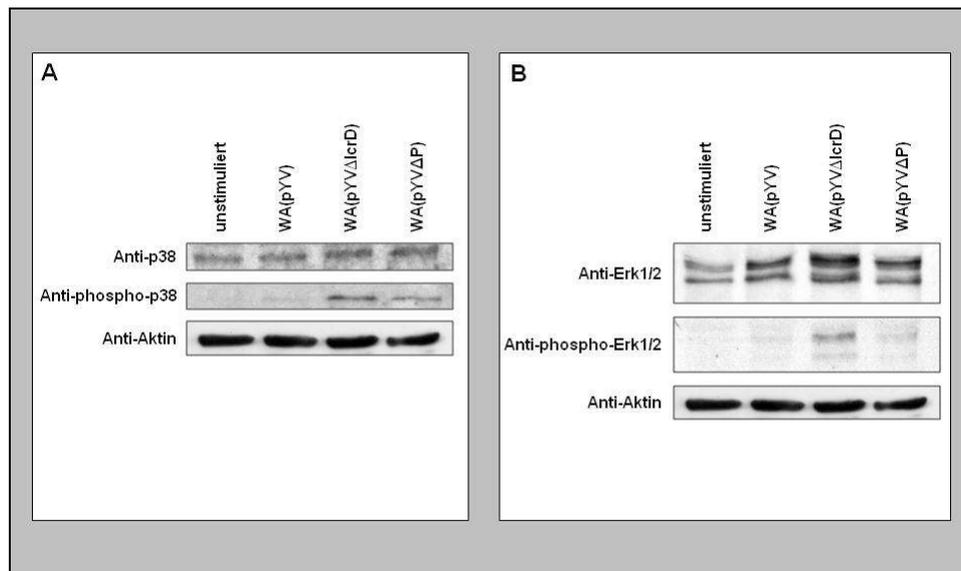


Abb. 3.19 Einfluss von YopP auf die MAPK Signalwege. 1×10^7 hB-PMNs wurden mit WA(pYV), WA(pYVΔlcrD) oder WA(pYVΔP) mit einer MOI10 für 30 min bei 37°C infiziert. Das Zelllysate von 5×10^5 hB-PMNs wurde in einem 12 % SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit den Primärantikörpern (A) Kaninchen anti-human p38 MAPK (1:1000), Kaninchen anti-human Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (1:1000), (B) Kaninchen anti-Ratte p44/42 MAPK (Erk1/2) (1:1000) oder Maus anti-human Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1:1000). Als Zweitantikörper dienten Esel anti-Kaninchen bzw. Schaf anti-Maus IgG Peroxidase Konjugate (1:10 000).

3.1.9.2 Einfluss von YopP auf das „priming“ von PMNs

Unter „priming“ von PMNs wird eine Vorstimulation der PMNs verstanden. Diese äußert sich in einer Teilphosphorylierung der zytosolischen NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox (DeLeo *et al.*, 1998; Dewas *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung des Ser345 über den p38 MAPK-Signalweg wurde als unabdinglicher Schritt im „priming“-Mechanismus beschrieben (Dang *et al.*, 2006). Da gezeigt wurde, dass YopP in hB-PMNs die Phosphorylierung von p38 inhibiert (3.1.9.1) wurde die Phosphorylierung von p47phox an Ser345 nach Yersinien-Infektion im Immunoblot nachgewiesen.

HB-PMNs (2.18.1) wurden mit WA(pYV), WA(pYVΔlcrD) und WA(pYVΔP) für 30 min mit einer MOI10 infiziert. Daraufhin wurden Zelllysate hergestellt (2.15.4). Die zytosolischen Proteine wurden in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt (2.15.6), auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.15.9) und mit spezifischen Antikörpern (Tab. 2.6) detektiert.

Die zytosolische Untereinheit der NADPH-Oxidase p47phox konnte in allen Zelllysaten in gleicher Konzentration nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Im Gegensatz dazu wurde p47phox an Ser345 nur nach Infektion mit *Y. enterocolitica* Stämmen phosphoryliert. Es kann

keine Reduktion der Phosphorylierung von Ser345-p47phox nach Infektion mit WA(pYV) und WA(pYV Δ lcrD) im Vergleich zum Infektionsansatz mit WA(pYV Δ lcrD) gezeigt werden. Dies läßt darauf schließen, dass Yops ihre Aktivität in hB-PMNs erst nach einem „priming“ entfalten können.

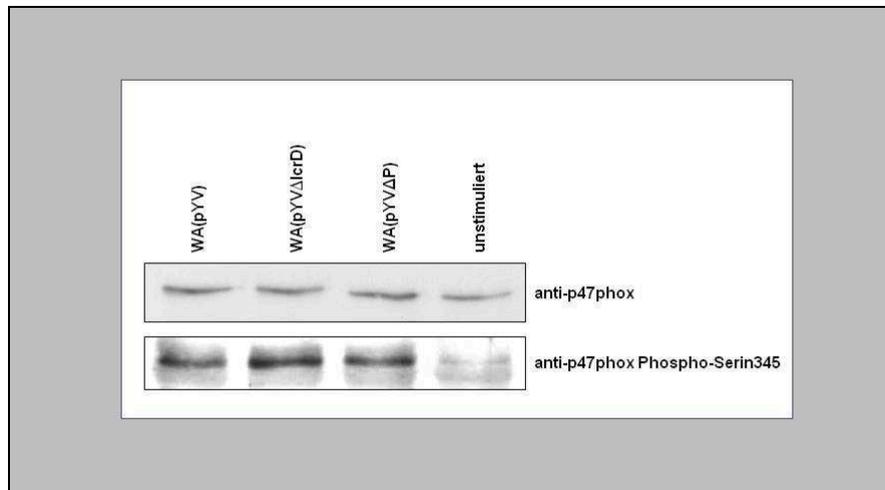


Abb. 3.20 Einfluss der Yops auf das „priming“ von humanen PMNs. 1×10^7 hB-PMNs wurden mit WA(pYV), WA(pYV Δ lcrD) oder WA(pYV Δ P) mit einer MOI10 für 30 min bei 37°C infiziert. Das Zelllysat von 5×10^5 hB-PMNs wurde in einem 12 % SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit den Primärantikörpern Kaninchen anti-human p47phox Antiserum (1:2000) und Kaninchen anti-human Phospho-Ser345-p47phox (1:1000). Als Zweitantikörper dienten Esel anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugate (1:10 000).

3.1.10 Signalkaskaden und Rezeptoren beteiligt an der Aktivierung der NADPH-Oxidase in PMNs nach Interaktion mit *Y. enterocolitica*

Um zu untersuchen welche Signalwege und welche Rezeptoren in humanen PMNs maßgeblich an der Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit an der ROS-Produktion nach Interaktion mit *Y. enterocolitica* beteiligt sind, wurden unten folgende Versuche durchgeführt.

3.1.10.1 Inhibition verschiedener Signalkaskaden der ROS-Produktion

Um den Einfluss bestimmter Komponenten zu untersuchen, die in zur ROS-Produktion führenden Signalkaskaden beteiligt sind, wurden hB-PMNs mit den unten genannten Inhibitoren 30 min präinkubiert (2.19.6). Hierfür wurden hB-PMNs (2.18.1) mit 10 μ M APF (2.19.4.1) beladen und mit einem Aktin- (Cytochalasin D), Tyrosinkinase- (AG18 und Genistein), Syk-Kinase (Piceatannol), PI-3Kinase- (Wortmannin) oder MAPK- (p38: SB203580 und MEK1: PD98059) Inhibitor versehen (Tab. 2.7). Daraufhin wurden die Zellen mit dem *Y. enterocolitica* Stamm WA(pYV Δ lcrD) mit einer MOI10 infiziert, mit PMA stimuliert oder unbehandelt nach 30 min durchflusszytometrisch analysiert (2.18.4). Es

wurden der prozentuale Anteil an Fluoreszein-positiven PMNs und der relative Mittelwert der Fluoreszenzintensität in Prozent angegeben.

Alle Inhibitoren wurden darauf untersucht, ob sie nicht selbst zur Bildung reaktiver Sauerstoffmoleküle beitragen. Abbildungen 3.21 B und 3.22 B zeigen, dass es nicht allein durch Zugabe der Inhibitoren zur ROS-Produktion kommt. Außerdem wurde überprüft, ob die hB-PMNs prinzipiell zur ROS-Produktion angeregt werden können und somit eine toxische Wirkung der Inhibitoren ausgeschlossen werden kann. Als Stimulus wurde 40 nM PMA verwendet. PMA wirkt auf die Proteinkinase C, eine Rezeptor-unabhängige Aktivierung der NADPH-Oxidase. Alle angegebenen Inhibitoren wirken auf Proteine, die der Proteinkinase C übergeordnet sind. Abbildung 3.21 C und 3.22 C zeigen keine signifikante Reduktion des prozentualen Anteils an ROS-produzierenden PMNs sowie ihrer relativen MFI im Gegensatz zu nicht behandelten hB-PMNs. Alle Inhibitoren sind in DMSO gelöst. Die maximale Konzentration an DMSO, mit der hB-PMNs in Kontakt kamen waren 7 %. Es wurde gezeigt, dass diese Konzentration an DMSO PMNs nicht beeinflusst und ihre Reaktion auf *Y. enterocolitica* und PMA nicht verändert (Abb. 3.21 A – C und 3.22 A – C).

Alle Inhibitoren beeinflussen die ROS-Produktion von hB-PMNs, die mit WA(pYVΔlcrD) infiziert wurden. Eine starke Reduktion des prozentualen Anteils an Fluoreszein-positiven PMNs konnte für Cytochalasin D (32 % ± 1,00), Piceatannol (41 % ± 3,81), SB203580 (49 % ± 1,19), Genistein (52 % ± 2,16) und Wortmannin (54 % ± 1,79) beobachtet werden (Abb. 3.21 A). Weniger starke jedoch signifikante Reduktionen zeigten die Infektionsansätze mit AG18 (65 % ± 1,42), PD98059 (72 ± 2,23). Als Referenz dient der prozentuale Anteil an Fluoreszein-positiven hB-PMNs infiziert mit WA(pYVΔlcrD) (80 % ± 1,89) (Abb. 3.21 A).

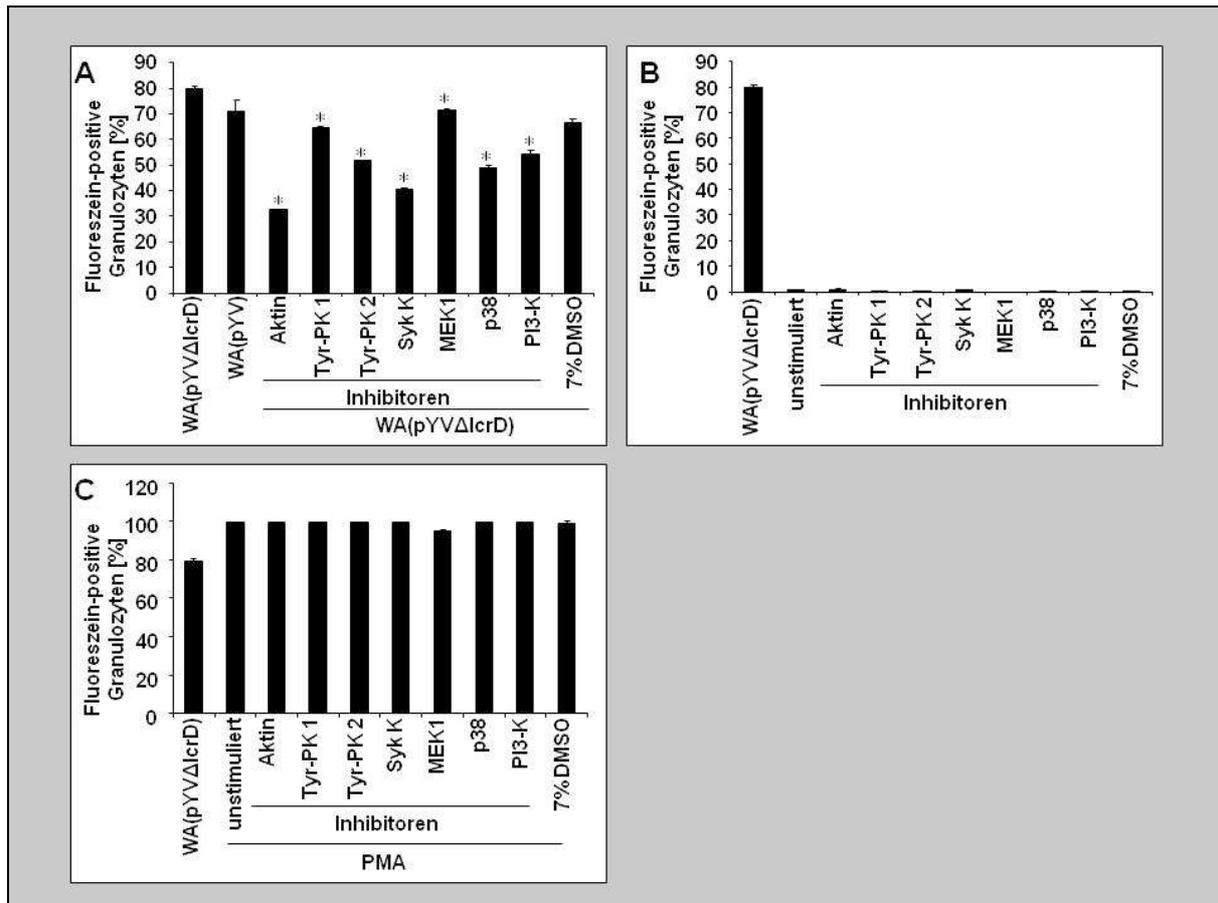


Abb. 3.21 Prozentualer Anteil an ROS-produzierenden, humanen PMNs nach Inhibition verschiedener Komponenten, der für die ROS-Produktion wichtiger Signalkaskaden. Durchflusszytometrische Analyse von 1×10^6 hB-PMNs versetzt mit $10 \mu\text{M}$ Cytochalasin D (Aktin-Inhibitor), $80 \mu\text{M}$ AG18 (Tyrosinkinase-Inhibitor (Tyr-PK1)), $10 \mu\text{M}$ Genistein (Tyrosinkinase-Inhibitor (Tyr-PK2)), $30 \mu\text{M}$ Piceatannol (Syk-Kinase-Inhibitor), $50 \mu\text{M}$ PD98059 (MEK1-Inhibitor), $10 \mu\text{M}$ SB203580 (p38-Inhibitor) oder $1 \mu\text{M}$ Wortmannin (PI-3Kinase-Inhibitor) und $10 \mu\text{M}$ APF. Der prozentuale Anteil an Fluorescein-positiven hB-PMNs wurde von hB-PMNs (A) infiziert mit MOI10 WA(pYVΔlcrD), (B) uninfizierten Zellen und (C) mit PMA behandelten Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. $*p < 0,05$.

Eine stark reduzierte relative Fluoreszenzintensität (Abb. 3.22 A) kann bei hB-PMNs, infiziert mit WA(pYVΔlcrD) für die Inhibitoren Cytochalasin D ($9 \% \pm 2,33$) und Wortmannin ($23 \% \pm 2,56$) beobachtet werden. Eine mäßige Reduktion der Fluoreszenzintensitäten zeigen hB-PMNs behandelt mit den Tyrosinkinase-Hemmern AG18 ($29 \% \pm 1,42$) und Genistein ($28 \% \pm 2,16$). Die Inhibitoren Piceatannol ($54 \% \pm 4,58$) und SB203580 ($77 \% \pm 4,06$) führen ebenso zu einer leichten, signifikanten Reduktion der relativen Fluoreszenzintensität. Der MAP-Kinase Hemmer PD98059 ($93 \% \pm 4,52$) zeigt keine signifikante Reduktion der relative MFI verglichen mit hB-PMNs ohne Inhibitor und infiziert mit WA(pYVΔlcrD).

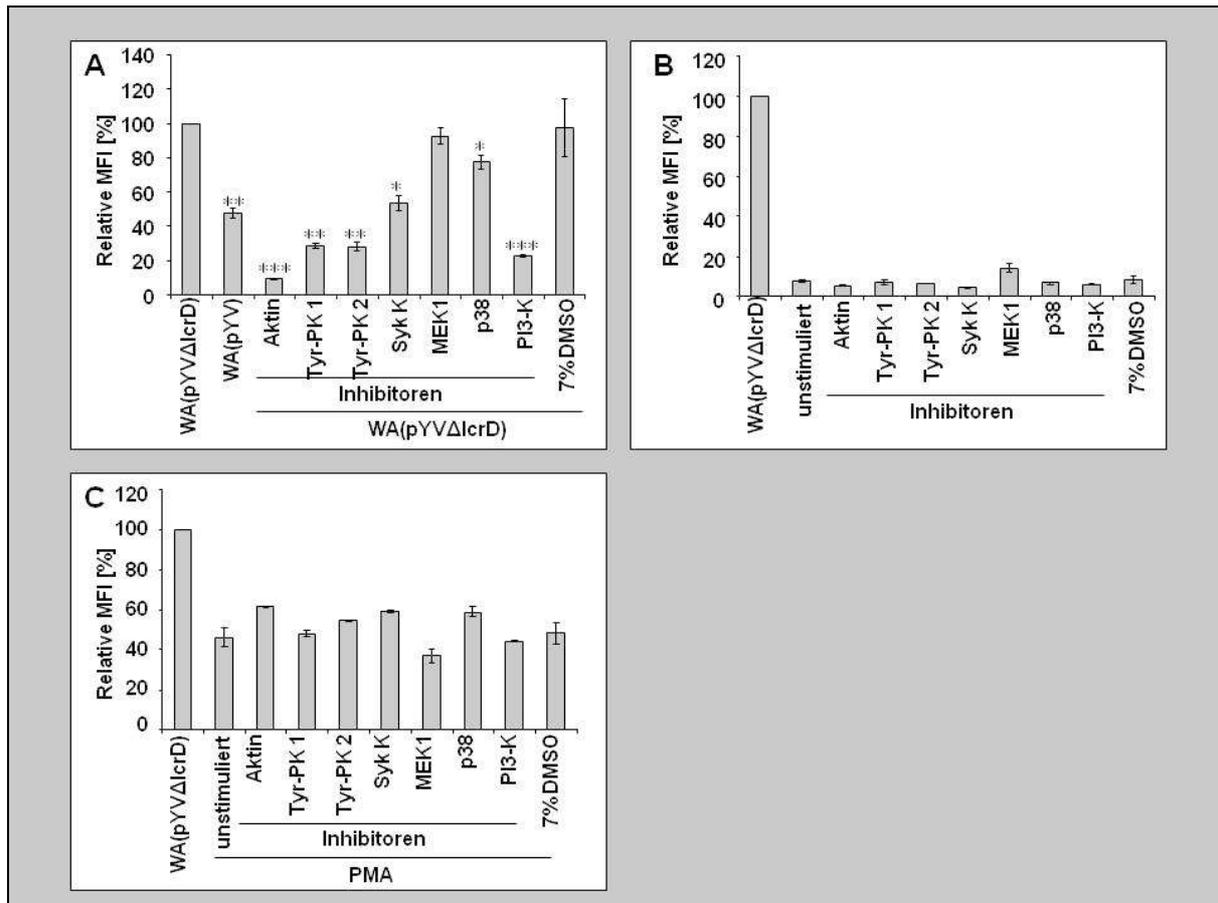


Abb. 3.22 Relative MFI ROS-produzierender, humaner PMNs nach Inhibition verschiedener Komponenten, der für die ROS-Produktion wichtiger Signalkaskaden. Durchflusszytometrische Analyse von 1×10^6 hB-PMNs versetzt mit $10 \mu\text{M}$ Cytochalasin D (Aktin-Inhibitor), $80 \mu\text{M}$ AG18 (Tyrosinkinase-Inhibitor (Tyr-PK1)), $10 \mu\text{M}$ Genistein (Tyrosinkinase-Inhibitor (Tyr-PK2)), $30 \mu\text{M}$ Piceatannol (Syk-Kinase-Inhibitor), $50 \mu\text{M}$ PD98059 (MEK1-Inhibitor), $10 \mu\text{M}$ SB203580 (p38-Inhibitor) oder $1 \mu\text{M}$ Wortmannin (PI-3Kinase-Inhibitor) und $10 \mu\text{M}$ APF. Der prozentuale Anteil an Fluoreszein-positiven hB-PMNs wurde von hBPMNs (A) infiziert mit MOI10 WA(pYVΔlcrD), (B) uninfizierten Zellen und (C) mit PMA behandelten Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ und *** $p < 0,0001$.

3.1.10.2 Bedeutung von PMN-Rezeptoren für die Interaktion mit *Y. enterocolitica*

In Abschnitt 3.1.7 wurde gezeigt, dass YadA wichtig für die bakterielle Adhäsion an PMNs ist. PMNs ihrerseits besitzen eine Vielzahl an Rezeptoren um bakterielle Erreger zu erkennen. Integrine und TLRs sind dabei hauptbeteiligte Rezeptoren. In diesem Abschnitt wurde untersucht ob die Inhibition von bestimmten Integrinen bzw. das Fehlen verschiedener TLRs („Toll-like receptors“) einen Einfluss auf die Adhäsion und damit auf die Sauerstoffradikalproduktion von PMNs hat, die mit *Y. enterocolitica* Stämmen infiziert wurden.

3.1.10.3 Integrine

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss der Interaktion von Yersinien mit β_1 - und β_2 -Integrinen mit anschließender ROS-Produktion hB-PMNs untersucht.

Y. enterocolitica bindet über Inv oder indirekt mit Kollagen (I, II oder IV), Laminin oder Fibronectin über YadaA an $\alpha_3\beta_1$ -, $\alpha_4\beta_1$ -, $\alpha_5\beta_1$ -, $\alpha_6\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_1$ -Integrine (El Thair und Skurnik, 2001; Lundgren *et al.*, 1996). Neutrophile exprimieren β_1 -Integrine (CD29) als heterodimere mit α -Integrinen auf ihrer Oberfläche. β_1 -Integrine (CD29) erlauben die Bindung von Neutrophilen an Fibroblasten (Gao und Issekutz, 1997). Die α -Integrine CD49d (α_4), CD49e (α_5) und CD49f (α_6) sind für die Bindung an extrazelluläre Matrixproteine verantwortlich (Frieser *et al.*, 1996; Kubes *et al.*, 1995; Bohnsack, 1992). Nachdem Neutrophile extravadiert sind, produzieren sie CD49b (α_2) auf ihrer Oberfläche, dieses Protein ist wichtig für die extravaskuläre Migration (Ridger *et al.*, 2001). β_2 -Integrine (CD18) kommen auf Neutrophilen in Assoziation mit α_L (CD11a) als ICAM-1, -2, -3, -5-Rezeptor (LFA-1), mit α_M (CD11b) als Komplement-Rezeptor 3 (CR3) und mit α_D (CD11d) als ICAM-3- und VCAM-1-Rezeptor vor (Luo *et al.*, 2007).

HB-PMNs wurden aus heparinisiertem venösem Blut isoliert (2.18.1) und auf die Oberflächenexpression von CD29 und CD18 überprüft (2.18.3.1). Abb. 3.23 zeigt, dass sowohl β_1 - als auch β_2 -Integrine nachgewiesen werden können. 99,1 % der hB-PMNs waren CD18 sowie CD29 positiv.

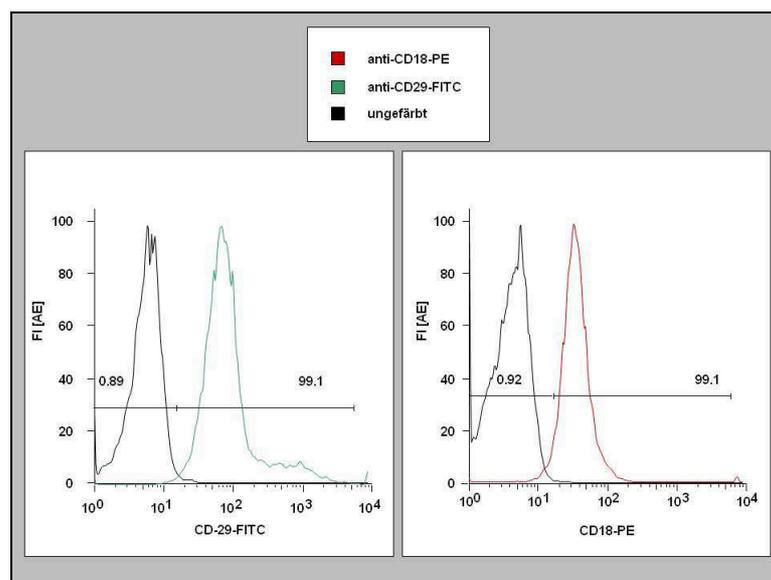


Abb. 3.23 Nachweis von β_1 - und β_2 -Integrinen auf der Zelloberfläche von hB-PMNs. 2×10^5 hB-PMNs wurden mit anti-CD29-FITC-Konjugat (1:60) bzw. anti-CD18-PE-Konjugat (1:25) für eine 1 h bei 4°C gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. FI (Fluoreszenzintensität), AE (arbiträre Einheiten).

Die hB-PMNs wurden mit β_1 - (AIIB2), β_2 - (P4H9) und beiden Integrin-blockierenden Antikörpern präinkubiert (2.19.5), mit 10 μ M APF beladen (2.19.4.1) und für 15 und 30 min mit einer MOI10 mit WA(pYV Δ lcrD) infiziert. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert (2.18.4) und der prozentuale Anteil an Fluoreszein-positiven hB-PMNs sowie der relative Mittelwert der Fluoreszenzintensität in Prozent angegeben. Die mittlere geometrische Fluoreszenzintensität von hB-PMNs infiziert mit WA(pYV Δ lcrD) ohne inhibierende Antikörper wurde auf 100% gesetzt.

Der prozentuale Anteil an ROS-produzierenden hB-PMNs beläuft sich nach 15 min auf 23 – 31 % und nach 30 min auf 65 % -71 %. Für beide Zeitpunkte konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und der β_1 - bzw. β_2 -Blockade festgestellt werden (Abb. 3.24 A und B). Im Gegensatz dazu zeigen hB-PMNs eine signifikante Reduktion der relativen MFI für Zellen, die mit anti- β_1 (61 % \pm 7,65), anti- β_2 (67 % \pm 3,81) und anti- $\beta_{1/2}$ (48 % \pm 4,85) inkubiert wurden (Abb. 3.24 C und D). Nach 30 min konnte nur noch eine signifikante Reduktion der relativen MFI für Neutrophile behandelt mit anti- β_1 (89 % \pm 2,12) und anti- $\beta_{1/2}$ (63 % \pm 9,78) nachgewiesen werden. hB-PMNs, die mit anti- β_2 versehen wurden hatten eine relative MFI von 92% \pm 11,05. Somit konnte die Relevanz von β_1 - und β_2 -Integrinen für die ROS-Produktion der Yersinien-hB-PMNs-Interaktion gezeigt werden.

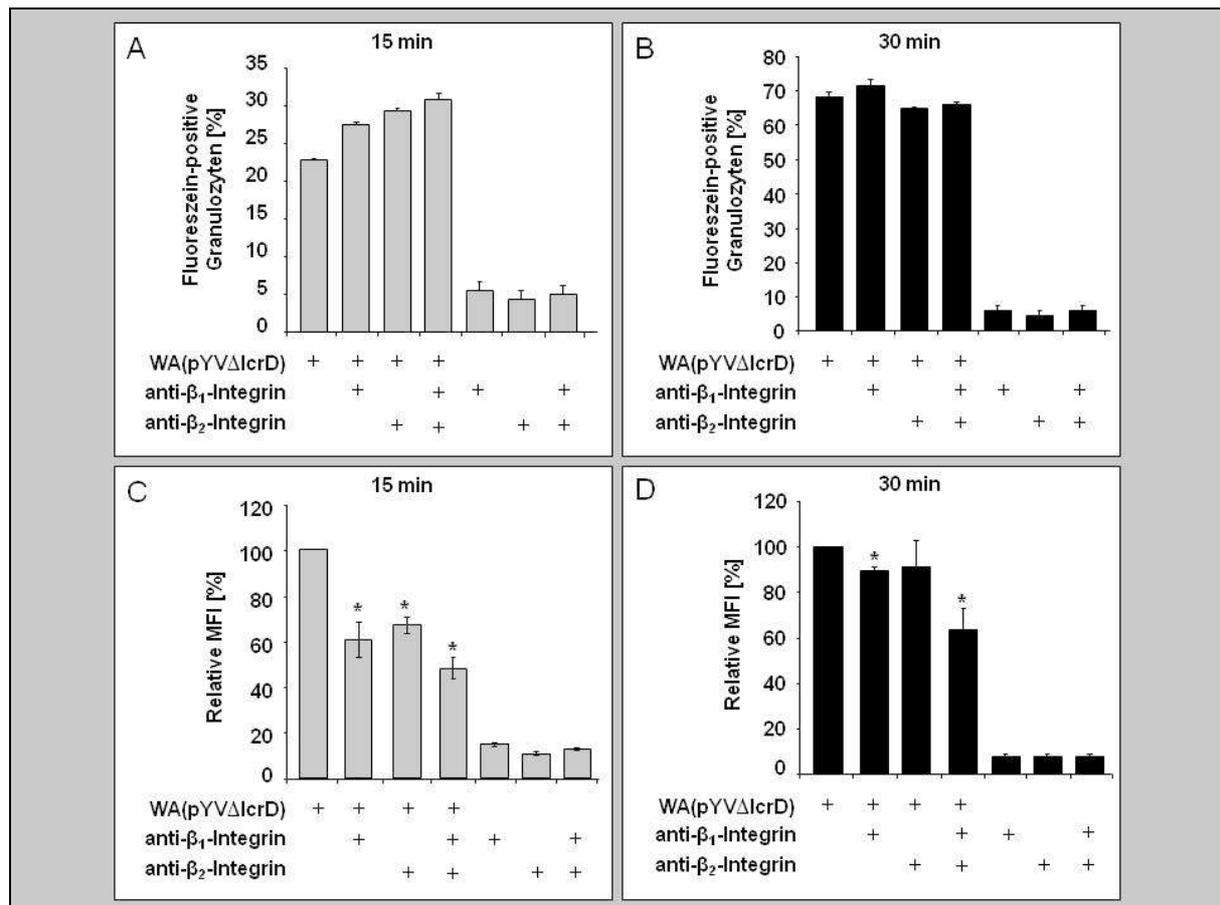


Abb. 3.24 ROS-Produktion humaner Neutrophiler behandelt mit blockierendem β_1 - und β_2 -Integrin-Antikörper und infiziert mit *Y. enterocolitica* WA(pYVΔlcrD). $2,5 \times 10^5$ hB-PMNs wurden in 100 μ l anti-human β_1 -Integrin (AIB2) Hybridomazellüberstand aufgenommen oder/und mit 2 μ g anti-human β_2 -Integrin (P4H9) versehen. Die Zellen wurden mit 10 μ M APF und 15 bzw. 30 min mit WA(pYVΔlcrD) inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Prozentualer Anteil an Fluorescein-positiven hB-PMNs in Prozent nach (A) 15 min und (B) 30 min. Relative mittlere Fluoreszenzintensität in Prozent nach (C) 15 min und (D) 30 min. Die Ergebnisse sind als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$.

3.1.10.4 TLRs

PRRs („*pattern recognition receptors*“) sind Rezeptoren der angeborenen Immunantwort, welche konservierte Strukturen von Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten) sogenannte PAMPs („*pathogen-associated molecular patterns*“) erkennen. Eine wichtige Gruppe der PRRs sind die TLRs („*Toll-like receptors*“). Diese Transmembranrezeptoren erkennen virale Nukleinsäuren und unterschiedliche bakterielle Produkte und induzieren nach ihrer Aktivierung inflammatorische und antimikrobielle Immunantworten (Medzhitov, 2007). Um den Einfluss von TLR-Rezeptoren auf die ROS-Produktion von PMNs zu untersuchen, wurden peritoneale Zellen (2.18.2.3) unterschiedlicher „*knock-out*“ Mäuse (TLR1 $-/-$, TLR2 $-/-$, TLR4 $-/-$, TLR6 $-/-$ und MyD88 $-/-$) (2.20.1) gewonnen und mit 10 μ M APF (2.19.4.1) beladen. Daraufhin wurden die Zellen mit

WA(pYV) und WA(pYV Δ lcrD) mit einer MOI10 infiziert (2.19.1 und 2.19.2) und für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert (2.18.4). Die mPEPN-Population wurde anhand von Fluorchrom-markierten Antikörpern (für murine Neutrophile anti-Ly-6G-PE (2.18.3.4)), gegen Oberflächenproteine bestimmt. Es wurden der prozentuale Anteil an Fluoreszeins-positiven mPEPNs und der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität in Prozent angegeben.

MPEPNs der TLR1 -/- „knock out“ Maus zeigen eine höhere ROS-Grundaktivität (Fluoreszeins-positiv mPEPNs: 25 % \pm 0,81) im Gegensatz zu mPEPNs der anderen ko-Mäuse (8 % \pm 1,72). Die geom. MFI der TLR1 -/- mPEPNs (135 AE \pm 1,53) hingegen ist der anderer mPEPNs (130 AE \pm 12,56) ähnlich. Dies ist zu beachten, wenn ROS-Ergebnisse dieses Mausstammes mit den Ergebnissen anderer ko-Mäuse verglichen werden.

TLR2 -/- mPEPNs (72 % \pm 2,23; 339 AE \pm 16,65) zeigen im Prozentsatz der ROS-produzierenden mPEPNs sowie in der geom. MFI eine signifikante Erhöhung im Gegensatz zu Werten von C57BL/6 (59 % \pm 3,92; 214 AE \pm 7,55) für Infektionen mit WA(pYV). Diese ist für Infektionen mit WA(pYV Δ lcrD) nicht zu beobachten (Abb. 3.25).

Wird die ROS-Produktion der mPEPNs unterschiedlicher Mausstämme nach Infektion mit WA(pYV Δ lcrD) verglichen, können signifikante Reduktionen im Prozentsatz der Fluoreszeins-positiven PMNs sowie der geom. MFI für MyD88 -/- (59 % \pm 2,03; 564 AE \pm 17,50), TLR1 -/- (64 % \pm 2,11; 414 AE \pm 18,50) und TLR4 -/- (74 % \pm 1,86; 559 AE \pm 21,00) mPEPNs nachgewiesen werden (C57BL/6: 83 % \pm 1,03; 800 AE \pm 61,59) (Abb. 3.25).

Somit wurde eine Relevanz von TLR4 und dem Adapterprotein MyD88 für die ROS-Produktion in mPEPNs bei einer Infektion mit *Y. enterocolitica* nachgewiesen. Dieser Befund ist nicht trivial, da *Y. enterocolitica* bei 37°C kaum TLR4-aktives LPS produziert (überwiegend tetraacyliertes LPS) (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2010).

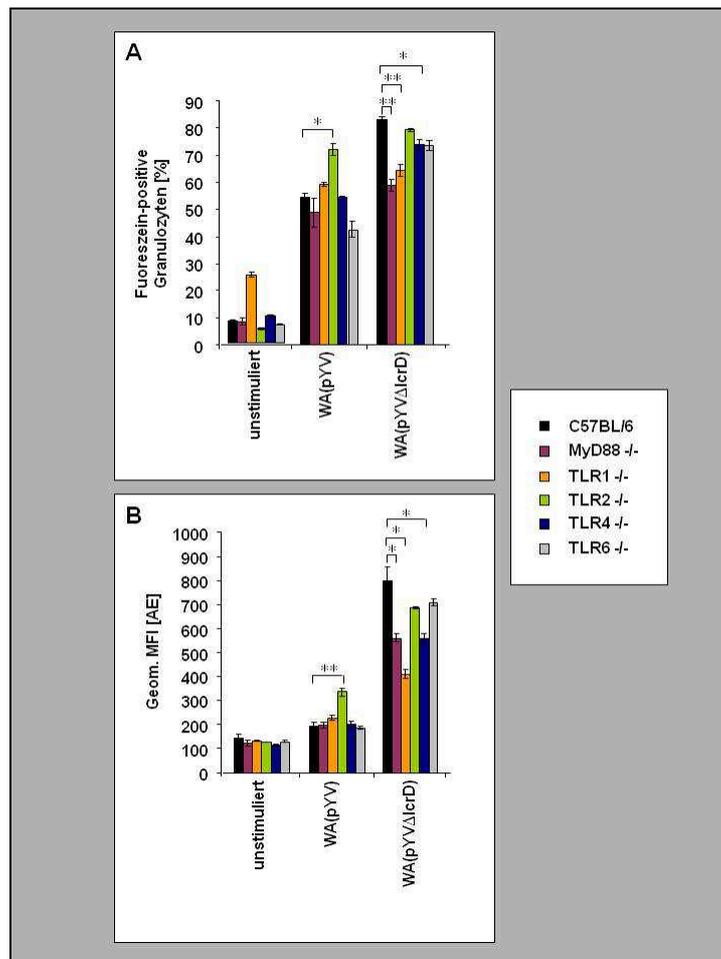


Abb. 3.25 ROS-Produktion muriner peritonealer PMNs der TLR1^{-/-}, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR6^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäuse infiziert mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) und WA(pYVΔlcrD). Durchflusszytometrische Analyse von 1×10^6 muriner peritonealer Zellen versetzt mit 10 μ M APF und infiziert mit WA(pYV) und WA(pYVΔlcrD) für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂. (A) prozentualer Anteil an Fluoreszein-positiven mPEPNs. (B) Geometrische mittlere Fluoreszenzintensität in arbiträren Einheiten (AE). Die Ergebnisse sind als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,004$ und ** $p < 0,0004$.

3.2 Etablierung eines 3D-Kollagengel-Modells zur Analyse der *Yersinia*-Phagozyten-Interaktion

Die Kolonialisierung des Wirtes durch Pathogene sowie die daraus resultierende Immunantwort des Wirtes sind komplexe Vorgänge, die im Tiermodell untersucht werden. Sollen Teilschritte des Infektionsprozesses beschrieben werden, ist es von Vorteil, diese in einem definierten und kontrollierbaren *in vitro* Modell zu analysieren, in dem gezielt verschiedene Parameter (Immunzellen, Erreger, extrazelluläre Matrixkomponenten, Serumproteine, Chemokine, etc.), variiert werden können.

Konventionelle *in vitro* Infektionsversuche werden mit haftenden Zellen (Epithelzellen, Makrophagen, etc.) oder in Zellsuspension in Zellkulturschalen durchgeführt. Diese Zellen werden in einem definierten Verhältnis (MOI = „multiplicity of infection“) mit Bakterien in Kontakt gebracht. Diese Infektionsmodelle berücksichtigen nicht chemotaktische Prozesse, Wirtszellmigration und die Dreidimensionalität des infizierten Gewebes. Das 3D-Kollagengel (3D-KoG) liefert eine Weiterentwicklung in Richtung gewebeaher Untersuchungsmethoden und wird in der Immunologie, Zellbiologie und Tumorforschung zur Untersuchung von Zellmigration, Zell-Zell-Interaktionen sowie Zell-Matrix-Interaktionen verwendet. In dieser Arbeit wurde das 3D-Kollagengel-Modell zur mikroskopischen Analyse von *Yersinia*-PMN-Interaktionen etabliert.

3.2.1 Wachstumsverhalten von *Y. enterocolitica* im 3D-Kollagengel

Das Wachstumsverhalten von *Y. enterocolitica* im 3D-KoG-System wurden von uns beschrieben (Freund *et al.*, 2008).

Wir konnten zeigen, dass WA(pYV) im 3D-KoG nach ca. 16 h Virulenzplasmid-abhängig, kugelförmige Mikrokolonien mit einem Durchmesser von 40–50 µm bildete, wohingegen WA-C als einzeln liegende Zelle oder in kleinen Zellassoziationen (2 – 10 Bakterien) wächst. Elektronenmikroskopisch konnte bei WA(pYV) eine fibrilläre Struktur auf der Bakterienoberfläche festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Myf nicht für diese Ultrastruktur verantwortlich ist und, dass die pYV-abhängige Mikrokoloniebildung Serotyp (*Y. enterocolitica* O:3, O:8 und O:9) unabhängig ist. Es liegt eine Verdopplungszeit im 3D-KoG von 29 min für WA-C und 37 min für WA(pYV) vor. Im Gegensatz zum 3D-KoG zeigt WA(pYV) in anderen dreidimensionalen Umgebungen (Motilitätsagar, 1,5% und 0,5% LB-Agar, 0,5% RPMI-Agar) keine pYV-abhängige Mikrokoloniebildung.

YadA ist für die Packungsdichte der Mikrokolonien verantwortlich. YadA-positive Stämme wachsen als dicht gepackte Mikrokolonien, wobei YadA-negative Stämme eine netzartige,

lockere Packung aufweisen. Durch Untersuchungen mit Stämmen, welche unterschiedliche YadA-Konstrukte exprimieren, konnte der YadA-positive Phänotyp der YadA-Kopfdomäne (Aminosäuren 30 – 180) zugewiesen werden, die auch für den Phänotyp „Autoaggregation“ nach Wachstum in Suspension bei 37°C verantwortlich ist. Invasin sowie das TTSS zeigen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten im 3D-Kollagengel.

Y. enterocolitica ist in Flüssigkultur und Motilitätsagar bei 27°C beweglich und bei 37°C unbeweglich, da die Flagellensynthese temperaturabhängig abgeschaltet wird. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass WA-C im 3D-KoG beweglich ist. Werden die Gene *motAB* bzw. *yenIR* bei WA-C (WA Δ *yenRI*, WA Δ *motAB*) deletiert, bilden die Mutanten im 3D-KoG unregelmäßige große Zellcluster, jedoch keine dichtgepackten Mikrokolonien. Dieser Phänotyp wird auch bei Zugabe von anti-Flagellum-Antisera beobachtet und „tracking“-Mikroskopie unterstreicht diese Ergebnisse. Schon leichte YadA Expression kann die Motilität unterbinden, jedoch stellt die Deletion von *yadA* (WA(pYV Δ *yadA*)) die Beweglichkeit nicht wieder her.

Mit einem *yopE-gfp* Reporterplasmid (WA(pYV, pYopE₁₃₈-GFP)) wurde die *yopE*-Expression im 3D-KoG bei 37°C nachgewiesen, was für ein intaktes *yop*-Regulon spricht. WA(pYV Δ *virF*, pYopE₁₃₈-GFP) zeigt keine Fluoreszenz im 3D-CoG bei 37°C. Eine Ca²⁺-Depletion führte zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität jedoch auch zu einer drastischen Wachstumsinhibierung des Stammes WA(pYV, pYopE₁₃₈-GFP). Des Weiteren konnte mit einem *fyuA-gfp* Reporterstamm (Reporterfusion mit Yersiniabactinrezeptorgen *fyuA*) gezeigt werden, dass die Yersiniabactinsynthese und der –Transport im 3D-CoG von RPMI1640 Medium nicht aktiviert wird.

3.2.2 Verhalten der *Y. enterocolitica* Stämme im 3D-Kollagengel

Die für Interaktionsstudien verwendeten *Y. enterocolitica* Stämme wurden auf die in Freund *et al.* (2008) beschriebenen Charakteristika für Mikrokolonien untersucht und sind in Tab. 3.1 zusammengefasst. Alle Stämme, die *yadA* exprimieren, weisen eine dicht gepackte Mikrokolonienmorphologie auf. Dies ist exemplarisch an 3 Stämmen auf den CLSM- („confocal laser scanning microscopy“) Bildern (Abb. 3.26) zu sehen. Die locker gepackte Mikrokolonienstruktur von WA(pYV Δ *yadA*, pRFP) ist im Hellfeldkanal und besonders deutlich durch die rote Fluoreszenz der Bakterien zu beobachten. Die YadA Produktion (Abb. 3.26) wurde im 3D-KoG in einer Immunfluoreszenzfärbung (2.18.3.5) mit dem monoklonalen Antikörper anti-YadA 8D1 und einem sekundären FITC-konjugiertem Antikörper überprüft. Die grüne Fluoreszenz zeigt die YadA Exposition auf der Bakterienoberfläche. Für WA(pYV, pRFP) ist ein radialer, für WA(pYV Δ *lcrD*, pRFP) ein tangentialer Schnitt durch die

Mikrokolonie dargestellt. Die Stämme WA(pRFP) und WA(pYVΔ*yadA*, pRFP) exprimieren *YadA* nicht und zeigen keine Autoagglutination.

Tab. 3.1 Charakteristika der in 3D-KoG Studien verwendeten *Y. enterocolitica* Stämme. Charakteristikum (+) vorhanden, (-) nicht vorhanden, (#) Yop Sekretion inhibiert. (dp) dicht gepackt, (lp) locker gepackt.

Stamm	Auto-agglutiation	<i>yadA</i> Expression	<i>yop</i> Expression, Yop Sekretion	Mikrokolonie-Bildung
WA(pRFP)	-	-	-	-
WA(pGFP)	-	-	-	-
WA(pYV, pRFP)	+	+	+	dp
WA(pYV, pGFP)	+	+	+	dp
WA(pYVΔX, pRFP)				
WA(pYVΔ <i>lcrD</i> , pRFP)	+	+	#	dp
WA(pYVΔ <i>yadA</i> , pRFP)	-	-	+	lp
WA(pYVΔE, pRFP)	+	+	+	dp
WA(pYVΔH, pRFP)	+	+	+	dp
WA(pYVΔM, pRFP)	+	+	+	dp
WA(pYVΔO, pRFP)	+	+	+	dp
WA(pYVΔP, pRFP)	+	+	+	dp
WA(pYVΔQ, pRFP)	+	+	+	dp
WA(pYVΔT, pRFP)	+	+	+	dp
WA(pT3SS, pYopX)				
WA(pT3SS)	+	+	-	dp
WA(pT3SS, YopE)	+	+	+	dp
WA(pT3SS, YopH)	+	+	+	dp
WA(pT3SS, YopM)	+	+	+	dp
WA(pT3SS, YopO)	+	+	+	dp
WA(pT3SS, YopOP)	+	+	+	dp
WA(pT3SS, YopQ)	+	+	+	dp
WA(pT3SS, YopT)	+	+	+	dp

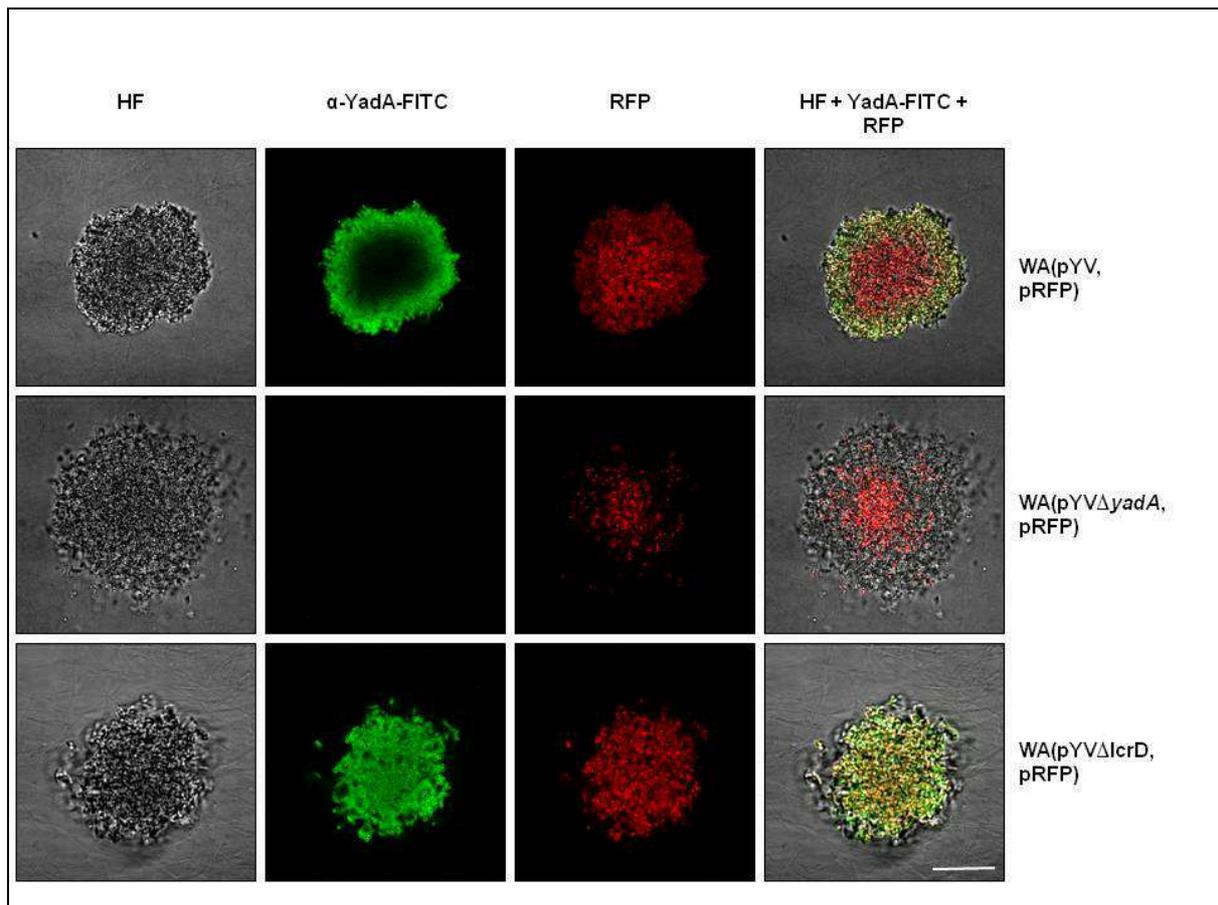


Abb. 3.26 YadA Produktion der *Y. enterocolitica* Stämme im 3D-KoG. *Y. enterocolitica* Stämme wurden 16 h im 3D-KoG bei 37°C inkubiert. Die Mikrokolonien wurden mit dem monoklonalen anti-YadA Antikörper 8D1 (1:200) und anti-Maus IgG FITC (1:200) inkubiert. Die Yersinien enthalten das Plasmid pRFP. HL: Hellfeld. Der Größenbalken entspricht 25 µm.

Die Yop Synthese und Sekretion (2.15.1) der Yersinia-Stämme nach Anzucht in BHI-EGTA-Medium und Präparation des Kulturüberstandes wurde in Westernblot Analysen überprüft (Abb. 3.27). Für die Einzel-Yop-Deletionsmutanten WA(pYVΔX, pRFP) konnte bestätigt werden, dass das jeweils deletierte Yop nicht mehr produziert und sekretiert wurde. WA(pYV, pRFP) und WA(pYVΔyadA, pRFP) konnten alle sieben Yops synthetisieren und sekretieren. WA(pYVΔlcrD, pRFP) produzierte alle sieben Yops. In diesem Stamm wurde das *lcrD* Gen durch Tn5-Insertion inaktiviert. *lcrD* kodiert für eine Komponente der Basalstruktur des T3SS in der inneren Bakterienmembran. Deswegen ist eine Sekretion der Yops für WA(pYVΔlcrD, pRFP) nicht nachzuweisen. WA(pT3SS) ist ein pYV-negativer *Y. enterocolitica* Stamm, der ein Minivirulenzplasmid trägt, welches den kompletten Gensatz für das Ysc-T3SS sowie für YadA enthält. Dieser Stamm wurde von Trülsch *et al.*, (2003) mit verschiedenen Plasmiden transformiert, die jeweils nur ein *yop*-Gen bzw. *yop/syc*-Gene enthalten. Mit diesen Stämmen ist es möglich, einzelne Yop-Effekte zu untersuchen. Die

Synthese und Sekretion der einzelnen Yops wurde auch für diese Stämme bestätigt. Da die Einzel-Yop-Mutanten von WA(pT3SS, pYopX, pRFP) eine erhebliche Wachstumsinhibition zeigten wurden in dieser Arbeit die pRFP-negativen WA(pT3SS, pYopX)-Stämme für Interaktionsversuche im 3D-KoG verwendet.

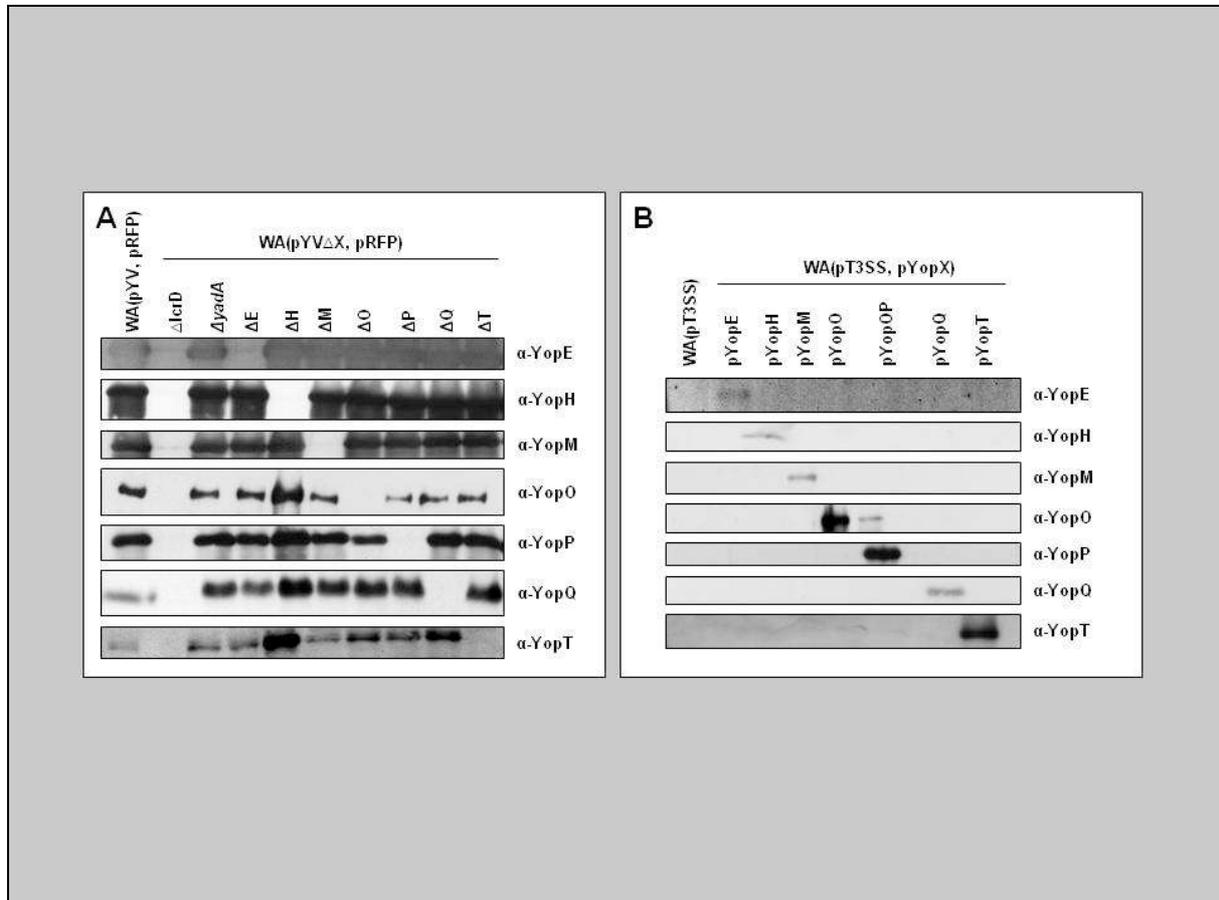


Abb. 3.27 Yop Sekretion der *Y. enterocolitica* Stämme. (A) WA(pYVΔX, pRFP) Stämme. (B) WA(pT3SS, pYopX) Stämme. Sekretierte Yops wurden auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Immunoblots wurden mit Kaninchen anti-YopH/M/O/P/Q/T-Seren (1:1000), mit Kaninchen anti-YopE-Serum (1:10 000) und Esel anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat (1:10000) inkubiert.

3.2.3 Versuchsaufbau für 3D-Kollagenstudien

Es wurden zwei 3D-KoG-Systeme verwendet, um *Yersinia*-Immunzell-Interaktionen zu beobachten. Im Einzelschichtmatrixsystem (Abb. 3.28 A) wurden Bakterien und eukaryotische Zellen gleichzeitig in das 3D-KoG eingegossen (2.19.2.2.1). Diese Methode ist geeignet, um die Interaktion von einzeln liegenden Yersinien oder kurzen Bakterienketten mit Immunzellen zu untersuchen. In diesem Versuchsaufbau müssen Immunzellen keine weiteren Barrieren überwinden, die vor allem durch unterschiedlich polymerisiertes Kollagen, das an Grenzflächen oft ein dichteres Netzwerk aufweist, entstehen. Des Weiteren wurde das

Doppelschichtmatrixsystem (2.19.2.2 und Abb. 3.28 B) als variables System etabliert in dem zunächst ein Kollagengel (KoG) gegossen wird, welches den zu untersuchenden *Y. enterocolitica* Stamm enthält (2.19.1.2). Dieses 3D-KoG kann unterschiedlich lang inkubiert werden. Dies hat den Vorteil, dass die Bakterien in jeder Wachstumsphase mit Immunzellen in Kontakt gebracht werden können. Der Zeitpunkt des Überschichtens mit dem zweiten Immunzell-enthaltendem 3D-KoG (2.19.2.2 und Abb. 3.28 B) kann je nach Versuchsziel frei bestimmt werden. Nach auftragen des zweiten 3D-KoG, wandern die darin enthaltenen PMNs in das untere 3D-KoG ein (Abb. 3.28 C) und können mit den Yersinien interagieren (Abb. 28 D). Die Neutrophilenwanderung und Interaktion mit Yersinien wurde mit dem CLSM analysiert. Eine Abbildungstiefe von 30 μm wurde nicht überschritten, da die Fluoreszenzintensität in tieferen Schichten nicht mehr ausreichend detektiert werden konnte.

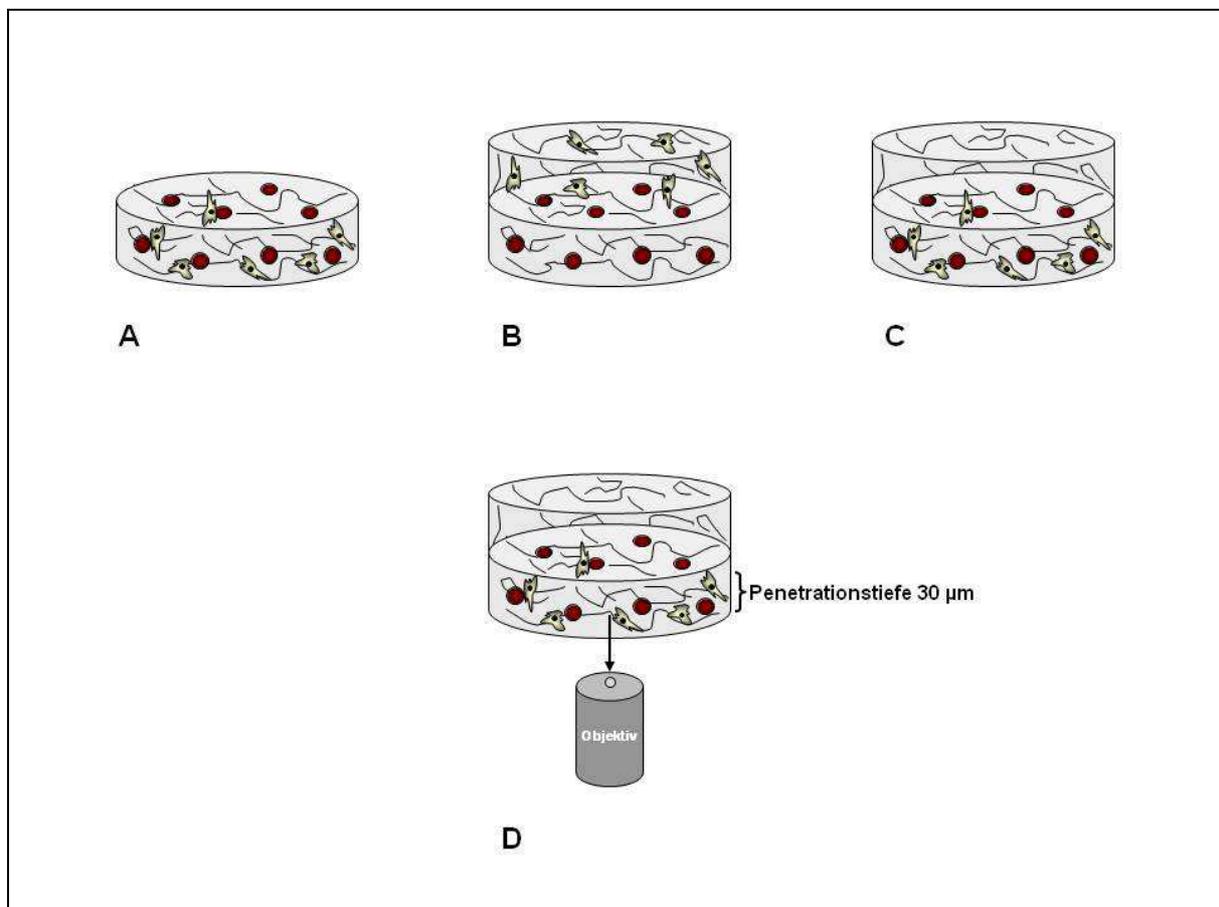


Abb. 3.28 Versuchsaufbau des 3D-KoG-Systems. Im (A) Einzelschichtmatrixsystem werden Bakterien und Immunzellen gleichzeitig in das 3D-KoG gegeben. Im (B – D) Doppelschichtmatrixsystem kann das Yersinien-enthaltende erste 3D-KoG unabhängig inkubiert werden und zu gewünschtem Zeitpunkt mit dem zweiten Immunzell-enthaltendem 3D-KoG überschichtet werden. Die Abbildungstiefe des konfokalen Mikroskops beträgt ca. 30 μm .

3.2.4 Migration von Phagozyten und deren Interaktion mit *Y. enterocolitica* Stämmen im 3D-Kollagengel

Die Migration von Immunzellen im Gewebe ist Voraussetzung, um Infektionen zu beseitigen. Somit wurde zunächst das Migrationsverhalten verschiedener phagozytischer Zellen im 3D-KoG untersucht. Zwei Zelltypen des angeborenen Immunsystems sind in den ersten Stunden einer Infektion von Bedeutung. Dies sind zum Einen PMNs, welche von der Blutbahn über das Blutgefäßendothel ins Gewebe migrieren, um den Infektionsherd zu erreichen. Zum Anderen residieren Makrophagen im Gewebe und können von der Infektionsquelle rekrutiert werden (Chemotaxis). Es wurden verschiedene Phagozytentypen (primäre Blutzellen und Zelllinien) untersucht. Für PMNs wurden hB-PMNs (2.18.1) isoliert und eine humane Leukämiezelllinie myeloider Vorläuferzellen (HL60) verwendet, welche innerhalb von 6 Tagen mit DMSO zu PMN-ähnlichen Zellen (dHL60) ausdifferenziert werden konnte (2.17.2). Um Makrophagen zu erhalten wurden murine Knochenmarkszellen (2.18.2.1.1) mit M-CSF über 15 Tage zu BMDM („bone marrow derived macrophages“) differenziert bzw. die murine Zelllinie J774A.1 (2.17.1.1) verwendet. Es wurden 3D-Kollagengele im Einzelschichtmatrixsystem (2.19.2.2.1) gegossen, die jeweils PMNs (primär oder dHL60 Zellen) oder Makrophagen (BMDM oder J774A.1) enthielten sowie entweder den Virulenzplasmid freien Stamm WA-C oder den pYV-enthaltenden Stamm WA(pYV). Die *Y. enterocolitica* Stämme wurden zur besseren Lokalisierung im 3D-KoG mit Plasmiden transformiert, welche Gene enthielten, die entweder für Gfp oder Rfp kodierten.

3.2.4.1 PMN-Yersinien-Interaktion

Alle initial in das 3D-KoG eingebrachten PMNs wiesen zunächst eine sphärische Morphologie auf. Nach ungefähr 30 min konnten an den meisten Zellen ca. 3 – 5 µm lange Filopodien identifiziert werden, welche an der Zelloberfläche alternierend und ungerichtet verteilt auftraten (Abb. 3.29 A). Außerdem konnten ab diesem Zeitpunkt wandernde polarisierte Zellen mit einer Zellfront und einem Uropod beobachtet werden (Abb. 3.29 B). Der Anteil an migrierenden Zellen erhöhte sich mit steigender MOI und war bei primären Zellen stets höher als bei dHL60 Zellen. Migrierende PMNs stießen zufällig auf *Y. enterocolitica* Zellen. Kam es zu einem länger andauernden Kontakt dem Stamm WA-C konnten Phagozytoseprozesse erkannt werden (Abb. 3.30 A). Wenige Kontakte waren transient („stille Interaktionen“) und die PMNs wanderten weiter. Bei virulenten WA(pYV) Bakterien konnten 4 Folgereaktionen der Phagozyten nach einer Interaktion beschrieben werden. (1) die Bakterien wurden phagozytiert, (2) die PMNs wurden geschädigt

(zytotoxischer Effekt) (Abb. 3.30 B), (3) die Zellpolarität und Migration wurde gestört (Abb. 3.33 C) oder (4) die Interaktionen blieben transient (stille Interaktionen) (Abb. 3.33 D).

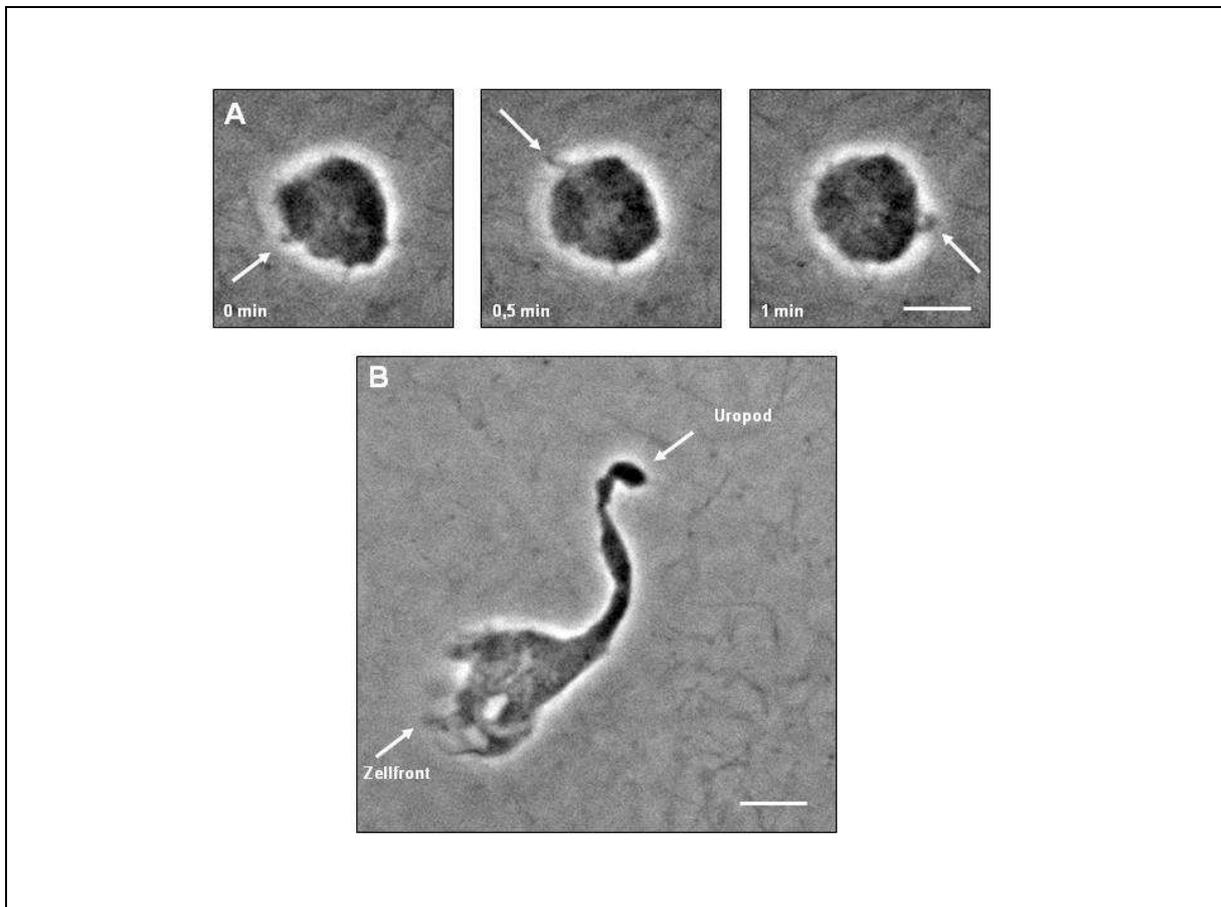


Abb. 3.29 Verschiedene Aktivitätszustände von PMNs im 3D-KoG. dHL60 Zellen wurden mit WA(pYV, pGFP) im Einzelschichtmatrixsystem in das KoG eingegossen. 30 min nach Fertigstellung des 3D-KoG wurden alle 10 sec Aufnahmen mit einem CLSM durchgeführt. (A) dHL60 Zelle mit alternierend auftretenden Filopodien. (B) Migrierende dHL60 Zelle mit Zellfront und Uropod. Der Größenbalken entspricht 15 μm .

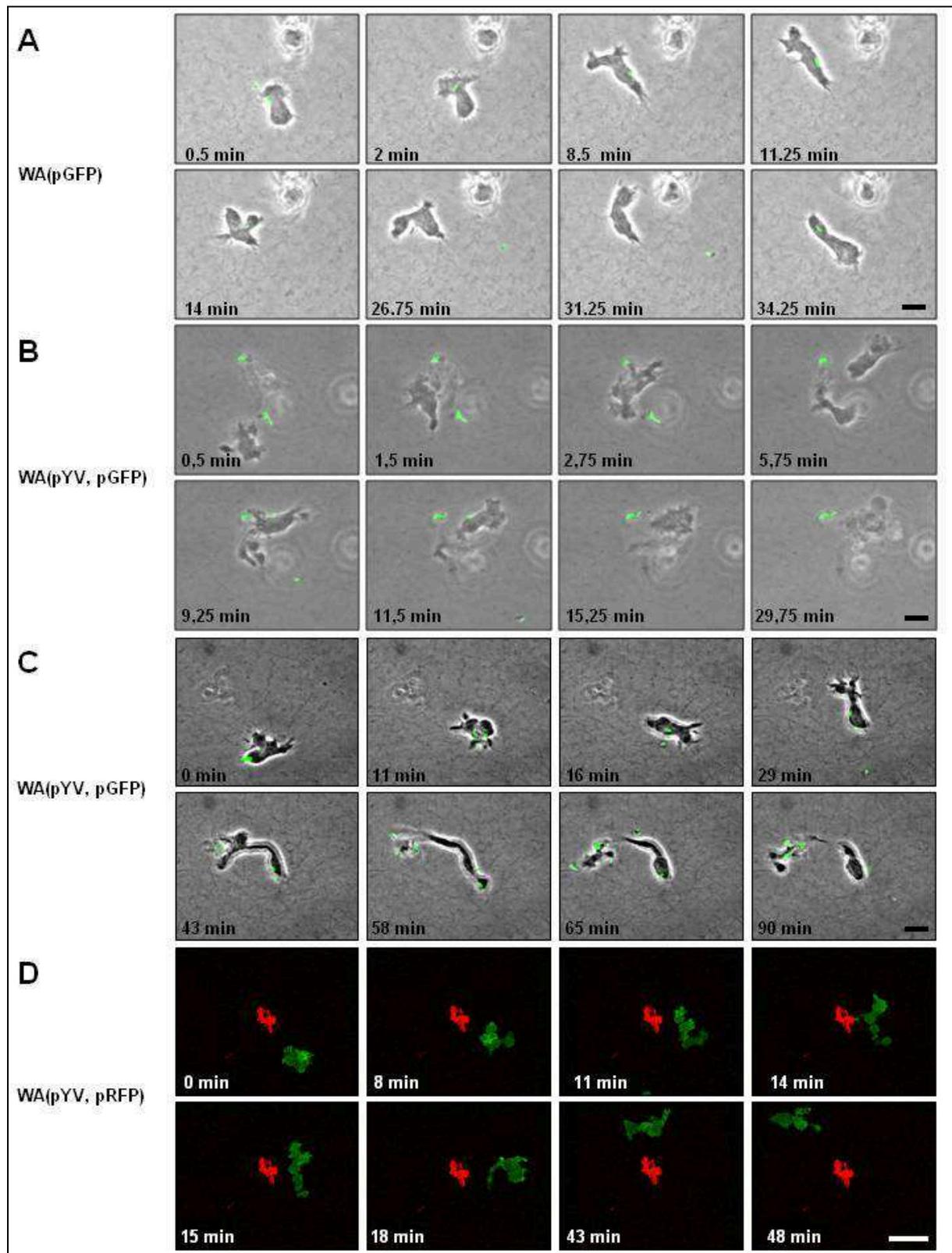


Abb. 3.30 Folgeaktionen der PMN-*Y. enterocolitica* Interaktion. dHL60 wurden im Einzelschichtmatrixsystem 3 h beobachtet. Gezeigt sind repräsentative Interaktionssequenzen aufgenommen mit einem (A – D) CLSM. (A) WA(pGFP) wird von einer dHL60 Zelle phagozytiert. (B) Zelltod der dHL60 Zelle nach Interaktion mit WA(pYV, pGFP). (C) Zellpolarität und Migration der dHL60 Zelle gestört nach Interaktion mit WA(pYV, pGFP). (D) Stille Interaktion von dHL60 Zelle mit WA(pYV, pRFP). dHL60 Zellen wurden mit 0,5 μ M CMFDA gefärbt. Der Größenbalken entspricht 15 μ m.

3.2.4.2 Makrophagen-Yersinien-Interaktion

Wurden murine Makrophagen (BMDM) zusammen mit den *Y. enterocolitica* Stämmen WA-C bzw. WA(pYV) in ein 3D-KoG eingebracht, behielten sie über 2 Stunden eine sphärische Morphologie bei. Nach ca. 3 Stunden bildeten sich auf der gesamten Zelloberfläche 3 – 15 µm lange Filopodien (Abb. 3.31 A) und nach 16 Stunden wiesen die Makrophagen eine Vielzahl von Pseudopodien auf (Abb. 3.31 B). Migrierende Zellen wurden über eine Inkubationszeit von 16 h nicht beobachtet. *Y. enterocolitica* Zellen, die in kontaktfähiger Nähe lagen, wurden unabhängig ob virulent (WA(pYV)) oder avirulent (WA-C) phagozytiert. Vitalitätsunterschiede der Makrophagen zeigten sich nach 16-stündiger Inkubation. Geschädigte Zellen verloren ihre grüne Fluoreszenz, da der Farbstoff über Löcher in der Zytoplasmamembran entweichen kann. Makrophagen, die mit dem *Y. enterocolitica* Stamm WA(pYV) zusammen inkubiert wurden, zeigten einen hohen Anteil an toten Zellen (Abb. 3.32 B), im Gegensatz zu dem Ansatz der WA-C enthielt (Abb. 3.32 A).

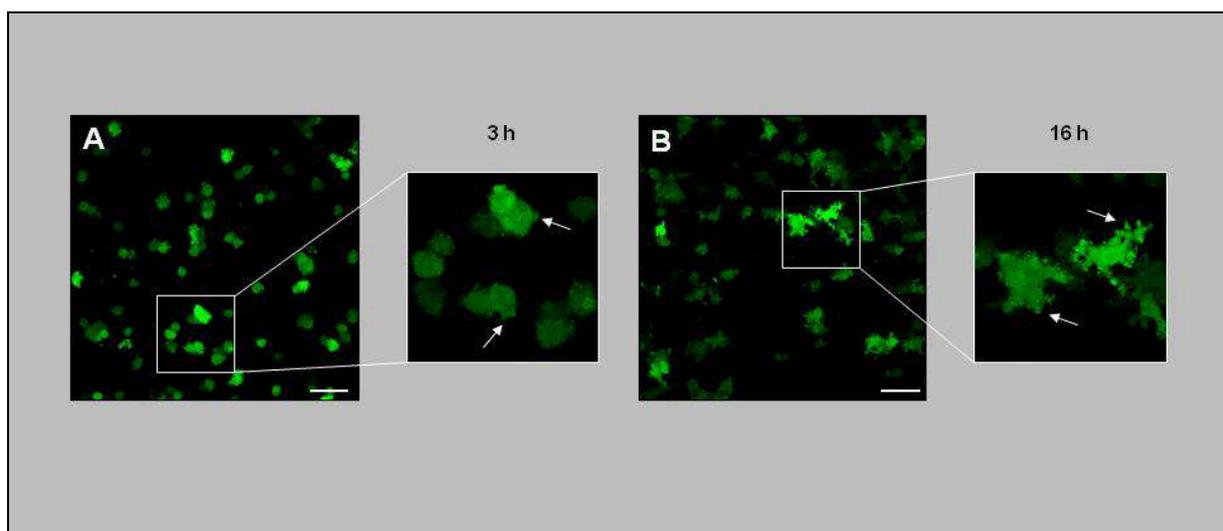


Abb. 3.31 Morphologie der Makrophagen im 3D-KoG. 1×10^6 murine BMDM wurden im Einzelschichtmatrixsystem ins 3D-KoG analysiert. Morphologie der Zellen nach (A) 3 h und (B) 16 h. Die weißen Pfeile zeigen (A) Filopodien und (B) Pseudopodien. Die Zellen wurden mit $0,5 \mu\text{M}$ CMFDA gefärbt. Dargestellt ist eine Projektion von 10 Bildern mit einem Bildabstand von $3 \mu\text{m}$. Der Größenbalken entspricht (A und B) $50 \mu\text{m}$.

Um Makrophagen für Infektionsversuche verwenden zu können, müssen sie von dem Zellkulturboden mechanisch abgelöst werden und ein Wiederanheften an den Untergrund dauert mindestens 3 Stunden. Um auszuschließen, dass das Ablösen die Makrophagen beschädigt und hindert in das 3DCoG einzuwandern, wurde ein anderer Ansatz gewählt. Makrophagen wurden in Mikroskopierschälchen ausgesät und einen Tag später mit einem

Yersinien enthaltendem 3D-KoG überschichtet. Nach ca. einer Stunde konnten migrierende Zellen auf der Mikroskopierschälchenoberfläche beobachtet werden (Abb. 3.33 A und B), jedoch wanderten die Makrophagen nicht in das 3D-KoG ein. Auch hier konnte die Phagozytose von WA(pGFP) und WA(pYV, pGFP) gezeigt werden (Abb. 3.33).

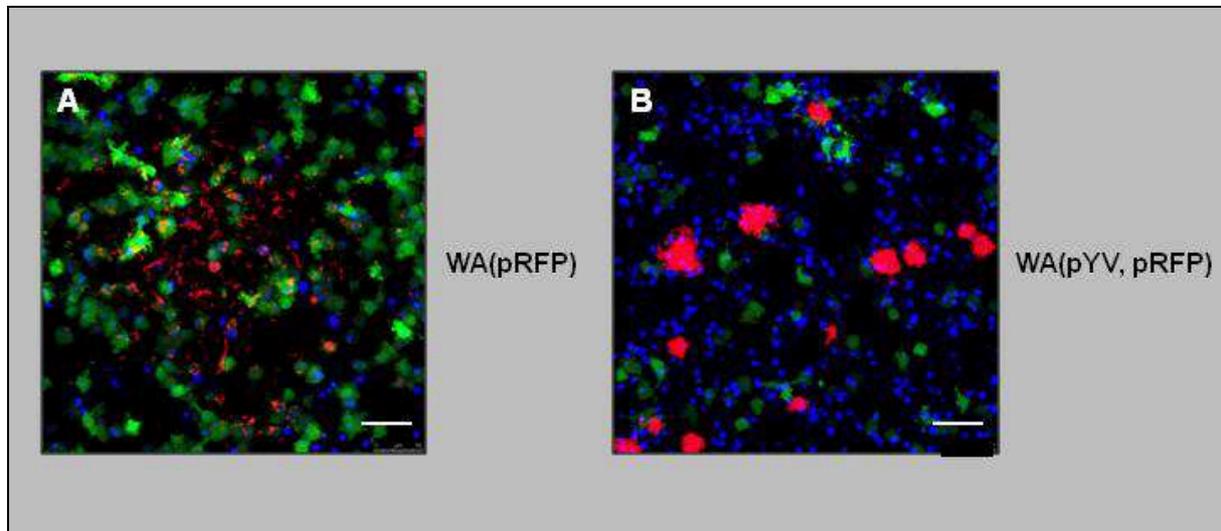


Abb. 3.32 Interaktion von Makrophagen und *Y. enterocolitica* Stämmen im 3D-KoG. 1×10^6 murine BMDM wurden mit 1×10^4 (A) WA(pRFP) oder mit (B) WA(pYV, pRFP) im Einzelschichtmatrixsystem ins 3D-KoG eingegossen und bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Die Analyse fand nach 16 h mit einem CLSM statt. Dargestellt sind eine Projektion von 10 Bildern mit einem Bildabstand von $3 \mu\text{m}$ (A und B). (rot) Yersinien mit pRFP. (blau) DAPI-gefärbte Zellkerne. (grün) murine BMDM gefärbt mit CMFDA. Der Größenbalken entspricht (A und B) $50 \mu\text{m}$.

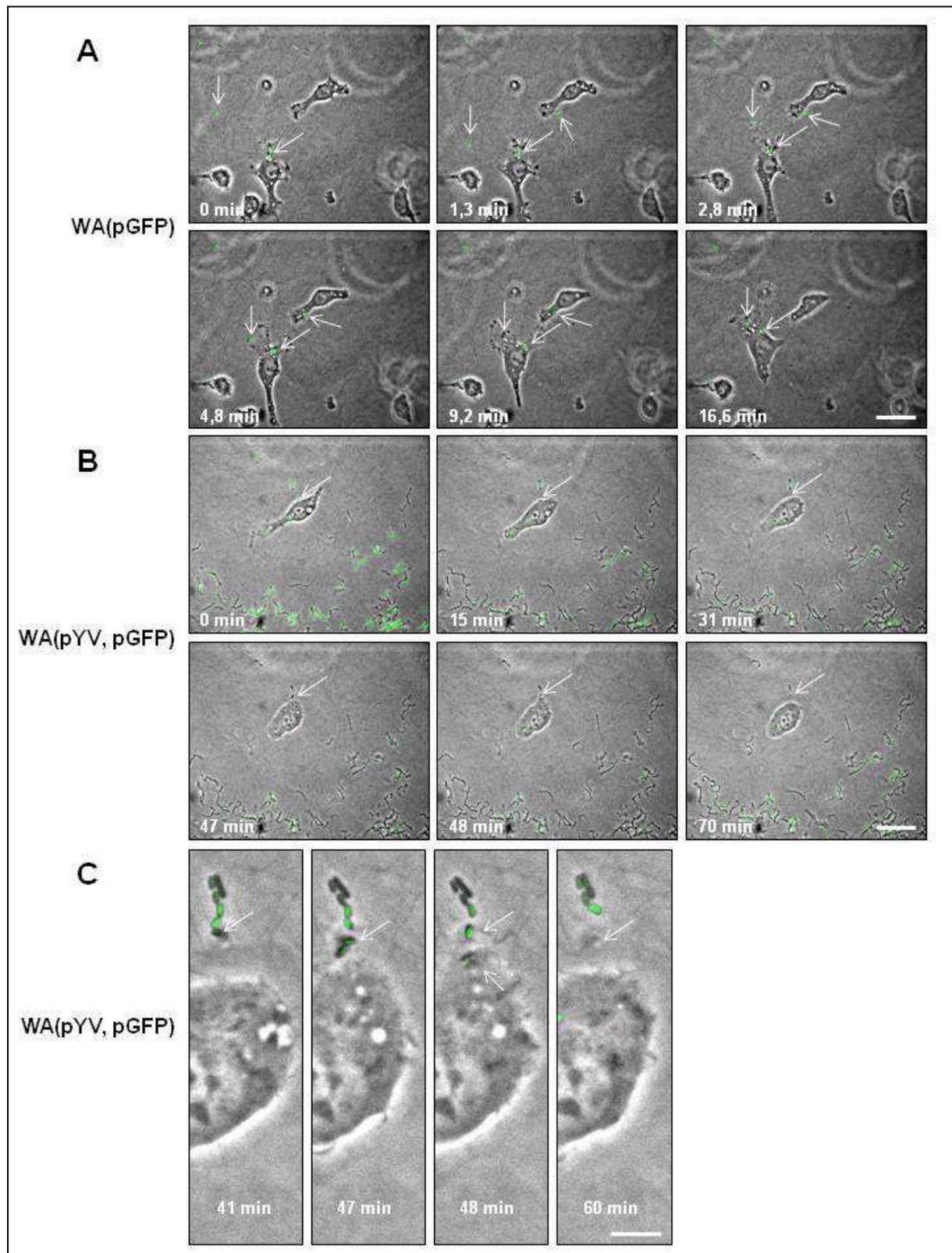


Abb. 3.33 Phagozytose von *Y. enterocolitica* Stämmen durch Makrophagen. 1×10^5 J774A.1 Zellen wurden in Mikroskopierschälchen ausgesät und am nächsten Tag mit einem 1×10^6 Bakterien enthaltendem 3D-KoG überschichtet. (A) WA(pGFP). (B) und (C) WA(pYV, pGFP). (A und B) Ausschnitte repräsentativer Sequenzen von 1,5-stündigen Aufnahmen mit einem CLSM. Zu beobachten ist die Phagozytose von Yersinienzellen. (C) Vergrößerte Darstellung der Phagozytose von WA(pYV, pGFP). Bildaufnahmeintervall 30 sec. Der Größenbalken entspricht (A und B) $30 \mu\text{m}$ und (C) $10 \mu\text{m}$.

3.2.5 Mikroskopische Bestimmung der ROS-Produktion von humanen PMNs nach Interaktion mit *Y. enterocolitica* Stämmen im 3D-Kollagengel-Modell

PMNs gehören, in der Regel zu den ersten Zellen der angeborenen Immunantwort, die vom bakteriellen Infektionsherd rekrutiert werden. Diese Zellen verfügen über eine Vielzahl von Abwehrmechanismen, um bakterielle Infektionserreger zu kontrollieren und zu eliminieren. Eine dieser wichtigen Eigenschaften ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffmolekülen (ROS), die in diesem Abschnitt untersucht wurde. Es sollte festgestellt werden, ob ROS-Produktion im 3D-CoG nach Interaktion mit Yersinien möglich ist, ob Yersinien eine gerichtete Neutrophilen Rekrutierung induzieren und ob zwischen ROS-positivem und ROS-negativem Kontakt differenziert werden kann. Zur Detektion der ROS-Produktion wurde der Fluoreszenzfarbstoff Amino-Phenyl-Fluoreszein (APF) verwendet. Es wurde das Doppelschichtmatrixsystem benutzt. Somit konnte die Interaktion von PMNs mit einzelnen Yersinien sowie mit Mikrokolonien verschiedener *Y. enterocolitica* Stämme untersucht werden. Um einzelne Bakterien bzw. kurze Bakterienketten zu erhalten wurde das erste 3D-KoG sofort nach der Polymerisierung mit dem zweiten PMNs enthaltenem 3D-KoG überschichtet. Um Mikrokolonien eines Durchmessers von 40 – 50 μm zu erhalten wurde das erste 3D-KoG 16 h bei 37°C und 5 % CO_2 bebrütet. Bei Interaktionen von PMNs mit Einzelzellen konnten für jeden untersuchten *Y. enterocolitica* Stamm phagozytierte Bakterien und die Produktion von ROS festgestellt werden. Die Migration der PMNs im 3D-KoG war mit einzelnen Bakterienzellen oder Mikrokolonien stets ungerichtet. Für die zufällige Interaktion mit Mikrokolonien wurden mehrere Charakteristika untersucht, welche in Tabelle 3.2 aufgelistet sind. Das Eindringen in die Mikrokolonie gelang PMNs bei WA(pYV Δ lcrD, pRFP) (Abb. 3.34 A und B) und bei allen WA(pT3SS, pYopX). Nachdem die ersten Neutrophilen eine Mikrokolonie kontaktiert hatten, war eine gerichtete Migration von weiteren PMNs in Richtung Mikrokolonie festgestellt worden. Die meisten Neutrophilen wurden nach initialer Interaktion mit randständigen Bakterien der Mikrokolonie unbeweglich. Dieses Phänomen der Immobilisierung und Abrundung von PMNs konnte bei allen Stämmen und in besonderem Maße bei WA(pYV Δ yadA, pRFP) (Abb 3.34 A) beobachtet werden. Eine Ausnahme stellte WA(pYV Δ lcrD, pRFP) dar (Abb3.34 A und B). Stille Interaktionen, Interaktionen von PMNs mit randständigen Bakterien der Mikrokolonie, nach denen sich die PMNs wieder von der Mikrokolonie entfernen, konnten bei WA(pYV, pRFP), sowie bei allen WA(pYV Δ YopX, pRFP), festgestellt werden (Abb. 3.34 C). Die ROS-Produktion wurde bei PMNs nach einer Interaktion mit Mikrokolonien der Stämme WA(pYV Δ lcrD, pRFP) (Abb. 3.34 A und B) und allen WA(pT3SS, pYopX) mit Ausnahme von WA(pT3SS, YopH) (Abb.

3.35) beobachtet. Ob eine Phagozytose der Bakterien zusätzlich stattfand konnte nur für WA-C(pYVΔlcrD, pRFP) (Abb. 3.34 B) bestätigt werden. Die WA(pT3SS, pYopX)-Stämme tragen wegen ihres schlechten Wachstumsverhaltens kein pRFP-Plasmid. Auf Grund dessen ist es nicht möglich die Phagozytose dieser Bakterienstämme in diesem Versuchsansatz mikroskopisch festzustellen.

Tab. 3.2 Interaktion von humanen PMNs mit Mikrokolonien verschiedener *Y. enterocolitica* Stämme. (+) Merkmal vorhanden, (-) Merkmal nicht vorhanden.

Stamm	PMNs			
	ROS Produktion	Mikrokolonie-Invadierung	Interaktion mit Zellabrunden	Interaktion und anschließender Migration
WA(pYV, pRFP)	-	-	+	+
WA(pYVΔX, pRFP)				
WA(pYVΔlcrD, pRFP)	+	+	-	-
WA(pYVΔyadA, pRFP)	-	-	++	-
WA(pYVΔE, pRFP)	-	-	+	+
WA(pYVΔH, pRFP)	-	-	+	+
WA(pYVΔM, pRFP)	-	-	+	+
WA(pYVΔO, pRFP)	-	-	+	+
WA(pYVΔP, pRFP)	-	-	+	+
WA(pYVΔQ, pRFP)	-	-	+	+
WA(pYVΔT, pRFP)	-	-	+	+
WA(pT3SS, pYopX)				
WA(pT3SS)	+	+	+	-
WA(pT3SS, YopE)	+	+	+	-
WA(pT3SS, pYopH)	-	+	+	-
WA(pT3SS, pYopM)	+	+	+	-
WA(pT3SS, pYopO)	+	+	+	-
WA(pT3SS, pYopOP)	+	+	+	-
WA(pT3SS, pYopQ)	+	+	+	-
WA(pT3SS, pYopT)	+	+	+	-

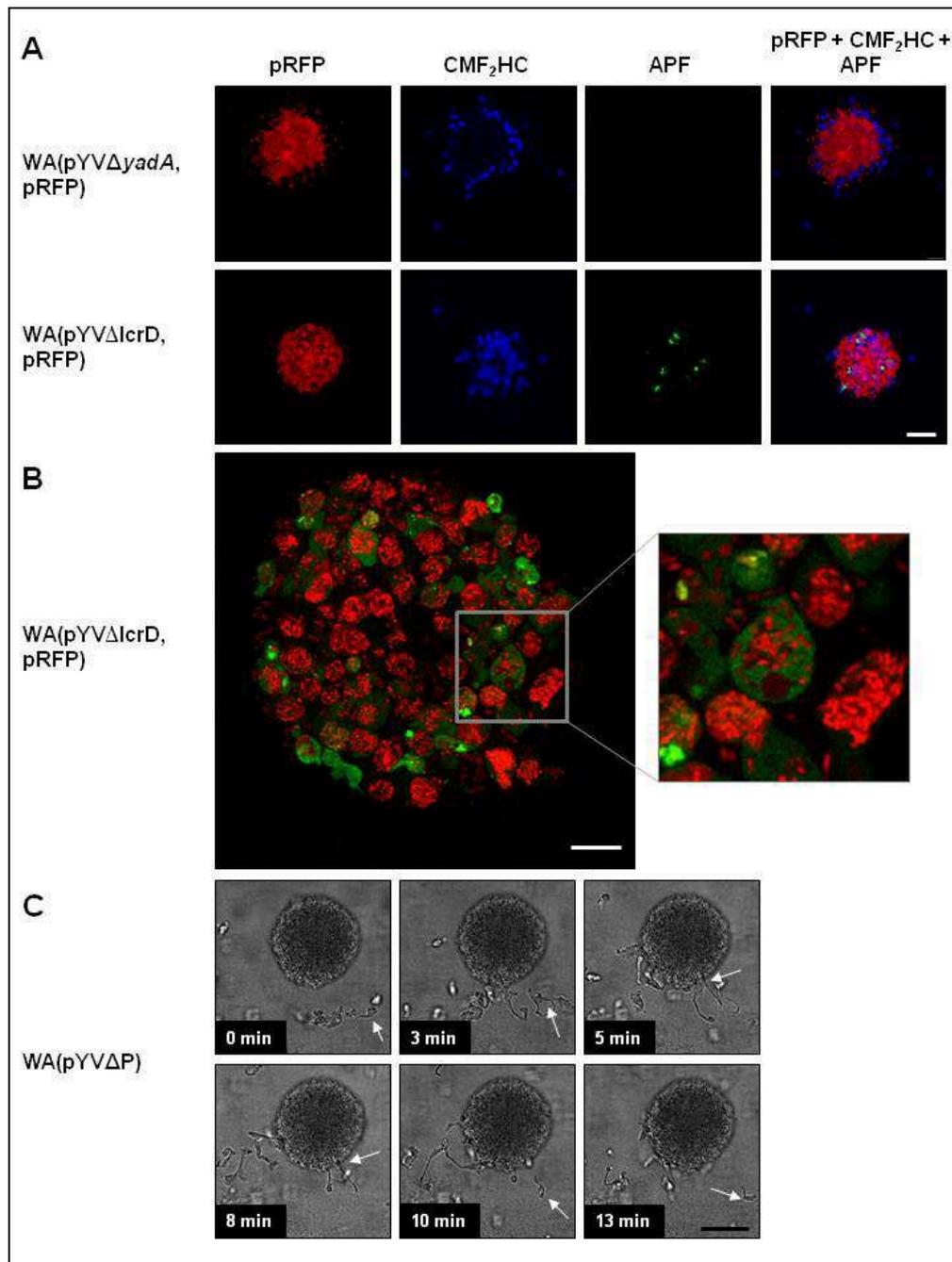


Abb. 3.34 Interaktion von humanen PMNs mit Mikrokolonien verschiedener *Y. enterocolitica* Stämme. Die Darstellung zeigt CLSM-Aufnahmen von *Y. enterocolitica* Mikrokolonien im Doppelschichtmatrixsystem. Das untere 3D-KoG enthält 5×10^4 Yersinien in 60 μ l Kollagenlösung inkubiert bei 37°C mit 5% CO₂ 16 h. Das obere 3D-CoG enthält 5×10^5 hB-PMNs gefärbt mit 1 μ M CMF₂HC (blau) und 10 μ M APF in 100 μ l Kollagenlösung. Bakterien produzieren RFP (rot). ROS wurden durch APF detektiert (grün). (A) Obere Zeile: Interaktion von hB-PMNs mit einer Mikrokolonie des Stammes WA(pYVΔyadA, pRFP). Die dicht gepackte Mikrokolonie ist von abgerundeten hB-PMNs umgeben. Untere Zeile: Interaktion von hB-PMNs mit Mikrokolonie des Stammes WA(pYVΔlcrD, pRFP). Die Mikrokolonie wird von hB-PMNs invadiert, welche ROS produzieren. (B) WA(pYVΔlcrD, pRFP) Mikrokolonie komplett durchsetzt von phagozytierenden hB-PMNs, die ROS produzieren. (C) Stille Interaktion: Der Pfeil zeigt einen hB-PMN der mit einer Mikrokolonie von WA(pYVΔP) interagiert. Das Migrationsverhalten ist daraufhin nicht behindert. Der Größenbalken entspricht (A) 25 μ m, (B) 10 μ m und (C) 30 μ m.

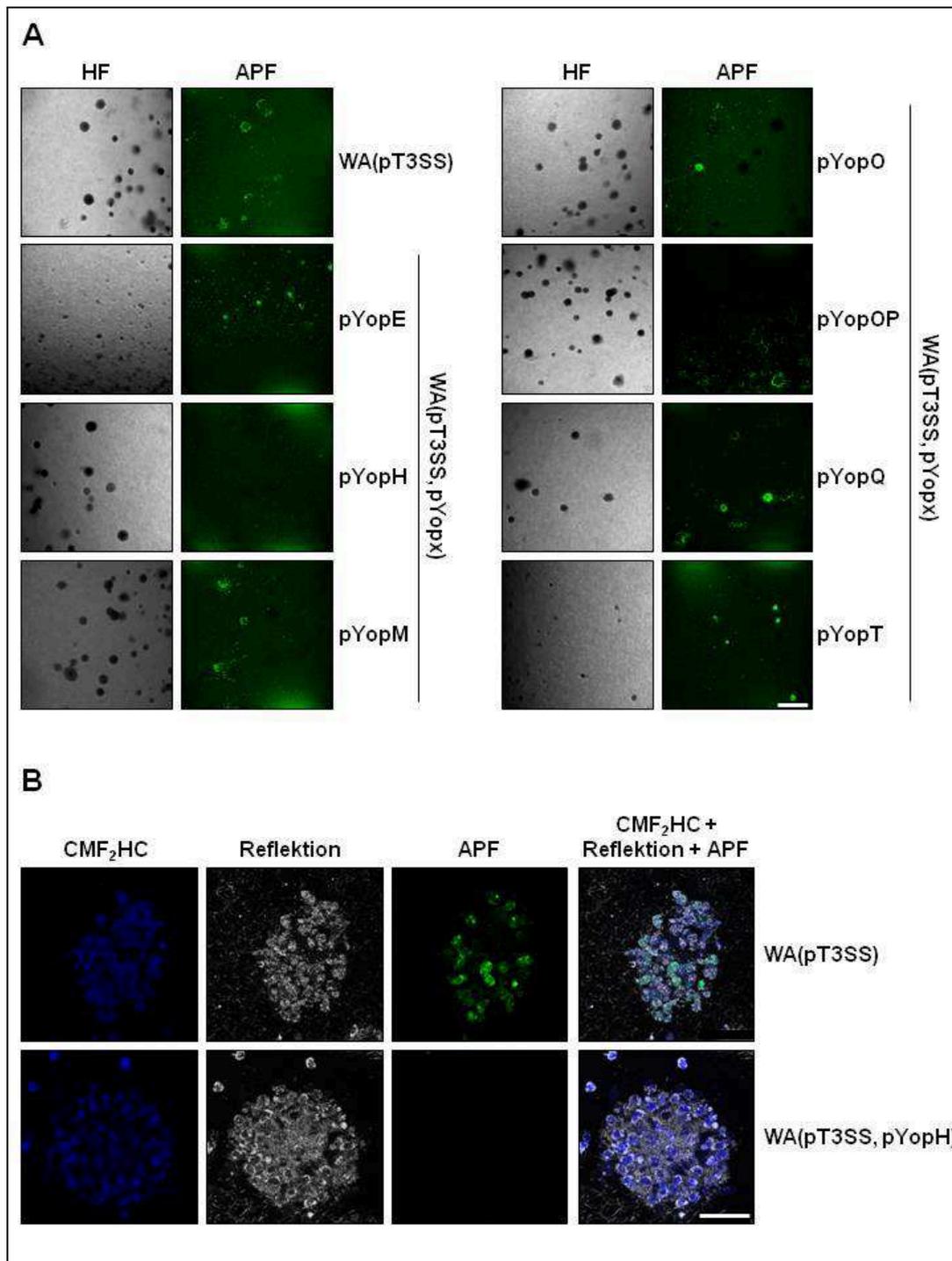


Abb. 3.35 ROS-Produktion von humanen PMNs nach Interaktion mit Mikrokolonien. Konfokal mikroskopische Aufnahmen von *Y. enterocolitica* Mikrokolonien in einem Doppelschichtmatrixsystem. Das untere 3D-KoG enthält 5×10^4 Bakterien in 60 μ l Kollagenlösung. Inkubation bei 37°C mit 5% CO₂ 16 h. Das obere Gel enthält 5×10^5 hB-PMNs gefärbt mit 1 μ M CMF₂HC (blau) und 10 μ M APF in 100 μ l Kollagenlösung. ROS-Produktion (grün) der hB-PMNs detektiert durch APF nach ca. 1 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. (A) Interaktion von hB-PMNs mit Mikrokolonien der WA(pT3SS, pYopX). Gezeigt sind Mikrokolonien invadiert mit hB-PMNs. (B) Detailansicht invadierter Mikrokolonien. Mikrokolonien mit WA(pT3SS, pYopH) zeigen keine ROS produzierenden humanen PMNs. Der Größenbalken entspricht (A) 250 μ m und (B) 25 μ m.

4 Diskussion

Polymorphkernige Neutrophile (PMNs) sind ein essentieller Teil des menschlichen, angeborenen Immunsystems. Sie werden aus dem Blutkreislauf oder aus Reserven im Knochenmark durch Chemokine und Entzündungsmediatoren rekrutiert und zum bakteriellen Infektionsherd gelenkt. Dort spielen sie als erste Immunzellen eine entscheidende Rolle bei der Eindämmung von Infektionen, in dem sie Bakterien phagozytieren und eliminieren. Um Erreger effizient abtöten zu können, produzieren Neutrophile im Phagosom und Phagolysosom reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Nauseef, 2007). Die Relevanz von ROS für die Infektionsabwehr spiegelt anschaulich eine genetische Störung wieder, wie sie sich in der Krankheit CGD („*chronic granulomatous disease*“) manifestiert. Ursache für diese Erkrankung sind Defekte in Genen, die für Komponenten der NADPH-Oxidase kodieren und zu deren Funktionsverlust führen. Dies bedeutet, dass Neutrophile der CGD-Patienten keine ROS bilden können, was den charakteristischen Verlauf dieser Krankheit erklärt, bei der sich pathogene Bakterien und Pilze ohne medikamentöse Behandlung ungehindert im Körper ausbreiten können und lebensbedrohliche Infektionen hervorrufen (Roos *et al.*, 1996). Die Phagozytose von Bakterien durch Neutrophile wird meist effizient über Rezeptoren initiiert, die die Antikörper- oder Komplement-opsonierte Oberfläche der Erreger erkennen. Während der Phagozytose führt die Bindung an diese Rezeptoren zur Initiierung diverser Signalwege, welche die für die Assemblierung der NADPH-Oxidase an der Phagosom- und Plasmamembran von PMNs einschließt. Die darauffolgende Aktivierung der NADPH-Oxidase führt zunächst zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxid und nachfolgend zu Wasserstoffperoxid durch die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) oder hypochlorigen Säuren durch die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) (Nathan, 2006). Der kumulative Effekt der neutrophilen ROS und weiterer bakterizider Granulabestandteile reicht aus, um viele Erreger abzutöten. Obligat pathogene Erreger haben deshalb Strategien entwickelt, um die Neutrophilenbakterizide zu unterlaufen. Pathogene Yersinien injizieren mittels eines T3SS Effektorproteine (Yops), die die Phagozytose und ROS-Produktion inhibieren. In welcher Weise Yops die Produktion von ROS in PMNs hemmen ist im Gegensatz zur Phagozytose nicht genau bekannt. Frühere Publikationen zeigen lediglich die Relevanz des pYV-Plasmids für die Inhibition der ROS-Produktion (Lian und Pai, 1985; Hartland *et al.*, 1994; Spinner *et al.*, 2008). Weitere Arbeiten heben YopE (Ruckdeschel *et al.*, 1996; Songsunthong *et al.*, 2010) und YopH (Green *et al.*, 1995; Bliska and Black, 1995; Ruckdeschel *et al.*, 1996; Visser *et al.*, 1999) als wichtige Effektoren hervor. Jedoch ist nicht

bekannt welche Rolle sie dabei auf molekularer Ebene spielen und welche Yops einen besonderen Anteil an der Hemmung der ROS-Produktion haben.

4.1 Evaluierung der Agenzien zum Nachweis der ROS-Produktion

In früheren Studien mit *Yersinia spp.* wurden drei Reagenzien zum Nachweis der ROS-Produktion von Neutrophilen bzw. Makrophagen verwendet. Dazu zählt das kolorimetrische Substrat Zytochrom c (Hartland *et al.*, 1994; Green *et al.*, 1995; Visser *et al.*, 1999), das chemiluminometrische Substrat Luminol (Lian und Pai, 1985, Bliska und Black, 1995; Ruckdeschel *et al.*, 1996; Paauw *et al.*, 2009; Songsunthong *et al.*, 2010) und das fluorimetrische Substrat DCFH (2',7'-Dichlorodihydrofluoreszein) (Spinner *et al.*, 2008; Spinner *et al.*, 2010). Die Wahl eines optimalen Substrates zum ROS-Nachweis ist schwierig, da verschiedene Faktoren berücksichtigt werden müssen. Die Methode sollte (a) für die zu detektierenden ROS spezifisch und sensitiv sein, (b) das Substrat sollte chemisch gut charakterisiert, nicht-toxisch und sehr reaktiv bei niedrigen Konzentrationen sein, (c) es ist wichtig zu wissen, ob extra- oder intrazelluläre ROS detektiert werden sollen, (d) das Substrat sollte chemisch-, thermo- und photostabil sein und (e) entstehende Artefakte sollten ausgeschlossen werden können (Freitas *et al.*, 2009). Da kein erhältliches Substrat alle Kriterien erfüllt, wurden zwei sich ergänzende Substrate (APF (*p*-Aminophenyl-3'-Fluoreszein) und Luminol) verwendet. Um die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit früheren Studien vergleichen zu können, wurde zunächst das gut charakterisierte Luminol (Allen und Loos, 1976) ausgewählt. Luminol detektiert ein breites Spektrum von intra- und extrazellulären ROS ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , $HOCl$, $^{\cdot}NO$, $ONOO^-$) und weist eine hohe Sensitivität auf. Kolorimetrische Reagenzien, wie Zytochrom c, haben eine geringe Sensitivität verglichen mit fluorimetrischen und luminometrischen Methoden und sind sehr Artefaktanfällig (Freitas *et al.*, 2009). Das fluorimetrische Substrat DCFH ist leicht autooxidierbar, detektiert ausschließlich extrazelluläre ROS (H_2O_2 , HO^{\cdot} , $^{\cdot}NO$, $ONOO^-$) und dies nur in Abhängigkeit einer Peroxidaseaktivität (LeBel *et al.*, 1992, Bonini *et al.*, 2006). Als zweites Reagenz wurde, APF eingesetzt, welches im Gegensatz zu DCFH nicht Licht sensitiv ist und die Zytoplasmamembran durchdringt (Setsukinai *et al.*, 2003). Die reduzierte APF-Form fluoresziert nicht. Erst nach Oxidation mit intrazellulären, sehr reaktiven ROS (HO^{\cdot} , $ONOO^-$, $HOCl$) konvertiert es zu fluoreszierendem Fluoreszein. Dieses Substrat macht es möglich die Fluoreszenz sowie dessen Intensität auf Einzelzellniveau in einer FACS-Analyse zu bestimmen und mikroskopisch zu beobachten (Abb. 4.1). Neutrophile, die mit unterschiedlichen *Y. enterocolitica* Mutanten infiziert wurden, zeigten Fluoreszein in einzelnen Granula bzw. Vesikeln und vor allem in Bakterien-enthaltenden Phagolysosomen.

Die Oxidation von Luminol durch ROS führt zu einem energiereichen, Elektron-angeregten Aminophthalatanion. Dieses emittiert Licht, wenn es in seinen energiearmen Ausgangszustand zurückkommt. Somit eignet sich Luminol dazu, Kinetiken der ROS-Produktion aufzunehmen, welche die produzierte ROS-Menge zu bestimmten Zeitpunkten wiedergibt. Im Falle von APF zeigt eine Kinetik die integrierte Zunahme der intrazellulären ROS. Äquivalentes, einmal umgesetztes APF akkumuliert in der intakten Zelle als Fluoreszein und kann diese durch Diffusion oder aktiven Efflux über die Membran verlassen.

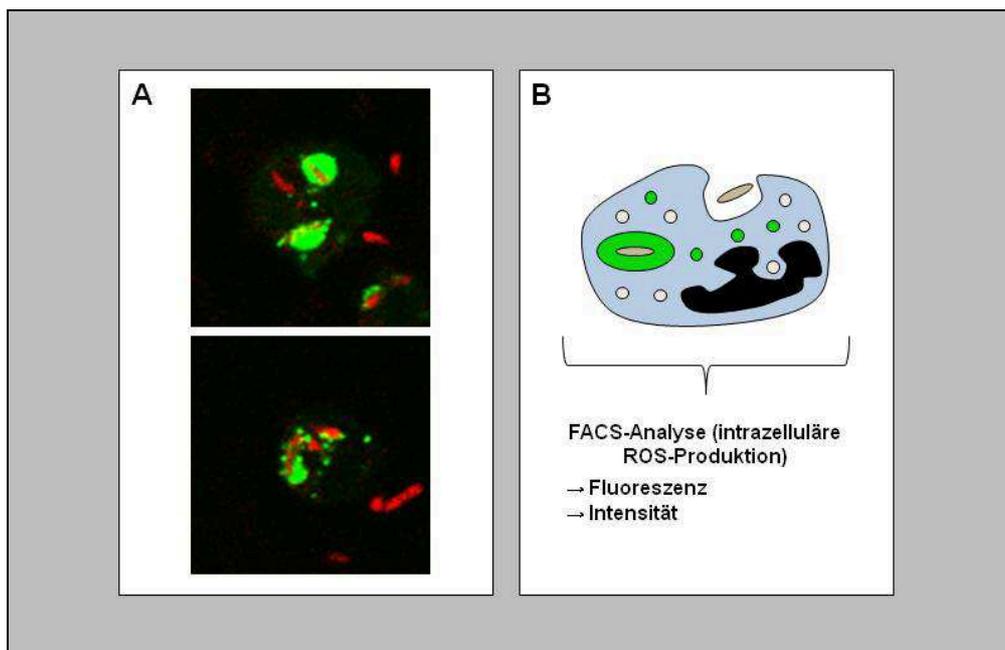


Abb. 4.1 Nachweis intrazellulärer ROS-Produktion in PMNs. (A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen humaner Neutrophiler inkubiert mit 10 μ M APF und infiziert mit WA(pYV Δ lcrD, pRFP) MOI10 für 30 min. (B) Schematische Darstellung eines mit APF-beladenen humanen PMN, infiziert mit *Y. enterocolitica*. Die intrazelluläre ROS-Produktion von Neutrophilen kann mit APF nachgewiesen werden. Wird APF durch hoch reaktive Sauerstoffspezies (OCl , $\bullet\text{OH}$ und ONOO) oxidiert, entsteht Fluoreszein. Der Prozentsatz an Fluoreszein-positiven Zellen einer Zellpopulation, sowie die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle kann im FACS analysiert werden. Mikroskopische Untersuchungen zeigen Fluoreszein (grün) im Phagolysosom, wie in einzelnen Granula bzw. Vesikeln, der infizierten PMNs.

4.2 Einfluss der Yop-Effektoren auf die ROS-Produktion

Typ 3 Sekretionssysteme (T3SSs) wirken als Injektisom Gram-negativer Bakterien, die Effektorproteine aus dem bakteriellen Zytosol in Wirtszellen translozieren (Gophna *et al.*, 2003). Diese Effektorproteine können Wirtsproteine, die an Signalprozessen und Zytoskelettlagerungen beteiligt sind, modulieren (Mattoo *et al.*, 2007). *Y. enterocolitica* exprimiert ein Plasmid-kodiertes T3SS (Portnoy *et al.*, 1981), welches *in vivo* mindestens sechs Effektorproteine (YopE, YopH, YopM, YopO, YopP und YopT) in Immunzellen (Neutrophile, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen) injiziert (Marketon *et al.*, 2005; Koberle *et al.*, 2009; Durand *et al.*, 2010), die die Etablierung einer Infektion ermöglichen. Wichtig hierbei ist die Unterdrückung der ROS-Produktion neutrophiler Phagozyten, welche als erste Immunzellen am Infektionsherd eintreffen. In dieser Arbeit konnte nicht nur die bereits bekannte Rolle von YopH und YopE (Bliska und Black, 1995; Green *et al.*, 1995; Ruckdeschel *et al.*, 1996; Songsunghong *et al.*, 2010) in der Unterdrückung der ROS-Produktion bestätigt, sondern auch weitere Effektoren, wie YopP und YopQ identifiziert werden. Zudem konnte die Effektstärke der einzelnen Yops für humane Blut-PMNs (hB-PMNs) und Proteosepepton-rekrutierte Neutrophile aus dem Peritonealraum von Mäusen (mPEPNs) verglichen werden. YopH, YopP und YopQ zeigten in hB-PMNs einen starken inhibierenden Effekt hinsichtlich der APF-detektierten ROS-Produktion, wobei für YopE ein moderaterer Effekt und für YopM, YopO und YopT kein Effekt beobachtet werden konnte. In mPEPNs zeigte YopH den im Vergleich zu anderen Yops stärksten inhibierenden Effekt auf die ROS-Produktion. Interessanterweise konnte dieser inhibierende Effekt in murinen Knochenmarks-PMNs (BM-PMNs) nicht gesehen werden. Insgesamt zeigten YopE und YopH in murinen PMNs (mPEPN und BM-PMNs) einen stärkeren inhibierenden Effekt, als YopP und YopQ und zusätzlich konnte ein leichter Effekt für YopT und kein Effekt für YopM und YopO nachgewiesen werden. Um mögliche Angriffspunkte der einzelnen Yops in der Unterdrückung der APF-detektierten ROS-Produktion diskutieren zu können, soll auf schon vorhandene Literaturdaten zurückgegriffen werden. YopQ (YopK in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*) wird nicht als typisches Effektorprotein angesehen (Straley und Bowmer, 1986; Mulder *et al.*, 1989; Holström *et al.*, 1995), sondern soll an der YopB/YopD-Translokationspore die Translokationsrate der Yops regulieren (z.B durch Regulation des Porendurchmessers) (Holmström *et al.*, 1997; Dewoody *et al.*, 2011). Gemäß diesem Modell könnte erwartet werden, dass eine Infektion von Neutrophilen mit *yopQ*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp WA(pYV) zwar den gleichen Prozentsatz an fluoreszierenden PMNs jedoch mit einer geringeren Fluoreszenzintensität zur

Folge hat, da durch die größere Pore eine größere Menge an translozierten Yops eine stärkere Unterdrückung der ROS-Produktion bedingt (Holmström *et al.*, 1997; Rüssmann *et al.*, 2003). Jedoch wurde in dieser Arbeit eine stärkere ROS-Produktion für die YopQ-Mutante detektiert. Das YopK zur Virulenz in *Y. pseudotuberculosis* beiträgt zeigen Infektionsversuche, in denen die Relevanz von YopK für systemische Infektionen in Mäusen beschrieben wird (Holmström *et al.*, 1995). Außerdem wurde publiziert, dass YopK die T3SS-induzierte Aktivierung des NLRP3- bzw. NLRC4-Inflammasoms verhindert (Brodsky *et al.*, 2010). Da die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch ROS induziert werden kann (Dostert *et al.*, 2008), könnte YopQ bei *Y. enterocolitica* durch Inhibierung der ROS-Produktion die Ausbildung eines Inflammasoms verhindern.

Als Reaktion auf PAMPs, wie zum Beispiel LPS oder Flagellin, werden in Phagozyten multiple MAPK- und NF κ B-Signalwege angeschaltet, welche zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-12 und IL-18, und zum „*priming*“ bzw. zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führen. Die translozierten Yops der *Yersinia spp.* interferieren mit diesen Signalwegen (Shao, 2008; Viboud und Bliska, 2005; Trosky *et al.*, 2008), wie z.B. YopP/J Serin- und Threonin-Reste von MKKs und IKKs azetyliert (Mukherjee *et al.*, 2006; Mittal *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2008). Diese Modifizierung blockiert die Phosphorylierung der Serin-/Threoninreste dieser Kinasen. Es ist wahrscheinlich, dass durch die Blockierung der MAPK-Signalwege das „*priming*“ und die Aktivierung der NADPH-Oxidase blockiert werden. Zudem könnte eine Azetylierung von Serin-/Threoninresten von NADPH-Oxidase-Untereinheiten eine Phosphorylierung und eine Rekrutierung an die Membran verhindern. Folglich würde es dadurch zur Inhibition der ROS-Produktion kommen.

YopH ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die mehreren Signalwegen entgegenwirkt und damit verschiedene Phagozytosewege inhibiert. Einerseits kolokalisiert YopH mit fokalen Adhäsionskomplexen und dephosphoryliert ihre Komponenten wie FAK, Cas und Paxillin (Persson *et al.*, 1999; Black *et al.*, 1998). Diese Proteine sind in der β_1 -Integrin-vermittelten Phagozytose von Yersinien beteiligt, welche durch die direkte Interaktion mit Invasin oder indirekt über Brückenproteine wie z.B. Fibronectin und YadA zustande kommt. Dies wurde jedoch bisher nur an Epithelzellen gezeigt (Isberg und Leong, 1990; Heise und Dersch, 2006). Andererseits kann YopH ebenso die Fc-Rezeptor- und Komplement-Rezeptor-vermittelte Phagozytose verhindern, indem es die fokalen Adhäsionsprotein-assoziierten Proteine Cas, SKAP-HOM, Fyb und das FAK-homolog Pyk2 dephosphoryliert (Fällman *et al.*, 1995; Ruckdeschel *et al.*, 1996). Da mit der APF-Methode nur intrazelluläre ROS-Produktion

ermittelt werden kann und mikroskopische Untersuchungen gezeigt haben, dass Fluoreszein in Phagolysosomen und in Granula bzw. Vesikeln detektiert worden ist, hat eine unterschiedliche Phagozytoserate unweigerlich eine Auswirkung auf die Menge der intrazellulär gebildeten ROS bzw. APF-Fluoreszeinintensität. Außerdem könnte eine durch YopH vermittelte Dephosphorylierung von Proteinen, die in Signalwegen zum „*priming*“ bzw. zur Aktivierung der NADPH-Oxidase beitragen, eine Rolle spielen (z.B. das Rac-GEF Vav, das durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert wird).

Die Phagozytose von Bakterien erfordert auch die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Dieser Prozess wird über RhoGTPasen reguliert (Barbieri *et al.*, 2002). Da in dieser Arbeit keine Opsonisierung der Bakterien vorgenommen wurde, könnte die Aufnahme von *Y. enterocolitica* durch Neutrophile über β_1 -Integrine vermittelt werden. Im Falle von β_1 -Integrinen stellt Invasin oder an extrazelluläre Matrix gebundenes YadA den Liganden dar (Isberg und Leong, 1990; Heise und Dersch, 2006). Ob β_2 -Integrine bei der Phagozytose von nicht opsonierten Yersinien eine Rolle spielen wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Lamellipodien und Membranprotrusionen umgeben Yersinien bei einer Aufnahme durch β_1 -Integrine, deren Ausbildung durch Rac1 induziert wird (Etienne-Manneville und Hall, 2002). YopE, YopT und YopO interagieren mit RhoGTPasen auf unterschiedliche Art und Weise. YopE imitiert eine GAP- („*GTPase activating protein*“) Funktion und deaktiviert bevorzugt RhoG, in dem es die Hydrolyse von GTP zu GDP katalysiert (Black und Bliska, 2000; Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Roppenser *et al.*, 2009; Songsunghong *et al.*, 2010). Damit könnte es zur fehlenden Aktivierung von Rac1/2 kommen. Die Cysteinprotease YopT disloziert RhoA von der Plasmamembran zum Zytoplasma, in dem es den für die Membranverankerung wichtigen C-terminalen Isoprenoidrest spaltet (Shao *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 2003). Die Serin/Threoninkinase YopO bindet und inhibiert insbesondere Rac1 und weniger RhoA über eine Domäne, die strukturell RhoGDIs („*guanine nucleotide dissociation inhibitor*“) ähnelt (Prehna *et al.*, 2006; Groves *et al.*, 2010). Alle drei Yops spielen bei der Inhibition der Phagozytose eine entscheidende Rolle, wobei YopH den größten Effekt zeigt, gefolgt mit abnehmender Inhibitionsaktivität von YopE, YopT und YopO (Grosdent *et al.*, 2002). Im Bezug auf die Inhibition der ROS-Produktion dieser Yops wurde für humane PMNs nur ein geringer Effekt für YopE und für murine PMNs für YopE und YopT beschrieben. Das bedeutet, dass die Stärke der Inhibition der Phagozytose und die Stärke der Inhibition der ROS-Produktion durch bestimmte Yops nicht zwingend korrelieren müssen. Bei murinen Neutrophilen scheint ein größerer Zusammenhang zwischen Phagozytose und ROS-Produktion zu bestehen, da Yops, die die Phagozytose unterdrücken, einen stärkeren

Effekt auf die Menge der produzierten ROS ausüben, als bei humanen Neutrophilen. Dies könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass murine PMNs keine intrazellulären Speicher an NADPH-Oxidase Komponenten besitzen (Follin *et al.*, 1991; Bylund *et al.*, 2003). Sind NADPH-Oxidasen nur an der Plasmamembran vorhanden, könnten ROS nur in Phagosomen, jedoch nicht in Granula gebildet werden. Dass mPEPNs stärker für eine YopH-Inhibition der ROS-Produktion empfänglich sind als BM-PMNs, könnte an einer erhöhten Phagozytoserate mPEPNs liegen. Plausibel wäre eine verstärkte Rezeptorexposition auf der Oberfläche der mPEPNs verursacht durch ein vorangegangenes „*priming*“ durch proinflammatorische Mediatoren oder Extravasation. Der geringe YopT-Effekt in der Inhibition der ROS-Produktion könnte damit erklärt werden, dass dieser Effektor vorzugsweise den Prenylrest von RhoA spaltet. RhoA ist wichtig für die Komplement-Rezeptor-vermittelte Phagozytose, während Rac1 unabdinglich für die Fc-Rezeptor- und β_1 -Integrin-vermittelte Phagozytose ist (Dupuy und Caron, 2008; Alrutz *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2006; Lowell *et al.*, 2005). Wäre eine Komplement-unabhängige Phagozytose über $\alpha\beta_2$ -Integrine der Grund für einen YopT-Effekt in murinen PMNs, würde er jedoch in diesem Fall eine untergeordnete Rolle spielen. Für YopO wurde gezeigt, dass es die Fc-Rezeptor- und β_1 -Integrin-vermittelte Phagozytose in Makrophagen inhibiert (Groves *et al.*, 2010). Erstaunlicherweise hat YopO trotzdem keine Auswirkung auf die Inhibition der ROS-Produktion in murinen und humanen Neutrophilen. Dies könnte bedeuten, dass YopO zwar Rac1 jedoch nicht Rac2, dessen Expression auf hämatopoetische Zellen restringiert ist, deaktivieren kann. Humane Neutrophile besitzen unterschiedliche Rac-Isoformen, wobei Rac2 98 % und Rac1 2 % der Gesamt-Rac-Population ausmacht (Knaus *et al.*, 1992). Rac2 ist in seiner Aminosäuresequenz zu 92 % homolog zu Rac1 (Gu *et al.*, 2003) und in PMNs wichtig für die Degranulierung, Chemotaxis, Aktinassemblierung und ROS-Produktion (Yang *et al.*, 2000; Gu und Williams, 2002; Yamauchi *et al.*, 2004; Yamauchi *et al.*, 2005). Nach Dissoziation von RhoGDI inseriert Rac2 in die Membran und wird mittels GEF mit GTP beladen und aktiviert. Dort bindet es mit seiner Effektorregion an p67phox in einer 1:1 Stöchiometrie (Sheppard *et al.*, 2005) und trägt zu einer funktionsfähigen NADPH-Oxidase bei. YopE von *Y. pseudotuberculosis* inaktiviert Rac2 und hat damit einen negativen Effekt auf die ROS-Produktion (Songsunthong *et al.*, 2010). Die Polyubiquitinierung an Lysin-75 markiert das *Y. enterocolitica* YopE für den Abbau durch das Wirtszellproteasom (Ruckdeschel *et al.*, 2006). Dies könnte zu einer Reaktivierung von Rac2 führen und den geringen Effekt von *Y. enterocolitica* YopE in der Inhibition der ROS-Produktion in humanen PMNs erklären. Im Vergleich hierzu hat das YopE von *Y. pseudotuberculosis* im N-terminalen Bereich kein Lysin, was den proteasomalen

Abbau verzögern und die YopE Wirkung verstärken sollte. Da in murinen PMNs noch der Phagozytoseeffekt hinzukommt ist der YopE-Effekt größer. YopP scheint als einziges Yop einen Phagozytose-unabhängigen Effekt auf die ROS-Produktion von murinen und humanen PMNs zu haben.

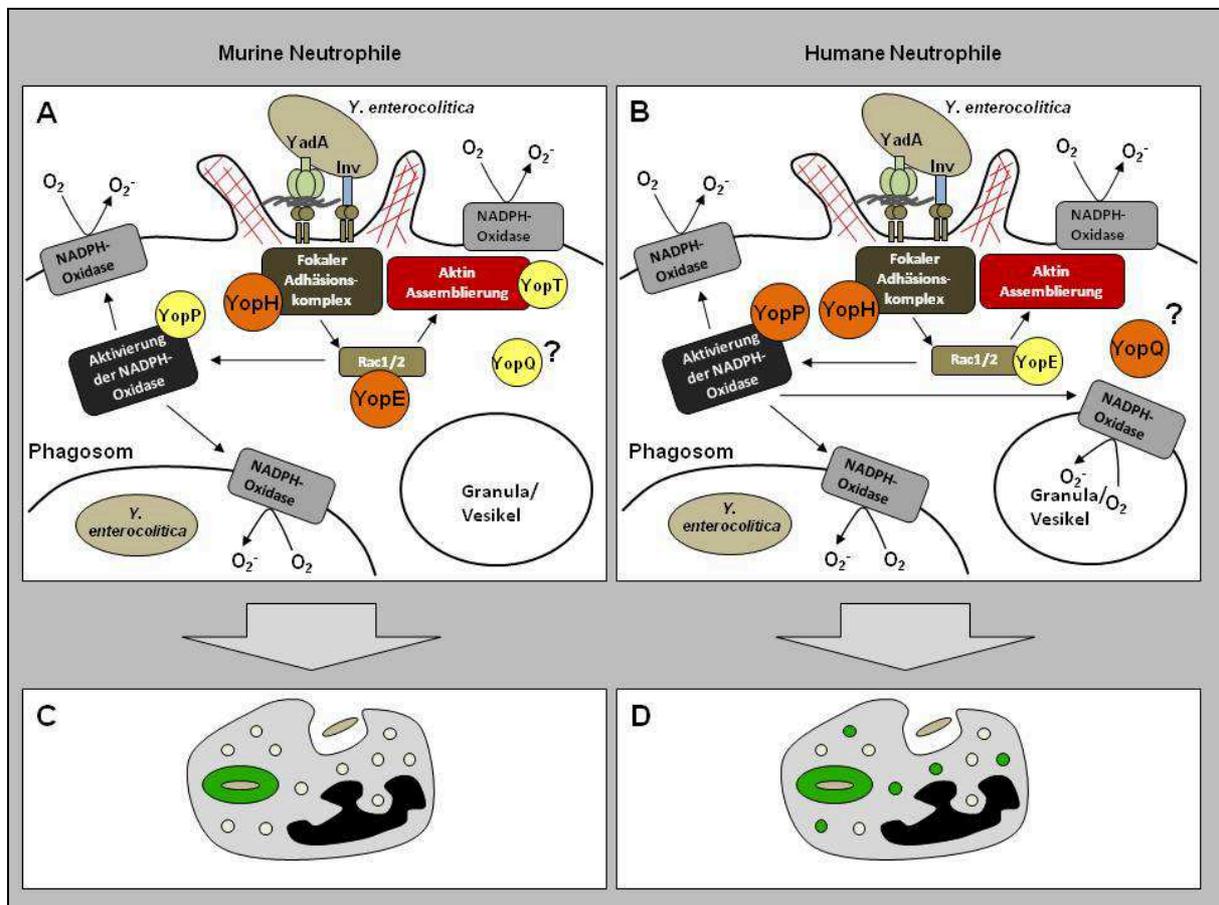


Abb. 4.2 Model zur Korrelation von Phagozytose und ROS-Produktion. *Y. enterocolitica* interagiert wahrscheinlich mit Neutrophilen entweder direkt über Invasin (Inv) oder indirekt über YadA und extrazelluläre Matrixkomponenten (z.B. Fibronectin) mit β -Integrinen. Dies würde zur Induktion mehrerer Signalwege innerhalb der PMNs führen, welche in Phagozytose, Aktivierung der NADPH-Oxidase und Zytokinproduktion resultieren. Yops können die Signalweiterleitung stören, indem sie verschiedene Wirtsproteine modifizieren oder ihren Aktivitätsstatus verändern. (A) Murine Neutrophile haben keine intrazellulären NADPH-Speicher im Gegensatz zu (B) humanen Neutrophilen. Somit hat die Phagozytose für die Menge an produzierten ROS bei murinen PMNs eine größere Relevanz. Dadurch haben Yops, die die Phagozytose unterdrücken, bei murinen PMNs einen größeren Einfluss auf die ROS-Produktion als bei humanen PMNs. Yops mit großem Effekt (orange) und Yops mit geringem Effekt (gelb) auf die Menge an produzierten ROS. (C und D) Schematische Darstellung eines (C) murinen und (D) humanen PMNs, der mit APF beladen und mit *Y. enterocolitica* infiziert wurde. Bei (C) ROS-Produktion nur in Phagolysosom, bei (D) auch in sekundären und tertiären Granula und Vesikeln nachweisbar.

4.3 Rezeptoren und Signalkaskaden, die zum „*priming*“ und zur Aktivierung der ROS-Produktion in Neutrophilen führen

Die Erkennung von Bakterien durch Neutrophile wird meist effizient über Rezeptoren initiiert, welche PAMPs oder die Antikörper- bzw. Komplement-opsonierte Oberfläche der Erreger erkennen und diverse Signalwege innerhalb der Wirtszelle aktivieren, welche zu einer proinflammatorischen Immunantwort und zur Beseitigung der Erreger führen. Virulente Bakterien können meist gezielt Wirtszelloberflächenproteine binden, um daraufhin bestimmte Zellen zu manipulieren und die Immunabwehr zu modulieren. Für *Y. enterocolitica* ist eine Adhäsion essentiell, um Yops in das Zytosol von Wirtszellen zu injizieren (Grosdent *et al.*, 2002; Mejia *et al.*, 2008). Es befinden sich mehrere Proteine auf der Yersinienzelloberfläche, welche zu einer Wirtszell-Erreger-Interaktion beitragen bzw. von Bedeutung sein könnten. Das Proteinpolymer Myf bildet eine fibrilläre Struktur auf der Bakterienoberfläche (Iriarte *et al.*, 1993) und wurde bisher nur bei pathogenen *Y. enterocolitica* Serotypen gefunden (Diaz *et al.*, 1985, Toyos *et al.*, 1986), wobei sein Beitrag zur Virulenz noch nicht geklärt ist. Desweiteren exponiert *Y. enterocolitica* zwei Adhäsine auf der äußeren Membran, Invasin und YadA. Beide Moleküle führen zu einer engen Wirtszell-Erreger-Interaktion, indem sie mit β 1-Integrinen interagieren (Isberg und Leong, 1990). Im Falle von Invasin, bedeutet dies eine direkte Bindung an β 1-Integrine und für YadA eine indirekte Bindung über eine extrazelluläre Matrixbrücke (z.B. Fibronectin) (Isberg *et al.*, 2000, Eitel und Dersch, 2002, Heise und Dersch, 2006). Beide Adhäsine initiieren eine schnelle Internalisierung der Erreger über einen „*zipper*“-ähnlichen Mechanismus und die Produktion von Chemokinen (Dersch und Isberg, 1999, Uliczka *et al.*, 2009). Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Integrinen mit einer erhöhten ROS-Produktion verbunden ist (Svineng *et al.*, 2008). Durch die gezielte Blockierung mit Antikörpern von entweder β 1- oder β 2-Integrinen auf der PMN-Oberfläche konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die ROS-Produktion nach Stimulation mit der sekretionsinhibierten, nicht opsonisierten *Y. enterocolitica* Mutante (WA(pYV Δ lcrD)) in beiden Fällen um ca. 40 % reduziert wird. Wurden beide β 1- und β 2-Integrine gleichzeitig blockiert, konnte eine Reduktion der ROS-Produktion um 50 % beobachtet werden. Somit wird in vorliegender Arbeit zum ersten Mal die hohe Relevanz von β 1- und β 2-Integrinen für die Aktivierung der ROS-Produktion in humanen Neutrophilen durch *Y. enterocolitica* beschrieben. Das bakterielle Adhäsin für β 2-Integrine ist für *Y. enterocolitica* nicht bekannt. Möglich wäre, dass Inv und YadA nicht nur β 1- sondern auch β 2-Integrine binden. Versuche mit Adhäsinmutantenstämmen ergaben, dass von Seiten der Yersinien YadA maßgeblich an

der Induktion der ROS-Produktion in humanen und murinen PMNs beteiligt ist. Inv spielt hierbei eine untergeordnete und Myf keine Rolle. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits publizierte Relevanz von YadA und Inv in der Aktivierung der ROS-Produktion (Ruckdeschel *et al.*, 1996). Es wurde berichtet, dass Inv wie auch YadA zu einer Anhäufung („*clustering*“) der Integrinrezeptoren führen, die entscheidend für die Rekrutierung von nicht-Rezeptor Proteinkinasen wie FAK und Pyk2, Src Kinasen und Adaptermolekülen, wie Cas und Crk ist. Dieser Multiproteinkomplex wird als fokaler Adhäsionskomplex bezeichnet. Er verbindet das Zytoskelett der Wirtszelle mit den Integrinrezeptoren und ist verantwortlich für die Signalweiterleitung ins Zellinnere (Alrutz und Isberg, 1998; Weidow *et al.*, 2000, Bruce-Staskal *et al.*, 2002, Owen *et al.*, 2007). Dies führt zur Aktivierung einer Rac1-abhängigen Signalkaskade. Rac1 ist ein Mitglied der RhoGTPasen Familie, die eine Vielzahl von typischen Aktinumlagerungen induziert. Außerdem wurde beschrieben, dass PI3K über einen FAK-, Src- und Ras-abhängigen Prozess aktiviert wird und ebenso notwendig für die Yersinien Aufnahme ist (Eitel und Dersch, 2002; Eitel *et al.*, 2005). PI3K phosphoryliert PIP2 (Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat) zu PIP3 (Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-triphosphat) an der Innenseite der Zytoplasmamembran (Takenawa und Itoh, 2001), was Kinasen, wie Akt an die Membran rekrutiert und zu deren Aktivierung führt. PI3K kann PLC γ auch direkt aktivieren (Bae *et al.*, 1998; Falasca *et al.*, 1998; Gratacap *et al.*, 1998; Rameh *et al.*, 1998). Zusätzlich zeigen Uliczka *et al.*, 2009, dass PKC α und PKC β auch über β 1-Integrine aktiviert werden und zur Aufnahme von Yersinien in die Zelle beitragen. Viele der für die β 1-Phagozytose wichtigen zentralen Proteinkinasen (PKC, PI3K), wie auch Phospholipasen (PLC), sind ebenso ausschlaggebend für die Aktivierung der NADPH-Oxidase und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Sheppard *et al.*, 2005). In wie fern verschiedene Signalwege die ROS-Produktion beeinflussen, konnte über direkte Blockierung/Inhibition ausgesuchter an der Signalkaskade beteiligter Proteine bzw. Proteinfamilien und die anschließende Infektion mit einer sekretionsdefekten *Y. enterocolitica* Mutante (WA(pYV Δ lcrD)) untersucht werden. Auch an dieser Stelle kann bestätigt werden, dass die Aktivierung der ROS-Produktion zu einem Großteil über β _{1/2}-Integrine abläuft. Dies wird an der Inhibition der Tyrosinkinase Syk verdeutlicht, welche zu einer 50%igen Reduktion des ROS-Signals führt. Syk besteht aus zwei SH2 („*src homology 2*“) Domänen, die phosphorylierte ITAM („*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*“) Sequenzen binden und einer Tyrosinkinasedomäne (Jakus *et al.*, 2007). Diese Domänen nehmen eine zentrale Rolle in der β 1- und β 2-vermittelten Signalweiterleitung in Neutrophilen ein (Lin *et al.*, 1995). Die Syk-Phosphorylierung scheint unabhängig von der Reorganisation des

Zytoskeletts und der Aktivierung von FAK zu sein (Clark *et al.*, 1994, Lin *et al.*, 1995, Yan *et al.*, 1997), und stellt somit einen eigenständigen, weiteren Integrin-Signalweg dar (Miranti *et al.*, 1998). Es wird vorgeschlagen, dass ITAM-tragende Adaptoren in der Signalweiterleitung partizipieren (Mócsai *et al.*, 2006) oder der zytoplasmatische Integrinabschnitt direkt mit Syk interagiert (Woodside *et al.*, 2001). Die Aktivierung von Syk führt zur Phosphorylierung von SLP-76, Vav und PLC γ Isoformen in hämatopoetischen Zellen (Jakus *et al.*, 2007). PLC γ kann direkt über PI3K stimuliert werden. Wird PI3K durch Wortmannin inhibiert, können nur noch 23 % der üblich produzierten ROS-Menge gebildet werden. Einerseits kann PI3K durch die Signalinitiierung von β -Integrinen andererseits durch 7-transmembrane, heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Bastian *et al.*, 2006). Zu letzteren zählt der fMLP- und IL-8 Rezeptor. Da es in einem Infektionsansatz wahrscheinlich ist, dass durch Bakterien fMLP freigesetzt wird, könnte dieser Weg zu einer zusätzlichen Aktivierung von PI3K führen. Eine weitere Rezeptorfamilie, welche zur Erkennung von Yersinien durch Neutrophile beiträgt, sind die TLRs. In dieser Arbeit wurden TLR4 als wichtiger Rezeptor in der Aktivierung der NADPH-Oxidase beschrieben. Murine PMNs mit einem TLR4 bzw. MyD88 „knock out“ zeigten eine signifikant geringere ROS-Produktion als PMNs der Referenzmäuse (C57BL/6). TLR4 erkennt Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien und MyD88 fungiert als zytosolisches Adaptermolekül des Rezeptors, welches für die Signalweiterleitung ins Zellinnere entscheidend ist (Akira, 2006). Eine Aktivierung der NADPH-Oxidase wäre über die TLR4 vermittelte Phosphorylierung der MAPKs p38 und Erk1/2 möglich (Sheppard *et al.*, 2005). Wobei die Inhibition dieser MAPKs nach anschließender Stimulation humaner Neutrophiler mit der sekretionsdefekten *Y. enterocolitica* Mutante (WA(pYV Δ lcrD)) im Falle von Erk1/2 keine und von p38 nur eine leichte, jedoch signifikante Reduktion der ROS-Produktion erbrachte. Dies zeigt, dass der Signalweg über p38 zur Aktivierung der NADPH-Oxidase genutzt wird, aber keine dominante Rolle spielt. Werden zentrale Proteine, wie Tyrosin-Proteinkinasen oder Vorgänge, wie die Aktinassemblierung inhibiert, hat dies gravierende Auswirkung auf die ROS-Produktion. Tyrosin-Proteinkinasen werden ubiquitär in einer Vielzahl von Signalwegen eukaryotischer Zellen genutzt und sind somit auch essentiell in der ROS-Produktion. Das „priming“ und die Aktivierung von Neutrophilen gehen mit strukturellen Veränderungen der Zelle einher, bei der eine Reorganisation von Aktin von Bedeutung ist. Das Aktinzytoskelett könnte koordinative Aufgaben in der Assemblierung der NADPH-Oxidase übernehmen, jedoch ist der Mechanismus der Aktivierung der NADPH-Oxidase im Bezug auf die Zytoskelettlagerung nicht vollständig geklärt (Quinn *et al.*, 1989, Morimatsu *et al.*, 1997,

Sheppard *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass zytosolische Komponenten der NADPH-Oxidase mit Aktin-assoziierten bzw. -bindenden Proteinen, wie Coronin, Moesin und Cofilin interagieren (de Hostos *et al.*, 1991; Wientjes *et al.*, 2001; Djafarzadeh und Niggli, 1997; Heyworth *et al.*, 1997).

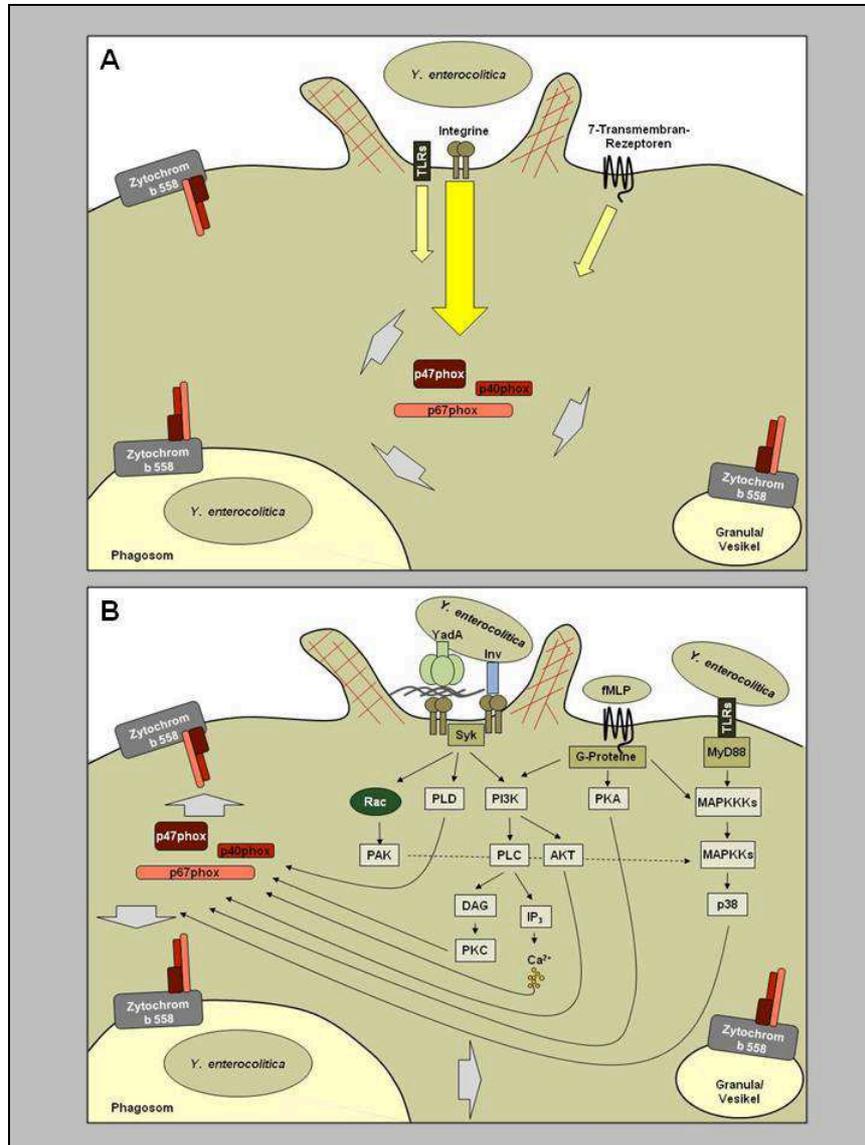


Abb. 4.3 Rezeptoren und Signalkaskaden, die zum „priming“ und zur Aktivierung der ROS-Produktion in Neutrophilen führen. Neutrophile können *Y. enterocolitica* über unterschiedliche Rezeptoren erkennen. Wie hier gezeigt wurde, erfolgt (A) die Aktivierung der NADPH-Oxidase primär über β_1 - und β_2 -Integrine. 7-Transmembran-Rezeptoren (wahrscheinlich fMLPR) und TLRs (TLR4) spielen eine untergeordnete Rolle. (B) Die hier in Frage kommenden Rezeptoren geben Signale über Proteinkinasen (PKC, PKA; MAPKs, AKT, PAK, PI-3K), Phospholipasen (PLC und PLC) oder Kalzium ins Zellinnere weiter, welche in der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies resultieren. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Syk und PI3K eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Yersinien einnehmen, wobei die Signalkaskade über p38 eher einen geringeren Stellenwert besitzt.

4.4 Einfluss der Yops auf die NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox

Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Neutrophile ist abhängig von der Aktivierung der NADPH-Oxidase, einem aus mehreren Komponenten bestehenden, zusammengesetzten Enzymsystem, welches die NADPH-abhängige Sauerstoffreduktion zu Superoxid katalysiert (Chanock *et al.*, 1994; Quinn und Gauss, 2004; Groemping und Rittinger, 2005). In ruhenden/naiven PMNs ist die NADPH-Oxidase inaktiv, und ihre Komponenten befinden sich verteilt an der Zytoplasma-, Vesikel- bzw. sekundären und tertiären Granulamembran und im Zytosol. Werden die Zellen aktiviert, reichern sich die zytosolischen Komponenten (p47phox, p67phox, p40phox und Rac2) an der Membran an, um dort mit den Membran-gebundenen Komponenten des Flavocytochrom b₅₅₈ (gp91phox und p22phox) zu assoziieren (Clark 1990; Quinn *et al.*, 1993; Abo *et al.*, 1994; El Benna *et al.*, 1994). In dieser Arbeit wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht, ob die NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox nach Infektion von Neutrophilen mit verschiedenen *yop*-Deletionsmutanten an die Membran lokalisiert. Diese Studien ergaben, dass YopP und YopH einen stark inhibitorischen, YopM, YopQ und YopE einen mäßig inhibitorischen und YopO und YopT keinen Effekt auf die Membranbindung von p47phox ausüben. Diese Ergebnisse stimmen mit Versuchen in denen die Menge an produzierten ROS durch Neutrophile in Abhängigkeit translozierter Yops untersucht wurde überein. Da die ROS-Produktion der NADPH-Oxidase hoch toxische Wirkungen nicht nur für die Erreger sondern auch für zelleigene Strukturen und benachbartes Gewebe hat, sind strenge Regulationsmechanismen zur Aktivierung des Enzymkomplexes notwendig. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der zytosolischen NADPH-Oxidase-Komponenten ist einer dieser Regulationsmechanismen. Es wurden verschiedene Kinasen beschrieben, welche zur Phosphorylierung von p47phox beitragen (Dang *et al.*, 2006). Die ROS-Produktion durch Neutrophile kann durch „*priming*“ Substanzen (z.B. IL-8, fMLP, etc.) potenziert werden (El Benna *et al.*, 2008), welche keine oder eine schwache ROS-Produktion induzieren, jedoch die Menge an produzierten ROS bei Exposition mit einem zweiten Stimulus erhöhen. Dang *et al.*, 2006 beschreibt, dass die MAPK-Signalwege über p38 und Erk1/2 zu einem „*priming*“ der Neutrophilen beitragen können. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Infektion von humanen PMNs mit der sekretionsdefekten *Y. enterocolitica* Mutante (WA(pYVΔlcrD)) zu einer Phosphorylierung von p38 und Erk1/2 führt, welche Yop-abhängig unterdrückt werden kann. Für die Inhibition des p38-MAPK-Signalwegs wurde YopP identifiziert. Die Beteiligung einer MAPK-Signaltransduktion bei einer Yersinien-Infektion von Makrophagen wurde bereits von Ruckedeschel *et al.*, 1997 beschrieben. Nun konnte

diese Erkenntnis in vorliegender Arbeit erstmals für humane Neutrophile bestätigt werden. Die Stimulation von humanen Neutrophilen führt zur Phosphorylierung von p47phox an seinem C-Terminus an maximal 10 Serinen (El-Benna *et al.*, 2009). Die zielgerichtete Mutagenese von Ser345 und die Verwendung eines kompetitiv-inhibitorischen Peptids für diesen Aminosäureabschnitt, ergaben, dass Ser345 als „*priming*“-Stelle betrachtet werden muss (Dang *et al.*, 2006). Für Infektionsstudien mit *Y. enterocolitica* stellte sich die Frage, ob humane Neutrophile durch die Zugabe der Bakteriensuspension bereits stimuliert werden und ob Yops darauf Einfluss nehmen können. Da YopP in vorliegender Arbeit als Inhibitor des p38-MAPK-Signalwegs beschrieben wurde und Dang *et al.*, 2006 eine Beteiligung dieses Weges beim „*priming*“ von Neutrophilen publizierte, wurde vermutet, dass YopP diese Vorstimulierung unterdrücken kann. Jedoch musste festgestellt werden, dass keines der Yops auf die Phosphorylierung von Ser345 nach 30 minütiger Infektion Einfluss nimmt. Dies bedeutet, dass ein „*priming*“ der NADPH-Oxidase durch Yops innerhalb dieser Infektionszeit nicht unterdrückt wird. Die durchgeführten Kinetiken in dieser Arbeit zeigen, dass ein Yop-Effekt bezüglich der Inhibition der ROS-Produktion bei humanen PMNs ca. nach 5 min bei murinen peritoneal PMNs nach ca. 10 min beobachtet werden kann. Dies spricht dafür, dass es scheinbar zu einer vollständigen Aktivierung der NADPH-Oxidase kommt, bevor Yops ihre Wirkung entfalten können. Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese zeigen in vorliegender Arbeit zum ersten Mal, dass Yops dazu beitragen, dass weniger phosphoryliertes p47phox in Yersinien-infizierten humanen PMNs vorhanden ist. Zudem konnte in fluoreszenzmikroskopischen Studien bei diesen PMNs weniger Membran-lokalisiertes p47phox detektiert werden. Diese Ergebnisse unterstützten die Annahme, dass Yops zur Dephosphorylierung oder zur Inhibition der Rephosphorylierung der NADPH-Oxidase-Komponente p47phox beitragen und auf diesem Weg die Inhibition der ROS-Produktion in Neutrophilen veranlassen.

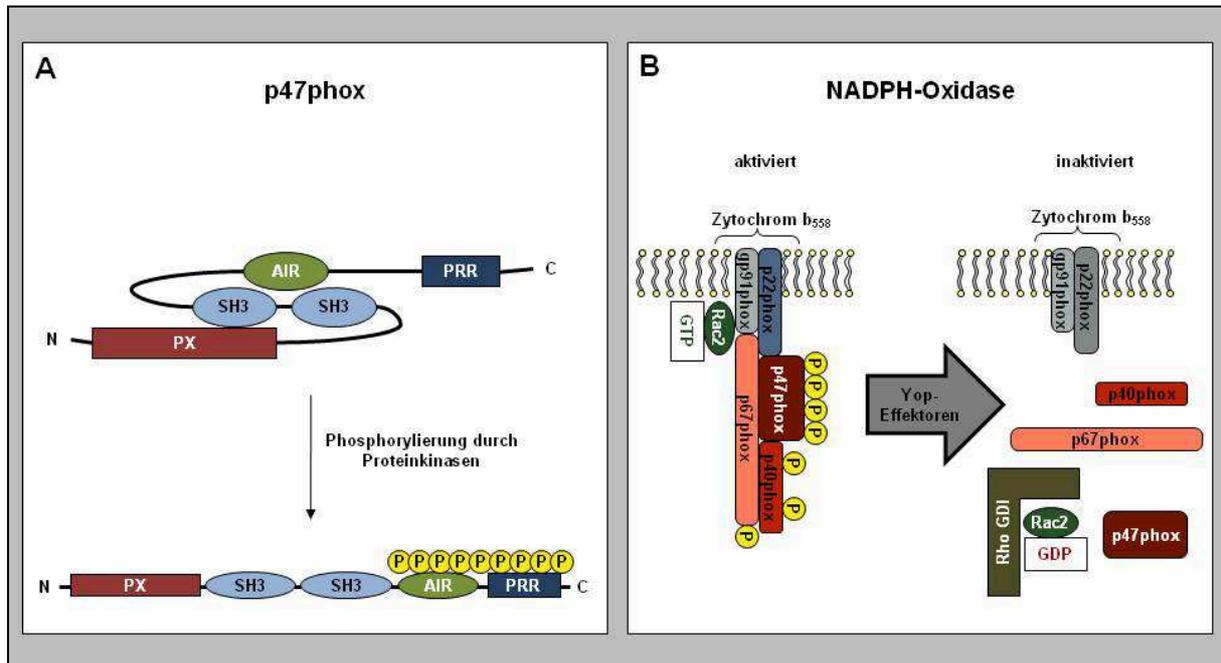


Abb. 4.4 Yop-Effektoren führen dazu, dass weniger phosphoryliertes p47phox in humanen PMNs vorhanden ist. (A) Verschiedene Signalwege führen im Zuge einer *in vitro* Yersinieninfektion zur Phosphorylierung der NADPH-Oxidasen-Komponente p47phox. Daraufhin bindet p47phox an die Membranständigen NADPH-Oxidase Komponenten und trägt dadurch zur Aktivierung die NADPH-Oxidase bei. (B) Translozierte Yop-Effektoren könnten eine Dephosphorylierung oder Inhibition einer Rephosphorylierung der NADPH-Oxidase-Untereinheit p47phox bedingen. Dies führt zu einer Reduktion der ROS-Produktion.

4.5 Das 3D-Kollagengellmodell zur Beobachtung von Yersinien-Phagozyten-Interaktionen

Standard-*in-vitro*-Infektionsstudien finden meist mit eukaryotischen Zellen in Suspension bzw. adhärennten Einzelzellschichten statt, welche mit Bakterien in Kontakt gebracht werden. Über Jahrzehnte wurden somit Mechanismen wie Zelladhäsion, Zellinvasion und intrazelluläres Überleben bzw. Replizieren von Bakterien erfolgreich untersucht. Auch im ersten Teil dieser Arbeit fanden Standard-*in-vitro*-Infektionsstudien, für die Untersuchung der Unterdrückung der ROS-Produktion durch Yops in Neutrophilen, ihre Anwendung. Wird das bedeckende Medium außer Acht gelassen interagieren eukaryotische Zellen und Bakterien in diesem Infektionsmodell unter zwei-dimensionalen Bedingungen miteinander. Jedoch ist die Wirtszell-Erreger-Interaktion *in vivo* weitaus komplexer. Immunzellen treffen meist im Gewebe, d. h. unter drei-dimensionalen Bedingungen auf Erreger, welche dort eine Infektion etablieren konnten. Die 3-dimensionale extrazelluläre Matrix-Architektur enthält vielschichtige Informationen und einen bedeutenden Einfluss auf Zellfunktionen, welche auch in Infektionsstudien nicht vernachlässigt werden sollten. Um gewebe-nahe Studien zu ermöglichen wird in der immunologischen und onkologischen Forschung das 3D-CoG verwendet (Friedl und Bröcker, 2000). In dieser Arbeit wurden unter Verwendung des 3D-KoGs zwei Versuchsaufbauten, das Einzelschichtmatrixsystem und das Doppelschichtmatrixsystem etabliert, um Yersinien-Erreger-Interaktionen zu untersuchen. Die Kollagenmatrix simuliert damit die extrazelluläre Matrix im Gewebe und bietet den eingebrachten Zellen eine 3-dimensionale Umgebung. In dieser ist es möglich, dass sich Immunzellen 3-dimensional organisieren und sich auf die im 3D-KoG vorhandenen Erreger zubewegen können. In 2D-Infektionsstudien werden Erreger auf die eukaryotischen Zellen aufgebracht. Zunächst wurde von uns das Wachstumsverhalten von *Y. enterocolitica* im 3D-KoG beschrieben (Freund *et al.*, 2008). Wir konnten neue phänotypische Charakteristika zeigen, welche durch das Virulenzplasmid kontrolliert werden. Das kettenartige Wachstum von wildtyp Yersinien, schon bekannt aus Experimenten mit adhärennten Einzelzellschichten, wurde ebenso in unserem 3D-KoG-Infektionsmodell beobachtet und scheint für die dort auftretende Mikrokoloniebildung von Bedeutung zu sein. Die dicht-gepackten Mikrokolonien innerhalb des 3D-KoG ähneln Yersinien-Mikroabszessen im Gewebe (Simonet *et al.*, 1990; Viboud und Bliska, 2005). Die Packungsdichte der Mikrokolonien im 3D-KoG ist YadA abhängig. YadA-produzierende Stämme bilden dicht-gepackte und WA(pYVΔ*yadA*) locker-gepackte Mikrokolonien. Es wurde eine starke Korrelation zwischen der Autoagglutination

von Yersinien und dicht gepackten Mikrokolonien festgestellt, wobei der Phänotyp der dichten Packung auf die YadA-Kopfdomäne eingegrenzt wurde. Allerdings ist die Kollagenbinde-Eigenschaft von YadA dafür nicht verantwortlich. Zusätzlich wurde von uns die Expression von Virulenz-assoziierten Genen für *Y. enterocolitica* im 3D-KoG bestätigt, was die Grundlage für Interaktionsstudien mit Immunzellen schuf (Freund *et al.*, 2008). Für diese Studien wurden Neutrophile, welche für die Initiierung einer Immunantwort wichtig sind und Makrophagen, welche große Bedeutung bei der Beseitigung und Klärung einer Infektion aufweisen, verwendet. Es wurde festgestellt, dass Makrophagen im Gegensatz zu Neutrophilen im Kollagen-Netzwerk nicht migrieren. Diese Beobachtung wurden von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Michael Sixt persönliche Mitteilung) und könnte damit zusammenhängen, dass Makrophagen nicht amöboid und Integrin-unabhängig in 3-dimensionalen Umgebungen migrieren können, wie es für Lymphozyten und dendritische Zellen beschrieben wurde (Lämmermann *et al.*, 2008). Nachdem Makrophagen in das 3D-KoG eingegossen wurden, etablieren sie sich in der 3-dimensionalen Matrix, indem sie sich ausbereiten und Filo- bzw. Pseudopodien bilden. Zudem konnte in Infektionsversuchen ihre phagozytierende Aktivität gezeigt werden. Die Phagozytose von Yersinien war zunächst pYV-unabhängig. Es konnte jedoch nach einer 16-stündigen Infektion ein höherer Anteil an toten Makropagen mit WA(pYV) als mit WA-C festgestellt werden. Neutrophile hingegen zeigten die für die Entwicklung von Chemotaxis typischen Merkmale, wie Pseudopodienbildung, Ausbildung von Polarität und die spätere Ausbildung einer Zellfront und eines Uropods (Van Haastert und Devreotes, 2004). Da die Anzahl an migrierenden PMNs von der Bakteriendichte abhängt und nicht stattfindet, wenn keine Bakterien vorhanden sind, gehen wir davon aus, dass Yersinien chemotaktisch wirken. Es wurden unterschiedliche Yersinienmutanten in 2 Wachstumsphasen untersucht. Zum einen wurde die Interaktion von Neutrophilen mit einzelnen bzw. kurzen Yersinienketten und Mikrokolonien konfokal mikroskopisch beobachtet. Da es sich um Lebendpräparate handelte, wurde stets abgewogen, ob Detailinformationen oder eine grobe Übersicht des Gesamtgeschehens dargestellt werden sollte. Eine hohe Auflösung bedeutet eine zeitintensive Darstellungsart und eine hohe Strahlenbelastung für das Präparat, beides hat bei sich schnell bewegenden und lebenden Zellen seine Grenzen. Im umgekehrten Sinn werden bei einer niedrigen Auflösung wertvolle Informationen eingebüßt. Für Neutrophile konnten nach einer Interaktion mit kurzen WA(pYV)-Ketten vier Folgereaktionen festgehalten werden. (1) Es wurde die Phagozytose von WA(pYV) beobachtet. (2) Es kam zum Zelltod der Neutrophilen. (3) Weitere PMNs zeigten eine Störung der Zellpolarität und ihrer Migrationsfähigkeit. (4) Und andere PMNs

interagierten mit den Bakterien, ohne dass ein Effekt beobachtet werden konnte (stille Interaktion). Auf Grund oben genannter Argumente konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen WA(pYV Δ yop)-Mutanten bzw. WA(pT3SS, pYop) Mutanten dargestellt werden. Alle vier Folgereaktionen konnten praktisch simultan nachgewiesen werden. Nur für Interaktionen von PMNs mit WA-C und WA(pYV Δ lcrD) wurden kaum tote und keine in ihrer Migrationsfähigkeit eingeschränkte PMNs gefunden. Auch für die ROS-Produktion konnten für einzeln liegende Bakterien und Bakterienketten oben angegebener Mutanten keine Unterschiede dargestellt werden. Die ROS-Produktion fand prinzipiell statt und eine Quantifizierung und die Darstellung signifikanter Unterschiede konnte sehr gut mit einer FACS-Analyse durchgeführt werden. Mit der durchflusszytometrischen Methode konnte eine weitaus größere Zellzahl mit höherer Sensitivität überprüft werden. Bei der Interaktion von Neutrophilen mit Mikrokolonien wurde besonderer Wert auf vier Charakteristika gelegt. Es wurde beobachtet, ob Neutrophile die Mikrokolonien invadieren konnten und ob es zur Ausbildung von ROS kam. Zusätzlich wurde festgehalten, ob die PMNs im Stande waren nach einer Interaktion mit der Mikrokolonie sich wieder zu entfernen oder ob sie sich abrundeten und immobil wurden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Eindringen der Neutrophilen in die Mikrokolonie Yop-abhängig inhibiert wird. Dies konnte nicht auf ein einzelnes Yop zurückgeführt werden und schließt aller Wahrscheinlichkeit nach, dass Zusammenspiel mehrerer Yops ein. Das Invadieren der Mikrokolonie wurde außer bei den Mikrokolonien von WA(pT3SS, pYopH) mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies begleitet. Dies deutet auf eine Phagozytose der WA(pT3SS,pYopX) Mutanten hin. Jedoch konnte die Phagozytose nur von WA(pYV Δ lcrD) mikroskopisch bestätigt werden. WA(pT3SS, pYopX) Mutanten haben einen Wachstumsdefekt, der sich durch das einbringen eines weiteren Plasmids (pRFP) noch verstärkt. Aus diesem Grund konnte eine lebendmikroskopische Bestätigung der Phagozytose nur für pRFP-tragende Stämme durchgeführt werden. Nachdem Eindringen der PMNs in die Mikrokolonie konnte eine gerichtete Migration anderer PMNs beobachtet werden. Dies deutet auf die Produktion von Chemokinen der bereits invadierten Neutrophilen hin. Zudem wurde ein entfernen von PMNs von solchen Mikrokolonien nicht beobachtet. Das Abrunden von Neutrophilen fand bei allen Mikrokolonien außer bei WA(pYV Δ lcrD) statt. Besonders viele abgerundete Zellen konnten mit WA(pYV Δ yadA) gezeigt werden. Dies könnte auf eine verstärkte Yop-Sekretion hindeuten.

Insgesamt wurde das 3D-KoG-Model für Yersinia-Neutrophil-Interaktionen erfolgreich etabliert.

5 Zusammenfassung

Um eine Infektion hervorrufen zu können, besitzt *Y. enterocolitica* unterschiedliche, chromosomal- und Plasmid-kodierte Virulenzfaktoren wie Adhäsine und Effektorproteine. Letztere werden T3SS-vermittelt präferenziell in Immunzellen injiziert. Neutrophile werden als erste Immunzellen vom Infektionsherd angezogen. Dies gilt auch für die murine Yersiniose. Einer der wichtigsten Verteidigungsmechanismen von Neutrophilen ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, dessen Schlüsselenzym die NADPH-Oxidase darstellt. Mit dem neuartigen Farbstoff APF, welcher mittels FACS-Analyse hoch sensitive Untersuchungen auf Einzelzellniveau zulässt und auch konfokal mikroskopische Beobachtungen ermöglicht, konnte in dieser Arbeit ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Inhibition der intrazellulären ROS-Produktion von PMNs durch *Y. enterocolitica* geleistet werden. Zudem wurden Unterschiede muriner und humaner Neutrophiler herausgearbeitet. Damit können die Ergebnisse im Mausinfektionsmodell besser bewertet werden. Es konnte gezeigt werden, dass in humanen PMNs zusätzlich zu den schon bekannten Effektoren YopE und YopH, auch YopP und YopQ maßgeblich an der Unterdrückung der ROS-Produktion beteiligt sind. Da es sich um die Erfassung der intrazellulären ROS-Produktion handelt, hat die Phagozytose zusätzlich Einfluss auf die Menge an produzierten ROS. Hier konnte gezeigt werden, dass Yops, welche die Phagozytose beeinflussen, bei murinen PMNs auch mit der Inhibition der ROS-Produktion korrelieren. Bei humanen Neutrophilen war dies nicht der Fall. Diese Ergebnisse passen zu der Tatsache, dass murine Neutrophile keine intrazellulären NADPH-Speicher im Gegensatz zu humanen Neutrophilen besitzen. Rezeptor-Blockierungsstudien sowie die Inhibition intrazellulärer Signalmoleküle ergaben, dass β_1 - und β_2 -Integrine, Syk und PI3K eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion zur Aktivierung der NADPH-Oxidase in Neutrophilen durch *Y. enterocolitica* spielen. Es konnte gezeigt werden, dass der TLR4-Rezeptor und die MAPK p38 eine untergeordnete und Erk1/2 keine Bedeutung haben. Werden zentrale und ubiquitär vorkommende Proteine wie Tyrosinkinase oder Vorgänge wie die Aktinassemblierung inhibiert, hat dies eine gravierende Auswirkung auf die Yersinien-induzierte ROS-Produktion in Neutrophilen. Eine weitere wichtige Erkenntnis für das Infektionsgeschehen in Suspension ist die Tatsache, dass Neutrophile in einem vorstimulierten Zustand vorliegen. Dieses „priming“ der Neutrophilen wurde mit Westernblot-Analysen bestätigt. Offensichtlich kommt es zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase bevor Yop-Effektoren ihre Wirkung entfalten können. Der Unterschied in der Quantität an produzierten ROS nach einer Aktivierung der NADPH-Oxidase wird darauf

zurückgeführt, dass Yops zu einer Dephosphorylierung oder Inhibition einer Rephosphorylierung von p47phox führen. Dies wurde durch 2D-Gelelektrophorese und anschließendem Immunoblot nachgewiesen. Zusätzlich belegen Immunfluoreszenzstudien die Delokalisierung von p47phox von der Zytoplasma- bzw. Vesikel- und Granulamembran.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde erfolgreich das 3D-KoG-Modell zur Untersuchung von *Yersinia*-Neutrophil-Interaktionen etabliert. Die Mikrokoloniebildung von *Y. enterocolitica* im 3D-KoG ähnelt *Yersinia*-Abszessen in oral infizierten Mäusen. Durch diese Gewebe-nahen Bedingungen besteht in diesem Modell die Möglichkeit, Studien mit Mutanten durchzuführen, welche im Mausmodell attenuiert sind. Somit konnte gezeigt werden, dass Mikrokolonien bestehend aus *Y. enterocolitica*, Yop-abhängig und nicht durch mechanische Abwehr die Invasion durch Neutrophile verhindern. Dies scheint im Zusammenspiel mehrerer Yops zu geschehen, da kein einzelnes Yop für diesen Phänotyp verantwortlich ist. In diesen ersten Studien wurde die Grundlage für weitere Untersuchungen gelegt, um das Infektionsgeschehen *in vivo* besser verstehen zu können. Zusätzlich konnte in diesen Gewebe-nahen Untersuchungen beschrieben werden, dass YopH die Ausbildung der ROS-Produktion als einziges Yop in Mikrokolonien vollständig unterdrückt.

6 Literaturverzeichnis

Abo, A., Webb, M. R., Grogan, A., and Segal, A. W. (1994) Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J* **298 Pt 3**: 585-591.

Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., and Carniel, E. (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14043-14048.

Ackermann, N., Tiller, M., Anding, G., Roggenkamp, A., and Heesemann, J. (2008) Contribution of trimeric autotransporter C-terminal domains of oligomeric coiled-coil adhesin (Oca) family members YadA, UspA1, EibA, and Hia to translocation of the YadA passenger domain and virulence of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **190**: 5031-5043.

Aepfelbacher, M., Trasak, C., and Ruckdeschel, K. (2007) Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb Haemost* **98**: 521-529.

Aepfelbacher, M., Trasak, C., Wiedemann, A., and Andor, A. (2003) Rho-GTP binding proteins in *Yersinia* target cell interaction. *Adv Exp Med Biol* **529**: 65-72.

Aepfelbacher, M., Trasak, C., Wilharm, G., Wiedemann, A., Trulzsch, K., Krauss, K. *et al.* (2003) Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J Biol Chem* **278**: 33217-33223.

Aili, M., Isaksson, E. L., Hallberg, B., Wolf-Watz, H., and Rosqvist, R. (2006) Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Cell Microbiol* **8**: 1020-1033.

Aili, M., Telepnev, M., Hallberg, B., Wolf-Watz, H., and Rosqvist, R. (2003) In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity. *Microb Pathog* **34**: 297-308.

Akira, S. (2006) TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**: 1-16.

Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**: 499-511.

Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B., and Normark, S. (2007) Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* **261**: 511-528.

Allen, L. A. (2003) Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. *Microbes Infect* **5**: 1329-1335.

Allen, R. C. and Loose, L. D. (1976) Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **69**: 245-252.

Alonso, A., Bottini, N., Bruckner, S., Rahmouni, S., Williams, S., Schoenberger, S. P. *et al.* (2004) Lck dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by *Yersinia* phosphatase YopH. *J Biol Chem* **279**: 4922-4928.

- Alrutz, M. A. and Isberg, R. R. (1998) Involvement of focal adhesion kinase in invasion-mediated uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13658-13663.
- Alrutz, M. A., Srivastava, A., Wong, K. W., Souza-Schorey, C., Tang, M., Ch'Ng, L. E. *et al.* (2001) Efficient uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function. *Mol Microbiol* **42**: 689-703.
- Amirmozafari, N. and Robertson, D. C. (1993) Nutritional requirements for synthesis of heat-stable enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3314-3320.
- Anderson, D. M. and Schneewind, O. (1997) A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**: 1140-1143.
- Anderson, K. V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**: 791-798.
- Anderson, K. V., Jurgens, G., and Nusslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* **42**: 779-789.
- Andersson, K., Carballeira, N., Magnusson, K. E., Persson, C., Stendahl, O., Wolf-Watz, H. *et al.* (1996) YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol Microbiol* **20**: 1057-1069.
- Andor, A., Trulzsch, K., Essler, M., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Heesemann, J. *et al.* (2001) YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* **3**: 301-310.
- Autenrieth, I. B., Hantschmann, P., Heymer, B., and Heesemann, J. (1993) Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiology* **187**: 1-16.
- Autenrieth, S. E., Soldanova, I., Rosemann, R., Gunst, D., Zahir, N., Kracht, M. *et al.* (2007) *Yersinia enterocolitica* YopP inhibits MAP kinase-mediated antigen uptake in dendritic cells. *Cell Microbiol* **9**: 425-437.
- Babior, B. M. (1982) The enzymatic basis for O-2 production by human neutrophils. *Can J Physiol Pharmacol* **60**: 1353-1358.
- Babior, B. M. (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**: 1464-1476.
- Babior, B. M. (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* **109**: 33-44.
- Bach, S., de, A. A., and Carniel, E. (2000) The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* **183**: 289-294.
- Bae, Y. S., Cantley, L. G., Chen, C. S., Kim, S. R., Kwon, K. S., and Rhee, S. G. (1998) Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**: 4465-4469.

- Baldrige, C. W. and Gerard, R. W. (1933) The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol* **103**:235-247
- Balligand, G., Laroche, Y., and Cornelis, G. (1985) Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect Immun* **48**: 782-786.
- Barbieri, J. T., Riese, M. J., and Aktories, K. (2002) Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 315-344.
- Bastian, P., Posch, B., Lang, K., Niggemann, B., Zaenker, K. S., Hatt, H. *et al.* (2006) Phosphatidylinositol 3-kinase in the G protein-coupled receptor-induced chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 breast carcinoma cells: a comparison with leukocytes. *Mol Cancer Res* **4**: 411-421.
- Bearden, S. W., Fetherston, J. D., and Perry, R. D. (1997) Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **65**: 1659-1668.
- Benabdillah, R., Mota, L. J., Lutzelschwab, S., Demoinet, E., and Cornelis, G. R. (2004) Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. *Microb Pathog* **36**: 247-261.
- Beutler, B. (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**: 257-263.
- Biedzka-Sarek, M., Jarva, H., Hyytiainen, H., Meri, S., and Skurnik, M. (2008) Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun* **76**: 4100-4109.
- Biedzka-Sarek, M., Salmenlinna, S., Gruber, M., Lupas, A. N., Meri, S., and Skurnik, M. (2008) Functional mapping of YadA- and Ail-mediated binding of human factor H to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun* **76**: 5016-5027.
- Black, D. S. and Bliska, J. B. (1997) 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* **16**: 2730-2744.
- Black, D. S. and Bliska, J. B. (2000) The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* **37**: 515-527.
- Black, D. S., Montagna, L. G., Zitsmann, S., and Bliska, J. B. (1998) 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* **29**: 1263-1274.
- Black, R. E., Jackson, R. J., Tsai, T., Medvesky, M., Shayegani, M., Feeley, J. C. *et al.* (1978) Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N Engl J Med* **298**: 76-79.
- Bliska, J. B. and Black, D. S. (1995) Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect Immun* **63**: 681-685.

- Bliska, J. B., Copass, M. C., and Falkow, S. (1993) The Yersinia pseudotuberculosis adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infect Immun* **61**: 3914-3921.
- Bliska, J. B. and Falkow, S. (1992) Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of Yersinia enterocolitica. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3561-3565.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C. *et al.* (1999) The tripartite type III secretin of Shigella flexneri inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* **147**: 683-693.
- Bockemuhl, J. and Roggentin, P. (2004) [Intestinal yersiniosis. Clinical importance, epidemiology, diagnosis, and prevention]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **47**: 685-691.
- Bockemuhl, J. and Wong, J.D. (2003) Yersinia. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A. and Tenover, R. C. (ed) pp. 672-683.
- Bohnsack, J. F. (1992) CD11/CD18-independent neutrophil adherence to laminin is mediated by the integrin VLA-6. *Blood* **79**: 1545-1552.
- Boland, A. and Cornelis, G. R. (1998) Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect Immun* **66**: 1878-1884.
- Boland, A., Havaux, S., and Cornelis, G. R. (1998) Heterogeneity of the Yersinia YopM protein. *Microb Pathog* **25**: 343-348.
- Boland, A., Sory, M. P., Iriarte, M., Kerbouch, C., Wattiau, P., and Cornelis, G. R. (1996) Status of YopM and YopN in the Yersinia Yop virulon: YopM of Y. enterocolitica is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J* **15**: 5191-5201.
- Bolin, I., Norlander, L., and Wolf-Watz, H. (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* **37**: 506-512.
- Bolin, I. and Wolf-Watz, H. (1984) Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of Yersinia pseudotuberculosis. *Infect Immun* **43**: 72-78.
- Bonini, M. G., Rota, C., Tomasi, A., and Mason, R. P. (2006) The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? *Free Radic Biol Med* **40**: 968-975.
- Borregaard, N. (1997) Development of neutrophil granule diversity. *Ann N Y Acad Sci* **832**: 62-68.
- Borregaard, N. and Cowland, J. B. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**: 3503-3521.
- Borregaard, N., Heiple, J. M., Simons, E. R., and Clark, R. A. (1983) Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol* **97**: 52-61.

- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Lollike, K., and Sengelov, H. (1995) Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin Exp Immunol* **101 Suppl 1**: 6-9.
- Borregaard, N., Sehested, M., Nielsen, B. S., Sengelov, H., and Kjeldsen, L. (1995) Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood* **85**: 812-817.
- Bos, J. L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**: 865-877.
- Bottone, E. J. (1977) *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Crit Rev Microbiol* **5**: 211-241.
- Bottone, E. J. (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect* **1**: 323-333.
- Bouin, A. P., Grandvaux, N., Vignais, P. V., and Fuchs, A. (1998) p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J Biol Chem* **273**: 30097-30103.
- Bowie, A. and O'Neill, L. A. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* **67**: 508-514.
- Boxio, R., Bossenmeyer-Pourie, C., Steinckwich, N., Dournon, C., and Nusse, O. (2004) Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J Leukoc Biol* **75**: 604-611.
- Boyce, J. M., Evans, E. J., Jr., Evans, D. G., and DuPont, H. L. (1979) Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **25**: 532-537.
- Boyd, A. P., Lambermont, I., and Cornelis, G. R. (2000) Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* **182**: 4811-4821.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S. *et al.* (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**: 1532-1535.
- Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* **5**: 577-582.
- Brodsky, I. E. and Medzhitov, R. (2008) Reduced secretion of YopJ by *Yersinia* limits in vivo cell death but enhances bacterial virulence. *PLoS Pathog* **4**: e1000067.
- Brodsky, I. E., Palm, N. W., Sadanand, S., Ryndak, M. B., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A. *et al.* (2010) A *Yersinia* effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host Microbe* **7**: 376-387
- Brown, G. D. (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**: 33-43.

- Brown, G. E., Stewart, M. Q., Bissonnette, S. A., Elia, A. E., Wilker, E., and Yaffe, M. B. (2004) Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* **279**: 27059-27068.
- Bruce-Staskal, P. J., Weidow, C. L., Gibson, J. J., and Bouton, A. H. (2002) Cas, Fak and Pyk2 function in diverse signaling cascades to promote Yersinia uptake. *J Cell Sci* **115**: 2689-2700.
- Bruckner, S., Rhamouni, S., Tautz, L., Denault, J. B., Alonso, A., Becattini, B. *et al.* (2005) Yersinia phosphatase induces mitochondrially dependent apoptosis of T cells. *J Biol Chem* **280**: 10388-10394.
- Brugirard-Ricaud, K., Duchaud, E., Givaudan, A., Girard, P. A., Kunst, F., Boemare, N. *et al.* (2005) Site-specific antiphagocytic function of the *Photobacterium luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cell Microbiol* **7**: 363-371.
- Buchrieser, C., Brosch, R., Bach, S., Guiry, A., and Carniel, E. (1998) The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn* tRNA genes. *Mol Microbiol* **30**: 965-978.
- Bukholm, G., Kapperud, G., and Skurnik, M. (1990) Genetic evidence that the *yopA* gene-encoded *Yersinia* outer membrane protein Yop1 mediates inhibition of the anti-invasive effect of interferon. *Infect Immun* **58**: 2245-2251.
- Burghout, P., Beckers, F., de W. E., van, B. R., Cornelis, G. R., Tommassen, J. *et al.* (2004) Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **186**: 5366-5375.
- Bylund, J., Samuelsson, M., Collins, L. V., and Karlsson, A. (2003) NADPH-oxidase activation in murine neutrophils via formyl peptide receptors. *Exp Cell Res* **282**: 70-77.
- Carniel, E., Guiry, A., Guilvout, I., and Mercereau-Puijalon, O. (1992) Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Mol Microbiol* **6**: 379-388.
- Caron, E. and Hall, A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**: 1717-1721.
- Carter, P. B. (1975) Animal model of human disease. *Yersinia enterocolitica*. Animal model: oral *Yersinia enterocolitica* infection of mice. *Am J Pathol* **81**: 703-706.
- Carter, R. S., Pennington, K. N., Ungurait, B. J., Arrate, P., and Ballard, D. W. (2003) Signal-induced ubiquitination of I kappaB Kinase-beta. *J Biol Chem* **278**: 48903-48906.
- Chain, P. S., Carniel, E., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Stoutland, P. O., Regala, W. M. *et al.* (2004) Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13826-13831.
- Chang, A. C. and Cohen, S. N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**: 1141-1156.

- Chanock, S. J., el, B. J., Smith, R. M., and Babior, B. M. (1994) The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* **269**: 24519-24522.
- Chauvaux, S., Rosso, M. L., Frangeul, L., Lacroix, C., Labarre, L., Schiavo, A. *et al.* (2007) Transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in human plasma: an approach for discovering bacterial genes involved in septicemic plague. *Microbiology* **153**: 3112-3124.
- Chen, Z. J. (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* **7**: 758-765.
- Chimini, G. and Chavrier, P. (2000) Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol* **2**: E191-E196.
- China, B., Sory, M. P., N'Guyen, B. T., De, B. M., and Cornelis, G. R. (1993) Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect Immun* **61**: 3129-3136.
- Ciesiolka, L. D., Hwin, T., Gearlds, J. D., Minsavage, G. V., Saenz, R., Bravo, M. *et al.* (1999) Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 35-44.
- Clark, E. A., Shattil, S. J., Ginsberg, M. H., Bolen, J., and Brugge, J. S. (1994) Regulation of the protein tyrosine kinase pp72syk by platelet agonists and the integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem* **269**: 28859-28864.
- Clark, M. A., Hirst, B. H., and Jepson, M. A. (1998) Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M-cell invasion and epithelial destruction by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **66**: 724-731.
- Clark, R. A. (1990) The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* **161**: 1140-1147.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38.
- Cornelis, G., Vanootegem, J. C., and Sluiter, C. (1987) Transcription of the *yop* regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* **2**: 367-379.
- Cornelis, G. R. (2002) The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 742-752.
- Cornelis, G. R. (2002) The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol* **291**: 455-462.
- Cornelis, G. R. (2002) *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* **158**: 401-408.
- Cornelis, G. R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811-825.
- Cornelis, G. R., Biot, T., Lambert de, R. C., Michiels, T., Mulder, B., Sluiter, C. *et al.* (1989) The *Yersinia* *yop* regulon. *Mol Microbiol* **3**: 1455-1459.

- Cornelis, G. R. and Van, G. F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**: 735-774.
- Cornelis, G. R. and Wolf-Watz, H. (1997) The Yersinia Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**: 861-867.
- Currie, M. G., Fok, K. F., Kato, J., Moore, R. J., Hamra, F. K., Duffin, K. L. *et al.* (1992) Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 947-951.
- Dach, K., Zovko, J., Hogardt, M., Koch, I., van, E. K., Heesemann, J. *et al.* (2009) Bacterial toxins induce sustained mRNA expression of the silencing transcription factor klf2 via inactivation of RhoA and Rhophilin 1. *Infect Immun* **77**: 5583-5592.
- Dahlgren, C. and Karlsson, A. (1999) Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* **232**: 3-14.
- Dang, P. M., Babior, B. M., and Smith, R. M. (1999) NADPH dehydrogenase activity of p67PHOX, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. *Biochemistry* **38**: 5746-5753.
- Dang, P. M., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y. *et al.* (2006) A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* **116**: 2033-2043.
- Day, J. B. and Plano, G. V. (1998) A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in Yersinia pestis. *Mol Microbiol* **30**: 777-788.
- de Hostos, E. L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R., and Gerisch, G. (1991) Coronin, an actin binding protein of Dictyostelium discoideum localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J* **10**: 4097-4104.
- de la Puerta, M. L., Trinidad, A. G., del Carmen, R. M., Bogetz, J., Sanchez, C. M., Mustelin, T. *et al.* (2009) Characterization of new substrates targeted by Yersinia tyrosine phosphatase YopH. *PLoS One* **4**: e4431.
- de, Mendez., I, Homayounpour, N., and Leto, T. L. (1997) Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol* **17**: 2177-2185.
- deBakker, C. D., Haney, L. B., Kinchen, J. M., Grimsley, C., Lu, M., Klingele, D. *et al.* (2004) Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-12/ELMO. *Curr Biol* **14**: 2208-2216.
- DeLeo, F. R., Renee, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., Weiss, J. P. *et al.* (1998) Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* **101**: 455-463.
- Delor, I. and Cornelis, G. R. (1992) Role of Yersinia enterocolitica Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* **60**: 4269-4277.

- Delor, I., Kaeckenbeeck, A., Wauters, G., and Cornelis, G. R. (1990) 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* **58**: 2983-2988.
- Dersch, P. and Isberg, R. R. (1999) A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *EMBO J* **18**: 1199-1213.
- Dersch, P. and Isberg, R. R. (2000) An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors. *Infect Immun* **68**: 2930-2938.
- Desvaux, M., Parham, N. J., and Henderson, I. R. (2004) The autotransporter secretion system. *Res Microbiol* **155**: 53-60.
- Devignat, R. (1951) Varieties of *Pasteurella pestis*; new hypothesis. *Bull World Health Organ* **4**:247-263.
- Dewas, C., Dang, P. M., Gougerot-Pocidallo, M. A., and El-Benna, J. (2003) TNF- α induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* **171**: 4392-4398.
- Dewoody, R., Merritt, P. M., Houppert, A. S., and Marketon, M. M. (2011) YopK regulates the *Yersinia pestis* type III secretion system from within host cells. *Mol Microbiol*.
- Diaz, R., Urra, E., Toyos, J., and Moriyon, I. (1985) Characterization of a *Yersinia enterocolitica* antigen common to enterocolitis-associated serotypes. *J Clin Microbiol* **22**: 1035-1039.
- Djafarzadeh, S. and Niggli, V. (1997) Signaling pathways involved in dephosphorylation and localization of the actin-binding protein cofilin in stimulated human neutrophils. *Exp Cell Res* **236**: 427-435.
- Doeing, D. C., Borowicz, J. L., and Crockett, E. T. (2003) Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol* **3**: 3.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., and Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**, 674–677.
- Dukuzumuremyi, J. M., Rosqvist, R., Hallberg, B., Akerstrom, B., Wolf-Watz, H., and Schesser, K. (2000) The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem* **275**: 35281-35290.
- Dupuy, A. G. and Caron, E. (2008) Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. *J Cell Sci* **121**: 1773-1783.
- Durand, E. A., Maldonado-Arocho, F. J., Castillo, C., Walsh, R. L., and Meccas, J. (2010) The presence of professional phagocytes dictates the number of host cells targeted for Yop translocation during infection. *Cell Microbiol* **12**: 1064-1082.

- Edelmann, M. J., Kramer, H. B., Altun, M., and Kessler, B. M. (2010) Post-translational modification of the deubiquitinating enzyme otubain 1 modulates active RhoA levels and susceptibility to Yersinia invasion. *FEBS J* **277**: 2515-2530.
- Eitel, J. and Dersch, P. (2002) The YadA protein of Yersinia pseudotuberculosis mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect Immun* **70**: 4880-4891.
- Eitel, J., Heise, T., Thiesen, U., and Dersch, P. (2005) Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of Yersinia pseudotuberculosis require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. *Cell Microbiol* **7**: 63-77.
- El Benna, J., Faust, L. P., and Babior, B. M. (1994) The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem* **269**: 23431-23436.
- El Benna, J., Faust, R. P., Johnson, J. L., and Babior, B. M. (1996) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **271**: 6374-6378.
- El Benna, J., Han, J., Park, J. W., Schmid, E., Ulevitch, R. J., and Babior, B. M. (1996) Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys* **334**: 395-400.
- El Benna, J., Dang, P. M., and Gougerot-Pocidallo, M. A. (2008) Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* **30**: 279-289.
- El Benna, J., Dang, P. M., Gougerot-Pocidallo, M. A., and Elbim, C. (2005) Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**: 199-206.
- El Benna, J., Dang, P. M., Gougerot-Pocidallo, M. A., Marie, J. C., and Braut-Boucher, F. (2009) p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* **41**: 217-225.
- El Thair, Y. and Skurnik, M. (2001) YadA, the multifaceted Yersinia adhesin. *Int J Med Microbiol* **291**: 209-218.
- Ellison, D. W., Lawrenz, M. B., and Miller, V. L. (2004) Invasin and beyond: regulation of Yersinia virulence by RovA. *Trends Microbiol* **12**: 296-300.
- Ellison, D. W. and Miller, V. L. (2006) H-NS represses inv transcription in Yersinia enterocolitica through competition with RovA and interaction with YmoA. *J Bacteriol* **188**: 5101-5112.
- Emody, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skurnik, M., Kapperud, G., O'Toole, P. *et al.* (1989) Binding to collagen by Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol* **171**: 6674-6679.

- Erfurth, S. E., Grobner, S., Kramer, U., Gunst, D. S., Soldanova, I., Schaller, M. *et al.* (2004) *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun* **72**: 7045-7054.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-635.
- Evdokimov, A. G., Anderson, D. E., Routzahn, K. M., and Waugh, D. S. (2001) Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J Mol Biol* **312**: 807-821.
- Evdokimov, A. G., Tropea, J. E., Routzahn, K. M., and Waugh, D. S. (2002) Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 398-406.
- Falasca, M., Logan, S. K., Lehto, V. P., Baccante, G., Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (1998) Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* **17**: 414-422.
- Fallman, M., Andersson, K., Hakansson, S., Magnusson, K. E., Stendahl, O., and Wolf-Watz, H. (1995) *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect Immun* **63**: 3117-3124.
- Faurschou, M. and Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* **5**: 1317-1327.
- Faust, L. R., el, B. J., Babior, B. M., and Chanock, S. J. (1995) The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest* **96**: 1499-1505.
- Feeley, J. C., Wells, J. G., Tsai, T. F., and Puhr, N. D. (1979) Detection of enterotoxigenic and invasive strains of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **5**: 329-334.
- Feldman, M. F., Muller, S., Wuest, E., and Cornelis, G. R. (2002) SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol* **46**: 1183-1197.
- Fetherston, J. D., Bearden, S. W., and Perry, R. D. (1996) YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol Microbiol* **22**: 315-325.
- Flugel, A., Schulze-Koops, H., Heesemann, J., Kuhn, K., Sorokin, L., Burkhardt, H. *et al.* (1994) Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J Biol Chem* **269**: 29732-29738.
- Follin, P., Johansson, A., and Dahlgren, C. (1991) Intracellular production of reactive oxygen species in human neutrophils following activation by the soluble stimuli FMLP, dioctanoylglycerol and ionomycin. *Cell Biochem Funct* **9**: 29-37.
- Forman, S., Wulff, C. R., Myers-Morales, T., Cowan, C., Perry, R. D., and Straley, S. C. (2008) yadBC of *Yersinia pestis*, a new virulence determinant for bubonic plague. *Infect Immun* **76**: 578-587.

- Forsberg, A., Viitanen, A. M., Skurnik, M., and Wolf-Watz, H. (1991) The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **5**: 977-986.
- Foultier, B., Troisfontaines, P., Muller, S., Opperdoes, F. R., and Cornelis, G. R. (2002) Characterization of the *ysa* pathogenicity locus in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion systems. *J Mol Evol* **55**: 37-51.
- Freitas, M., Lima, J. L., and Fernandes, E. (2009) Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Anal Chim Acta* **649**: 8-23.
- Freund, S., Czech, B., Trulzsch, K., Ackermann, N., and Heesemann, J. (2008) Unusual, virulence plasmid-dependent growth behavior of *Yersinia enterocolitica* in three-dimensional collagen gels. *J Bacteriol* **190**: 4111-4120.
- Friedl, P. and Brocker, E. B. (2000) The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* **57**: 41-64.
- Frieser, M., Hallmann, R., Johansson, S., Vestweber, D., Goodman, S. L., and Sorokin, L. (1996) Mouse polymorphonuclear granulocyte binding to extracellular matrix molecules involves beta 1 integrins. *Eur J Immunol* **26**: 3127-3136.
- Fu, Y. and Galan, J. E. (1999) A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* **401**: 293-297.
- Fueller, F., Bergo, M. O., Young, S. G., Aktories, K., and Schmidt, G. (2006) Endoproteolytic processing of RhoA by Rce1 is required for the cleavage of RhoA by *Yersinia enterocolitica* outer protein T. *Infect Immun* **74**: 1712-1717.
- Galan, J. E. and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322-1328.
- Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730-732.
- Gao, J. L. and Murphy, P. M. (1993) Species and subtype variants of the N-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains. *J Biol Chem* **268**: 25395-25401.
- Gao, J. X. and Issekutz, A. C. (1997) The beta 1 integrin, very late activation antigen-4 on human neutrophils can contribute to neutrophil migration through connective tissue fibroblast barriers. *Immunology* **90**: 448-454.
- Garcia, J. T., Ferracci, F., Jackson, M. W., Joseph, S. S., Pattis, I., Plano, L. R. *et al.* (2006) 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* **74**: 5645-5657.
- Garrity, G.M., Bell, J. A., and Liburn, T. G. (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Gerke, C., Falkow, S., and Chien, Y. H. (2005) The adaptor molecules LAT and SLP-76 are specifically targeted by *Yersinia* to inhibit T cell activation. *J Exp Med* **201**: 361-371.

- Glickman, M. H. and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**: 373-428.
- Goehring, U. M., Schmidt, G., Pederson, K. J., Aktories, K., and Barbieri, J. T. (1999) The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* **274**: 36369-36372.
- Gophna, U., Ron, E. Z., and Graur, D. (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**: 151-163.
- Gorg, A., Postel, W., and Gunther, S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**: 531-546.
- Gratacap, M. P., Payraastre, B., Viala, C., Mauco, G., Plantavid, M., and Chap, H. (1998) Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C-gamma2 is an early key event in FcgammaRIIA-mediated activation of human platelets. *J Biol Chem* **273**: 24314-24321.
- Green, S. P., Hartland, E. L., Robins-Browne, R. M., and Phillips, W. A. (1995) Role of YopH in the suppression of tyrosine phosphorylation and respiratory burst activity in murine macrophages infected with *Yersinia enterocolitica*. *J Leukoc Biol* **57**: 972-977.
- Gripenberg-Lerche, C., Skurnik, M., and Toivanen, P. (1995) Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: experimental studies with rats. *Infect Immun* **63**: 3222-3226.
- Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S. J., and Rittinger, K. (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* **113**: 343-355.
- Groemping, Y. and Rittinger, K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* **386**: 401-416.
- Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P., and Cornelis, G. R. (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* **70**: 4165-4176.
- Grosskinsky, U., Schutz, M., Fritz, M., Schmid, Y., Lamparter, M. C., Szczesny, P. *et al.* (2007) A conserved glycine residue of trimeric autotransporter domains plays a key role in *Yersinia* adhesin A autotransport. *J Bacteriol* **189**: 9011-9019.
- Groves, E., Rittinger, K., Amstutz, M., Berry, S., Holden, D. W., Cornelis, G. R. *et al.* (2010) Sequestering of Rac by the *Yersinia* effector YopO blocks Fcgamma receptor-mediated phagocytosis. *J Biol Chem* **285**: 4087-4098.
- Gu, Y., Filippi, M. D., Cancelas, J. A., Sieftring, J. E., Williams, E. P., Jasti, A. C. *et al.* (2003) Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* **302**: 445-449.
- Gu, Y. and Williams, D. A. (2002) RAC2 GTPase deficiency and myeloid cell dysfunction in human and mouse. *J Pediatr Hematol Oncol* **24**: 791-794.

- Guarino, A., Cohen, M. B., and Giannella, R. A. (1987) Small and large intestinal guanylate cyclase activity in children: effect of age and stimulation by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Pediatr Res* **21**: 551-555.
- Guthrie, L. A., McPhail, L. C., Henson, P. M., and Johnston, R. B., Jr. (1984) Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med* **160**: 1656-1671.
- Guzman-Verduzco, L. M. and Kupersztoch, Y. M. (1989) Rectification of two *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin allele sequences and lack of biological effect of changing the carboxy-terminal tyrosine to histidine. *Infect Immun* **57**: 645-648.
- Haag, H., Hantke, K., Drechsel, H., Stojiljkovic, I., Jung, G., and Zahner, H. (1993) Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol* **139**: 2159-2165.
- Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Muller, T., Latz, E. *et al.* (2008) The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* **28**: 315-323.
- Haase, R., Richter, K., Pfaffinger, G., Courtois, G., and Ruckdeschel, K. (2005) *Yersinia* outer protein P suppresses TGF-beta-activated kinase-1 activity to impair innate immune signaling in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J Immunol* **175**: 8209-8217.
- Haen (1995), In *Principles of Hematology*, Dubuque, IA, Wm. C. Brown
- Hakansson, S., Galyov, E. E., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (1996) The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol* **20**: 593-603.
- Hakansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E. E., Rosqvist, R., Homble, F. *et al.* (1996) 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* **15**: 5812-5823.
- Haley, P. J. (2003) Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* **188**: 49-71.
- Hall, A. B., Martinez Gakidis, M. A., Wilsbacher, J. L., Gao, S., Swat, W. and Brugge, J. S. (2005) Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in FcγR- and complement-mediated phagocytosis. *Immunity* **24**:305-316
- Hamburger, Z. A., Brown, M. S., Isberg, R. R., and Bjorkman, P. J. (1999) Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**: 291-295.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., and Winterbourn, C. C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**: 3007-3017.
- Han, Y. W. and Miller, V. L. (1997) Reevaluation of the virulence phenotype of the *inv yadA* double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **65**: 327-330.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.

- Hao, Y. H., Wang, Y., Burdette, D., Mukherjee, S., Keitany, G., Goldsmith, E. *et al.* (2008) Structural requirements for Yersinia YopJ inhibition of MAP kinase pathways. *PLoS One* **3**: e1375.
- Hardt, W. D. and Galan, J. E. (1997) A secreted Salmonella protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9887-9892.
- Hartland, E. L., Green, S. P., Phillips, W. A., and Robins-Browne, R. M. (1994) Essential role of YopD in inhibition of the respiratory burst of macrophages by Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* **62**: 4445-4453.
- Heesemann, J., Keller, C., Morawa, R., Schmidt, N., Siemens, H. J., and Laufs, R. (1983) Plasmids of human strains of Yersinia enterocolitica: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* **147**: 107-115.
- Heesemann, J. and Laufs, R. (1983) Construction of a mobilizable Yersinia enterocolitica virulence plasmid. *J Bacteriol* **155**: 761-767.
- Heesemann, J., Gross, U., and Gruter, L. (1987) Genetic manipulation of virulence of Yersinia enterocolitica. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 312-316.
- Heesemann, J., Sing, A., and Trulzsch, K. (2006) Yersinia's stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol* **9**: 55-61.
- Heise, T. and Dersch, P. (2006) Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3375-3380.
- Hentschke, M., Berneking, L., Belmar, C. C., Buck, F., Ruckdeschel, K., and Aepfelbacher, M. (2010) Yersinia virulence factor YopM induces sustained RSK activation by interfering with dephosphorylation. *PLoS One* **5**.
- Heroven, A. K. and Dersch, P. (2006) RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene rovA, controls cell invasion, virulence and motility of Yersinia pseudotuberculosis. *Mol Microbiol* **62**: 1469-1483.
- Heusipp, G., Spekker, K., Brast, S., Falker, S., and Schmidt, M. A. (2006) YopM of Yersinia enterocolitica specifically interacts with alpha1-antitrypsin without affecting the anti-protease activity. *Microbiology* **152**: 1327-1335.
- Heyworth, P. G., Robinson, J. M., Ding, J., Ellis, B. A., and Badwey, J. A. (1997) Cofilin undergoes rapid dephosphorylation in stimulated neutrophils and translocates to ruffled membranes enriched in products of the NADPH oxidase complex. Evidence for a novel cycle of phosphorylation and dephosphorylation. *Histochem Cell Biol* **108**: 221-233.
- Hoffmann, R., van, E. K., Trulzsch, K., and Heesemann, J. (2004) Transcriptional responses of murine macrophages to infection with Yersinia enterocolitica. *Cell Microbiol* **6**: 377-390.
- Hoiczky, E. and Blobel, G. (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen Yersinia enterocolitica into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4669-4674.

- Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., and Heesemann, J. (2000) Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**: 5989-5999.
- Holmes, B., Page, A. R., and Good, R. A. (1967) Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest* **46**: 1422-1432.
- Holmstrom, A., Petterson, J., Rosqvist, R., Hakansson, S., Tafazoli, F., Fallman, M. *et al.* (1997) YopK of Yersinia pseudotuberculosis controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol Microbiol* **24**: 73-91.
- Holmstrom, A., Rosqvist, R., Wolf-Watz, H., and Forsberg, A. (1995) Virulence plasmid-encoded YopK is essential for Yersinia pseudotuberculosis to cause systemic infection in mice. *Infect Immun* **63**: 2269-2276.
- Holmstrom, A., Rosqvist, R., Wolf-Watz, H., and Forsberg, A. (1995) YopK, a novel virulence determinant of Yersinia pseudotuberculosis. *Contrib Microbiol Immunol* **13**: 239-243.
- Hsieh, P. F., Lin, T. L., Lee, C. Z., Tsai, S. F., and Wang, J. T. (2008) Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in Klebsiella pneumoniae causing primary pyogenic liver abscess. *J Infect Dis* **197**: 1717-1727.
- Hurvel, B. Zoonotic Yersinia enterocolitica infection: host range clinical manifestation and transmission between animals and man, in Bottone E. J. (Ed.), Yersinia enterocolitica, *CRC Press*, Boca Raton, FL, 1981, pp.145-160.
- Ibrahim, A., Goebel, B. M., Liesack, W., Griffiths, M., and Stackebrandt, E. (1993) The phylogeny of the genus Yersinia based on 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* **114**: 173-177.
- Inanami, O., Johnson, J. L., McAdara, J. K., Benna, J. E., Faust, L. R., Newburger, P. E. *et al.* (1998) Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304. *J Biol Chem* **273**: 9539-9543.
- Inoue, T., Okamoto, K., Moriyama, T., Takahashi, T., Shimizu, K., and Miyama, A. (1983) Effect of Yersinia enterocolitica ST on cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels in mouse intestines and cultured cells. *Microbiol Immunol* **27**: 159-166.
- Iriarte, M. and Cornelis, G. R. (1998) YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* **29**: 915-929.
- Iriarte, M., Sory, M. P., Boland, A., Boyd, A. P., Mills, S. D., Lambermont, I. *et al.* (1998) TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of Yersinia Yop effectors. *EMBO J* **17**: 1907-1918.
- Iriarte, M., Vanooteghem, J. C., Delor, I., Diaz, R., Knutton, S., and Cornelis, G. R. (1993) The Myf fibrillae of Yersinia enterocolitica. *Mol Microbiol* **9**: 507-520.
- Isaksson, E. L., Aili, M., Fahlgren, A., Carlsson, S. E., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (2009) The membrane localization domain is required for intracellular localization and autoregulation of YopE in Yersinia pseudotuberculosis. *Infect Immun* **77**: 4740-4749.

- Isberg, R. R., Hamburger, Z., and Dersch, P. (2000) Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect* **2**: 793-801.
- Isberg, R. R. and Leong, J. M. (1990) Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**: 861-871.
- Isberg, R. R., Voorhis, D. L., and Falkow, S. (1987) Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**: 769-778.
- Itou, T., Collins, L. V., Thoren, F. B., Dahlgren, C., and Karlsson, A. (2006) Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) during inflammation: a comparison of bone marrow and peritoneal exudate PMN. *Clin Vaccine Immunol* **13**: 575-583.
- Ivanov, M. I., Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Saper, M. A., and Bliska, J. B. (2005) Two substrate-targeting sites in the Yersinia protein tyrosine phosphatase co-operate to promote bacterial virulence. *Mol Microbiol* **55**: 1346-1356.
- Jaffe, A. B. and Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-269.
- Jakus, Z., Fodor, S., Abram, C. L., Lowell, C. A., and Mocsai, A. (2007) Immunoreceptor-like signaling by beta 2 and beta 3 integrins. *Trends Cell Biol* **17**: 493-501.
- Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.
- Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport M., Shlomchik, M., J. (2005) Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th edition. *Garland Science Publishing*. pp. 37-100
- Jin, X., Qin, Q., Chen, W., and Qu, J. (2007) Expression of toll-like receptors in the healthy and herpes simplex virus-infected cornea. *Cornea* **26**: 847-852.
- Johnson, J. L., Park, J. W., Benna, J. E., Faust, L. P., Inanami, O., and Babior, B. M. (1998) Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem* **273**: 35147-35152.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G. R. (2003) The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**: 1757-1760.
- Juris, S. J., Rudolph, A. E., Huddler, D., Orth, K., and Dixon, J. E. (2000) A distinctive role for the Yersinia protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9431-9436.
- Juris, S. J., Shah, K., Shokat, K., Dixon, J. E., and Vacratsis, P. O. (2006) Identification of otubain 1 as a novel substrate for the Yersinia protein kinase using chemical genetics and mass spectrometry. *FEBS Lett* **580**: 179-183.
- Juris, S. J., Shao, F., and Dixon, J. E. (2002) Yersinia effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol* **4**: 201-211.

- Kang, T., Yi, J., Guo, A., Wang, X., Overall, C. M., Jiang, W. *et al.* (2001) Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem* **276**: 21960-21968.
- Kapperud, G., Namork, E., Skurnik, M., and Nesbakken, T. (1987) Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. *Infect Immun* **55**: 2247-2254.
- Karlsson, A., Nixon, J. B., and McPhail, L. C. (2000) Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol* **67**: 396-404.
- Katayama, T., Hayashi, Y., Nagahira, K., Konishi, K., Yamaichi, K., and Oikawa, S. (2003) Imidocarb, a potent anti-protozoan drug, up-regulates interleukin-10 production by murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **309**: 414-418.
- Katoh, H. and Negishi, M. (2003) RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* **424**: 461-464.
- Kaufmann, S. H. E. and Steward, M. W. (2005) *Immunology*. Washington, DC: Hodder Arnold.
- Kellog, C. M., Tarakji, E. A., Smith, M., Brown, P. D. (1995) Bacteremia and suppurative lymphadenitis due to *Yersinia enterocolitica* in a neutropenic patient who prepared chitterlings. *Clin. Infect. Dis.* **21**:236-237
- Kerschen, E. J., Cohen, D. A., Kaplan, A. M., and Straley, S. C. (2004) The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect Immun* **72**: 4589-4602.
- Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A. M., Skurnik, M., and Meri, S. (2008) *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog* **4**: e1000140.
- Kjeldsen, L., Sengelov, H., Lollike, K., Nielsen, M. H., and Borregaard, N. (1994) Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood* **83**: 1640-1649.
- Knaus, U. G., Heyworth, P. G., Kinsella, B. T., Curnutte, J. T., and Bokoch, G. M. (1992) Purification and characterization of Rac 2. A cytosolic GTP-binding protein that regulates human neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* **267**: 23575-23582.
- Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Somerville, G. A., Braughton, K. R., Malech, H. L., Musser, J. M. *et al.* (2003) An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* **73**: 315-322.
- Koberle, M., Klein-Gunther, A., Schutz, M., Fritz, M., Berchtold, S., Tolosa, E. *et al.* (2009) *Yersinia enterocolitica* targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model. *PLoS Pathog* **5**: e1000551.
- Koster, M., Bitter, W., de, C. H., Allaoui, A., Cornelis, G. R., and Tommassen, J. (1997) The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* **26**: 789-797.

- Krall, R., Zhang, Y., and Barbieri, J. T. (2004) Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and Yersinia YopE in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**: 2747-2753.
- Kubes, P., Niu, X. F., Smith, C. W., Kehrli, M. E., Jr., Reinhardt, P. H., and Woodman, R. C. (1995) A novel beta 1-dependent adhesion pathway on neutrophils: a mechanism invoked by dihydrocytochalasin B or endothelial transmigration. *FASEB J* **9**: 1103-1111.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I., and Galan, J. E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10225-10230.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lambert de, R. C., Sluifers, C., and Cornelis, G. R. (1992) Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of Yersinia enterocolitica. *Mol Microbiol* **6**: 395-409.
- Lammermann, T., Bader, B. L., Monkley, S. J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K. *et al.* (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* **453**: 51-55.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* **5**: 227-231.
- Lee, L. A., Gerber, A. R., Lonsway, D. R., Smith, J. D., Carter, G. P., Puhr, N. D. *et al.* (1990) Yersinia enterocolitica O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *N Engl J Med* **322**: 984-987.
- Lehrer, R. I. and Ganz, T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* **11**: 23-27.
- Leibiger, R., Niedung, K., Geginat, G., Heesemann, J., and Trulzsch, K. (2008) Yersinia enterocolitica Yop mutants as oral live carrier vaccines. *Vaccine* **26**: 6664-6670.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* **86**: 973-983.
- Lemaitre, N., Sebbane, F., Long, D., and Hinnebusch, B. J. (2006) Yersinia pestis YopJ suppresses tumor necrosis factor alpha induction and contributes to apoptosis of immune cells in the lymph node but is not required for virulence in a rat model of bubonic plague. *Infect Immun* **74**: 5126-5131.
- Leo, J. C., Elovaara, H., Bihan, D., Pugh, N., Kilpinen, S. K., Raynal, N. *et al.* (2010) First analysis of a bacterial collagen-binding protein with collagen Toolkits: promiscuous binding of YadA to collagens may explain how YadA interferes with host processes. *Infect Immun* **78**: 3226-3236.
- Leo, J. C., Elovaara, H., Brodsky, B., Skurnik, M., and Goldman, A. (2008) The Yersinia adhesin YadA binds to a collagenous triple-helical conformation but without sequence specificity. *Protein Eng Des Sel* **21**: 475-484.

- Leonard, J. N., Ghirlando, R., Askins, J., Bell, J. K., Margulies, D. H., Davies, D. R. *et al.* (2008) The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 258-263.
- Leong, J. M., Fournier, R. S., and Isberg, R. R. (1990) Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J* **9**: 1979-1989.
- Leong, J. M., Morrissey, P. E., Marra, A., and Isberg, R. R. (1995) An aspartate residue of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that is critical for integrin binding. *EMBO J* **14**: 422-431.
- Letzelter, M., Sorg, I., Mota, L. J., Meyer, S., Stalder, J., Feldman, M. *et al.* (2006) The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J* **25**: 3223-3233.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**: 678-689.
- Lian, C. J. and Pai, C. H. (1985) Inhibition of human neutrophil chemiluminescence by plasmid-mediated outer membrane proteins of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **49**: 145-151.
- Liang, F., Huang, Z., Lee, S. Y., Liang, J., Ivanov, M. I., Alonso, A. *et al.* (2003) Aurintricarboxylic acid blocks in vitro and in vivo activity of YopH, an essential virulent factor of *Yersinia pestis*, the agent of plague. *J Biol Chem* **278**: 41734-41741.
- Lilo, S., Zheng, Y., and Bliska, J. B. (2008) Caspase-1 activation in macrophages infected with *Yersinia pestis* KIM requires the type III secretion system effector YopJ. *Infect Immun* **76**: 3911-3923.
- Lin, T. H., Rosales, C., Mondal, K., Bolen, J. B., Haskill, S., and Juliano, R. L. (1995) Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem* **270**: 16189-16197.
- Lindler, L. E., Klempner, M. S., and Straley, S. C. (1990) *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. *Infect Immun* **58**: 2569-2577.
- Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I. B., Lupas, A., and Kempf, V. A. (2006) Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* **14**: 264-270.
- Lloyd, S. A., Norman, M., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (2001) *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol* **39**: 520-531.
- Logsdon, L. K. and Meccas, J. (2003) Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. *Infect Immun* **71**: 4595-4607.
- Logsdon, L. K. and Meccas, J. (2006) The proinflammatory response induced by wild-type *Yersinia pseudotuberculosis* infection inhibits survival of yop mutants in the gastrointestinal tract and Peyer's patches. *Infect Immun* **74**: 1516-1527.

- Lomax, K. J., Leto, T. L., Nunoi, H., Gallin, J. I., and Malech, H. L. (1989) Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science* **245**: 409-412.
- Lu, M. and Ravichandran, K. S. (2006) Dock180-ELMO cooperation in Rac activation. *Methods Enzymol* **406**: 388-402.
- Lundgren, E., Carballeira, N., Vazquez, R., Dubinina, E., Branden, H., Persson, H. *et al.* (1996) Invasin of *Yersinia pseudotuberculosis* activates human peripheral B cells. *Infect Immun* **64**: 829-835.
- Luo, B. H., Carman, C. V., and Springer, T. A. (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25**: 619-647.
- Mack, D., Heesemann, J., and Laufs, R. (1994) Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA. *Med Microbiol Immunol* **183**: 217-227.
- Marketon, M. M., DePaolo, R. W., DeBord, K. L., Jabri, B., and Schneewind, O. (2005) Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* **309**: 1739-1741.
- Marmur, J. and Grossman, L. (1961) Ultraviolet light induced linking of deoxyribonucleic acid strands and its reversal by photoreactivating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**: 778-787.
- Martinez, R. J. (1983) Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **41**: 921-930.
- Martinez, R. J. (1989) Thermoregulation-dependent expression of *Yersinia enterocolitica* protein 1 imparts serum resistance to *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **171**: 3732-3739.
- Matsumoto, H. and Young, G. M. (2006) Proteomic and functional analysis of the suite of Ysp proteins exported by the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B. *Mol Microbiol* **59**: 689-706.
- Mattoo, S., Lee, Y. M., and Dixon, J. E. (2007) Interactions of bacterial effector proteins with host proteins. *Curr Opin Immunol* **19**: 392-401.
- May, R. C. and Machesky, L. M. (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **114**: 1061-1077.
- McCoy, M. W., Marre, M. L., Lesser, C. F., and Mecsas, J. (2010) The C-terminal tail of *Yersinia pseudotuberculosis* YopM is critical for interacting with RSK1 and for virulence. *Infect Immun* **78**: 2584-2598.
- McDonald, C., Vacratsis, P. O., Bliska, J. B., and Dixon, J. E. (2003) The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* **278**: 18514-18523.
- McGraw, E. A., Li, J., Selander, R. K., and Whittam, T. S. (1999) Molecular evolution and mosaic structure of alpha, beta, and gamma intimins of pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **16**: 12-22.

- McPhee, J. B., Mena, P., and Bliska, J. B. (2010) Delineation of regions of the Yersinia YopM protein required for interaction with the RSK1 and PRK2 host kinases and their requirement for interleukin-10 production and virulence. *Infect Immun* **78**: 3529-3539.
- Medzhitov, R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**: 819-826.
- Mejia, E., Bliska, J. B., and Viboud, G. I. (2008) Yersinia controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity. *PLoS Pathog* **4**: e3.
- Mestas, J. and Hughes, C. C. (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* **172**: 2731-2738.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J. M., and Cornelis, G. (1990) Secretion of Yop proteins by Yersiniae. *Infect Immun* **58**: 2840-2849.
- Mikulskis, A. V., Delor, I., Thi, V. H., and Cornelis, G. R. (1994) Regulation of the Yersinia enterocolitica enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol Microbiol* **14**: 905-915.
- Miller, V. L., Beer, K. B., Heusipp, G., Young, B. M., and Wachtel, M. R. (2001) Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol Microbiol* **41**: 1053-1062.
- Miller, V. L., Bliska, J. B., and Falkow, S. (1990) Nucleotide sequence of the Yersinia enterocolitica ail gene and characterization of the Ail protein product. *J Bacteriol* **172**: 1062-1069.
- Miller, V. L. and Falkow, S. (1988) Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **56**: 1242-1248.
- Miller, V. L., Farmer, J. J., III, Hill, W. E., and Falkow, S. (1989) The ail locus is found uniquely in Yersinia enterocolitica serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun* **57**: 121-131.
- Miranti, C. K., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J. S., and Shattil, S. J. (1998) Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol* **8**: 1289-1299.
- Mittal, R., Peak-Chew, S. Y., and McMahon, H. T. (2006) Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18574-18579.
- Mittal, R., Peak-Chew, S. Y., Sade, R. S., Vallis, Y., and McMahon, H. T. (2010) The acetyltransferase activity of the bacterial toxin YopJ of Yersinia is activated by eukaryotic host cell inositol hexakisphosphate. *J Biol Chem* **285**: 19927-19934.
- Mocsai, A., Abram, C. L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L. L., and Lowell, C. A. (2006) Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol* **7**: 1326-1333.

- Mogemark, L., McGee, K., Yuan, M., Deleuil, F., and Fallman, M. (2005) Disruption of target cell adhesion structures by the *Yersinia* effector YopH requires interaction with the substrate domain of p130Cas. *Eur J Cell Biol* **84**: 477-489.
- Mohammadi, S. and Isberg, R. R. (2009) *Yersinia pseudotuberculosis* virulence determinants invasin, YopE, and YopT modulate RhoG activity and localization. *Infect Immun* **77**: 4771-4782.
- Monack, D. M., Meccas, J., Bouley, D., and Falkow, S. (1998) *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. *J Exp Med* **188**: 2127-2137.
- Montagna, L. G., Ivanov, M. I., and Bliska, J. B. (2001) Identification of residues in the N-terminal domain of the *Yersinia* tyrosine phosphatase that are critical for substrate recognition. *J Biol Chem* **276**: 5005-5011.
- Moon, S. Y. and Zheng, Y. (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**: 13-22.
- Morimatsu, T., Kawagoshi, A., Yoshida, K., and Tamura, M. (1997) Actin enhances the activation of human neutrophil NADPH oxidase in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* **230**: 206-210.
- Mota, L. J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C., and Cornelis, G. R. (2005) Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**: 1278.
- Mueller, C. A., Broz, P., Muller, S. A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I. *et al.* (2005) The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* **310**: 674-676.
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H. L., Goldsmith, E. J. *et al.* (2006) *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**: 1211-1214.
- Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M. P., and Cornelis, G. (1989) Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun* **57**: 2534-2541.
- Murros-Konttiainen, A., Johansson, P., Niskanen, T., Fredriksson-Ahomaa, M., Korkeala, H. and Johanna Björkroth (2011) *Yersinia pekkanenii* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbio* **61**:2363-2367
- Nagel, G., Lahrz, A., and Dersch, P. (2001) Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol* **41**: 1249-1269.
- Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**: 173-182.
- Nauseef, W. M. (2007) How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* **219**: 88-102.
- Navarro, L., Alto, N. M., and Dixon, J. E. (2005) Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. *Curr Opin Microbiol* **8**: 21-27.

- Navarro, L., Koller, A., Nordfelth, R., Wolf-Watz, H., Taylor, S., and Dixon, J. E. (2007) Identification of a molecular target for the Yersinia protein kinase A. *Mol Cell* **26**: 465-477.
- ndersen-Nissen, E., Smith, K. D., Bonneau, R., Strong, R. K., and Aderem, A. (2007) A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J Exp Med* **204**: 393-403.
- Neyt, C. and Cornelis, G. R. (1999) 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* **33**: 971-981.
- Nummelin, H., Merckel, M. C., Leo, J. C., Lankinen, H., Skurnik, M., and Goldman, A. (2004) The Yersinia adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J* **23**: 701-711.
- Oellerich, M. F., Jacobi, C. A., Freund, S., Niedung, K., Bach, A., Heesemann, J. *et al.* (2007) Yersinia enterocolitica infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect Immun* **75**: 3802-3811.
- Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., and Satow, Y. (2007) Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science* **316**: 1632-1634.
- Okamura, N., Malawista, S. E., Roberts, R. L., Rosen, H., Ochs, H. D., Babior, B. M. *et al.* (1988) Phosphorylation of the oxidase-related 48K phosphoprotein family in the unusual autosomal cytochrome-negative and X-linked cytochrome-positive types of chronic granulomatous disease. *Blood* **72**: 811-816.
- Olsson, C., Olofsson, T., Ahrne, S., and Molin, G. (2003) The Yersinia HPI is present in Serratia liquefaciens isolated from meat. *Lett Appl Microbiol* **37**: 275-280.
- Orth, K., Palmer, L. E., Bao, Z. Q., Stewart, S., Rudolph, A. E., Bliska, J. B. *et al.* (1999) Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* **285**: 1920-1923.
- Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M. B., Bao, Z. Q., Palmer, L. E., Bliska, J. B. *et al.* (2000) Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* **290**: 1594-1597.
- Owen, C. A. and Campbell, E. J. (1999) Extracellular proteolysis: new paradigms for an old paradox. *J Lab Clin Med* **134**: 341-351.
- Owen, K. A., Thomas, K. S., and Bouton, A. H. (2007) The differential expression of Yersinia pseudotuberculosis adhesins determines the requirement for FAK and/or Pyk2 during bacterial phagocytosis by macrophages. *Cell Microbiol* **9**: 596-609.
- Paauw, A., Leverstein-van Hall, M. A., van Kessel, K. P., Verhoef, J., and Fluit, A. C. (2009) Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. *PLoS One* **4**: e8240.
- Pabst, R. and Gehrke, I. (1990) Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? *Am J Respir Cell Mol Biol* **3**: 131-135.

- Paerregaard, A., Espersen, F., Jensen, O. M., and Skurnik, M. (1991) Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect Immun* **59**: 253-260.
- Paerregaard, A., Espersen, F., and Skurnik, M. (1991) Adhesion of yersiniae to rabbit intestinal constituents: role of outer membrane protein YadA and modulation by intestinal mucus. *Contrib Microbiol Immunol* **12**: 171-175.
- Paerregaard, A., Espersen, F., and Skurnik, M. (1991) Role of the *Yersinia* outer membrane protein YadA in adhesion to rabbit intestinal tissue and rabbit intestinal brush border membrane vesicles. *APMIS* **99**: 226-232.
- Pai, C. H. and DeStephano, L. (1982) Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **35**: 605-611.
- Pai, C. H. and Mors, V. (1978) Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **19**: 908-911.
- Palmer, L. E., Hobbie, S., Galan, J. E., and Bliska, J. B. (1998) YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* **27**: 953-965.
- Park, J. W., Benna, J. E., Scott, K. E., Christensen, B. L., Chanock, S. J., and Babior, B. M. (1994) Isolation of a complex of respiratory burst oxidase components from resting neutrophil cytosol. *Biochemistry* **33**: 2907-2911.
- Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C. A., Schubert, S., and Heesemann, J. (1998) The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol* **180**: 538-546.
- Pepe, J. C., Badger, J. L., and Miller, V. L. (1994) Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. *Mol Microbiol* **11**: 123-135.
- Pepe, J. C. and Miller, V. L. (1990) The *Yersinia enterocolitica* *inv* gene product is an outer membrane protein that shares epitopes with *Yersinia pseudotuberculosis* *invasin*. *J Bacteriol* **172**: 3780-3789.
- Pepe, J. C. and Miller, V. L. (1993) *Yersinia enterocolitica* *invasin*: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6473-6477.
- Pepe, J. C., Wachtel, M. R., Wagar, E., and Miller, V. L. (1995) Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun* **63**: 4837-4848.
- Pérez-Gutiérrez, C., Llobet, E., Llompart, C. M., Reinés, M. and Bengoechea, J. A. (2010) Role of Lipid A Acetylation in *Yersinia enterocolitica* virulence. *Infect Immun* **6**: 2768-2781.
- Perry, R. D. and Brubaker, R. R. (1983) Vwa+ phenotype of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **40**: 166-171.

- Persson, C., Carballeira, N., Wolf-Watz, H., and Fallman, M. (1997) The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* **16**: 2307-2318.
- Persson, C., Nordfelth, R., Andersson, K., Forsberg, A., Wolf-Watz, H., and Fallman, M. (1999) Localization of the Yersinia PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. *Mol Microbiol* **33**: 828-838.
- Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K. E. *et al.* (1996) Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* **273**: 1231-1233.
- Pickart, C. M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* **25**: 544-548.
- Pierson, D. E. and Falkow, S. (1993) The ail gene of Yersinia enterocolitica has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect Immun* **61**: 1846-1852.
- Pilz, D., Vocke, T., Heesemann, J., and Brade, V. (1992) Mechanism of YadA-mediated serum resistance of Yersinia enterocolitica serotype O3. *Infect Immun* **60**: 189-195.
- Portnoy, D. A. and Martinez, R. J. (1985) Role of a plasmid in the pathogenicity of Yersinia species. *Curr Top Microbiol Immunol* **118**: 29-51.
- Portnoy, D. A., Moseley, S. L., and Falkow, S. (1981) Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of Yersinia enterocolitica pathogenesis. *Infect Immun* **31**: 775-782.
- Prehna, G., Ivanov, M. I., Bliska, J. B., and Stebbins, C. E. (2006) Yersinia virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* **126**: 869-880.
- Quenee, L. E. and Schneewind, O. (2007) Ubiquitin-Yop hybrids as probes for post-translational transport by the Yersinia type III secretion pathway. *Mol Microbiol* **65**: 386-400.
- Quinn, M. T., Evans, T., Loetterle, L. R., Jesaitis, A. J., and Bokoch, G. M. (1993) Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J Biol Chem* **268**: 20983-20987.
- Quinn, M. T. and Gauss, K. A. (2004) Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* **76**: 760-781.
- Quinn, M. T., Parkos, C. A., and Jesaitis, A. J. (1989) The lateral organization of components of the membrane skeleton and superoxide generation in the plasma membrane of stimulated human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* **987**: 83-94.
- Rakin, A., Noelting, C., Schubert, S., and Heesemann, J. (1999) Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* **67**: 5265-5274.
- Rakin, A., Saken, E., Harmsen, D., and Heesemann, J. (1994) The pesticin receptor of Yersinia enterocolitica: a novel virulence factor with dual function. *Mol Microbiol* **13**: 253-263.

- Rameh, L. E., Rhee, S. G., Spokes, K., Kazlauskas, A., Cantley, L. C., and Cantley, L. G. (1998) Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase C γ -mediated calcium signaling. *J Biol Chem* **273**: 23750-23757.
- Rao, M. C., Guandalini, S., Smith, P. L., and Field, M. (1980) Mode of action of heat-stable Escherichia coli enterotoxin. Tissue and subcellular specificities and role of cyclic GMP. *Biochim Biophys Acta* **632**: 35-46.
- Ratliff, N. B., Wilson, J. W., Mikat, E., Hackel, D. B., and Graham, T. C. (1971) The lung in hemorrhagic shock. IV. The role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Am J Pathol* **65**: 325-334.
- Reisner, B. S. and Straley, S. C. (1992) Yersinia pestis YopM: thrombin binding and overexpression. *Infect Immun* **60**: 5242-5252.
- Revell, P. A. and Miller, V. L. (2000) A chromosomally encoded regulator is required for expression of the Yersinia enterocolitica inv gene and for virulence. *Mol Microbiol* **35**: 677-685.
- Ridger, V. C., Wagner, B. E., Wallace, W. A., and Hellewell, P. G. (2001) Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. *J Immunol* **166**: 3484-3490.
- Ridley, A. J., Self, A. J., Kasmi, F., Paterson, H. F., Hall, A., Marshall, C. J. *et al.* (1993) rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J* **12**: 5151-5160.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F. (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 588-593.
- Rodgers, L., Mukerjea, R., Birtalan, S., Friedberg, D., and Ghosh, P. (2010) A solvent-exposed patch in chaperone-bound YopE is required for translocation by the type III secretion system. *J Bacteriol* **192**: 3114-3122.
- Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C. A., Truelzsch, K., Hoffmann, H., and Heesemann, J. (2003) Molecular analysis of transport and oligomerization of the Yersinia enterocolitica adhesin YadA. *J Bacteriol* **185**: 3735-3744.
- Roggenkamp, A., Neuberger, H. R., Flugel, A., Schmoll, T., and Heesemann, J. (1995) Substitution of two histidine residues in YadA protein of Yersinia enterocolitica abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**: 1207-1219.
- Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R., and Heesemann, J. (1996) Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of Yersinia enterocolitica serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* **64**: 2506-2514.
- Roos, D., de, B. M., Kuribayashi, F., Meischl, C., Weening, R. S., Segal, A. W. *et al.* (1996) Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* **87**: 1663-1681.
- Rozenaal, R. and Carroll, M. C. (2006) Emerging patterns in complement-mediated pathogen recognition. *Cell* **125**: 29-32.

- Roppenser, B., Roder, A., Hentschke, M., Ruckdeschel, K., and Aepfelbacher, M. (2009) *Yersinia enterocolitica* differentially modulates RhoG activity in host cells. *J Cell Sci* **122**: 696-705.
- Rosqvist, R., Forsberg, A., Rimpilainen, M., Bergman, T., and Wolf-Watz, H. (1990) The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol Microbiol* **4**: 657-667.
- Rosqvist, R., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1991) Microinjection of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Biochem Soc Trans* **19**: 1131-1132.
- Rosqvist, R., Magnusson, K. E., and Wolf-Watz, H. (1994) Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* **13**: 964-972.
- Rosqvist, R., Skurnik, M., and Wolf-Watz, H. (1988) Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature* **334**: 522-524.
- Rotrosen, D. and Leto, T. L. (1990) Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J Biol Chem* **265**: 19910-19915.
- Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S., and Heesemann, J. (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* **64**: 724-733.
- Ruckdeschel, K., Machold, J., Roggenkamp, A., Schubert, S., Pierre, J., Zumbihl, R. *et al.* (1997) *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor- α production. *J Biol Chem* **272**: 15920-15927.
- Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C. A., Trulzsch, K., Rouot, B. *et al.* (2001) *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor- κ B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* **166**: 1823-1831.
- Ruckdeschel, K., Richter, K., Mannel, O., and Heesemann, J. (2001) Arginine-143 of *Yersinia enterocolitica* YopP crucially determines isotype-related NF- κ B suppression and apoptosis induction in macrophages. *Infect Immun* **69**: 7652-7662.
- Ruckdeschel, K., Pfaffinger, G., Haase, R., Sing, A., Weighardt, H., Hacker, G. *et al.* (2004) Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN- β , but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J Immunol* **173**: 3320-3328.
- Ruckdeschel, K., Pfaffinger, G., Trulzsch, K., Zenner, G., Richter, K., Heesemann, J. *et al.* (2006) The proteasome pathway destabilizes *Yersinia* outer protein E and represses its antihost cell activities. *J Immunol* **176**: 6093-6102.

- Russmann, H., Gerdemann, U., Igwe, E. I., Panthel, K., Heesemann, J., Garbom, S. *et al.* (2003) Attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. *Infect Immun* **71**: 3463-3472.
- Saha, S., Gupta, D. D., and Chakrabarti, M. K. (2005) Involvement of phospholipase C in *Yersinia enterocolitica* heat stable enterotoxin (Y-STa) mediated rise in intracellular calcium level in rat intestinal epithelial cells. *Toxicon* **45**: 361-367.
- Sauvonnet, N., Lambermont, I., van der, B. P., and Cornelis, G. R. (2002) YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Microbiol* **45**: 805-815.
- Sauvonnet, N., Pradet-Balade, B., Garcia-Sanz, J. A., and Cornelis, G. R. (2002) Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J Biol Chem* **277**: 25133-25142.
- Savill, J. and Haslett, C. (1995) Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol* **6**: 385-393.
- Sbarra, A. J. and Karnovsky, M. L. (1959) The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* **234**: 1355-1362.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., and Wittinghofer, A. (1998) GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci* **23**: 257-262.
- Schesser, K., Frithz-Lindsten, E., and Wolf-Watz, H. (1996) Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *J Bacteriol* **178**: 7227-7233.
- Schesser, K., Spiik, A. K., Dukuzumuremyi, J. M., Neurath, M. F., Pettersson, S., and Wolf-Watz, H. (1998) The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* **28**: 1067-1079.
- Schotte, P., Denecker, G., Van Den, B. A., Vandenabeele, P., Cornelis, G. R., and Beyaert, R. (2004) Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J Biol Chem* **279**: 25134-25142.
- Schubert, S., Bockemuhl, J., Brendler, U., and Heesemann, J. (2003) First isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* O8, biotype 1B in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**: 66-68.
- Schubert, S., Rakin, A., and Heesemann, J. (2004) The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* **294**: 83-94.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., and Heesemann, J. (1998) Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* **66**: 480-485.

- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., Kirsch, T., Swoboda, B., Bull, C. *et al.* (1993) Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect Immun* **61**: 2513-2519.
- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., von der, M. K., and Emmrich, F. (1992) Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect Immun* **60**: 2153-2159.
- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., von der, M. K., and Emmrich, F. (1995) Characterization of the binding region for the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA on types I and II collagen. *Arthritis Rheum* **38**: 1283-1289.
- Schutz, M., Weiss, E. M., Schindler, M., Hallstrom, T., Zipfel, P. F., Linke, D. *et al.* (2010) Trimer stability of YadA is critical for virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **78**: 2677-2690.
- Segal, A. W., Heyworth, P. G., Cockcroft, S., and Barrowman, M. M. (1985) Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein. *Nature* **316**: 547-549.
- Selvaraj, R. J. and SBARRA, A. J. (1966) Relationship of glycolytic and oxidative metabolism to particle entry and destruction in phagocytosing cells. *Nature* **211**: 1272-1276.
- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J., and Nagano, T. (2003) Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem* **278**: 3170-3175.
- Shao, F. (2008) Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Curr Opin Microbiol* **11**: 21-29.
- Shao, F. and Dixon, J. E. (2003) YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. *Adv Exp Med Biol* **529**: 79-84.
- Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W., and Dixon, J. E. (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**: 575-588.
- Sheppard, F. R., Kelher, M. R., Moore, E. E., McLaughlin, N. J., Banerjee, A., and Silliman, C. C. (2005) Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* **78**: 1025-1042.
- Simonet, M., Richard, S., and Berche, P. (1990) Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect Immun* **58**: 841-845.
- Simonet, M., Riot, B., Fortineau, N., and Berche, P. (1996) Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect Immun* **64**: 375-379.
- Skryzpek, E. and Straley, S. C. (1993) LcrG, a secreted protein involved in negative regulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **175**: 3520-3528.

- Skrzypek, E., Cowan, C., and Straley, S. C. (1998) Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* **30**: 1051-1065.
- Skrzypek, E., Myers-Morales, T., Whiteheart, S. W., and Straley, S. C. (2003) Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eucaryotic cells. *Infect Immun* **71**: 937-947.
- Skurnik, M. (1985) Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. *Infect Immun* **47**: 183-190.
- Skurnik, M., Bolin, I., Heikkinen, H., Piha, S., and Wolf-Watz, H. (1984) Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* **158**: 1033-1036.
- Skurnik, M., El, T. Y., Saarinen, M., Jalkanen, S., and Toivanen, P. (1994) YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect Immun* **62**: 1252-1261.
- Skurnik, M., Peippo, A., and Ervela, E. (2000) Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol* **37**: 316-330.
- Skurnik, M. and Toivanen, P. (1992) LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **174**: 2047-2051.
- Skurnik, M. and Wolf-Watz, H. (1989) Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* **3**: 517-529.
- Soares, L., Seroogy, C., Skrenta, H., Anandasabapathy, N., Lovelace, P., Chung, C. D. *et al.* (2004) Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. *Nat Immunol* **5**: 45-54.
- Songsungthong, W., Higgins, M. C., Rolan, H. G., Murphy, J. L., and Mecsas, J. (2010) ROS-inhibitory activity of YopE is required for full virulence of *Yersinia* in mice. *Cell Microbiol* **12**: 988-1001.
- Sorg, I., Hoffmann, C., Dumbach, J., Aktories, K., and Schmidt, G. (2003) The C terminus of YopT is crucial for activity and the N terminus is crucial for substrate binding. *Infect Immun* **71**: 4623-4632.
- Sorg, J. A., Miller, N. C., and Schneewind, O. (2005) Substrate recognition of type III secretion machines--testing the RNA signal hypothesis. *Cell Microbiol* **7**: 1217-1225.
- Soundararajan, V., Patel, N., Subramanian, V., Sasisekharan, V., and Sasisekharan, R. (2010) The many faces of the YopM effector from plague causative bacterium *Yersinia pestis* and its implications for host immune modulation. *Innate Immun.*
- Spinner, J. L., Cundiff, J. A., and Kobayashi, S. D. (2008) *Yersinia pestis* type III secretion system-dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function. *Infect Immun* **76**: 3754-3760.

- Spinner, J. L., Seo, K. S., O'Loughlin, J. L., Cundiff, J. A., Minnich, S. A., Bohach, G. A. *et al.* (2010) Neutrophils are resistant to *Yersinia* YopJ/P-induced apoptosis and are protected from ROS-mediated cell death by the type III secretion system. *PLoS One* **5**: e9279.
- Stenhouse, M. A. and Milner, L. V. (1982) *Yersinia enterocolitica*. A hazard in blood transfusion. *Transfusion* **22**: 396-398.
- Straley, S. C. and Bowmer, W. S. (1986) Virulence genes regulated at the transcriptional level by Ca²⁺ in *Yersinia pestis* include structural genes for outer membrane proteins. *Infect Immun* **51**: 445-454.
- Straley, S. C. and Cibull, M. L. (1989) Differential clearance and host-pathogen interactions of YopE- and YopK- YopL- *Yersinia pestis* in BALB/c mice. *Infect Immun* **57**: 1200-1210.
- Straley, S. C., Skrzypek, E., Plano, G. V., and Bliska, J. B. (1993) Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. *Infect Immun* **61**: 3105-3110.
- Svineng, G., Ravuri, C., Rikardsen, O., Huseby, N. E., and Winberg, J. O. (2008) The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connect Tissue Res* **49**: 197-202.
- Sweet, C. R., Conlon, J., Golenbock, D. T., Goguen, J., and Silverman, N. (2007) YopJ targets TRAF proteins to inhibit TLR-mediated NF-kappaB, MAPK and IRF3 signal transduction. *Cell Microbiol* **9**: 2700-2715.
- Takao, T., Tominaga, N., Shimonishi, Y., Hara, S., Inoue, T., and Miyama, A. (1984) Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Biochem Biophys Res Commun* **125**: 845-851.
- Takao, T., Tominaga, N., Yoshimura, S., Shimonishi, Y., Hara, S., Inoue, T. *et al.* (1985) Isolation, primary structure and synthesis of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Eur J Biochem* **152**: 199-206.
- Takenawa, T. and Itoh, T. (2001) Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **1533**: 190-206.
- Tamm, A., Tarkkanen, A. M., Korhonen, T. K., Kuusela, P., Toivanen, P., and Skurnik, M. (1993) Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **10**: 995-1011.
- Tauxe, R. V., Vandepitte, J., Wauters, G., Martin, S. M., Goossens, V., De, M. P. *et al.* (1987) *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* **1**: 1129-1132.
- Terti, R., Skurnik, M., Vartio, T., and Kuusela, P. (1992) Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun* **60**: 3021-3024.
- Thiefes, A., Wolf, A., Doerrie, A., Grassl, G. A., Matsumoto, K., Autenrieth, I. *et al.* (2006) The *Yersinia enterocolitica* effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway. *EMBO Rep* **7**: 838-844.

- Thornton, B. P., Vetvicka, V., Pitman, M., Goldman, R. C., and Ross, G. D. (1996) Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol* **156**: 1235-1246.
- Toyos, J., Diaz, R., Urra, E., and Moriyon, I. (1986) Analysis by coagglutination of the distribution of a 24,000-dalton surface protein in *Yersinia* isolates. *J Clin Microbiol* **23**: 804-805.
- Trasak, C., Zenner, G., Vogel, A., Yuksekdog, G., Rost, R., Haase, I. *et al.* (2007) *Yersinia* protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process. *J Biol Chem* **282**: 2268-2277.
- Trcek, J., Wilharm, G., Jacobi, C. A., and Heesemann, J. (2002) *Yersinia enterocolitica* YopQ: strain-dependent cytosolic accumulation and post-translational secretion. *Microbiology* **148**: 1457-1465.
- Triantafyllou, M., Gamper, F. G., Haston, R. M., Mouratis, M. A., Morath, S., Hartung, T. *et al.* (2006) Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* **281**: 31002-31011.
- Trosky, J. E., Liverman, A. D., and Orth, K. (2008) *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* **10**: 557-565.
- Trulzsch, K., Geginat, G., Sporleder, T., Ruckdeschel, K., Hoffmann, R., Heesemann, J. *et al.* (2005) *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J Immunol* **174**: 4244-4251.
- Trulzsch, K., Roggenkamp, A., Aepfelbacher, M., Wilharm, G., Ruckdeschel, K., and Heesemann, J. (2003) Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int J Med Microbiol* **293**: 167-177.
- Trulzsch, K., Sporleder, T., Igwe, E. I., Russmann, H., and Heesemann, J. (2004) Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* **72**: 5227-5234.
- Trulzsch, K., Sporleder, T., Leibiger, R., Russmann, H., and Heesemann, J. (2008) *Yersinia* as oral live carrier vaccine: influence of *Yersinia* outer proteins (Yops) on the T-cell response. *Int J Med Microbiol* **298**: 59-67.
- Uliczka, F., Kornprobst, T., Eitel, J., Schneider, D., and Dersch, P. (2009) Cell invasion of *Yersinia pseudotuberculosis* by invasin and YadA requires protein kinase C, phospholipase C-gamma1 and Akt kinase. *Cell Microbiol* **11**: 1782-1801.
- Underhill, D. M. and Ozinsky, A. (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* **20**: 825-852.
- Underhill, D. M. and Ozinsky, A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* **14**: 103-110.
- Urban, C. F., Lourido, S., and Zychlinsky, A. (2006) How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol* **8**: 1687-1696.

- Van Aelst L. and Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**: 2295-2322.
- Van Bruggen R., Drewniak, A., Jansen, M., van, H. M., Roos, D., Chapel, H. *et al.* (2009) Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles. *Mol Immunol* **47**: 575-581.
- Van Haastert, P. J. and Devreotes, P. N. (2004) Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 626-634.
- Viboud, G. I. and Bliska, J. B. (2001) A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *EMBO J* **20**: 5373-5382.
- Viboud, G. I. and Bliska, J. B. (2005) Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **59**: 69-89.
- Viboud, G. I., Mejia, E., and Bliska, J. B. (2006) Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to Yersinia pseudotuberculosis infection. *Cell Microbiol* **8**: 1504-1515.
- Viboud, G. I., So, S. S., Ryndak, M. B., and Bliska, J. B. (2003) Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with Yersinia pseudotuberculosis. *Mol Microbiol* **47**: 1305-1315.
- Vignais, P. V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1428-1459.
- Visser, L. G., Seijmonsbergen, E., Nibbering, P. H., van den Broek, P. J., and van, F. R. (1999) Yops of Yersinia enterocolitica inhibit receptor-dependent superoxide anion production by human granulocytes. *Infect Immun* **67**: 1245-1250.
- Volpp, B. D., Nauseef, W. M., Donelson, J. E., Moser, D. R., and Clark, R. A. (1989) Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 7195-7199.
- Von Pawel-Rammingen, U., Telepnev, M. V., Schmidt, G., Aktories, K., Wolf-Watz, H., and Rosqvist, R. (2000) GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* **36**: 737-748.
- Wachtel, M. R. and Miller, V. L. (1995) In vitro and in vivo characterization of an ail mutant of Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* **63**: 2541-2548.
- Walker, B. A. and Ward, P. A. (1992) Priming and signal transduction in neutrophils. *Biol Signals* **1**: 237-249.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P. *et al.* (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**: 520-562.
- Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T., and Cornelis, G. R. (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by Yersinia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10493-10497.

- Wattiau, P. and Cornelis, G. R. (1993) SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ome secretion of YopE. *Mol Microbiol* **8**: 123-131.
- Wattiau, P. and Cornelis, G. R. (1994) Identification of DNA sequences recognized by VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* yop regulon. *J Bacteriol* **176**: 3878-3884.
- Wauters, G., Kandolo, K., and Janssens, M. (1987) Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 14-21.
- Weidow, C. L., Black, D. S., Bliska, J. B., and Bouton, A. H. (2000) CAS/Crk signalling mediates uptake of *Yersinia* into human epithelial cells. *Cell Microbiol* **2**: 549-560.
- Whalen, M. C., Wang, J. F., Carland, F. M., Heiskell, M. E., Dahlbeck, D., Minsavage, G. V. *et al.* (1993) Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. *Mol Plant Microbe Interact* **6**: 616-627.
- Wientjes, F. B., Hsuan, J. J., Totty, N. F., and Segal, A. W. (1993) p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* **296** (Pt 3): 557-561.
- Wientjes, F. B., Reeves, E. P., Soskic, V., Furthmayr, H., and Segal, A. W. (2001) The NADPH oxidase components p47(phox) and p40(phox) bind to moesin through their PX domain. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 382-388.
- Wiley, D. J., Nordfeldth, R., Rosenzweig, J., DaFonseca, C. J., Gustin, R., Wolf-Watz, H. *et al.* (2006) 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* **40**: 234-243.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., scamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**: 617-653.
- Wittels, E. H., Coalson, J. J., Welch, M. H., and Guenter, C. A. (1974) Pulmonary intravascular leukocyte sequestration. A potential mechanism of lung injury. *Am Rev Respir Dis* **109**: 502-509.
- Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P., and Cornelis, G. R. (1994) YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol* **176**: 1561-1569.
- Woestyn, S., Sory, M. P., Boland, A., Lequenne, O., and Cornelis, G. R. (1996) The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol* **20**: 1261-1271.
- Wong, K. W. and Isberg, R. R. (2005) Emerging views on integrin signaling via Rac1 during invasin-promoted bacterial uptake. *Curr Opin Microbiol* **8**: 4-9.
- Wong, K. W. and Isberg, R. R. (2005) *Yersinia pseudotuberculosis* spatially controls activation and misregulation of host cell Rac1. *PLoS Pathog* **1**: e16.
- Woodside, D. G., Obergfell, A., Leng, L., Wilsbacher, J. L., Miranti, C. K., Brugge, J. S. *et al.* (2001) Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol* **11**: 1799-1804.

- Wren, B. W. (2003) The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **1**: 55-64.
- Xia, Y. and Ross, G. D. (1999) Generation of recombinant fragments of CD11b expressing the functional beta-glucan-binding lectin site of CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol* **162**: 7285-7293.
- Yamauchi, A., Kim, C., Li, S., Marchal, C. C., Towe, J., Atkinson, S. J. *et al.* (2004) Rac2-deficient murine macrophages have selective defects in superoxide production and phagocytosis of opsonized particles. *J Immunol* **173**: 5971-5979.
- Yamauchi, A., Marchal, C. C., Molitoris, J., Pech, N., Knaus, U., Towe, J. *et al.* (2005) Rac GTPase isoform-specific regulation of NADPH oxidase and chemotaxis in murine neutrophils in vivo. Role of the C-terminal polybasic domain. *J Biol Chem* **280**: 953-964.
- Yan, S. R., Huang, M., and Berton, G. (1997) Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J Immunol* **158**: 1902-1910.
- Yang, F. C., Kapur, R., King, A. J., Tao, W., Kim, C., Borneo, J. *et al.* (2000) Rac2 stimulates Akt activation affecting BAD/Bcl-XL expression while mediating survival and actin function in primary mast cells. *Immunity* **12**: 557-568.
- Yang, Y. and Isberg, R. R. (1993) Cellular internalization in the absence of invasins expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis* yadA product. *Infect Immun* **61**: 3907-3913.
- Yao, T., Meccas, J., Healy, J. I., Falkow, S., and Chien, Y. (1999) Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J Exp Med* **190**: 1343-1350.
- Ye, Z., Kerschen, E. J., Cohen, D. A., Kaplan, A. M., van, R. N., and Straley, S. C. (2009) Gr1+ cells control growth of YopM-negative *Yersinia pestis* during systemic plague. *Infect Immun* **77**: 3791-3806.
- Young, G. M. (2007) The Ysa type 3 secretion system of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. *Adv Exp Med Biol* **603**: 286-297.
- Yuan, M., Deleuil, F., and Fallman, M. (2005) Interaction between the *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH and its macrophage substrate, Fyn-binding protein, Fyb. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**: 214-223.
- Zauberman, A., Tidhar, A., Levy, Y., Bar-Haim, E., Halperin, G., Flashner, Y. *et al.* (2009) *Yersinia pestis* endowed with increased cytotoxicity is avirulent in a bubonic plague model and induces rapid protection against pneumonic plague. *PLoS One* **4**: e5938.
- Zauberman, A., Velan, B., Mamroud, E., Flashner, Y., Shafferman, A., and Cohen, S. (2007) Disparity between *Yersinia pestis* and *Yersinia enterocolitica* O:8 in YopJ/YopP-dependent functions. *Adv Exp Med Biol* **603**: 312-320.
- Zen, K., Reaves, T. A., Soto, I., and Liu, Y. (2006) Response to genistein: assaying the activation status and chemotaxis efficacy of isolated neutrophils. *J Immunol Methods* **309**: 86-98.

Zhang, Y. and Bliska, J. B. (2010) YopJ-promoted cytotoxicity and systemic colonization are associated with high levels of murine interleukin-18, gamma interferon, and neutrophils in a live vaccine model of *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Infect Immun* **78**: 2329-2341.

Zhang, Y., Ting, A. T., Marcu, K. B., and Bliska, J. B. (2005) Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with *Yersinia*. *J Immunol* **174**: 7939-7949.

Zhang, Z. Y. (2003) Mechanistic studies on protein tyrosine phosphatases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **73**: 171-220.

Zhou, H., Monack, D. M., Kayagaki, N., Wertz, I., Yin, J., Wolf, B. *et al.* (2005) *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. *J Exp Med* **202**: 1327-1332.

Zhou, L., Tan, A., and Hershenson, M. B. (2004) *Yersinia* YopJ inhibits pro-inflammatory molecule expression in human bronchial epithelial cells. *Respir Physiol Neurobiol* **140**: 89-97.

Zhu, M., Shao, F., Innes, R. W., Dixon, J. E., and Xu, Z. (2004) The crystal structure of *Pseudomonas* avirulence protein AvrPphB: a papain-like fold with a distinct substrate-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 302-307.

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

7 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können, die Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und für jede Menge Ideen und Anregungen.

Für die unkomplizierte Übernahme der Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanke ich mich bei Prof. Dr. Heinrich Jung.

Bei Dr. Hicham Bouabe bedanke ich mich für das Teilen seines großen Erfahrungsschatzes. Durch viele Diskussionen und tolle Anregungen hat er maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bei Dr. Sandra Freund bedanke ich mich für die Einarbeitung und die Zusammenarbeit am 3D-CoG-Projekt.

Dr. Louisa Jiménez Soto danke ich herzlich für das immer offene Ohr bei methodischen und fachlichen Fragen sowie der ganzen AG Haas für die Bereitschaft mit manchem Antikörper und Labormaterial auszuhelfen.

Der AG Ebel danke ich, dass ich ihre große Sammlung an Inhibitoren benutzen durfte.

Allen Blutspendern wie auch allen Ärzten, die ihre Arbeit stets kurz für Blutabnahmen zu jeder Zeit unterbrochen haben, möchte ich ganz herzlich danken.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Labors 407 für ihre Hilfsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima, sowie die vielen fröhlichen Momente. Vielen Dank Bettina, Sandra, Kristina, Christoph und Benjamin.

Ein großes Dankeschön an Julia, Virginie, Christoph und Stefan für die Unterstützung in fachlich Fragen, die rege Diskussionsbereitschaft und die schöne Zeit zusammen im „Büro 327“.

Den Mädels von unserer Mittagsrunde gilt mein besonderer Dank. Ihr habt so manchen schwarzen Tag aufgehellt. Vielen lieben Dank an Tina, Andrea, Iris, Steffi, Claudia, Susi, Julia und Virginie.

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mir durch ihre fortwährende Unterstützung eine umfassende Ausbildung ermöglicht haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden, meinen Eltern, Frank, Ina und besonders bei meinem Mann Rupert für die liebevolle Unterstützung, den bedingungslosen Rückhalt und die große Geduld bedanken. Ihr seid einfach die Besten! Vielen, vielen Dank!