

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

**Untersuchungen zur Produktion und
Chaperoninteraktion von
Yersinia YopE und SycE
mittels Reporterfusionstechnologie**

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

vorgelegt von
Sebastian Gregor
aus Kiel

2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter	Prof. Dr. med. Dr. J. Heesemann
Mitberichterstatter	Prof. Dr. Dr. W. Neupert Priv. Doz. Dr. P. Kufer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter	Dr. rer. nat. C. Jacobi
Dekan	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung	24.06.2004

Meinem Vater und meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Klinisches Bild der humanen Yersiniose	2
1.2 Pathogenitätsfaktoren von <i>Yersinia enterocolitica</i>	3
1.2.1 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren	4
1.2.2 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren	5
1.2.3 Typ III Protein-Sekretionsmechanismus	8
1.2.4 Yop Translokation	10
1.2.5 YopE Translokation/Sekretion	11
1.2.6 Syc E	13
1.3 Reportergenfusionen	14
1.3.1 GFP (Green Fluorescent Protein) und BFP (Blue Fluorescent Protein)	15
1.3.2 Luziferase	18
1.3.3 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	18
1.4 Zielsetzung	21
2 Materialien	23
2.1 Geräte	23
2.2 Sonstige Materialien	24
2.3 Chemikalien	24
2.4 Proteine und Enzyme	25
2.5 Elektrophorese-Marker	25

2.6	Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie, Immunoblot und Immunopräzipitation	25
2.7	Synthetische Oligonukleotide	26
2.8	Plasmide	27
2.9	Bakterienstämme	28
2.10	Medien und Lösungen	30
	2.10.1 Medien für die Bakterienkultur	30
	2.10.2 Puffer und Lösungen	30
3	Methoden	34
3.1	Mikrobiologische Methoden	34
	3.1.1 Kultivierung von Bakterien	34
	3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen	34
	3.1.3 Ausplattieren von Bakterien	34
	3.1.4 Lagerung von Bakterien	34
3.2	Molekularbiologische Methoden	35
	3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA	35
	3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
	3.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	36
	3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	36
	3.2.5 DNA Isolierung aus Agarosegelen	37
	3.2.6 Dephosphorylierung linearisierten Vektors	37
	3.2.7 Ligation	38
	3.2.8 Transformation von <i>E. coli</i>	38
	3.2.9 Elektroporation von <i>Yersinia</i>	38
	3.2.10 Luciferase-Assay	39
3.3	Proteinchemische Methoden	39
	3.3.1 Isolierung der sekretierten Proteine (Yops)	39
	3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	40
	3.3.3 Immunoblot	41
3.4	Fluoreszenzmikroskopie von GFP und BFP	42

3.4.1	Quantifizierung von YopE-Luc und SycE-Luc--Biolumineszenz mit der CCD Kamera	42
3.4.2	Durchflußcytometrische Messung der GFP-Fluoreszenz Quantifizierungen der GFP-Produktion	42
3.4.3	Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET)	43
3.4.4	Spektralphotometer	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET)	45
4.1.1	Herstellung der Konstrukte	45
4.1.2	Produktion und Charakterisierung von YopE-GFP/SycE-BFP aus <i>Yersinia enterocolitica</i>	46
4.1.3	Fluoreszenzmikroskopie von <i>Y. enterocolitica</i> nach Transformation mit pISGYE18/53/138G2/3-SyB	48
4.1.4	Fluoreszenzmikroskopie von <i>Y. enterocolitica</i> nach Transformation eines high-copy-Vektors mit BFP1 (phSGYE18/53/138G2/3-SyB)	50
4.1.5	Fluoreszenzmikroskopie von <i>Y. enterocolitica</i> nach Transformation eines high-copy-Vektors mit BFP2 (phSGYE18/53/138G2/3-SyB)	50
4.1.6	Fluorescence Resonance Energy Transfer in <i>Y. enterocolitica</i> durch Fluoreszenzmikroskopie	53
4.1.7	FRET in <i>Y. enterocolitica</i> mittels Fluoreszenzspektrometrie	53
4.2	Zeitlicher Verlauf der YopE- und SycE-Produktion von <i>Yersinia enterocolitica</i>	61
4.2.1	Klonierung von YopE-GFP und SycE-Luc sowie YopE-Luc und SycE- GFP	61
4.2.2	Cytofluorometrische Messung der Fluoreszenzintensität von YopE-GFP und SycE-GFP	62
4.2.3	Luciferaseaktivitätsmessung von YopE-Luc und SycE-Luc	65
4.2.4	Immunoblot der Zelllysate der Stämme WA-C ([pYV08] pISGYE138G3- SyL) und WA-C ([pYV08] pISGYE138L-SyG3) mit Anti-GFP- und Anti-Luc-Serum	67
5	Diskussion	70

5.1	Charakterisierung der Interaktion von YopE und SycE durch die FRET-Methode	70
5.2	Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf von YopE und SycE	73
	Zusammenfassung	76
	Literaturverzeichnis	78
	Lebenslauf	98
	Danksagung	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Virulenzfaktoren von <i>Yersinia enterocolitica</i> (Yst, Inv, YadA, Yersiniabaktin)	4
Abbildung 1.2 <i>in vitro</i> Modell der Regulation der Genexpression und Sekretion der Yops	6
Abbildung 1.3 Typ III Sekretionsweg von pathogenen Yersiniae.	9
Abbildung 1.4 Schematisches Modell für die Erkennung des Substrates durch den Typ III Sekretionsmechanismus von Yersinia (Cornelis, 2003)	13
Abbildung 1.5 Tertiärstruktur des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP)	16
Abbildung 1.7 Fluoreszenzspektren von BFP und GFP	20
Abbildung 1.8 Graphische Darstellung des FRET	21
Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau des AMINCO-Bowman Luminescence Spektrometers	44
Abbildung 4.1 Klonierungsstrategie für die YopE-GFP/SycE-BFP Konstrukte	47
Abbildung 4.2 Immunoblot von WA-C ([pYV08] pLSGYeE18/53/138G2/3-SyB) aus Zelllysaten links (a.) und Überständen rechts (b.)	48
Abbildung 4.3 Fluoreszenzmikroskopie von WA-C ([pYV08] pLSGYE138G3-SyB)	49
Abbildung 4.4 <i>in vitro</i> Stimulation von WA-C([pYV08] phSGYE18G3SyB) (a.), WA-C([pYV08] phSGYE18G2-SyB) (b.), WA-C([pYV08] phSGYE138G3SyB) (c.) und WA-C([pYV08] phSGYE138G2SyB) (d.) in pKS	51
Abbildung 4.5 <i>in vitro</i> Stimulation von WA-C([pYV08] phSGYE53G3-B2) (a.), WA-C([pYV08] phSGYE138G2-B2) (b.) und WA-C([pYV08]phSGYE138G2-B2) (c.)	52
Abbildung 4.6 Emissionsscan von WA-C ([pYV 08] phSGYE138G3/G2-SyB2)	55
Abbildung 4.7 Emissionsscan von Wa-C ([pYV08] phSGYE53G3/G2-SyB2)	56
Abbildung 4.8 Emissionsscan von WA-C ([pYV 08] phSGYE18G3/G2-SyB2)	57
Abbildung 4.9 Emissions- und Exzitationsscan von WA-C ([pYV 08] pBFP2)	58
Abbildung 4.10 Emissions- und Exzitationsscan von WA-C ([pYV08] pGFP3)	59
Abbildung 4.11 Wa-C(pYV 08) Emissionsscan ohne fluoreszierendes Protein	60
Abbildung 4.12 Klonierungsstrategie für die YopE-GFP/SycE-Luc bzw. YopE-Luc/SycE-GFP	62
Abbildung 4.13 FACS-Messung der Zellsuspension von WA-C ([pYV08] pLSGYE138G3-SyL) (●) und WA-C([pYV08] pLSGYE138L-SyG3) (■)	64
Abbildung 4.14 FACS-Messung der Zellsuspension von WA-C ([pYV08] pLSGYE138G3-SyL) (●) und WA-C ([pYV08] pLSGYE138L-SyG3) (■)	64
Abbildung 4.15 Lumineszenzmessung der Zelllysate von WA-C ([pYV08] pLSGYE138L-SYG3) (■)und WA-C ([pYV08] pLSGYE138G3-SYL) (●)	65

-
- Abbildung 4.16 Lumineszenzmessung der Zelllysate von WA-C ([pYV08] pISGYE138G3-SyL) (●) und WA-C ([pYV08] pISGYE138L-SyG3) (■) 66
- Abbildung 4.17 Immunoblot der Zelllysate von WA-C ([pYV 08] pISGYE138G3-SyL) und WA-C ([pYV 08] pISGYE138L-SyG3) 69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Virulenzfaktoren von <i>Y. enterocolitica</i> .	7
Tabelle 2.1	Verwendete Geräte	23
Tabelle 2.2	Synthetische Oligonukleotide für die PCR und Sequenzierung	26
Tabelle 3.1	Agarosekonzentration für die Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente	37
Tabelle 3.2	Zusammensetzung des SDS-PAGE	40

Abkürzungsverzeichnis

μF	Mikrofarad
μl	Mikroliter
Å	Angstrom
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
ADP	Adenosindiphosphat
Ail	attachment invasion locus
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AraC	Arabinosid C
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintri-phosphat
BFP	blue fluorescent protein
BHI	brain heart infusion
bidest	bidestilliert
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca	Calcium
CaCl_2	Calciumchlorid
CCD	charge coupled device
CFP	cyan fluorescent protein
CFU	colony forming units
CIP	calf intestinal phosphatase
CLSM	confocal laser scan microscope
CM	Zellmembran

Cm	Chloramphenicol
DA	Diese Arbeit
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
dTTP	desoxytyrosintriphosphate
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycobis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
FACS	fluorescence-activated-cell-sorter
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FRET	fluorescence resonance energy transfer
G	Guanosin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescence protein
GFPmut	green fluorescence protein mutant
Gly	Glycin
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HCl	Hydrochlorid
HeLa	Henrietta Lacks
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horse rabbit
IgG	Immunglobulin G

Inv	Invasin
kDa	kilo-Dalton
kV	kilo-Volt
LB	Luria-Bertani
LcrV	low calcium response V
LMW	low molecular weight
Luc	Luciferase
mA	Milli-Ampere
MCS	multiple cloning site
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Myf	mucoid <i>yersinia</i> factor
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
Ohm	elektrischer Widerstand
OM	Äußere Membran
PAGE	Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	Potenz der Wasserstoffionenkonzentration

pKS	Bluescript-Vektor KS
pYV	<i>Yersinia</i> Virulenzplasmid
R ₀	Förster Radius
RbCl ₂	Rubidiumchlorid
REV	Restriktionsenzymverdau
RP	released protein
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
Ser	Serin
SycE	specific yop E chaperone
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure /“trichloracetic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
<u>μ</u> l	Mikroliter
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	volume/volume (Vol.%)
VirF	virulence F
YadA	<i>Yersinia</i> adhaesion A
YFP	Yellow Fluorescent Protein
Yop	<i>Yersinia</i> Outer Protein
ysc	yop secretion

Yst Enterotoxin von *Yersinia enterocolitica*

1 Einleitung

Die Gattung *Yersinia* (früher *Pasteurella*), wurde 1964 nach dem Schweizer Bakteriologen Alexandre J. Yersin benannt, der 1894 erstmals den Erreger der Pest isolierte (Yersin, 1894; Frederiksen, 1964). Seit 1974 gehört die Gattung *Yersinia* zu der Familie der *Enterobacteriaceae* und umfaßt elf Arten (Schleifstein and Coleman, 1939). Die ubiquitär verbreiteten Yersinien sind pleomorphe, gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien mit einem Wachstumsoptimum von 27-30 °C. Sie bilden keine Sporen, sind Katalase positiv und Oxidase negativ. Bei Anzuchtbedingung unter 30°C sind die Bakterien peritrich begeißelt und beweglich (Miller et al., 1988).

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

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

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

1.1 Klinisches Bild der humanen Yersiniose

Die Infektion durch *Yersinia enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* erfolgt meist durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel, in der Regel Schweinefleisch, Wasser oder Milch (Cover and Aber, 1989; Aleksic and Bockemühl, 1990). Sie sind wichtige Erreger von Darminfektionen. Klinische Manifestationen einer Infektion mit diesen Erregern reichen von einer selbstlimitierenden Enterokolitis bis zu einer potentiell fatalen systemischen Infektion. In einigen Ländern wie Deutschland und Dänemark wird *Y. enterocolitica* als Erreger einer akuten bakteriellen Gastroenteritis in ihrer Häufigkeit nur von den Gattungen *Salmonella* und *Campylobacter* übertroffen (Hoogkamp Korstanje et al., 1988).

Es wird angenommen, daß $10^8 - 10^9$ Yersinien vom Typ *Yersinia enterocolitica* oral aufgenommen werden müssen, um eine Infektion auszulösen (Jawetz et al., 1991). Während einer 1-11 tägigen Inkubationszeit und nach Aufnahme über die M-Zellen vermehren sich die Yersinien in dem Follikel-assoziierten Epithel der Darmmukosa, insbesondere in den Peyerschen Plaques im terminalen Ileum (Cover and Aber, 1989). In der Folge der enteroinvasiven Infektion durch *Yersinia enterocolitica* kommt es zu entzündlichen Veränderungen der Darmschleimhaut und Ulzerationen mit dem Auftreten von Leukozyten und Erythrozyten im Stuhl (Gutman et al., 1973). Die Infektion kann sich, insbesondere bei herabgesetztem Immunstatus, unter dem Bild einer mesenterialen Lymphadenitis auch auf die mesenterialen Lymphknoten ausbreiten und führt, von dort ausgehend, in seltenen Fällen zu einer Bakteriämie (Bradford et al., 1974). Für den Verlauf der Erkrankung ist das Alter des Patienten von besonderer Bedeutung. Bei Säuglingen und Kindern bis 6 Jahren, sowie bei Erwachsenen über 30 Jahren kommt es zu einer akuten fieberhaften Infektion mit kolikartigen Bauchbeschwerden, Übelkeit und Durchfällen (Marks et al., 1980). Personen zwischen 10 und 30 Jahren erkranken häufig an dem klinischen Bild einer sog. Pseudoappendizitis, die sich mit Fieber, Schmerzen im rechten Unterbauch und einer Leukozytose manifestiert. Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe können im weiteren Verlauf hinzukommen. Meistens findet man dann auch eine mesenteriale Lymphadenitis und eine Ileitis terminalis mit einer normalen oder nur leicht entzündeten Appendix (Olinde et al., 1984). Klinisch bedeutsam ist dieses Krankheitsbild insbesondere deshalb, weil es leicht mit einer akuten Appendizitis verwechselt werden kann.

In der Folge der beschriebenen Bakteriämie mit *Yersinia enterocolitica* kann es gelegentlich auch zu fokalen, extraintestinalen Manifestationen der Erkrankung kommen. Pharyngitis mit zervikaler Adenopathie wird besonders bei Erwachsenen häufig beschrieben (Tacket et al., 1983).

In 5-20% der Erkrankungen kommt es zu immunologisch vermittelten Sekundärveränderungen, wie Arthritis, Erythema nodosum, Reiter Syndrom, Myokarditis und Glomerulonephritis (Aho et al., 1974). Die reaktive Arthritis beginnt typischerweise ein bis zwei Wochen nach dem Beginn der gastrointestinalen Symptome und betrifft meist die Gelenke der unteren Extremitäten. Die Symptome persistieren bei zwei Drittel der Betroffenen in der Regel über einen Monat und bei einem weiteren Drittel sogar bis zu vier Monaten (Ahvonen et al., 1969). Nach zwölf Monaten sind fast alle Patienten symptomfrei, während die Beschwerden jedoch bei einigen Patienten im Sinne einer Sakroilitis persistieren.

1.2 Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica*

Alle humanpathogenen *Yersinia*-Arten haben eine Reihe von Resistenzmechanismen entwickelt, um der Infektabwehr des Wirtes durch Komplementlyse und Phagozytose zu entgehen (Martinez, 1983; Lian et al., 1987; Hanski et al., 1989; Heesemann, 1990; Simonet et al., 1990; Hanski et al., 1991; Heesemann et al., 1993). Für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* werden sowohl chromosomal- als auch plasmidkodierte Virulenzfaktoren verantwortlich gemacht (Cornelis et al., 1987; Cornelis, 1994; Cornelis et al., 1998; Aepfelbacher et al., 1999). Diese Virulenzfaktoren sind in der Abbildung 1.1, Seite 4 schematisch dargestellt und werden im Weiteren besprochen.

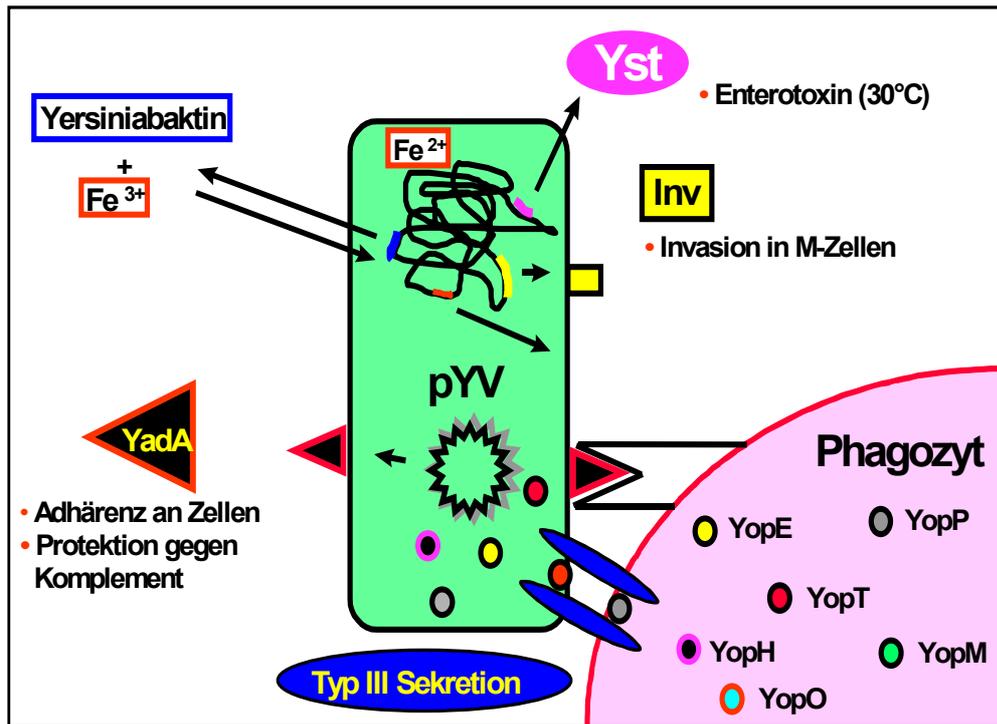


Abbildung 1.1 Virulenzfaktoren von *Yersinia enterocolitica* (Yst, Inv, YadA, Yersiniabaktin) mit translozierten Yops über den Typ III-Sekretionsweg (Cornelis et al., 1989; Cornelis, 1994; Aepfelbacher et al., 1999)

1.2.1 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren

Zu den chromosomal kodierten Virulenzfaktoren gehören:

- das hitzestabile Enterotoxin **Yst**. Dieses wird nur von *Y. enterocolitica* gebildet und besitzt Ähnlichkeit mit dem Enterotoxin STI von *E. coli* und Guanylin, dem endogenen Aktivator der intestinalen Guanylat-Cyclase (Pai and Mors, 1978; Curri et al., 1992). Obwohl Yst *in vitro* nur bei Temperaturen unter 30 °C produziert wird, ist es wahrscheinlich bei der Entstehung der Diarrhoe während der Yersiniose von Bedeutung (Delor and Cornelis, 1992).
- das äußere Membranprotein **Inv** (Invasin), welches über β 1-Integrine die Adhärenz an und die Invasion in Wirtszellen über M-Zellen des Darmepithels vermittelt (Miller and Falkow, 1988; Isberg, 1989; Miller et al., 1990; Brett et al., 1993; Ennis et al., 1993). Inv spielt eine entscheidene Rolle in der intestinalen

Yersinieninfektion bei der Invasion des Darmepithels (Grassl et al., 2003; Pepe and Miller, 1994).

- Elementares Eisen spielt eine zentrale Rolle bei vielen biochemischen Reaktionen. In der Atmungskette oder als Kofaktor vieler Enzyme wie Nitrogenasen, Peroxidasen oder Katalasen ist Eisen unentbehrlich (Neilands, 1981). Pro Bakterienzelle muß nach jeder Zellteilung ein Eisenbedarf von 10^5 bis 10^6 Eisenionen ergänzt werden (Archibald, 1983). Prokaryonten haben hochaffine Eisentransport- und Speichersysteme entwickelt, um ihren Eisenbedarf zu decken. Ein wichtiges System zur Eisenaufnahme bei *Yersinia enterocolitica* stellt das Siderophor Yersiniabaktin dar (Haag et al., 1993). Dies ist ein niedermolekularer, hochaffiner Eisenchelator, welcher von den Bakterien unter Eisenmangelbedingungen synthetisiert, aus der Zelle ausgeschieden und nach Eisenkomplexierung über spezifische Transportsysteme wieder in die Bakterienzelle aufgenommen wird (Perry and Brubaker, 1979; Neilands, 1981; Bagg and Neilands, 1987; Braun and Winkelmann, 1987).

1.2.2 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren

Zu den plasmidkodierten Virulenzfaktoren gehören:

die **Yops** (*Yersinia* outer proteins), deren Synthese und Sekretion durch Calcium-Entzug, die Temperatureinstellung auf 37°C und den Kontakt mit eukaryontischen Zellen kontrolliert werden (Heesemann et al., 1986; Heesemann et al., 1987). Der am besten charakterisierte Regulator ist VirF (*virulence F*), ein transkriptioneller Aktivator der *yop* Regulation, der zur Familie der AraC Regulatoren gezählt wird (Cornelis et al., 1987; Cornelis et al., 1989). Die Kontrolle der Genexpression von Yop ist in der Abbildung 1.2, Seite 6 schematisch dargestellt.

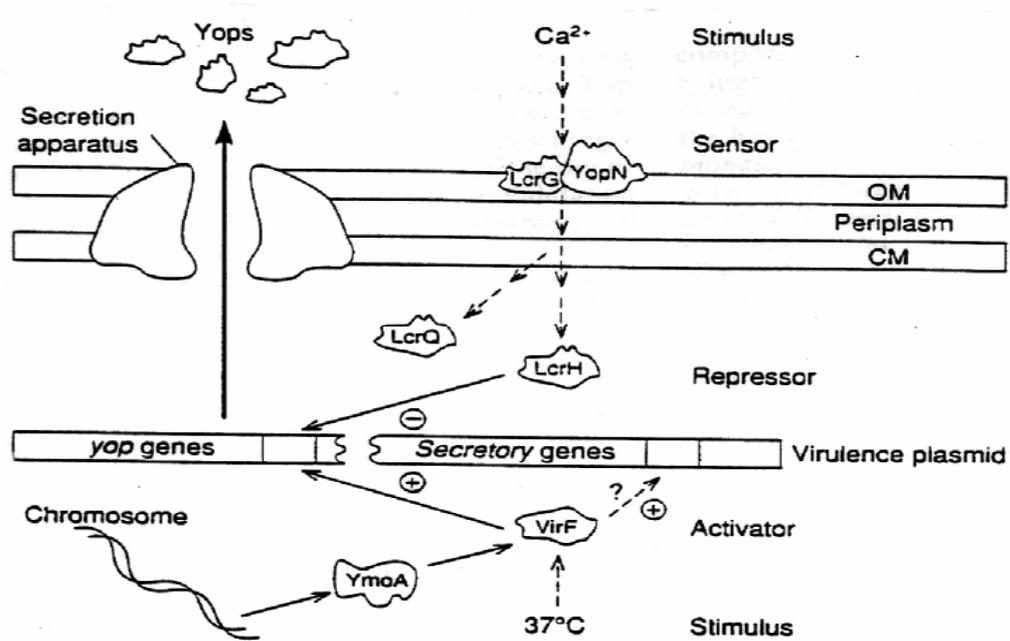


Abbildung 1.2 *in vitro* Modell der Regulation der Genexpression und Sekretion der Yops. Der temperaturabhängige Transkriptionsfaktor VirF ist das Hauptsignal, welches die *yop* Transkription aktiviert. Hingegen hemmt Ca^{2+} die Aktivierung des *yop*-Operons unter Vermittlung cytosolischer Proteine. (OM, äußere Membran; CM, cell Membran) (Forsberg et al., 1994)

Zwölf verschiedene Yops (YopB, D, E, H, M, N, O, P, Q, R, T, und LcrV) werden in Ca -depletiertem Medium bei $37^{\circ}C$ sezerniert. Im Zellkultur-Infektionsmodell konnte gezeigt werden, daß YopE, H, M, O, P und T in die Wirtszelle transloziert werden (Heesemann et al., 1984; Cornelis et al., 1987; Bolin et al., 1988; Bolin et al., 1988; Cornelis et al., 1989; Viitanen et al., 1990; Straley et al., 1993; Cornelis et al., 1998; Zumbühl et al., 1999). Yop B, YopD und LcrV scheinen als Transmembranproteine für die Translokation der anderen Yops notwendig zu sein (Cornelis, 2002). Die zellbiologische Wirkung einiger Yops wurde in den vergangenen Jahren zum Teil aufgeklärt und ist, neben den anderen beschriebenen Virulenzfaktoren, in der Tabelle 1.1, Seite 7 zusammenfassend dargestellt.

Kodiert werden die beschriebenen Yops auf dem ca. 70 kb großen Virulenzplasmid **pYV**, welches bei allen humanpathogenen Yersinien nachgewiesen wird. Es kodiert für eine Vielzahl von Proteinen und Polypeptiden. Darunter befinden sich das äußere

Membranprotein YadA (*Yersinia adhesinA*), sezernierte Proteine sowie verschiedene regulatorische cytosolische Proteine (Cornelis et al., 1998).

- Das 45 kDa große Oberflächen-Agglutinogen **YadA**, welches bei 37 °C und durch den Transkriptionsfaktor LcrF exprimiert wird und oligomere Fibrillen bildet. Die sogenannte "lollipop"-Struktur von YadA findet sich auf der gesamten äußeren Bakterienmembran (Hoiczky et al. 2000; El Tahir und Skurnik, 2001) und vermittelt die Adhärenz an extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen und Fibronectin (Heesemann and Gräter, 1987; Schultze Koops et al., 1992; Skurnik et al., 1994). YadA vermittelt eine Resistenz gegen Opsonierung und Komplementlyse (Grosdent et al., 2002). Antikörper gegen YadA wirken nach einer parenteralen Infektion protektiv (Toivanen et al., 1985; Pilz et al., 1992; China et al., 1993).

Darüber hinaus vermittelt YadA die Adhäsion von *Yersinia enterocolitica* an die Wirtszelle. Diese Adhäsion ist eine besonders wichtige Voraussetzung für die effiziente Translokation der Yops (siehe Kapitel 1.2.4, Seite 10) (Sory et al., 1995). Doppelmutanten in *inv* und *yadA* translozieren keine Yops und induzieren keine Cytotoxizität.

Tabelle 1.1 Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica*.

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

Virulenzfaktor	Locus ⁽¹⁾	vermutete Funktion
Yst	C	Hitzestabiles Enterotoxin, Diarrhoe
Inv	C	Invasin: Eintritt in intestinale Zellen während der initialen Infektionsphase
Yersiniabaktin	C	Eisenaufnahme, Immunsuppression
YadA	P	Hauptmembranprotein, Bindung an Kollagen und Fibronectin, Autoagglutination, Darmkolonisierung, Phagozytoseresistenz, Komplementresistenz

YopB	P	Transmembranprotein, Translokation von YopE und YopH, Hämolyse
YopD	P	Transmembranprotein, Translokation von YopE und YopH
YopE	P	Cytotoxizität, Phagozytoseresistenz
YopH	P	Protein-Tyrosin-Phosphatase, Cytotoxizität, Phagozytoseresistenz
YopM	P	Thrombinbindung, Thrombozytenaggregationshemmer
YopN (LcrE)	P	Regulation der Translokation
YopO (YpkA)	P	Serin/Threonin-Protein-Kinase
YopP	P	involviert in der Apoptose
LcrV	P	Induktion des Toll-like-Rezeptor 2 (Sing et al., 2002)

1.2.3 Typ III Protein-Sekretionsmechanismus

Die Interaktion von Bakterien mit ihren eukaryontischen Zielzellen wird durch spezifische äußere Membranproteine und sekretierte Proteine vermittelt. Obwohl diese Proteine zahlreiche, verschiedene Funktionen haben, existieren lediglich eine begrenzte Anzahl von Wegen, um diese Proteine zu sekretieren. In der Literatur werden gegenwärtig fünf verschiedene Sekretionswege (Typ I bis Typ V) beschrieben (Finlay and Falkow, 1989; Fath and Kolter, 1993; Salmond and Reeves, 1993; Van Gijsegem et al., 1993; Finlay and Falkow, 1997; Hueck, 1998).

Yersinia enterocolitica benutzt den sogenannten Typ III Protein-Sekretionsmechanismus (TTSS), um die Yops zu sekretieren (Abbildung 1.3, Seite 9).

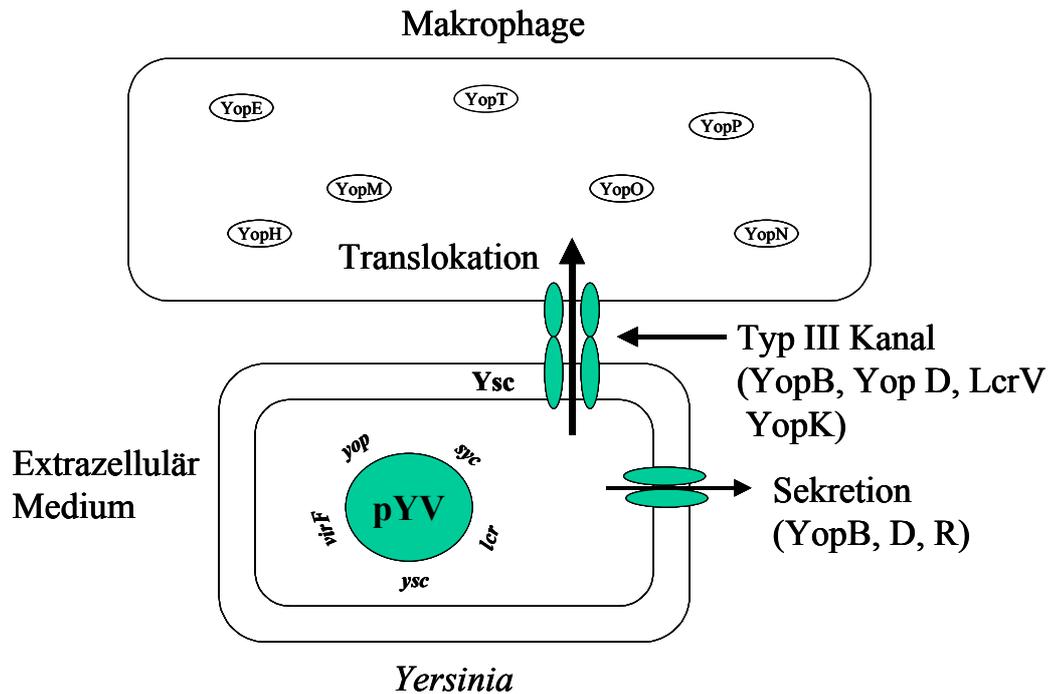


Abbildung 1.3 Typ III Sekretionsweg von pathogenen Yersiniae.

Der Typ III Sekretionsmechanismus (*ysc*- und *lcr*-Gene), Transkriptionsfaktor (*VirF*-Gen), Sekretionsproteine (*yop*-Gene) und Chaperone (*syc*-Gene) befinden sich auf dem 70-kb Virulenzplasmid pYV. Ein Temperaturanstieg auf 37°C bewirkt die Expression von VirF als Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von *ysc* und *lcr* Genen induziert. Kontakt mit eukaryonten Zellen aktiviert den Typ III Sekretionsapparat, der zur Translokation bzw. Sekretion der Yops führt (Cheng and Schneewind, 2000).

Dieser Sekretionsmechanismus wird von vielen gram-negativen Bakterien verwendet und ist primär für die Translokation von Proteinen in die eukaryonte Zielzelle im Rahmen einer Infektion zuständig (Cornelis, 2003; Young and Young, 2002). Die zu sekretierenden Proteine werden nicht durch N-terminale Prozessierungen modifiziert. Der Typ III Sekretionsmechanismus zeigt insbesondere bei mindestens 10 verschiedenen Proteinen, die Teil des Sekretionsapparates sind, Homologien zum Flagellensystem von Bakterien (Aldridge und Hughes, 2002; Blocker et al., 2003; Cornelis et al., 1998). Lange Zeit wurde das Signal für die Sekretion in den N-terminalen 15 bis 20 Aminosäuren des Polypeptids vermutet (Michiels et al., 1990; Michiels and Cornelis, 1991; Sory et al., 1995). In dieser Region besteht jedoch keinerlei Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz, im Hydrophobizitäts-Profil, in der

Verteilung geladener Gruppen oder in der vorhergesagten Sekundärstruktur zwischen den verschiedenen sekretierten Yops (Michiels and Cornelis, 1991). So wurde selbst nach einer systematischen Mutagenese der putativen Sekretionsdomäne das entsprechende YopE weiterhin sekretiert (Anderson und Schneewind, 1997; Lloyd et al., 2002).

Ferner lag die Menge an sekretiertem YopE auch nach Deletion der Aminosäuren 2 – 15 immer noch bei 10%. Dieser Befund spricht für ein zweites, schwächeres Sekretionssignal neben dem mRNA Signal. Dieses Signal korrespondiert mit der Chaperonbindungsstelle für SycE (Wattiau and Cornelis, 1993).

Es gibt nach wie vor keinen eindeutigen Hinweis welches System für die Sekretion der Yops zuständig ist (Cornelis, 2003). Es wird vermutet, daß das Signal für die Sekretion in der Peptidsequenz (Sory und Cornelis, 1994; Woestyn et al., 1996), und in der entsprechenden mRNA andererseits zu finden ist (Kumaran et al., 2003; Kumaran et al., 2003; Anderson and Schneewind, 1997; Anderson and Schneewind, 1999).

Der Sekretionsapparat *ysc* (für *yop secretion*) besteht aus mindestens 25 Proteinen und wird in vier Loci aufgeteilt (*virA*, *virB*, *virG* und *virC*) (Cornelis et al., 1986). Die genaue Lokalisation der meisten Proteine im Sekretionsapparat, wie auch die Funktion dieser Proteine innerhalb des Sekretionsapparates, ist jedoch noch unbekannt.

1.2.4 Yop Translokation

Als Translokation bezeichnet man einen gerichteten Prozeß, bei dem sogenannte Effektorproteine vom Bakterium direkt in die eukaryontische Zielzelle geschleust werden. Sechs Yop Proteine (YopE, YopH, YopO, YopM, YopJ und YopT) werden auf diese Weise in die Wirtszelle transloziert (Rosqvist et al., 1994; Sory and Cornelis, 1994; Persson et al., 1995; Sory et al., 1995; Boland et al., 1996; Schesser et al., 1996; Iriarte and Cornelis, 1998; Iriarte et al., 1998). Die Translokation dieser Yop Proteine setzt lebende Bakterien voraus, die unter Vermittlung von YadA an die Wirtszelle adhären (siehe Kapitel 1.2.2, Seite 5).

Mindestens vier Proteine, YopB, YopD, LcrV und YopK sind am Aufbau des Translokationsapparates beteiligt. Von den zwölf beschriebenen sekretierten Yops

haben nur YopB und YopD hydrophobe Domänen, die eine Interaktion mit Membranen vermuten lassen (Rosqvist et al., 1990; Cornelis, 2002).

1.2.5 YopE Translokation/Sekretion

Das YopE ist eines der am besten untersuchten Yops. Es handelt sich um ein 23 kDa großes Rho GTPase aktivierendes Protein (Rho GAP), welches eine Homologie mit einem Teil der N-terminalen Region von ExoS von *Pseudomonas aeruginosa* aufweist (Krall et al., 2004; Kulich et al., 1994). Der cytotoxische Effekt tritt nur nach Anheftung des Bakteriums an die Oberfläche der eukaryonten Zielzelle auf und geht mit der polarisierten Translokation von YopE in die Zielzelle einher (Rosqvist et al., 1994). YopE hat eine GTPase-aktivierende Funktion, d.h. YopE katalysiert die Hydrolyse von Rho/Rac/Cdc42 gebundenem GTP zu GDP, was zur Inaktivierung von Rho-GTPasen führt (Andor et al., 2001; Black and Bliska, 2000; Ernst, 2000; Von Pawel-Rammingen et al., 2000). Schon kurze Zeit nach Infektion von Epithelzellen oder HeLa Zellen findet man eine Abrundung der Zellen und Zerstörung der Actin Mikrofilament Strukturen (Rosqvist et al., 1990).

Es gibt zwei Signalwege die zur Sekretion von YopE führen: Zum einen scheint am N-terminalen Ende des YopE das Signal für die Erkennung des Typ III Sekretionsmechanismus lokalisiert zu sein. Entsprechend führen Mutationen in diesem Bereich zwar zur Translation, nicht jedoch zur Sekretion von YopE (Lloyd and Wolf-Watz, 2001; Lloyd and Wolf-Watz, 2001; Lloyd et al., 2002).

Zum anderen führt die Sekretion von YopE über einen Chaperon regulierten Mechanismus. Dieses ebenfalls auf dem pYV Plasmid kodierte Peptid spielt eine entscheidende Rolle bei der Sekretion von YopE (Boyd et al., 2000). Deletionen im Bereich des Virulenzplasmid für SycE zeigten, daß YopE zwar synthetisiert wird, die Anwesenheit des N-terminal kodierten Signals jedoch notwendig ist, um YopE sekretieren zu können (Wattiau and Cornelis, 1993; Wattiau and Bernier, 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurden YopE-Proteine verwendet, die sich in ihrer Aminosäurenlänge unterscheiden: das in seiner Sequenz mit 138 Aminosäuren vollständige YopE und die beiden kürzeren, N-terminal trunkierten Varianten mit lediglich 53 bzw. 18 AS der ursprünglichen Sequenz. Bei diesen YopE-Fragmenten fehlen die Sekretions- und Translokationsdomänen an dem N-terminalen YopE

Segment, weshalb eine *in vitro* Sekretion unmöglich und eine Bindung von SycE unwahrscheinlich zu sein scheint.

Der Ablauf der Sekretion von YopE einschließlich der daran beteiligten Faktoren wurde in der Vergangenheit in zahlreichen Veröffentlichungen bearbeitet (Cornelis, 2003; Kumaran et al., 2003; Kumaran et al., 2003; Ramamurthi und Schneewind, 2003; Anderson and Schneewind, 1997; Lee et al., 1998; Cambronne et al., 2000; Cheng and Schneewind, 2000; Lloyd and Wolf-Watz, 2001; Lloyd and Wolf-Watz, 2001). Es werden zwei verschiedene Modelle der Sekretion, die co-translationale Sekretion und die post-translationale Sekretion der Yops, diskutiert:

1. Bei dem Modell der co-translationalen Sekretion läuft die Translation der *yopE*-mRNA und die Typ III-Sekretion in zwei unmittelbar zusammenhängenden Schritten ab. Die vorhandene mRNA wird nach Adhäsion der Yersinien an die Zielzelle zu den Ribosomen transportiert und bildet mit ihnen einen Komplex. Das Ribosom mit der mRNA wird dann an die innere Zellmembran der Yersinien geleitet, wo es zur Sekretion der translatierten Yops durch den Membrankanal kommt. Dies bedeutet, daß die Virulenzproteine (Yops) nur bei Bedarf produziert und unmittelbar nach der Translation sekretiert werden. Ein vorhandener Repressor-Komplex unterbindet die direkte Translation im Zytosol von *Y. enterocolitica*.
2. Bei der post-translationalen Sekretion kommt es im Rahmen der Bindung von *Y. enterocolitica* an die eukaryonten Zellen ebenfalls zur Aktivierung des Sekretionsapparates und zur Bildung der Yop-mRNA. Die mRNA wird innerhalb des Cytosols der Yersinien entsprechend translatiert. Die Sekretion der Yops erfolgt anschließend durch Bindung an das Chaperon. Das Chaperon bewirkt die Stabilisierung und Faltung der Yops, damit sie in der notwendigen Konformation durch den Typ-III-Sekretionsweg in die Zielzelle transloziert werden können. Das Chaperon wird an der Sekretionspore von dem Substrat gelöst und bleibt in der Bakterienzelle zurück. Dies hat zur Folge, daß sich innerhalb des Cytosols eine große Anzahl von Yops befinden, die im

Rahmen der Infektion durch die Bakterien sekretiert werden. Es handelt sich hierbei also nicht um eine Sekretion die durch ein Signal an der mRNA initiiert wird, sondern um eine Chaperon-induzierte Sekretion.

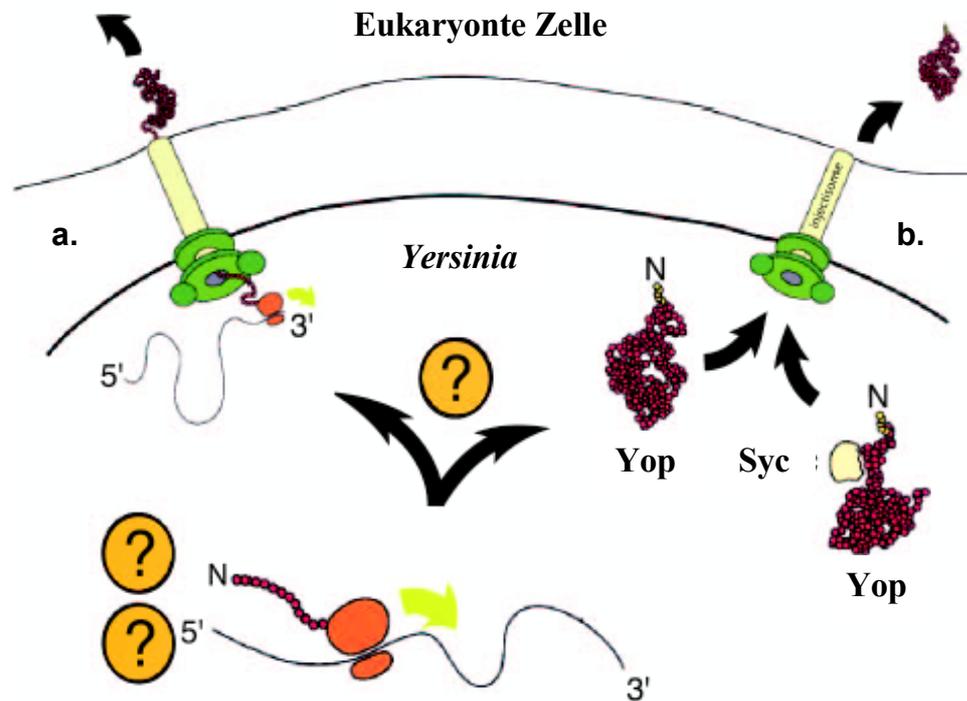


Abbildung 1.4 Schematisches Modell für die Erkennung des Substrates durch den Typ III Sekretionsmechanismus von *Yersinia* (Cornelis, 2003)

(a) Modell der co-translationalen Sekretion, bei der die *yop* mRNA Translation und Typ III Sekretion ein gleichzeitig gekoppelter Mechanismus sind.

(b) Modell der post-translationalen Sekretion mit der Chaperon-gekoppelten Signalerkennung. SycE wird fortlaufend an die neu produzierten Substrate gebunden und bedingt die Stabilität der Yops im Cytoplasma

1.2.6 Syc E

SycE (specific YopE chaperone) ist ein ca. 14-19 kDa großes, saures (pH ca. 4-5), homodimeres Protein mit einer hohen Affinität zu den 15-100 Aminosäuren des N-Terminus von YopE (Birtalan and Gosh, 2001; Birtalan et al., 2002; Evdokimov et al., 2002; Trame and McKay, 2003). Zwei große hydrophobe oberflächliche Anteile des Proteins könnten die Bindungsstellen für YopE oder einer Komponente des Typ III

Sekretionsapparates sein. Elektronegativ geladene Aminosäuren (saure Aminosäuren) sind über fast dem gesamten Protein nachzuweisen, so wie es auch bei anderen Chaperonen gefunden werden konnte (Birtalan and Gosh, 2001). Man geht davon aus, daß im Cytosol ein SycE-YopE Komplex entsteht. Durch die Bindung von SycE an YopE wird die Löslichkeit und Stabilität von YopE innerhalb des Bakteriums erreicht. Wahrscheinlich ist SycE für die Stabilisierung der Konformation von YopE verantwortlich und/oder verhindert die Degradation von YopE im Cytoplasma der Bakterien (Forsberg and Wolf-Watz, 1990; Frithz-Lindsten and Rosquist, 1995; Feldman et al., 2002). Die Bindung wird als Voraussetzung und Initiator der Typ III Translokation von YopE in die eukaryote Zelle angesehen (Frithz-Lindsten and Rosquist, 1995). Nach der Translokation des Virulenzproteins bleibt das Chaperon im Cytosol des Bakteriums zurück.

Bei fehlendem SycE ist die Sekretion von YopE stark vermindert oder findet überhaupt nicht statt (Cheng et al., 1997; Boyd et al., 2000). Darüber hinaus wird eine verfrühte Interaktion von YopE mit anderen Komponenten des Sekretionsapparates verhindert.

1.3 Reporterfusionen

Ein Reporter gen kodiert für ein Protein mit enzymatischer Aktivität (z.B. β -Glukosidase, Luciferase, Phosphatase) oder Fluoreszenzaktivität (z.B. Green Fluorescent Protein, GFP). Die kodierende Sequenz des Reporters kann als Transkriptionsfusion (Fremdpromotor ligiert mit Reportersequenz), oder als Translationsfusion (Fremdpromotor ligiert mit eigener Shine-Delgarno-Sequenz) kloniert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils die direkt nachweisbaren Reportergene *gfp* (Green Fluorescent Protein) und *bfp* (Blue Fluorescent Protein) sowie das indirekt nachweisbare Reporter gen *luciferase* (Lumineszenz nach Substratzugabe) als Translationsfusion verwendet, um die Regulation von YopE und SycE in *Yersinia enterocolitica* zu untersuchen.

1.3.1 GFP (Green Fluorescent Protein) und BFP (Blue Fluorescent Protein)

Der Einsatz des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) als Reporter gen wurde erstmals 1994 beschrieben (Chalfie and Yuan, 1994). Das Protein GFP war schon seit langem bekannt. Bereits in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts war dieses Protein aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* isoliert und charakterisiert worden (Shimomura et al., 1962). Das grüne Licht zwischen ihren Tentakeln wird von dem angeregten GFP emittiert (Prasher et al., 1992; Chalfie and Yuan, 1994). Diese Anregung erfolgt durch das Photoprotein Aequorin, welches nach der Bindung von Calcium blaues Licht emittiert.

Das 238 Aminosäuren große GFP absorbiert blaues Licht bei maximal 395 nm und sendet grünes Licht bei 509 nm aus (Prasher et al., 1992; Chalfie and Yuan, 1994). Die grüne Fluoreszenz ist somit sowohl im konventionellen Epifluoreszenzmikroskop als auch im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) gut detektierbar. (Standard-FITC Filterset). Charakteristisch ist die Raumstruktur des Proteins die als sogenannter "β-barrel" bezeichnet wird (Abbildung 1.5, Seite 16).

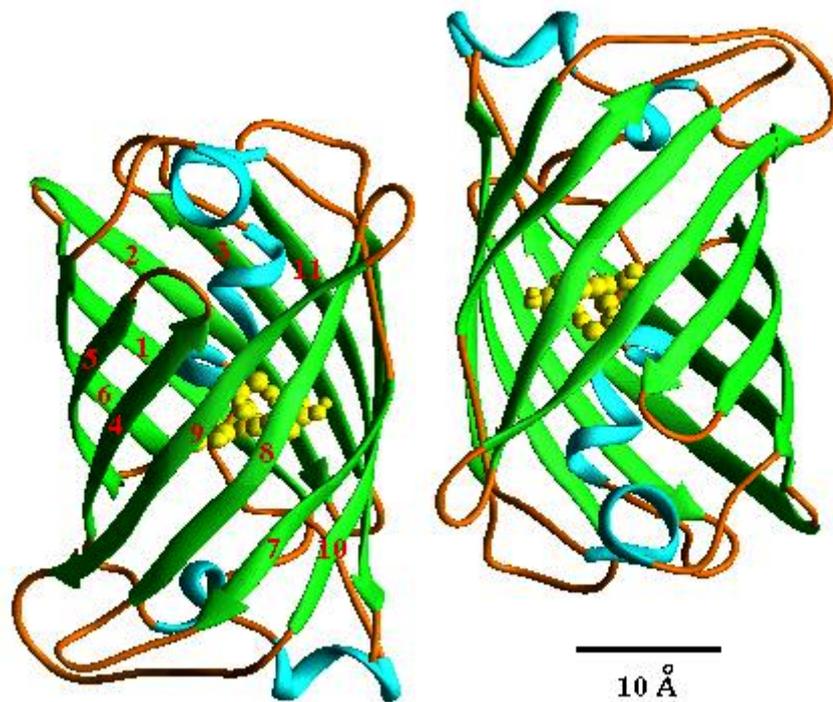


Abbildung 1.5 Tertiärstruktur des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP)
11 antiparallele β -Faltblattstrukturen (grün) bilden die Wand eines Zylinders, dessen Enden durch 3 kurze α -helicale Segmente (blau) verschlossen werden. Im Zentrum dieses Zylinders befindet sich eine weitere α -Helix (blau, AS 57-64), in deren Mittelpunkt das Chromophor lokalisiert ist (gelb dargestellt). Die verbindenden Loops sind gelb, helikale Strukturen blau dargestellt.

Dabei handelt es sich um einen elfsträngigen Zylinder mit einem Durchmesser von 24 Å und einer Länge von 42 Å. Kurze α -Helix Segmente schließen die beiden Enden des Zylinders und schaffen ein Gerüst für das Chromophor (Ormö et al., 1996).

Das Chromophor ist für die Fluoreszenz verantwortlich und bildet sich wahrscheinlich autokatalytisch in der Anwesenheit von Sauerstoff aus der Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 (Cody et al., 1993).

Durch den Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb der Sequenz des Chromophors, kommt es entweder zu einer erhöhten Grünfluoreszenz mit einem veränderten Exzitationsmaximum bei 488 nm oder zu einer Emission von Licht einer anderen Wellenlänge und somit anderer Farbe (Blau, Cyan oder Gelb). Es sind GFP-Typen

erhältlich, die eine - verglichen mit dem Wildtyp GFP - dreifache (S65T Mutante) oder 35-fache (GFPmut Mutanten) Fluoreszenz aufweisen (Cubitt and Heim, 1995). Das Protein muß jedoch in seiner gesamten Länge vorliegen, damit es zu einer Fluoreszenz kommt (Heim et al., 1994; Cormack et al., 1996).

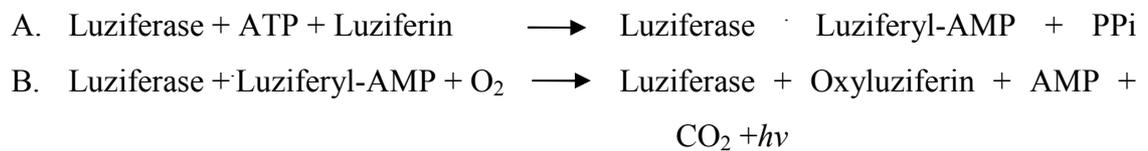
Weitere bemerkenswerte und nützliche Eigenschaften des GFPs sind die Hitzestabilität (bis 65°C), die Einsetzbarkeit in alkalischem Milieu (pH11) und die Resistenz gegenüber Detergenzien (1% SDS) (Chalfie and Yuan, 1994). Es gibt aber auch GFP-Mutanten, die sehr instabil sind. An diese Mutanten ist eine bestimmte Aminosäuresequenz fusioniert, die das Substrat für zelleigene Proteasen darstellt, so daß das GFP abgebaut werden kann. Diese GFP-Mutanten haben in *E. coli* eine GFP-Halbwertszeit von nur 40 min (Andersen et al., 1998).

Das Blau Fluoreszierende Protein (BFP) ist ein weiteres fluoreszierendes Protein, welches bei 340 nm maximal angeregt wird und bei 380 nm blaues Licht emittiert. Dieses Protein hat eine vergleichbare Fluoreszenzintensität wie die S65T GFP-Mutante bei gleichzeitig hoher Ausbleichrate (Clontech Manual, 1996). Das Protein wurde benutzt, um zusammen mit GFP die Expression zweier verschiedener Gene *in vitro* und *in vivo* simultan beobachten zu können (Rizzuto and Brini, 1996). Von der Firma Clontech wurde 1998 ein Nachfolger des BFP veröffentlicht. Bei dieser zweiten Generation des BFP (BFP 2) wird durch den Austausch von drei Aminosäuren an den Positionen -64, -65 und -145 eine Konformationsänderung des Proteins innerhalb der Zelle erreicht, die mit einer stabileren Formation der Chromophore verbunden ist. In der Folge kommt es, im Vergleich zu dem bisher bekannten BFP, zu einer 2-3-mal stärkeren Fluoreszenzintensität, zu einer höheren Löslichkeit des Proteins und einer um die Hälfte geringeren Ausbleichrate.

Ein besonderer Vorteil von GFP und BFP gegenüber allen anderen Reporterproteinen, wie der β -Galaktosidase oder der Luziferase, besteht schließlich darin, daß diese Proteine direkt, also ohne den Zusatz anderer Substrate oder Genprodukte, durch ihre Fluoreszenz nachweisbar sind. Dies bedeutet gleichzeitig, daß GFP und BFP als echte *in vivo* Marker verwendet werden können, da weder Zell- noch Gewebsverbände für die weitere Analytik zerstört werden müssen.

1.3.2 Luziferase

Das Enzym Luziferase wurde aus dem nordamerikanischen "Glühwürmchen" *Photinus pyralis* isoliert und sequenziert. Dieses Enzym (544 Aminosäuren, MG 62 kDa) katalysiert bei Anwesenheit von ATP und Coenzym A die oxidative Decarboxylierung seines Substrates Luziferin. Dabei kommt es zur Produktion von Photonen (Licht), die mit Hilfe einer hochempfindlichen Kamera ("CCD Photon Counting" Kamera) detektiert werden können. Die Menge produzierter Photonen, also die Intensität des emittierten Lichtes, korreliert mit der Menge an verfügbarer Luziferase. Bei einem pH zwischen 7.5 und 8.5 führt die Luziferase-Reaktion zu einer Emission von gelb-grünem Licht mit einer Hauptemission von 560 nm (DeWet et al., 1987). Folgende Reaktionen werden von der Luziferase katalysiert:



1.3.3 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Unter Fluoreszenz versteht man den physikalischen Vorgang der Lichtabgabe eines Moleküls, nach vorheriger Lichtanregung, es handelt sich dabei um einen dynamischen Prozess.

In der Regel ist die emittierende Wellenlänge bathochrom zur Anregungswellenlänge verschoben. Das Fluoreszenzlicht kann von einem eng benachbarten Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen werden und ebenfalls strahlungslos, in Form einer intermolekularen Dipol-Dipol Kopplung auf einen geeigneten Akzeptor übertragen werden (Förster, 1946). Dieser Vorgang ist abhängig von der Entfernung zwischen anregendem Donor (hier BFP) und aufnehmendem Akzeptormolekül (hier GFP) und wird als Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) bezeichnet. Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor-Chromophor sollte weniger als 100 Å betragen, da die FRET-Effizienz proportional zu $1/r^6$ (r = Abstand zwischen den beiden Chromophoren) abnimmt (Chan et al., 2001; Clegg, 1995; Stryer und Haugland, 1967).

Für einen effizienten Energietransfer über Distanzen von bis zu 100 Å muss die Überlappung der beiden Spektren ausreichend groß sein, was bei dem Einsatz von GFP und BFP möglich ist (Abbildung 1.6, Seite 20).

Da es sich bei der Dipol-Dipol Interaktion um einen vektoriellen Prozess handelt, sollten Donor und Akzeptor entweder optimal zueinander ausgerichtet sein, oder aber eines der beiden Moleküle sollte einen gewissen Grad an Rotationsfreiheit besitzen (Clegg, 1995; Elangovan et al., 2002).

Die Effizienz des Energietransfers kann nach folgender Gleichung berechnet werden (Förster, 1948):

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

Dabei ist die Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, r ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor und R_0 (Förster-Radius) die Distanz, bei der die FRET-Effizienz 50 % beträgt (Förster, 1949).

$$R_0 = \frac{\kappa^2 \Phi_d J}{n^4}$$

R_0 wiederum ist abhängig von der Orientierung des Donors und Akzeptors zueinander, der Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, dem Überlappungsintegral (J), welches den Überlappungsgrad von Donor-Emissions- und Akzeptor-Anregungsspektrum repräsentiert und dem Brechungsindex des umgebenden Mediums (n) (Förster, 1949; Mitra et al., 1996).

Vor diesem Hintergrund kann die Interaktion bzw. die Bindung verschiedener Proteine auf zellulärer Ebene und in der Entfernung von 10-100 Å mit Hilfe der FRET-Technik mikroskopisch sichtbar gemacht werden (Day et al., 2001). So wurde diese Methode bisher vorzugsweise in eukaryonten Zellen für den Nachweis einer Proteininteraktion unter Verwendung der beschriebenen Reportergene *gfp* und *bfp* eingesetzt (Mahajan and Heim, 1998).

Es gibt grundsätzlich drei verschiedene Möglichkeiten die FRET-Effizienz experimentell zu bestimmen (Stryer, 1978).

- (a) Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität von Donor oder Akzeptor, zunächst bei Abwesenheit und anschließend bei Anwesenheit des jeweiligen FRET-Partners. Diese Methode eignet sich jedoch nur für Systeme, bei denen das zweite Chromophor direkt zu dem Ansatz, in dem die Quantifizierung des ersten Chromophors erfolgte, zugesetzt werden kann.
- (b) Betrachtung des Bleichverhaltens von Donor und Akzeptor (Kubitschek, et al. 1993). Hier wird zunächst die Bleichdauer beider FRET-Partner separat bestimmt und anschließend mit der Bleichdauer in einem Testansatz verglichen
- (c) Betrachtung des Emissionsspektrums bei Donor-Anregung (Mitra et al., 1996; Sagot et al., 1999), dabei sollte die Donor-Emission mit zunehmendem Energietransfer schwächer, die des Akzeptors stärker werden.

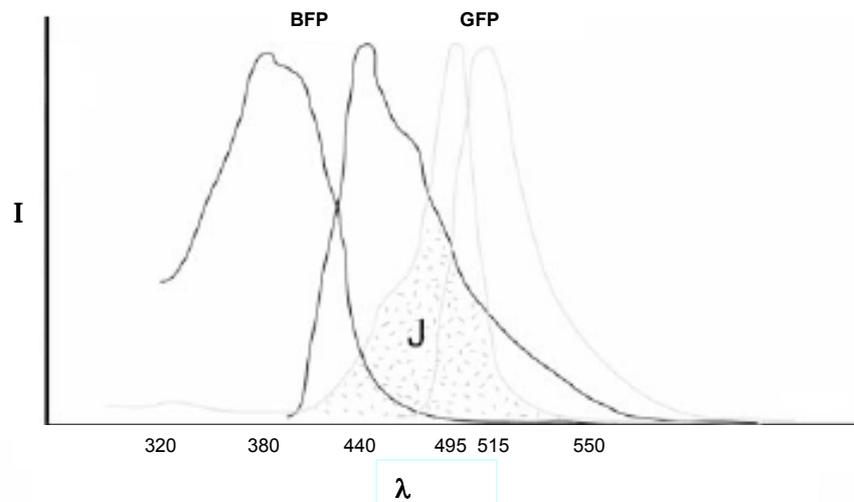


Abbildung 1.6 Fluoreszenzspektren von BFP und GFP

Das Exzitationsmaximum von BFP liegt bei 380nm und die Emissionsmaximum bei 440 nm, respektive 495nm und 515 nm für das GFP. „J“ zeigt den Bereich an wo sich Emission von BFP und Exzitation von GFP als Überlappungintegral überschneiden und damit den FRET möglich machen (Elangovan et al., 2002).

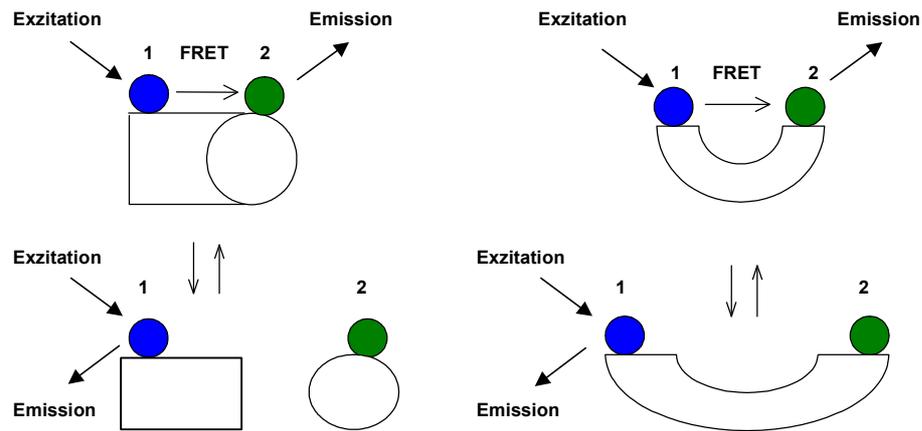


Abbildung 1.7 Graphische Darstellung des FRET

Mögliche Interaktionen von Zellbestandteilen sind durch die beiden Fluoreszenzproteine BFP (1) und GFP (2) in Abhängigkeit ihrer Distanz mit Hilfe der FRET-Methode darstellbar (Cubitt and Heim, 1995).

1.4 Zielsetzung

Wie im Abschnitt 1.2.5 erläutert, liegt YopE im Zytosol der Yersinien mit SycE als stabilisierender Komplex vor. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, mittels der fluoreszierenden Proteine GFP und BFP die folgenden Fragen zu untersuchen:

1. Lässt sich mit Hilfe der Methode des Fluorescence-Resonance-Energy-Transfers (FRET) unter Verwendung der Reportergene *gfp* und *bfp*, die Interaktion zwischen YopE und seinem Chaperon SycE überprüfen?
2. Ist die Verwendung der Reportergene *gfp* und *luc* für *in vitro* Untersuchungen der Produktion von YopE und seinem Chaperon SycE geeignet?

Für diese Ziele sollten dabei im Einzelnen die folgenden Aufgaben bearbeitet werden:

- a. Klonierung von Reportergenfusionen mit den drei verschiedenen langen N-terminalen YopE-Bereichen und dem SycE-Chaperon.
- b. Untersuchung der Proteininteraktion und der Expressionsmuster dieser Konstrukte mit der Methode des Fluorescence-Resonance-Energy-Transfers (FRET).

- c. Herstellung von Reportergenkonstrukten des Virulenzproteins YopE und seines Chaperones SycE mit GFP und der Luciferase.
- d. Untersuchung der Expressionskinetik von YopE und SycE in *Yersinia enterocolitica* im Hinblick auf die folgenden Fragen:
 - Werden in der Folge einer *in vitro* Stimulation von *Yersinia enterocolitica* äquivalente Mengen von YopE und SycE produziert?
 - Besteht die Möglichkeit, eine Kumulation von YopE und SycE in der Zelle nachzuweisen, bevor es zu einer Sekretion von YopE kommt?
 - Verändert sich die Produktion von YopE und SycE im Rahmen der Stimulation von *Y. enterocolitica* und der Sekretion von YopE unter *in vitro* Bedingungen?

2 Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Analysenwaagen	R160P; PT 1200	Sartorius, Göttingen
Brutschränke	BB6220; Thermicon T	Heraeus, Hanau
CCD Kamera	C2400-77	Hamamatsu, Herrsching
Durchflußzytometer	EPICS XL-MCL	Coulter, Krefeld
Elektrophoresekammern	Flachbett-Kammern	von Keutz, Reiskirchen
	Protean II; Mini Protean	BioRad, München
Elektroblot-Apparatur	Trans Blot Cell	BioRad, München
Filmentwickler	FPM-100A	Fuji, Tokio
FRET-Filter		AHF, Tübingen
Mikroskope	Leica Aristoplan	Leica, Wetzlar
	Epi-Fluoreszenz	Zeiss, Jena
PCR Thermocycler	GeneAmp System 9600	PE, Weiterstadt
pH-Meter	Modell pH530	WTW, Weilheim
Pipetten	Research P10-P1000	Eppendorf, Hamburg
Spannungsquellen	Modelle 200/2,0; 3000 xi	BioRad, München
Spektralphotometer	Ultrospec 3000	Pharmacia, Freiburg
Luminescence- Spectrometer	AMINCO-Bowman [®] Series 2	Aminco Braum
Sterilwerkbank	Hera safe	Heraeus, Hanau
Tischinkubator	Thermostat 5350	Eppendorf, Hamburg

UV-Handlampe		Bachofer, Reutlingen
UV-Transluminator		Bachofer, Reutlingen
Videokamera	SPOT	Diagnostic Instruments, Inc.
Videophotoanlage	E.A.S.Y. RH	Herolab, Wiesloch
Video-Printer		Mitsubishi, Tokio
Photopapierdrucker	Phaser 450	Tektronix, München
Zentrifugen	Bactifuge; Biofuge 1.5;	Heraeus, Hanau
	Megafuge 1.0;	Heraeus, Hanau
	Kühlzentrifuge 3MK	Sigma,
	Eppendorf 5412	Eppendorf, Hamburg

2.2 Sonstige Materialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Sartorius (Göttingen), Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg), B. Braun (Melsungen), Eppendorf (Hamburg), Schleicher & Schuell (Dassel); Greiner (Nürtingen), Dynex (Denkendorf) und Millipore (Eschborn).

2.3 Chemikalien

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

Vectashield	Roche
Acrylamid, Bisacrylamid	National Diagnostics, USA
Ammoniumpersulfat	BioRad, München
dNTP (dTTP, dGTP, dCTP, dATP)	Boehringer Mannheim

λ -DNA (DNA des Bakteriophagen λ) Boehringer Mannheim

2.4 Proteine und Enzyme

BSA Biomol, Hamburg
Lysozym Biomol, Hamburg
Restriktionsenzyme (inkl. Puffer) Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase (inkl. Puffer) Boehringer Mannheim
CIP-Alkaline Phosphatase (inkl. Puffer) Boehringer Mannheim
Taq DNA

2.5 Elektrophorese-Marker

DNA Standard X; XIV Boehringer Mannheim
LMW-Protein-Marker Pharmacia, Freiburg
Prestained SDS-PAGE Standards BioRad, München
Low Range

2.6 Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie, Immunoblot und Immunopräzipitation

Ziege-anti-Kaninchen-IgG, HRP konjugiert Dianova, Hamburg
Anti-GFP-Kaninchen-Antiserum Dianova, Hamburg
Anti-Luc-Kaninchen-Antiserum Dianova, Hamburg

2.7 Synthetische Oligonukleotide

Für die PCR und zur Sequenzierung wurden folgende synthetische Oligonukleotide (Roth, Karlsruhe und Metabion, Martinsried) eingesetzt.

Tabelle 2.2 Synthetische Oligonukleotide für die PCR und Sequenzierung

Name	T _m (°C)	Sequenz (5'→3')
BFP <i>Xba</i> F	58	CACGTGGATCC <u>ATGGTGAGCAAGGGCGAG</u>
BFP <i>Sal</i> R	56	AGCTACGTCGACTTACTTGTACAGCTCGTCC
GFP <i>Xba</i> F	54	GGCGGATCC <u>AAGATGAGTAAAGGAGAAGA</u>
GFP <i>Sal</i> R	54	AGCCCCGTCGAC <u>ACTCCAAGTAGCCTGTTTA</u>
LUC <i>Xba</i> F	58	GGCAGGATCC <u>ATGGAAGACGCCAAAAACATA</u>
LUC <i>Sal</i> R	48	AGCCCCGTCGACTTACCTGATTTTATTATTCGT
S65T <i>Xba</i> F	48	GGCGGATCC <u>ATGAGTAAAGGAGAAGAA</u>
S65T <i>Sal</i> R	48	AGCCCCGTCGACTTATTTGTATAGTTCATCC
S65T <i>Bam</i> NstR	52	AGCATGGATCC <u>GTATAGTTCATCCATGCC</u>
YopE <i>Hind</i> F	58	GCCGAAGCTT <u>GATATTGCTGGCACCACAAA</u>
YopE18 <i>Xba</i> R	56	CGCGGATCC <u>TGACACTGATGTCGGCAG</u>
YopE53 <i>Xba</i> R	58	CGCGGATCC <u>GGAACCCTGAGGGCTTTC</u>
YopE138 <i>Xba</i> R	60	CGCGGATCC <u>CGTGGCGAACTGATCATGATT</u>
S65t <i>Hind</i> F	48	GGATAAGCTT <u>GATGA TGA GTA AAG GAG AAG AA</u>
S65T <i>Bam</i> HIR	48	GCATGGATCC <u>TCGTA TAG TTC ATC CAT GCC</u>
LUC <i>Hind</i> IIIF	52	GCAGAAGCTT <u>ATGGA AGACGCCAAAAACAT</u>
S65T <i>Hind</i> F	48	GCAGAAGCTT <u>ATGAGTAAAGGAGAAGA A</u>
S65T <i>Xba</i> R	48	AGCTATCTAGATT <u>TTTGTATAGTTCATCC</u>
S65T <i>spe</i> F	48	GGACTAGTATGAGTA <u>AAGGAGAAGAA</u>
bfp2 <i>Hind</i> IIIF	58	CACGTAAGCTT <u>ATGA GTA AAG GAG AAG AA</u>
bfp2 <i>Xba</i> R	58	AGCTATCTAGACTAT <u>ATGA GTA AAG GAG AAG AA</u>
bfp <i>Hind</i> IIIF	58	CACGTAAGCTT <u>ATGGTGA GCA AGG GCG AG</u>
bfp <i>Xba</i> R	58	AGCTATCTAGATT <u>ACTTGTACAGCTCGTCC</u>

YopE _{bfp} HindIII	56	GCTAGAAGCTTAAATGACCGTGGTGAGATTA
YopE138EcoRVR	58	AGCCTGATATCCGTGGCGACCTGATCATGAT
YopE53EcoRVR	58	AGCCTGATATCGGAACCCTGAGGGCTTTC
S65TEcoRVF	48	GGCAAGATATCATGAGTAAAGGAGAAGAA
S65TBamHIR	48	AGCATGGATCCTTATTGTATAGTTCATCC
S65TBamHNstR	48	AGCATGGATCCGTATAGTTCATCCATGCC

T_m bezeichnet die Schmelztemperatur hybridisierender DNA-Sequenzen. Bei den zur PCR verwendeten synthetischen Oligonukleotiden ist die hybridisierende DNA-Sequenz unterstrichen. *Kursiv* ist die jeweilige Erkennungssequenz des entsprechenden Restriktionsenzym gekennzeichnet.

2.8 Plasmide

pACYC184	low copy vector Cm ^R , Tc ^R	1
pKS	high copy vector Amp ^R	3
pCJYE138-L	<i>Sall</i> HindIII <i>YopE138-luc</i> Fragment in pACYC184	2
pCJYE18G3	<i>Sall</i> -HindIII <i>YopE18-gfp3</i> Fragment in pACYC184	2
pCJYE53G3	<i>Sall</i> -HindIII <i>YopE53-gfp3</i> Fragment in pACYC184	2
pCJYE138G3	<i>Sall</i> -HindIII <i>YopE138-gfp3</i> Fragment in pACYC184	2
pCJYE138G2	<i>Sall</i> -HindIII <i>YopE138-gfp2</i> Fragment in pACYC184	2
pBFP2	high copy vector (Amp ^R) mit <i>bfp2</i> Fragment	4
pISG-G2	<i>EcoRV</i> -BamHI <i>gfp2</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE138G2	<i>BamHI</i> -HindIII <i>YopE138-gfp2</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE18G2	<i>BamHI</i> -HindIII <i>YopE18-gfp3</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE53G2	<i>BamHI</i> -HindIII <i>YopE53-gfp3</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGG3	<i>EcoRV</i> -BamHI <i>gfp3</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE18G3	<i>BamHI</i> -HindIII <i>YopE18-gfp3</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE53G3	<i>BamHI</i> -HindIII <i>YopE53-gfp3</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE138G3	<i>BamHI</i> -HindIII <i>YopE138-gfp3</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE138G3-SyB1	<i>BamHI</i> -XbaI <i>YopE138-gfp3</i> - <i>SycE</i> - <i>bfp1</i> Fragment in pACYC184	DA

pISGYE53G3-B1	<i>BamHI-XbaI YopE53-gfp3-SycE-bfp1</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE18G3-B1	<i>BamHI-XbaI YopE18-gfp3-SycE-bfp1</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE138G2-SyB1	<i>BamHI-XbaI YopE138-gfp2-SycE-bfp1</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE53-G2-SyB1	<i>BamHI-XbaI YopE138-gfp2-SycE-bfp1</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE18G2-SyB1	<i>BamHI-XbaI YopE138-gfp2-SycE-bfp1</i> Fragment in pACYC184	DA
phSGYE138G2-SyB1	<i>SalI-XbaI YopE138-gfp2-SycE-bfp1</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE53G2-SyB1	<i>SalI-XbaI YopE53-gfp2-SycE-bfp1</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE18G2-SyB1	<i>SalI-XbaI YopE18-gfp2-SycE-bfp1</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE138G3-SyB1	<i>SalI-XbaI YopE138-gfp3-SycE-bfp1</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE53G3-SyB1	<i>SalI-XbaI YopE53-gfp3-SycE-bfp1</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE18G3-SyB1	<i>SalI-XbaI YopE18-gfp3-SycE-bfp1</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE138G2-SyB1	<i>SalI-XbaI YopE138-gfp2-SycE-bfp1</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE53G2-SyB1	<i>SalI-XbaI YopE53-gfp2-SycE-bfp1</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE18G2-SyB1	<i>SalI-XbaI YopE18-gfp2-SycE-bfp1</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE138G3-SyB2	<i>SalI-XbaI YopE138-gfp3-SycE-bfp2</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE53G3-SyB2	<i>SalI-XbaI YopE53gfp3-SycE-bfp2</i> Fragment in pKS	DA
phSGYE18G3-SyB2	<i>SalI-XbaI YopE18-gfp3-SycE-bfp2</i> Fragment in pKS	DA
pISGYE138G3-SyL	<i>SalI-HindIII YopE138-gfp3-SycE-luc</i> Fragment in pACYC184	DA
pISGYE138L-SyG3	<i>SalI-HindIII YopE138-luc-SycE-gfp3</i> Fragment in pACYC184	DA

(DA): Diese Arbeit; (1): (Chang and Cohen, 1978); (2): (Jacobi et al., 1998); (4): Clontech 1998

2.9 Bakterienstämme

DH5 α	<i>(E.coli) endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi-1 recA1</i>	1
	<i>gyrA relA1Δ(lacZYA-argF)U169 (ϕ80lacZΔM15)</i>	
WA-C[pYV08]	WA-C trägt Virulenzplasmid pYV08	2
WA-C[pYV08, pCJYE138-L]	WA-C[pYV08] trägt pCJYE138-L	3
Wa-C [pYV08, pBFP2]	WA-C [pYV08] trägt pBFP2	DA
WA-C[pYV08, pISGG2]	WA-C [pYV08] trägt pISGG2	DA

WA-C[pYV08, plSGYE138G2]	WA-C [pYV08] trägt plSGYE138G2	DA
WA-C[pYV08, plSGYE53G2]	WA-C [pYV08] trägt plSGYE53G2	DA
WA-C[pYV08, pSGYE18G2]	WA-C [pYV08] trägt plSGYE18G2	DA
WA-C[pYV08, plSGG3]	WA-C [pYV08] trägt plSGG3	DA
WA-C[pYV08, plSGYE138G3]	WA-C [pYV08] trägt plSGYE138G3	DA
WA-C[pYV08, plSGYE53G3]	WA-C [pYV08] trägt plSGYE53G3	DA
WA-C[pYV08, plSGYE18G3]	WA-C [pYV08] trägt plSGYE18G3	DA
WA-C[pYV08, plSGYE138G3-SyB1]	WA-C[pYV08] trägt plSGYE138G3-SyB1	DA
WA-C[pYV08, phSGYE53G3-SyB1]	WA-C[pYV08] trägt plSGYE53G3-SyB1	DA
WA-C[pYV08, phSGYE18G3-SyB1]	WA-C[pYV08] trägt plSGYE18G3-SyB1	DA
WA-C[pYV08, phSGYE138G2-SyB1]	WA-C[pYV08] trägt plSGYE138G2-SyB1	DA
WA-C[pYV08, phSGYE53G2-SyB1]	WA-C[pYV08] trägt plSGYE53G2-SyB1	DA
WA-C[pYV08, phSGYE18G2-SyB1]	WA-C[pYV08] trägt plSGYE18G2-SyB1	DA
WA-C[pYV08, phSGYE138-G3SyB2]	WA-C[pYV08] trägt phSGYE138G3-SyB2	DA
WA-C[pYV08, phSGYE53G3-SyB2]	WA-C[pYV08] trägt phSGYE53G3-SyB2	DA
WA-C[pYV08, phSGYE18G3-SyB2]	WA-C[pYV08] trägt phSGYE18G3-SyB2	DA
WA-C[pYV08, phSGYE138G2-SyB2]	WA-C[pYV08] trägt, phSGYE138G2-SyB2	DA
WA-C[pYV08, phSGYE53G2-SyB2]	WA-C[pYV08] trägt phSGYE53G2-SyB2	DA
WA-C[pYV08, pSGYE18-G2-SyB2]	WA-C[pYV08] trägt phSGYE18G2-SyB2	DA
WA-C[pYV08, plSGYE138G3-SyL]	WA-C[pYV08] trägt plSGYE138G3-SyL	DA
WA-C[pYV08, plSGYE138L-SyG3]	WA-C[pYV08] trägt plSGYE138L-SyG3	DA

(DA): Diese Arbeit; (1): (Hanahan, 1983); (2): (Heesemann, 1997); (3): (Jacobi et al., 1998)

2.10 Medien und Lösungen

2.10.1 Medien für die Bakterienkultur

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

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

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

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

Ampicillin (Biomol): 100 µg/ ml für *E. coli*

300 µg/ ml für *Yersinia enterocolitica*

Chloramphenicol (Sigma): 50 µg/ ml

Nalidixin (Sigma): 50 µg/ ml

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

2.10.2 Puffer und Lösungen

Zusätze für die Induktion der Yop-Sekretion:

1. 20% Glukose (E. Merck)

2. 1,5 M MgCl (E. Merck)

3. 0,5 M EGTA (Sigma)

jeweils in A. bidest lösen.

Lösungen für die Agarosegelelektrophorese:

10 x Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau (Sigma) 25% (v/v) Ficoll 400 (Biomol)
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma) in A. bidest.

Lösungen für die Polyacrylamidgelelektrophore (SDS-PAGE):

10% APS (E. Merck)	10% (w/v) in Ampuwa
10% SDS (Biomol)	10% (w/v) in Ampuwa
AA/BA (30:0,8)	30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid
TEMED (Aldrich)	(National Diagnostics)
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl (Gibco), pH 6,8
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl (Gibco), pH 8,6
10 x Elektrophoresepuffer:	30 g Tris-HCl (Gibco) 144,4 g Glycin (Biomol) 100 ml 10% SDS (Biomol) ad 1 l A. bidest
2 x Laemmli- Probenpuffer:	125 mM Tris-HCl (Gibco), pH 6,8 20% Glycerin (E. Merck) 4% SDS (Biomol) 10% β - Mercaptoethanol (E. Merck) 0,0025% Bromphenolblau (Sigma)
Coomassie-Färbelösung:	0,2% Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma) in 50% Methanol, 10% Essigsäure (E. Merck)
Entfärbelösung:	30% Methanol, 10% Essigsäure (E. Merck)

Lösungen für den Immunoblot:

10 x Westernblotpuffer:	30 g Tris-HCl (Gibco) 144,4 g Glycin (Biomol) ad 1 l A. bidest
Waschpuffer:	1 x PBS, 0,05% Tween 20 (Sigma)
Blockierungspuffer:	5% BSA (Biomol) in Waschpuffer

Lösungen zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterien:

Wasch-Puffer:	steriles Ampuwa
Einfrier-Puffer:	10% Glycerin in Ampuwa

Lösungen zur Herstellung von kompetenten E. coli Bakterien:

TFB1-Puffer:	30 mM K-Acetat (E. Merck) 50 mM MnCl ₂ (Sigma) 100 mM RbCl ₂ (E. Merck) 15% Glycerin (E. Merck)
TFB2-Puffer:	10 mM MOPS (Sigma), pH 7,0 10 mM RbCl ₂ (E. Merck) 75 mM CaCl ₂ (E. Merck) 15% Glycerin (E. Merck)

Lösungen für Chemilumineszenz-Messungen:

Krebs-Ringer-Puffer:	132 mM NaCl (E. Merck) 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (E. Merck) 5 mM Na ₂ HPO ₄ (Biomol) 1 mM CaCl ₂ (Biomol) 1,5 mM MgCl ₂ (Biomol)
----------------------	---

	10 mM Glukose (E. Merck)
	in A. bidest. lösen pH 7,1
Bakterien-Lyse-Puffer:	14 g K_2HPO_4 (Merck)
	2,67 g KH_2PO_4 (Merck)
	0,74 g EDTA (Biomol)
	10 g Triton X-100 (Sigma)
	5 g BSA (Biomol)
	ad 1 l A. dest. pH 7,8
	Vor Gebrauch:
	1 mM DTT (Biomol)
	5 mg/ml Lysozym hinzufügen
Luziferase-Puffer:	20 mM Tricin (Biomol)
	1,07 mM $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$ (Aldrich)
	0,1 mM EDTA (Biomol)
	33,3 mM DTT (Biomol)
	270 μ M Li_3 -Coenzym A (Sigma)
	470 μ M Luziferin (Boehringer)
	530 μ M Mg-ATP (Sigma)
	pH 7,8 mit 1 N HCl (E. Merck)

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Bakterien

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

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

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen

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

3.1.3 Ausplattieren von Bakterien

Von einer geeigneten Verdünnung einer Bakterienkultur werden 100-200 µl auf eine Agarplatte gegeben und mit einem abgeflamnten, sterilen Glasspatel gleichmäßig verteilt. Nach dem Antrocknen werden die Platten bei 27°C für *Yersinia* und bei 37°C für *E. coli* im Brutschrank inkubiert. Nach 12-16 Stunden sind Einzelkolonien gewachsen.

3.1.4 Lagerung von Bakterien

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

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA beginnt mit der Auflösung der Bakterienzellwand. Anschließend wird die gesamte bakterielle DNA im alkalischen Milieu denaturiert. Die nachfolgende Neutralisation der Lösung erlaubt nur der kovalent geschlossenen, zirkulären Plasmid-DNA eine Renaturierung. Die chromosomale DNA wird abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA bleibt löslich im Überstand. Dieser Überstand wird auf eine "Mini-prep" Säule (Qiagen, Hilden) gegeben, welche eine Glasmilchmatrix enthält. Die Plasmid-DNA wird an diese Matrix gebunden, durch Zentrifugation von Verunreinigungen gesäubert und von der Matrix eluiert. Die isolierte Plasmid-DNA kann für alle molekularbiologischen Manipulationen genutzt werden.

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

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

Die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte erfolgt aus einem Gesamtzellysat von Bakterien. Dazu wird Bakterienzellmasse von einer Platte direkt in 70µl sterilem Ampuwa aufgelöst und für 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend 5 min bei 15000 rpm abzentrifugiert. Je 5 µl des DNA-haltigen Überstands werden in einem 100 µl PCR-Reaktionsansatz eingesetzt. Dieser Reaktionsansatz enthält außerdem 2,5 U Taq-Polymerase, 1/10 Volumen des mitgelieferten Puffers, je 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1,5 mM MgCl₂ und je 1 µM der beiden Primer. Die Amplifikation

der DNA-Segmente wird durch 25-35 Zyklen der folgenden drei Inkubationsschritte in einem PCR Thermocycler durchgeführt:

1. Denaturierung der DNA bei 94°C für 45 sec,
2. Bindung der Primer an die DNA bei den entsprechenden Schmelztemperaturen für 1 min,
3. DNA-Elongation bei 72°C für 2 min.

Den Zyklen geht ein einmaliger Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 min voraus und eine Elongation bei 72°C für 7 min beendet die PCR. 10 µl des PCR-Ansatzes werden anschließend elektrophoretisch analysiert und zur Klonierung über "QIAquickspin"-Säulen (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

3.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

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

Die Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III, *Sal*I und *Xba*I sowie den vom Hersteller (Roche) mitgelieferten Puffern. 1 µg DNA wird in einem Volumen von 50 µl mit 10 U Restriktionsenzym 2-3 h (Plasmid-DNA) oder 12-24 h (PCR-Produkt) bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und über "QIAquickspin"-Säulen (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird eingesetzt, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen. Hierzu wird die Agarose in dem für die Elektrophorese benutzten Laufpuffer (1 x TAE-Puffer) aufgeköcht und nach Abkühlung auf ca. 50°C in das Bett einer Horizontal-Gelelektrophoresekammer gegossen. Der Einsatz eines Gelkammes bildet die Taschen, in die die zu analysierende DNA-Probe gegeben wird. Die Konzentration der Agarosegele (0,8-1,2%) wird entsprechend der Größe der zu analysierenden DNA gewählt. Je größer die zu trennenden DNA Stücke sind, umso geringer konzentriert wird die Agarose eingesetzt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Agarosekonzentration für die Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente

% Agarose (w/v)	Trennbereich linearisierter DNA (kb)
2,0	100-2000
0,7	200-6000
0,6	300-20000
0,3	1000-50000

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

3.2.5 DNA Isolierung aus Agarosegelen

In einem ersten Schritt wird die gewünschte DNA-Bande, nach Färbung mit Ethidiumbromid, auf einen UV-Transilluminator ausgeschnitten. Dieses Gelstück wird in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und in einem dreifachen Volumen mit Puffer QG von QIAGEN bei 45-55°C vollständig gelöst. Die Suspension wird 1 Minute in einer Mikrozentrifuge über eine Waschsäule abzentrifugiert und anschließend mit dem Puffer PE gewaschen. Nach dem Verwerfen des Überstandes wird erneut 1 Minute bei $\geq 10000 \times g$ zentrifugiert. Die gereinigte DNA innerhalb der Säule wird mit 50 μl Wasser gelöst und in ein frisches Eppendorfgefäß gesammelt. Die isolierte DNA kann anschließend erneut in einem Agarosegel überprüft werden.

3.2.6 Dephosphorylierung linearisierten Vektors

Um die Religation von freien Vektorenden zu verhindern, werden die terminalen Phosphatgruppen an den 5'-Enden durch eine Behandlung mit CIP (calf intestinal phosphatase) entfernt. Zur linearisierten Vektor-DNA gibt man 5 μl 10 x CIP-Puffer und 0,01 units CIP/pmol 5'-termini in einem Volumen von 50 μl . Dieser Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird noch einmal die gleiche Menge CIP zugegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch eine 15 minütige Inkubation bei 68°C gestoppt.

3.2.7 Ligation

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

3.2.8 Transformation von *E. coli*

E. coli-Zellen werden mit gereinigter Plasmid-DNA inkubiert. Das Plasmid trägt ein Gen für eine Antibiotikaresistenz, die das Bakterium zuvor nicht besaß. Auf entsprechende antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert, vermehren sich nur diejenigen Zellen, die das Plasmid aufnehmen und dadurch gegen das Antibiotikum resistent werden.

1 ml einer Übernachtskultur (üN) des entsprechenden *E. coli*-Stammes wird in 100 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 geschüttelt. Anschließend werden die Bakterien auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Die Bakterien werden in 30 ml eiskaltem TFB1 resuspendiert und abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Bakterien werden in 4 ml eiskaltem TFB2 resuspendiert. Anschließend werden die in TFB2 resuspendierten Bakterien in 400µl oder 800 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

Zur Transformation werden 50 µl Ligationsansatz bzw. 0,1-1 µg Plasmid-DNA mit 100-200 µl der kompetenten Zellen 30 min auf Eis inkubiert, 90 sec bei 42°C inkubiert, kurz im Eisbad gelagert und nach Zugabe von 1 ml LB Medium 1 h bei 37°C inkubiert. Die transformierten Bakterien werden auf Selektivagar ausplattiert.

3.2.9 Elektroporation von *Yersinia*

Die Methode der Elektroporation beruht darauf, daß eine Bakteriensuspension hoher Zelldichte, zu der DNA pipettiert wird, kurzfristig einem starken elektrischen Feld

ausgesetzt wird. Dadurch kommt es zu einer Destabilisierung der bakteriellen Membran. In der Folge wird diese kurzzeitig durchlässig, so daß die Plasmid-DNA in das Zellinnere diffundieren kann. Damit es nicht zu einem Kurzschluß kommt, muß die bakterielle Suspension möglichst ionenfrei sein.

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

3.2.10 Luciferase-Assay

Die Bakterien werden über Nacht im Nährmedium herangezüchtet. Die Bakterienkulturen werden dann fünf Minuten bei 4°C und 20.000 G pelletiert. Der Überstand wird sofort abpipettiert und das Zellpellet anschließend in 500 µl Luc-Lysispuffer resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. 25µl von jeder Probe werden in pro Well der 96-Well-Platte (DYNATECH MicroFLUOR-Plate) in einer Dreifachbestimmung pipettiert. Kurz vor der Messung werden jeweils 50µl Luc-Reagenz hinzupipettiert und im Beta-Plate vermessen.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Isolierung der sekretierten Proteine (Yops)

Die Produktion von *Yersinia* Outer Proteins (Yops) wurde bei 37°C in Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium induziert. Durch Chelatierung von Ca²⁺ durch EGTA wird die Sekretion von Yops induziert.

Eine Übernachtskultur, bei 28°C in LB-Medium gewachsen, wird 1:40 in BHI Medium verdünnt und bei 37°C für 90 min schüttelnd inkubiert. Im Anschluß wird durch Zugabe von EGTA (Endkonzentration 5 mM), MgCl₂ (Endkonzentration 15 mM) und

Glukose (Endkonzentration 0,2%) die Sekretion der Yops induziert. Nach einer weiteren 90-120 minütigen Inkubation werden die Bakterien bei 5000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 1 ml 0,9% NaCl aufgenommen und bei -20 °C eingefroren. Die Präzipitation der sekretierten Proteine im Überstand erfolgt mit Trichloressigsäure (TCA) (Endkonzentration 10%) für mindestens 60 min bei 4°C. Es folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm und 4°C. Das bräunlich gefärbte Proteinpellet wird vorsichtig mit eiskaltem Aceton aus dem Zentrifugenröhrchen gekratzt. Diese präzipitierten Proteine werden darauf zwei bis dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, um das TCA zu lösen. Nach dem letzten Aceton-Waschschritt werden die Proteine in eiskaltem Ampuwa aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wird das Ampuwa quantitativ mit einer Kanüle entfernt, die Proteine in 50 µl Ampuwa resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Hierbei bewirkt das Detergenz SDS die Dissoziation, Entfaltung und Solubilisierung komplexer Proteinmoleküle oder Proteinassoziate. β -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken und unterstützt damit diesen Vorgang. Im elektrischen Feld wandern die von dem negativ geladenen SDS umgebenen Proteine in Richtung der Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit großer Proteinmoleküle geringer als die kleiner Proteinmoleküle, wodurch in der Folge eine Auftrennung entsprechend dem Molekulargewicht der Proteine erfolgt. Die angewandte Methode nach Laemmli bedient sich eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels (Laemmli, 1970). Hierbei werden die Proteine zunächst in einem sog. „Sammelgel“ fokussiert, um sie dann in dem sog. „Trenngel“ nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht zu trennen (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Zusammensetzung des SDS-PAGE

	Trenngel	Sammelgel
Lösung	11%	4%
AA/BA (30:0,8)	3,7 ml	0,7 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,6)	2,5 ml	-

0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	1,25 ml
Ampuwa	3,6 ml	3,05 ml
10% SDS	200 μ l	100 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l
10% APS	40 μ l	40 μ l

Die für das Trenngel erforderlichen Lösungen werden auf Eis zusammengegeben und vorsichtig in eine Vertikalkammer (10,5 cm x 7,5 cm x 1,0 mm) bis zu 2/3 des Endvolumens pipettiert. Das Gel wird mit Ampuwa überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach 30-minütiger Polymerisation des Trenngels und Entfernung des Ampuwas wird das Sammelgel in das verbleibende Volumen der Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach erneuter 30-minütiger Polymerisation des Sammelgels erfolgt der Probenauftrag. Die zu analysierenden Proteinproben werden mit 1/2 v/v 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min gekocht und dann nach einer ca. 10-minütigen Abkühlungsphase über die Dauer von 5 Minuten bei hoher Geschwindigkeit abzentrifugiert. Anschließend werden die Proben vorsichtig in die Taschen des kurz zuvor entfernten Kammes pipettiert. Die Elektrophorese wird in 1 x SDS-Elektrophoresepuffer bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA durchgeführt.

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

3.3.3 Immunoblot

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

Die über eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden elektrophoretisch in einer BioRad Minigel Blotting Kammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer erfolgt in 1 x Westernblotpuffer bei einer Stromstärke von konstant 350 mA für 1 h. Die Nitrozellulosemembran wird anschließend für 1 h bis μ N in Blockierungspuffer inkubiert. Nach dem Blockieren der freien Membranareale wird die Nitrozellulosemembran für 1,5 h bis μ N mit einem gegen das gewünschte Protein gerichteten Antikörper bzw. Antiserum (1:3000 verdünnt in PBS/Tween) inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS/Tween wird ein zweiter, gegen den ersten gerichteter Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG, HRP konjugiert, 1:5000 verdünnt in PBS/Tween), dazugegeben und für 1,5 h mit der Membran inkubiert. Die Membran wird erneut dreimal mit PBS/Tween gewaschen. Die Konjugation des zweiten Antikörpers mit einer Peroxidase (HRP) erlaubt den Nachweis spezifischer Proteinbanden nach Inkubation mit Substrat (ECL Kit, Amershan-Pharmacia).

3.4 Fluoreszenzmikroskopie von GFP und BFP

Die GFP- und BFP-produzierenden Yersinien werden mit dem Leica Aristoplan Epifluoreszenzmikroskop untersucht. Dabei wird für die GFP-produzierende Bakterien das Standard Filterset FITC (I3: Anregungsfilter BP 450-490, Teilerspiegel 510, Sperrfilter 520) und für die BFP2-produzierenden Bakterien ein spezielles UV-Fluoreszenzfilterset (Anregungsfilter BP340-380, Teilerspiegel 400, Sperrfilter 430) verwendet. Es werden Objektive mit 40, 60 und 100facher Vergrößerung verwendet. Mikroskopische Bilder werden mit der digitalen SPOT Videokamera inkl. der Software benutzt.

3.4.1 Quantifizierung von YopE-Luc und SycE-Luc--Biolumineszenz mit der CCD Kamera

Für die Bestimmung der Luziferaseaktivität werden die Bakterien lysiert. Die optische Dichte einer Bakterienkultur wird bestimmt und 1 ml dieser Kultur wird abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird mit 1 ml Bakterien-Lyse-Puffer versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wird maximal abzentrifugiert und ein Aliquot des Überstandes mit 50 µl des Luciferin-Reagenz versetzt. Die Luziferaseaktivität wird für 15 Minuten in der „Darkbox“ in einer weiß beschichteten Mikrotiterplatte (Dynex, Denkendorf) mit der CCD Kamera C2400-77 (Hamamatsu) gemessen. Es wird eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Ist die Luziferaseaktivität zu stark, wird das Lysat entsprechend mit dem Lyse-Puffer verdünnt.

3.4.2 Durchflußcytometrische Messung der GFP-Fluoreszenz Quantifizierungen der GFP-Produktion

Für die durchflußzytometrischen Messungen von GFP-produzierenden Bakterien wird ein Coulter Epics MXL Gerät benutzt. Der Argon Laser erzeugt einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm, so daß GFP effizient angeregt werden kann. *In vitro* stimulierte Bakterien werden verdünnt und mit dem Side Scatter Modus detektiert. Die

Intensität der Fluoreszenz wird ermittelt und ein sogenanntes “Gate” gesetzt, welches die Bakterien repräsentiert. Die durchschnittliche Fluoreszenz wird erfaßt und graphisch dargestellt. Zwei weitere “Gates” werden gesetzt, um die fluoreszierende von der nicht fluoreszierenden Population von Yersinien zu trennen. Die Skala ist logarithmisch und die Fluoreszenz von 50.000 bis 200.000 Ereignissen (Yersinien) werden gezählt.

3.4.3 Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET)

Es werden die Fusionsprodukte von YopE-GFP und von SycE-BFP verwendet, um die vermutete direkte Proteininteraktionen zwischen YopE und SycE innerhalb einer Zelle mit Hilfe des Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET) nachweisen zu können. Dabei hat BFP eine Exzitation bei 389 nm und eine Emission von 445 nm, während die Exzitation des GFP bei 489 nm und sein Emissionsmaximum bei 511 nm liegt. Gleichzeitig überlappen sich dabei das Emissionsspektrum von BFP als Donor und das Exzitationsspektrum von GFP als Akzeptor. Auf Grund dieser Überlappung überträgt das angeregte BFP (-SycE) mit Hilfe eines FRET-Spezialfilters seine höher energetische Fluoreszenz direkt auf das niederenergetische GFP (-YopE). In der Folge wird im Fluoreszenzmikroskop fast keine blaue Fluoreszenz des BFP beobachtet, obwohl in dem entsprechenden Wellenlängenbereich angeregt wird, sondern nahezu ausschließlich die grüne Fluoreszenz des GFP.

3.4.4 Spektralphotometer

Stationäre Fluoreszenzspektrometer messen wellenlängenabhängig das gesamte Fluoreszenzspektrum unter Verwendung einer kontinuierlichen Anregungslichtquelle (Abbildung 3.1, Seite 44). Dabei können die Anregungswellenlänge (Anregungsspektrum), die Emissionswellenlänge (Emissionsspektrum), beide Wellenlängen gleichzeitig mit einem festen Frequenzabstand voneinander (synchronisiertes Scannen), oder der gesamte Anregungs- und Emissions-Frequenzraum in einem 3D-Diagramm gescannt und aufgezeichnet werden.

Nach Anzüchtung der Bakterien in einem entsprechenden Nährmedium wird die Suspension dreimal in PBS-Puffer gewaschen und in einer 1:10 Verdünnung in die Küvette des Photometers gefüllt. Es erfolgt die Einstellung des Photometers auf die bekannte Wellenlänge von BFP bzw. GFP. Anschließend wird der Wellenlängen-

bereich festgelegt, in dem die zu erwartenden Fluoreszenzmaxima entweder als Emission oder als Exzitation erwartet werden.

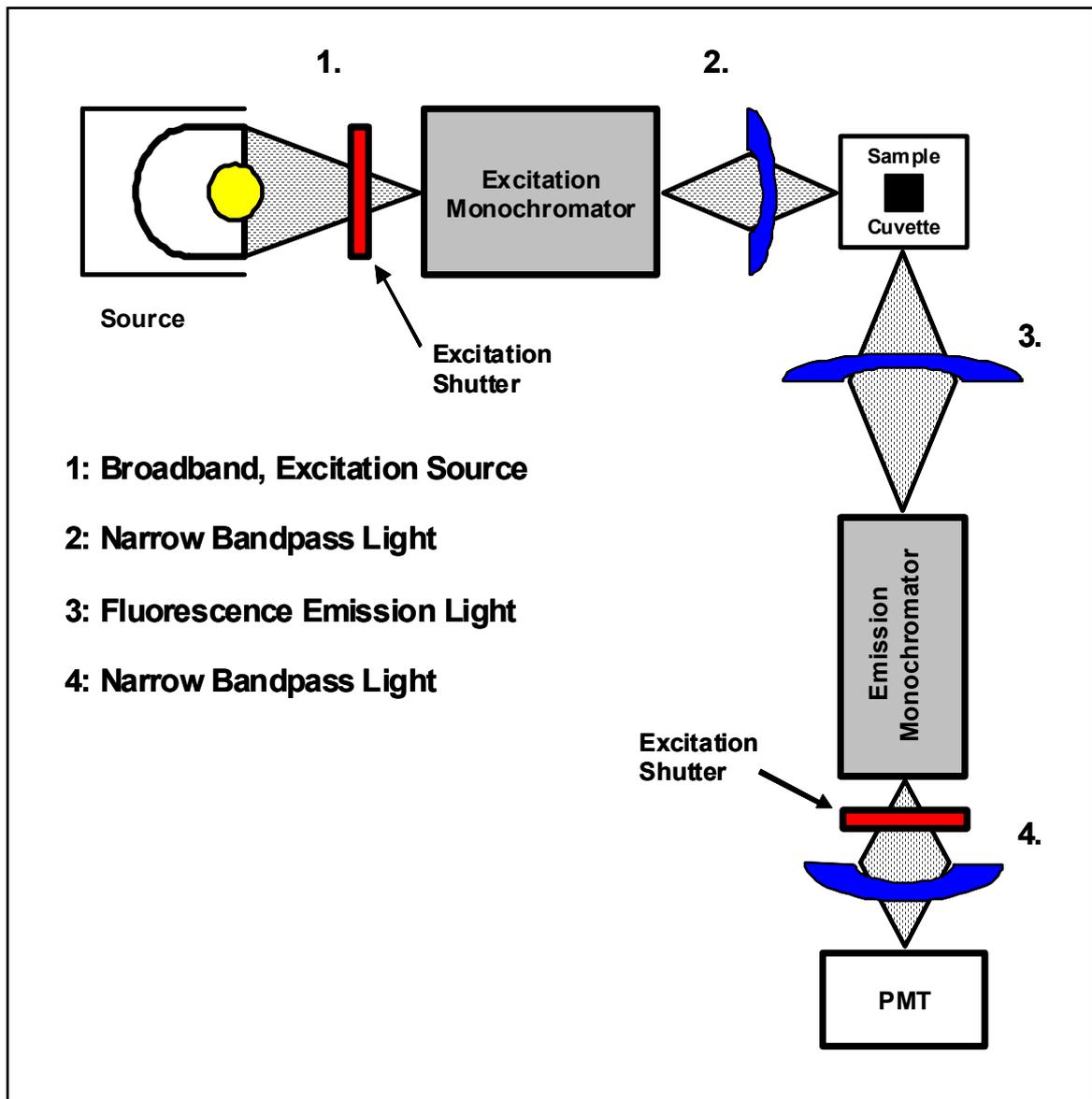


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau des AMINCO-Bowman Luminescence Spektrometers mit zwei Monochromatoren (Emission und Exzitation; Serie 2). Monochromatoren isolieren einen spezifischen Wellenlängenbereich aus einem weiten Wellenlängenbereich. Dies kann sowohl für Wellenlängen erfolgen, die die Exzitation einer Fluoreszenz betreffen, als auch für eine Wellenlänge bei der die Fluoreszenz emittiert wird.

4 Ergebnisse

4.1 Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET)

YopE ist ein Virulenzprotein von *Yersinia enterocolitica*, welches für seine Translokation und Sekretion das Chaperon SycE benötigt (siehe Kapitel 1.2.4, Seite 10)

Es wird diskutiert, daß das Chaperon an die Aminosäuren 15-100 am N-terminalen Ende von YopE bindet und durch diese Bindung die korrekte Faltung von YopE ermöglicht sowie die Degradation des Virulenzproteins verhindert. Ferner dient das Chaperon SycE als Initiator für die Typ III-Sekretion und Translokation von YopE in die eukaryonte Zelle.

In dieser Arbeit wollten wir die Interaktion zwischen YopE und seinem Chaperon SycE mit Hilfe der Methode des Fluorescence-Resonance-Energy-Transfers (FRET), unter Verwendung der Reportergene *gfp* und *bfp2* nachweisen

4.1.1 Herstellung der Konstrukte

4.1.1.1 Klonierung von GFP

Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene GFP-Varianten verwendet. Von dem Wild-Typ-GFP wurden die Varianten GFP-S65T (G2) und GFPmut (G3) eingesetzt. Beide Varianten zeichnen sich durch eine größere Stabilität und geringere Ausbleichrate unter dem Mikroskop aus, was in einer höheren Fluoreszenzintensität resultiert.

Es wurden Primer mit den Restriktionsschnittstellen *EcoRV* und *BamHI* benutzt, um beide GFP-Varianten mittels der PCR zu amplifizieren. Nach Auftragen auf ein Agarosegel und Reinigen der PCR-Produkte erfolgte ein Restriktionsenzymverdau (REV) über Nacht mit den Enzymen *EcoRV* und *BamHI*. Der Vektor pACYC184 und die PCR-Produkte wurden nach dem REV durch Auftrennen auf dem Agarosegel erneut gereinigt. Anschließend werden Vektor und Insert (GFP) in einem Ligationsansatz ligiert und transformiert. Die Bakterien werden auf selektiven Agarplatten ausgestrichen und aus einigen Klonen die Plasmide isoliert. Die isolierten Plasmide werden einem REV bzw. einer PCR unterzogen und damit durch ihre Größenverhältnisse auf dem Agarosegel auf ihre Richtigkeit hin kontrolliert. Im nächsten Schritt wurde in den Vektor die verschieden langen Fragmente von YopE

(YopE - 18 AS, YopE - 53 AS und YopE - 138 AS) zusammen mit dem SycE, kloniert.

Alle drei YopE-Fragmente werden durch Genfusionen sowohl an das *gfp-s65t* als auch an das *gfpmut* in den Vektor kloniert, so daß sich in dem Vektor jeweils eines der GFP-Varianten, die jeweilige YopE-Sequenzen mit 18, 53 bzw. 138 Aminosäuren und das Chaperon SycE befindet (klonierte Vektoren pLSGYE18/53/138G2/3-SyB (Abbildung 4.1, Seite 47)).

4.1.1.2 SycE-BFP

Das Plasmid pBFP1 von Clontech[®] wurde als Matrize für die Klonierung des BFPs herangezogen. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Yersinien mit dem *bfp*-Gen *in vitro* und *in vivo* BFP produzieren können (Jacobi et al., 1998). Das Plasmidkonstrukt pLSGYE138G2/G3 wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* geschnitten und mit *HindIII* und *XbaI* geschnittenem BFP1 religiert. Damit wurde das Reporter-gen BFP an das Chaperon SycE kloniert (pLSGYE138G2/G3-SyB; Abbildung 4.1, Seite 47). Dadurch kann bei Translation von SycE auch gleichzeitig BFP produziert werden.

4.1.2 Produktion und Charakterisierung von YopE-GFP/SycE-BFP aus *Yersinia enterocolitica*

Die Vektoren pLSGYE18/53/138G2/3-SyB wurden in *Y. enterocolitica* transformiert. Nach Anzüchten der Yersinien über Nacht bei 27°C erfolgte am nächsten Tag die *in vitro*-Stimulation der Bakterien durch Temperaturerhöhung auf 37°C und Calciumentzug. Die sekretierten Yop-Proteine werden präzipitiert, abzentrifugiert und mittels SDS-Gel und anschließendem Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen GFP auf das Vorhandensein der Proteinfusionen detektiert. Darüber hinaus werden nach Lyse der Bakterien auch die zellulären Proteine mittels SDS-Gel und Immunoblot analysiert.

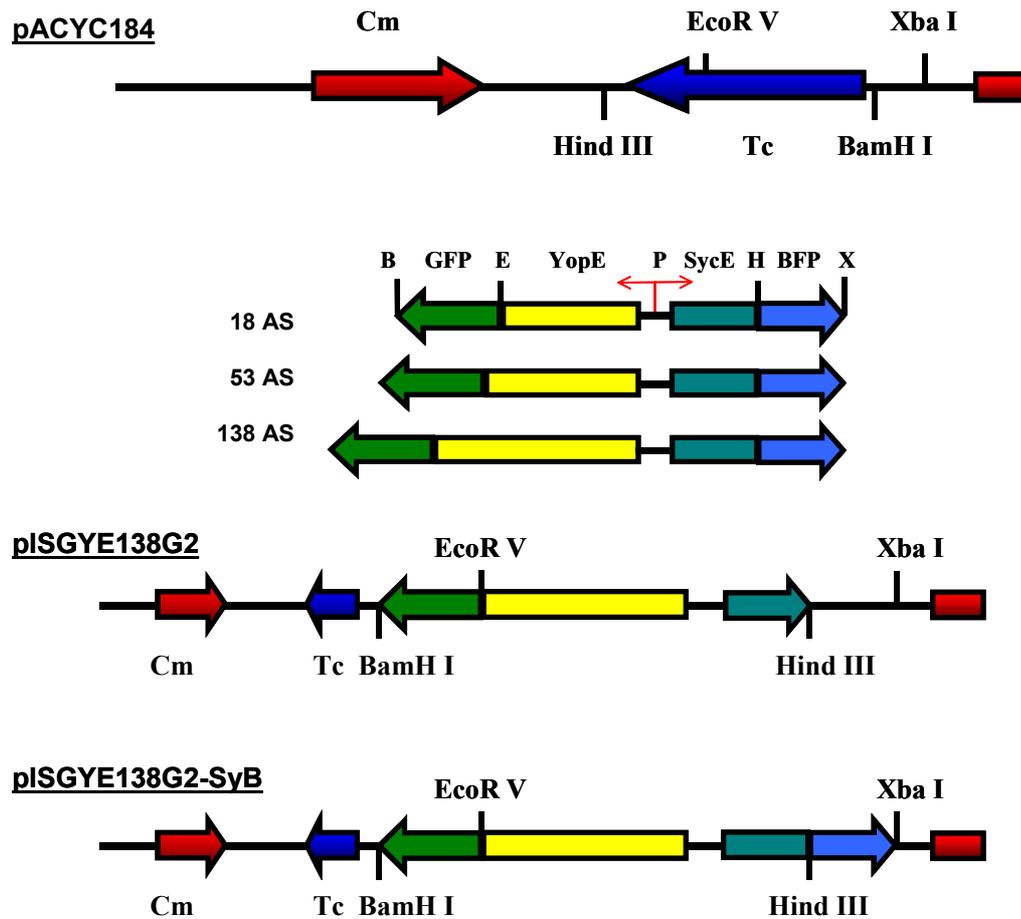


Abbildung 4.1 Klonierungsstrategie für die YopE-GFP/SycE-BFP Konstrukte (Bsp. pISGYE138G2-SyB). pACYC184 Ursprungsvektor. pISGYE138G2: Klonierter Vektor ohne BFP. pISGYE138G2-SyB: Klonierter Vektor mit BFP. Cm: Chloramphenicolkassette. Tc: Tetrazyklincassette. Restriktionsenzyme: *BamHI*, *EcoRV*, *HindIII*, *XbaI*. P: Promotorregion für YopE und SycE

Dabei konnten die Banden der Proteinfusionen aus den Zellysaten entsprechend ihrer Größe bei 28 kDa, 32 kDa und 48 kDa im SDS-Gel und im Westernblot dargestellt werden. Wesentlich schwieriger war es, die Proteine im Überstand als eindeutige Banden zu erkennen. Die Konstrukte YopE138-G2/3 wurden in geringen Mengen sekretiert, YopE53-G2 und YopE18-G2 am stärksten (Abbildung 4.2, Seite 48)

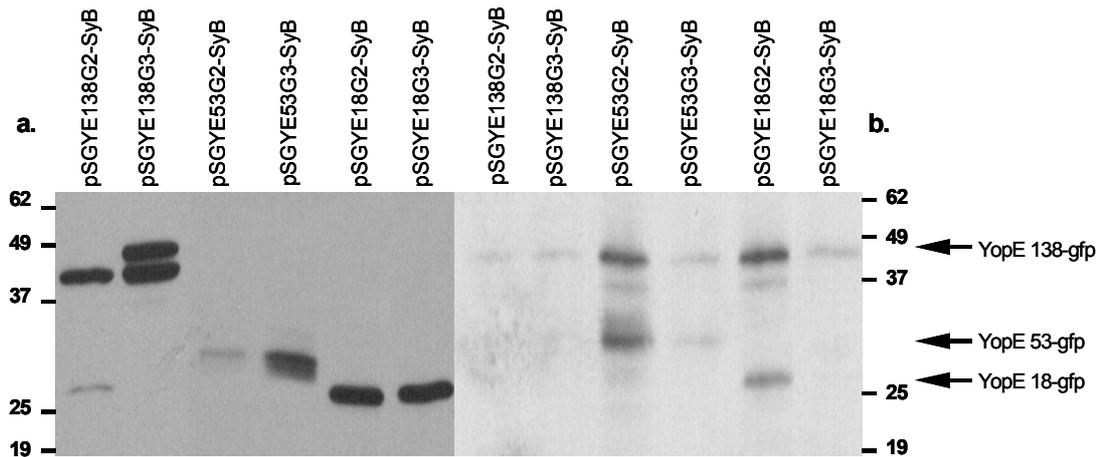


Abbildung 4.2 Immunoblot von WA-C ([pYV08] pISGyE18/53/138G2/3-SyB) aus Zelllysaten links (a.) und Überständen rechts (b.) nach Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C und nach Stimulation durch EGTA und $MgCl_2$ mit Kaninchen Anti-GFP-Antiserum und Anti-Kaninchen Peroxidase-Konjugat

4.1.3 Fluoreszenzmikroskopie von *Y. enterocolitica* nach Transformation mit pISGyE18/53/138G2/3-SyB

Die Vektoren pISGyE18/53/138G2/3-Sy wurden in *Y. enterocolitica* transformiert. Nach Anzüchten der Yersinien über Nacht bei 27°C erfolgte am nächsten Tag die *in vitro*-Stimulation der Bakterien durch Temperaturerhöhung auf 37°C und Calciumentzug. Nachfolgend wurden die Yersinien mikroskopiert.

Nach einer Exzitation mit einer Wellenlänge von 488 nm und Einsatz eines 515 nm FITC Emissionsfilters wurde eine deutliche Grünfluoreszenz beobachtet (Abbildung 4.3, Seite 49).

Die verschiedenen YopE-GFP-Konstrukte wiesen eine vergleichbare Fluoreszenzstärke auf. Eine unterschiedliche Intensität konnte jedoch zwischen den Konstrukten GFP-S65T und GFPmut beobachtet werden. GFPmut wies eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität auf, mit einer wesentlich geringeren Ausbleichrate auf. Noch über 30 Minuten später waren die Bakterien an ihrer grünen Fluoreszenz zu erkennen.

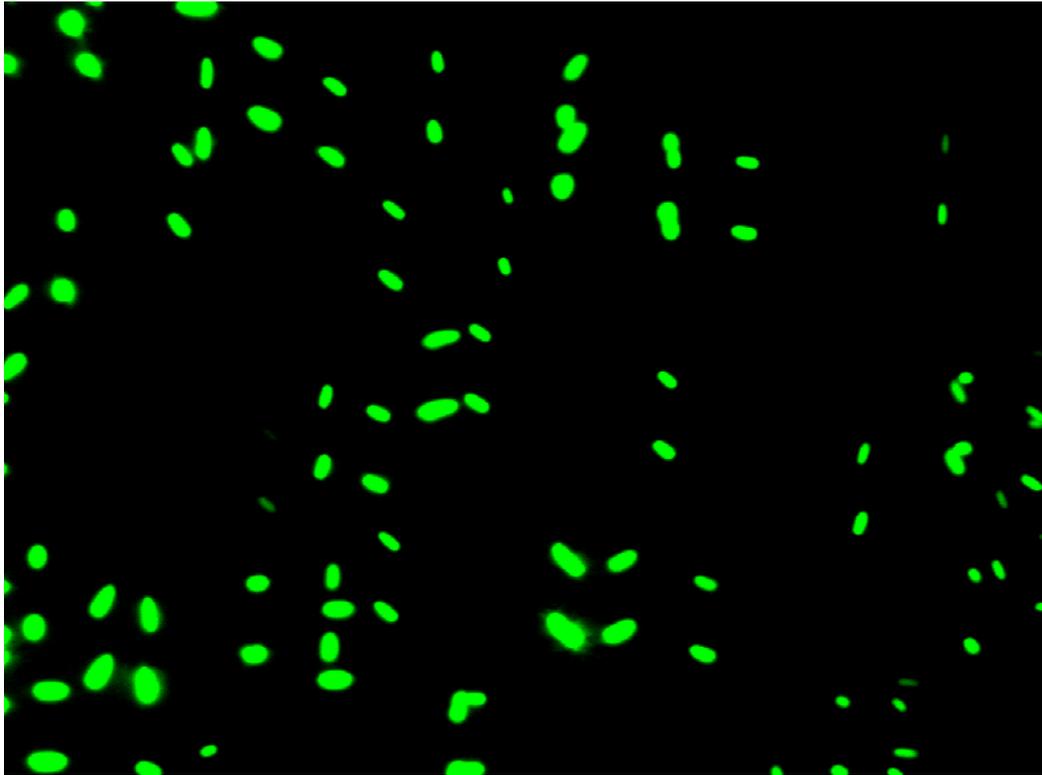


Abbildung 4.3 Fluoreszenzmikroskopie von WA-C ([pYV08] pISGYE138G3-SyB) nach Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C über 90 Minuten und Calciumentzug (EGTA/MgCl₂), FITC-Filter (Sperrfilter 520 nm)

Dabei war an einem der beiden Pole der Stäbchenbakterien eine Konzentrierung grüner Fluoreszenz im Sinne kleiner monopolarer Granula innerhalb der Bakterien erkennbar. Diese Fluoreszenz war bei Yersinien aus nicht-calciumdepletiertem Medium mikroskopisch stärker, da bei ihnen keine Sekretion der Yops induziert wurde.

Nach einer Exzitation mit einer Wellenlänge von 380 nm und Einsatz eines 445 nm FITC Emissionsfilters wurde eine, im Vergleich zu der Grünfluoreszenz der YopE-GFP-Konstrukte, schwächere Blaufluoreszenz mit einer hohen Ausbleichrate in wenigen Sekunden der SycE-BFP-Konstrukte beobachtet. Ferner war eine unspezifische diffuse Blaufluoreszenz im Hintergrund zu erkennen, aus diesem Grund war es schwierig, die fluoreszierenden Bakterien vom Hintergrund abzugrenzen.

4.1.4 Fluoreszenzmikroskopie von *Y. enterocolitica* nach Transformation eines high-copy-Vektors mit BFP1 (phSGYE18/53/138G2/3-SyB)

Während die Fusionsproteine unter der Verwendung eines low-copy-Vektors pACYC184 sich mit ca. 10 Plasmidkopien in einer Bakterienzelle befinden, kann die Proteinmenge unter Verwendung eines high-copy-Vektors pKS auf ca. 200 Plasmidkopien in einer Bakterienzelle erhöht werden.. Die Menge an YopE-GFP und SycE-BFP ist unter diesen Umständen größer und die damit verbundene Fluoreszenzintensität von GFP und BFP wesentlich stärker.

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XbaI* und *SalI* wird das Konstrukt YopE-GFP/SycE-BFP aus dem Low-Copy-Vektor herausgeschnitten in den high-copy-Vektor ligiert und mittels Elektroporation in *Yersinia enterocolitica* transformiert.

Anschließend wurde das in dem Kapitel 4.1.3 (Seite 48) beschriebene Experiment wiederholt. Dabei fiel nach Temperaturerhöhung auf 37°C eine sehr starke grüne Fluoreszenzintensität auf. Auch die gfp-S65T Variante zeigte eine sehr stabile, über 20 Minuten anhaltende und helle Fluoreszenz (Abbildung 4.4, Seite 51). Die Intensität der blauen Fluoreszenz war mit dem pKS-Vektor doppelt so hoch, doch zeigte sich auch mit diesem Vektor, dass die Blaufluoreszenz unter dem Mikroskop in wenigen Sekunden ausbleicht

4.1.5 Fluoreszenzmikroskopie von *Y. enterocolitica* nach Transformation eines high-copy-Vektors mit BFP2 (phSGYE18/53/138G2/3-SyB)

In einem weiteren Schritt wurde dann *bfp2* im Austausch mit dem *bfp* in den pKS-Vektor ligiert. *bfp2* weist durch den Austausch einzelner Aminosäuren eine Änderung der Tertiärstruktur auf, die eine 3-fach höhere Fluoreszenzintensität und Stabilität gegenüber dem BFP begründet (siehe Kapitel 1.3.1, Seite 15).

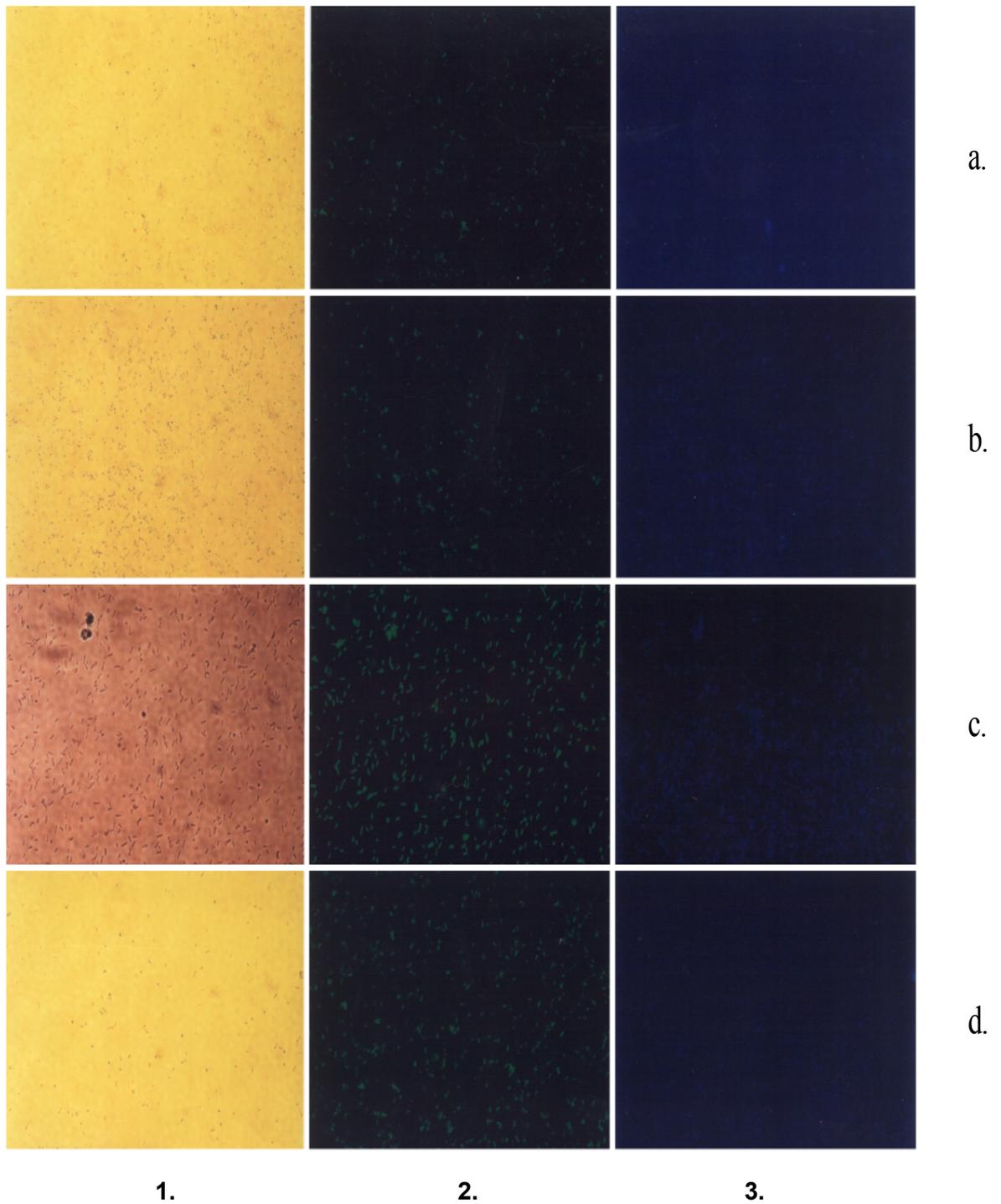


Abbildung 4.4 *in vitro* Stimulation von WA-C[pYV08] phSGYE18G3SyB (a.), WA-C[pYV08] phSGYE18G2-SyB (b.), WA-C[pYV08] phSGYE138G3SyB (c.) und WA-C[pYV08] phSGYE138G2SyB (d.) in pKS nach Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C und Calciumentzug (Zugabe von 5 mM EGTA und MgCl₂). (1.) Phasenkontrastmikroskopie, (2.) FITC-Filter, Sperrfilter 520 nm; (3.) UV-Fluoreszenzfilterset, Sperrfilter 430 nm.

BFP2 hat tatsächlich ein circa 3-fach stärkeres blaues Fluoreszenzlicht mit einer gleichzeitig erkennbar größeren Stabilität (geringere Ausbleichrate), wie BFP (Abbildung 4.5, Seite 52).

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurden in den weiteren Experimenten zum FRET die in *Y. enterocolitica* transformierten Vektoren auf der Basis des high-copy-Vektors sowie des BFP2 verwendet.

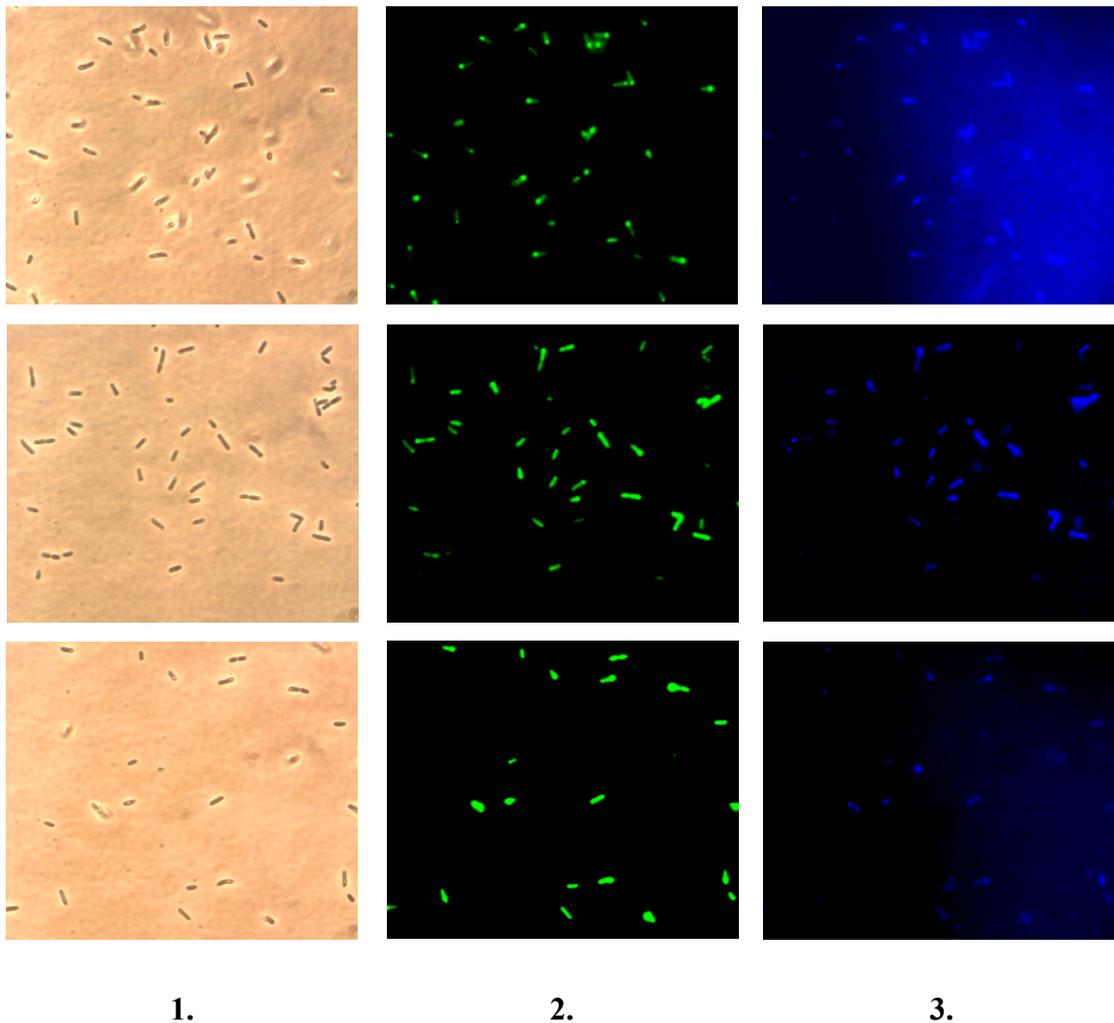


Abbildung 4.5 *in vitro* Stimulation von WA-C([pYV08] phSGYE53G3-B2) (a.), WA-C([pYV08] phSGYE138G2-B2) (b.) und WA-C([pYV08] phSGYE138G2-B2) (c.) in pKS nach Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C und Calciumentzug (5 mM EGTA, MgCl₂). (1.) Phasenkontrastmikroskopie; (2.) FITC-Filter, Sperrfilter 520 nm; (3.) UV-Fluoreszenzfilterset, Sperrfilter 430 nm.

4.1.6 Fluorescence Resonance Energy Transfer in *Y. enterocolitica* durch Fluoreszenzmikroskopie

Aufgrund der Überlappung des Emissionsspektrums von BFP (Donor) mit dem Exzitationsspektrums von GFP (Akzeptor), können beide Reportergene für den FRET benutzt werden. Befinden sich diese Fluoreszenzproteine unterhalb einer kritischen Distanz von circa 10-100 Å (in Abhängigkeit der GFP-BFP Orientierung) kann die emittierte Energie vom höher energetischen BFP durch einen FRET-Spezialfilter (AHF Tübingen) direkt auf das GFP übertragen werden.

Die Interaktion zwischen YopE 138 und dem SycE sollte durch Fluoreszenzanregung des GFP mikroskopisch erkennbar sein. Hingegen würden bei Einsatz des trunkierten YopE53 bzw. YopE18 auf Grund der fehlenden SycE-Bindungsstelle keine Interaktion und deshalb keine räumliche Annäherung beider Proteine stattfinden. In der Folge wäre damit ein fehlendes Fluoreszenzsignal verbunden. Dies setzt allerdings voraus, daß im Bakterienzytosol die Konzentration von GFP und BFP nicht zu hoch ist.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop war das Produkt YopE-GFP bei Verwendung des FITC-Filters durch eine starke Grünfluoreszenz sehr gut zu detektieren. Auch die blaue Fluoreszenz des SycE-BFP2 Konstrukts war unter diesen Filtern gut erkennbar. Wurde nun der FRET-Filter eingesetzt, war eine, wenn auch 4-mal schwächere, Grünfluoreszenz zu beobachten. Auf Grund dieser Beobachtung wurde zunächst vermutet, daß ein FRET stattgefunden hatte.

Kontrollversuche wurden anschließend mit BFP2- und GFP-freien Vektorkonstrukten wiederholt. Dies bedeutet, daß für den FRET entweder kein Donor (BFP2) oder kein Akzeptor (GFP) vorhanden war. Im Rahmen dieser Kontrollversuche war in jedem Fall erneut eine vergleichbar schwache Grünfluoreszenz erkennbar.

4.1.7 FRET in *Y. enterocolitica* mittels Fluoreszenzspektrometrie

Im Gegensatz zur Mikroskopie stellt die Fluoreszenzphotometrie/Spektrophotometrie ein objektives, sehr empfindliches Meßverfahren der Emissions- und Exzitationsmaxima auch geringer Fluoreszenzintensitäten dar. Im Hinblick auf die hohe Empfindlichkeit dieses Meßverfahrens wurden deshalb die Experimente zum FRET unter Einsatz der Fluoreszenzspektrometrie wiederholt

Die Ergebnisse der Messungen bei Einsatz vom WA-C ([pYV 08] phSGYE18/53/138G2/3-SyB2) sind in den unten stehenden Abbildungen dargestellt. Bei einer Exzitationswellenlänge von 380 nm stellt sich im Emissionsscan in einem ersten Gipfel bei 440 nm das Emissionsmaximum von BFP2 dar. In einem zweiten Gipfel bei 515 nm ist das Emissionsmaximum von GFP bei allen YopE-Längen zu beobachten. Bei Einsatz der YopE138-GFP-Konstrukte waren die Fluoreszenzmaxima bei 515 nm ausgeprägt (Abbildung 4.6, Seite 55). Hingegen zeigten die Messungen im Zusammenhang mit den YopE53-GFP-Konstrukten an gleicher Stelle eine 2-fach geringere Fluoreszenzintensität (Abbildung 4.7, Seite 56), während bei Einsatz von WA-C ([pYV 08] phSGYE18G2/3-SyB2) eine noch geringere Fluoreszenzintensität zu beobachten war (Abbildung 4.8, Seite 57).

Diese Messungen korrespondieren mit den fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen (siehe Kapitel 4.1.6, Seite 53). Auf Grund dieser Ergebnisse ist von einem FRET auszugehen.

Nachfolgend wurde die Fluoreszenzspektrometrie bei den Stämmen WA-C ([pYV 08] pBFP2) und WA-C ([pYV 08] pGFPmut) (Abbildung 4.9, Seite 58, Abbildung 4.10, Seite 59) durchgeführt. Dabei zeigte sich im Emissionsscan eine ca. 3.5-fach stärkere Fluoreszenzintensität bei Verwendung der GFP-Konstrukte im Vergleich zu den Messungen bei Einsatz der BFP2-Konstrukte. Die Einstellungen dieser Fluoreszenzintensitäten wurden als Referenz für die Messungen der Konstrukte verwendet. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen. Das breite Emissionsspektrum von GFP kann bei Anwendung des Exzitationsscans dargestellt werden.

Auch bei Verwendung einer Exzitationswellenlänge von 380 nm konnte in den Experimenten mit BFP-defizienten Konstrukten bei der Fluoreszenzmessung ein Emissionsmaximum bei 510 nm beobachtet werden. Auch diese Ergebnisse entsprechen den Nachweisen einer Grünfluoreszenz in den korrespondierenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen.

Der Bakterienstamm Wa-C [pyV08] ohne transformiertes Plasmid zeigte keine meßbare Fluoreszenz (Abbildung 4.11, Seite 60).

Diese Ergebnisse zeigen, daß unter Einsatz der hochempfindlichen Fluoreszenzspektrometrie der FRET mit GFP und BFP2 nicht sicher nachgewiesen werden kann.

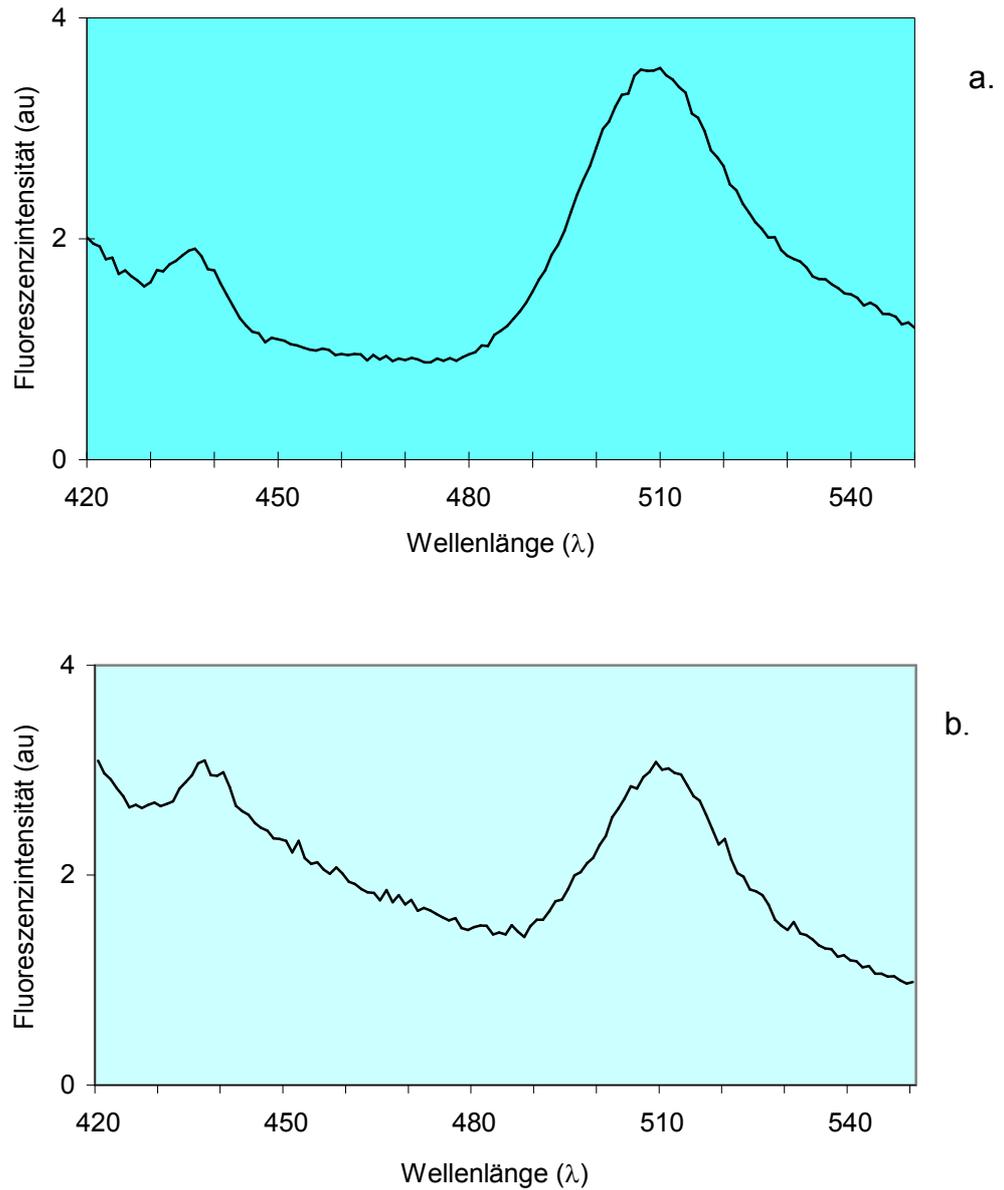


Abbildung 4.6 Emissionsscan von WA-C ([pYV 08] phSGYE138G3/G2-SyB2) nach Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C über 90 Minuten und Stimulation (5 mM EGTA und MgCl₂)

a. WA-C [pYV 08] mit dem Kontrukt phSGYE138G3-SyB2 (Exzitationswellenlänge 380 nm)

b. WA-C [pYV 08] mit dem Kontrukt phSGYE138G2-SyB2 (Exzitationswellenlänge 380 nm)

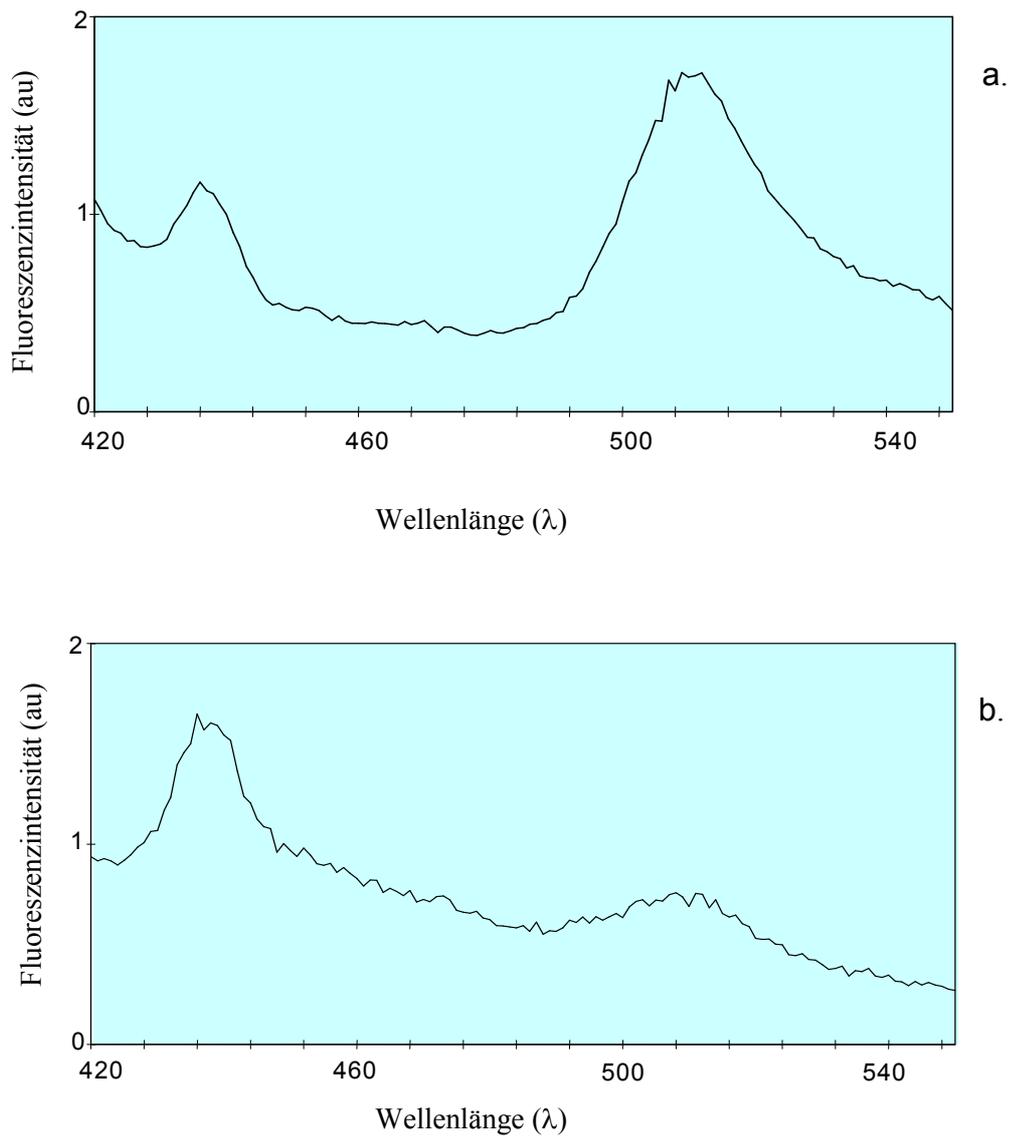


Abbildung 4.7 Emissionsscan von Wa-C ([pYV08] phSGYE53G3/G2-SyB2) nach Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C über 90 Minuten und Stimulation (5 mM EGTA und MgCl₂)

a. WA-C [pYV 08] mit dem Kontrukt phSGYE53G3-SyB2 (Exzitationswellenlänge 380 nm)

b. WA-C [pYV 08] mit dem Kontrukt phSGYE53G2-SyB2 (Exzitationswellenlänge 380 nm)

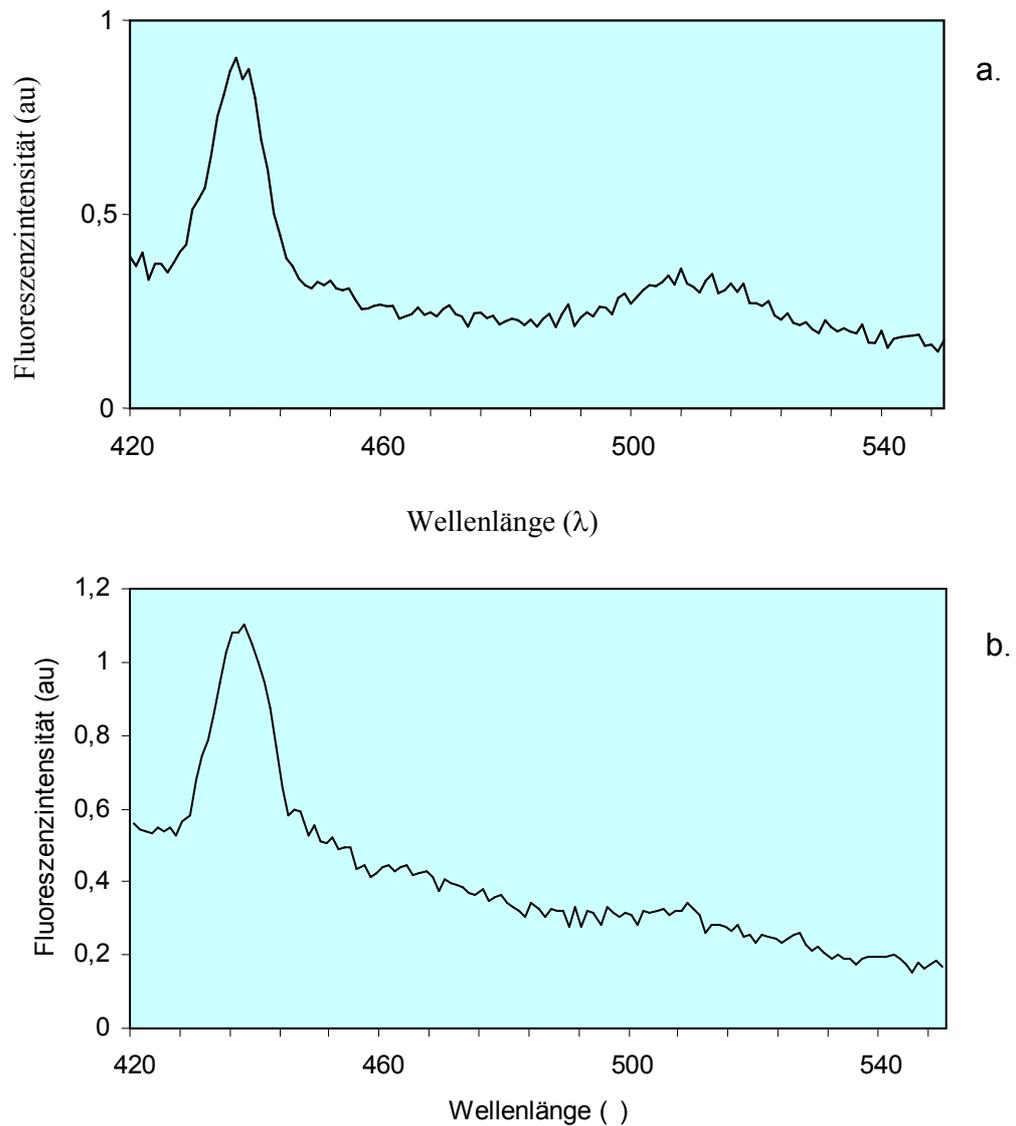


Abbildung 4.8 Emissionsscan von WA-C ([pYV 08] phSGYE18G3/G2-SyB2) nach Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C über 90 Minuten und Stimulation (5 mM EGTA und MgCl₂)

- a. WA-C [pYV 08] mit dem Kontrukt phSGYE18G3-SyB2 (Exzitationswellenlänge 380 nm)
- b. WA-C [pYV 08] mit dem Kontrukt phSGYE18G2-SyB2 (Exzitationswellenlänge 380 nm)

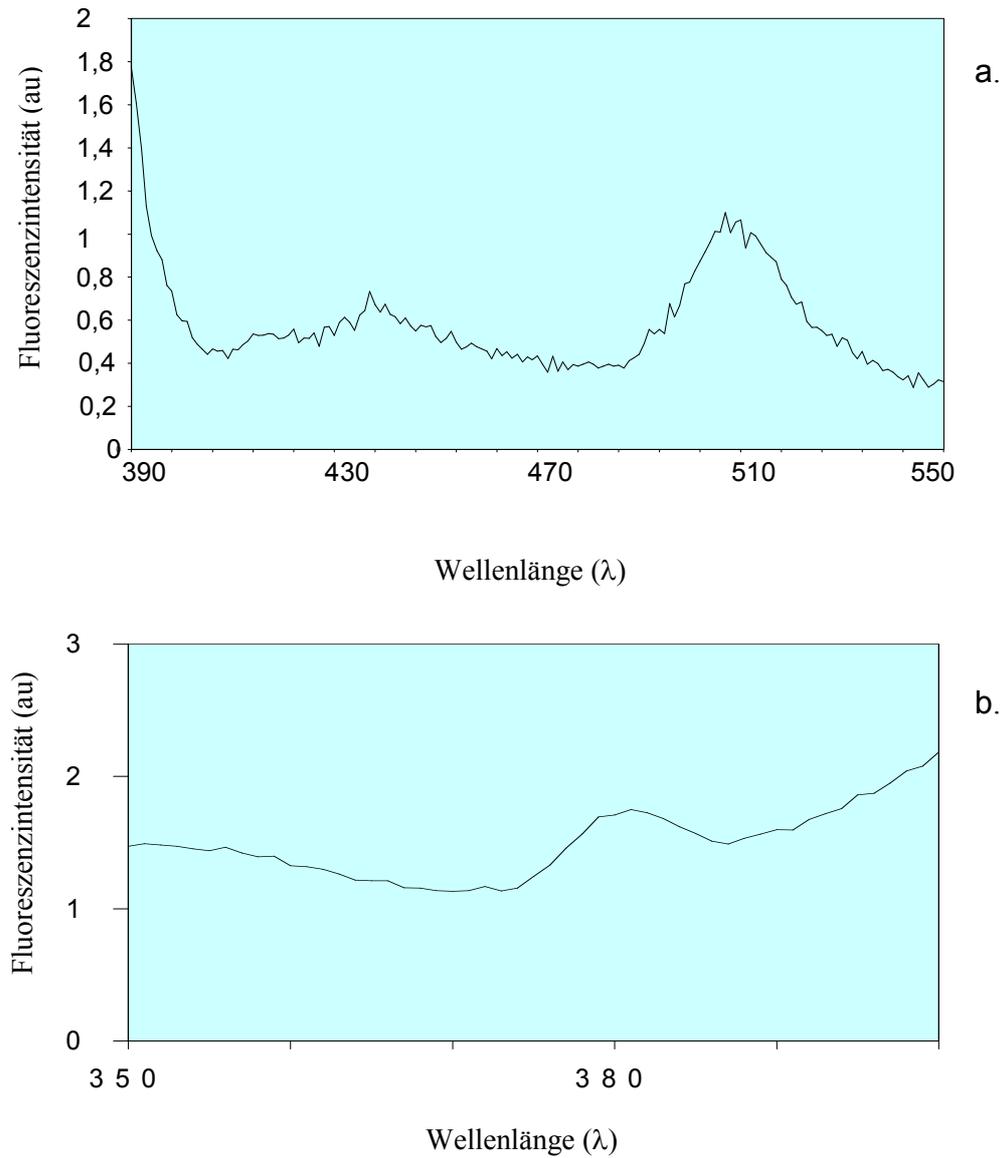


Abbildung 4.9 Emissions- und Exzitationsscan von WA-C ([pYV 08] pBFP2) nach Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C über 90 Minuten und Stimulation (5 mM EGTA und MgCl₂)

- a. Emissionsscan bei 380 nm
- b. Exzitationsscan bei 440 nm

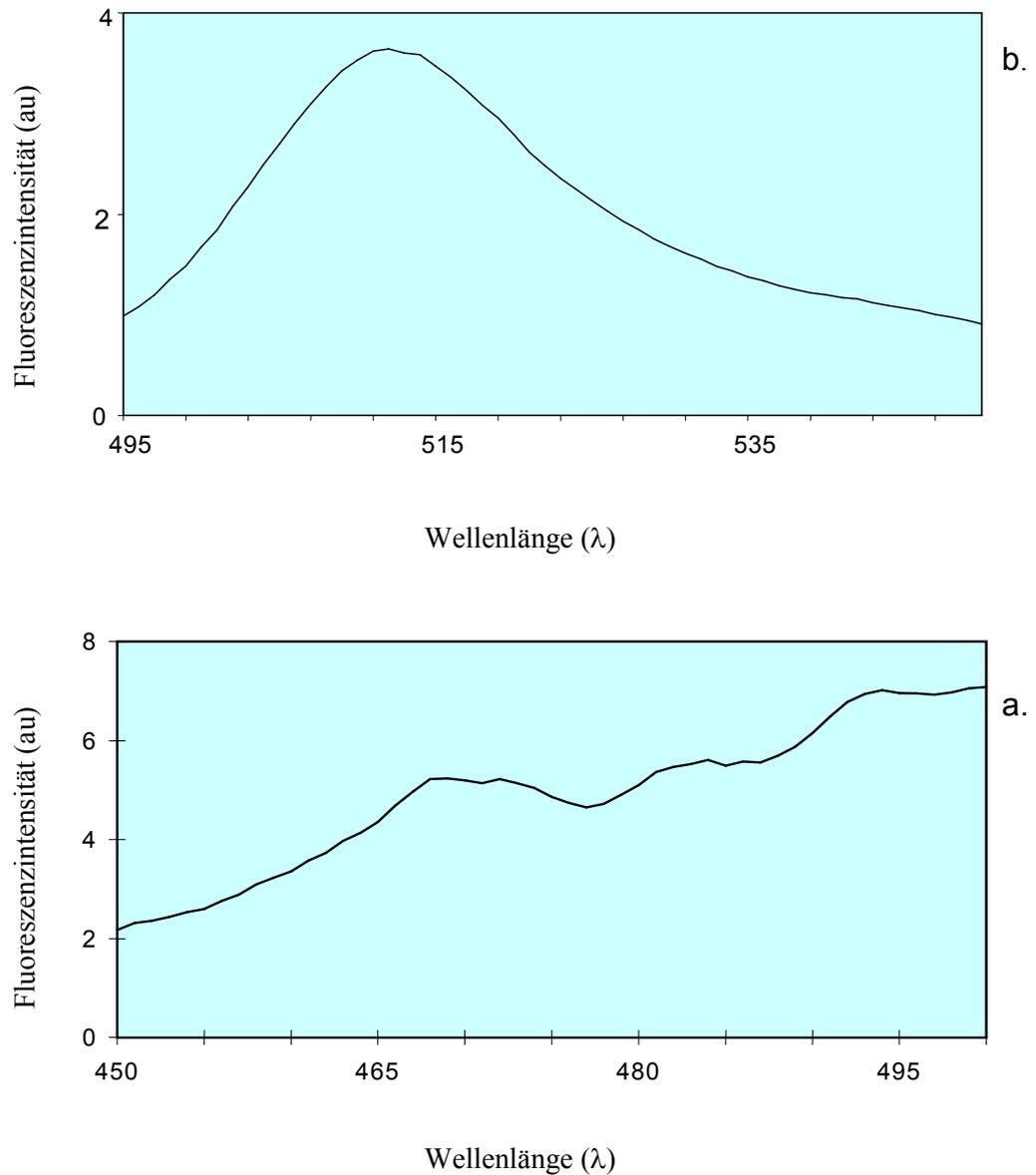


Abbildung 4.10 Emissions- und Exzitationsscan von WA-C ([pYV08] pGFP3) nach Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C über 90 Minuten und Stimulation (5 mM EGTA und MgCl₂)

- a. Emissionsscan bei 380 nm
- b. Exzitationsscan bei 440 nm

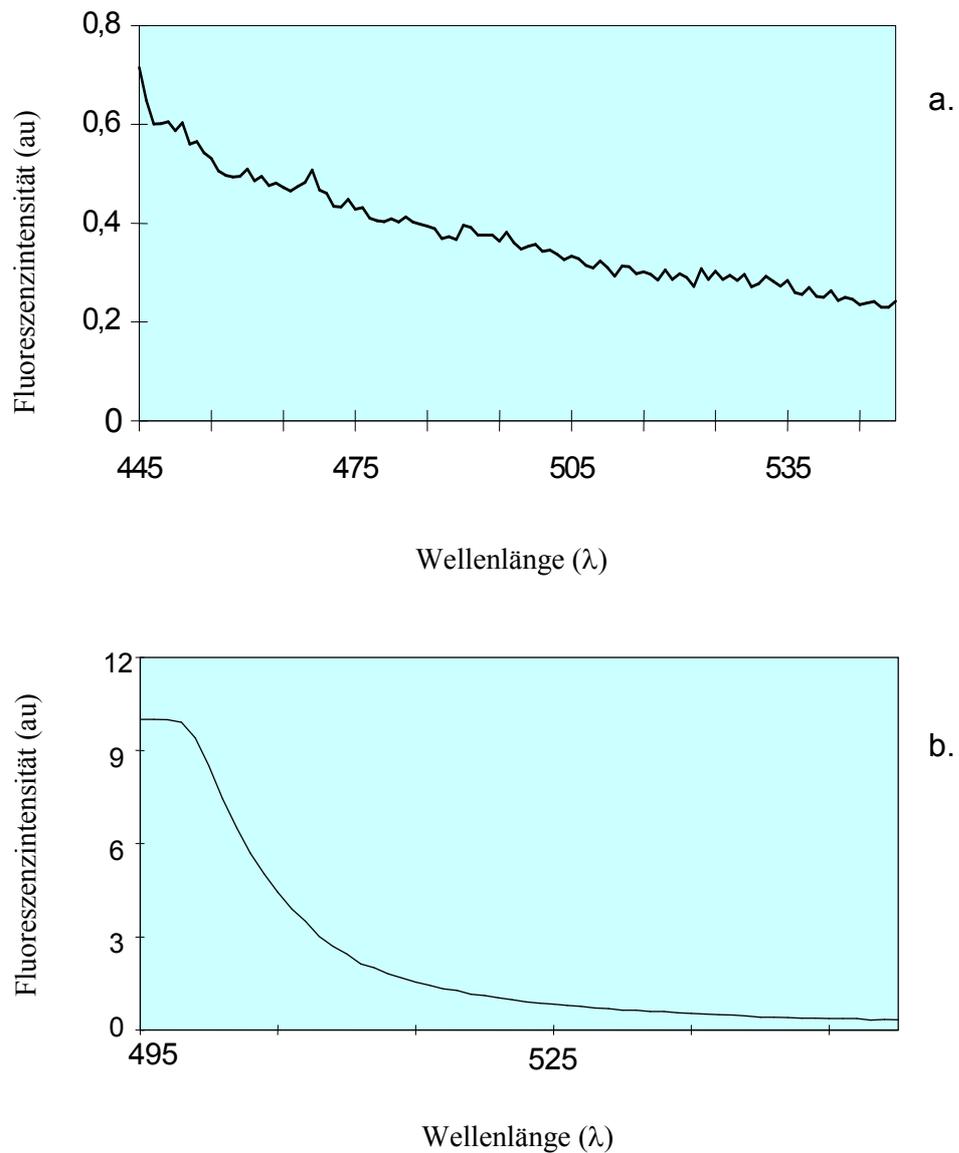


Abbildung 4.11 Wa-C(pYV 08) Emissionsscan ohne fluoreszierendes Protein, nach Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C und Stimulation (5 mM EGTA/MgCl₂); a. Exzitationswellenlänge 380 nm b. Exzitationswellenlänge 495 nm

4.2 Zeitlicher Verlauf der YopE- und SycE-Produktion von *Yersinia enterocolitica*

Die SycE-BFP2 Fluoreszenz war, als Ausdruck der SycE-Produktion, nach der Stimulation von *Y. enterocolitica* nur schwach zu erkennen war. Dies warf die Frage auf, ob das Fluoreszenzprotein BFP2, oder eine geringere Menge an SycE im Vergleich zu YopE innerhalb der Zelle ursächlich für die schwächere Blaufluoreszenz war.

Vor diesem Hintergrund wurde im zweiten Teil der Arbeit der zeitliche Verlauf der Produktion von YopE und seinem Chaperon SycE mit Hilfe der Reporterproteine GFP und Luciferase untersucht.

Im Einzelnen sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Werden in der Folge einer *in vitro* Stimulation von *Yersinia enterocolitica* äquivalente Mengen von YopE und SycE entsprechend dem Komplex YopE/SycE produziert?
2. Besteht die Möglichkeit, eine Akumulation von YopE und SycE in der Zelle nachzuweisen, bevor es zu einer Sekretion von YopE kommt?
3. Verändert sich die Produktion von YopE und SycE im Rahmen der Stimulation von *Y. enterocolitica* und der Sekretion von YopE unter *in vitro* Bedingungen?

4.2.1 Klonierung von YopE-GFP und SycE-Luc sowie YopE-Luc und SycE-GFP

Für den quantitativen Nachweis von YopE und SycE wurden jeweils Konstrukte mit den Reportergenen *gfp* und dem Enzym Luciferase hergestellt (Abbildung 4.12, Seite 62).

Mittels PCR wurden zunächst die Konstrukte YopE-GFP3 und YopE-LUC hergestellt und in den Vektor pACYC184 ligiert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Fusion von *luc* und *sycE* sowie von *gfp* und *sycE* an der Restriktionsschnittstelle *HindIII* im Vektor pACYC184. Schließlich erfolgte die Transformation dieser Plasmide in *Yersinia enterocolitica* durch Elektroporation (siehe Kapitel 3.2.9, Seite 38).

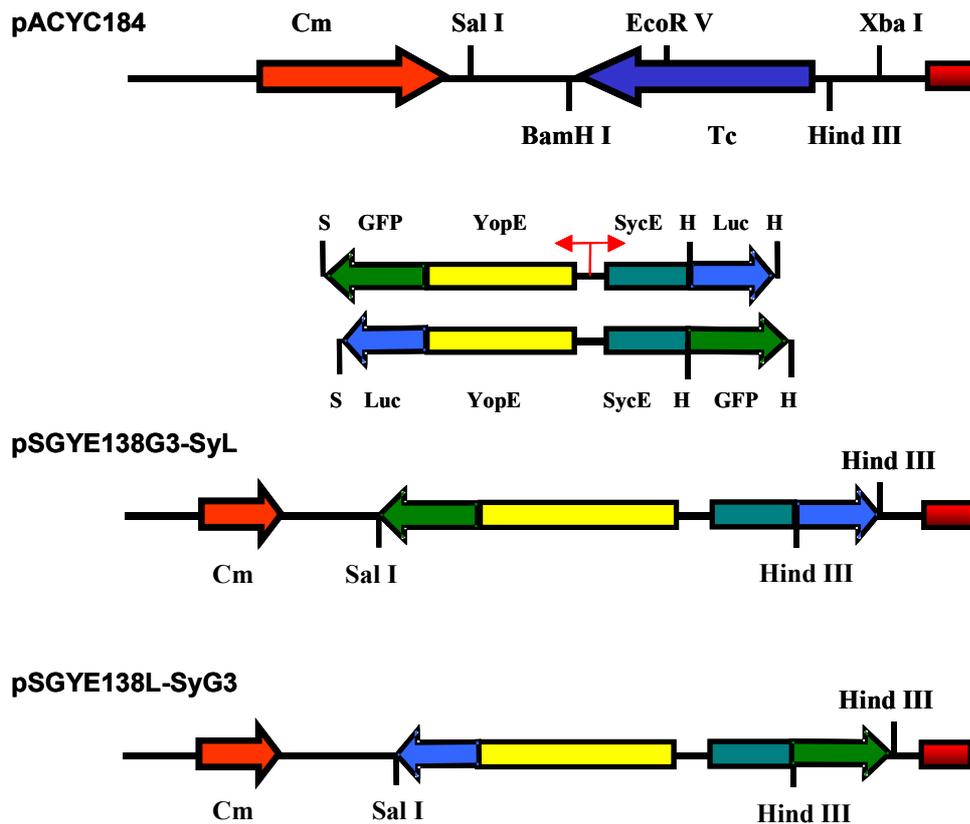


Abbildung 4.12 Klonierungsstrategie für die YopE-GFP/SycE-Luc bzw. YopE-Luc/SycE-GFP pACYC184 Ursprungsvektor. pISGYE138G3-SyL: Klonierter Vektor mit GFP an YopE und Luciferase an SycE. pISGYE138L-SyG3: Klonierter Vektor mit GFP an SycE und Luciferase an YopE. Cm: Chloramphenicolkassette. Tc: Tetrazyclinkassette. Restriktionsenzyme: *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III, *Sal*I, *Xba*I. P: Promotorregion für YopE und SycE Konstrukte.

4.2.2 Cytofluorometrische Messung der Fluoreszenzintensität von YopE-GFP und SycE-GFP

Nach Anzuchten der Yersinien über Nacht bei 27°C erfolgte am nächsten Tag die *in vitro*-Stimulation der Bakterien durch Temperaturerhöhung auf 37°C und Calciumentzug. Die FACS-Messungen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, um den Verlauf der YopE bzw. SycE Produktion darzustellen. Dafür wurden folgende Zeitabschnitte gewählt: Erste Messung direkt von den über Nacht gewachsenen Kulturen bei 27°C (üN Kultur), sowie 60', 75' und 90' nach Temperaturerhöhung auf 37°C. Die Meßpunkte nach Calciumentzug durch 5 mM EGTA und MgCl₂ erfolgten

anschließend nach 105', 120', 135', 150', 180' und 300 Minuten. Nach 180 bzw. 300 Minuten wurden die Versuche beendet.

In der Übernachtskultur zeigte WA-C ([pYC 08] pISGYE138G3-SyL) in der FACS-Messung nahezu keine Fluoreszenz (Abbildung 4.13 ●-●, Seite 64). Es war deutlich zu erkennen, daß im Laufe der Messung die Fluoreszenz kontinuierlich anstieg. Auch nach 90 Minuten und im Verlauf der induzierten *in vitro*-Sekretion stieg die Intensität kontinuierlich weiter an. Schließlich war nach 300 Minuten ein geringfügiger Abfall der Fluoreszenzintensität zu beobachten.

Hingegen war bei Verwendung von WA-C ([pYC 08] pISGYE138L-SyG3) schon in der Übernachtskultur eine 3-fach stärkere Fluoreszenzintensität zu detektieren, die im Verlauf ebenfalls kontinuierlich anstieg und einen nahezu parallelen Verlauf zu dem WA-C ([pYC 08] pISGYE138G3-SyL) aufwies. Insgesamt war die Fluoreszenzintensität des SycE-GFP-produzierenden Stammes ungefähr drei- bis viermal höher als die Fluoreszenzintensität des YopE-GFP-produzierenden Stammes. Auch im Falle des SycE-GFP-produzierenden Stammes war der Verlauf der Fluoreszenz zu Beginn der Sekretionsphase 90 Minuten nach Beginn der Stimulation und im weiteren Verlauf nach Calciumentzug kontinuierlich ansteigend und erreichte sein Maximum nach etwa 150 - 180 Minuten, um dann ebenfalls geringfügig abzufallen (Abbildung 4.13 ■-■, Seite 64).

Geringe Intensitätsschwankungen innerhalb des Zeitverlaufs konnten bei dem WA-C ([pYV 08] pISGYE138L-SyG3) gemessen werden, während die Fluoreszenzintensitäten von WA-C ([pYC 08] pISGYE138G3-SyL) bis zu ihrem Maximum nach 180 Minuten gleichförmiger verliefen.

Versuche mit denselben Konstrukten, bei denen der Sekretionsapparat nicht durch Calciumentzug induziert wurde, zeigten nur einen geringfügigen erniedrigten Verlauf der Fluoreszenzintensitäten. (Abbildung 4.14, Seite 64).

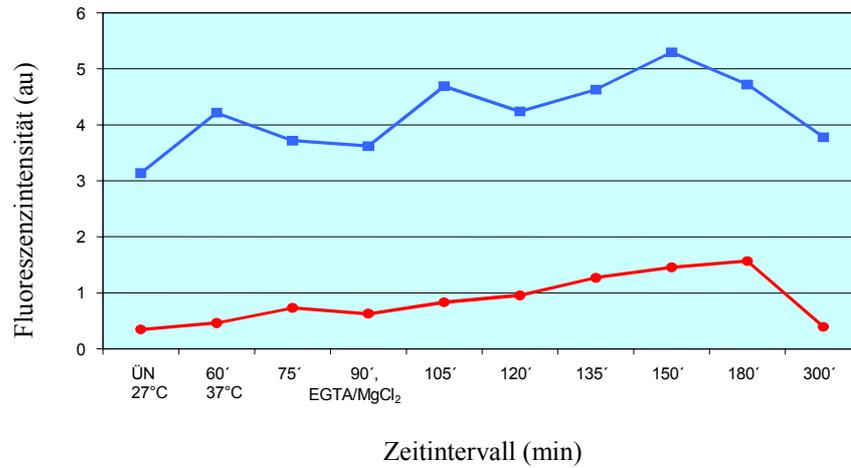


Abbildung 4.13 FACS-Messung der Zellsuspension von WA-C ([pYV08] pISGYE138G3-SyL) (●) und WA-C([pYV08] pISGYE138L-SyG3) (■). Anzucht bei 37°C und Stimulation durch EGTA/MgCl₂ nach 90 Minuten

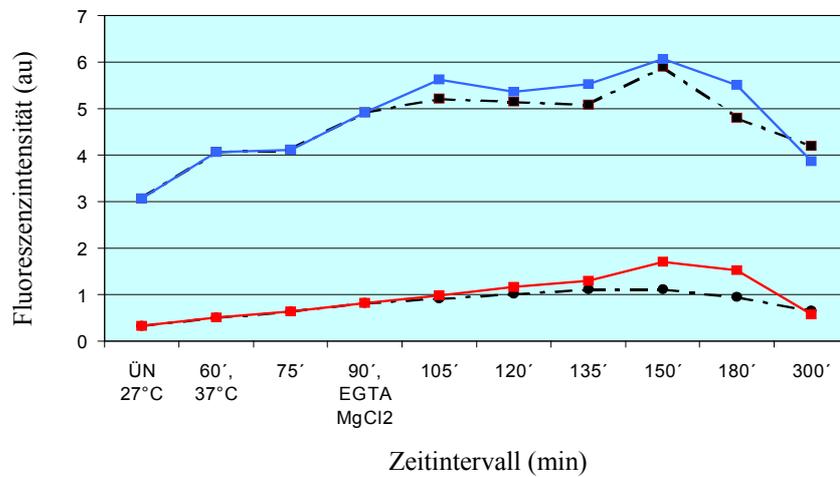


Abbildung 4.14 FACS-Messung der Zellsuspension von WA-C ([pYV08] pISGYE138G3-SyL) (●) und WA-C ([pYV08] pISGYE138L-SyG3) (■) mit (—) und ohne (---) durch Calciumentzug stimulierten Sekretionsapparat (EGTA und MgCl₂ nach 90' und 37°C).

4.2.3 Luciferaseaktivitätsmessung von YopE-Luc und SycE-Luc

Nach Beendigung der cytofluorometrischen Messungen erfolgte jeweils die Bestimmung der Luciferaseaktivitäten in den Zelllysaten von WA-C ([pYV 08] pISGYE138G3-SyL) und WA-C ([pYV 08] pISGYE138L-SyG3) zu vergleichbaren Zeitpunkten unter Verwendung der CCD-Kamera (Kapitel 3.4.1., Seite 42).

In der Übernachtskultur zu Beginn der Messung der Luciferaseaktivität, waren beide Fusionsproteine YopE-LUC (●) und SycE-Luc (■) detektierbar, wobei basal eine gering höhere Intensität von SycE-Luc zu messen war (Abbildung 4.15, Seite 65). Im Verlauf der Messungen stiegen die Enzymaktivitäten von SycE-Luc steil an und erreichten ihr Maximum nach 90 Minuten mit einer 5-fach stärkeren Lumineszenzintensität. Wurde der Sekretionsapparat durch Calciumentzug bei 90 Minuten aktiviert, konnte ein wellenförmiger Verlauf beobachtet werden, der ein zweites, 3-fach höheres Maximum nach 120 Minuten erreichte. Nachfolgend sank die Intensität kontinuierlich ab (Abbildung 4.15, Seite 65). Die Lumineszenzmessung von WA-C ([pYV 08] pISGYE138L-SyG3) zeigte einen gleichartigen Verlauf bei insgesamt geringerer Intensität. Dieses Ergebnis ist mit den FACS-Messungen vergleichbar.

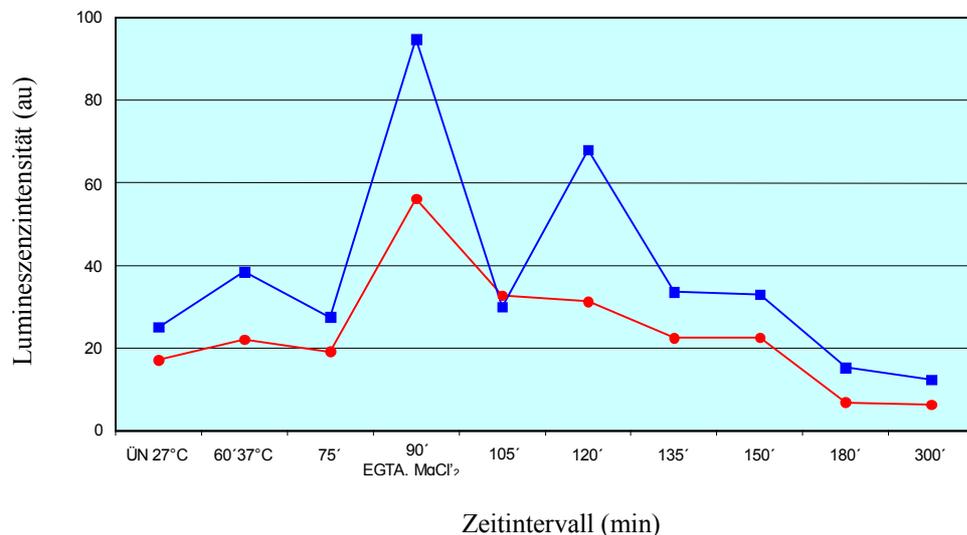


Abbildung 4.15 Lumineszenzmessung der Zelllysate von WA-C ([pYV08] pISGYE138L-SYG3) (■) und WA-C ([pYV08] pISGYE138G3-SYL) (●). Yop-Sekretion bei 90 Minuten und 37°C durch EGTA/MgCl₂ Zugabe.

Auch mit den Lumineszenzmessungen konnte bei beiden Konstrukten kein Unterschied zwischen den Bedingungen des Calciumentzuges im Vergleich zu den Bedingungen ohne Calciumentzug beobachtet werden. Dies bedeutet, daß im Verlauf der Sekretionsphase von YopE *in vitro* kein signifikanter Abfall der Luminszenzintensität gemessen werden (Abbildung 4.16, Seite 66) kann und möglicherweise YopE-GFP respektive YopE-Luc nicht sekretiert werden.

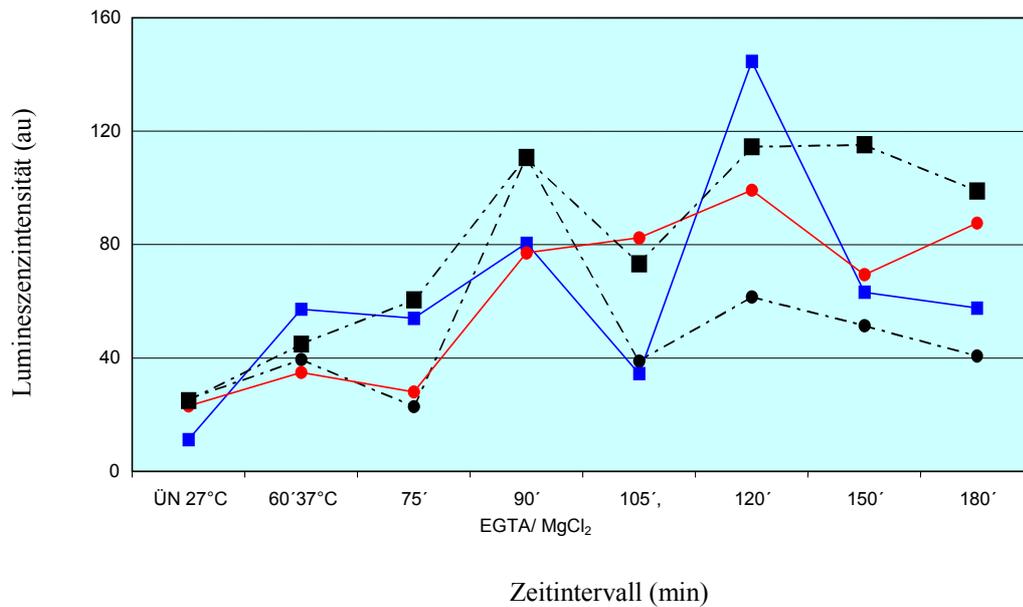


Abbildung 4.16 Lumineszenzmessung der Zelllysate von WA-C ([pYV08] pISGYE138G3-SyL) (●) und WA-C ([pYV08] pISGYE138L-SyG3) (■) mit (—) und ohne (— · —) durch Calciumentzug stimulierten Sekretionsapparat

YopE und SycE hatten während der *in vitro* Stimulation einen vergleichbaren Verlauf, auch wenn SycE in größeren Mengen intrazellulär vorhanden zu sein scheint. Im stimulierten Zustand und in der Phase der Sekretion unter Calciumentzug waren beide Proteine ständig meßbar.

4.2.4 Immunoblot der Zellysate der Stämme WA-C ([pYV08] pISGYE138G3-SyL) und WA-C ([pYV08] pISGYE138L-SyG3) mit Anti-GFP- und Anti-Luc-Serum

Zur Kontrolle der Lumineszenzmessungen und der cytofluorometrischen Messungen wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen GFP und gegen Luciferase Immunoblots durchgeführt.

Zu den verschiedenen Zeitpunkten der Messungen wurden sezernierte Yops aus dem Überstand sowie ein Zellpellet für den Westernblot verwendet (siehe Kapitel 3.3.3, Seite 41). Die lysierten Zellen und die Yops wurden auf das SDS-Gel aufgetragen und mit den spezifischen Antikörpern inkubiert.

Die Bande von YopE aus der üN-Kultur war nach Inkubation mit dem GFP-Antikörper sehr schwach (Abbildung 4.17, Seite 69). Ein Unterschied in der Stärke der Banden zwischen YopE-GFP und SycE-GFP war erkennbar. SycE-GFP war schon in der üN-Kultur mit einem 2-3-fach stärkerem Signal zu erkennen und wurde im weiteren Verlauf stärker, um dann ebenfalls abzunehmen. Diese Beobachtungen korrespondieren mit den Beobachtungen der FACS-Messungen (siehe Kapitel 4.2.2, Seite 62).

Im Gegensatz zu der Lumineszenz-Messung ist im Immunoblot zu Beginn der Stimulation nach Temperaturerhöhung auf 37°C kein Luciferasesignal zu erkennen (Abbildung 4.17, Seite 69). Im Zeitverlauf weist SycE-Luc auch im Immunoblot ein 3-4-fach stärkeres Signal als YopE-Luc auf. Während SycE bis zum Ende deutlich detektierbar ist, nimmt die Bande von YopE stetig ab und ist nach 180 Minuten nicht mehr erkennbar (Abbildung 4.17, Seite 69). Ein Unterschied in der Intensität der Banden zwischen den Bakterien, die aktiv YopE sekretieren und denen die nicht stimuliert wurden, kann man auch hier nicht erkennen. Dies stimmt mit den Beobachtungen aus der Lumineszenz-Messung und den cytofluorometrischen Bestimmungen überein.

Aufgrund der Ergebnisse der cytofluorometrischen Messungen, der Aktivitätsmessung von Luciferase und der Immunoblots mit GFP- und Luc-Antikörpern lassen sich zusammenfassend die folgenden Schlußfolgerungen treffen:

1. Erhöhung der Wachstumstemperatur von 27°C auf 37°C führt zur Anreicherung von SycE-Luc und YopE-Luc im Cytosol, wohin SycE-Luc in 3-4-fach höherer Konzentration vorliegt als YopE-Luc. Dieser Befund könnte für eine höhere Produktion oder eine höhere Stabilität von SycE-Luc in Bezug auf YopE-Luc sprechen.
2. Die Befunde mit Luc-Hybridproteinen ähneln denen mit GFP-Hybriden.
3. Die Induktion der Yop-Sekretion mit EGTA (Ca^{2+} -Komplexierung) hat keinen Einfluß auf das Konzentrationsverhältnis von SycE- zu YopE-Hybriden, was dafür spricht, dass Yop-Fusionsproteine im Gegensatz zu Yops nur in sehr geringem Maße sezerniert werden.
4. SycE-GFP konnte bereits nach Übernachtskulturen bei 27°C mittels der Fluoreszenzmessungen und Immunoblot im Zytosol nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist überraschend, da bisher angenommen wurde, dass bei 27°C keine Yop-Produktion *in vitro* stattfindet.

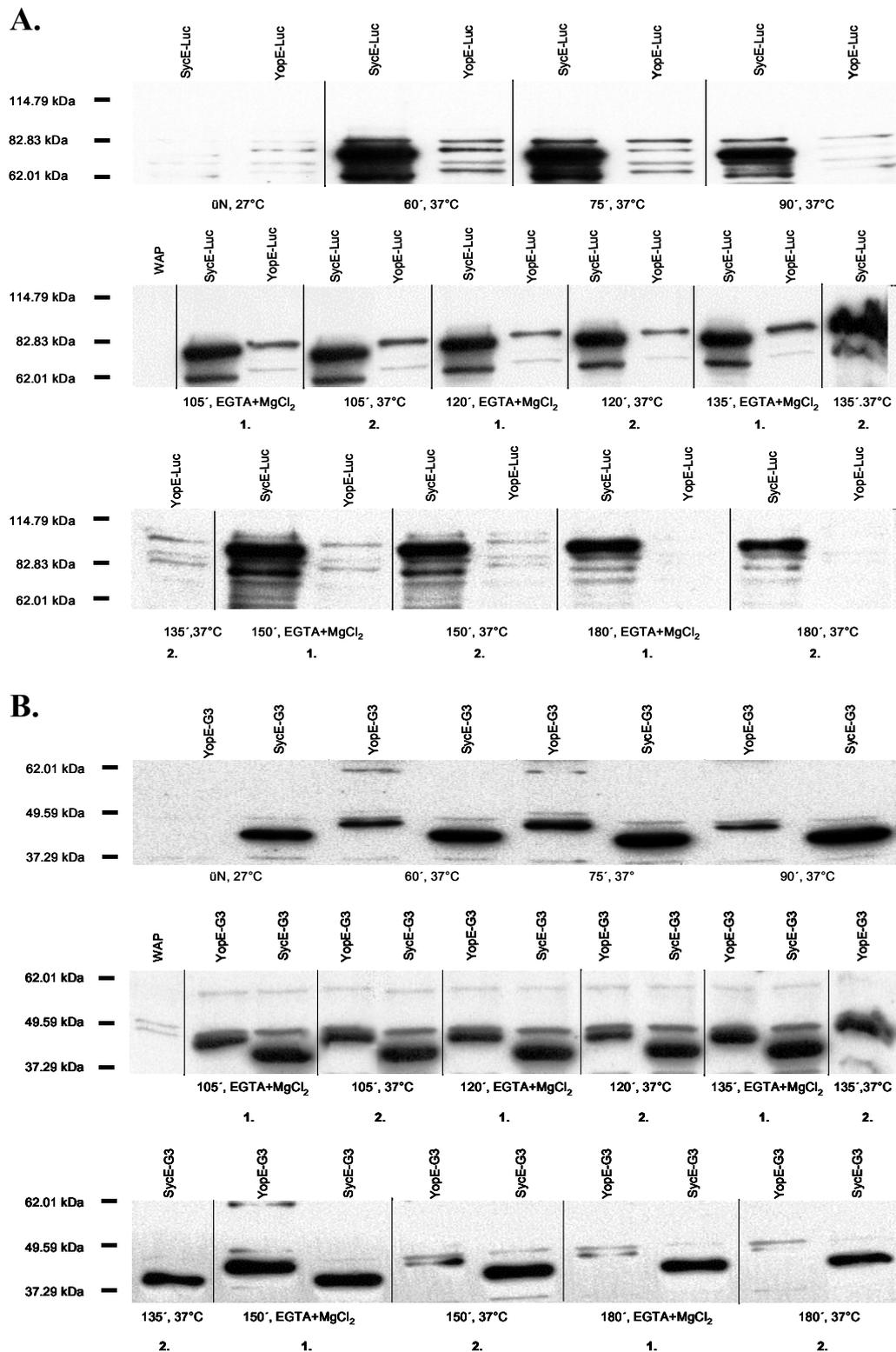


Abbildung 4.17 Immunoblot der Zelllysate von WA-C ([pYV 08] pISGYE138G3-SyL) und WA-C ([pYV 08] pISGYE138L-SyG3) nach Inkubation mit Anti-Kaninchen-Luc-AK (A.) und dem Anti-Kaninchen-GFP-AK (B.), mit (1.) und ohne (2.) Stimulation durch Calciumentzug (5 mM EGTA/MgCl₂) nach 90 Minuten.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der Interaktion von YopE und SycE durch die FRET-Methode

Mittels des Fluorescence-Resonance-Energy-Transfers (FRET) kann im Prinzip die Interaktion zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Dabei wird die Fluoreszenzenenergie vom Donorprotein (hier BFP) auf das Akzeptorprotein (hier GFP) strahlenlos übertragen, wenn beide Proteine in einer Distanz von circa 10-100 Å liegen.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß GFP von *Yersinia enterocolitica* produziert werden kann (Jacobi et al., 1998). Vor diesem Hintergrund war es das Ziel, im ersten Teil der Arbeit die Frage zu untersuchen, ob sich eine Interaktion zwischen YopE und seinem Chaperon SycE mit Hilfe der Methode des Fluorescence-Resonance-Energy-Transfers (FRET) unter Verwendung der Reporterproteine GFP und BFP nachweisen läßt.

Die Bakterienzelle hat etwa ein Volumen von $1 \mu\text{m}^3$ ($\cong 10^{-9} \mu\text{l}$). Wenn 5×10^5 GFP- und 5×10^5 BFP-Proteine in der Zelle gleichmäßig verteilt wären (jedes Fluoreszenzprotein hätte 10^3 nm^3 Raum zur Verfügung), würden sie in einem Abstand von 10 nm bzw. 100 Å vorliegen, was bereits ohne Interaktion zu FRET-Effekten führen würde. Da die Bakterienzelle insgesamt aus 2,5 Millionen Proteinmolekülen besteht, kann von maximal 10^5 fluoreszierenden Proteinen pro Zelle ausgegangen werden, was bei Gleichverteilung zu einem intermolekularen Abstand von 30 nm (300 Å) führt und GFP-BFP-FRET, bei direkter Protein-Proteininteraktion, für meßbar erscheinen läßt.

Es wurden verschieden lange *yopE*-Fragmente (18, 53 und 138 Codons) mit *gfp2* bzw. *gfp3* fusioniert. Das *sycE*-Gen, welches in entgegengesetzter Richtung von *yopE* transkribiert wird, wurde mit *bfp* bzw. *bfp2* fusioniert. Die Produktion und Sekretion der Fusionsproteine wurde durch eine temperaturabhängige Stimulation von 27°C auf 37°C der Yersinien in BHI-Medium und den nachfolgenden Calcium-Entzug durch EGTA und MgCl_2 induziert. Anschließend wurden die Bakterien im Fluoreszenzmikroskop und im Durchflußzytometer untersucht.

Bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm (GFP) ließen sich unter dem Mikroskop starke, grüne Fluoreszenzen mit einer geringen Ausbleichrate darstellen. Beim Wechsel in den blauen Wellenlängenbereich war auch eine Blaufluoreszenz zu detektieren. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, daß YopE- und SycE-Fusionsproteine gleichzeitig produziert werden.

Die Blaufluoreszenz war deutlich schwächer wahrnehmbar und mit einer stärkeren Hintergrundfluoreszenz, sowie einer schnelleren Ausbleichrate verbunden. Dies kann bedeuten, dass das SycE in geringerer Menge transkribiert wurde, oder dass die geringere Fluoreszenzintensität des BFP in einer geringeren Stabilität des Reporterproteins BFP ursächlich begründet sein kann. So ist schon aus früheren Untersuchungen bekannt, daß konstitutiv BFP-produzierende und deshalb blau fluoreszierende Yersinien sich ebenfalls schwächer fluoreszierend darstellen und eine stärkere Ausbleichrate zeigen (unpublizierte Beobachtung).

Der eingesetzte Vektor pKS (hohe Kopienzahl) sollte durch eine gesteigerte Produktion der Fusionsproteine die schwache Fluoreszenzintensität von BFP erhöhen. Diese Untersuchungen zeigten jedoch nur eine geringe Verbesserung der Fluoreszenzintensität bei unverändert schneller Ausbleichrate von BFP.

In einem weiteren Experiment wurde dann BFP2 verwendet. BFP2 wurde durch einen Austausch von 3 Aminosäuren in der *bfp*-Sequenz entwickelt und soll mit einer stärkeren Fluoreszenz sowie einer geringeren Ausbleichrate verbunden sein (Clontech, 1998). Tatsächlich zeigten mehrere Klone von *Yersinia enterocolitica*, die BFP2 konstitutiv produzieren, neben einer 3-fach stärkeren Blaufluoreszenz auch eine geringere Ausbleichrate. In der Folge wurde deshalb BFP2 in Verbindung mit dem pKS-Vektor für die FRET-Experimente verwendet.

In den Experimenten wurde nach Stimulation der Yersinien mit dem FRET-Filter eine schwache Grünfluoreszenz detektiert. Jedoch war in allen Kontrollexperimenten unter Verwendung der unterschiedlichen YopE-Fragmente sowie bei dem alleinigen Einsatz von BFP2 ohne GFP ebenfalls eine schwache Grünfluoreszenz sichtbar. In der Fluoreszenzspektrometrie konnte unter Verwendung der verschiedenen YopE-Längen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität von GFP beobachtet werden. So ist bei Wa -C ([pYV 08] phSG18G2/3-SyB2) fast keine Fluoreszenz bei 520 nm zu erkennen. Dies

kann ebenfalls für eine Abnahme der Effizienz des FRET sprechen (siehe 1.3.3, Seite 18), da YopE18 keine Chaperon-Bindungsstelle hat. Doch waren auch hier die Kontrollen nicht eindeutig negativ.

Diese Ergebnisse sind grundsätzlich mit der Annahme vereinbar, daß kein FRET unter den genannten Bedingungen zwischen BFP2 und GFP meßbar ist. Im Rahmen der Interpretation der FRET-Methode bedeutet dies aber gleichzeitig, daß auch keine Interaktion zwischen YopE-GFP und SycE-BFP2 stattfindet. Diese Schlußfolgerung ist jedoch aus den folgenden Überlegungen nur mit Einschränkung gültig:

1. Durch die Verwendung des pKS-Vektors mit hoher Kopienzahl liegen die Fusionsproteine YopE-GFP und SycE-BFP2 in der Bakterienzelle in hoher Konzentration vor und wahrscheinlich sogar in Aggregaten, da GFP zur Dimerisierung neigt (Mahajan and Heim, 1998)., sehr eng und dicht gepackt vor. Auf diese Weise könnte die kritische Distanz von GFP bzw. BFP für einen FRET erreicht werden, ohne dass eine Interaktion von YopE und SycE stattfindet.

Bei den GFP-Molekülen sitzt das Chromophor durch die Fusion an YopE bzw. SycE in einem Protein, das frei flexibel beweglich ist. Auch dadurch kommen sich die Chromophore vermutlich sehr viel näher, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion erhöht und damit ein FRET meßbar wäre.

2. Durch die Fusion von GFP an YopE und BFP an SycE können die Konformationen von YopE und SycE so verändert worden sein, dass die Interaktion der beiden Proteine nicht mehr möglich wäre, das heißt, dass GFP und BFP sterisch die YopE-SycE Interaktion verhindern.
3. Das Exzitationsmaximum für das GFP liegt bei 495 nm. Das gesamte Emissionsspektrum von BFP überlappt sich in einem weiten Bereich mit dem Exzitationsspektrum von GFP. Damit kann eine gleichzeitige Anregung von BFP2 und GFP verbunden sein, ohne daß ein Energy-Transfer stattgefunden hat. So wurde in unseren Kontrollexperimenten in Abwesenheit von BFP2 bei einer Exzitationswellenlänge zwischen 375 nm und 400 nm eine Grünfluoreszenz beobachtet.

Aus diesen Gründen ist das Fluoreszenzprotein BFP aufgrund der schwachen Intensität und der hohen Ausbleichrate nicht mehr kommerziell erhältlich. Neue

Reporterproteine wie Cyan Fluoreszierendes Protein (CFP) als Donor und Gelb Fluoreszierendes Protein (YFP) als Akzeptor werden seit einiger Zeit erfolgreich für den FRET eingesetzt. Das Überlappungsintegral von CFP und YFP ist deutlich geringer und CFP zeigt als Donor eine geringere Autofluoreszenz, sowie eine deutlich stärkere und stabilere Intensität (Miyawaki et al., 1997).

Zusammenfassend belegen die Untersuchungen dieser Arbeit, daß die Frage einer Interaktion zwischen YopE und seinem Chaperon SycE in *Yersinia enterocolitica* mit dem Fluorescence-Resonance-Energy-Transfers (FRET) unter den verwendeten Reporterproteinen GFP und BFP nicht beantwortet werden kann.

5.2 Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf von YopE und SycE

Kommt es zur Adhäsion von *Y. enterocolitica* an die Zielzelle, werden die kodierten Gene der Yops und ihrer Chaperons transkribiert und an den Ribosomen translatiert. Neben der Yop/Syc-Neusynthese erfolgt simultan die Sekretion von bereits vorhandenem YopE unter Vermittlung seines Chaperons SycE über vorhandene Sekretionsporen durch die Bakterienmembran in die Zielzelle. *Yersinia enterocolitica* verwendet dabei den Typ III Sekretionsweg. Das Chaperon SycE bleibt in der Bakterienzelle zurück. Es ist gegenwärtig ungeklärt, was anschließend mit den Syc-Chaperonen geschieht (Recycling oder Abbau?).

In dem zweiten Teil dieser Arbeit sollte der zeitliche Verlauf von YopE und SycE während der *in vitro* Stimulation und Sekretion mit Hilfe der Reporterproteine GFP und Luciferase untersucht werden. Das Reporterprotein Luciferase hat den Vorteil, einer geringeren Halbwertszeit im Vergleich zum GFP zu haben, wodurch Akkumulationseffekte verhindert werden. Unter der Voraussetzung, daß SycE tatsächlich die Konformation von YopE stabilisiert, die Degradation des Proteins verhindert und als Leitstruktur für YopE zur inneren Zellmembran dient, müßte SycE synchron mit YopE produziert werden. Im Rahmen der YopE-Sekretion müßte die SycE-Produktion aufhören.

YopE-GFP und SycE-GFP wurden cytofluorometrisch bestimmt. Nach 60 Minuten zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Fluoreszenzen beider Fusionsproteine im FACS, verbunden mit einer 3-fach höheren Intensität von SycE-GFP (das

stöchiometrische Verhältnis von YopE:SycE beträgt 1:2). Dieser Anstieg der Intensitäten spricht für die synchrone Produktion von YopE und SycE direkt nach der Temperaturerhöhung des Mediums auf 37°C. Andererseits kann der kontinuierliche Anstieg der Fluoreszenzintensität von GFP in beiden Fusionsproteinen auch durch eine Zunahme der Bildung von fluoreszierender Aktivität sein, ohne das YopE-GFP weiter produziert wird. So konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, daß YopE-GFP Fusionen in sehr stabiler Form gebildet werden (Jacobi et al., 1998).

Die Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten zwischen YopE-GFP und SycE-GFP könnten methodisch durch die potentiell verschiedenen Konformationen der Proteine bedingt sein. So behindert YopE durch die Fusion mit GFP möglicherweise die Faltung der Chromophore des GFP und setzt in der Folge die Fluoreszenzintensität herab. Andererseits stellt sich in den Immunoblots auch ein vergleichbarer Intensitätsunterschied der Banden dar. Mit dem GFP-Antikörper und dem Luciferase-Antikörper sind die Banden mindestens im Verhältnis 2:1 (SycE-YopE) nachweisbar. Durch die Proteinfusionen kann die Konformation aber auch derartig verändert sein, dass die entsprechenden Antikörperbindungsstellen nicht vollständig durch die Antikörper erreicht werden können.

Bei Verwendung der Luciferase als Reporterprotein wird in der Lumineszenz-Messung ebenso eine deutlich höhere Aktivität des SycE-Luc-Konstruktes im Vergleich zum YopE-Luc Konstrukt beobachtet. Wie die Lumineszenzmessungen zeigen, sind die Produktionskinetiken der Fusionsproteine in der Zeit der Stimulation mittels Temperaturerhöhung gleichlaufend konstant und schwanken während der Sekretionsphase unter Calciumentzug. Diese Intensitätsschwankungen beruhen möglicherweise auf einer unregelmäßigen oder fehlenden Sekretion von YopE durch Verstopfung der Sekretionsporen. So konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass während einer *in vitro*-Stimulation die Intensität der sekretierten Yops im Immunoblot durch die YopE-GFP-Fusion stark verringert war (Jacobi, et al. 1998). Durch die Fusion von YopE-GFP bzw. YopE-Luc könnte die Faltung des Proteins und damit dessen Konformation so verändert sein, dass eine effiziente Sekretion durch die Sekretionsporen der Bakterienmembran nicht mehr stattfinden kann.

Die Beobachtungen im Rahmen des FRET zeigten, daß nach einer *in vitro* Stimulation, in Abhängigkeit von dem gewählten Filter, gleichzeitig sowohl blaue als auch grüne Fluoreszenz in den Bakterien zu beobachten sind. Dies bedeutet, daß sowohl YopE- als auch SycE-Fusionsproteine zur gleichen Zeit in den Bakterien vorhanden sind.

In dem Modell der co-translationalen Sekretion dürften so gut wie keine Fluoreszenzen oder Luciferase-Aktivitäten erkennbar sein. Sollte hingegen eine posttranslationale Sekretion stattfinden, würden die Bakterien im Cytosol eine konstante Zahl an Yops und Chaperone produzieren und während der Sekretion ein „Auffüllen“ der im Cytosol vorhandenen Proteine herbeiführen. Entsprechend weisen die in den beschriebenen Experimenten konstant nachweisbaren Fluoreszenzen innerhalb der Zellen, sowie die fortlaufend nachweisbaren Lumineszenzen möglicherweise auf eine kontinuierlich stattfindende Transkription und Translation von YopE und SycE bei 37°C hin.

Zusammenfassend und ausblickend zeigen unsere Ergebnisse, dass die Untersuchung eines FRET mit BFP und GFP unter Verwendung des pKS-Plasmids aufgrund hoher Proteinmengen intrazellulär schwierig ist. Desweiteren sollten die mikroskopisch detektierten Fluoreszenzen quantitativ gemessen werden. Der Einsatz von Fluoreszenzproteinen mit kleinerem Überlappungsintegral scheint für den FRET von Vorteil zu sein. Möglicherweise müssen in Zukunft Reporterproteine mit Fluoreszenzspektren verwendet werden, die erst zum FRET führen, wenn eine Distanz unter 10 nm erreicht wird.

Die Reporterproteine GFP und Luciferase haben unterschiedlich lange Halbwertszeiten, weshalb sie in dieser Arbeit zur Anwendung kamen. Unsere Untersuchungen zeigen, dass GFP aufgrund der hohen Stabilität und der langsamen Bildung bzw. Faltung des Fluorophors für Translationskinetiken nur mit Einschränkung anwendbar sind. Mittlerweile wurden GFP-Varianten entwickelt, die deutlich kürzere Halbwertszeiten besitzen und damit die Messung von Translationskinetiken unter Verwendung von Fluoreszenzproteinen verbessern.

Zusammenfassung

Yersinia enterocolitica produzieren Pathogenitätsfaktoren, die es Ihnen ermöglichen, an die Zellen des Wirtes zu adhären, diese zu invadieren und die protektive Immunantwort des Wirtes zu modifizieren.

Die *Yersinia outer proteins* (Yops), werden nach Adhäsion der Bakterienzelle an die Wirtszelle durch einen Typ III Sekretionsmechanismus über die Bakterienmembran transloziert. Die Sekretion von YopE wird durch das Chaperon SycE herbeigeführt. SycE bindet an YopE, verhindert dessen Degradation, stabilisiert die Faltung des Proteins und leitet es gezielt an die Sekretionspore. Nach erfolgreicher Translokation bleibt das Chaperon in der Zelle zurück.

In dieser Arbeit sollte mittels der Reporterfusionstechnologie von Fluoreszenzproteinen die Frage zu untersucht werden, ob sich mit Hilfe der Methode des Fluorescence-Resonance-Energy-Transfers (FRET), unter Verwendung der Reportergene *gfp* und *bfp*, die Interaktion zwischen YopE und seinem Chaperon SycE nachweisen läßt. Ferner sollte mit Hilfe der Reportergene *gfp* und *luc* die Produktion von YopE und SycE *in vitro* verfolgt werden.

Für die Darstellung der Interaktion von YopE und SycE wurden verschieden lange Yop-Fragmente mit dem Reportergen GFP und SycE mit BFP bzw. BFP2 fusioniert.

Nach Stimulation von *Y. enterocolitica*, durch Temperaturerhöhung auf 37°C und Ca²⁺-Entzug durch EGTA-Zugabe, waren die verschiedenen YopE- und SycE-Fusionsproteine bei Verwendung eines entsprechenden Filters als Grün- bzw. Blaufluoreszenzen gleichzeitig innerhalb der Bakterienzellen nachweisbar. Mit Hilfe der FRET-Technik konnte eine schwache Grünfluoreszenz im Sinne der postulierten Interaktion von YopE und SycE gezeigt werden.

Gleichzeitig zeigten die Untersuchungen aber auch, daß die Möglichkeiten der Darstellung des FRET bei Verwendung der Reportergene *gfp* und *bfp* begrenzt sind: So war die Detektion von SycE-BFP aufgrund der schwachen Blaufluoreszenz und hoher Ausbleichrate erschwert. Ferner überlappt das Emissionsspektrum von BFP mit dem Exzitationsspektrum von GFP in einem so großen Bereich, daß es unabhängig von einem möglichen FRET von BFP zum Auftreten einer entsprechenden

Grünfluoreszenz aufgrund der Anregung durch die Lichtquelle kam. Die Anwendung eines Vektors mit hoher Kopienzahl wirkte sich positiv auf die Fluoreszenzintensität von BFP aus. Die Grünfluoreszenz, die unter diesen Bedingungen zu beobachten war, steht vermutlich nicht in einem Zusammenhang mit der Interaktion von YopE-GFP und SycE-BFP. Vielmehr ist zu vermuten, daß es durch die großen Mengen an Reportergenen innerhalb der Zellen zu einem YopE-SycE-unabhängigen FRET aufgrund der dichten Packung von GFP und BFP im Bakterienzytoplasma kommt.

In dem zweiten Teil der Arbeit wurde die Kinetik der Produktion von YopE und SycE *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß YopE und SycE gleichzeitig mit dem Beginn der Stimulation produziert werden. Während der Sekretionsphase beruhen Schwankungen der Fluoreszenz- und Lumineszenzintensitäten bei einer unverändert kontinuierlichen Produktion von YopE- und SycE-Reporterfusionen möglicherweise auf einem Wechsel von Produktion zu Sekretion und proteolytischem Abbau von YopE hin, bedingt durch eine Sekretionsblockade durch YopE-Fusionsproteine. Andererseits ist die hohe Stabilität des Reportergens GFP und die damit verbundene Akkumulation für die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Produktionskinetiken von YopE-GFP und anderer Proteine begrenzt.

Die unter diesen experimentellen Bedingungen konstant nachweisbaren Fluoreszenzen und Lumineszenzen innerhalb der Zellen weisen auf eine kontinuierlich stattfindende Transkription und Translation von YopE und SycE hin. Dieser Befund ist mit dem Modell einer Chaperon-induzierten, post-translationalen Sekretion von YopE vereinbar.

Literaturverzeichnis

- Aepfelbacher, M., R. Zumbihl, K. Ruckdeschel, C. A. Jacobi, C. Barz, J. Heesemann (1999). "The tranquilizing injection of Yersinia proteins: a pathogen's strategy to resist host defense." *Biological Chemistry* **380**: 795-802.
- Aho, K., P. Ahvonen, A. Lassus, K. Sievers, A. Tiilikainen (1974). "HLA-27 in reactive arthritis: a study of Yersinia arthritis and Reiter disease." *Scand. J. Rheumatol.* **7**: 26-28.
- Ahvonen, P., K. Dickhoff (1974). "Uveitis, episcleritis and conjunctivitis associated with *Yersinia* infection." *Acta Ophthalmol. Suppl. Copenh.* **123**: 209-212.
- Ahvonen, P., K. Sievers, K. Aho (1969). "Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection." *Acta Rheumatol. Scand.* **15**: 232-253.
- Aldridge, P., K. T. Hughes (2002). "Regulation of flagellar assembly." *Curr Opin Microbiol* **5**(2): 160-5.
- Aleksic, S., J. Bockemühl (1990). "Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen." *Immun. Infekt.* **18**: 178-185.
- Andersen, J. B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjorn, M. Givskov, S. Molin (1998). "New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1140-1143.
- Anderson, D., O. Schneewind (1997). "A mRNA Signal for the Type III Secretion of Yop Proteins by *Yersinia enterocolitica*." *Science* **278**: 1140-1143.
- Anderson, D. M., O. Schneewind (1999). "Yersinia enterocolitica type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ." *Mol Microbiol* **31**(4): 1139-48.
- Andor, A., K. Trülzsch, M. Essler, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, J. Heesemann, M. Aepfelbacher (2001). "YopE of Yersinia, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells." *Cell Microbiol* **3**(5): 301-310.

- Archibald, F. (1983). "Microoccus Lysodeicticus, an organism not requiring iron." FEMS Microbiol Lett **19**: 29-32.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, F. G. Seidmann, J. A. Smith, K. Struhl (1989). "Current Protocols in Molecular Biology." John Wiley&Sons, Inc., New York.
- Bagg, A., J. B. Neilands (1987). "Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation." Microbiol. Rev. **51**: 509-518.
- Beuscher, H. U., F. Rödel, A. Forsberg, M. Röllinghoff (1995). "Bacterial evasion of host immune defense: *Yersinia enterocolitica* encodes a suppressor for tumor necrosis factor alpha expression." Infect. Immun **63**: 1270-1277.
- Birnboim, H. C., J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic. Acids. Res. **7**: 1513-1523.
- Birtalan, S., P. Gosh (2001). "Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE." Nature Structural Biology **8**(11): 974-978.
- Birtalan, S. C., R. M. Phillips, P. Ghosh (2002). "Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens." Mol Cell **9**(5): 971-80.
- Bisset, M. L., C. Powers, S. L. Abbott, J. M. Janda (1990). "Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency and serotype distribution." J. Clin. Microbiol. **28**: 910-912.
- Black, D. S., J. B. Bliska (2000). "The RhoGAP activity of the *Yersinia* pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence." Mol Microbiol **37**(3): 515-527.
- Bliska, J. B., J. C. Clemens, J. E. Dixon, S. Falkow (1992). "The *Yersinia* tyrosine phosphatase: specificity of a bacterial virulence determinant for phosphoproteins in the J774A.1 macrophage." J. Exp. Med. **176**: 1625-1630.
- Blocker, A., K. Komoriya, S. Aizawa (2003). "Type III secretion systems and bacterial flagellar: insights into their function from structural similarities." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3027-3030.

- Blumberg, H. M., J. A. Kiehlbauch, I. K. Wachsmuth (1991). "Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* O:3 infection: use of chromosomal DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes." *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2368-2374.
- Boland, A., M. P. Sory, M. Iriarte, C. Kerbouch, P. Wattiau, G. R. Cornelis (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**(19): 5191-201.
- Bolin, I., A. Forsberg, L. Norlander, M. Skurnik, H. Wolf-Watz (1988). "Identification and mapping of the temperature-inducible, plasmid encoded proteins of *Yersinia* spp." *Infect. Immun.* **56**: 342-348.
- Bolin, I., D. A. Portnoy, H. Wolf-Watz (1988). "Expression of the temperature-inducible outer membrane proteins of *yersiniae*." *Infect. Immun.* **48**: 234-240.
- Bolin, I., H. Wolf-Watz (1988). "The plasmid-encoded Yop2b protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is a virulence determinant regulated by calcium and temperature at the level of transcription." *Mol Microbiol* **2**(2): 237-45.
- Boyd, A. P., I. Lambermont, G. R. Cornelis (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**(17): 4811-21.
- Bradford, W. D., P. J. Noce, L. T. Gutman (1974). "Pathogenic features of enteric infection with *Yersinia enterocolitica*." *Arch. Pathol.* **98**: 17-22.
- Braun, V., G. Winkelmann (1987). "Microbial iron transport: structure and function of siderophores." *Prog. Clin. Biochem. Med.* **5**: 67-99.
- Brenner, D. J. (1979). "Speciation in *Yersinia*." *Contrib Microbiol Immunol* **5**: 33-43.
- Brett, S. J., A. V. Mazurov, I. G. Charles, J. P. Tite (1993). "The invasin protein of *Yersinia* spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins." *Eur J Immunol.* **23**: 1608-1614.
- Burrows, T. W., G. A. Bacon (1956). "The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence." *Br. J. Exp. Pathol.* **37**: 481-493.

- Cambronne, E. D., L. W. Cheng, O. Schneewind (2000). "LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia yop* virulon, are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism." *Molecular Microbiology* **37**(2): 263-273.
- Chalfie, M., T. Yuan (1994). "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression." *Science* **263**: 802-805.
- Chan, F. K., R. M. Siegel, D. Zacharias, R. Swofford, K. L. Holmes, R. Y. Tsien, M. J. Lenardo (2001). "Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis of Cell Surface Receptor Interactions and Signaling using Spectral Variants of the Green Fluorescent Protein." *Cytometry* **44**: 361-368.
- Chang, A. C. Y., S. N. Cohen (1978). "Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid." *J Bacteriol* **134**(1141-1156).
- Cheng, L., O. Schneewind (1999). "Yersinia enterocolitica Type III Secretion." *The Journal of Biological Chemistry* **274**(31): 22102-22108.
- Cheng, L., O. Schneewind (2000). "Type III machines of gram-negative bacteria: delivering the goods." *Elsevier Science* **8**(5): 214-219.
- Cheng, L. W., D. M. Anderson, O. Schneewind (1997). "Two independent type III secretion mechanism for YopE in *Yersinia enterocolitica*." *Mol Microbiol* **24**: 757-765.
- China, B., M. P. Sory, B. T. N'Guyen, M. de Bruyere, G. R. Cornelis (1993). "Role of the YadA protein in preventing of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules." *Infect Immun* **61**: 3129-3136.
- Clegg, R. M. (1995). "Fluorescence resonance energy transfer." *Curr. Op. Biotechnol.* **6**(1): 103-110.
- Clontech (1998). "pBFP2 vector Information." Clontech Laboratories. Palo Alto. CA, USA.
- Clontech, Manual (1996). "Living Colors GFP Application Notes." Clontech Laboratories. Palo Alto. CA, USA.

- Cody, C. W., D. C. Prasher, W. W. Westler, F. G. Prendergast, W. W. Ward (1993). "Chemical structure of the hexapeptide chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein." *Biochemistry* **32**: 1212-1218.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, S. Falkow (1996). "FACS-optimized mutants of green fluorescent protein (GFP)." *Genes* **173**: 33-38.
- Cornelis, G. (1994). "Yersinia pathogenicity factors." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **192**: 243-263.
- Cornelis, G. (2003). "How Yops find their way out of *Yersinia*." *Mol Microbiol* **50**(4): 1091-1094.
- Cornelis, G., T. Biot, C. L. Lambert de Rouvroit, T. Michiels, B. Mulder, C. Sluiter, M. Sory, M. Van Bouchaute, J.-C. Vanooteghem (1989). "The *Yersinia* Yop regulon." *Mol Microbiol* **3**: 1455-1459.
- Cornelis, G., Y. Laroche, G. Balligand, M. Sory, G. Wauters (1987). "Yersinia enterocolitica, a primary model for bacterial invasiveness." *Rev. Infect. Dis.* **9**: 64-87.
- Cornelis, G., C. Sluiter, C. L. Lambert de Rouvroit, T. Michiels (1989). "Homology between virF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator." *J Bacteriol* **171**: 254-262.
- Cornelis, G., M. Sory, Y. Laroche, I. Derclaye (1986). "Genetic analysis of the plasmid region controlling virulence of *Yersinia enterocolitica* O:9 by Mini-Mu insertions and *lac* gene fusions." *Microb Pathog* **1**: 349-359.
- Cornelis, G., J.-C. Vanooteghem, C. Sluiter (1987). "Transcription of the Yop regulon from *Y. enterocolitica* requires transacting pYV and chromosomal genes." *Microb Pathog* **2**(367-379).
- Cornelis, G. R. (2002). "The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus." *Int J Med Microbiol* **291**(6-7): 455-62.

- Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory, I. Stainier (1998). "The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4): 1315-52.
- Cornelis, G. R., H. Wolf-Watz (1997). "The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells." *Mol Microbiol* **23**(5): 861-7.
- Cover, T. L., R. C. Aber (1989). "*Yersinia enterocolitica*." *N. Engl. J. Med.* **321**: 16-24.
- Cubitt, A., R. Heim (1995). "Understanding, improving and using green fluorescent proteins." Elsevier Science: 448-455.
- Curri, M. G., K. F. Fok, J. Kato, R. J. Moore, F. K. Hamra, K. L. Duffin, C. E. Smith (1992). "Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 947-951.
- Day, R. N., A. Periasamy, F. Schaufele (2001). "Fluorescence resonance energy transfer microscopy of localized protein interaction in the living cell nucleus." *Methods*. **25**(1): 4-18.
- Delor, I., G. Cornelis (1992). "Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits." *Infect Immun* **60**: 4269-4277.
- Dequeker, J., R. Jamar, M. Walravens (1980). "HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection." *J. Rheumatol.* **7**: 706-710.
- DeWet, J. R., R. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski, Subramani (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." *Mol. Cell. Biol.* **7**(725-737).
- El Tahir, Y., M. Skurnik (2001). "YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesion." *Int J Med Microbiol* **291**(3): 209-218.
- Elangovan, M., R. N. day, A. Periasamy (2002). "Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell." *J Microscopy* **205**(Pt1): 3-14.

- Ennis, R., R. R. Isberg, Y. Shimizu (1993). "Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial beta 1 integrin ligand invasin." *J. Exp. Med.* **177**: 207-212.
- Ernst, J. D. (2000). "Bacterial inhibition of phagocytosis." *Cell Microbiol* **2**(5): 379-86.
- Evdokimov, A. G., J. E. Tropea, K. M. Routzahn, D. S. Waugh (2002). "Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 3): 398-406.
- Fath, M. J., R. Kolter (1993). "ABC transporters: bacterial exporters." *Microbiol Rev.* **57**(995-1017).
- Feldman, M. F., S. Muller, E. Wuest, G. R. Cornelis (2002). "SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system." *Mol Microbiol* **46**(4): 1183-97.
- Finlay, B. B., Falkow (1989). "Common themes in microbial pathogenicity." *Microbiol Rev.* **53**: 210-230.
- Finlay, B. B., Falkow (1997). "Common themes in microbial pathogenicity revised." *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 136-169.
- Forsberg, A., I. Bolin, L. Norlander, H. Wolf-Watz (1987). "Molecular cloning and expression of calcium regulated, plasmid-coded proteins of *Y. pseudotuberculosis*." *Microb Pathog* **2**: 123-137.
- Forsberg, A., R. Rosquist, H. Wolf-Watz (1994). "Regulation and polarized transfers of the *Yersinia* outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis." *Trends in Microbiology* **2**(1): 14-19.
- Forsberg, A., A. M. Viitanen, M. Skurnik, H. Wolf-Watz (1991). "The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*." *Mol Microbiol* **5**: 977-986.
- Forsberg, A., H. Wolf-Watz (1988). "The virulence protein Yop5 of *Yersinia pseudotuberculosis* is regulated at transcriptional level by plasmid-plB1-encoded trans-acting elements controlled by temperature and calcium." *Mol Microbiol* **2**(1): 121-33.

- Forsberg, A., H. Wolf-Watz (1990). "Genetic analysis of the yopE region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression." *J Bacteriol* **172**(3): 1547-55.
- Förster, T. (1946). "Energiewanderung und Fluoreszenz." *Die Naturwissenschaften* **6**: 166-175.
- Förster, T. (1948). "Intermolecular energy migration and fluorescence." *Ann Phys.* **3**: 55-75.
- Förster, T. (1949). "Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie." *Z. Naturforschung* **4a**: 321-327.
- Frederiksen, W. (1964). "A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella X*)." *Proc. 14th Scand. Congr. Path. Microbiol.*: 103-104.
- Frithz-Lindsten, E., R. Rosquist (1995). "The chaperone-like protein YerA of *Yersinia pseudotuberculosis* stabilizes YopE in the cytoplasm but is dispensible for targeting to the secretion loci." *Molecular Microbiology* **16**(3).
- Galyov, E. E., S. Hakansson, A. Forsberg, H. Wolf-Watz (1993). "A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant." *Nature* **361**: 730-732.
- Grassl, G. A., E. Bohn, Y. Müller, O. T. Buhler, I. B. Authenrieth (2003). "Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion." *Int J Med Microbiol* **293**(1): 41-54.
- Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M. P. Sory, G. R. Cornelis (2002). "Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis." *Infect Immun* **70**(8): 4165-76.
- Gutman, L. T., E. A. Ottensen, T. J. Quan, P. S. Noce, S. L. Katz (1973). "An inter-familial outbreak of *Yersinia enterocolitica* enteritis." *N. Engl. J. Med.* **320**: 1372-1377.

- Haag, H., K. Hantke, H. Drechsel, I. Stojiljkovic, G. Jung, H. Zähler (1993).
"Purification of yersiniabactin: a siderophore and a possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*." J. Gen. Microbiol. **139**: 2159-2165.
- Hakansson, S., T. Bergman, J.-C. Vanooteghem, G. Cornelis, H. Wolf-Watz (1993).
"YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins." Infect Immun **61**: 71-80.
- Hakansson, S., K. Schesser, C. Persson, E. E. Galyov, R. Rosqvist, F. Homble, H. Wolf-Watz (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**(21): 5812-23.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J. Mol. Biol. **166**: 557-580.
- Hanski, C., U. Kutschka, H. P. Schmoranzler, M. Naumann, A. Stallmach, H. Hahn, H. Menge, E. O. Riecken (1989). "Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis." Infect Immun **57**: 673-678.
- Hanski, C., M. Naumann, A. Grutzkau, G. Pluschke, B. Friedrich, H. Hahn, E. O. Riecken (1991). "Humoral and cellular defense against intestinal murine infection with *Yersinia enterocolitica*." Infect Immun **59**: 1106-1111.
- Heesemann, J. (1990). "Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neu diagnostische Methoden." Immun. Infekt. **18**: 186-191.
- Heesemann, J. (1997). "Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species." FEMS Microbiol Lett **48**: 229-233.
- Heesemann, J., B. Algermissen, R. Laufs (1984). "Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*." Infect. Immun. **46**: 105-110.
- Heesemann, J., C. Eggers, J. Schröder (1987). "Serological diagnosis of yersiniosis by immunoblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic *Yersinia*." Contrib Microbiol Immunol **9**: 285-289.

- Heesemann, J., K. Gaede (1989). "Mechanism involved in the pathogenesis of *Yersinia* infections." *Rheumatol. Int.* **9**: 213-217.
- Heesemann, J., K. Gaede, I. B. Authenrieth (1993). "Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis." *APMIS* **101**: 417-429.
- Heesemann, J., U. Gross, N. Schmidt, R. Laufs (1986). "Immunohistochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media." *Infect. Immun.* **54**: 561-567.
- Heesemann, J., L. Grüter (1987). "Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells." *FEMS Microbiol Lett* **40**: 37-41.
- Heesemann, J., C. Keller, R. Morawa, N. Schmidt, H. J. Siemens, R. Laufs (1983). "Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance of pathogenesis." *J. Infect. Dis.* **147**: 107-115.
- Heim, R., D. C. Prasher, R. Y. Tsien (1994). "Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12501-12504.
- Hoiczky, E., A. Roggenkamp, A. Lupas and J. Heesemann (2000). Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.*, **19**: 5989-5999,
- Holmstrom, A., R. Rosqvist, H. Wolf-Watz, A. Forsberg (1995). "Virulence plasmid-encoded YopK is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systemic infection in mice." *Infect Immun* **63**(6): 2269-76.
- Hoogkamp Korstanje, J. A., J. de Koning, J. Heesemann (1988). "Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man." *Infection* **16**: 81-85.
- Hueck, C. J. (1998). "Typ III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Iriarte, M., G. Cornelis (1995). "MyfF, an Element of the Network Regulating the Synthesis of Fibrillae in *Yersinia enterocolitica*." *J Bacteriol* **177**(3): 738-744.

- Iriarte, M., G. R. Cornelis (1998). "YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells." *Mol Microbiol* **29**(3): 915-29.
- Iriarte, M., M. P. Sory, A. Boland, A. P. Boyd, S. D. Mills, I. Lambermont, G. R. Cornelis (1998). "TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors." *Embo J* **17**(7): 1907-18.
- Isberg, R. R. (1989). "Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of enteropathogenic *Yersinia* species." *Mol Microbiol* **3**: 1449-1453.
- Jacobi, C. A., A. Roggenkamp, A. Rakin, R. Zumbihl, L. Leitritz, J. Heesemann (1998). "In vitro and in vivo expression studies of yopE from *Yersinia enterocolitica* using the gfp reporter gene." *Mol Microbiol* **30**(4): 865-82.
- Jawetz, Melnick, Adelberg (1991). "Medical Microbiology." Appleton and Lange.
- Knapp, W. (1988). "Die Gattung *Yersinia*-Yersiniosen, p. 348-358. In Brandis und G. Pulverer (ed.), Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie."
- Krall, R., Y. Zhang, J. T. Barbieri (2004). "Intracellular membrane localization of *Pseudomonas* ExoS and *Yersinia* YopE in mammalian cells." *J Biol Chem* **4**(279): 2747-2753.
- Kulich, S. M., T. L. Yahr, L. M. Mende-Mueller, J. T. Barbieri, D. W. Frank (1994). "Cloning the structural gene for the 49-kDa form of exoenzyme S (exoS) from *Pseudomonas aeruginosa* strain 388." *J. Biol. Chem.* **269**: 10431-10437.
- Kumaran, S., K. S. Ramamurthi, O. Schneewind (2003). "Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery." *Mol Microbiol* **50**(4): 1095-1102.
- Kumaran, S., K. S. Ramamurthi, O. Schneewind (2003). "*Yersinia yopQ* mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons." *Mol Microbiol* **50**(4): 1189-1198.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.

- Lambert de Rouvroit, C. L., C. Sluifers, G. Cornelis (1992). "Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*." *Mol Microbiol* **6**: 395-409.
- Lee, L. A., A. R. Gerber, D. R. Lonsway, J. D. Smith, G. P. Carter, N. D. Pühr, C. M. Parrish, R. K. Sikes, R. J. Finton, R. V. Tauxe (1990). "Yersinia enterocolitica O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings." *N. Engl. J. Med.* **322**: 984-987.
- Lee, V., O. Schneewind (2001). "Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections." *Genes & Development* **15**: 1725-1752.
- Lee, V. T., D. M. Anderson, O. Schneewind (1998). "Targeting of Yersinia Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one- step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone." *Mol Microbiol* **28**(3): 593-601.
- Lee, V. T., S. K. Mazmanian, O. Schneewind (2001). "A program of Yersinia enterocolitica type III secretion reactions is activated by specific signals." *J Bacteriol* **183**(17): 4970-8.
- Lee, V. T., O. Schneewind (1999). "Type III machines of pathogenic yersiniae secrete virulence factors into the extracellular milieu." *Mol Microbiol* **31**(6): 1619-29.
- Leung, K. Y., B. S. Reisner, S. C. Straley (1990). "YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of Yersinia pestis in mice." *Infect . Immun.* **58**: 3262-3271.
- Lian, C. J., W. S. Hwang, C. H. Pai (1987). "Plasmid-mediated resistance to phagocytosis in *Yersinia enterocolitica*." *Infect . Immun.* **55**: 1176-1183.
- Lloyd, S., H. Wolf-Watz (2001). "Targeting exported substrates to the Yersinia TTSS: different functions for different signals." *Trends in Micobiology* **9**(8): 367-371.
- Lloyd, S., H. Wolf-Watz (2001). "*Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals." *Molecular Micobiology* **39**(2): 520-531.

- Lloyd, S. A., M. Sjostrom, S. Andersson, H. Wolf-Watz (2002). "Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences." *Mol Microbiol* **43**(1): 51-9.
- Mahajan, N., R. Heim (1998). "Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer." *Nature Biotechnology* **16**: 547-552.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook (1989). "Molecular Cloning.; C. Nolan, N. Ford and M. Ferguson, editors. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA."
- Marks, R. S., C. H. Pai, L. Lafleur, L. Lackman, O. Hammerberg (1980). "Yersinia enterocolitica gastroenteritis: a prospective study of clinical, bacteriologic and epidemiologic features." *J. Pediatr.* **96**(2631-2633).
- Martinez, R. J. (1983). "Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica*." *Infect . Immun.* **41**: 921-930.
- Menard, R., P. J. Sansonetti, C. Parsot (1993). "Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* into epithelial cells." *J Bacteriol* **175**: 5899-5806.
- Michiels, T., G. Cornelis (1991). "Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system." *J Bacteriol* **173**: 1677-1685.
- Michiels, T., P. Wattiau, R. Brasseur, J. M. Ruyschaert, G. Cornelis (1990). "Secretion of Yop proteins by Yersiniae." *Infect Immun* **58**(9): 2840-9.
- Miller, V. L., K. B. Beer, G. Heusipp, B. M. Young, M. R. Wachtel (2001). "Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes." *Mol Microbiol* **41**(5): 1053-1062.
- Miller, V. L., J. B. Bliska, S. Falkow (1990). "Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica ail* gene and characterization of the Ail protein product." *J Bacteriol* **172**: 1062-1069.

- Miller, V. L., S. Falkow (1988). "Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells." *Infect . Immun.* **56**: 1242-1248.
- Miller, V. L., B. B. Finlay, S. Falkow (1988). "Factors essential for the penetration of mammalian cells by *Yersinia*." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **138**: 15-39.
- Mitra, R. D., C. M. Silva, D. C. Youvan (1996). "Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein." *Gene* **173**(1): 13-17.
- Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffrey, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien (1997). "Fluorescence indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin." *Nature* **388**: 882-887.
- Morin, J. G., J. W. Hastings (1971). "Energy transfer in a bioluminescent system." *J. Cell. Physiol.* **77**: 313- 318.
- Morise, H., O. Shimomura, F. H. Johnson, J. Winant (1974). "Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*." *Biochemistry* **13**: 2656-2662.
- Neilands, J. B. (1981). "Iron absorption and transport in microorganism." *Annu. Rev. Nutr.* **1**: 27-46.
- Neyt, C., G. Cornelis (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**: 971-982.
- Nilles, M. L., K. A. Fields, S. C. Straley (1998). "The V antigen of *Yersinia petis* regulates Yop vectorial targeting as well as Yop secretion through effects of YopB and LcrG." *J Bacteriol* **180**: 3410-3420.
- Olinde, A. J., J. F. Lucas Jr., R. C. Miller (1984). "Acute Yersiniosis and its surgical significance." *South. Med. J.* **77**: 1539-1540.
- Ormö, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington (1996). "Crystal structure of the *Aquorea victoria* green fluorescent protein." *Science* **273**: 1392-1395.

- Orth, K., L. E. Palmer, Z. Q. Bao, S. Stewart, A. E. Rudolph, J. B. Bliska, J. E. Dixon (1999). "Inhibition of the MAP kinase superfamily by a *Yersinia* effector." *Science* **285**(1920-1923).
- Pai, C. H., V. Mors (1978). "Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*." *Infect . Immun.* **19**: 908-911.
- Pepe, J. C., V. L. Miller (1994). "The biological role of invasin during a *Yersinia enterocolitica* infection." *Infect. Agents. Dis.* **2**: 236-241.
- Perry, R. D., R. R. Brubacker (1979). "Accumulation of iron by *yersiniae*." *J. Bacteriol.* **137**: 1290-1298.
- Persson, C., N. Carballeira, H. Wolf-Watz, M. Fallman (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., R. Nordfeldt, S. Holmström, S. Hakansson, R. Rosquist, H. Wolf-Watz (1995). "Cell-surface bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarised mechanism into the target cell." *Mol Microbiol* **18**: 135-150.
- Pilz, D., T. Vocke, J. Heesemann, V. Brade (1992). "Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3." *Infect . Immun.* **60**: 189-195.
- Portnoy, D. A., S. L. Moseley, S. Falkow (1981). "Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis." *Infect . Immun.* **31**: 775-782.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier (1992). "Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein." *Gene* **111**: 229-233.
- Ramamurthi, K. S., O. Schneewind (2003). "Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery." *Mol Microbiol* **50**(4): 1095-1102.

- Reisner, B. S., S. C. Straley (1992). "Yersinia pestis YopM: thrombin binding and overexpression." *Infect . Immun.* **60**: 5242-5252.
- Rizzuto, R., M. Brini (1996). "Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants *in vivo*." *Current Biology* **6**(2): 183-188.
- Rohde, J. R., J. M. Fox, S. A. Minnich (1994). "Thermoregulation in Yersinia enterocolitica is coincident with changes in DNA supercoiling." *Mol Microbiol* **12**: 187-199.
- Rosqvist, R., I. Bolin, H. Wolf-Watz (1988). "Inhibition of phagocytosis in Yersinia pseudotuberculosis: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein." *Infect . Immun.* **56**: 2139-2143.
- Rosqvist, R., A. Forsberg, M. Rimpilainen, T. Bergman, H. Wolf-Watz (1990). "The cytotoxic protein YopE of Yersinia obstructs the primary host defence." *Mol Microbiol* **4**(4): 657-67.
- Rosqvist, R., K. E. Magnusson, H. Wolf-Watz (1994). "Target cell contact triggers expression and polarized transfer of Yersinia YopE cytotoxin into mammalian cells." *Embo J* **13**(4): 964-72.
- Russo-Marie, F., F. Roederer, B. Sager, L. A. Herzenberg, D. Kaiser (1993). "β-Galactosidase activity in single differentiating bacterial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8194-8198.
- Sagot, I., M. Bonneu, A. Balguerie, M. Aigle (1999). "Imaging fluorescence resonance energy transfer between two green fluorescent proteins in living yeast." *FEBS Lett.* **447**(1): 53-58.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**: 487-491.
- Salmond, G. P. C., P. J. Reeves (1993). "Membrane traffic wardens and protein secretion on Gram negative bacteria." *Trends Biochem. Sci.* **18**: 7-12.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis (1989). "Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY."

- Sarker, M. R., C. Neyt, I. Stanier, G. Cornelis (1998). "The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocator YopB and YopD." *J Bacteriol* **180**: 1207-1214.
- Sarker, M. R., M. P. Sory, A. P. Boyd, M. Iriarte, G. R. Cornelis (1998). "LcrG is required for efficient translocation of *Yersinia* Yop effector proteins into eukaryotic cells." *Infect Immun* **66**(6): 2976-9.
- Schesser, K., E. Frithz-Lindsten, H. Wolf-Watz (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.
- Schleifstein, J. I., M. B. Coleman (1939). "An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Pasteurella pseudotuberculosis*, and pathogenic for man." *NY. State. J. Med.* **39**: 1749-1753.
- Schultze Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, K. von der Mark, F. Emmerich (1992). "Plasmid-encoded outer membrane Protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersiniae* to various types of collagen." *Infect . Immun.* **60**: 2153-2159.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, Y. Saiga (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusa, *Aequorea*." *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**: 223-239.
- Simonet, M., S. Richard, P. Berche (1990). "Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid." *Infect . Immun.* **58**: 841-845.
- Sing, A., D. Rost, N. Tvardoskaia, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, C. J. Kirschning, M. Aepfelbacher, J. Heesemann (2002). "Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression." *J Experimental Medicine* **8**(196): 1017-1024.
- Skurnik, M., Y. el Tahir, M. Saarinen, S. Jalkanen, P. Toivanen (1994). "YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa." *Infect . Immun.* **62**: 1252-1261.

- Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, G. R. Cornelis (1995). "Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26): 11998-2002.
- Sory, M. P., G. R. Cornelis (1994). "Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells." *Mol Microbiol* **14**(3): 583-94.
- Steipe, B., A. Skerra (1997). "Das grün fluoreszierende Protein." *Biospektrum* **3/1**: 28-30.
- Straley, S. C., W. S. Bowmer (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., E. Skrzypek, G. V. Plano, J. B. Bliska (1993). "Yops of *Yersinia* ssp. pathogenic for human." *Infect . Immun.* **61**: 3105-3110.
- Strathdee, C. A., R. Y. Lo (1989). "Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant." *J Bacteriol* **171**: 916-928.
- Stryer, L. (1978). "Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler." *Ann Rev. Biochem.* **47**(819-846).
- Stryer, L., R. P. Haugland (1967). "Energy transfer: a spectroscopic ruler." *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(2): 719-726.
- Tacket, C. O., B. R. Davis, G. P. Carter, J. F. Randolph, M. L. Cohen (1983). "*Yersinia enterocolitica* pharyngitis." *Ann. Intern. Med.* **99**: 40-42.
- Tak, P. P., L. G. Visser, J. A. Hoogkamp Korstanje, J. C. Kluin Nelemans, P. C. Hogendoorn, P. M. Kluin, M. Barza, J. de Koning, R. van Furth (1992). "Unusual manifestation of *Yersinia enterocolitica* infections diagnosed using novel methods." *Clin. Infect. Dis.* **15**: 645-649.
- Toivanen, P., K. Granfors, R. Lahesmaa Rantala, R. Leino, T. H. Stahlberg, R. Vuento (1985). "Pathogenesis of *Yersinia* triggered reactive arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects." *Immunol. Rev.* **86**: 47-70.

- Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Trame, C. B., D. B. McKay (2003). "Structure of the *Yersinia enterocolitica* molecular-chaperone protein SycE." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**(Pt 2): 389-92.
- Trulzsch, K., A. Roggenkamp, M. Aepfelbacher, G. Wilharm, K. Ruckdeschel, J. Heesemann (2003). "Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*." *Int J Med Microbiol* **293**(2-3): 167-177.
- Van Gijsegem, F., S. Genin, C. Boucher (1993). "Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plants and animal bacteria." *Trends Microbiol* **1**: 175-180.
- Viitanen, A. M., P. Toivanen, M. Skurnik (1990). "The *lcrE* gene is part of an operon in the *lcr* region of *Yersinia enterocolitica* O:3." *J Bacteriol* **172**: 3152-3162.
- Von Pawel-Rammingen, U., M. V. Telepnev, G. Schmidt, K. Aktories, H. Wolf-Watz, R. Rosquist (2000). "GAP activity of the YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure." *Mol Microbiol* **36**(3): 737-748.
- Wang, S., T. Hazelrigg (1994). "Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis." *Nature* **369**: 400-403.
- Wattiau, P., B. Bernier (1994). "Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*." *Proc. Natl. Acad. Science* **91**: 10493-10497.
- Wattiau, P., G. R. Cornelis (1993). "SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ohe secretion of YopE." *Mol Microbiol* **8**(1): 123-31.
- Wattiau, P., S. Woestyn, G. Cornelis (1996). "Custommized secretion chaperones in pathogenic bacteria." *Mol Microbiol* **20**: 255-262.

- Winblad, S. (1969). "Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*." *Scand. J. Infect. Dis.* **1**: 11-16.
- Woestyn, S., M. P. Sory, A. Boland, O. Lequenne, G. R. Cornelis (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**(6): 1261-71.
- Wolf-Watz, H., D. A. Portnoy, I. Bolin, S. Falkow (1985). "Transfer of the virulence plasmid of *Yersinia pestis* to *Yersinia pseudotuberculosis*." *Infect. Immun.* **48**: 241-243.
- Yersin, A. (1894). "La bubonique peste a Hong Kong." *Ann. Inst. Pasteur Paris* **8**: 662-667.
- Young, B. M., G. M. Young (2002). "Evidence for targeting of Yop effectors by the chromosomally encoded Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*." *J Bacteriol* **184**(20): 5563-71.
- Youvan, D. C., C. M. Silva, E. J. Bylina, W. J. Coleman, M. R. Dilworth, M. M. Yang (1997). "Calibration of Fluorescence Resonance Energy Transfer in Microscopy Using Genetically Engineered GFP Derivates on Nickel Chelating Beads." *Biotechnology et alia* **3**: 1-18.
- Zhang, Z. Y. (1995). "Kinetic and mechanistic characterization of a mammalian protein tyrosine phosphatase, PTP1." *J. Biol. Chem.* **270**: 11199-11204.
- Zhang, Z. Y., J. C. Clemens, H. L. Schubert, J. A. Stuckey, M. W. F. Fischer, D. M. Hume, M. A. Saper, J. E. Dixon (1992). "Expression, purification and physiochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase." *J. Biol. Chem.* **267**: 15266-15270.
- Zumbihl, R., M. Aepfelbacher, A. Andor, C. A. Jacobi, K. Ruckdeschel, B. Rouot, J. Heesemann (1999). "The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA." *J Biol Chem* **274**(41): 29289-93.

Lebenslauf

Name: Sebastian Gregor

Geburtsdatum: 26.08.1974

Geburtsort: Kiel

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1980 – 86 Rothenburg Grundschule Berlin

1986 – 93 Fichtenberg Gymnasium Berlin

1990 - 1991 Schüleraustausch in Mentor, Ohio, USA

1993 Abitur

Zivildienst

1993 - 94 Zivildienst im Theodosius Krankenhaus Berlin

Studium:

05/1995 – 05/2002 Studium der Humanmedizin, LMU München

04/1997 Ärztliche Vorprüfung

04/1998 1. Staatsexamen

04/2001 2. Staatsexamen

05/2002 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

04/2001 – 08/2001 Klinik für Kinderchirurgie, Städtisches Krankenhaus

08/2001 - 12/2001 Medizinische Klinik, Krankenhaus Neuperlach

12/2001 – 04/2002 Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern, LMU

Arzt im Praktikum

08/2002 – 01/2004 1. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Mainz

01.02.2004

Approbation als Arzt

seit 02/2004

Wissenschaftlicher Mitarbeiter der I. Medizinischen
Klinik, Universitätsklinikum Mainz

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie in München unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Professor Dr. med. Dr. J. Heesemann.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die Bereitstellung des Themas sowie für sein beständiges Interesse und Engagement bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. Christoph Jacobi, dem direkten Betreuer der Arbeit. Ohne seine ausgezeichnete Einweisung in die mikrobiologischen und molekularbiologischen Arbeitstechniken, seine laufenden Anregungen, seine ständige Unterstützung und seine unendliche Geduld wäre die Dissertation nicht in dieser Form möglich gewesen.

Allen Kollegen im Max von Pettenkofer-Institut danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Hervorheben möchte ich besonders Daniela Brem, Cosima Pelludat, Alexander Rakin, Christina Nölting, Wolf-Dietrich Hardt, Robert Zumbühl und Andreas Sing.