

Max von Pettenkofer-Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum

**Regulation von Adhäsinen und der Protease DegP durch den  
CpxR- und RpoE-*envelope stress response*-Signalweg  
in *Yersinia enterocolitica***



Dissertation

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

Catharina Zeuzem

aus

Frankfurt am Main

2018

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum  
ehem. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann

**Regulation von Adhäsinen und der Protease DegP durch den  
CpxR- und RpoE-*envelope stress response*-Signalweg  
in *Yersinia enterocolitica***

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

vorgelegt von  
Catharina Zeuzem  
aus  
Frankfurt am Main

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

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

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Konrad Trülzsch  
Prof. Dr. med. Holger Rüssmann  
PD Dr. rer. nat. Stefan Odenbreit

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Ombeline Rossier

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Oktober 2018

## Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Regulation von Adhäsinen und der Protease DegP durch den CpxR- und RpoE-  
*envelope stress response*-Signalweg in *Yersinia enterocolitica*“**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 10. Oktober 2018

Catharina Zeuzem

Meiner Familie und Christopher

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Gattung <i>Yersinia</i> .....	1
1.1.1	Yersiniose – Ätiologie, Klinik, Komplikationen, Diagnostik und Therapie .....	2
1.1.2	<i>Yersinia enterocolitica</i> als infektiionsbiologischer Modellorganismus.....	3
1.2	Adhäsine – ein wichtiger Bestandteil der <i>Y. enterocolitica</i> Pathogenität.....	3
1.2.1	Die Adhäsine Ail und OmpX.....	4
1.2.2	Das Adhäsin Invasin .....	4
1.2.3	Das <i>Yersinia</i> Adhäsin A .....	5
1.3	Das Periplasma und periplasmatische Proteine .....	7
1.3.1	Die periplasmatische Protease DegP .....	7
1.3.2	Periplasmatische Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen .....	8
1.4	<i>Envelope stress response</i> -Signalwege .....	9
1.4.1	Der CpxR-ESR-Signalweg .....	9
1.4.2	Der RpoE-ESR-Signalweg .....	12
1.4.3	Der Psp-ESR-Signalweg.....	14
1.4.4	Der BaeR-ESR-Signalweg.....	15
1.4.5	Der Rcs-ESR-Signalweg.....	15
1.5	Das RNA Chaperon Hfq .....	16
1.6	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1	Material.....	20
2.1.1	Geräte .....	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.3	Chemikalien und Biochemikalien .....	22
2.1.4	Medien, Puffer und Lösungen .....	24
2.1.5	Antibiotika.....	25
2.1.6	Antikörper für Immunoblots .....	26
2.1.7	Kits .....	26
2.1.8	Software .....	27

2.1.9	Stämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	27
2.1.9.1	Bakterienstämme.....	27
2.1.9.2	Plasmide.....	28
2.1.9.3	Oligonukleotide/Primer .....	29
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Allgemeine bakteriologische Techniken.....	31
2.2.1.1	Kultivierung von Bakterien.....	31
2.2.1.2	Photometrische Bestimmung des bakteriellen Wachstums.....	31
2.2.1.3	Lagerung von Bakterien .....	32
2.2.1.4	Herstellung elektrokompenter Bakterien .....	32
2.2.1.5	Transformation elektrokompenter Bakterien .....	32
2.2.2	Biochemische und biomolekulare Techniken.....	33
2.2.2.1	Reinigung und Lagerung von genomischer DNA .....	33
2.2.2.2	Reinigung und Lagerung von Plasmid-DNA.....	33
2.2.2.3	Reinigung und Lagerung von RNA.....	33
2.2.2.4	Reverse Transkription von RNA zu cDNA.....	33
2.2.2.5	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration und –Qualität.....	34
2.2.3	Genetische Techniken .....	34
2.2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion .....	34
2.2.3.2	Kolonie-PCR.....	35
2.2.4	Agarosegelelektrophorese .....	36
2.2.5	Reinigung von PCR-Produkten .....	36
2.2.6	Enzymatische Modifikation von DNA .....	37
2.2.6.1	Restriktionsverdau.....	37
2.2.6.2	Ligation von DNA-Fragmenten .....	37
2.2.6.3	„Golden Gate“ Klonierungen.....	38
2.2.7	DNA-Sequenzierung .....	39
2.2.8	Proteinbiochemische Methoden.....	40
2.2.8.1	Wachstumskurven und Gesamtzelllysate.....	40
2.2.8.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	40
2.2.8.3	Western-Blot / Immunoblot .....	41
2.2.9	Durchflusszytometrie-Messung der GFP Fluoreszenz von Bakterien.....	42
2.2.10	Quantitative PCR .....	43
2.2.10.1	Primer-Design und Testung der Primer.....	43
2.2.10.2	Durchführung der qPCR mit cDNA.....	45
2.2.10.3	Auswertung der qPCR Ergebnisse.....	46
2.2.11	Statistische Auswertung.....	47

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
3.1	Wirkung der induzierten Überexpression der ESR-Regulatorgene <i>cpxR</i> und <i>rpoE</i> auf das Wachstum von <i>Y. enterocolitica</i> .....	48
3.2	Analyse des CpxR- und RpoE-ESR-Regulons .....	52
3.3	Effekt der <i>cpxR</i> bzw. <i>rpoE</i> Überexpression auf die Expression des Gens <i>degP</i> .....	54
3.4	Effekt der Überexpression der Gene <i>cpxR</i> und <i>rpoE</i> auf die Expression der Adhäsingene.....	56
3.4.1	CpxR- bzw- RpoE-abhängige Expression des Adhäsingens <i>ompX</i> .....	57
3.4.2	CpxR- bzw- RpoE-abhängige Expression des Adhäsingens <i>ail</i> .....	59
3.4.3	CpxR- bzw. RpoE-abhängige Expression des Adhäsingens <i>yadA</i> .....	61
3.4.4	CpxR- bzw. RpoE-abhängige Produktion des Adhäsin Invasin .....	63
3.4.5	CpxR- bzw. RpoE-abhängige Expression der Adhäsingene <i>invA</i> und <i>rovA</i> .....	65
3.5	Einfluss des RNA Chaperons Hfq auf die Expression ESR-abhängiger Gene .....	67
3.5.1	Durchflusszytometrische Untersuchungen mit <i>gfp</i> -Reporterfusionen.....	67
3.5.2	Quantitative PCR zur Untersuchung der ESR-Genexpression .....	70
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>73</b>
4.1	Vermehrte Expression der <i>envelope stress response</i> -abhängigen Gene <i>cpxR</i> bzw. <i>rpoE</i> hemmen das Wachstum von <i>Y. enterocolitica</i> .....	74
4.2	Vermehrte Expression der periplasmatischen Protease DegP unter <i>rpoE</i> Überexpression .....	76
4.3	Untersuchung von Adhäsinen unter vermehrter Expression von <i>cpxR</i> bzw. <i>rpoE</i> .....	80
4.4	Wechselwirkungen zwischen dem CpxR- und dem RpoE-ESR-Regulon .....	85
4.5	Interaktion zwischen dem CpxR- bzw. RpoE-ESR-Signalweg und dem RNA Chaperon Hfq87	
4.6	Ausblick .....	89
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>108</b>



<b>8 ANHANG.....</b>	<b>112</b>
8.1 Danksagung.....	112

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* gehört zu der Familie der Enterobacteriaceae. Sie sind Gram-negative Stäbchen und haben einen fakultativ anaeroben Stoffwechsel (Heesemann, 2001). Benannt wurden sie nach dem Naturwissenschaftler Alexandre Yersin, der 1894 den Erreger der Pest (*Yersinia pestis*) als Erster beschrieb (Yersin, 1994). Das Wachstumstemperaturoptimum für *Yersinia* liegt zwischen 25°C und 28°C. Jedoch können sich Yersinien auch bei 0 - 4°C (psychrophil) und zwischen 30 - 43°C (mesophil) vermehren (Heesemann, 2001).

Gegenwärtig sind 19 *Yersinia* Spezies bekannt (List of prokaryotic names with standing in nomenclature, 2016), von denen drei humanpathogen sind: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* (Putzker *et al.*, 2001). *Y. pestis* ist der Erreger der Pest, der heutzutage auf Wildpestherde beschränkt bleibt und in Europa keine Rolle mehr spielt. 2013 wurden weltweit 783 Fälle bekannt. Es werden vor allem Pesterkrankungen beim Menschen in Afrika, aber auch in Asien, sowie in Nord- und Südamerika beschrieben. Die meisten Fälle kommen laut *World Health Organisation* (WHO) derzeit in Madagaskar, der Demokratischen Republik Kongo und in Peru vor (Weltgesundheitsorganisation, 2017). *Y. pestis* kann den Magen von Flöhen besiedeln und wird beim Saugakt auf dem Wirt übertragen. Zu den natürlichen Wirtstieren gehören u.a. Murmeltiere, Wüstenrennmäuse und Erdmännchen (Heesemann, 2001).

*Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind enteropathogen und verursachen eine Yersiniose, wobei *Y. enterocolitica* weitaus häufiger zu einer Infektion führt als *Y. pseudotuberculosis* (Long *et al.*, 2010). Die Yersiniose gehört zu den Zoonosen, d.h. die Erreger werden von Tieren auf Menschen übertragen. *Y. enterocolitica* wird vor allem über rohes Schweinefleisch aufgenommen (Huovinen *et al.*, 2010; Valentin-Weigand *et al.*, 2014). Wenn es zu einer Yersiniose durch *Y. pseudotuberculosis* kommt, werden die Bakterien auch über Gemüse, wie Blattsalat oder Karotten übertragen (Nuorti *et al.*, 2004; Rimhanen-Finne *et al.*, 2009). Des Weiteren sind Fälle bekannt, bei denen Yersinien über Bluttransfusionen (Spender mit Yersiniose) übertragen wurden (Bottone, 1999).

*Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* unterscheiden sich durch biochemische und molekulare Merkmale. Die *Y. enterocolitica* Spezies ist sehr heterogen, daher werden die *Y. enterocolitica* Stämme über O- und H-Antigene in verschiedene Serovaren und über biochemische Reaktionen in Biovaren eingeteilt. Nur die Stämme der Biovaren 1B und 2 bis 5 sind pathogen (Huovinen *et al.*, 2010). Dieses System zur Klassifizierung wird auch für *Y. pseudotuberculosis* angewendet (Heesemann, 2001).

### 1.1.1 Yersiniose – Ätiologie, Klinik, Komplikationen, Diagnostik und Therapie

Als Yersiniose versteht man das durch *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* ausgelöste Krankheitsbild. Die Inzidenz der Yersiniose in Deutschland ist seit 2002 kontinuierlich zurückgegangen, dennoch ist die Yersiniose nach der *Campylobacter jejuni*-Enteritis und Salmonellose die dritthäufigste, bakterielle Ursache einer Gastroenteritis. Noch häufiger als bakteriell- ausgelöste Gastroenteritiden sind Gastroenteritiden durch Noro- oder Rotaviren. Betroffen von einer Yersiniose sind vor allem Kinder unter fünf Jahren, die höchste Inzidenz haben einjährige Kinder (Robert-Koch-Institut, 2012, 2016).

Die Symptome einer Yersiniose sind variabel in Abhängigkeit des Alters und des Immunstatus des Infizierten. Kleine Kinder haben häufig selbstlimitierenden Durchfall, abdominale Schmerzen, eine mesenteriale Lymphadenitis und leichtes Fieber, während ältere Kinder und Erwachsene häufig unter rechtsseitigen Unterbauchschmerzen (Pseudoappendizitis) leiden (Van Noyen *et al.*, 1991). Erwachsene können zudem eine *Yersinia*-Colitis mit diffusen Ulzerationen des Ileums und Kolons entwickeln. Ein weiteres Symptom der Yersiniose im Erwachsenenalter kann eine Pharyngitis durch Infektion der Tonsillen sein (Tacket *et al.*, 1983). Sehr selten können, insbesondere immundefiziente Patienten, eine *Yersinia*-Septikämie entwickeln, die mit hoher Letalität einhergeht. Besonders gefährdet sind Dialyse-Patienten, Patienten mit Leberzirrhose oder einer Thalassämie (Schuchmann *et al.*, 1997; Strobel *et al.*, 2000).

Zu den post-infektiösen Komplikationen einer Yersiniose gehören u.a. reaktive Arthritiden, Erythema nodosum und Konjunktivitis. Die reaktive Arthritis kommt vor allem bei HLA-B-27-positiven Patienten vor (Lahesmaa *et al.*, 1992). Die Latenz der Folgeerkrankungen kann bis zu mehrere Wochen betragen (Bottone, 1997).

In Deutschland wird bei Patienten mit Diarrhoe nicht routinemäßig auf *Yersinia* getestet. Die Diagnose einer akuten Yersiniose erfolgt primär über einen Erregernachweis im Stuhl. Als ergänzende Diagnostik ist eine serologische Untersuchung zum Nachweis von IgM-, IgA- und IgG-Antikörpern gegen spezifische virulenz-assoziierte Yersinien-Antigene möglich. Die IgG-Antikörper persistieren bei vielen Patienten nach *Yersinia*-Infektion über Jahre (Heesemann, 2001).

Meist verläuft eine Yersiniose selbstlimitierend, so dass therapeutisch nur eine Volumen- und Elektrolytsubstitution nötig ist. Bei älteren oder immungeschwächten Patienten sowie bei invasiver Yersiniose sollte bei Erregernachweis eine Antibiotikatherapie (z.B. mit Cotrimoxazol, Doxycyclin oder Chinolonen) durchgeführt werden (Heesemann, 2001).

### 1.1.2 *Yersinia enterocolitica* als infektionsbiologischer Modellorganismus

*Y. enterocolitica* ist aus zwei Gründen ein wichtiger Modellorganismus für das Verständnis der Funktion und Regulation von Pathogenitätsfaktoren in Gram-negativen Bakterien.

Zum einen teilt *Y. enterocolitica* einen wichtigen Infektionsmechanismus mit anderen klinisch relevanten Bakterien. Wie auch *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* und *Bordetella* sind *Y. enterocolitica* Gram-negative Stäbchen, die das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) als ein wichtiges Pathogenitätsinstrument gemeinsam haben (Troisfontaines und Cornelis, 2005). Das T3SS spielt in *Yersinia* eine wichtige Rolle bei der Unterwanderung des Immunsystems durch Translokation/Injektion von *Yersinia outer proteins* (Yops) in die Wirtszelle (Heesemann *et al.*, 2006; Trosky *et al.*, 2008). Neben dem T3SS hat *Y. enterocolitica* weitere Pathogenitätsfaktoren, die entweder chromosomal oder auf einem hoch konservierten Virulenz-Plasmid (pYV) kodiert werden.

Zum anderen führt eine akute *Y. enterocolitica* Infektion im Tiermodell zu den gleichen klinischen Symptomen wie beim Menschen. Nach Aufnahme von *Y. enterocolitica* über kontaminierte Nahrung gelangen die Bakterien über M-Zellen (spezialisierte Epithelzellen) im terminalen Ileum in die darunter liegenden Peyer-Plaques. Die Peyer-Plaques sind Lymphfollikel und Teil des MALT-Systems (*mucosa associated lymphoid tissue*). Von dort kann *Y. enterocolitica* in mesenteriale Lymphknoten, Leber und Milz disseminieren (Galindo *et al.*, 2011).

### 1.2 Adhäsine – ein wichtiger Bestandteil der *Y. enterocolitica* Pathogenität

Die Oberflächenpathogenitätsfaktoren, die zur Interaktion zwischen Bakterien und Wirtszellen beitragen bezeichnet man als Adhäsine. Sie spielen eine wichtige Rolle für das Überleben von Bakterien im Wirt, denn eine präzise Interaktion zwischen Wirtszelle und Bakterien bildet die Grundlage für eine erfolgreiche Pathogenität.

Für die Translokation in M-Zellen und die Streuung im Körper sind unter anderem die Adhäsine Invasin, *Yersinia* Adhäsine A (YadA) und *attachment-invasin locus* (Ail) verantwortlich. Sie werden zu unterschiedlichen Phasen der Infektion und bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen exprimiert und ergänzen sich dadurch in ihrer Funktion. Die Adhäsine Invasin, Ail und OmpX (*outer membrane protein X*) werden chromosomal-kodiert. Plasmid-kodierte Pathogenitätsfaktoren befinden sich auf dem pYV-Plasmid (Plasmid für *Yersinia* Virulenz) und werden hauptsächlich bei 37°C (Wirtstemperatur) exprimiert, dadurch wird die Infektiosität differenziert reguliert sowie eine *in vivo* Besiedlung und Streuung begünstigt. Die Gene für das bereits oben erwähnte T3SS und das Adhäsine YadA sind auf dem pYV-Plasmid lokalisiert.

### 1.2.1 Die Adhäsine Ail und OmpX

Ail (*attachment invasion locus*) ist ein kleines Zelloberflächen-Adhäsion (17 kDa). In stationärer Wachstumsphase wird Ail ausschließlich bei 37°C produziert, in exponentieller Wachstumsphase dagegen wird Ail auch bei niedrigeren Temperaturen produziert (Pierson und Falkow, 1993). Ail fördert die Epithelzellinvasion durch Bindung an extrazelluläre Matrix und die Anheftung an migrierende Immunzellen (Phagozyten, Dendritische Zellen) und damit die Streuung in Lymphknoten, Leber und Milz (Miller *et al.*, 2001; Miller und Falkow, 1988). Zu den Komponenten der extrazellulären Matrix, an die Ail in *Y. pestis* bindet, gehören Laminin, Fibronectin und Proteoglykane (Yamashita *et al.*, 2011). Außer seiner Rolle in Invasion und Streuung, trägt Ail auch zur Serumresistenz von *Y. enterocolitica* bei. Insbesondere das Zusammenspiel von Ail und YadA sorgt für ein hohes Maß an Serum-Resistenz durch Bindung von Faktor H und C4-bindendem Protein (Biedzka-Sarek *et al.*, 2005; Bliska und Falkow, 1992; Kirjavainen *et al.*, 2008; Pierson und Falkow, 1993).

Die Struktur von Ail ist verwandt mit der Struktur des *E. coli* Proteins OmpX (*outer membrane protein X*). Ail und OmpX sind homologe Proteine der äußeren Bakterienmembran (Mecsas *et al.*, 1993; Mecsas *et al.*, 1995). Die genaue Funktion von OmpX ist bisher nicht aufgeklärt.

### 1.2.2 Das Adhäsion Invasin

Invasin ist etwa 92 kDa groß und ein Protein der äußeren Membran, dort vermittelt es die Adhäsion und Invasion von *Y. enterocolitica* an Epithelzellen. Dabei spielt es insbesondere in der frühen Infektionsphase, der Initialisierung und Invasion, der Infektion eine wichtige Rolle (Clark *et al.*, 1998; Pepe und Miller, 1993). Für das Eindringen der Bakterien in die M-Zellen des terminalen Ileums bindet das Invasin an  $\beta_1$ -Integrine (Clark *et al.*, 1998), was zu einem Umbau des Zytoskeletts der M-Zellen und zur Internalisierung der Yersinien führt (Deuretzbacher *et al.*, 2009). Die Bakterien werden dann von den M-Zellen Richtung Submukosa transloziert, wo sie zunächst extrazellulär in der Lamina propria des Ileums verbleiben (Autenrieth und Firsching, 1996). Invasin induziert außerdem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und darüber hinaus die Produktion und Freisetzung der Zytokine IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (Grassl *et al.*, 2003; Kampik *et al.*, 2000).

Invasin wird chromosomal durch das *invA* Gen kodiert. Die Produktion von Invasin ist temperaturabhängig und abhängig von der Wachstumsphase. Maximale Invasin-Produktion findet *in vitro* bei 27°C, pH 8 oder bei 37°C, pH 5,5 statt. Außerdem wird *invA* maximal exprimiert beim Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase sowohl bei 27°C als auch bei 37°C (Bottone, 1999; Pepe *et al.*, 1994). Das spricht dafür, dass Invasin schon vor Aufnahme in den Wirt produziert wird, was vorteilhaft für eine schnelle Transzytose durch die Epithelzellen sein könnte (Grassl *et al.*, 2003; Uliczka *et al.*, 2011). In *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 wird Invasin insbesondere bei niedrigeren Temperaturen

exprimiert und nur gering bei 37°C (Uliczka *et al.*, 2011). Die Expression von *invA* ist abhängig von dem transkriptionalen *regulator of virulence A* (RovA). Bei 27°C vermindert RovA die transkriptionale Hemmung von *invA* durch das *histone-like protein* (H-NS), indem es an die Promotorregion von *invA* und seinen eigenen Promotor bindet (Cathelyn *et al.*, 2007; Heroven *et al.*, 2007). In *Y. enterocolitica* wird die Invasin-Produktion bei 37°C durch RovA gehemmt, indem es zu einer reversiblen Änderung der Konformation von RovA kommt. Dies führt zu einer vermehrten Proteolyse von RovA und einer verminderten DNA-Bindung (Herbst *et al.*, 2009; Uliczka *et al.*, 2011). Man geht davon aus, dass RovA noch andere Gene außer *invA* reguliert, da *rovA*-negative *Y. enterocolitica* noch avirulenter als *invA*-negative Stämme und der Wildtyp sind (Dube *et al.*, 2003; Revell und Miller, 2000).

### 1.2.3 Das *Yersinia* Adhäsins A

Das *Yersinia* Adhäsins A (YadA) ist ein trimeres Protein, bestehend aus einer N-terminalen Kopfregion, einer Stieldomäne und einer kurzen C-terminalen Ankerstruktur, die in der äußeren Membran verankert ist (Hoiczky *et al.*, 2000). Die wichtigste Funktion von YadA ist die Adhäsion. Die Kopf-Region des YadA bindet an Epithelzellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten sowie Komponenten der extrazellulären Matrix des Wirtes wie Kollagen, Laminin und Fibronectin (Galindo *et al.*, 2011; Schulze-Koops *et al.*, 1993; Schulze-Koops *et al.*, 1992). Durch die Bindung an Kollagen bildet YadA eine Brücke zu der Wirtszelle, die relativ pH-, Temperatur-, Protease- und Urea-resistent ist (Emody *et al.*, 1989). Möglicherweise ist die Bindung von YadA an Kollagen dafür verantwortlich, dass *Y. enterocolitica*-Infektionen in der Spätfolge zu reaktiver Arthritis und Erythema nodosum führen können (Cover und Aber, 1989). Die Stieldomäne des YadA hat zum einen die Funktion die Kopf-Region über die Bakterien-Oberfläche zu verlängern, aber auch die Funktion, eine Komplement-Resistenz zu vermitteln. Durch die Komplement-Resistenz verhindert *Yersinia* die Aktivierung von C3b und die Formation eines *membrane attack complex* (MAC) (Biedzka-Sarek *et al.*, 2008; Biedzka-Sarek *et al.*, 2005; Kirjavainen *et al.*, 2008). Der Anker hat die Funktion, das YadA durch die äußere Membran zu translozieren und es dann in der äußeren Membran als Trimer zu stabilisieren (Biedzka-Sarek *et al.*, 2008; Roggenkamp *et al.*, 2003).

Das *yadA* Gen ist auf dem hochkonservierten pYV-Plasmid lokalisiert und seine Expression findet temperaturabhängig bei 37°C statt (Skurnik und Toivanen, 1992). Ein positiver Regulator der *yadA* Transkription ist das VirF. Es ist dafür verantwortlich, dass YadA nur bei 37°C synthetisiert wird (Bialas *et al.*, 2012). Das Gen für den transkriptionalen Regulator VirF ist auch auf dem pYV-Plasmid lokalisiert (Cornelis *et al.*, 1998; Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992). Der zweite Regulator von YadA ist das YmoA. Das Gen *ymoA* wird chromosomal kodiert und ist ein transkriptionaler Repressor von *virF*, indem die *virF* Expression unterhalb

von 37°C verhindert wird. VirF reguliert auch die Expression anderer Virulenzfaktoren in *Y. enterocolitica*. Man nimmt an, dass die mRNA-Struktur temperaturabhängig verändert wird, so dass Promotoren besser für Aktivatoren der Transkription zugänglich sind (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992). Andere, extrazelluläre Faktoren, die zu einer Induktion der *yadA* Transkription führen sind pH, Änderung der Osmolarität und die direkte Interaktion zwischen dem Bakterium und Wirtszellen, insbesondere Phagozyten (Portnoy *et al.*, 1984).

Bei Infektion des Wirtes wird YadA in den Peyer-Plaques produziert und schützt, zusammen mit translozierten *Yops*, die Bakterien vor Phagozytose durch Phagozyten. Dennoch transportieren Leukozyten die Bakterien zu anderen lymphatischen Geweben wie mesenterialen Lymphknoten. Zusammen mit Ail spielt YadA eine wichtige Rolle bei der Dissemination der Bakterien und bietet Schutz vor dem angeborenen Immunsystem (Biedzka-Sarek *et al.*, 2005; Kirjavainen *et al.*, 2008; Leo und Skurnik, 2011).

### 1.3 Das Periplasma und periplasmatische Proteine

Das Periplasma Gram-negativer Bakterien wird von der inneren und der äußeren Bakterienmembran begrenzt. Es ist mit Proteinen und Peptidoglykan gefüllt und deutlich visköser als das Zytoplasma (Mullineaux *et al.*, 2006). Die Proteine im Periplasma sorgen für die Biogenese und die Homöostase der bakteriellen Außenmembran, für die Aufnahme von Nährstoffen, die Beseitigung von „Abfall“, für Motilität, Sekretion und Anheftung an Oberflächen (Guest und Raivio, 2016).

In der Außenmembran der Bakterien befinden sich diverse Proteine (*outer membrane proteins*, OMP), die dort verschiedene Funktionen ausführen, sowie Lipopolysaccharide (LPS). Im Periplasma werden die OMP durch periplasmatische Chaperone gebunden und in die äußere Bakterienmembran inseriert. Fehlgefaltete Proteine werden durch Proteasen abgebaut. Anders als die ATP-abhängigen Chaperone und Proteasen im Zytoplasma, müssen periplasmatische Chaperone und Proteasen ohne ATP auskommen (Mogensen und Otzen, 2005). Für die Biogenese von OMP sind neben Proteasen und Chaperonen auch Phospholipide und LPS von Bedeutung (de Cock *et al.*, 2001). Phospholipide und LPS befinden sich in der äußeren Membran und haben auch eine Chaperon-Funktion (Mogensen und Otzen, 2005).

#### 1.3.1 Die periplasmatische Protease DegP

DegP (*degradation protease*) ist ein Protein, das sich im Periplasma von Gram-negativen Bakterien befindet. Die Fass-Struktur von DegP wird von zwei trimeren Ringstrukturen gebildet (Krojer *et al.*, 2002). Es ist bi-funktional, d.h. es ist sowohl Chaperon als auch Protease. DegP gehört zur Familie der konservierten *high temperature requirement A* (HtrA)-Proteasen (Clausen *et al.*, 2002). Die Aktivität als Chaperon oder Protease ist temperaturabhängig: Die Funktion als Chaperon kommt bei niedrigeren Temperaturen (28°C) zur Geltung, während die Funktion als Protease bei höheren Temperaturen (42°C) aktiv ist (Spiess *et al.*, 1999).

Die Protease-Funktion von DegP ist eng verbunden mit der Biogenese von Oberflächenproteinen, allerdings nicht mit der Faltung der Proteine (keine direkte Chaperon-Funktion), sondern vielmehr um eine Homöostase der Oberflächenproteine zu erhalten. In der Doppelfunktion degradiert DegP falsch-gefaltete Proteine und entfaltet reversibel falsch-gefaltete Proteine, damit diese im Periplasma neu gefaltet werden können (Mogensen und Otzen, 2005).

Vermehrte DegP Expression ist unter anderem das Resultat von aktivierten *envelope stress response* (ESR)-Signalwegen und schützt dadurch vor zellulärem Stress, da extrazytoplasmatischer Stress zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen führen kann (Mogensen



und Otzen, 2005). Die *degP* Transkription wird sowohl durch den RpoE- als auch durch den CpxR-ESR-Signalweg kontrolliert (siehe auch Kapitel 1.4.) (Danese *et al.*, 1995; Erickson und Gross, 1989; Raina *et al.*, 1995). Aber auch eine OMP-Überproduktion oder hohe Temperaturen führen zu vermehrter *degP* Expression (Heusipp *et al.*, 2004; Meccas *et al.*, 1993). DegP Produktion ist bei Temperaturen über 42°C von besonderer Bedeutung für das Überleben von *E. coli* (Lipinska *et al.*, 1989; Strauch *et al.*, 1989).

DegP hat damit eine virulenzassoziierte Funktion bei Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* (Bringer *et al.*, 2005), *S. enterica* (Humphreys *et al.*, 1999), *Y. enterocolitica* (Li *et al.*, 1996) und *Y. pestis* (Williams *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Periplasmatische Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen

Periplasmatische Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen (PPlasen) sind an der Proteinfaltung beteiligt, indem sie die Bindungsachsenrotation von Amid-Bindungen, an denen die Aminosäure Prolin beteiligt ist, katalysieren.

Die FKBP-Typ Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase A (FkpA) befindet sich im Periplasma Gram-negativer Bakterien (Arie *et al.*, 2001). Die Transkription von *fkpA* wird über den RpoE-ESR-Signalweg kontrolliert (siehe auch Kapitel 1.4.2.) (Danese und Silhavy, 1997; Missiakas *et al.*, 1996). Die Interaktion zwischen FkpA und seinen Substraten scheint transient zu sein, da kein stabiler FkpA-Substrat-Komplex nachgewiesen werden konnte. FkpA scheint insbesondere auf die frühen Zwischenstufen des Faltungsprozesses zu wirken, da die Produktivität abhängig davon ist, wann das FkpA dem Faltungs-Prozess hinzugefügt wird. Allerdings geht auch in späteren Phasen ein signifikanter Effekt von FkpA aus (Ramm und Pluckthun, 2000, 2001). In *S. enterica* und *E. coli* ist FkpA für die Faltung von Proteinen im Periplasma mit verantwortlich (Danese und Silhavy, 1997; Humphreys *et al.*, 1999). Eine *S. enterica fkpA*-Mutante zeigt eine gestörte intrazelluläre Replikation und auch für intrazelluläre Erreger wie *Legionella pneumophila* und *Chlamydia trachomatis* sind FkpA Homologe von Bedeutung für die Infektion von Wirtszellen (Horne *et al.*, 1997).

Die Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase A (PpiA) ist auch bekannt als RotA. PpiA ist ebenfalls eine periplasmatische PPlase, die zur Familie der Cyclophiline gehört (Norregaard-Madsen *et al.*, 1994). Die Transkription von *ppiA* ist in *E. coli* unter Kontrolle des CpxR-ESR-Signalweges (siehe auch Kapitel 1.4.1.) (Pogliano *et al.*, 1997). Das Protein ist nicht essentiell, eine *ppiA*-Mutante zeigt keinerlei Änderung der OMP-Zusammensetzung bezogen auf den Wildtyp (Kleerebezem *et al.*, 1995).

## 1.4 *Envelope stress response*-Signalwege

An bakteriellen Zellmembranen (*envelope* entspricht innerer und äußerer Zellmembran sowie dem Periplasma mit Zellwand) findet die Auseinandersetzung zwischen dem Bakterium und seiner Umgebung statt. Hierzu gehören: (i) Kontakt zu dem angeborenen Immunsystem des Wirtes, (ii) Antibiotikawirkung, (iii) Änderungen des pH und der Osmolarität der Umgebung. Für das Überleben der Bakterien muss die Komposition der Oberflächenproteine den wechselnden Umgebungsbedingungen angepasst werden. Die *envelope stress response* (ESR)-Signalwege können Änderungen der Umgebung, als *envelope stress* wahrnehmen und mit einer Schutzreaktion durch Modifikation der Lipopolysaccharide (LPS), der Proteine der äußeren Bakterienmembran (OMP) oder vermehrte Produktion von Proteasen und Chaperonen antworten (Guest und Raivio, 2016).

Für Gram-negative Bakterien wurden einige ESR-Signalwege beschrieben, dazu gehören der CpxR-, RpoE-, Psp-, BaeR- und Rcs-ESR-Signalweg (Chen *et al.*, 2016; Guest und Raivio, 2016). Einige der CpxR-ESR-aktivierenden Stimuli überlappen sich mit dem RpoE-ESR-Signalweg (De Wulf *et al.*, 2002; Raivio und Silhavy, 1999). Neben gemeinsamen aktivierenden Stimuli überlappen sich die beiden Systeme auch bei der Regulation der Expression von DegP in *E.coli* (Danese *et al.*, 1995). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die beiden Signalwege parallel wirken. Allerdings wurde für den CpxR-ESR-Signalweg auch eine negativ regulierende Wirkung auf den RpoE-ESR-Signalweg in *E. coli* und *S. enterica* beschrieben (Dartigalongue *et al.*, 2001; De Wulf *et al.*, 2002; Humphreys *et al.*, 2004; Mutalik *et al.*, 2009).

### 1.4.1 Der CpxR-ESR-Signalweg

Die Stressantwort des CpxR (*conjugative pilus expression*)-ESR-Signalweges wird über ein Zwei-Komponenten-System in der inneren Bakterienmembran vermittelt, bestehend aus dem Sensor CpxA und dem Regulator CpxR (Abbildung 1). Im aktuellen Modell für *E. coli* wird die Wahrnehmung von *envelope stress* über CpxA vermittelt, welches unter nicht-stress-Bedingungen durch das periplasmatische Protein CpxP gebunden und inhibiert wird. *Envelope stress* inaktiviert den Inhibitor CpxP und löst eine CpxA-abhängige Phosphorylierung von CpxR aus und damit die Aktivierung des ESR-Signalweges. Die Kinase-Aktivität von CpxA wird bei Erreichen einer Homöostase in eine intrinsische Phosphatase-Aktivität umgewandelt und dephosphoryliert CpxR-P. Das phosphorylierte CpxR (CpxR-P) reguliert die Transkription durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen (Grabowicz und Silhavy, 2017; Raivio und Silhavy, 1997). Die CpxR-P-abhängige Transkription führt zu veränderter Expression von Genen für Chaperone, Proteasen, Transportern und anderen Enzymen, die zum Beispiel zur Resistenz gegen viele Antibiotika oder das angeborene Immunsystem führen (Raivio, 2014). Zu den periplasmatischen

Proteasen und Chaperonen, die durch den CpxR-ESR-Signalweg reguliert werden, gehört u.a. PpiA und DegP sowie CpxP, CpxA und CpxR, die Bestandteile dieses Zwei-Komponenten-Systems sind. Die Aktivierung des CpxR-ESR-Signalweges führt auch zu einer Negativ-Regulation einiger Gene. Dazu gehören u.a. *rpoE*, *rseA* und *rseB*, die Bestandteile des RpoE-ESR-Signalweges sind (De Wulf *et al.*, 1999) (Abbildung 2).

In *Y. enterocolitica* führt eine CpxR-Überexpression nicht automatisch zu einer Phosphorylierung in CpxR-P, weil es zu keiner Überexpression der CpxA-Kinase kommt (Rönnebäumer *et al.*, 2009). Allerdings wird CpxR durch Acetylphosphat unspezifisch phosphoryliert und durch die fehlende CpxA-Phosphatase nicht dephosphoryliert, so dass es schlussendlich zu einer Phosphorylierung von CpxR kommt (Danese *et al.*, 1995; Rönnebäumer *et al.*, 2009). Zudem zeigten Rönnebäumer *et al.*, dass ein nicht-phosphorylierbares CpxR die gleichen Effekte auf die Expression von *cpxR* bzw. *rpoE* hat und schlossen daraus, dass die Phosphorylierung von CpxR nicht notwendig für dessen Funktion ist (Rönnebäumer *et al.*, 2009).

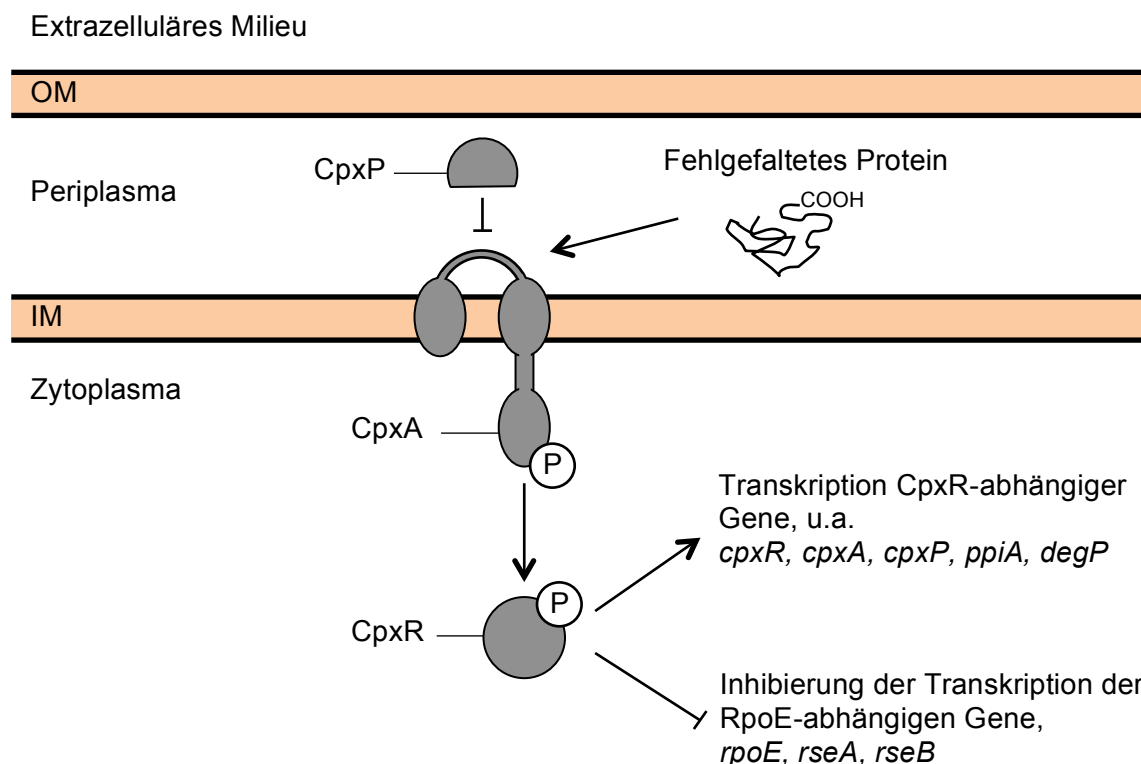
In *E. coli* wird der CpxR-ESR-Signalweg durch Oberflächenadhäsion, alkalischen pH und Lipoprotein-Überproduktion aktiviert (Rowley *et al.*, 2006). In *E. coli* und *S. enterica* wird der CpxR-ESR-Signalweg durch Biofilm-Formation, Invasion in Epithelzellen und Oberflächenadhäsion aktiviert (Dorel *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 1998; Otto und Silhavy, 2002). Aktuelle Studien zeigen, dass der CpxR-ESR-Signalweg spezifisch auf Störungen in der inneren Bakterienmembran reagiert (Grabowicz und Silhavy, 2017; Raivio, 2014).

Des Weiteren wird eine Aktivierung des CpxR-ESR-Signalweges mit der Pathogenese vieler Erreger in Verbindung gebracht. Der CpxR-ESR-Signalweg reguliert die Expression der Gene für Oberflächenstrukturen, die mit der Virulenz von Erregern assoziiert sind, wie z.B. Adhäsine und das Typ-3-Sekretions-System. Mehrere Studien zeigen für *E.coli*, dass der CpxR-ESR-Signalweg die Produktion von Pili und Fimbrien beeinflusst (Hung *et al.*, 2001; Jubelin *et al.*, 2005; Nevesinjac und Raivio, 2005), sowie die Genexpression von *ppiA*, das als Chaperon einen indirekten Einfluss auf Pili und Fimbrien hat. In *E. coli* ist eine Kolonisation des Intestinaltraktes bei Mäusen in Abwesenheit des CpxR-ESR-Signalweges nicht möglich (Lasaro *et al.*, 2014). Für *Y. enterocolitica* dagegen ist der CpxR-ESR-Signalweg nicht notwendig für die Mausvirulenz (Heusipp *et al.*, 2004).

Für Salmonellen und Shigellen hat der CpxR-ESR-Signalweg einen pH-abhängigen Einfluss auf die Invasion von eukaryotischen Zellen (Nakayama *et al.*, 2003; Tobe *et al.*, 1993). In *Legionella pneumophila* reguliert der CpxR-ESR-Signalweg die Transkription von Genen positiv, die wichtig für das intrazelluläre Überleben der Bakterien sind. Jedoch sind in *Legionella pneumophila* weder *cpxR* noch *rpoE* für das Überleben und das Wachstum in

Makrophagen nötig (Gal-Mor und Segal, 2003). Auch in *Yersinien* ist der CpxR-ESR-Signalweg an der Interaktion mit eukaryotischen Zellen beteiligt (Carlsson *et al.*, 2007b).

Unter anderem in *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* beeinflussen *cpxR*-Mutanten die Resistenz zu  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Kurabayashi *et al.*, 2014; Srinivasan *et al.*, 2012; Yakhnina *et al.*, 2015). In *E. coli* führt eine Aktivierung des CpxR-ESR-Signalweges außerdem zu vermehrter Resistenz gegenüber Gallen salzen und Antibiotika wie Chinolonen und Aminoglykosiden (Hirakawa *et al.*, 2003).



**Abb. 1.: Schematische Darstellung des CpxR-ESR-Signalweges in *E. coli*.** OM: *Outer membrane* (äußere Bakterienmembran); IM: *Inner membrane* (innere Bakterienmembran). *Envelope stress* wie fehlgefaltete Proteine (exemplarisch dargestellt), Änderungen des pH oder der Osmolarität sowie Oberflächenadhäsion werden von dem CpxR-ESR-Signalweg durch die Sensor-Kinase CpxA wahrgenommen. Die Aktivierung der CpxA Kinase führt zur Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne. Die Phosphatgruppe wird dann an den N-Terminus des Regulator CpxR gebunden. Das phosphorylierte CpxR (CpxR-P) bindet an spezifische DNA-Sequenzen und fördert bzw. inhibiert die Transkription von CpxR-abhängigen Genen. CpxR-P führt zu einer vermehrten Transkription von *cpxA* und *cpxR* im Sinne einer positiven Autoregulation, allerdings auch zu einer vermehrten Transkription von *cpxP*. Es kodiert für das periplasmatische Protein CpxP, das CpxA bindet und seine Aktivität inhibiert (negative Rückkopplung). PpiA ist eine periplasmatische PPlase und DegP ist eine periplasmatische Protease/Chaperon (siehe auch Kapitel 1.3.), deren CpxR-abhängige Transkription ebenfalls durch *envelope stress* verstärkt wird. Die Transkription RpoE-abhängiger Gene wird durch CpxR-P inhibiert. Die Abbildung ist modifiziert nach Guest und Ravio (2016), Grabowicz und Silhavy (2017) und Rowley *et al.* (2006).

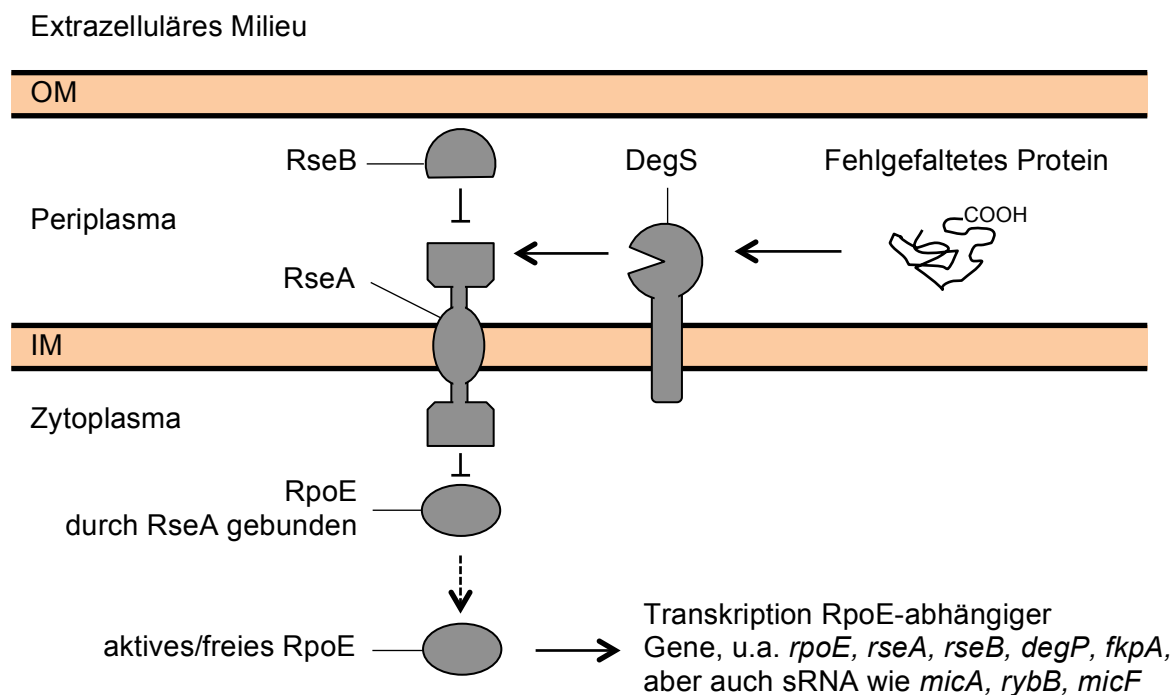
### 1.4.2 Der RpoE-ESR-Signalweg

RpoE (*extra*zytoplasmic *RNA polymerase sigma factor*) gehört zu den Sigmafaktoren, die auf extrazytoplasmatische Stimuli an der äußeren Bakterienmembran reagieren (Raivio und Silhavy, 2001). Der RpoE-ESR-Signalweg nimmt Veränderungen in der äußeren Bakterienmembran oder der LPS-Biogenese wahr. Diese Wahrnehmung beruht auf Interaktionen zwischen dem C-Terminus fehlgefalteter Proteine und der Protease DegS oder zwischen RseB und periplasmatischen LPS Molekülen. Beides führt zu einer regulierten intramembranären Proteolyse (*regulated intramembrane proteolysis*, RIP)-Kaskade und zur Freisetzung von RpoE - aus dem Membran-gebundenen RseA - in das Zytoplasma (Flores-Kim und Darwin, 2014; Ruiz und Silhavy, 2005). DegS gehört zur Familie der *high temperature requirement A* (HtrA) Proteasen, die typischerweise in extrazytoplasmatischen Kompartimenten lokalisiert sind (Clausen *et al.*, 2002). In *E. coli* wird etwa die Hälfte des RpoE ohne *envelope stress* durch RseA gebunden (Alba und Gross, 2004). RseA kontrolliert die Aktivität des RpoE-ESR-Signalweges indem es bei fehlendem Stress als Anti-Sigma-Faktor RpoE bindet (Missiakas *et al.*, 1997).

In *E. coli* sind inzwischen zahlreiche Gene bekannt, die unter Kontrolle des RpoE-ESR-Signalweges stehen (Dartigalongue *et al.*, 2001). Neben der Regulation des eigenen *rpoE* Gens und anderen Genen desselben Operons (*rseA*, *rseB*) werden Gene für Proteasen, Chaperone und Proteine zur LPS-Biogenese reguliert (Rowley *et al.*, 2006). RpoE ist ein Sigma-Faktor, der an den bakteriellen RNA-Polymerasekomplex bindet und die Transkription spezifischer DNA-Sequenzen initiiert (Feklistov *et al.*, 2014). Als Aktivator der Transkription fördert RpoE u.a. die Produktion von periplasmatischen Chaperonen und Proteinen für die Zellwand-Biogenese (Mogensen und Otzen, 2005). Die steigende Produktion von Chaperonen und Proteasen vermindert das durch *envelope stress* entstandene Ungleichgewicht im Periplasma.

Zu den Konditionen (*stress*), die zu einer Aktivierung des RpoE-ESR-Signalweges führen gehört bei *E. coli* beispielsweise Hitze, Kälte, oxidativer oder osmotischer Stress, die stationäre Wachstumsphase, Biofilm-Bildung und die Überexpression von OMP (Mecsas *et al.*, 1993; Missiakas *et al.*, 1996). Als Auslöser des RpoE-ESR-Signalweges ist in *Y. enterocolitica* bisher osmotischer Stress und *in vivo*-Wachstum beschrieben worden (Heusipp *et al.*, 2003; Rowley *et al.*, 2006). Wahrscheinlich führt auch die Akkumulation von OMP im Periplasma zu einer Aktivierung des RpoE-ESR-Signalweges durch die periplasmatische Protease DegS. Allerdings gibt es sowohl in *E. coli* als auch in *S. enterica* Hinweise auf eine DegS-unabhängige Aktivierung von RpoE (Grigorova *et al.*, 2004; Kenyon *et al.*, 2005; Rowley *et al.*, 2005).

In *S. enterica* ist *rpoE* zwar nicht essentiell, allerdings haben *Salmonella rpoE*-Mutanten eine deutlich abgeschwächte Virulenz bei der Infektion von Mäusen (Humphreys *et al.*, 1999). Auch in *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa* wurde ein Zusammenhang zwischen RpoE und bakterieller Pathogenität beschrieben (Craig *et al.*, 2002; Kovacikova und Skorupski, 2002; Martin *et al.*, 1993). In *Y. enterocolitica* konnte gezeigt werden, dass *rpoE* *in vivo* exprimiert wird (Heusipp *et al.*, 2003) und dass die Überexpression von *rpoE* eine ESR simuliert (Heusipp *et al.*, 2004).



**Abb. 2.: Schematische Darstellung des RpoE-ESR-Signalweges in *E. coli*.** OM: *Outer membrane* (äußere Bakterienmembran); IM: *Inner membrane* (innere Bakterienmembran). Die Aktivität der RpoE-ESR wird durch den membrangebundenen Faktor RseA und dessen Bindung an RpoE inhibiert. Für die Aktivierung des RpoE-ESR-Signalweges muss unter anderem die Protease DegS das RseA spalten. Die Aktivität des DegS wird durch fehlgefaltete Proteine induziert. Nach einigen weiteren im Zytoplasma stattfindenden Reaktionen wird RpoE freigesetzt und kann dann die Transkription RpoE-abhängiger Gene durch Bindung an die RNA Polymerase beeinflussen (Alba BM 2004). Dazu gehört eine positive Rückkopplung auf die Gene *rpoE* und *rseB* sowie die vermehrte Transkription der Gene *degP* und *fkpA*, die für periplasmatische Proteasen bzw. PPlasen kodieren (siehe auch Kapitel 1.3.). Eine negative Rückkopplung wird durch vermehrte Transkription von *rseA* erreicht. Die Abbildung ist modifiziert nach Guest und Ravio (2016), Grabowicz und Silhavy (2017) und Rowley *et al.* (2006).

### 1.4.3 Der Psp-ESR-Signalweg

Der Psp (*phage shock protein*)-ESR-Signalweg erhielt seinen Namen, weil das Psp-ESR-zugehörige Protein PspA bei einer Infektion mit filamentösen Bakteriophagen vermehrt gebildet wird (Brissette *et al.*, 1990). Der Psp-ESR-Signalweg wird durch Veränderungen in der inneren Bakterienmembran aktiviert. In *Y. enterocolitica* wird der Psp-ESR-Signalweg durch hohe Temperaturen, osmotischen Stress und Kontakt zu Ethanol aktiviert. In *E. coli* führt die stationäre Wachstumsphase bei basischem pH und eine Infektion durch filamentöse Bakteriophagen zu einer Induktion des Signalweges (Rowley *et al.*, 2006).

Die Funktionsweise des Psp-ESR-Signalweges wurde sowohl in *E. coli* (Adams *et al.*, 2003; Model *et al.*, 1997) als auch in *Y. enterocolitica* (Darwin und Miller, 2001) beschrieben. Bei Aktivierung des Signalweges durch *envelope stress* interagieren die beiden Proteine der inneren Bakterienmembran PspB und PspC mit dem Inhibitor des Psp-ESR-Signalweges (PspA). Dies führt zu einer Freisetzung des PspF (Transkriptionsfaktor) von seinem Inhibitor PspA und zu einer PspF-abhängigen Genexpression. In *E. coli* wird der Psp-ESR-Signalweg durch das *pspABCDE* Operon reguliert (Guest und Raivio, 2016; Rowley *et al.*, 2006).

In *E. coli* und *Y. enterocolitica* ist der Psp-ESR-Signalweg wichtig für die Aufrechterhaltung des Protonengradienten an der inneren Bakterienmembran (Kleerebezem *et al.*, 1996; Maxson und Darwin, 2004; Model *et al.*, 1997). In *S. enterica* konnte gezeigt werden, dass RpoE und PspA gemeinsam daran beteiligt sind, den Protonengradienten aufrecht zu erhalten und dass PspA in *rpoE*-Mutanten kompensatorisch während der stationären Wachstumsphase wirkt (Becker *et al.*, 2005).

Der Psp-ESR-Signalweg spielt für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* eine wichtige Rolle (Darwin und Miller, 1999, 2001). *Psp*-negative *Y. enterocolitica* Stämme haben eine deutlich abgeschwächte Infektiosität im Mausmodell wahrscheinlich durch Inhibierung des bakteriellen Wachstums (Darwin und Miller, 2001; Green und Darwin, 2004). Der Transkriptionsfaktor PspF steigert die Produktion von Faktoren, die wichtig für das Überleben von *Y. enterocolitica* sind (Darwin, 2005). Des Weiteren konnten Darwin und Miller zeigen, dass *pspC* wichtig für normales Wachstum von *Y. enterocolitica* während der Produktion des Typ-III-Sekretionssystems ist (Darwin und Miller, 2001).

In Gram-positiven Bakterien spielt der Psp-ESR-Signalweg eine wichtige Rolle bei Resistenz gegen Zellwand-aktive Antibiotika und in *Mycobacterium tuberculosis* für das Überleben in Makrophagen. Ferner wird der Psp-ESR-Signalweg bei Kontakt zu Vancomycin induziert (Datta *et al.*, 2015; Kingston *et al.*, 2013; Provvedi *et al.*, 2009; Wolf *et al.*, 2010).

#### 1.4.4 Der BaeR-ESR-Signalweg

Der BaeR (bacterial adaptive response)-ESR-Signalweg ist wie der CpxR-ESR-Signalweg ein Zwei-Komponenten-System, das aus der Sensor-Kinase BaeS und dem *response regulator* BaeR besteht. 2002 wurde der BaeR-ESR-Signalweg in *E.coli* erstmals beschrieben (Raffa und Raivio, 2002).

Hinweise auf die Funktion des Signalweges entstanden durch Studien, bei denen gezeigt werden konnte, dass Überexpression des BaeR-ESR-Signalweges zu einer verbesserten Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und Gallen Salzen führt (Hirakawa *et al.*, 2003). Dieser Signalweg wird durch für Bakterien toxische Stoffe und Metalle aktiviert (Baranova und Nikaido, 2002; Cordeiro *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2005; Raffa und Raivio, 2002). In *E. coli* wird die Resistenz gegen antimikrobielle Stoffe durch Zunahme der Aktivität von *multidrug resistance* (MDR) Efflux-Pumpen erreicht. Diese MDR Efflux-Pumpen sind Transportsysteme, die beispielsweise Antibiotika, Detergentien und Metabolite aus dem Bakterium heraus transportieren. Bisher gibt es keine Hinweise darauf, dass der BaeR-ESR-Signalweg einen Einfluss auf die bakterielle Pathogenität hat (Leblanc *et al.*, 2011).

#### 1.4.5 Der Rcs-ESR-Signalweg

Der Rcs (regulator of capsule synthesis)-ESR-Signalweg besteht u.a. aus zwei Sensor-Kinasen (RcsC und RcsD), die mit der inneren Membran assoziiert sind und dem zytoplasmatischen *response regulator* (RcsB). Viele Parameter der Umgebung, die zu einer Schwächung der Zellhülle führen, aktivieren entweder RcsC und/oder RcsD, die dann eine Phosphorylierung von RcsB katalysieren. Das aktivierte RcsB führt zu Änderungen der Expression zahlreicher Gene und beeinflusst damit die Motilität, Virulenz und Biofilmbildung (Huang *et al.*, 2006; Majdalani und Gottesman, 2005; Majdalani *et al.*, 2005). In *E. coli* wird der Rcs-ESR-Signalweg bei Kontakt zu Serum aktiviert und führt zu einer Serumresistenz (Miajlovic *et al.*, 2014).

Des Weiteren führt eine RcsB Überexpression in *E. coli* zu einer vermehrten Resistenz gegenüber Aminoglykosiden, Cephalosporinen und Gallen Salzen (Erickson und Detweiler, 2006; Farizano *et al.*, 2014; Farris *et al.*, 2010; Hirakawa *et al.*, 2003; Laubacher und Ades, 2008; Wang *et al.*, 2009). In *Y. pseudotuberculosis* wird die Expression des Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) durch den Rcs-ESR-Signalweg positiv beeinflusst. Dabei bindet RcsB direkt an das *virG-lcrF* Operon, das für LcrF kodiert. Das LcrF ist der Regulator der T3SS-Expression (Li *et al.*, 2015). Zudem konnten Li *et al.* zeigen, dass ein aktives RcsB die Fähigkeit von *Y. pseudotuberculosis*, Yops in Wirtszellen zu schleusen, verbessert.



## 1.5 Das RNA Chaperon Hfq

Die oben beschriebenen ESR-Signalwege aktivieren Transkriptionsfaktoren in Form einer Stressantwort. Allerdings sind inzwischen auch post-transkriptionelle Regulatoren wie RNA-bindende Proteine und *small non-coding RNA* bekannt, die einen Einfluss auf die Regulation von ESR-Signalwegen haben (Chao und Vogel, 2016; Grabowicz und Silhavy, 2017; Guo *et al.*, 2014). Ein zentrales regulatorisches RNA-bindendes Protein ist das RNA Chaperon Hfq (Nuss *et al.*, 2017).

Hfq wurde zuerst in *E. coli* als ‚*host factor important for the replication of the RNA phage Q beta*‘ beschrieben (Franze de Fernandez *et al.*, 1968). Es ist ein 11 kDa großes Protein, das Ringe aus Hexameren bildet und RNA bindet (Brennan und Link, 2007). In Enterobacteriaceae stabilisiert Hfq *small RNA* (sRNA) und ist ein wichtiger Co-Faktor für die Interaktion zwischen den meisten sRNA und deren Ziel-*messenger-RNAs* (mRNA), wodurch wiederum eine transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulation von Genen stattfindet, inklusive Pathogenitätsgenen (Chao *et al.*, 2012; Vogel und Luisi, 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Hfq durch Bindung an tRNA eine signifikante Rolle bei der Translation spielt (Lee und Feig, 2008).

Bei der Interaktion zwischen sRNA und mRNA bindet die sRNA komplementär an mRNA und moduliert dadurch die Stabilität der mRNA und auch dessen Translation (Storz *et al.*, 2011; Waters und Storz, 2009). In den meisten Fällen führt die Bindung von Hfq-abhängiger sRNA an mRNA zum Abbau der mRNA oder zumindest zur Inhibierung der Translation (Vogel und Luisi, 2011). In einigen Fällen wurde allerdings beschrieben, dass die Interaktion von Hfq und sRNA zu einer Entfaltung von Sekundärstrukturen der mRNA, die Bindungsstellen des Ribosoms blockieren, führt und dadurch die Translation ermöglicht wird (Fröhlich und Vogel, 2009). Hfq kann daher die Proteinbiosynthese post-transkriptionell entweder fördern oder inhibieren.

Die post-transkriptionelle Kontrolle durch Hfq ist wichtig für Bakterien, um sich schnell an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Daher führt die Deletion des *hfq* Gens in vielen Bakterien zu unterschiedlichen Phänotypen. So wird beispielsweise die Expression von 20% der Gene in *S. enterica* durch die Abwesenheit von Hfq verändert (Ansong *et al.*, 2009; Sittka *et al.*, 2008). Dieser Effekt durch Hfq kann zum einen durch die Wirkung von Hfq auf Regulatoren der Transkription als auch durch die Interaktion zwischen Hfq und zahlreichen mRNAs erklärt werden (Battesti *et al.*, 2011; Chao und Vogel, 2010).

Das konservierte RNA Chaperon Hfq ist entscheidend für die Virulenz vieler Gram-positiver und Gram-negativer pathogener Bakterien (Chao und Vogel, 2010), inklusive *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (Kakoschke *et al.*, 2016; Schiano *et al.*, 2010).

So haben *hfq*-Mutanten in der Regel eine deutlich abgeschwächte Virulenz in Tierversuchen (Chao und Vogel, 2010; Kakoschke *et al.*, 2016). In *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* führt eine Mutation in *hfq* zur Instabilität von mehr als zwölf sRNAs (Beauregard *et al.*, 2013; Koo *et al.*, 2011) und zu einer Reduktion der mRNA, deren kodierte Proteine in den Stoffwechsel und in Stressantworten involviert sind (Geng *et al.*, 2009). Es ist bekannt, dass Hfq in allen drei humanpathogenen *Yersinia* Spezies die Stressresistenz erhöht (Geng *et al.*, 2009; Kakoschke *et al.*, 2014; Schiano *et al.*, 2010).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das RNA Chaperon Hfq in *Y. enterocolitica* einen wichtigen Einfluss auf das optimale Wachstum, den Stoffwechsel und das bakterielle Überleben bei Stress hat (Kakoschke *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass *hfq*-negative *Y. enterocolitica* Mutanten langsamer wachsen und die stationäre Wachstumsphase früher erreichen als der Wildtyp. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Kohlenhydrat-, Stickstoff- und Eisen-Stoffwechsel in *Y. enterocolitica* durch Hfq inhibiert wird. Gleichzeitig hat Hfq einen positiven Einfluss auf die Produktion von Urease und einen negativen Einfluss auf die Produktion von Yersiniabactin. Die Urease spielt eine wichtige Rolle für das Überleben von *Y. enterocolitica* bei niedrigem pH (De Koning-Ward und Robins-Browne, 1995) und Yersiniabactin ist als Siderophor entscheidend für eine Infektion in Mäusen (Pelludat *et al.*, 2002). Ferner konnte 2016 gezeigt werden, dass Hfq essentiell für die Virulenz von *Y. enterocolitica* in Mäusen ist und die Produktion von Lipopolysacchariden und vier wichtigen Adhäsinen moduliert (Kakoschke *et al.*, 2016). Hfq inhibiert die Produktion von Ail, OmpX und MyfA post-transkriptionell, führt aber zu einer vermehrten Produktion von Invasin und YadA. Die Studie von Kakoschke *et al.* deutet darauf hin, dass die Regulation durch Hfq entweder direkte post-transkriptionale Effekte auf die mRNA hat oder indirekte Effekte auf regulatorische Gene, die zur Modellierung der Pathogenitätsfaktoren auf der Zelloberfläche beitragen.

Es ist weiterhin bekannt, dass *E. coli*, *Salmonella* und *Vibrio cholera* *hfq*-Mutanten eine konstitutive Aktivierung des RpoE-ESR-Signalweges aufweisen (Ding *et al.*, 2004; Figueroa-Bossi *et al.*, 2006; Guisbert *et al.*, 2007). Vogt *et al.* konnten 2014 zeigen, dass *E. coli* *hfq*-Mutanten eine Aktivierung des RpoE- und des CpxR-ESR-Signalweges aufweisen (Vogt und Raivio, 2014). Eine mögliche Interaktion zwischen dem RNA Chaperon Hfq und ESR-Signalwegen in *Y. enterocolitica* ist bisher nicht untersucht worden.

## 1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Anpassung von Bakterien an wechselnde Umgebungsbedingungen während einer Infektion des Wirtes stellt die Medizin immer wieder vor neue Herausforderungen. Entscheidend für das Verständnis ist es, die Grundprinzipien der Adaptation und die Pathogenitätsmechanismen zu verstehen, um dieses Wissen dann gezielt für die Entwicklung neuer Strategien in Diagnostik, Prävention und Therapie von Infektionskrankungen im klinischen Alltag anzuwenden. Denn für den Verlauf einer Infektion ist nicht nur das immunologische Abwehrpotential des Patienten sondern auch die Infektionsbiologie der Erreger von Bedeutung (Heesemann, 2016).

Die Wahrnehmung wechselnder Umgebungsbedingungen und eine daraus resultierende Anpassung der Pathogenitätsfaktoren wird in vielen Bakterien über sogenannte *envelope stress response* (ESR)-Signalwege vermittelt. In *Y. enterocolitica*, einem Modellorganismus für Gram-negative Erreger, sind mindestens fünf dieser Signalwege bekannt. In dieser Arbeit wurden die beiden ESR-Signalwege CpxR und RpoE näher untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Wachstums von *Y. enterocolitica* unter Einfluss der beiden ESR-Signalwege und die Charakterisierung der Regulation von Virulenz-Adhäsinen und der periplasmatischen Protease DegP. Die beiden ESR-Signalwege wurden durch Überexpression der Gene *cpxR* bzw. *rpoE* simuliert (Carlsson *et al.*, 2007b; Heusipp *et al.*, 2004)

Hierfür wurde unter Überexpression der ESR-abhängigen Gene das Wachstum von *Y. enterocolitica* in zwei Stämmen (JB580v und WA-314) untersucht, wobei die Regulation der vier wichtigen Virulenz-Adhäsine (Ail, OmpX, Invasin, YadA) und die Regulation der periplasmatischen Protease DegP im Fokus standen. Hierfür wurde die Expression der Gene für die Adhäsine und die Protease mit Hilfe translationaler *gfp*-Fusionen (*green fluorescent protein*-Gen) unter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* (*pB-cpxR*, *pB-rpoE*) getestet. In einem weiteren Ansatz wurde die Protein-Produktion der vier Adhäsine und der Protease DegP unter Überexpression der beiden ESR-abhängigen Gene in Immunoblot-Experimenten quantifiziert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Interaktion des CpxR- und RpoE-ESR-Signalweges in *Y. enterocolitica* aufzudecken und zu beschreiben. Dafür wurden translationale Fusionen zwischen ESR-abhängigen Genen und *gfp* (*cpxR*'-`*gfp*, *ppiA*'-`*gfp*, *rpoE*'-`*gfp*, *fkp*'-`*gfp*) sowie die Plasmide mit induzierbarem Promotor vor ESR-zugehörigen Genen (*pB-cpxR* und *pB-rpoE*) verwendet, um die Interaktion zwischen diesen beiden Signalwegen zu charakterisieren.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich außerdem seit einigen Jahren mit dem RNA Chaperon Hfq und dessen Einfluss auf Wachstum, Stoffwechsel und Pathogenitätsfaktoren

in *Y. enterocolitica*. Um die Rolle von Hfq auf die Expression (Transkription und Translation) von ESR-abhängigen Genen zu untersuchen, wurden im dritten Teil dieser Arbeit translationale Fusionen aus ESR-regulierten Genen und *gfp* (*cpxR*'-`*gfp*, *ppiA*'-`*gfp*, *rpoE*'-`*gfp*, *fkpA*'-`*gfp*, *degP*'-`*gfp*) im Wildtyp *Y. enterocolitica* Stamm JB580v und im *hfq*-negativen Stamm SOR17 vergleichend untersucht.

Zur genaueren Charakterisierung der Rolle von Hfq in der Regulation der ESR-Signalwege CpxR und RpoE wurde Gesamt-RNA aus *Y. enterocolitica* Stamm JB580v und dem *hfq*-negativen Stamm SOR17 isoliert und mittels quantitativer PCR die Transkription der Gene untersucht.

Darüber hinaus wurden die regulatorischen Gene von drei weiteren ESR-Signalwegen (*baeR*, *rcsB*, *pspA*) auf deren Regulation durch Hfq mittels quantitativer-PCR untersucht.

Diese Arbeit soll ein besseres Verständnis zur Rolle der bakteriellen ESR-Signalwege für Anpassungsmechanismen von *Y. enterocolitica* und deren Zusammenspiel mit dem RNA Chaperon Hfq ermöglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können eine attraktive Grundlage für die Entwicklung neuer antimikrobieller Strategien bilden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tab. 1** Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Agarose Gel Dokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad (GER)
Analysenwaagen	Typ 1801 Typ 440-33, Typ 2500-2	Satorius (GER) Kern (GER)
Automatisches Elektrophorese System	Experion	Bio-Rad (GER)
Blotting-Gerät	Semi-Dry Blotter	Roth (GER)
Brutschrank	Typ B20	Heraeus (GER)
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD (GER)
Elektrophoresekammer <ul style="list-style-type: none"> <li>• für DNA</li> <li>• für Proteine (PAGE)</li> </ul>	Easy Cast, Typ B1A, B1, B2 Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Owl (USA) Bio-Rad (GER)
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	Bio-Rad (GER)
Gel Imaging System	ChemiDoc™	Bio-Rad (GER)
Heizblock	TR-L 288	Liebisch (GER)
(Tief-) Kühlschranks <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4°C</li> <li>• -20°C</li> <li>• -80°C</li> </ul>	Profi Line Profi Line Ultima II	Liebherr (CH) Liebherr (CH) Revco Technologies (USA)
Magnetrührer	RTC Basic	Ika Labortechnik (GER)
Nano-Drop Spektrophotometer	ND-1000	Peqlab (GER)
PCR Thermocycler	T3 Thermocycler	Biometra (GER)
pH-Meter	Typ SG2	Mettler-Toledo (CH)
Pipetten	Pipetman 2µl, 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl  0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-1000 µl	Gilson (GER)  Eppendorf (GER)

Gerät	Modell	Firma
Platformschüttler	Duomax 1030 T	Heidolph (GER)
qPCR Thermocycler	LightCycler ® 96	Roche (GER)
Schüttelinkubator	Multitron Pro	Infors HT (CH)
Spektrophotometer	Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences (GB)
Sterilwerkbank	Herasafe HS12	Heraeus (GER)
Thermoblock	TR-L 288	Liebisch (GER)
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf (GER)
Transformator	Power Pac 300 Power Pac 1000	Bio-Rad (GER)
Vortex	Typ G-560E	Scientific Industries (USA)
Wasserbad	Typ W350t	Memmert (GER)
Zentrifugen <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tischzentrifugen</li> <li>• Kühlzentrifugen</li> </ul>	Typ 100VAC Typ 5417R, 5417C Typ 3-30K Super T21 Evolution RC	Roth (GER) Eppendorf (GER) Sigma (GER) Sorvall (GER)

Neben den, in Tab. 1 aufgelisteten Geräten, wurden Laborstandardgeräte eingesetzt.

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2** Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Firma
0.22µm-Filter (steril)	Merck (GER)
FACS Röhrchen (5 ml)	Falcon (USA)
Glaspipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50ml)	Hirschmann (GER)
Kryoröhrchen (1ml)	Nalgene (USA)
Küvetten für Elektroporation	Bio-Rad (GER)
Küvetten für Spektrophotometer (1,5 ml)	Brand (GER)
Mini-PROTEAN® Protein Gel (4-15%)	Bio-Rad (GER)
PCR - Platten (96-Well, clear)	Roche (GER)
PCR Reaktionsgefäße (0,2ml)	VWR (USA)
Petrischalen	Greiner bio-one (GER)

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Pipettenspitzen <ul style="list-style-type: none"> <li>• Weiß (0,5 – 20 µl)</li> <li>• Gelb (2 – 200 µl)</li> <li>• Blau (50 -1000 µl)</li> </ul>	Brand (GER)
PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße)	Roth (GER)
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Eppendorf (GER)
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	BD Biosciences (USA)
stdSens RNA Chips für Experion	Bio-Rad (GER)
Sterile Plastik Reaktionsgefäße (14 ml)	Labcon (USA)
Whatman® PROTRAN Transfer Membran	Schleicher & Schuell (GER)

Neben den, in Tab. 2 aufgelisteten Verbrauchsmaterialien, wurden Standardverbrauchsmaterialien eingesetzt.

### 2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

**Tab. 3** Verwendete Chemikalien und Biochemikalien.

<b>Chemikalien und Biochemikalien</b>	<b>Firma</b>
6-Amino-n-Caprinsäure	Sigma-Aldrich (USA)
Acrylamid	Serva (GER)
Agarose	Invitrogen (GER)
Ampicillin	Roth (GER)
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth (GER)
Bacto Agar	BD Biosciences (USA)
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich (USA)
Carbenicillin	Roth (GER)
Coomassie	Merck (GER)
dNTPs	Thermo Scientific (USA)
Dream Taq Polymerase	Thermo Scientific (USA)
EDTA	Roth (GER)
Essigsäure	Roth (GER)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (USA)
FACSflow, FACSclean, FACSshutdown	BD Biosciences (USA)
FastStart Essential DNA Green Master	Roche (GER)
Glukose	Roth (GER)
Glycin	BD Biosciences (USA)
Glyzerin	Roth (GER)

<b>Chemikalien und Biochemikalien</b>	<b>Firma</b>
Hefeextrakt	MP Biomedicals (GER)
High Fidelity Taq Polymerase	Thermo Scientific (USA)
Immobilon Chemiluminescent HRP Substrat	Millipore (USA)
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Roth (GER)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (GER)
Kanamycin	Roth (GER)
L(+)-Arabinose	Roth (GER)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth (GER)
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth (GER)
Mercaptoethanol	OLS Omni Life Science (GER)
Methanol	Roth (GER)
Milchpulver	Sigma-Aldrich (CH)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (GER)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (GER)
O'GeneRuler 1kb DNA-Leiter	Thermo Scientific (USA)
O'GeneRuler DNA-Leiter (Low Range)	Thermo Scientific (USA)
Orange Lauf Puffer (6x)	Thermo Scientific (USA)
PBS (Phosphat-gepufferte Salz-Lösung) Tabletten	Sigma-Aldrich (USA)
Red Taq Polymerase	VWR (USA)
Restriktionsenzyme	Thermo Scientific (USA)
RNase-freies Wasser	Thermo Scientific (USA)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva (GER)
Spectinomycin	Sigma-Aldrich (GER)
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific (USA)
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Biomol (GER)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	MP (USA)
tRNA	Roche (GER)
Trypton	Roth (GER)
Tween pure	Serva (GER)
X- $\beta$ -Gal	Roth (GER)



## 2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

Tab. 4 Rezepte der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen.

Puffer, Medien und Lösungen	Rezept	
1% Agarose Gel	1 g 100 ml	Agarose TAE Puffer
10% Glyzerol	100 ml	Glyzerol ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
20% L(+)-Arabinose	8 g 40 ml	L(+)-Arabinose H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Anoden Puffer I	36,3 g 100 ml	TRIS Methanol ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> und pH 10,4 (mit HCl)
Anoden Puffer II	3 g 100 ml	TRIS Methanol ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> und pH 10,4 (mit HCl)
Blocking-Lösung (5% Milch)	5 g 100 ml	Milchpulver PBS-T
Kathoden Puffer	3 g 5,2 g 100 ml	TRIS 6-Amino-n-Caprinsäure Methanol ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> und pH 9,4 (mit HCl)
Laemmli-Puffer (2x)	5 ml 8 ml 4 ml 2 ml 1 ml	TRIS-Cl (pH 6,8) SDS Glyzerol Mercaptoethanol 0,02g Bromphenol Blau in 1 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
LB-1,5%-Agar	6 g 400 ml	Bacto agar LB-Medium
LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	10 g 5 g 5 g 1 ml	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid Natriumhydroxid ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
LB-Medium mit 30% Glyzerol (Einfriermedium)	30 ml 70 ml	Glyzerol LB-Medium

Puffer, Medien und Lösungen	Rezept	
PBS-Lösung (Phosphatgepufferte Salzlösung)	1 Tablette 200 ml	PBS Sigma P4417 H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
PBS-Tween (PBS-T)	1 ml	Tween ad 1000 ml PBS-Lösung
SDS-PAGE Lauf-Puffer (10x)	60 g 289 g 20 g	TRIS Glycin SDS ad 2000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
SOB Medium	20 g 5 g 10 ml 2,5 ml 10 ml	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid Kaliumchlorid Magnesiumchlorid ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
SOC Medium	89 ml 1 ml 10 ml	SOB Medium Magnesiumsulfat Glukose, steril filtriert, nach dem Autoklavieren hinzugefügt
Stripping-Lösung (10x)	9,4 g 50 g	Glycin SDS ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> und pH 2 (mit HCl)
TAE-Puffer (50x)	242 g 57,1 ml 37,2 g	TRIS Essigsäure EDTA ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

### 2.1.5 Antibiotika

Tab. 5 Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Carbenicillin (Carb)	70% Ethanol	10 mg/ml	100 µg/ml ( <i>E.coli</i> und <i>Y.enterocolitica</i> in LB-Flüssigmedium)
			300 µg/ml ( <i>Y.enterocolitica</i> auf LB-Festmedium)
Spectinomycin (Spec)	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	10 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	5 mg/ml	50 µg/ml

## 2.1.6 Antikörper für Immunoblots

**Tab. 6** Liste der verwendeten Primärantikörper und ihre Verdünnung in PBS-T.

Primärantikörper	Herkunft	Proteingröße	Verdünnung	Quelle
Invasin	Kaninchen	ca. 100 kDa	1:5000	Kakoschke <i>et al.</i> , 2016
Ail	Maus	ca. 15 kDa	1:5000	Bliska und Falkow, 1992
OmpX	Kaninchen	ca. 15 kDa	1:5000	Arnold <i>et al.</i> , 2007
DegP	Meerschwein	49 kDa	1:2000	Grosskinsky <i>et al.</i> , 2007
YadA	Maus	>150 kDa	1:5000	Roggenkamp <i>et al.</i> , 1995

**Tab. 7** Liste der verwendeten Sekundärantikörper und ihre Verdünnung in PBS-T.

Sekundärantikörper	Herkunft	Verdünnung	Quelle
Meerschwein	Ziege	1:20.000	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Maus	Schaf	1:20.000	GE Healthcare (UK)
Kaninchen	Esel	1:20.000	GE Healthcare (UK)

## 2.1.7 Kits

**Tab. 8** Liste der verwendeten Kits. Die Kits wurden immer nach Hersteller-Angaben verwendet.

Kit	Hersteller
GeneJET Genomic DNA Purification Kit (#K0721)	Thermo Scientific (USA)
Plasmid DNA Midi Kit (#12143)	Qiagen (GER)
High Pure Plasmid Isolation Kit (Mini Prep) (#11 754 785 001)	Roche (GER)
GeneJET PCR Purification Kit (#K0702)	Thermo Scientific (USA)
Maxima First Strand cDNA Synthese Kit (#K1652)	Thermo Scientific (USA)

Kit	Hersteller
RNAprotect Bacteria Reagent (#76506) miRNeasy Mini Kit (#217004) QIAzol Lysis Reagent (#436178564)	Qiagen (GER)

### 2.1.8 Software

Für die statistische Auswertung sowie für das Erstellen von Abbildungen wurde das Programm GraphPad Prism 5 (Version 5.01) verwendet.

SeqBuilder und EditSeq von DNASTAR Lasergene (Version 8.1.4(7)) wurden zum Primer-Design und zur Überprüfung von Sequenzierungen verwendet.

Image Lab (Version 5.2.1) von Bio-Rad wurde verwendet, um die Protein-Banden der SDS-Polyacrylamid-Gele und die Banden der Immunoblots zu quantifizieren.

Das Programm FACS Diva Software (Version 6.1.2.) von BD wurde verwendet, um Durchflussszytometrie-Daten auszuwerten.

Das Programm LightCycler® 96 SW (Version 1.1) von Roche wurde zur Auswertung der Rohdaten der quantitativen PCR verwendet.

### 2.1.9 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

#### 2.1.9.1 Bakterienstämme

**Tab. 9** Verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) Stämme.

Organismus	Stamm	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>	DH5α	Wildtyp	Invitrogen (GER)
<i>Y. enterocolitica</i>	JB580v	Derivat des klinischen Isolates 8081, (R <sup>-</sup> M <sup>+</sup> ), Serotyp O:8, Biogruppe 1B, pYV <sub>8081</sub> Virulenzplasmid	Kinder <i>et al.</i> , 1993
<i>Y. enterocolitica</i>	SOR17	JB580v Derivat mit einer Deletion in <i>hfq</i> , alleler Austausch mit einer Kanamycin-Kassette (Km <sup>R</sup> ), <i>hfq::kan</i>	Kakoschke <i>et al.</i> , 2014

Organismus	Stamm	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<i>Y. enterocolitica</i>	WA-314	Klinisches Isolat des Serotyps O:8, Biogruppe 1B, pYV <sub>O8</sub> Virulenzplasmid	Heesemann <i>et al.</i> , 1983

### 2.1.9.2 Plasmide

Tab. 10 Verwendete Plasmide.

Plasmid	Eigenschaft	Resistenz	Referenz
pBAD24	Replikationsursprung pBR, durch Arabinose induzierbarer Promotor, genutzt zur gezielten Expression von Genen	Carbenicillin (Carb <sup>R</sup> )	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pFX-P	Replikationsursprung RSF1010, <i>gfp</i> Gen ohne Startcodon, genutzt für die Klonierung translationaler Gen-Fusionen mit <i>gfp</i>	Spectinomycin (Sp <sup>R</sup> )	Schmidtke <i>et al.</i> , 2013
pFX-1	pFX-P Derivat mit <i>gfp</i> unter der Kontrolle eines P <sub>lac</sub> Promotors, Positivkontrolle	Sp <sup>R</sup>	Schmidtke <i>et al.</i> , 2013
pFX-0	pFX-P Derivat mit promotorlosem <i>gfp</i> , Negativkontrolle	Sp <sup>R</sup>	Schmidtke <i>et al.</i> , 2013

Tab. 11 Rekombinante Plasmide.

Plasmid	Promotor/Gen Fusion	Beschreibung	Referenz
pB- <i>cpxR</i>	P <sub>BAD</sub> / <i>cpxR</i>	pBAD24 Derivat, <i>cpxR</i> unter Kontrolle des P <sub>BAD</sub> Promotors	diese Arbeit
pB- <i>rpoE</i>	P <sub>BAD</sub> / <i>rpoE</i>	pBAD24 Derivat, <i>rpoE</i> unter Kontrolle des P <sub>BAD</sub> Promotors	diese Arbeit
pFX- <i>rpoE</i>	P <sub>rpoE</sub> / <i>rpoE</i> '-' <i>gfp</i>	pFX-P Derivat, 229 bp vor dem Startcodon von <i>rpoE</i> und 12 Codons von <i>rpoE</i> mit <i>gfp</i> ligiert	diese Arbeit
pFX- <i>fkpA</i>	P <sub>fkpA</sub> / <i>fkpA</i> '-' <i>gfp</i>	pFX-P Derivat, 209 bp vor dem Startcodon von <i>fkpA</i> und 22 Codons von <i>fkpA</i> mit <i>gfp</i> ligiert	diese Arbeit
pFX- <i>degP</i>	P <sub>degP</sub> / <i>degP</i> '-' <i>gfp</i>	pFX-P Derivat, 228 bp vor dem Startcodon von <i>degP</i> und 13 Codons von <i>degP</i> mit <i>gfp</i> ligiert	diese Arbeit
pFX- <i>cpxR</i>	P <sub>cpxR</sub> / <i>cpxR</i> '-' <i>gfp</i>	pFX-P Derivat, 184 bp vor dem Startcodon von <i>cpxR</i> und 9 Codons von <i>cpxR</i> mit <i>gfp</i> ligiert	diese Arbeit
pFX- <i>ppiA</i>	P <sub>ppiA</sub> / <i>ppiA</i> '-' <i>gfp</i>	pFX-P Derivat, 361 bp vor dem Startcodon von <i>ppiA</i> und 11 Codons von <i>ppiA</i> mit <i>gfp</i> ligiert	diese Arbeit

Plasmid	Promotor/Gen Fusion	Beschreibung	Referenz
pFX-ompX	P <sub>ompX</sub> /ompX '-' gfp	pFX-P Derivat, 402 bp vor dem Startcodon von <i>ompX</i> und 5 Codons von <i>ompX</i> mit <i>gfp</i> ligiert	Kakoschke et al., 2016
pFX-yadA	P <sub>yadA</sub> /yadA '-' gfp	pFX-P Derivat, 686 bp vor dem Startcodon von <i>yadA</i> und 16 Codons von <i>yadA</i> mit <i>gfp</i> ligiert	Nieckarz et al., 2016
pFX-ail	P <sub>ail</sub> /ail '-' gfp	pFX-P Derivat, 380 bp vor dem Startcodon von <i>ail</i> und 9 Codons von <i>ail</i> mit <i>gfp</i> ligiert	Kakoschke et al., 2016
pFX-invA	P <sub>invA</sub> /invA '-' gfp	pFX-P Derivat, 494 bp vor dem Startcodon von <i>invA</i> und 4 Codons von <i>invA</i> mit <i>gfp</i> ligiert	Kakoschke et al., 2016
pFX-rovA	P <sub>rovA</sub> /rovA '-' gfp	pFX-P Derivat, 634 bp vor dem Startcodon von <i>rovA</i> und 6 Codons von <i>rovA</i> mit <i>gfp</i> ligiert	Kakoschke et al., 2016

### 2.1.9.3 Oligonukleotide/Primer

In Tabelle 12 sind die für diese Arbeit verwendeten Primer aufgelistet. Alle Primer wurden von biomers.net (GER) bezogen, in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> bei einer Konzentration von 50 pmol/μl (50 μM) gelöst und bei -20°C gelagert.

**Tab. 12** Verwendete Oligonukleotide/Primer.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
OR48-pBAD-fwd	ATGCCATAGCATT TTTTATCC	Sequenzierung von pBAD
OR49-pBAD-rvs	TTATCAGACCGCTTCTGC	Sequenzierung von pBAD
OR177-pFX-fwd	CCATGCTCAGAAAAGGCTTAACA	Sequenzierung von pFX
OR178-pFX-rvs	CCGTATGTAGCATCACCTTCA	Sequenzierung von pFX
OR133-cpxR-fwd	GCGCAACCATGGATAAAATCCTA TTAG	Amplifizierung von <i>cpxR</i> mit Einführung einer <i>NcoI</i> Schnittstelle, für Klonierung in pBAD24, PCR-Produkt hat 797bp mit OR134
OR134-cpxR-rvs	AATCAAGCTTTGGTACCATCAACA C	Amplifizierung von <i>cpxR</i> mit Einführung einer <i>HindIII</i> Schnittstelle, für Klonierung in pBAD24, PCR-Produkt hat 797bp mit OR133
OR141-rpoE-fwd	TCTTCCATGGGCGAGCAGTT	Amplifizierung von <i>rpoE</i> mit Einführung einer <i>NcoI</i> Schnittstelle, für Klonierung in pBAD24, PCR-Produkt hat 635bp mit OR142

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
OR142-rpoE-rvs	TCGGCAGCGGAAAGCTTTTC	Amplifizierung von <i>rpoE</i> mit Einführung einer <i>HindIII</i> Schnittstelle, für Klonierung in pBAD24, PCR-Produkt hat 635bp mit OR141
OR170-rpoE-rvs	TTTGGTCTCTTAGCTTCAACCAG CATCTGATCCGT	Amplifizierung von <i>rpoE</i> , für Klonierungen in pFX-P, PCR-Produkt hat 265bp mit OR169
OR171-ppiA-fwd	TTTGGTCTCTATTCCGGTTTTTCAT ATTTGGCCTCCA	Amplifizierung von <i>ppiA</i> , für Klonierungen in pFX-P, PCR-Produkt hat 394bp mit OR172
OR172-ppiA-rvs	TTTGGTCTCTTAGCTGCAATGAA GGTCACTAAAGT	Amplifizierung von <i>ppiA</i> , für Klonierungen in pFX-P, PCR-Produkt hat 394bp mit OR171
OR173-fkpA-fwd	TTTGGTCTCTATTCCGGAGGGTT GATTCTACCTGT	Amplifizierung von <i>fkpA</i> , für Klonierungen in pFX-P, PCR-Produkt hat 273bp mit OR174
OR174-fkpA-rvs	TTTGGTCTCTTAGCTGCAGAGG TATTCAGGGTCAG	Amplifizierung von <i>fkpA</i> , für Klonierungen in pFX-P, PCR-Produkt hat 273bp mit OR173
OR175-degP-fwd	TTTGGTCTCTATTCTCTGATTAT TGGTTCTCTGA	Amplifizierung von <i>degP</i> , für Klonierungen in pFX-P, PCR-Produkt hat 265bp mit OR176
OR176-degP-rvs	TTTGGTCTCTTAGCCAATGCCAA TGCACTTAACAC	Amplifizierung von <i>degP</i> , für Klonierungen in pFX-P, PCR-Produkt hat 265bp mit OR175
OR203-cpxR-fwd	TTTGGTCTCTATTCTTAACTCCT GGGTTTTATCTG	Amplifizierung von <i>cpxR</i> , für Klonierungen in pFX-P, PCR-Produkt hat 211bp mit OR168
OR168-cpxR-rvs	TTTGGTCTCTTAGCATCATCAAC TAATAGGATTTT	Amplifizierung von <i>cpxR</i> , für Klonierungen in pFX-P, PCR-Produkt hat 211bp mit OR203
OR187-16S-fwd	CCCCCTGGACAAAGACTGAC	Amplifizierung von <i>16S</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 111bp mit OR188
OR188-16S-rvs	TCAAGGGCACAACCTCCAAG	Amplifizierung von <i>16S</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 111bp mit OR187
OR69-gyrB-fwd	CCCCAGAGTTCAGGAACGAC	Amplifizierung von <i>gyrB</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 89bp mit OR70
OR70-gyrB-rvs	GAGCTTCCAGACGTTACCA	Amplifizierung von <i>gyrB</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 89bp mit OR69
OR121-rpoE-fwd	TGAACGGGTCCAGAAAGGTG	Amplifizierung von <i>rpoE</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 76bp mit OR122
OR122-rpoE-rvs	GAGGCTCGCAACCTTATGCT	Amplifizierung von <i>rpoE</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 76bp mit OR121
OR156-fkpA-fwd	GCCTGGGACACCAGATTCTC	Amplifizierung von <i>fkpA</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 115bp mit OR157

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
OR157-fkpA-rvs	TCTTGATGGCGTTATCCCCG	Amplifizierung von <i>fkpA</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 115bp mit OR156
OR118-degP-rvs	TACCTGAGCACTTCCCTCCA	Amplifizierung von <i>degP</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 127bp mit OR117
OR97-cpxR-fwd	CAGTTCCAGACCCAGAACCC	Amplifizierung von <i>cpxR</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 78bp mit OR98
OR98-cpxR-rvs	CGTCAACACCACCAAACACC	Amplifizierung von <i>cpxR</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 78bp mit OR97
OR135-cpxA-fwd	CAGGCCCATCATCATCGACA	Amplifizierung von <i>cpxA</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 83bp mit OR136
OR136-cpxA-rvs	GCGTTACTCCCACCATCACA	Amplifizierung von <i>cpxA</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 83bp mit OR135
OR131-ppiA-fwd	TCTTTATCTGCGGTACGGGC	Amplifizierung von <i>ppiA</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 134bp mit OR132
OR132-ppiA-rvs	TTTATGATTCAGGGCGGGGG	Amplifizierung von <i>ppiA</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 134bp mit OR131
OR123-baeR-fwd	AGCAAGATAATGGCCGGAGG	Amplifizierung von <i>baeR</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 76bp mit OR124
OR124-baeR-rvs	ACAGCACTCAGTGGCTTACC	Amplifizierung von <i>baeR</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 76bp mit OR123
OR109-rcsB-fwd	AGCACGTTGGCATCGAGTTT	Amplifizierung von <i>rscB</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 70bp mit OR110
OR110-rcsB-rvs	ACGTTGTCGGGGAGTTTGAA	Amplifizierung von <i>rscB</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 70bp mit OR109
OR115- <i>pspA</i> -fwd	ACTGGCTTTCCAGCGACTTT	Amplifizierung von <i>pspA</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 109bp mit OR116
OR116- <i>pspA</i> -rvs	CTGGATGAAGCAATGGCACG	Amplifizierung von <i>pspA</i> für qPCR, PCR-Produkt hat 109bp mit OR115

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine bakteriologische Techniken

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *Y. enterocolitica* und *E. coli* erfolgte aerob in LB-Medium bei 27°C (*Y. enterocolitica*) und 37°C (*E. coli*) in einem Schüttelinkubator oder alternativ auf LB-Festmedium in einem Brutschrank über Nacht. Bei Bedarf wurde dem LB-Medium eine entsprechende Antibiotika-Konzentration (siehe Abschnitt 2.1.5, Tab. 5) zugefügt.

#### 2.2.1.2 Photometrische Bestimmung des bakteriellen Wachstums

Zur Bestimmung der Optischen Dichte (OD) der Bakterien in einer Flüssigkeitskultur wurde die Bakterienkultur in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen (OD<sub>600</sub>). Als Leerwert diente LB-Medium, gegebenenfalls mit einem



entsprechenden Antibiotikum versetzt. Um eine bessere Messgenauigkeit zu gewährleisten, wurden Kulturen ab einer  $OD_{600} \geq 0,8$  im Verhältnis 1:10 mit LB-Medium verdünnt.

### **2.2.1.3 Lagerung von Bakterien**

Es wurde 1,5 ml Übernacht-Kultur bei 20.000 xg für 2 Minuten zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde dann in 1,5 ml LB-Medium mit 30% Glycerol resuspendiert und in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Stämme wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.1.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterien**

Eine Übernachtskultur wurde mit 50 ml LB-Medium und gegebenenfalls einer entsprechenden Antibiotika-Konzentration bei  $27^{\circ}\text{C}$  (*Y. enterocolitica*) oder  $37^{\circ}\text{C}$  (*E. coli*) unter Schütteln angesetzt. Diese Kultur wurde am nächsten Morgen in LB-Medium im Verhältnis 1:50 verdünnt und erneut bei  $27^{\circ}\text{C}$  (*Y. enterocolitica*) oder  $37^{\circ}\text{C}$  (*E. coli*) unter Schütteln, bis zu einer  $OD_{600} = 0,3-0,5$ , inkubiert. Eine  $OD_{600} = 0,3$  entspricht etwa  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml. Die Kulturen wurden dann auf Eis abgekühlt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde dann in  $4^{\circ}\text{C}$  gekühlter 10% Glycerol-Lösung suspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Das Bakterien-Pellet wurde dann in ca. 2 ml gekühlter Glycerol-Lösung aufgenommen und zu  $100 \mu\text{l}$  in gekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.1.5 Transformation elektrokompetenter Bakterien**

Die Küvetten für die Transformation wurden auf Eis gekühlt und die elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Den elektrokompetenten Bakterien wurde dann  $1-2 \mu\text{l}$  Plasmid-DNA hinzugefügt und die Suspension für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die elektrokompetenten Bakterien mit der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden dann in die Kammer der Küvette überführt. Das Transformationsgerät wurde auf 2500 V,  $25 \mu\text{F}$  und  $200 \Omega$  eingestellt und es wurde dann für 5 msek transformiert. Unmittelbar nach der Transformation wurde den Bakterien  $900 \mu\text{l}$  SOC-Medium hinzugefügt. Diese Suspension wurde dann bei  $27^{\circ}\text{C}$  (*Y. enterocolitica*) oder  $37^{\circ}\text{C}$  (*E. coli*) unter schütteln für eine Stunde inkubiert.  $200 \mu\text{l}$  der transformierten Kultur wurden auf LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Der Rest der transformierten Kultur ( $800 \mu\text{l}$ ) wurde zentrifugiert und das Pellet dieser restlichen Kultur auf LB-Agar-Platten ausplattiert und bei entsprechender Temperatur über Nacht inkubiert. Eine Selektion wurde durch entsprechende Antibiotika-Konzentrationen in dem LB-Agar-Medium erreicht. Als Kontrolle wurde auch immer der Leervektor transformiert, um die Effizienz der Transformation zu testen und ein Ligations-Ansatz ohne DNA-Insert, um zu testen, dass keine Kontamination in der Probe vorlag. Die Anwesenheit der Plasmid-DNA wurde mittels Kolonie-PCR überprüft.

## **2.2.2 Biochemische und biomolekulare Techniken**

### **2.2.2.1 Reinigung und Lagerung von genomischer DNA**

Genomische DNA wurde mit dem GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Es wurde nach dem empfohlenen Protokoll des Herstellers für Gram-negative Bakterien verfahren. Die gereinigte DNA wurde in 20-100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### **2.2.2.2 Reinigung und Lagerung von Plasmid-DNA**

Das Qiagen® Plasmid Midi Kit (Qiagen) wurde nach Angaben des Herstellers genutzt, um Plasmid-DNA zu isolieren und zu reinigen. Die Plasmid-DNA wurde in 30-80 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Nach einer Klonierung wurde die Plasmid-DNA mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit Mini Prep (Roche) isoliert und gereinigt, um den gewünschten Erfolg einer Transformation zu überprüfen. Auch dieses Kit wurde nach Angaben des Herstellers genutzt. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl Elution-Puffer aufgenommen und sowohl mittels Agarosegelelektrophorese als auch mittels PCR getestet.

### **2.2.2.3 Reinigung und Lagerung von RNA**

Die Isolation der RNA erfolgte aus drei individuellen *Y. enterocolitica*-Kulturen (biologische Triplikate für *Y. enterocolitica* Stamm JB580v und Stamm SOR17, jeweils bei 27°C und 37°C). Hierfür wurden Über-Nacht-Kulturen bei 27°C inkubiert und am nächsten Morgen in 50 ml LB-Medium auf eine OD<sub>600</sub>=0,1 verdünnt. Diese Kulturen wurden dann für vier Stunden bei 27°C oder 37°C inkubiert und die Gesamt-RNA isoliert. Die Reinigung der RNA erfolgte mit RNAprotect Bacteria Reagent, dem miRNeasy Mini Kit und QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

### **2.2.2.4 Reverse Transkription von RNA zu cDNA**

Es erfolgte eine reverse Transkription aus jeder RNA-Probe, jeweils in technischen Duplikaten, in cDNA. Hierfür wurde das Maxima First Strand cDNA Synthese Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. Eine Kontrolle ohne Reverse-Transkriptase wurde immer parallel durchgeführt. Die cDNA wurde in RNase-freiem Wasser bei -80°C gelagert und außerdem mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und 100 ng/µl tRNA 1:10 verdünnt und dann bei -20°C gelagert. Die tRNA verhindert, dass cDNA am Plastik der Reaktionsgefäße adhärert und so die Konzentration der cDNA bei längerer Lagerung verfälscht wird.

### 2.2.2.5 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration und –Qualität

Die Konzentrationsbestimmung der genomischen DNA, Plasmid-DNA und RNA erfolgte mittels Nano-Drop Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Für diese Messung wird 1  $\mu\text{l}$  der DNA- bzw. RNA-Probe benötigt. Als Leerwert diente entweder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  oder der Elution-Puffer (je nach Probe).

Eine Verunreinigung der DNA- oder RNA-Probe mit Proteinen wird durch den Quotienten  $\text{OD}^{(260\text{ nm}/280\text{ nm})}$  abgeschätzt und sollte bei DNA  $\approx 1,8\text{-}2,0$  und bei RNA  $\approx 1,8\text{-}2,1$  betragen, um von einer ausreichenden Qualität auszugehen. Der Quotient  $\text{OD}^{(260\text{ nm}/230\text{ nm})}$  indiziert eine mögliche andere Kontamination (z.B. durch Phenol) bei einer Wellenlänge von 230 nm und sollte  $\geq 1,7$  sein.

Die Qualität und Unversehrtheit der RNA wurde zusätzlich mit dem Experion Automatischen Elektrophorese System, stdSens RNA Chips und den benötigten Reagenzien von Bio-Rad getestet. Die Messung der verwendeten RNA-Proben ergab einen RQI (RNA Qualitätsindikator) zwischen 8,7 und 9,5. Der RQI hat eine Skala von 1-10, wobei ein RQI von 1 eine zersetzte RNA anzeigt und ein RQI von 10 für eine hohe Qualität und eine intakte RNA spricht.

## 2.2.3 Genetische Techniken

### 2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren, um in kurzer Zeit spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Die dafür eingesetzten Primer wurden von der Firma biomers.net (GER) synthetisiert. Als Template für die PCR diente entweder genomische DNA oder Plasmid-DNA. Für Klonierungen wurde grundsätzlich die High Fidelity Taq Polymerase (Thermo Scientific) eingesetzt. Die DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific) wurde verwendet, um neue Primer zu testen. Die verwendeten Reaktionsansätze und Programme sind in Tab. 13 und Tab. 14 dargestellt. Die Temperatur der Primerhybridisierung wurde anhand der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer festgelegt und betrug in der Regel ( $T_m - 5^\circ\text{C}$ ). Die  $T_m$  der Primer wurde von dem Hersteller biomers.net angegeben. Die Spezifität der Primer wurde mit genomischer DNA getestet. Hierfür wurden vier Ansätze getestet. In einem war sowohl der 5' Primer als auch der 3' Primer und in den zwei anderen Ansätzen jeweils nur einer der beiden Primer. Im vierten Ansatz waren beide Primer aber kein Template, so dass hier eine Primer-Dimer Bildung ausgeschlossen wurde.

**Tab. 13** Reaktionsansatz und das verwendete Programm von High Fidelity Taq Polymerase.

Reaktionsansatz			
1 µl	genomische DNA (0,1-1,0 µg)		
1 µl	5' Primer (50 pmol/µl)		
1 µl	3' Primer (50 pmol/µl)		
0,25 µl	High Fidelity Taq Polymerase		
5 µl	High Fidelity Puffer (10x)		
5 µl	dNTPs (jedes 2nM)		
36,75 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>		
50 µl	Gesamtvolumen		
Reaktionsprogramm			
	Initiale Denaturierung	94°C	3:00 min
30 Zyklen	• Denaturierung	94°C	0:30 min
	• Primerhybridisierung	T <sub>m</sub> – 5°C	0:30 min
	• Elongation	72°C	1:00 min
	Finale Elongation	72°C	10:00 min

**Tab. 14** Reaktionsansatz und das verwendete Programm von DreamTaq DNA Polymerase.

Reaktionsansatz			
1 µl	genomische DNA (0,1-1,0 µg) oder Plasmid-DNA (0,01-1,0 ng)		
1 µl	5' Primer (50 pmol/µl)		
1 µl	3' Primer (50 pmol/µl)		
0,25 µl	DreamTaq Polymerase		
5 µl	DreamTaq Puffer (10x)		
5 µl	dNTPs (jedes 2nM)		
36,75 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>		
50 µl	Gesamtvolumen		
Reaktionsprogramm			
	Initiale Denaturierung	95°C	3:00 min
30 Zyklen	• Denaturierung	95°C	0:30 min
	• Primerhybridisierung	T <sub>m</sub> – 5°C	0:30 min
	• Elongation	72°C	1:00 min
	Finale Elongation	72°C	10:00 min

### 2.2.3.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde mit RedTaq Polymerase (vWR) durchgeführt, um nach einer Transformation viele Klone testen zu können. Dafür wurde ein Master Mix mit dem in Tab. 15 beschriebenen Reaktionsansatz hergestellt. Eine Bakterienkolonie wurde ausgestrichen und bei 27°C (*Y. enterocolitica*) oder 37°C (*E. coli*) im Brutschrank inkubiert. Die Bakterien einer Kolonie wurden in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> suspendiert und für 10 Minuten bei 95°C gekocht. 1 µl dieser Suspension wurde als Matrize für die Kolonie-PCR verwendet. Von den positiv getesteten

Stämmen wurden im Anschluss Plasmid-DNA Präparationen hergestellt und erneut mittels PCR und Agarosegelelektrophorese getestet.

**Tab. 15** Reaktionsansatz und das verwendete Programm von Red Taq Polymerase.

Reaktionsansatz			
1 µl	Suspension aus einer gekochten Bakterien-Kolonie		
1 µl	5' Primer (50 pmol/µl)		
1 µl	3' Primer (50 pmol/µl)		
25 µl	RedTaq Master Mix (2x)		
22 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>		
50 µl	Gesamtvolumen		
Reaktionsprogramm			
	Initiale Denaturierung	95°C	2:00 min
30 Zyklen	• Denaturierung	95°C	0:30 min
	• Primerhybridisierung	T <sub>m</sub> – 5°C	0:30 min
	• Elongation	72°C	1:00 min
	Finale Elongation	72°C	10:00 min

#### 2.2.4 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach ihrem Molekulargewicht mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Je nach Größe des DNA-Fragmentes wurden 0,8 - 2,0% Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Die zu testenden DNA-Fragmente wurden mit 1 µl Orange Lauf-Puffer (6x) (Thermo Scientific) und H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gemischt und dann zu 1-2 µl in die Gelkammern pipettiert. Je nach zu erwartender DNA-Fragmentgröße wurde die O'GeneRuler DNA-Leiter Low Range (Thermo Scientific) oder die O'GeneRuler 1kb DNA-Leiter (Thermo Scientific) als Größenstandard eingesetzt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelelektrophoresekammern bei konstanten 7 Volt/cm durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gele für 15 Minuten im Ethidiumbromid-Bad gefärbt (1 µg Ethidiumbromid pro ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) und dann für 5 Minuten in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Die Detektion der DNA-Fragment-Banden und die Dokumentation der Gele erfolgte in einem UV-Transluminator bei 254 nm Wellenlänge (GelDoc EQ, Bio-Rad).

#### 2.2.5 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden dann in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> eluiert und bei 4°C oder -20°C gelagert.

## 2.2.6 Enzymatische Modifikation von DNA

### 2.2.6.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen/Restriktionsenzyme sind Enzyme, die an definierten Sequenzen zu einer Spaltung von DNA führen. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme spalten eine Palindromsequenz und führen zu „sticky ends“, die durch eine Ligation mit anderen Fragmenten verbunden werden können. Die für diese Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tab. 16 aufgeführt. Die Spaltung der DNA erfolgte Reaktionsansätzen von 20 µl und 60 µl bei 37°C für 3 Stunden. Die Reaktionsansätze sind in Tab. 17 dargestellt. Nach jedem DNA-Verdau wurde der Reaktionsansatz mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Erfolg eines DNA-Verdau wurde mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert und die Konzentration der verdauten und gereinigten DNA mit dem Nano-Drop bestimmt. Die verdauten DNA-Fragmente wurden dann für die Ligation verwendet.

**Tab. 16** Liste der verwendeten Restriktionsenzyme und empfohlener Puffer.

Restriktionsenzym	Schnittstelle	Puffer	Hersteller
NcoI	5'...CCATGG...3' 3'...GGTACC...5'	Tango	New England Biolabs (GER)
HindIII	5'...AAGCTT...3' 3'...TTCGAA...5'	Red	New England Biolabs (GER)

**Tab. 17** Reaktionsansatz für den Plasmid-DNA-Verdau und den Insert-DNA-Verdau.

Reaktionsansatz für Plasmid-DNA		Reaktionsansatz für Insert-DNA	
2 µl	Restriktionsenzym-Puffer (10x)	6 µl	Restriktionsenzym-Puffer (10x)
1 µl	Restriktionsenzym	1 µl	Restriktionsenzym
14 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	5 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
3 µl	DNA (≈ 2 µg Plasmid-DNA)	48 µl	aufgereinigte DNA nach PCR
20 µl	Gesamtvolumen	60 µl	Gesamtvolumen

### 2.2.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die bei einem Restriktionsverdau entstandenen „sticky ends“ der DNA-Fragmente und der Plasmid-DNA werden bei einer Ligation mit T4-DNA-Ligase miteinander verbunden, so dass ein neues DNA-Produkt aus Insert-DNA und Plasmid-DNA entsteht. Die Ligase verbindet unter ATP-Verbrauch die Phosphodiesterbindung zwischen den DNA-Fragmenten. Für den Ligations-Ansatz wurde grundsätzlich die dreifache Menge an Insert-DNA zu Plasmid-DNA verwendet. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 18 dargestellt. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht und wurde am nächsten Tag in *E.coli* transformiert (Abschnitt 2.2.1.5). Parallel wurde immer eine Ligations-Kontrolle ohne Insert-DNA durchgeführt. Die Plasmide wurden aus

*E. coli* isoliert und gereinigt (Abschnitt 2.2.2.2) und hinsichtlich der Plasmid-Präsens und korrekter Insertion (DNA-Sequenzierung und PCR) überprüft. Korrekt ligierte Plasmide wurden in *Y. enterocolitica* transformiert.

**Tab. 18** Reaktionsansatz für die Ligation.

Reaktionsansatz	
2 µl	Ligase-Puffer (10x)
1 µl	T4 DNA Ligase (1:10 verdünnt in Ligase-Puffer (1x))
x µl	Plasmid-DNA (≈ 50 ng/µl)
x µl	Insert-DNA (≈ 150 ng/µl)
bis 20 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
20 µl	Gesamtvolumen

### 2.2.6.3 „Golden Gate“ Klonierungen

Die „Golden Gate“ Klonierungs-Methode wurde angewendet, um translationale Fusionen mit einem grün fluoreszierenden Protein (*green fluorescent protein*, GFP) in dem pFX-P Plasmid zu generieren (Engler *et al.*, 2008; Schmidtke *et al.*, 2013). Hierfür wurden DNA-Fragmente eines Gens mittels PCR amplifiziert. Diese DNA Fragmente beinhalten den Promotor des jeweiligen Gens, einen Teil der 5'-UTR (5' *untranslated region*, nicht-translationierte Region) und die ersten 4-22 Kodons des Gens. Es wurden mindestens 180 Basenpaare vor dem Start-Kodon des Gens miteinbezogen. Die verwendeten Primer für diese Klonierungen sind in Tab. 12 aufgelistet und enthalten alle eine Schnittstelle für die *Bsa*I Restriktionsendonuklease sowie eine zusätzlich konstruierte Sequenz die generiert wurde, um mit dem *Bsa*I-verdauten pFX-P kompatibel zu sein. *Bsa*I ist eine sogenannte Typ IIs Restriktionsendonuklease, das bedeutet, dass sie außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneidet und so kein Palindrom-Überhang entsteht. Korrekt ligierte Produkte können so nicht mehr von *Bsa*I erkannt werden und sind irreversibel verbunden.

Durch diesen Mechanismus kann bei der „Golden Gate“ Klonierungs-Methode der Verdau und die Ligation in einem Ansatz gleichzeitig ablaufen. Der verwendete Reaktionsansatz ist in Tab. 19 dargestellt. Es wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Darauf folgten 5 Minuten bei 50°C (Rest-Verdau, während die Ligase inaktiviert wird) und 5 Minuten bei 80°C (Inaktivierung von *Bsa*I). Es wurden dann 3 µl des Reaktionsansatzes in *E. coli* transformiert.

Nach der Transformation wurden die Bakterien eine Stunde in SOC-Medium bei 37°C (*E. coli*) unter Schütteln inkubiert. Die Kulturen wurden dann auf LB-Agar-Platten mit Spectinomycin, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und dem kolorimetrischen Substrat der β-Galaktosidase (X-β-Gal) ausplattiert und inkubiert. Bakterien, die nicht

transformiert wurden und nicht das Plasmid tragen, werden durch Spectinomycin am Wachstum gehindert. Das IPTG induziert den *lac*-Promotor und damit die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase, die dann wiederum das Galaktosid X- $\beta$ -Gal schneidet. Dabei entsteht ein blauer Farbstoff. X- $\beta$ -Gal dient also der Blau-Weiß-Selektion, da diejenigen Bakterien, die erfolgreich rekombinante Plasmide tragen, keine funktionsfähige Galaktosidase mehr bilden und dadurch weiße Kolonien generieren.

Weißer Kolonien wurden selektiert und mittels PCR und DNA-Sequenzierung getestet. Für die Testung mittels PCR wurde der für das Gen spezifische *Forward*-Primer und OR178 als *Reverse*-Primer verwendet.

**Tab. 19** Reaktionsansatz für „Golden Gate“ Klonierungen.

Reaktionsansatz	
2 $\mu$ l	Ligase-Puffer (10x)
1 $\mu$ l	<i>Bsa</i> I (New England Biolabs (GER))
1 $\mu$ l	T4 DNA Ligase
40 fmol	Plasmid-DNA pFX-P
40 fmol	Insert-DNA
bis 20 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
20 $\mu$ l	Gesamtvolumen

Berechnung der DNA-Konzentration in fmol/ $\mu$ l (Länge von pFX-P: 11.486 Basenpaare)

$$\text{DNA-Konzentration in } \frac{\text{fmol}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{DNA-Konzentration in } \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 1520}{\text{Länge des Plasmids oder Inserts}}$$

### 2.2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen der hergestellten Plasmide wurden von der Firma LGC Genomics durchgeführt. Hierfür wurde die gereinigte Plasmid-DNA (100 ng/ $\mu$ l) benötigt. Es wurden die Standardprimer OR48 und OR49 (siehe Tab. 12) verwendet, um pBAD-Vektoren zu sequenzieren. Die Standardprimer für die Sequenzierung von pFX-Vektoren waren OR177 und OR178 (siehe Tab. 12). 4  $\mu$ l dieser Standardprimer (5 pmol/ $\mu$ l) wurden zusammen mit 10  $\mu$ l Plasmid-DNA eingeschickt.



## 2.2.8 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.8.1 Wachstumskurven und Gesamtzelllysate

Für die Wachstumskurven von *Y. enterocolitica* wurde eine Übernacht-Kultur auf eine  $OD_{600} = 0,1$  verdünnt und dann bei 27°C bzw. 37°C kultiviert. Das Wachstum wurde im Verlauf protokolliert. Die *Y. enterocolitica* Stämme JB580v und WA-314 trugen den Leervektor pBAD24 oder die pBAD-Plasmide mit *envelope stress response* (ESR)-abhängigen Genen nach dem induzierbarem Promotor (pB-*cpxR* oder pB-*rpoE*) (siehe Tab. 11). Es fand eine Induktion mit 0,2% Arabinose sowohl in früher (nach einer Stunde Wachstum) als auch in mittlerer exponentieller Wachstumsphase (nach vier Stunden Wachstum) statt. Das pBAD24 Plasmid enthält den  $P_{BAD}$  Promotor und das Gen für den Arabinose-sensitiven Regulator AraC aus dem Arabinose Operon. Durch Zugabe von Arabinose wird die Transkription der klonierten Gene initiiert (Guzman *et al.*, 1995). Guzman *et al.* konnten zeigen, dass es schon nach wenigen Minuten zu einer signifikanten Zunahme der Transkription und Translation kommt.

Zu jedem Messzeitpunkt der  $OD_{600}$  wurden aus den Kulturen Gesamtzelllysate gewonnen. Für die Herstellung der Gesamtzelllysate wurde 1 ml der Bakterienkultur für 2 Minuten bei 12.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Pellet in Laemmli-Puffer aufgenommen. Das Volumen des benötigten Laemmli-Puffers wurde nach der gemessenen  $OD_{600}$  berechnet und angeglichen. Die Probe wurde dann für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis auf 4°C abgekühlt. Die gewonnenen Proben wurden bei -20°C gelagert.

### 2.2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Für die Gelelektrophorese wurden Mini-PROTEAN® Protein Gele (4-15%) (Bio-Rad) verwendet. Als Größenstandard dienten 5 µl der PageRuler Prestained Protein-Leiter (Fermentas). Die Gelkammern wurden mit SDS-PAGE Lauf-Puffer gefüllt und die Taschen der Gele mit 8 µl Gesamtzelllysate beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 35-45 Minuten bei 180V.

Normalerweise werden Proteine nach der gelelektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamid-Gel durch Färbung, z.B. mit Coomassie-Blau, sichtbar gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine *stain-free* (Färbungs-freie) Technologie verwendet. Hierfür enthalten die Polyacrylamid Mini-PROTEAN® Protein Gele (Bio-Rad) eine Trihalo-Komponente, die an Tryptophan-Reste in Proteinen kovalent bindet, wenn eine Aktivierung mit UV-Licht erfolgt. Die kovalente Bindung zwischen der Trihalo-Komponente und

Tryptophan führt zu Emission von Fluoreszenz, die von dem *stain-free* Gel Imaging System (ChemiDoc) sichtbar gemacht werden kann.

Die Mini-PROTEAN® Protein Gele wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung für 2,5 Minuten mit UV-Licht aktiviert (Gel Imaging System, ChemiDoc) und damit die Proteine sichtbar gemacht. Die Darstellung der Proteine wurde als Ladekontrolle für die Analyse der Immunoblots benötigt.

Der Protein-Transfer und auch die spätere Antikörper-Bindung im Immunoblot werden durch die *stain-free* Technologie nicht beeinflusst. Die *stain-free* Mini-PROTEAN® Protein Gele benötigen keine speziellen Puffer oder Reagenzien und sind mit Standard SDS-PAGE Puffern kompatibel. Die *stain-free* Technologie erlaubt die Normalisierung von Protein-Banden im Immunoblot zum Gesamt-Protein einer Spur im Polyacrylamid-Gel (Ladekontrolle).

### 2.2.8.3 Western-Blot / Immunoblot

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert/geblottet. Dieser Transfer wurde in einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur (Roth) durchgeführt (Elektroblot). Die für den Transfer benötigten Whatman-Paper und die PVDF-Membran wurden vor dem Transfer in den verschiedenen Immunoblot-Puffern äquilibriert. Die Anordnung und Anzahl der Whatman-Paper, der PVDF-Membran sowie des Protein-Gels sind in Tab. 20 dargestellt.

**Tab. 20** Anordnung des Transfer-Stapels für einen Immunoblot.

<b>Kathode</b>	
3x Whatman-Paper	mindestens 30 Sek. in Kathoden Puffer äquilibriert
Protein-Gel	15 Min. in Kathoden Puffer äquilibriert
PVDF-Membran	15 Sek. in Methanol, 2 Min. in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> und 5 Min. in Anode II Puffer äquilibriert
1x Whatman-Paper	mindestens 30 Sek. in Anode II Puffer äquilibriert
2x Whatman-Paper	mindestens 30 Sek. in Anode I Puffer äquilibriert
<b>Anode</b>	

Luftblasen wurden mit einer Glaspipette vorsichtig durch Rollen aus dem Transfer-Stapel entfernt, um einen luftblasenfreien Transfer zu gewährleisten. Der Transfer von vier Gelen erfolgte für eine Stunde bei 346 mA (1,2 mA/cm<sup>2</sup>). Nach dem Transfer wurde das Gel vorsichtig entfernt und im Gel Imaging System fotografiert, um einen korrekten und luftblasenfreien Protein-Transfer zu dokumentieren.

Der Transfer der „geblotteten“ PVDF-Membranen erfolgte mit stumpfen Pinzetten für Waschungen (PBS-T) und Antikörperinkubationen. Die Membranen wurden über Nacht bei

4°C oder eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% Milch mit PBS-T geblockt. Danach wurde die Membran mit PBS-T erneut gewaschen und mit dem Primärantikörper für 1-1,5 Stunden bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Nach erneuten Waschvorgängen mit PBS-T dreimal je 10 Minuten, wurde der Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper hinzugefügt und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Es folgten drei weitere Waschvorgänge je 5 Minuten in PBS-T.

Die Detektion des Proteins erfolgte mit Hilfe des Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrats (Millipore). Hierfür wurden das Luminol-Reagenz und die Peroxid-Lösung zu gleichen Teilen vermischt und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach dem letzten Waschvorgang wurden 2 ml der Detektions-Lösung auf die Membran pipettiert und für 5 Minuten inkubiert. Das Reaktionsprodukt der Detektions-Lösung und des Sekundärantikörpers emittiert Licht, kann im ChemiDoc sichtbar gemacht und später mit Hilfe der Image Lab-Software (BioRad) semiquantifiziert werden (siehe auch Abschnitt 2.2.8.2). Für die statistische Auswertung siehe Abschnitt 2.2.11.

Wurde eine Membran für einen weiteren Proteinnachweis verwendet, wurde sie zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer inkubiert. Danach folgen zwei Waschvorgänge je 10 Minuten in PBS-T. Nach dem Waschvorgang konnte die Membran wieder in 5 % Milch in PBS-T geblockt werden und mit dem bereits beschriebenen Protokoll und einem anderen Antikörper fortgefahren werden. Die statistische Auswertung wird in Kapitel 2.2.11 erläutert.

### **2.2.9 Durchflusszytometrie-Messung der GFP Fluoreszenz von Bakterien**

Bei der Durchflusszytometrie-Messung fließen Zellen mit hoher Geschwindigkeit durch eine Kapillare, wobei ein Laserstrahl zur Bestimmung der Zellgröße durch Lichtstreuung und zur Bestimmung des Zelltyps durch Fluoreszenzanregung verwendet wird. Es wurde das FACS Canto II (BD) verwendet und die FACS Diva Software (BD) zum Auswerten der Ergebnisse. In jeder Probe wurden mindestens 20.000 Ereignisse (i.d.R. ein Ereignis = ein Bakterium) bei niedriger Fluss-Geschwindigkeit ( $\leq 1500$  Ereignisse/Sekunde) aufgezeichnet und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Einzelbakterien ermittelt.

Die Bakterienkonstrukte, die zur Durchflusszytometrie-Messung verwendet wurden, trugen alle Derivate des pFX-P Plasmids mit translationalen *gfp*-Fusionen (siehe Tab. 11). GFP wird von den Bakterien nicht sezerniert und kaum im Zytosol abgebaut.

Für die Versuche wurde steril-filtriertes LB-Medium (Filtergröße 0,22  $\mu\text{m}$ ) verwendet, um die Messgenauigkeit zu verbessern. Die Vorkulturen wurden im Verhältnis 1:20 in steril-filtrierte LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Konzentration verdünnt (i.d.R. 100  $\mu\text{l}$  Vorkultur in 2 ml LB-Medium) und in sterilen Plastik-Reaktionsgefäßen inkubiert.

Für die Versuche mit pBAD-Plasmiden erfolgte die Inkubation für eine Stunde (frühe exponentielle Wachstumsphase) bzw. vier Stunden (mittlere exponentielle Wachstumsphase) bis zur Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors mit 0,2% Arabinose. Nach Zugabe der Arabinose wurde für zwei weitere Stunde inkubiert, bevor die Kulturen in sterilem PBS verdünnt (ca.  $5 \times 10^6$  CFU/ml) und durchflusszytometrisch charakterisiert wurden. Das PBS wurde ebenfalls durch einen 0,22 µm Filter gereinigt, um die Messgenauigkeit zu verbessern (Entfernung von Partikeln > 0,22 µm).

In den Versuchen mit dem *Y. enterocolitica* Wildtyp und der *hfg*-Mutante, wurden die Kulturen für vier Stunden und 24 Stunden inkubiert, bevor sie in PBS verdünnt und durchflusszytometrisch charakterisiert wurden.

Als Negativkontrollen dienten ein Reaktionsgefäß mit steril-filtrierte LB-Medium und ein Reaktionsgefäß mit LB-Medium und entsprechender Antibiotika-Konzentration. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ± Standardabweichung (SD) der Einzelbakterien dargestellt.

#### **2.2.10 Quantitative PCR**

Die quantitative PCR (qPCR) ist eine modifizierte Methode der PCR, um spezifische Nukleinsäure-Sequenzen zu quantifizieren, auch wenn sie nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen (Carding *et al.*, 1992). Die qPCR basiert auf der Annahme, dass die Amplifikation der Ziel-Sequenz proportional zu der anfänglichen Menge der Ziel-Sequenz in der Probe ist. Dafür wird die Amplifikation der Ziel-Sequenz durch Fluoreszenz-Technologie kontinuierlich überwacht. Es wurde SYBR Green als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Das SYBR Green bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA und bildet einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, dessen Fluoreszenzintensität um das 20- bis 100-fache ansteigt, verglichen mit dem Farbstoff-Einzelstrang-DNA-Komplex. Das Ausmaß der Fluoreszenz steigt daher mit der Menge an doppelsträngiger DNA im Verlauf der PCR-Reaktion an. Es wurde Gesamt-RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA überführt, um die RNA des transkribierten Gens zu quantifizieren (siehe Abschnitt 2.2.2.3. und 2.2.2.4.). Die Transkription des Ziel-Gens wurde mit spezifischen Primern im qPCR Lightcycler 96 (Roche) in jedem Zyklus quantifiziert.

##### **2.2.10.1 Primer-Design und Testung der Primer**

Ein entscheidender Aspekt für den Erfolg einer qPCR sind spezifische Primer. Die entworfenen Primer sind spezifisch für ein Gen und wurden mit Hilfe der NCBI-Webseite „Primer-BLAST“ (Primer-BLAST, 2012; Ye *et al.*, 2012) und der Sequenz von *Y. enterocolitica* Stamm 8081 (NC\_008800.1) konstruiert. Voraussetzung für die Konstruktion eines Primer-Paares war die Amplifikation eines kurzen Produktes (< 200 bp).

Zusätzliche Kriterien wurden durch in-silico-Analyse auf den Webseiten „Integrated DNA Technologies“ (PrimerQuest® program, 2012) und „The *mfold* Web Server“ (Mfold Web Server, 2003; Zuker, 2003) getestet:

- Keine Sekundärstrukturen an der Stelle der Primer-Bindung
- 3'-Ende der Primer sollte keine Sekundärstrukturen aufweisen und keine repetitiven Basen-Sequenzen
- Primer-Paare sollten nicht komplementär zueinander sein
- Primer-Paare sollten einen ähnlichen Anteil an GC-Basen enthalten (40-70%)
- Primer-Paare sollten eine ähnliche Primerhybridisierungstemperatur haben

Die Primer (Tab. 12) wurden über [biomers.net](http://biomers.net) bezogen und zunächst bei verschiedenen Konzentrationen (z.B. 62,5 nM, 125 nM, 250 nM) mit genomischer DNA und einer „*no-template*“-Kontrolle auf Qualität der Primer (keine Primer-Dimer) und Spezifität des PCR-Produktes getestet.

Die Effizienz einer PCR-Reaktion mit einem Primer-Paar wurde mit Hilfe einer Standardkurve errechnet. Hierfür wurden Verdünnungs-Serien mit genomischer DNA als Matrize verwendet. Angefangen bei einer DNA Konzentration von 1 ng/μl in Verdünnungs-Schritten von 1:10, wurde jede Verdünnung in technischen Triplikaten gemessen. Die Verdünnung der genomischen DNA erfolgte in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> mit 100 ng/μl tRNA (Roche), um zu verhindern, dass genomische DNA am Plastik der Reaktionsgefäße adhärert und so die Konzentration der verwendeten DNA verfälscht wird. Die Berechnung der Effizienz erfolgt aus der Steigung des Graphen, wenn der Quantifizierungszyklus gegen den Logarithmus der Quantität der Verdünnungsreihe aufgetragen wird. Eine „perfekte“ PCR-Reaktion (100% Effizienz) verdoppelt das PCR-Produkt nach jedem Zyklus. Eine Primer-Effizienz zwischen 90% und 110% ist akzeptabel.

Es wurde eine Schmelzkurven-Analyse am Ende jedes qPCR-Laufes durchgeführt, um die Spezifität der Primer zu testen. Die Schmelzkurven-Analyse erlaubt eine Unterscheidung zwischen der Amplifikation der Ziel-Sequenz und PCR Artefakten wie Primer-Dimeren oder unspezifischen PCR-Produkten.

Der Reaktionsansatz und das Reaktionsprogramm sind in Abschnitt 1.2.10.2. in Tab. 22 dargestellt. Die Primer, deren verwendete Konzentration und die Effizienz sind in Tab. 21 aufgeführt.

**Tab. 21** Verwendete Primer und deren Konzentration, Größe der amplifizierten DNA Sequenz, Effizienz der Primer und der Korrelationskoeffizient ( $R^2$ )

Ziel-Gen	Primer Paar	Verwendete Konzentration der Primer	Größe der amplifizierten DNA Sequenz	Effizienz der Primer *	Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) **
<i>cpxR</i>	OR97/OR98	125 nM	78 bp	0,91	0,98
<i>cpxA</i>	OR135/OR136	62,5 nM	83 bp	0,95	0,98
<i>ppiA</i>	OR131/OR132	50 nM	134 bp	0,91	0,96
<i>rpoE</i>	OR121/OR122	250 nM	76 bp	0,94	1,00
<i>fkpA</i>	OR156/OR157	125 nM	115 bp	0,97	0,98
<i>degP</i>	OR117/OR118	250 nM	127 bp	0,92	0,99
<i>baeR</i>	OR123/OR124	300 nM	76 bp	0,92	0,99
<i>rcsB</i>	OR109/OR110	100 nM	70 bp	0,95	0,99
<i>pspA</i>	OR115/OR116	250 nM	109 bp	0,91	0,99
<i>gyrB</i>	OR69/OR70	62,5 nM	89 bp	0,95	0,98
16S rRNA	OR187/OR188	50 nM	111 bp	1,10	0,94

\* Effizienz ist akzeptabel zwischen 0,90 und 1,10 (entspricht 90% und 110%)

\*\* Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) sollte idealerweise  $\geq 0,98$  sein

### 2.2.10.2 Durchführung der qPCR mit cDNA

Für die qPCR wurde der FastStart Essential DNA Green Master Mix (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der verwendete Reaktionsansatz der qPCR und das Programm des Lightcycler 96 (Roche) sind in Tab. 22 dargestellt.

In jedem Durchlauf der qPCR wurden Negativkontrollen ohne genomische DNA oder ohne cDNA verwendet, um eine Kontamination des Master Mix auszuschließen. Als zusätzliche Negativkontrolle bei den Läufen mit cDNA diente eine Probe, die nicht mit reverser Transkriptase behandelt wurde (*no-reverse-Transkriptase (no-RT)* Kontrolle) und eine weitere Probe ohne RNA und ohne reverse-Transkriptase (*no-RT-no-RNA* Kontrolle). Alle Negativkontrollen hatten Quantifizierungszyklen ( $C_q$ )  $\geq 36$  und bestätigten damit, dass keine DNA Kontamination in den Proben vorlag. Jede cDNA-Probe wurde in technischen Duplikaten getestet.

**Tab. 22** Reaktionsansatz und das verwendete Programm von FastStart Essential DNA Green Master

Reaktionsansatz			
12,5 µl	FastStart Essential DNA Green Master Mix		
2,5 µl	Primer Mix des Forward- und Reverse-Primers		
5 µl	gDNA oder cDNA jeweils in tRNA (Roche) verdünnt		
5 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>		
25 µl	Gesamtvolumen		
Reaktionsprogramm			
	Prä-Inkubation	95°C	10:00 min
40 Zyklen	• Denaturierung	95°C	0:15 min
	• Primerhybridisierung	60°C	0:30 min
	• Elongation	72°C	0:30 min
	Schmelzkurven-Analyse	95°C	00:10 min
		65°C	01:00 min
		97°C	00:01 min

### 2.2.10.3 Auswertung der qPCR Ergebnisse

Aus *Y. enterocolitica* JB580v und der isogenen *hfq*-Mutante SOR17 wurden sowohl bei 27°C als auch bei 37°C jeweils drei unabhängige RNA-Proben gewonnen (n=3, biologische Triplikate). Aus jeder RNA-Probe wurden parallel zwei cDNA-Proben mittels reverser Transkription hergestellt (technische Duplikate). Jede dieser cDNA-Proben wurde zweimal auf die Expression verschiedener Gene in der qPCT getestet (technische Duplikate). Die Ergebnisse sind als relative Quantifizierung dargestellt, d.h. es wird die Änderung der Genexpression zwischen *Y. enterocolitica* JB580v und *hfq*-negativen *Y. enterocolitica* SOR 17 dargestellt, normalisiert zu der Genexpression von Referenz-Genen (*gyrB* und 16S rRNA). Eine Änderung des Logarithmus des Normalisierten *Fold Change* um mindestens „1“ wird als signifikante Veränderung der Genexpression erachtet.

Für die Auswertung der qPCR wurde der durchschnittliche Quantifizierungszyklus ( $C_q$ ) der vier cDNA-Proben, die aus einer RNA-Probe stammen (zwei cDNA-Proben aus einer RNA-Probe jeweils in technischen Duplikaten getestet), berechnet. Der durchschnittliche  $C_q$  eines Gens im *hfq*-negativen Stamm wurde dann von dem durchschnittlichen  $C_q$  dieses Gens im Wildtyp subtrahiert ( $\Delta C_q$ ). Für die Berechnung des *Fold Change* ist  $\Delta C_q$  der Exponent der spezifischen Effizienz eines Gens als Basis (s.u.). Die Normalisierung des *Fold Change* erfolgte zu den Referenz-Genen *gyrB* oder 16S rRNA. Die Berechnung der relativen Gen-Expression wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Normalisierter } \textit{Fold Change} = \frac{(E_{\text{spezifisches Gen}})^{\Delta C_q \text{ spezifisches Gen}}}{(E_{\text{gyrB oder 16S}})^{\Delta C_q \text{ gyrB oder 16S}}}$$

E = Effizienz der Primer (90% < E < 110%)

C<sub>q</sub> = Quantifizierungszyklus

ΔC<sub>q</sub> = mittlerer C<sub>q</sub> Kontrolle (wt) – mittlerer C<sub>q</sub> Experiment (hfq-negativ)

### 2.2.11 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) berechnet und dargestellt. Die statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism 5 Software.

Die Protein-Banden in den SDS-PAGE-Gelen und die Banden der Immunoblots wurden mit der Image Lab Software (Bio-Rad) quantifiziert. Mit Hilfe der Quantifizierung wurde die relative Signalintensität der Immunoblot-Banden berechnet. Hierfür wurde das Signal einer Immunoblot-Bande zu dem korrelierenden Gesamt-Protein im Polyacrylamid-Gel normalisiert und dann mit dem normalisierten Signal der Bande des Leervektors verglichen. Der Ail- bzw. InvA-Antikörper reagiert mit einer Doppelbande (Konformationsvarianten oder proteolytisch prozessierte Banden). In diesen Fällen wurde das Signal beider Immunoblot-Banden zusammengefasst.

Für die semiquantitative Analyse von drei unabhängigen Experimenten wurden die Gesamtzelllysate der drei Experimente in einem Immunoblot analysiert. Die Ergebnisse sind als das mittlere, relative Signal einer Protein-Bande ± SD dargestellt.

Die Signifikanz der semi-quantitativen Analyse der Immunoblot-Ergebnisse und die Signifikanz der Ergebnisse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in der Durchflusszytometrie wurden mit dem *Student's unpaired t-Test* berechnet. Der t-Test eignet sich besonders, da er robust gegen Verteilungsverformungen ist.

Als Grenzwerte für die Signifikanz der Ergebnisse wurde ein P-Wert < 0,05 (markiert mit \*) gewählt. Sehr signifikante Unterschiede (P < 0,01) wurden mit \*\* markiert und hochsignifikante Unterschiede (P < 0,001) wurden mit \*\*\* markiert.

Die Ergebnisse der qPCR wurden als Normalisierter *Fold Change* berechnet (siehe Abschnitt 2.2.10.3.). Dargestellt wird der Normalisierte *Fold Change* als Logarithmus zur Basis 2 (Log<sub>2</sub>).



### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Regulation der Expression von virulenzassoziierten Adhäsingenen und Genen periplasmatischer Proteine wie der Protease DegP (Abschnitt 1.3.1) und den Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen FkpA und PpiA (Abschnitt 1.3.2) durch die *envelope stress response* (ESR-) Signalwege CpxR und RpoE (Abschnitt 1.4.1 und 1.4.2).

Für diesen Zweck wurden einerseits die promotorlosen Gene *cpxR* und *rpoE* mit einem Arabinose-induzierbaren Promotor im Plasmid pBAD24 zur Simulation von CpxR- bzw. RpoE-*envelope stress* fusioniert. Zusätzlich wurden translationale GFP-Reporter-Fusionen mit den Regulatorgenen *cpxR*, *rpoE*, *rovA* und den Adhäsingenen hergestellt und in *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 (Stamm JB580v und Stamm WA-314) transformiert.

Es wurden zunächst die Wachstumskurven der rekombinanten Stämme in Flüssigmedium bei 27°C bzw. 37°C mit Arabinose-Induktion verglichen (siehe Kap. 3.1). Es folgten Translationsanalysen mittels GFP-Fluoreszenzbestimmung und Immunoblot, sowie Transkriptionsanalysen mittels reverser Transkriptase und qPCR.

#### 3.1 Wirkung der induzierten Überexpression der ESR-Regulatorgene *cpxR* und *rpoE* auf das Wachstum von *Y. enterocolitica*

Die ESR-Regulatorgene *cpxR* und *rpoE* wurden in den Leervektor pBAD24 unter Kontrolle des  $P_{BAD}$  Promotors kloniert, um den Effekt der Überexpression dieser Gene auf das Wachstum von *Y. enterocolitica* zu untersuchen. Der  $P_{BAD}$  Promotor ist durch Arabinose induzierbar (Guzman *et al.*, 1995). Die Induktion des  $P_{BAD}$  Promotors erfolgte mit Arabinose in früher exponentieller Wachstumsphase (nach einer Stunde) bzw. in mittlerer exponentieller Wachstumsphase (nach vier Stunden). Die Versuche wurden bei 27°C (optimale Wachstumstemperatur für *Yersinia*) bzw. 37°C (Temperatur bei Infektion) durchgeführt.

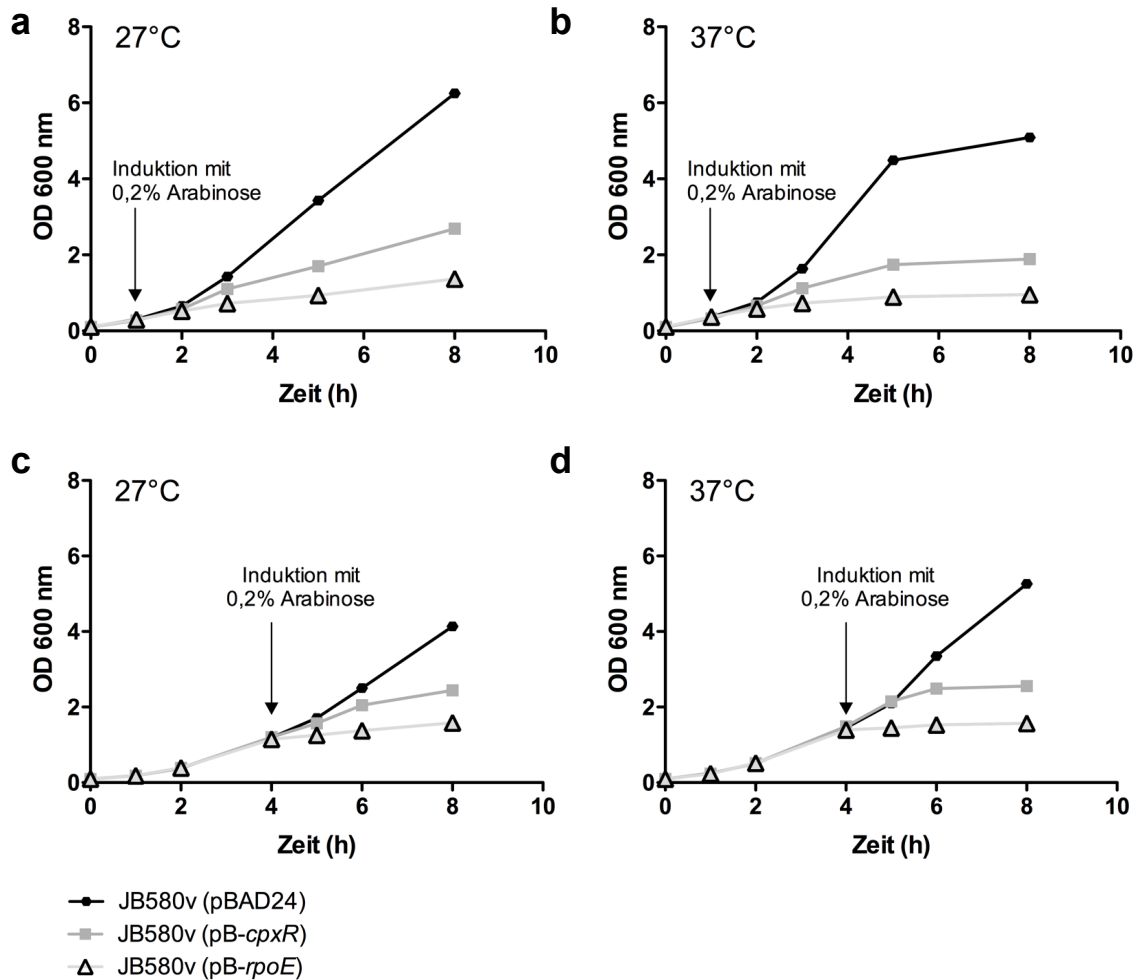
Bei Induktion in früher exponentieller Wachstumsphase wurde das Wachstum bzw. die Vermehrung der Bakterien zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 3, 5 und 8 Stunden und bei Induktion in mittlerer exponentieller Wachstumsphase zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 4, 5, 6 und 8 Stunden aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 (Stamm JB580v) und Abbildung 4 (Stamm WA-314) zusammengefasst.

Betrachtet man zunächst den Stamm JB580v (Abb. 3), der das pB-*cpxR* Plasmid trägt, fällt auf, dass es temperaturunabhängig nach vier Stunden Wachstum mit vermehrter *cpxR* Transkription (entspricht Zeitpunkt „5 Stunden“ in Abb. 3a, b und Zeitpunkt „8 Stunden“ in Abb. 3c, d) zu einem stark verminderten Wachstum im Vergleich zu dem Stamm mit Leervektor kommt.

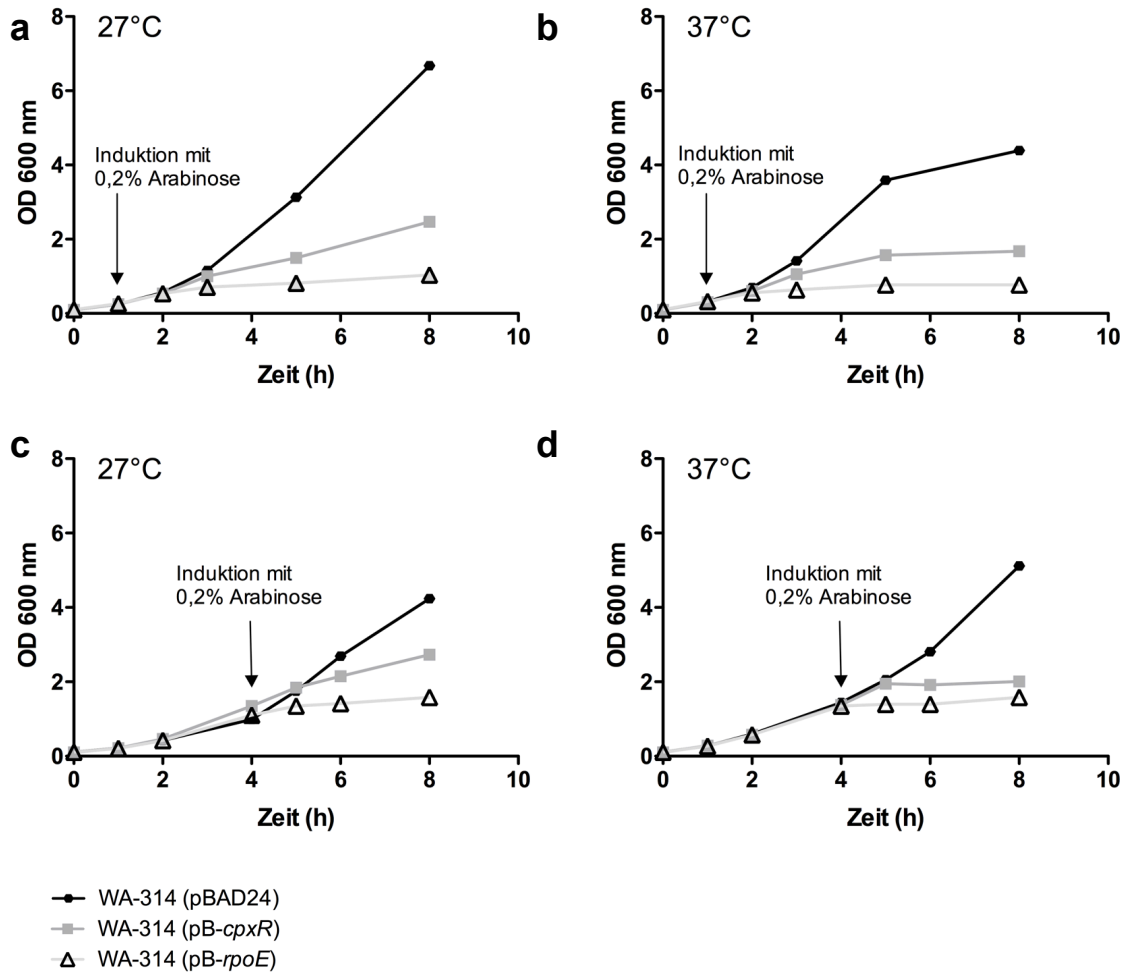
In dem Stamm JB580v (pB-*rpoE*) (Abb. 3) kommt es zu einer noch stärkeren Hemmung des Wachstums. Dieser Effekt ist ebenfalls temperaturunabhängig und unabhängig vom Zeitpunkt der Induktion mit Arabinose. Nach jeweils vier Stunden unter vermehrter *rpoE* Transkription (entspricht Zeitpunkt „5 Stunden“ in Abb. 3a, b und Zeitpunkt „8 Stunden“ in Abb. 3c, d) ist die OD<sub>600</sub> verglichen mit den Stämmen mit pBAD24 vermindert. Bei Induktion in mittlerer exponentieller Wachstumsphase (Abb. 3c, d) ist das Wachstum unter vermehrter *rpoE* Transkription so stark eingeschränkt, dass bereits eine Stunde nach Induktion mit Arabinose ein deutlicher Unterschied zum Stamm JB580v mit Leervektor besteht.

Analoge Versuche wurden mit Stamm WA-314 (Abb. 4) durchgeführt, um die Ergebnisse in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v zu überprüfen. Eine vermehrte Transkription von *cpxR* und *rpoE* führt auch in diesem Stamm zu einer starken Inhibierung des Wachstums. Dabei hat induzierte *rpoE* Transkription wieder einen stärkeren hemmenden Einfluss auf das Wachstum als induzierte *cpxR* Transkription. Der inhibierende Effekt auf das Wachstum ist unabhängig von der Temperatur und vom Zeitpunkt der Induktion mit Arabinose.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Überexpression der ESR-Gene *cpxR* bzw. *rpoE* zu einer starken Reduktion des Wachstums bzw. der Vermehrung von *Y. enterocolitica* führt. Dieser Effekt ist unabhängig davon, ob die Induktion der Transkription in früher oder in mittlerer exponentieller Wachstumsphase stattgefunden hat. Vermehrte *rpoE* Transkription hat einen noch stärkeren hemmenden Einfluss auf das Wachstum als vermehrte Transkription von *cpxR*.



**Abb. 3: Wachstum von *Y enterocolitica* Stamm JB580v bei Überexpression der ESR-Regulatorgene *cpxR* bzw. *rpoE*.** Das Wachstum von *Yersinia enterocolitica* Stamm JB580v erfolgte in LB-Medium bei 27°C (a, c) und bei 37°C (b, d). Die Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors erfolgte in allen Kulturen mit 0,2% Arabinose in früher exponentieller Wachstumsphase nach einer Stunde (a, b) oder in mittlerer exponentieller Wachstumsphase nach vier Stunden (c, d). Als Parameter für Wachstum/Vermehrung wurde photometrisch die OD<sub>600</sub> bestimmt. Zu Beginn der Messung (Zeitpunkt 0) wurde die Bakteriendichte auf OD<sub>600</sub> = 0,1 eingestellt und die Vermehrung aufgezeichnet. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Versuch. Das Experiment wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt (n = 2) und ergab hohe Reproduzierbarkeit.



**Abb. 4: Wachstum von *Y. enterocolitica* Stamm WA-314 bei Überexpression der ESR- Regulatorgene *cpxR* bzw. *rpoE*.** Das Wachstum von *Yersinia enterocolitica* Stamm WA-314 erfolgte in LB-Medium bei 27°C (**a, c**) und bei 37°C (**b, d**). Die Induktion des  $P_{BAD}$  Promotors erfolgte in allen Kulturen mit 0,2% Arabinose in früher exponentieller Wachstumsphase nach einer Stunde (**a, b**) oder in mittlerer exponentieller Wachstumsphase nach vier Stunden (**c, d**). Als Parameter für Wachstum/Vermehrung wurde photometrisch die  $OD_{600}$  bestimmt. Zu Beginn der Messung (Zeitpunkt 0) wurde die Bakteriendichte auf  $OD_{600} = 0,1$  eingestellt und die Vermehrung aufgezeichnet. Die Abbildung zeigt ein Experiment ( $n = 1$ ).

### 3.2 Analyse des CpxR- und RpoE-ESR-Regulons

*Y. enterocolitica* Stamm JB580v wurde mit zwei kompatiblen Plasmiden transformiert (Abschnitt 2.1.9.2), um die Wechselwirkungen zwischen den beiden ESR-Signalwegen zu untersuchen: Plasmide mit induzierbaren  $P_{BAD}$  Promotor (pBAD24 als Vektor, pB-*cpxR* oder pB-*rpoE*) und GFP-Reporter Plasmide mit translationalen *gfp*-Fusion (pFX-Plasmide). Bei den Plasmiden mit translationaler *gfp*-Fusion wurde immer der Promotor des Gens, einschließlich der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) und die ersten 9-22 Kodons des Gens mit *gfp* ligiert (siehe Tab. 11, Kapitel 2.1.9.2.). Die Induktion des  $P_{BAD}$  Promotors von pB-*cpxR* und pB-*rpoE* erfolgte mit Arabinose nach vier Stunden Wachstum (vgl. Abb. 3c und 3d). Die Kulturen wurden unter Überexpression von *cpxR* und *rpoE* für zwei weitere Stunden inkubiert, bevor die *gfp* Expression in der Durchflussfluoreszenzzytometrie quantifiziert wurde (entspricht Messzeitpunkt 6 Stunden in der Wachstumskurve Abb. 3c und 3d). Dabei reguliert CpxR die eigene Genexpression und die *ppiA* Genexpression und RpoE reguliert die *rpoE* und *fkpA* Genexpression (Dartigalongue *et al.*, 2001; De Wulf *et al.*, 1999). Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt. Negativkontrollen sind in allen Stämmen mit translationalen *gfp*-Fusionen, solche die den Vektor pBAD24 tragen (keine Überexpression von *cpxR* oder *rpoE*). Als Negativkontrolle für Hintergrund-Fluoreszenz dient pFX-0 mit einem promotorlosem *gfp*.

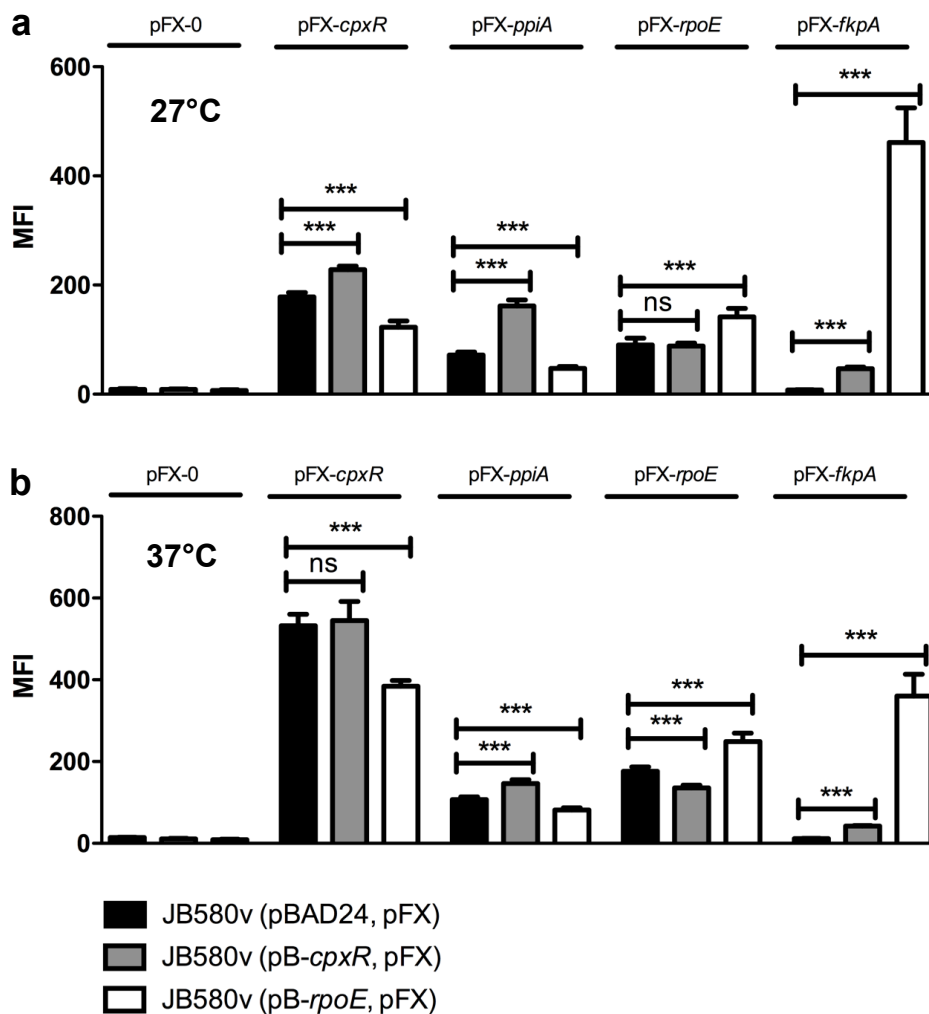
Die Ergebnisse in Abb. 5 zeigen die Funktionsfähigkeit der pBAD-Plasmid-Konstrukte: durch Zugabe von Arabinose werden die ESR-Signalwege aktiviert. Daher können mit diesem System und den ebenfalls funktionsfähigen *gfp*-Reporter-Konstrukten die regulatorischen Wechselwirkungen zwischen dem CpxR- und dem RpoE-ESR-Signalweg untersucht werden.

Die Überexpression von *cpxR* hat einen verstärkenden Einfluss auf die Expression von *cpxR* bei 27°C (Steigerung um 28% im Vergleich zur *cpxR*-Expression mit Vektor), allerdings nicht bei 37°C. Die Überexpression von *cpxR* führt auch zu einer vermehrten Expression von *ppiA* bei 27°C und 37°C. Die Überexpression von *rpoE* hat einen positiven Einfluss auf die Expression von RpoE-ESR-regulierten Genen sowohl bei 27°C als auch bei 37°C. Die Expression von *rpoE* wird um 57% bei 27°C und um 41% bei 37°C ( $P \leq 0,001$ ) gesteigert. Den stärksten Effekt hat eine *rpoE* Überexpression auf die Expression von *fkpA*'-*gfp*. Im Vergleich zur *fkpA* Expression im Stamm JB580v mit Vektor ist die Expression um das 60-fache bei 27°C und um das 34-fache bei 37°C gesteigert.

Der inhibierende Effekt der *cpxR* Überexpression auf die Expression von *rpoE* um 22% ist nur bei 37°C zu beobachten. Bei 27°C hat eine *cpxR*-Überexpression keinen Effekt auf die Expression von *rpoE*. Interessanterweise führt die Überexpression von *cpxR* auch zu einer vermehrten Expression von *fkpA* um das 6-fache bei 27°C und um das 4-fache bei 37°C (Abb. 5). Dagegen hat die vermehrte Expression von *rpoE* einen inhibierenden Einfluss auf

die Expression von *ppiA*. Unter *rpoE* Überexpression ist die Expression von *ppiA* bei 27°C um 35% und bei 37°C um 24%, verglichen zur *ppiA* Expression in den Stämmen mit Vektor reduziert.

Somit hat der RpoE-ESR-Signalweg einen negativ-regulierenden Effekt auf den CpxR-ESR-Signalweg in *Y. enterocolitica*. Umgekehrt scheint der CpxR-ESR-Signalweg nur einen geringfügigen Einfluss auf den RpoE-ESR-Signalweg in *Y. enterocolitica* zu haben.



**Abb. 5: Effekt von *cpxR* bzw. *rpoE* Überexpression auf die Expression von CpxR- und RpoE-abhängigen Zielgenen in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v.** Die Stämme tragen pFX-Plasmide mit translationalen Fusionen mit *gfp* (CpxR- und RpoE-ESR-abhängige Gene) und entweder den Vektor pBAD24, pB-*cpxR* oder pB-*rpoE* unter Kontrolle des induzierbaren P<sub>BAD</sub> Promotors. Den Stämmen wurden nach vier Stunden Wachstum bei 27°C (a) bzw. 37°C (b) in LB-Medium 0,2% Arabinose hinzugefügt. Nach zwei Stunden Wachstum wurden die Kulturen in PBS verdünnt und die GFP Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Ergebnisse sind als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ± SD der Einzelbakterien dargestellt (n = 4, jeweils in Duplikaten pro Stamm). \*\*\* P ≤ 0,001; ns, nicht signifikant. Die translationalen Fusionen mit *gfp* sind immer unter Promotorkontrolle des jeweiligen angezeigten Gens (siehe Tab. 10 und 11).

### 3.3 Effekt der *cpxR* bzw. *rpoE* Überexpression auf die Expression des Gens *degP*

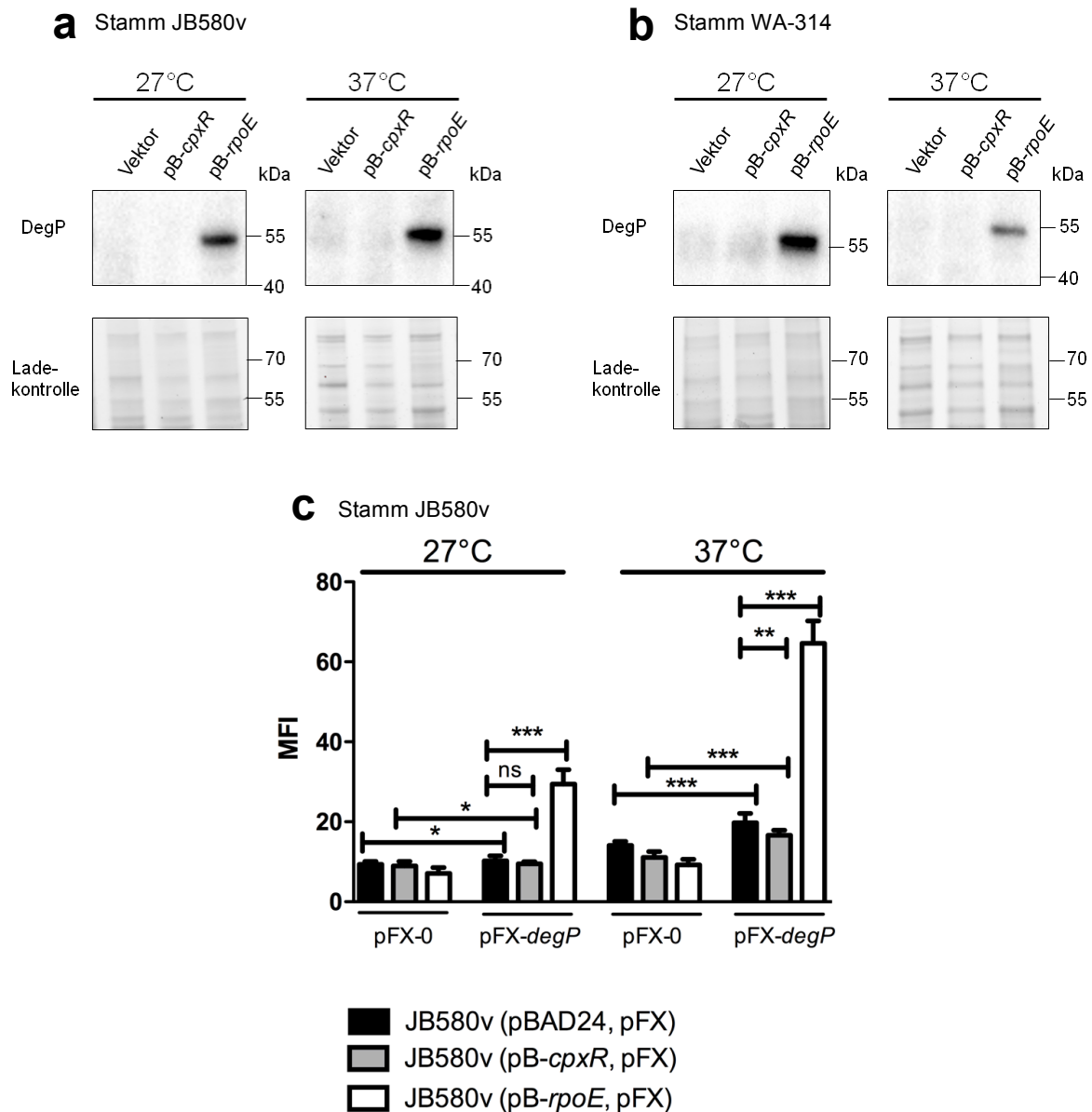
Wie bereits in der Einleitung beschrieben, führt die Aktivierung des CpxR- bzw. RpoE-ESR-Signalweges in *E. coli* zu einer vermehrten Genexpression der periplasmatischen Protease DegP (Danese *et al.*, 1995; Raina *et al.*, 1995). Es wurden Immunoblots zum Nachweis von DegP als auch Fluoreszenz-Messungen der *degP'*-*gfp* Reporterkonstrukte von Einzelbakterien mittels Durchflusszytometrie durchgeführt, um die Auswirkungen von *cpxR* bzw. *rpoE* Überexpression auf die periplasmatische Protease DegP in *Y. enterocolitica* zu charakterisieren.

Für die Protein-Untersuchungen von DegP mittels Immunoblots trugen die *Y. enterocolitica* Stämme JB580v (Abb. 6a) und WA-314 (Abb. 6b) Plasmide mit induzierbarem P<sub>BAD</sub> Promotor: pBAD24 als Negativkontrolle, pB-*cpxR* oder pB-*rpoE*. Die Kulturen wurden nach einer Stunde Wachstum mit Arabinose induziert und dann für zwei weitere Stunden unter Überexpression schüttelnd inkubiert (vgl. Abb. 3a, b und Abb. 4a, b). Abb. 6a zeigt die DegP Produktion im *Y. enterocolitica* Stamm JB580v unter Überexpression von *cpxR* und *rpoE*. Die periplasmatische Protease DegP ist im Stamm JB580v mit Leervektor und auch unter *cpxR* Überexpression nicht nachweisbar. Unter *rpoE* Überexpression wird DegP sowohl bei 27°C als auch bei 37°C produziert und ist im Immunoblot nachweisbar. Diese Effekte konnten auch im *Y. enterocolitica* Stamm WA-314 reproduziert werden (Abb. 6b).

Darüber hinaus wurde die *degP* Genexpression durch Fluoreszenz-Untersuchungen mit Hilfe translationaler *gfp*-Fusionen untersucht. Hierfür wurde das *degP'*-*gfp* Reporterplasmid zusammen mit den Plasmiden pB-*cpxR* bzw. pB-*rpoE* in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v untersucht. Die translationale *degP'*-*gfp*-Fusion ist ein Konstrukt, bei dem der P<sub>degP</sub> Promotor, 228 Basenpaare der 5'- untranslatierten Region (5'-UTR) und 13 Kodons von *degP* mit *gfp* ligiert wurden. Die Induktion der P<sub>BAD</sub> Promotoren erfolgte mit Arabinose nach vier Stunden Wachstum (mittlere exponentielle Wachstumsphase, vgl. Abb. 3c, d). Die Kulturen wurden dann unter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* für zwei weitere Stunden schüttelnd inkubiert, bevor die *degP'*-*gfp*-Expression in der Durchflusszytometrie gemessen wurde.

Abb. 6c zeigt das Ausmaß der *degP* Genexpression unter Überexpression von *cpxR* und *rpoE*. In den Kontrollstämmen ohne ESR-Genüberexpression ist die *degP'*-*gfp* Expression nur gering detektierbar im Vergleich zu den Stämmen mit promotorlosem *gfp*. Dies spricht für eine niedrige Basisgenexpression der Protease DegP. Eine *cpxR* Überexpression führt nicht zu einer Änderung der *degP'*-*gfp* Expression, vereinbar mit den Ergebnissen der Immunoblots. Die Überexpression von *rpoE* führt zu einem eindrucksvollen Anstieg der *degP'*-*gfp* Expression, um fast das Dreifache bei 27°C ( $P \leq 0,001$ ) und mehr als das Dreifache bei 37°C ( $P \leq 0,001$ ).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass der RpoE-ESR-Signalweg die Genexpression und Produktion der Protease DegP in *Y. enterocolitica* positiv beeinflusst.



**Abb. 6: Effekt induzierter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* in *Yersinia enterocolitica* auf die Genexpression und Produktion von DegP.** Immunoblot von DegP im *Y. enterocolitica* Stamm JB580v (a) und Stamm WA-314 (b). Das Wachstum erfolgte in LB-Medium bei 27°C bzw. 37°C, die Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors erfolgte mit 0,2% Arabinose in allen Kulturen in früher exponentieller Wachstumsphase (nach einer Stunde). Die Kulturen wurden für weitere zwei Stunden inkubiert bevor Gesamtzelllysate für den Immunoblot gewonnen wurden. Der obere Abschnitt zeigt den Immunoblot, der untere Abschnitt zeigt einen Ausschnitt aus dem *stain free* SDS-PAGE-Gel (siehe Abschnitt 2.2.8.2) als Ladekontrolle. (c) zeigt die Mittelwerte der Einzelzellfluoreszenz von *Y. enterocolitica* Stamm JB580v mit einem promotorlosem *gfp* (pFX-0) oder mit einer *degP*-*gfp* Reporterfusion (pFX-*degP*). Die Stämme wurden vier Stunden bei 27°C bzw. 37°C in LB-Medium inkubiert, bevor die Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors mit 0,2% Arabinose durchgeführt wurde. Es folgten zwei Stunden Inkubation bis die Stämme in PBS für die Durchflusszytometrie verdünnt wurden. Die Ergebnisse sind als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ± SD der Einzelbakterien dargestellt. n = 4, jeweils in technischen Duplikaten pro Stamm. Student's t-Test: \*\*\* P ≤ 0,001; \*\* P ≤ 0,01; \* P ≤ 0,05; ns, nicht signifikant.



### 3.4 Effekt der Überexpression der Gene *cpxR* und *rpoE* auf die Expression der Adhäsingene

Die pBAD-Konstrukte wurden verwendet, um den Effekt des CpxR- bzw. RpoE-ESR-Signalweges auf die Genexpression und Produktion von *envelope*-assoziierten Pathogenitätsfaktoren (Adhäsine) in *Y. enterocolitica* zu untersuchen. Es wurden sowohl Immunoblots zum Nachweis der Oberflächenpathogenitätsfaktoren als auch Fluoreszenz-Messungen der Genexpression in der Durchflusszytometrie durchgeführt.

Für den Nachweis der Adhäsine im Immunoblot trugen die *Y. enterocolitica* Stämme JB580v und WA-314 Plasmide mit induzierbarem P<sub>BAD</sub> Promotor: pBAD24 als Kontrolle, pB-*cpxR* oder pB-*rpoE*. Die Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors in den Kulturen erfolgte nach einer Stunde Wachstum (frühe exponentielle Wachstumsphase) mit Arabinose. Die Kulturen wurden dann für eine bzw. zwei weitere Stunde unter Überexpression von *cpxR* und *rpoE* schüttelnd inkubiert. Es wurden Gesamtzelllysate gewonnen und im Immunoblot untersucht. Die Gesamtzelllysate-Proben aus drei unabhängigen Experimenten wurden auf ein Gel geladen und die Signalintensität der Banden semi-quantitativ analysiert. Der Stamm JB580v mit Vektor (pBAD24) wird als 100% definiert und die beiden anderen Stämme in Relation zu diesem berechnet.

Darüber hinaus wurden die GFP-Reporterfusionen mittels Fluoreszenz-Untersuchungen quantifiziert. Hierfür wurden die translationalen *gfp* Fusionen zusammen mit den Plasmiden mit induzierbarem Promotor in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v getestet. Es handelt sich hierbei um Konstrukte bei denen der Promotor des jeweiligen Gens mit der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) und den ersten 4-16 Kodons mit *gfp* ligiert wurden (siehe Abschnitt 2.1.9.2, Tab. 11). Als Negativkontrolle für Hintergrund-Fluoreszenz diente pFX-0 mit einem *gfp* ohne Promotor. Die Zugabe von Arabinose erfolgte in alle Kulturen nach einer Stunde (frühe exponentielle Wachstumsphase) oder nach vier Stunden (mittlere exponentielle Wachstumsphase), um eine künstlich vermehrte Expression von *cpxR* bzw. *rpoE* zu induzieren. Die Kulturen wurden dann unter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* für zwei weitere Stunden schüttelnd inkubiert, bevor das GFP-Reporterprodukt in der Durchflusszytometrie quantifiziert wurde.

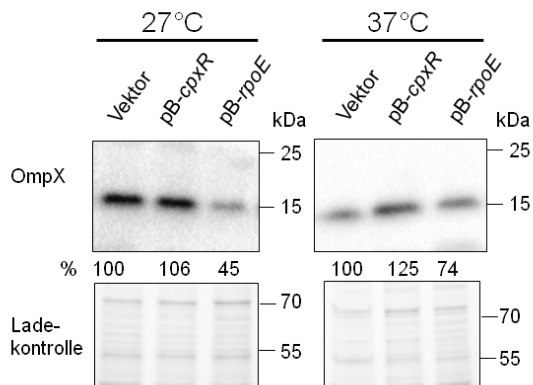
### 3.4.1 CpxR- bzw- RpoE-abhängige Expression des Adhäsiogens *ompX*

Abb. 7a zeigt einen repräsentativen Immunoblot von OmpX in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v unter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE*. Der Pathogenitätsfaktor OmpX ist im Stamm JB580v mit Kontrollvektor und auch unter *cpxR* Überexpression nachweisbar, allerdings ist die OmpX Produktion unter *cpxR* Überexpression nicht signifikant verändert. Bei 27°C wird OmpX unter *rpoE* Überexpression signifikant weniger produziert, was in der semi-quantitativen Analyse bestätigt wurde (Abb. 7a, b). Dieser Effekt konnte auch in *Y. enterocolitica* Stamm WA-314 nachgewiesen werden (Abb. 7c). Bei 37°C ist die OmpX Produktion in Stamm JB580v unter *rpoE* Überexpression um 26% vermindert (Abb. 7a), allerdings ist dieser Effekt in der semi-quantitativen Analyse nicht signifikant (Abb. 7b). Im Stamm WA-314 ist bei 37°C eine Reduktion der OmpX Produktion um 40% zu beobachten. Die Ergebnisse der Immunoblots zeigen, dass der RpoE-ESR-Signalweg einen negativen Effekt auf die Produktion von OmpX insbesondere bei 27°C hat.

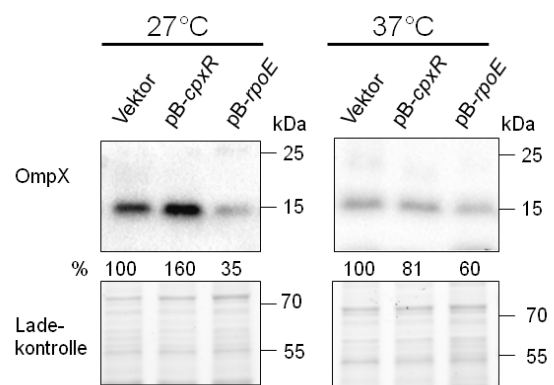
Abb. 7d zeigt das Ausmaß der OmpX-GFP Produktion unter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE*. Eine Überexpression von *cpxR* führt zu keiner signifikanten Änderung der *ompX'-gfp* Expression. Nur bei Induktion der *cpxR* Expression bei 27°C in mittlerer exponentieller Wachstumsphase kommt es zu einem kleinen Anstieg der *ompX* Expression von ca. 13% ( $P \leq 0,05$ ). Überexpression von *rpoE* führt in früher exponentieller Wachstumsphase bei 27°C zu einem starken Abfall der *ompX'-gfp* Expression um 50%. Bei 37°C kommt es zu einer moderaten Reduktion der *ompX'-gfp* Expression.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass eine Überexpression von *rpoE* die Expression von *ompX* inhibiert. Dieser Effekt ist insbesondere bei 27°C zu beobachten.

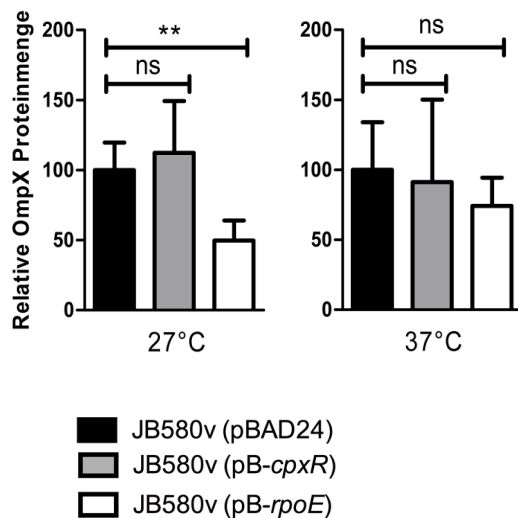
**a** Stamm JB580v



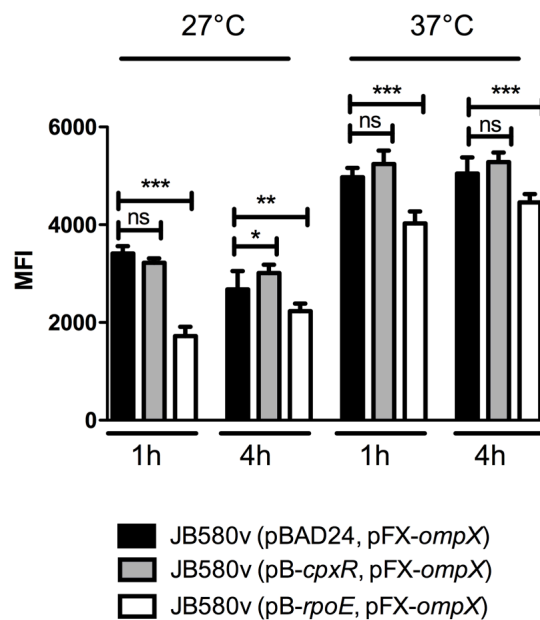
**c** Stamm WA-314



**b** Stamm JB580v



**d** Stamm JB580v



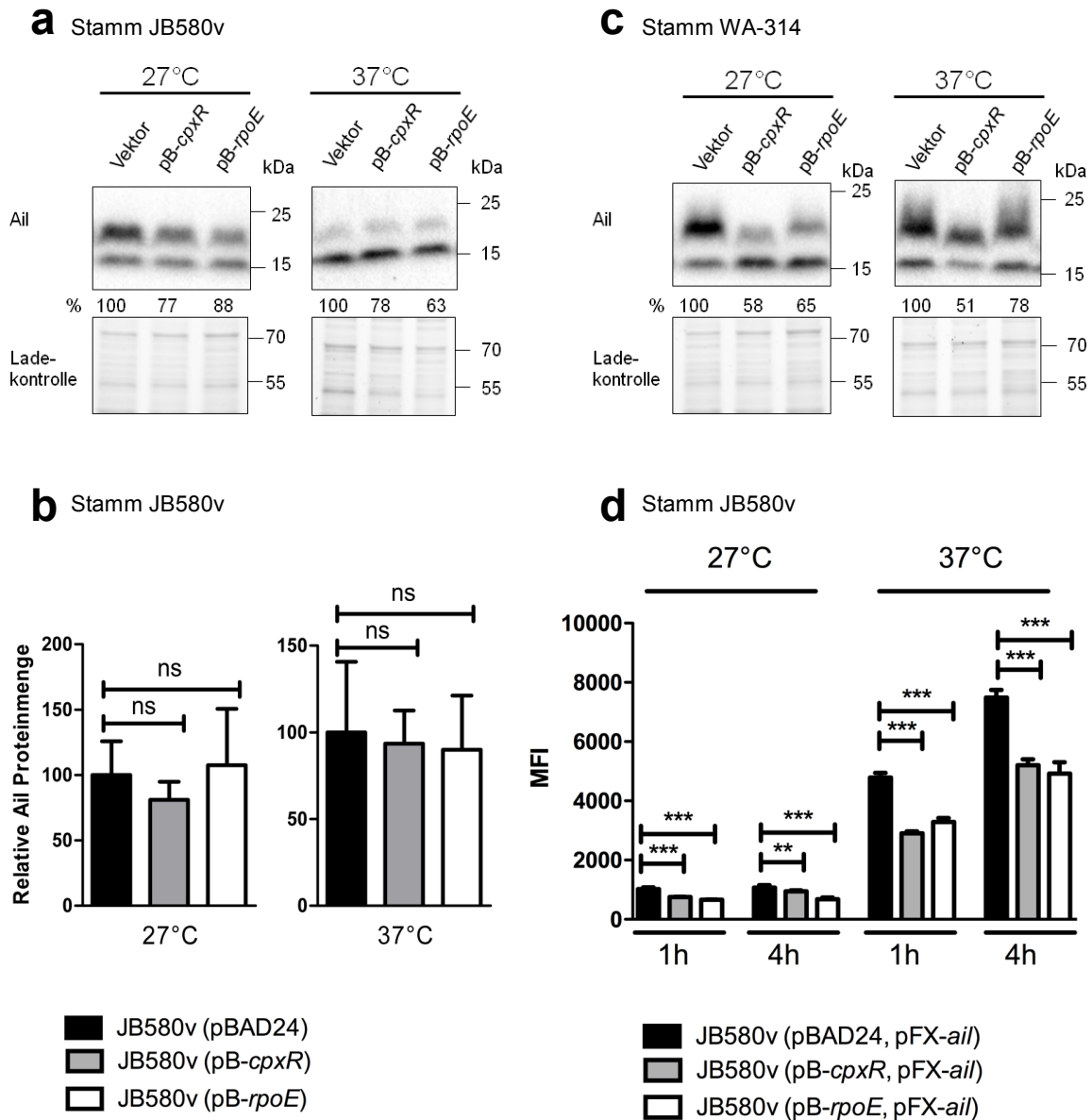
**Abb. 7: Effekt induzierter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* in *Yersinia enterocolitica* auf die Genexpression und Produktion von OmpX.** Immunoblot von OmpX in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v (**a, b**) und Stamm WA-314 (**c**). Das Wachstum erfolgte in LB-Medium bei 27°C bzw. 37°C. Die Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors erfolgte mit 0,2% Arabinose in früher exponentieller Wachstumsphase (nach einer Stunde). Die Kulturen wurden für eine weitere Stunde inkubiert bevor Gesamtzelllysate gewonnen wurden. Der obere Abschnitt zeigt den Immunoblot, der untere Abschnitt zeigt einen Ausschnitt aus dem *stain free* SDS-PAGE-Gel (siehe Abschnitt 2.2.8.2) als Ladekontrolle. Vektor ist pBAD24. Die Prozentangaben zeigen die relative Signalintensität der Protein-Banden. (**b**) zeigt die semi-quantitative Analyse der Gesamtproteinmenge von OmpX in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v (siehe Abschnitt 2.2.11). Die Ergebnisse in (**b**) sind das mittlere relative Signal der OmpX Banden ± SD (n=3). (**d**) zeigt die Mittelwerte der Einzelzellfluoreszenz von *Y. enterocolitica* Stamm JB580v mit einer translationalen *ompX*-*gfp* Fusion (pFX-*ompX*). Die Stämme wurden eine Stunde (frühe exponentielle Wachstumsphase) oder vier Stunden (mittlere exponentielle Wachstumsphase) bei 27°C bzw. 37°C in LB-Medium inkubiert, bevor die Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors mit 0,2% Arabinose durchgeführt wurde. Die Stämme wurden für zwei weitere Stunde inkubiert und dann in PBS für die Durchflusszytometrie verdünnt. Die Ergebnisse sind als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ± SD der Einzelbakterien dargestellt. n = 2 in früher exponentieller Wachstumsphase und n = 4 in mittlerer exponentieller Wachstumsphase, jeweils in Duplikaten pro Stamm. \*\*\* P ≤ 0,001; \*\* P ≤ 0,01; \* P ≤ 0,05; ns, nicht signifikant. In allen Experimenten war die MFI der Stämme mit dem promotorlosem *gfp* (pFX-0) kleiner 20 MFI (nicht dargestellt).

### 3.4.2 CpxR- bzw- RpoE-abhängige Expression des Adhäsiogens *ail*

Der monoklonale Ail Antikörper reagiert mit zwei Protein-Banden im Immunoblot, die mit verschiedenen Ail Varianten korrespondieren (Konformationsvarianten oder prozessierte Varianten). Für die semi-quantitative Immunoblot-Analyse wurden die beiden Ail Bandensignale einer Spur zusammengefasst.

Die Abb. 8a und 8c zeigen Immunoblots von Ail im *Y. enterocolitica* Stamm JB580v und Stamm WA-314. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Immunoblot-Experimenten zeigen, dass die Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* im Stamm JB580v keinen Effekt auf die Produktion der Ail Gesamtproteinmenge haben (Abb. 8b), auch wenn eine geringfügige Reduktion der Ail Produktion in einzelnen Experimenten auffällt (Abb. 8a, c). Die Ail Gesamtproteinmenge variiert stark zwischen einzelnen Experimenten, dadurch ist es schwer kleine Änderungen der Ail Produktion nachzuweisen (Kakoschke *et al.*, 2016).

Abb. 8d zeigt das Ausmaß der *ail'-gfp* Reporter-Expression unter vermehrter Expression von *cpxR* bzw. *rpoE*. Wie zuvor beschrieben ist die *ail* Genexpression ohne ESR-anhängige Genüberexpression bei 37°C deutlich stärker als bei 27°C (fünffach gesteigert in früher exponentieller Wachstumsphase und siebenfach gesteigert in mittlerer exponentieller Wachstumsphase) (Bliska und Falkow, 1992; Kakoschke *et al.*, 2016). Überexpression von *cpxR* und *rpoE* führen zu einem Abfall der *ail* Expression um 30% bei 27°C und 37°C. Unter *cpxR* Überexpression bei 27°C und Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors in mittlerer exponentieller Wachstumsphase zeigt sich eine moderatere Reduktion um etwa 12%. Eine signifikante Reduktion der *ail'-gfp* Reporter-Expression bei ESR-Gen-Überexpression ist durchflusszytometrisch nachweisbar, kann aber im Immunoblot nicht als signifikant nachgewiesen werden, am ehesten aufgrund der hohen Variabilität der Ail Produktion in den unabhängigen Immunoblot-Experimenten.



**Abb. 8: Effekt induzierter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* in *Yersinia enterocolitica* auf Genexpression und Produktion von Ail.** Immunoblot von Ail in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v (**a**) und Stamm WA-314 (**c**). Das Wachstum erfolgte in LB-Medium bei 27°C bzw. 37°C, die Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors mit 0,2% Arabinose erfolgte in allen Kulturen in früher exponentieller Wachstumsphase (nach einer Stunde). Die Kulturen wurden für eine weitere Stunde inkubiert bevor Gesamtzelllysate für den Immunoblot gewonnen wurden. Der obere Abschnitt zeigt den Immunoblot, der untere Abschnitt zeigt einen Ausschnitt aus dem *stain free* SDS-PAGE-Gel (siehe Abschnitt 2.2.8.2) als Ladekontrolle. Vektor ist pBAD24. Die Prozentangaben zeigen die relative Signalintensität der Protein-Banden. (**b**) zeigt die semi-quantitative Analyse der Gesamtproteinmenge von Ail in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v (siehe Abschnitt 2.2.11). Die Ergebnisse in (**b**) sind das mittlere relative Signal der beiden Ail Banden ± SD aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). (**d**) zeigt die mittlere Einzelzellfluoreszenz von *Y. enterocolitica* Stamm JB580v mit einer translationalen *ail*-*gfp* (pFX-*ail*) Fusion. Die Stämme wurden eine Stunde (frühe exponentielle Wachstumsphase) oder vier Stunden (mittlere exponentielle Wachstumsphase) bei 27°C bzw. 37°C in LB-Medium inkubiert, bevor die Induktion mit 0,2% Arabinose erfolgte. Die Stämme wurden für zwei weitere Stunde inkubiert und dann in PBS für die Durchflusszytometrie verdünnt. Die Ergebnisse sind als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ± SD der Einzelbakterien dargestellt. Es wurden zwei bzw. vier unabhängige Experimente, jeweils in Duplikaten pro Stamm durchgeführt (n=2 in früher exponentieller Wachstumsphase und n=4 in mittlerer exponentieller Wachstumsphase). \*\*\* P ≤ 0,001; \*\* P ≤ 0,01. In allen Experimenten war die MFI der Stämme mit einem promotorlosem *gfp* (pFX-0) kleiner 20 MFI (nicht dargestellt).

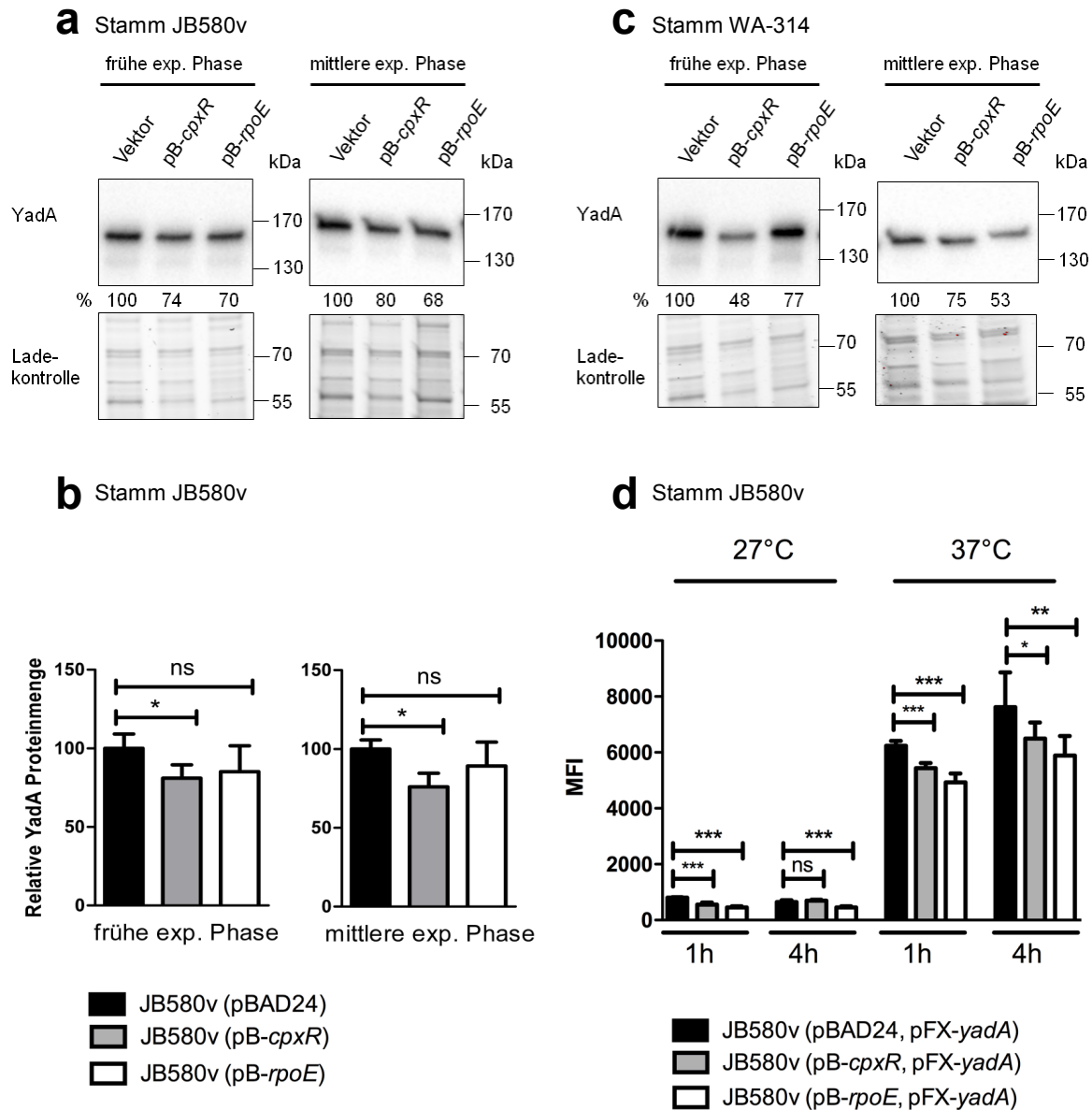
### 3.4.3 CpxR- bzw. RpoE-abhängige Expression des Adhäsingens *yadA*

Da das *yadA* Gen auf dem pYV-Plasmid lokalisiert ist und die Proteine nur bei 37°C nachweisbar sind (Skurnik und Toivanen, 1992), wurden die YadA Immunoblot-Untersuchungen nur bei 37°C durchgeführt (Abb. 9a-c).

Abb. 9a zeigt einen repräsentativen Immunoblot von YadA in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v unter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE*. Durch Überexpression von *cpxR* kommt es zu einer signifikanten Reduktion der YadA Produktion in Stamm JB580v (Abb. 9a, b) und in Stamm WA-314 (Abb. 9c). Die prozentuale relative Signalintensität der YadA-Bande bei *cpxR* Überproduktion ist um 26% in früher exponentieller Wachstumsphase und um 20% in mittlerer exponentieller Wachstumsphase vermindert. Der Effekt durch *cpxR*-Überexpression ist auch in der semi-quantitativen YadA Immunoblot-Analyse signifikant (Abb. 9b). Bei *rpoE* Überexpression ist YadA um 30% in früher exponentieller Wachstumsphase und um 32% in mittlerer exponentieller Wachstumsphase vermindert (Abb. 9a). Die Überexpression von *rpoE* hat in der semi-quantitativen YadA Analyse aus drei unabhängigen Experimenten keinen signifikanten Effekt (Abb. 9b).

Die *yadA* Expression wurde zytofluorometrisch mit Hilfe translationaler *yadA*'-'*gfp*-Reporterfusionen untersucht. Die Untersuchungen der *yadA*'-'*gfp* Reporter-Expression unter ESR-abhängiger Gen-Überexpression wurden sowohl bei 27°C als auch bei 37°C durchgeführt (Abb. 9d). Vereinbar mit der Literatur wird *yadA*'-'*gfp* bei 27°C nur in sehr geringem Ausmaß, verglichen zur *yadA*'-'*gfp* Expression bei 37°C, exprimiert (Skurnik und Toivanen, 1992). Abb. 9d zeigt das Ausmaß der *yadA*'-'*gfp* Reporter Expression unter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE*. Überexpression von *cpxR* führt zu einem moderaten Abfall der *yadA*'-'*gfp* Reporter Expression um 10-30% (Abb. 9d). Die Induktion der *rpoE* Expression führt zu einer Abnahme der *yadA*'-'*gfp* Expression um 20-45% in allen getesteten Wachstumsbedingungen.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass die Induktion der *cpxR*- bzw. *rpoE*-Expression mit einer Abnahme der *yadA* Expression assoziiert ist. Der Effekt der *cpxR* Überexpression auf die Produktion von YadA ist in den Immunoblot-Experimenten stärker ausgeprägt, während eine *rpoE* Überexpression auf die YadA-Produktion in den durchflusszytometrischen Untersuchungen deutlicher ist.



**Abb. 9: Effekt induzierter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* in *Yersinia enterocolitica* auf Genexpression und Produktion von YadA.** Immunoblot von YadA in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v (a) und Stamm WA-314 (c). Das Wachstum erfolgte in LB-Medium bei 37°C, die Induktion des  $P_{BAD}$  Promotors erfolgte mit 0,2% Arabinose in früher (nach einer Stunde) bzw. mittlerer exponentieller Wachstumsphase (nach vier Stunden). Die Kulturen wurden für weitere zwei Stunden inkubiert bevor Gesamtzelllysate für den Immunoblot gewonnen wurden. Der obere Abschnitt zeigt den Immunoblot, der untere Abschnitt zeigt einen Ausschnitt aus dem *stain free* SDS-PAGE-Gel (siehe Abschnitt 2.2.8.2) als Ladekontrolle. Vektor ist pBAD24. Die Prozentangaben zeigen die relative Signalintensität der Protein-Banden. (b) zeigt die semi-quantitative Analyse der Gesamtproteinmenge von YadA in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v (siehe Abschnitt 2.2.11). Die Ergebnisse in (b) sind das mittlere relative Signal der YadA Banden  $\pm$  SD (n=3). (d) zeigt die mittlere Einzelzellfluoreszenz von *Y. enterocolitica* Stamm JB580v mit einer translationalen *yadA*'-*gfp* (pFX-*yadA*) Fusion. Die Stämme wurden eine Stunde (frühe exponentielle Wachstumsphase) oder vier Stunden (mittlere exponentielle Wachstumsphase) bei 27°C bzw. 37°C in LB-Medium inkubiert, bevor die Induktion mit 0,2% Arabinose durchgeführt wurde. Die Stämme wurden dann für zwei weitere Stunden inkubiert und dann in PBS für die Durchflusszytometrie verdünnt. Die Ergebnisse sind als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)  $\pm$  SD der Einzelbakterien dargestellt. Es wurden zwei bzw. vier unabhängige Experimente, jeweils in Duplikaten pro Stamm durchgeführt (n=2 in früher exponentieller Wachstumsphase und n=4 in mittlerer exponentieller Wachstumsphase). \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*  $P \leq 0,05$ ; ns, nicht signifikant. In allen Experimenten war die MFI der Stämme mit einem promotorlosem *gfp* (pFX-0) kleiner 20 MFI (nicht dargestellt).

### 3.4.4 CpxR- bzw. RpoE-abhängige Produktion des Adhäsins Invasin

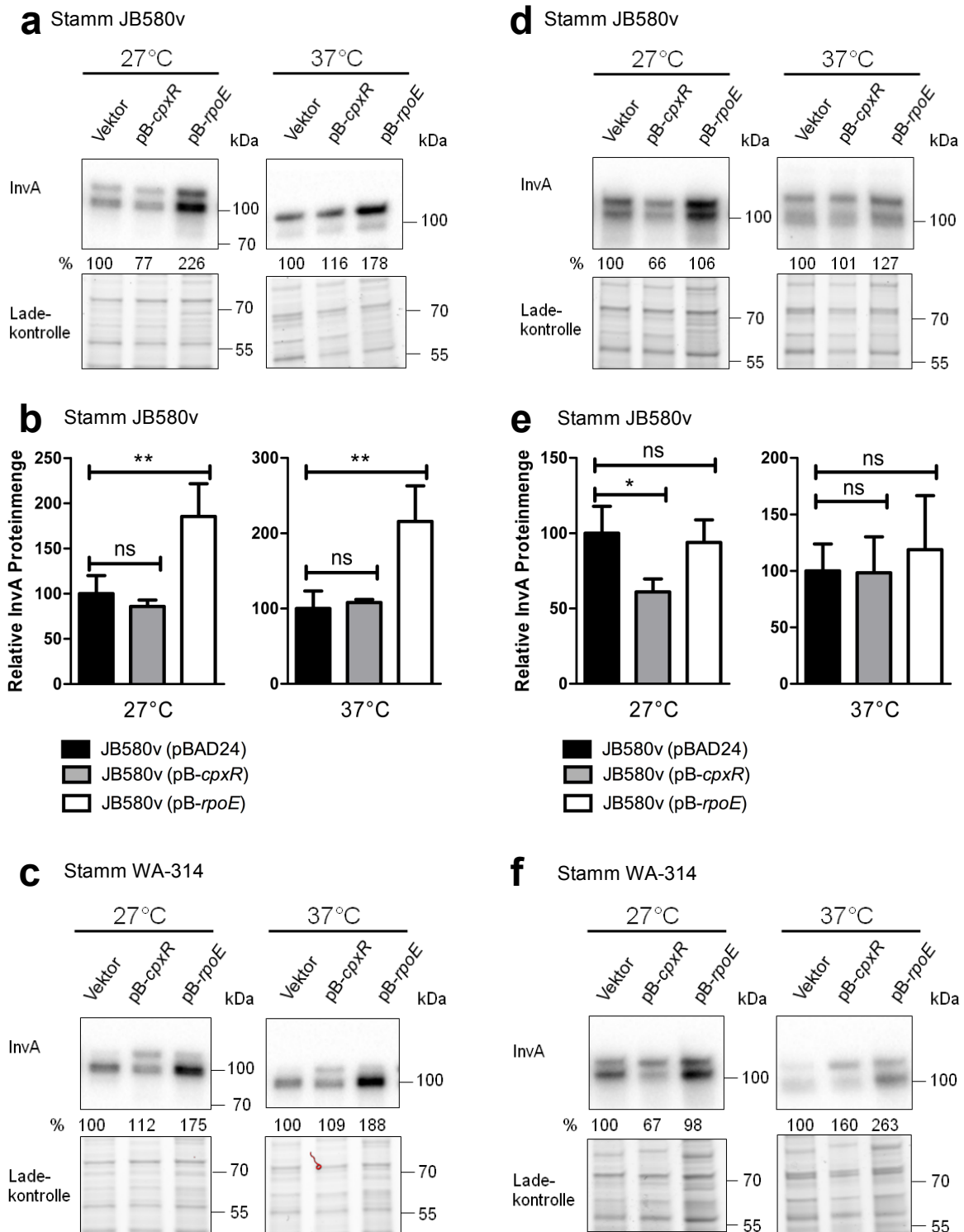
Der monoklonale InvA Antikörper reagiert im Immunoblot mit zwei Banden, eine der Banden korrespondiert wahrscheinlich mit einer Protease-prozessierten Form von InvA. Für die semi-quantitative Analyse wurden die beiden InvA Banden einer Spur zusammengefasst.

Die Abb. 10 zeigt repräsentative InvA-Immunoblots im *Y. enterocolitica* Stamm JB580v und Stamm WA-314 unter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* in früher und mittlerer exponentieller Wachstumsphase. Eine *cpxR* Überexpression hat bei 37°C keinen Einfluss auf die Produktion von Invasin (Abb. 10). Bei 27°C dagegen führt eine *cpxR* Überexpression in mittlerer exponentieller Wachstumsphase in beiden *Y. enterocolitica* Stämmen JB580v und WA-314 zu einer Reduktion der Invasin Produktion um 40% (Abb. 10 d, e, f). Dieser Effekt scheint spezifisch für die *cpxR* Induktion in mittlerer exponentieller Wachstumsphase zu sein, da kein Unterschied bei *cpxR* Induktion in früher exponentieller Wachstumsphase festgestellt werden konnte. Überexpression von *cpxR* in früher exponentieller Wachstumsphase (Abb. 10a, b) führte zu keiner signifikanten Veränderung der InvA-Produktion bei 27°C oder 37°C, weder im Stamm JB580v noch im Stamm WA-314 (Abb. 10c).

Bei *rpoE* Überexpression kam es zu einem Anstieg der InvA Produktion im Stamm JB580v um 126% bei 27°C und um 178% bei 37°C (Abb. 10a, b). Diese Ergebnisse konnten auch im Stamm WA-314 reproduziert werden (Abb. 10c). Bei ESR-abhängiger Gen-Induktion in mittlerer exponentieller Wachstumsphase sind in den InvA-Immunoblots zunächst die gleichen Effekte erkennbar wie in früher exponentieller Wachstumsphase. Im Stamm JB580v scheint die *rpoE* Überexpression zu einem Anstieg der Invasin-Produktion zu führen. Nach Normalisierung zum Gesamtprotein einer Spur und dann verglichen mit dem normalisierten Signal der Bande des Leervektors ist der Effekt allerdings gering (Abb. 10 d). In der semi-quantitativen Analyse ist der Effekt durch *rpoE* Überexpression auf die Invasin-Produktion nicht signifikant (Abb. 10e). Im *Y. enterocolitica* Stamm WA-314 zeigt sich ein ähnliches Bild (Abb. 10f). Bei 27°C scheint die Invasin-Produktion durch Expression von *rpoE* gesteigert, allerdings ist auch dieser Effekt nach Normalisierung zum Gesamtprotein nicht zu bestätigen. Bei 37°C wird mehr Invasin im Stamm WA-314 mit pB-*rpoE* detektiert. Hier bestätigt die Normalisierung zum Gesamtprotein eine vermehrte Invasin Produktion um 163%.

Sowohl die *cpxR*- als auch die *rpoE*-Überexpression haben einen Effekt auf die InvA Produktion, aber nur wenn die induzierte Genüberexpression in einer spezifischen Wachstumsphase bzw. während einer spezifischen Temperatur stattfindet: Reduktion der Invasin-Produktion durch CpxR bei 27°C in mittlerer exponentieller Wachstumsphase und Induktion der Invasin-Produktion durch RpoE in früher exponentieller Wachstumsphase bei 27°C und 37°C.





**Abb. 10: Effekt induzierter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* in *Yersinia enterocolitica* auf die Produktion von *InvA*.** Immunoblot von *InvA* in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v (**a,d**) und Stamm WA-314 (**c,f**). Das Wachstum erfolgte in LB-Medium bei 27°C bzw. 37°C. Die Induktion des  $P_{BAD}$  Promotors mit 0,2% Arabinose erfolgte in früher (nach einer Stunde, **a, c**) bzw. mittlerer exponentieller Wachstumsphase (nach vier Stunden, **d, f**). Die Kulturen wurden zwei Stunden inkubiert bevor Gesamtzelllysate gewonnen wurden. Der obere Abschnitt zeigt den Immunoblot, der untere Abschnitt zeigt einen Ausschnitt aus dem *stain free* SDS-PAGE-Gel (siehe Abschnitt 2.2.8.2) als Ladekontrolle. Die Prozentangaben zeigen die relative Signalintensität der Protein-Banden. (**b**) und (**e**) zeigen das mittlere relative Signal der *InvA* Banden im Stamm JB580v  $\pm$  SD (n=3) (siehe Abschnitt 2.2.11). \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*  $P \leq 0,05$ ; ns, nicht signifikant.

### 3.4.5 CpxR- bzw. RpoE-abhängige Expression der Adhäsingene *invA* und *rovA*

Nachdem im Immunoblot gezeigt werden konnte, dass CpxR und RpoE die Produktion von Invasin beeinflussen (Abschnitt 3.4.4), wurde als nächstes der Effekt auf die *invA* Genexpression und den transkriptionellen Aktivator *rovA* als Reporterfusionen getestet. Es wurden Fluoreszenz-Messungen von *Y. enterocolitica*, die die *invA*'-*gfp*- oder *rovA*'-*gfp*-Reporterfusionen tragen, durchgeführt. Es ist bekannt, dass RovA als transkriptioneller Aktivator positiv auf die Transkription von *invA* wirkt (Valentin-Weigand *et al.*, 2014).

Die *invA*'-*gfp*- oder *rovA*'-*gfp*-Reporterfusionen wurden zusammen mit den Plasmiden mit induzierbarem P<sub>BAD</sub> Promotor im *Y. enterocolitica* Stamm JB580v getestet, um die *invA* bzw. *rovA* Expression zu untersuchen.

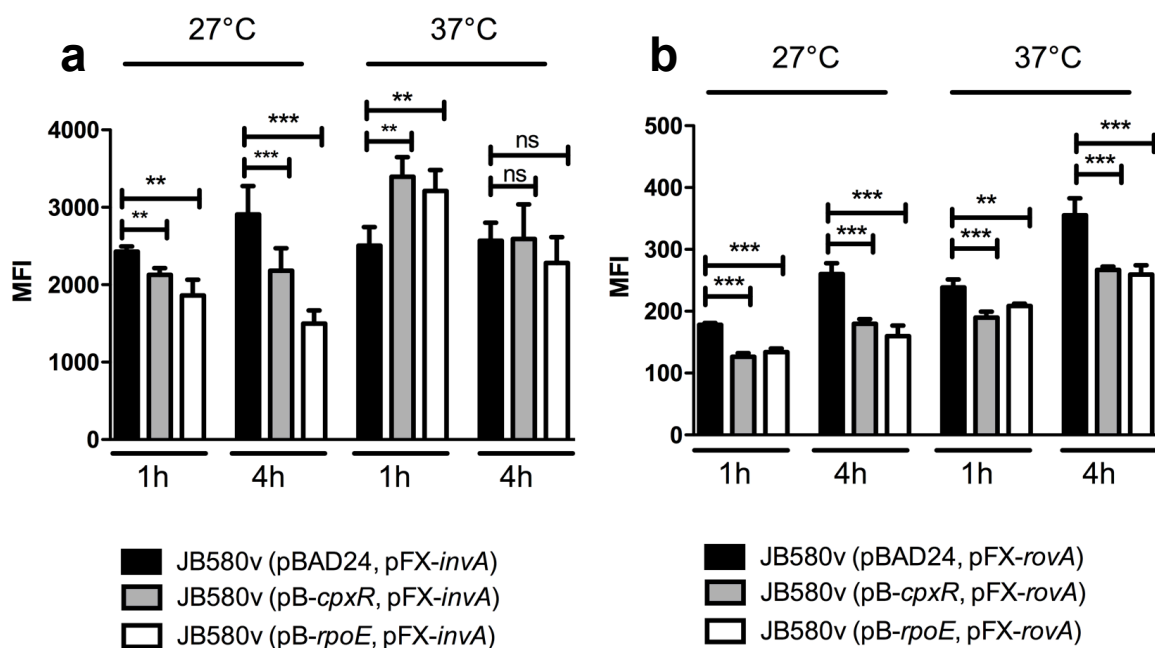
Abb. 11 zeigt den Effekt durch *cpxR* bzw. *rpoE* Überexpression auf die *invA*'-*gfp* Reporter- (Abb. 11a) und *rovA*'-*gfp* Reporterexpression (Abb. 11b). Bei 27°C führte eine Überexpression von *cpxR* zu einer moderat verminderten Expression von *invA*'-*gfp*, sowohl bei Induktion in früher Wachstumsphase (nach einer Stunde) um 12% ( $P \leq 0,01$ ), als auch bei Induktion in späterer Wachstumsphase (nach vier Stunden) um 25% ( $P \leq 0,001$ ). Eine *rpoE* Überexpression hat einen noch stärkeren Effekt und führte bei 27°C zu einer verminderten *invA* Expression um 23% ( $P \leq 0,01$ ) in früher exponentieller Wachstumsphase und um 49% ( $P \leq 0,001$ ) in mittlerer exponentieller Wachstumsphase.

Bei 37°C und Induktion in mittlerer exponentieller Wachstumsphase kommt es zu keinen signifikanten Unterschieden in der *invA* Expression durch Überexpression der ESR-abhängigen Gene. Bemerkenswert ist, dass es bei 37°C und Induktion in früher exponentieller Wachstumsphase (nach einer Stunde) durch Überexpression der beiden ESR-abhängigen Gene zu einer vermehrten *invA* Expression kommt. Bei Überexpression von *cpxR* kommt es zu vermehrter Expression von *invA* um 35% und bei vermehrter *rpoE* Expression um 28% verglichen zum Leervektor (beides  $P \leq 0,01$ ). Die Ergebnisse der Immunoblots mit InvA in Stamm JB580v (Abb. 10a und 10d) decken sich nicht mit den Ergebnissen in der Durchflusszytometrie. Auf Proteinebene kommt es durch Induktion der *rpoE* Expression zu einem Anstieg der Invasin-Produktion. Bei Induktion in mittlerer exponentieller Wachstumsphase scheint es auch zu einem Anstieg der Invasin Produktion unter vermehrter *rpoE* Expression zu kommen, allerdings sind diese Ergebnisse nicht immer reproduzierbar und waren in der semi-quantitativen Analyse nicht signifikant.

Die *cpxR*- bzw. *rpoE*-Gen-Überexpression hat deutliche Effekte auf die Expression von *rovA*'-*gfp* (Abb. 11b). Hier kommt es sowohl bei 27°C als auch bei 37°C zu einer signifikanten Reduktion der *rovA*'-*gfp* Expression unabhängig vom Zeitpunkt der Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors der ESR-abhängigen Gene. Sowohl *cpxR* als auch *rpoE* Überexpression

reduzieren die *rovA* Expression um mindestens 25% ( $P \leq 0,001$ ). Einzige Ausnahme besteht bei 37°C und Induktion in früher exponentieller Phase, bei der die *rovA* Expression nur um etwa 20% ( $P \leq 0,001$ ) bei vermehrter *cpxR* Expression und um 13% ( $P \leq 0,01$ ) bei vermehrter *rpoE* Expression reduziert ist.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse keine klare Übereinstimmung zwischen den im Immunoblot nachgewiesenen Invasin Proteinmengen und der Genexpression von Invasin, die durch *gfp*-Reporterfusionen gemessen wurden. Diese Ergebnisse könnten auf eine posttranskriptionelle und/oder posttranslationale Regulation hinweisen.



**Abb. 11: Effekt induzierter Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* in *Y. enterocolitica* auf die Genexpression von *invA* bzw. *rovA*.** Reporter-Fluoreszenz von *Y. enterocolitica* Stamm JB580v mit einer *invA*-*gfp* Fusion (**a**, pFX-*invA*) und einer *rovA*-*gfp* Fusion (**b**, pFX-*rovA*). Die Stämme wurden eine Stunde (frühe exponentielle Wachstumsphase) oder vier Stunden (mittlere exponentielle Wachstumsphase) bei 27°C bzw. 37°C in LB-Medium inkubiert, bevor die Induktion des P<sub>BAD</sub> Promotors mit 0,2% Arabinose erfolgte. Die Stämme wurden für zwei weitere Stunden inkubiert und dann in PBS für die Durchflusszytometrie verdünnt. Die Ergebnisse sind als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ± SD der Einzelbakterien dargestellt. Es wurden zwei bzw. vier unabhängige Experimente, jeweils in Duplikaten pro Stamm durchgeführt (für *invA*: n=2 in früher exponentieller Wachstumsphase und n=4 in mittlerer exponentieller Wachstumsphase; für *rovA*: n=4). \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; ns, nicht signifikant. In allen Experimenten war die MFI der Stämme mit einem promotorlosem *gfp* (pFX-0) kleiner als 20 MFI (nicht dargestellt).

### 3.5 Einfluss des RNA Chaperons Hfq auf die Expression ESR-abhängiger Gene

#### 3.5.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen mit *gfp*-Reporterfusionen

Von *E. coli* ist bekannt, dass *hfq*-Mutanten eine Aktivierung des CpxR- und RpoE-ESR-Signalweges zeigen (Vogt und Raivio, 2014). Die Expression von Genen des ESR-Regulons wurde im *Y. enterocolitica* Wildtyp und in *hfq*-negativen *Y. enterocolitica* vergleichend untersucht.

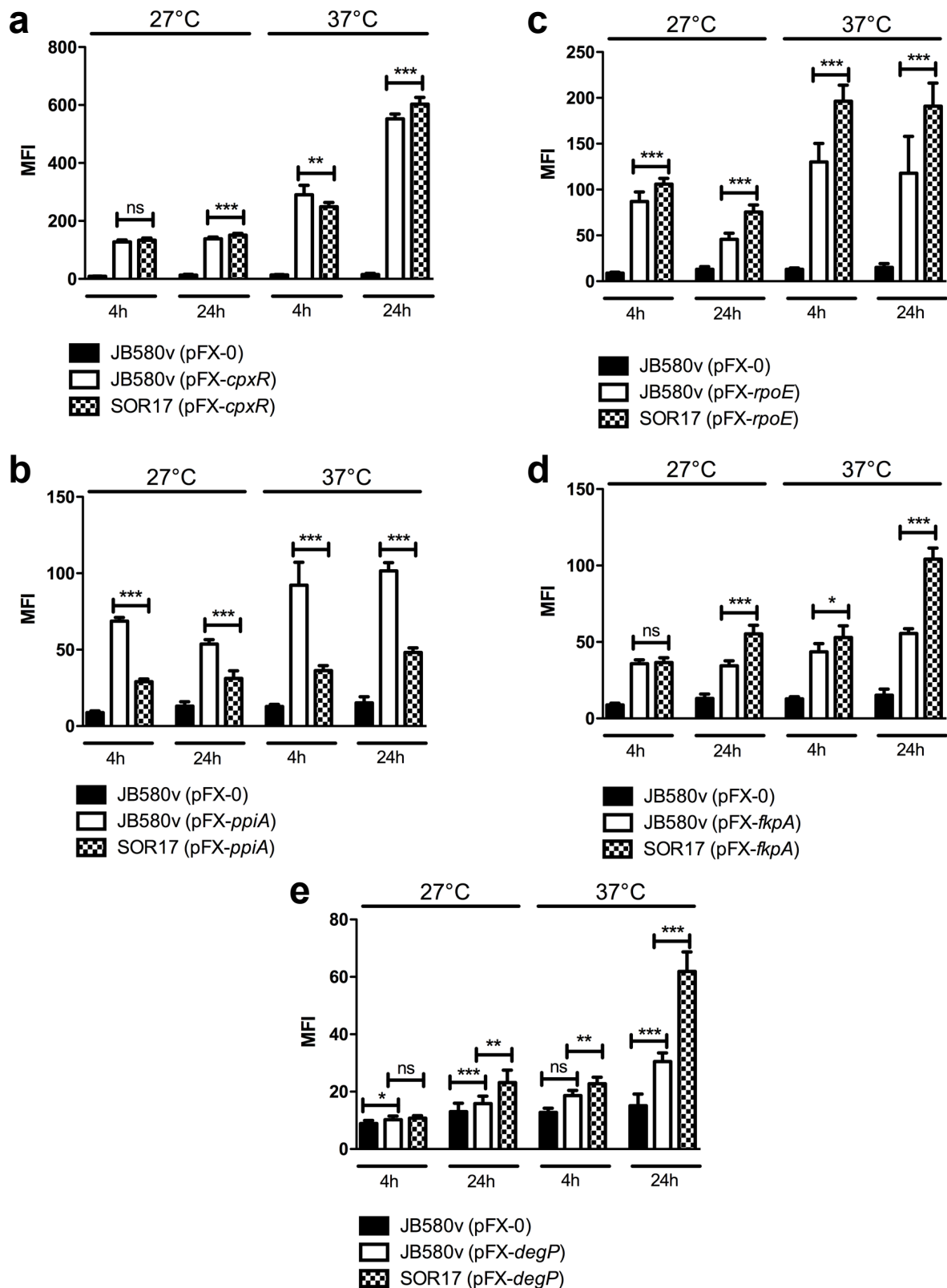
Zunächst wurden die in dieser Arbeit klonierten translationalen Fusionen der ESR-Regulons zugehörigen Gene mit *gfp* in *Y. enterocolitica* JB580v und die *hfq*-Mutante SOR17 transformiert, um deren GFP-Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie zu quantifizieren. Hierfür wurde das isogene Paar JB580v/SOR17 mit translationalen *gfp*-Fusionen bei 27°C (optimale Wachstumstemperatur für *Yersinia*) und 37°C (Temperatur bei Infektion) für vier Stunden (exponentielle Wachstumsphase) und 24 Stunden inkubiert (stationäre Wachstumsphase), bevor Proben für die Durchflusszytometrie-Messung entnommen und in PBS verdünnt wurden. Untersucht wurden die CpxR-ESR-regulierten Gene *cpxR* und *ppiA* (Abb. 12 a, b) und die RpoE-ESR-regulierten Gene *rpoE*, *fkpA* und *degP* (Abb. 12 c, d, e). Negativkontrolle für Hintergrund-Fluoreszenz der Einzelbakterien war in allen Versuchen *Y. enterocolitica* JB580v mit dem pFX-0 Plasmid (promotorloses *gfp*).

Der Stamm JB580v mit dem Reporterplasmid pFX-*cpxR* (Abb. 12 a) zeigt keine klaren Unterschiede der *gfp*-Expression verglichen mit der *gfp*-Expression in der *hfq*-Mutante SOR17. Dagegen ist die mittlere Fluoreszenzintensität der *ppiA*'-*gfp* Reporterexpression bei 27°C bzw. 37°C im Stamm SOR17 in beiden Wachstumsphasen um über 50% geringer verglichen mit der mittleren Fluoreszenzintensität des Stammes JB580v. Im Vergleich zur Expression von *cpxR*'-*gfp* wird *ppiA*'-*gfp*, unabhängig von der Wachstumsphase und der Inkubationstemperatur, geringer exprimiert.

Die *rpoE*'-*gfp* Expression ist in der *hfq*-Mutante SOR17 bei allen Wachstumsbedingungen im Vergleich zu JB580v deutlich höher (Abb. 12c): In exponentieller Wachstumsphase (nach vier Stunden) kommt es zu einem Anstieg bei 27°C um 22% und bei 37°C um 51%; in stationärer Wachstumsphase (nach 24 Stunden) kommt es zu einer Steigerung bei 27°C um 65% und bei 37°C um 62%. Auch die Expression des RpoE-abhängigen *fkpA* ist in der *hfq*-Mutante im Vergleich zum Stamm JB580v verändert. In exponentieller Wachstumsphase ist bei 37°C und in stationärer Wachstumsphase bei beiden Temperaturen die *fkpA*'-*gfp* Expression der *hfq*-Mutante SOR17 signifikant gesteigert. Dieser Effekt ist besonders bei 37°C in stationärer Wachstumsphase ausgeprägt, hier kommt es fast zu einer Verdopplung der *fkpA*'-*gfp* Expression im Stamm SOR17 im Vergleich zur *fkpA*'-*gfp* Expression im Stamm JB580v.

Schließlich zeigt die *hfq*-Mutante auch eine gesteigerte Expression des RpoE-abhängigen Gens *degP*. Bei 37°C ist die *degP*'-*gfp* Expression in exponentieller Wachstumsphase um 22% ( $P \leq 0,01$ ) und in stationärer Wachstumsphase um mehr als das Doppelte ( $P \leq 0,001$ ) in der *hfq*-Mutante SOR17 gesteigert.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Deletion des Gens für das RNA Chaperon Hfq das RpoE-ESR-Regulon positiv beeinflusst, insbesondere in der stationären Wachstumsphase. Dagegen wirkt sich die *hfq*-Deletion auf das CpxR-ESR-Regulon negativ aus.



**Abb. 12: Expression von CpxR- bzw. RpoE-ESR-abhängigen Genen in Wildtyp und *hfq*-Mutante.** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von *Y. enterocolitica* JB580v und *hfq*-Mutante SOR17 mit translationalen Reporterfusionen aus *cpxR'-gfp* (a), *ppiA'-gfp* (b), *rpoE'-gfp* (c), *fkpA'-gfp* (d) und *degP'-gfp* (e). Die Stämme wurden für vier Stunden (exponentielle Wachstumsphase) oder 24 Stunden (stationäre Wachstumsphase) inkubiert und dann in PBS für die Durchflusszytometrie verdünnt. Die Ergebnisse sind als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ± SD der Einzelbakterien dargestellt. Es wurden vier unabhängige Experimente (n=4), jeweils in Duplikaten pro Stamm durchgeführt. \*\*\* P ≤ 0,001; \*\* P ≤ 0,01; \* P ≤ 0,05; ns, nicht signifikant.

### 3.5.2 Quantitative PCR zur Untersuchung der ESR-Genexpression

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen mit translationalen *gfp*-Reporterfusionen konnten zeigen, dass die Expression von CpxR- und RpoE-ESR-regulierten Genen in *hfq*-Mutanten SOR17 verändert ist. So ist die Expression des CpxR-ESR-regulierten Gens *ppiA* in SOR17 signifikant vermindert, während die RpoE-ESR-regulierten Gene in der *hfq*-Mutante vermehrt exprimiert werden (siehe Abschnitt 3.5.1). Um die Transkription ESR-regulierter Gene direkt zu quantifizieren, wurden Versuche mit quantitativer PCR (qPCR) durchgeführt. Zudem wurden die zentralen regulatorischen Gene von drei weiteren ESR-Signalwegen untersucht (*baeR*, *rcsB*, *pspA*).

Es wurde Gesamt-RNA aus *Y. enterocolitica* Stamm JB580v und der *hfq*-Mutante SOR17 isoliert und eine reverse Transkription in cDNA durchgeführt (Abschnitt 2.2.2.3 und 2.2.2.4), um die relative Transkription der spezifischen ESR-regulierten Gene zu vergleichen .

Als Referenz-Gene in der qPCR wurden *gyrB* (Gyrase B Gen) und *16S rRNA* verwendet. Durch die Normalisierung zu Referenz-Genen sind die Ergebnisse als relative Werte zu betrachten. Es muss bedacht werden, dass der Standard, der durch Referenz-Gene festgelegt wird, variabel ist. Als eine signifikante Änderung der ESR-abhängigen Genexpression wird eine Änderung um 1, bei  $\text{Log}_2$  des normalisierten *Fold Change* zum Referenz-Gen, angesehen. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 zusammengefasst und zeigen jeweils für 27°C bzw. 37°C die zu *gyrB* oder *16S rRNA* normalisierten qPCR-Ergebnisse.

Die CpxR-ESR-regulierten Gene *cpxR*, *cpxA* und *ppiA* zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine signifikante Änderung ihrer Genexpression/Transkriptmengen in der *hfq*-Mutante. Allerdings zeichnet sich für *ppiA* eine Tendenz ab, die mit den translationalen *gfp*-Fusionen in der durchflusszytometrischen Untersuchung korrelieren (Abb. 13 vgl. Abb. 12 b). Die Expression von *ppiA* in der *hfq*-Mutante ist in der durchflusszytometrischen Untersuchung im Vergleich zum Stamm JB580v vermindert. In der qPCR ist die Transkription von *ppiA* ebenfalls vermindert, aber verglichen zum Stamm JB580v im Durchschnitt des  $\text{Log}_2 \text{ Norm Fold Change}$  nur um -0,44 bei 27°C und um -0,47 bei 37°C (Abb. 13 a, b).

Das *cpxA*-Gen ist ebenfalls von zentraler Bedeutung des CpxR-ESR-Signalweges und kodiert für den membrangebundenen Sensor CpxA. Bei 27°C zeigt sich eine verminderte *cpxA* Transkription in der *hfq*-Mutante (Durchschnitt des  $\text{Log}_2 \text{ Norm Fold Change}$  -0,35), während es bei 37°C zu einer vermehrten *cpxA* Expression (+0,28) in der *hfq*-Mutante kommt (Abb. 13 a, b). Diese Effekte erreichen allerdings keine statistische Signifikanz.

Die Transkription von *rpoE* ist bei beiden Temperaturen in der *hfq*-Mutante verglichen zum Wildtyp signifikant erhöht. Bei 27°C ist der durchschnittliche  $\text{Log}_2 \text{ Norm Fold Change}$  +1,09 und bei 37°C sogar +1,76 (Abb. 13 a, b). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen

der translationalen *rpoE'*-*gfp* Fusionen in Abb. 12 c (exponentielle Wachstumsphase). In beiden Versuchen wird *rpoE* in der *hfq*-Mutante stärker exprimiert und in beiden Versuchen ist der Effekt bei 37°C ausgeprägter als bei 27°C.

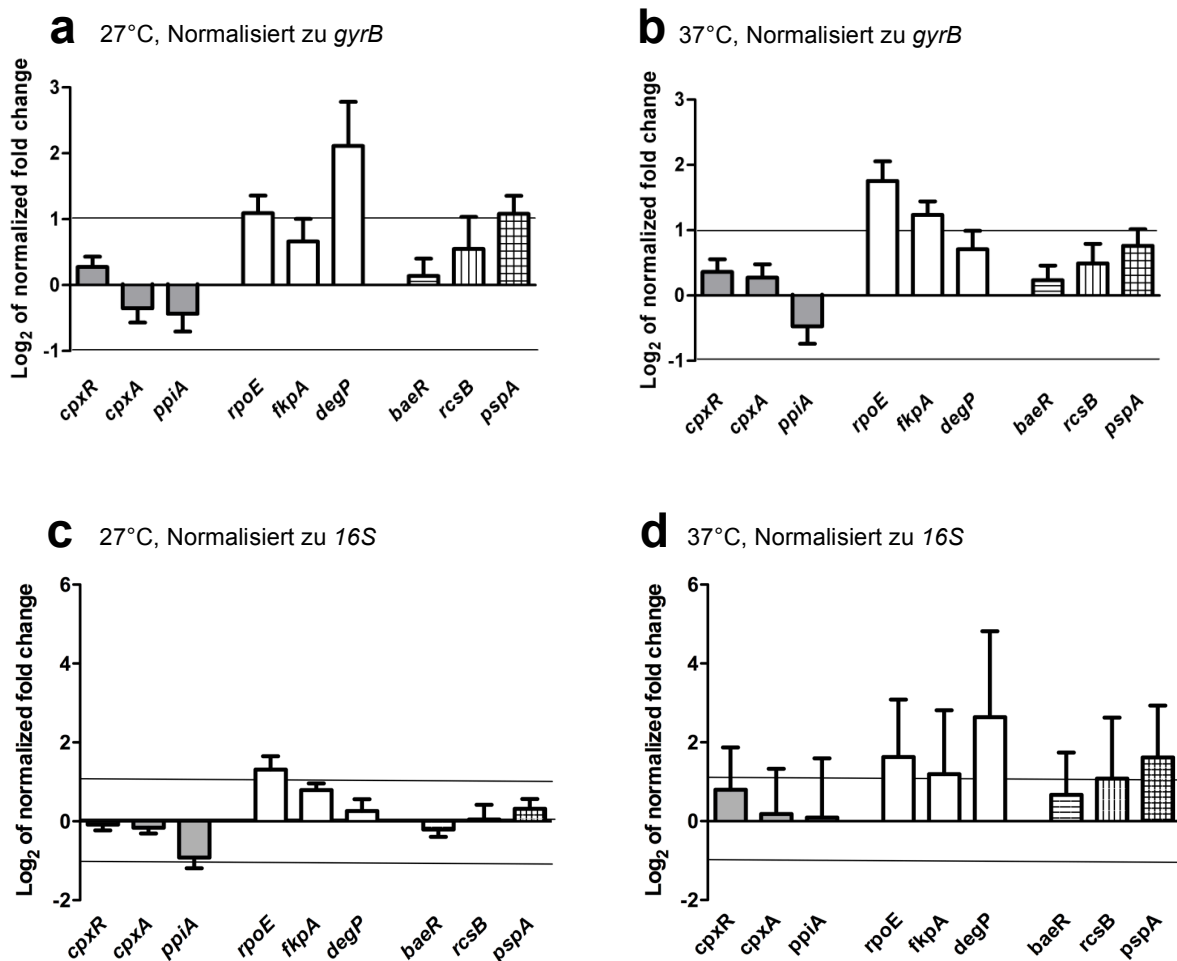
Die *fkpA* Transkription ist in der *hfq*-Mutante bei 27°C verglichen zum Wildtyp nicht signifikant verändert (durchschnittlicher *Log<sub>2</sub> Norm Fold Change* +0,66) (Abb. 13 a). Bei 37°C dagegen zeigt sich eine erhöhte *fkpA* Transkription in der *hfq*-Mutante (durchschnittlicher *Log<sub>2</sub> Norm Fold Change* +1,23) (Abb. 13 b). Wie auch die Ergebnisse der *rpoE* Transkription, korreliert die *fkpA* Transkription mit den Ergebnissen der translationalen *rpoE'*-*gfp* bzw. *fkpA'*-*gfp* Fusionen (Abb. 12 d). In der Durchflusszytometrie gab es bei 27°C in exponentieller Wachstumsphase keinen signifikanten Unterschied der *fkpA'*-*gfp* Expression zwischen Wildtyp und *hfq*-Mutante. Nur bei 37°C und in exponentieller Wachstumsphase war die *fkpA* Expression in der *hfq*-Mutante signifikant gesteigert.

Die *degP* Transkription wird bei 27°C am stärksten durch die Abwesenheit von Hfq beeinflusst. Allerdings zeigen die Ergebnisse eine ausgeprägte Variabilität. Der durchschnittliche *Log<sub>2</sub> Norm Fold Change* beträgt +2,11 (Abb. 13 a). Dieses Ergebnis korreliert nicht mit den Ergebnissen der translationalen Reporterfusionen (Abb. 12 e). In den durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigt sich kein signifikanter Unterschied der *degP'*-*gfp* Expression zwischen dem Wildtyp und der *hfq*-Mutante. Nur in stationärer Wachstumsphase (nach 24 Stunden), ist die *degP* Transkription in der *hfq*-Mutante signifikant gesteigert. Bei 37°C ist kein signifikanter Unterschied der *degP* Transkription zwischen Wildtyp und *hfq*-Mutante erkennbar (durchschnittlicher *Log<sub>2</sub> Norm Fold Change* +0,7) (Abb. 13 b). Auf translationaler Ebene dagegen, ist sowohl in exponentieller als auch in stationärer Wachstumsphase bei 37°C eine vermehrte *degP'*-*gfp* Expression quantifizierbar gewesen (Abb. 12 e).

Zusätzlich zu den CpxR- und RpoE-ESR-regulierten Genen wurde die Transkription drei weiterer ESR-abhängiger Gene untersucht. Die Gene *baeR*, *rCSB* und *pspA* gehören den gleichnamigen ESR-Signalwegen BaeR, Rcs und Psp an und kodieren für zentrale Bestandteile der Signalwege (siehe Abschnitt 1.4). Die drei Gene wurden auf ihre Abhängigkeit von Hfq untersucht. Das *baeR* Gen zeigt weder bei 27°C noch bei 37°C eine veränderte Transkription in der *hfq*-Mutante verglichen zum Wildtyp. Die Transkription des *rCSB* Gens ist in der *hfq*-Mutante gesteigert (durchschnittlicher *Log<sub>2</sub> Norm Fold Change* bei 27°C +0,55 und bei 37°C +0,49), allerdings ist dieser Effekt nicht statistisch signifikant. Die *pspA* Transkription zwischen *hfq*-Mutante und Wildtyp liegt bei einem durchschnittlichen *Log<sub>2</sub> Norm Fold Change* von +1,08 bei 27°C und +0,76 bei 37°C. Es kommt somit zu einer vermehrten *pspA* Transkription in der *hfq*-Mutante, allerdings erreicht dieser Effekt auch keine statistische Signifikanz.



In Abb. 13 c und 13 d sind die Ergebnisse, normalisiert zu dem Referenz-Gen *16S rRNA*, dargestellt. Durch die Normalisierung zu *16S rRNA* haben die Werte bei 27°C eine stärkere Variabilität. Trotz Variabilität decken sich die Ergebnisse mit denen, die zu *gyrB* normalisiert wurden (Abb. 13 a). Dasselbe trifft auch auf die Experimente bei 37°C zu (Abb. 13 b und 13 d). Einzige Ausnahme bilden die Gene *cpxA* und *baeR*. Die Werte dieser beiden Gene zeigen im Vergleich zur Normalisierung zu *gyrB* eine verminderte Transkription in der *hfq*-Mutante verglichen zum Wildtyp.



**Abb. 13: Vergleich der ESR-abhängigen Transkription in *Y. enterocolitica* JB580v und *hfq*-Mutante SOR17 mit qPCR.** Die Änderungen der Gen-Transkription in der *Y. enterocolitica* *hfq*-Mutante SOR17 im Vergleich zum Stamm JB580v wurde mittels qPCR ermittelt. Dargestellt ist der Log<sub>2</sub> des *Fold Change* zwischen der *hfq*-Mutante SOR17 und dem Stamm JB580v, normalisiert zu den Referenz-Genen *gyrB* (a, b) oder *16S rRNA* (c, d). Eine Änderung des Log<sub>2</sub> des normalisierten *Fold Change* um mindestens „1“ wird als signifikante Veränderung der Gen-Transkription zwischen SOR17 und JB580v bewertet. Die Gesamt-RNA Isolierung erfolgte aus drei unabhängigen Experimenten. Hierfür wurden der Stamm JB580v und die *hfq*-Mutante SOR17 für vier Stunden bei 27°C (a, c) bzw. bei 37°C (b, d) inkubiert.

#### 4 Diskussion

*Y. enterocolitica* ist eine Gram-negative Bakterienart, die als Modellorganismus für das Verständnis von mikrobiellen Pathogenitätsmechanismen in der infektionsbiologischen Forschung genutzt wird. Ihre Pathogenitätsfaktoren spielen eine wichtige Rolle für die erfolgreiche Infektion eines Wirtes und das extrazelluläre Überleben der Bakterien im Wirt.

Eine bakterielle Infektion löst im Wirt zunächst eine angeborene Immunantwort aus (Komplementsystem, neutrophile Granulozyten u.a.), die wiederum im Erreger eine Stressantwort induziert (Carlsson *et al.*, 2007a; Rowley *et al.*, 2006). Der Erreger produziert unter anderem verstärkt Defensine (äußere Membranproteine wie YadA, InvA, OmpX, Ail) und vermehrt sich.

Stresssignalwege, wie der CpxR- und der RpoE-*envelope stress response* (ESR)-Signalweg reagieren u.a. auf fehlgefaltete Proteine im Periplasma, die ihren Zielort, die äußere Membran, nicht erreichen. Die beiden oben genannten ESR-Signalwege können diese Proteintransportdefekte durch Kopplung an stressinduzierte Transkriptionsfaktoren ausgleichen, die positiv auf die Expression von Genen für periplasmatische Chaperone und Proteasen wirken. Periplasmatisch wirksame Chaperone und Proteasen sind wichtig, um die Homöostase von Oberflächenproteinen zu erhalten. DegP ist eines dieser periplasmatischen Chaperone, das zum einen fehlgefaltete Proteine abbaut und zum anderen an der korrekten Faltung von äußeren Membranproteinen im Periplasma beteiligt ist (Mogensen und Otzen, 2005). Die Zusammensetzung der Oberflächenproteine, Proteasen und Chaperone muss bei wechselnden Umgebungsbedingungen angepasst werden, um das Überleben der Bakterien zu sichern. ESR-Signalwege können Änderungen der Umgebung wahrnehmen und führen u.a. zu einer Modifikation der Proteinexpression.

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden genotypisch unterschiedlichen, mausvirulenten *Y. enterocolitica* Stämme JB580v und WA-314 vom Serotyp O:8 verwendet, um den Effekt ESR-abgängiger Genüberexpression auf das Wachstum von *Y. enterocolitica* sowie auf die Expression der Protease DegP und der Adhäsine OmpX, Ail, YadA und Invasin zu charakterisieren (Garzetti *et al.*, 2012; Hayashidani *et al.*, 1995; Heesemann *et al.*, 1984). Die ESR-zugehörigen Gene *cpxR* bzw. *rpoE* wurden durch einen Arabinose-induzierbaren Promotor überproduziert, um Zellwandstress zu simulieren. Die Auswirkung auf die Adhäsin-Produktion und Genexpression wurde mittels Immunoblot, GFP-Reporterfusionen und quantitativer PCR untersucht.

#### **4.1 Vermehrte Expression der *envelope stress response*-abhängigen Gene *cpxR* bzw. *rpoE* hemmen das Wachstum von *Y. enterocolitica***

Durch die Klonierung der ESR-zugehörigen Gene *cpxR* und *rpoE* unter Kontrolle des P<sub>BAD</sub> Promotors, konnte der Effekt vermehrter Transkription auf das Wachstum von *Y. enterocolitica* Stamm JB580v und Stamm WA-314 gezeigt werden. Die beiden Gene *cpxR* und *rpoE* kodieren jeweils für die Regulatoren ihrer ESR-Signalwege. Es handelt sich also um ein Konstrukt, bei dem die Transkription der vollständigen Gene *cpxR* und *rpoE* künstlich induziert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Transkription von *cpxR* bzw. *rpoE* zu einer starken Hemmung des Wachstums von *Y. enterocolitica* führt. Die Versuche wurden jeweils bei 27°C (optimale Wachstumstemperatur für *Yersinia*) bzw. 37°C (Temperatur bei Infektion) durchgeführt. Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt abhängig von der Wachstumsphase bei Induktion der Transkription ist, wurde die Transkription der Gene sowohl in früher (nach einer Stunde) als auch in mittlerer exponentieller Wachstumsphase (nach vier Stunden) induziert. In beiden *Y. enterocolitica* Stämmen wurden die gleichen Effekte durch vermehrte Transkription von *cpxR* bzw. *rpoE* festgestellt: (i) Vermehrte *cpxR* Transkription inhibierte das Wachstum von *Y. enterocolitica*, (ii) vermehrte *rpoE* Transkription führt zu einer noch stärkeren Hemmung des Wachstums als bei *cpxR* Überexpression (Abb. 3 und 4). Da die gleichen Ergebnisse in beiden *Y. enterocolitica* Stämmen gewonnen wurden, ist dies ein Hinweis darauf, dass die beiden ESR-Signalwege für Serotyp O:8 Stämme charakteristisch sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Ergebnisse von Rönnebäumer *et al.*, die zeigten, dass bei *cpxR* Überexpression kein Wachstum mehr stattfindet (Rönnebäumer *et al.*, 2009). Des Weiteren zeigten De Wulf *et al.*, dass eine CpxR Überproduktion einen negativen Einfluss auf die Vermehrung von *E. coli* hat (De Wulf *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse sind Hinweis dafür, dass CpxR physiologische Mechanismen beeinflusst, die entscheidend für die Vermehrung der Bakterien sind.

In den Versuchen dieser Arbeit hatte die vermehrte Transkription von *cpxR* einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von *Y. enterocolitica*. Die Translation von *cpxR* mRNA in CpxR und die Phosphorylierung in CpxR-P wurde in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft, da dies in der Literatur bereits beschrieben wurde (Carlsson *et al.*, 2007b; Danese *et al.*, 1995; Rönnebäumer *et al.*, 2009). CpxA ist der Sensor des CpxR-ESR-Signalweges. In der Literatur sind für CpxA zwei Funktionen beschrieben, zum einen ist CpxA eine Sensor-Kinase, welche den Regulator CpxR bei *envelope stress* phosphoryliert und zum anderen eine Phosphatase, um bei fehlendem *envelope stress* das CpxR-P zu dephosphorylieren/inaktivieren (Raivio und Silhavy, 1997). Dadurch wird das CpxR/CpxR-P

Verhältnis im Bakterium reguliert. Der Regulator CpxR wird allerdings nicht nur durch CpxA phosphoryliert, sondern auch ESR-unabhängig durch z.B. Acetylphosphat (Danese und Silhavy, 1998; Danese *et al.*, 1995; DiGiuseppe und Silhavy, 2003). Die vermehrte Transkription von *cpxR* führt zu Überexpression des Regulators CpxR, der bei fehlendem *envelope stress* unspezifisch phosphoryliert wird (Danese *et al.*, 1995). Durch die induzierte Überexpression entsteht so viel CpxR/CpxR-P, dass die Kapazität der CpxA Phosphatase überschritten wird. CpxR-P kann nicht mehr ausreichend dephosphoryliert werden und das CpxR/CpxR-P Verhältnis verschiebt sich zu Gunsten des CpxR-P (Carlsson *et al.*, 2007b). Sowohl in *E. coli* als auch in *Y. pseudotuberculosis* autoaktiviert CpxR-P das *cpxRA* Operon, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine vermehrte *cpxR* Transkription zu vermehrtem CpxR-P führt (Carlsson *et al.*, 2007b; De Wulf *et al.*, 1999; Raivio *et al.*, 1999). Zudem zeigten Pogliano *et al.*, dass nicht nur CpxR-P an DNA bindet, sondern auch das nicht-phosphorylierte CpxR, wenn auch mit einer deutlich niedrigeren Affinität (Pogliano *et al.*, 1997). Es kann also in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen werden, dass die vermehrte *cpxR* Transkription zu einer Überexpression von CpxR bzw. CpxR-P in *Y. enterocolitica* und dies in der Folge zu einer Hemmung der Zellteilung führt.

Neben den bereits durchgeführten Versuchen unter *cpxR*- bzw. *rpoE*-Überexpression wäre es interessant, das Wachstum von *cpxR*- bzw. *rpoE*-negativen *Y. enterocolitica* zu untersuchen, um den Einfluss eines fehlenden ESR-Signalweges charakterisieren zu können. Allerdings wurde in der Literatur beschrieben, dass sowohl in *E. coli* als auch in *Y. enterocolitica* das *rpoE* Gen essentiell ist. RpoE Mutanten sind für die untersuchten Bakterien letal (De Las Penas *et al.*, 1997; Heusipp *et al.*, 2003). Während *rpoE* ein essentielles Gen ist, zeigen *cpxR*-negative *Y. enterocolitica* bei 26°C bzw. bei 37°C keinen Wachstumsdefekt (Heusipp *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die von Rönnebäumer *et al.* zeigten, dass eine Überexpression von *cpxR* nicht nur das Wachstum von *Y. enterocolitica* inhibiert, sondern auch die Expression von *rpoE* reduziert (Rönnebäumer *et al.*, 2009). Da *rpoE* ein essentielles Gen ist, kann dies ein Grund für eine Inhibierung des Wachstums unter *cpxR* Überexpression sein. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass der aktive CpxR-ESR-Signalweg selbst zu einer Inhibierung des Wachstums führt.

Neben den Effekten auf das Wachstum durch vermehrte Transkription von *cpxR* bzw. *rpoE* konnte in den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten auch ein Einfluss auf die Expression der periplasmatischen Protease DegP und die Expression von vier Adhäsinen (OmpX, Ail, YadA, Invasin) und der Regulatoren CpxR und RpoE nachgewiesen werden.

## 4.2 Vermehrte Expression der periplasmatischen Protease DegP unter *rpoE* Überexpression

Die meisten Gene, die durch den CpxR- oder den RpoE-ESR-Signalweg reguliert werden, kodieren für Proteine, die Produktion und Homöostase von Proteinen der äußeren Bakterienmembran (*outer membrane proteins*, OMP) kontrollieren (Rowley *et al.*, 2006). In *E. coli* wird die Genexpression für die periplasmatische Protease DegP von beiden Signalwegen reguliert (Danese *et al.*, 1995; Dartigalongue *et al.*, 2001; Pogliano *et al.*, 1997).

In den durchflusszytometrischen Versuchen (*gfp*-Reporterfusionen) der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass *degP'-gfp* bei 37°C stärker als bei 27°C exprimiert wird. Auch Heusipp *et al.* konnten für *degP* in Wildtyp *Y. enterocolitica* ähnliche Ergebnisse zeigen (Heusipp *et al.*, 2004). Wie in dieser Arbeit und in der Literatur gezeigt werden konnte, ist die Genexpression der Protease DegP abhängig von dem CpxR-ESR-Signalweg (Danese *et al.*, 1995; Heusipp *et al.*, 2004). Dies weist darauf hin, dass es bei 37°C (Temperatur bei Infektion des Wirtes) zumindest *in vitro* zu einer *stress response*-abhängigen *degP* Expression kommt. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass die *degP* Expression und die Produktion von DegP durch vermehrte *rpoE* Genexpression stark gesteigert wird. Heusipp *et al.* zeigten dagegen, dass eine Überexpression von RpoE durch einen IPTG-induzierbaren Promotor nur zu einer gering vermehrten Expression von *degP* führt (Heusipp *et al.*, 2004). Dies könnte an verschiedenen Konstrukten sowie unterschiedlichen Induktoren (Arabinose in der vorliegenden Arbeit versus IPTG bei Heusipp *et al.*, 2004) liegen. Auch in *E. coli* führt eine *rpoE* Überexpression zu einem starken Anstieg der *degP* Expression (Danese *et al.*, 1995). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die bisherigen Ergebnisse in *Y. enterocolitica* und zeigen darüber hinaus, dass eine vermehrte Genexpression von DegP auch zu einer vermehrten Proteinproduktion in den Bakterien führt.

Im Immunoblot konnte DegP im *Y. enterocolitica* Stamm JB580v bzw. Stamm WA-314 mit Leervektor oder bei *cpxR*-Überexpression nicht nachgewiesen werden. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass die *degP* Expression durch *cpxR* Überexpression verglichen mit Stamm JB580v mit Leervektor abnimmt. Die GFP-Fluoreszenz der translationalen *degP'-gfp*-Fusion ist in *Y. enterocolitica* mit Leervektor in der Durchflusszytometrie nur schwach messbar, weil *degP* ohne *rpoE* Überexpression nur gering exprimiert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen denen von Rönnebäumer *et al.*, die in  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäts-Assays zeigten, dass eine Überproduktion von CpxR in *Y. enterocolitica* (ebenfalls Stamm JB580v, O:8) zu vermehrter Transkription von *degP* führt. Im Gegensatz dazu zeigten Rönnebäumer *et al.* auch, dass eine Überexpression von nicht-phosphorylierbarem CpxR (durch eine Punktmutation) zu verminderter *degP* Transkription

führt (Rönnebäumer *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse suggerieren eine komplexe Rolle des CpxR bei der Regulation der *degP* Expression. Die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und von Rönnebäumer *et al.*, 2009 könnten zum einen an verschiedenen Konstrukten liegen, da die *degP'-gfp* Reporterfusion der vorliegenden Arbeit eine translationale Fusion darstellt und *degP'-lacZ* eine transkriptionelle Fusion ist. Zum anderen können unterschiedliche Ergebnisse an unterschiedlichen Konstrukten zur Induktion der Genexpression (Arabinose versus IPTG) liegen. Die Induktoren Arabinose und IPTG können den Zellmetabolismus unterschiedlich beeinflussen, insbesondere weil für den *lacZ*-Reporter die Bakterienzellen für das Substrat mit Chloroform permeabel gemacht werden muss. Zudem wurde die Phosphorylierung von CpxR in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

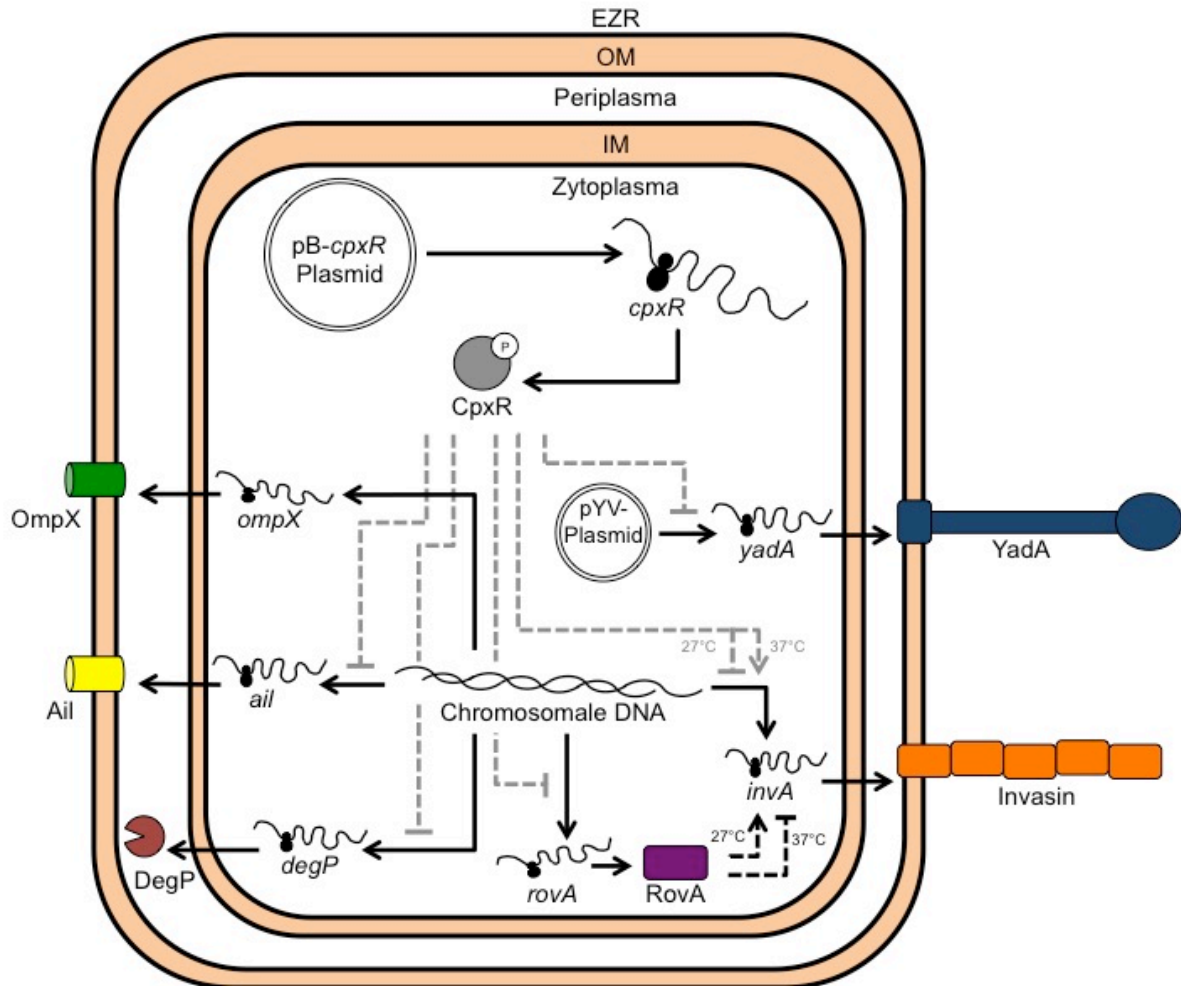
In *cpxR*-negativen *Y. enterocolitica* wird *degP* vermehrt exprimiert. Dieser Effekt wurde von Heusipp *et al.* beschrieben und war bei 37°C stärker als bei 27°C ausgeprägt (Heusipp *et al.*, 2004). Heusipp *et al.* schlossen daraus, dass die *degP* Expression von einem intakten CpxR-ESR-Signalweg abhängig ist. Im Einklang mit den Ergebnissen von Heusipp *et al.* konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die *cpxR* Überexpression die Expression von *degP* hemmt. Der Effekt der *cpxR* Überexpression auf die *degP* Expression ist auch in der vorliegenden Arbeit bei 37°C stärker als bei 27°C ausgeprägt.

Für *E. coli* wurde beschrieben, dass nicht nur der CpxR-ESR-Signalweg für die Expression von DegP von Bedeutung ist, sondern auch, dass DegP eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des CpxR-ESR-Signalweges spielt. Unter *envelope stress* wird die Inhibierung des Sensors CpxA durch den Inhibitor CpxP aufgehoben, da dieser durch DegP proteolytisch abgebaut wird (Buelow und Raivio, 2005; Isaac *et al.*, 2005). Schon 1996 konnten Li *et al.* zeigen, dass *degP*-negative *Y. enterocolitica* anfälliger für *envelope stress* durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder hohe Temperaturen sind (Li *et al.*, 1996). Dies unterstreicht die Rolle des DegP in den *stress response* Funktionen der Bakterien.

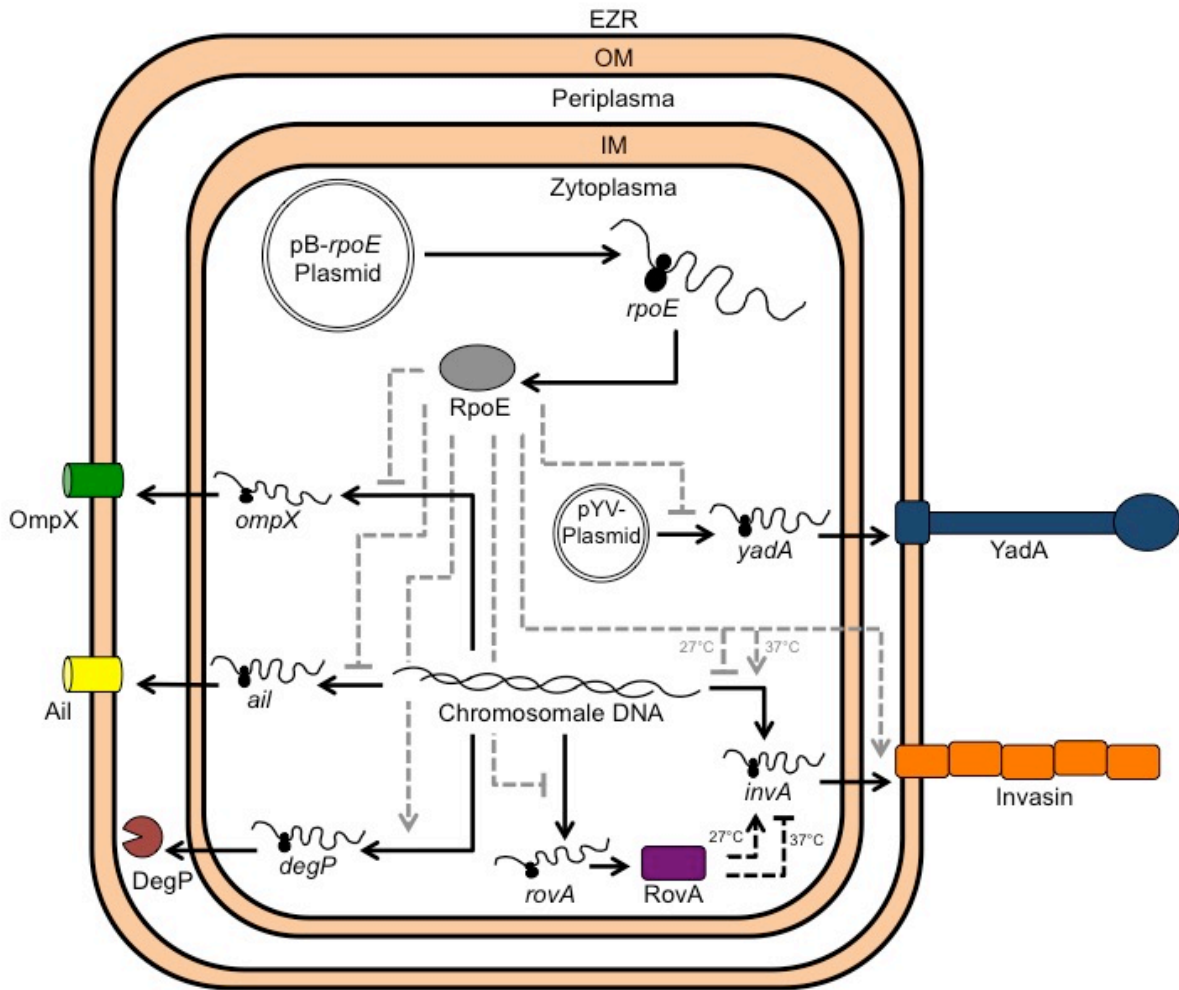
Zusammenfassend findet eine geringe *degP* Expression ohne *envelope stress* statt und eine vermehrte *rpoE* Genexpression führt zu einem starken Anstieg der *degP* Genexpression und DegP Proteinproduktion (Abb. 6).

Heusipp *et al.* zeigten, dass eine Ail Überproduktion in *Y. enterocolitica* zu einer verminderten Expression von *rpoE* führte. Gleichzeitig führte eine Ail Überproduktion zu vermehrter Expression von *degP*. In *cpxR*-negativen *Y. enterocolitica* führte die Überproduktion von Ail nicht zu einer vermehrten *degP* Expression. Diese Daten implizieren, dass eine vermehrte *degP* Expression durch Ail Überexpression nicht über RpoE reguliert wird. Alternativ ist eine Regulation durch den CpxR-ESR-Signalweg denkbar, der u.a. durch OMP Überexpression aktiviert wird. Es könnte sein, dass eine Ail-Überproduktion die DegP-

Proteaseaktivität und damit eine *envelope stress response* induziert (Heusipp *et al.*, 2004; Heusipp *et al.*, 2003).



**Abb. 14: Schematisches Modell zur Wirkung von CpxR auf die Produktion der periplasmatischen Protease DegP und der Adhäsine OmpX, Ail, YadA, Invasin und des Regulators der *invA*-Expression RovA.** *Y. enterocolitica* mit induzierbarem pB-*cpxR*-Plasmid. Die grau-gestrichelten Linien stellen die aktivierenden bzw. hemmenden Effekte des überproduzierten CpxR auf die Expression von *degP*, *ompX*, *ail*, *yadA*, *invA* und *rovA* dar. Die schwarz-durchgezogenen Pfeile symbolisieren Genexpression und Proteinproduktion in *Y. enterocolitica*. EZR: extrazellulären Raum; OM: *outer membrane* (äußere Bakterienmembran); IM: *inner membrane* (innere Bakterienmembran).



**Abb. 15: Schematisches Modell zur Wirkung von RpoE auf die Produktion der periplasmatischen Protease DegP und der Adhäsine OmpX, Ail, YadA, Invasin und des Regulators der *invA*-Expression RovA.** *Y. enterocolitica* mit induzierbarem pB-*rpoE*-Plasmid. Die grau-gestrichelten Linien stellen die aktivierenden bzw. hemmenden Effekte des überproduzierten RpoE auf die Expression von *degP*, *ompX*, *ail*, *yadA*, *invA* und *rovA* dar. Die schwarz-durchgezogenen Pfeile symbolisieren Genexpression und Proteinproduktion in *Y. enterocolitica*. EZR: extrazellulären Raum; OM: outer membrane (äußere Bakterienmembran); IM: inner membrane (innere Bakterienmembran).



### 4.3 Untersuchung von Adhäsinen unter vermehrter Expression von *cpxR* bzw. *rpoE*

In der Literatur wurden bereits Interaktionen zwischen ESR-Signalwegen wie dem EnvZ/OmpR-ESR-Signalweg und der Regulation von Pathogenitätsfaktoren in *Y. enterocolitica* beschrieben. Der EnvZ/OmpR-ESR-Signalweg ist - wie der CpxR-ESR-Signalweg - ein Zwei-Komponenten-System, das in *E. coli* und *Y. enterocolitica* u.a. auf Änderungen der Osmolarität oder pH reagiert und eine Überlebensreaktion der Bakterien auslöst (Aiba *et al.*, 1989; Brzostek *et al.*, 2003). In *Y. enterocolitica* reguliert der EnvZ/OmpR-ESR-Signalweg die Expression der Adhäsine Ail, OmpX, Invasin und YadA sowie die Motilität der Bakterien durch Regulation der Expression von Flagellen (Biedzka-Sarek *et al.*, 2008; Nieckarz *et al.*, 2016; Raczowska *et al.*, 2011; Skorek *et al.*, 2013).

Die Adhäsine sind für die Virulenz von *Y. enterocolitica* von Bedeutung und ihre Genexpression wurde in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich regulatorischer Effekte durch den CpxR- bzw. RpoE-ESR-Signalweg untersucht. In *E. coli* ist der CpxR-Signalweg mit der Regulation von Virulenzfaktoren und Infektiosität assoziiert (Dorel *et al.*, 2006; Hung *et al.*, 2001; Raivio, 2005). Die Invasion von Shigellen und Salmonellen in Wirtszellen ist ebenfalls von dem CpxR-ESR-Signalweg abhängig (Leclerc *et al.*, 1998; Nakayama und Watanabe, 1998). RpoE-negative *S. enterica* zeigen eine stark abgeschwächte Virulenz im Mausmodell (Humphreys *et al.*, 1999). In *E. coli* wurde gezeigt, dass die RpoE Produktion zu einem schnellen Abbau von *omp* (*outer membrane protein*, Proteine der äußeren Bakterienmembran) mRNA führt und so die bakterielle Homöostase der Zellhülle aufrechterhalten wird (Rhodius *et al.*, 2006).

Es ist bekannt, dass die Expression von ESR-zugehörigen Genen durch die Produktion von OMP moduliert wird (Heusipp *et al.*, 2004; Heusipp *et al.*, 2003; Meccas *et al.*, 1993; Meccas *et al.*, 1995). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Genexpression der Adhäsine in *Y. enterocolitica* wiederum durch den CpxR- und RpoE-ESR-Signalweg (Abb. 14 und 15) beeinflusst wird. Da die Umgebungstemperatur einen wichtigen Einfluss auf die Regulation der Genexpression der Adhäsine bei *Y. enterocolitica* hat, wurde in den Versuchen dieser Arbeit immer bei 27°C bzw. 37°C inkubiert.

**(I) OmpX.** In den durchflusszytometrischen Untersuchungen mit translationalen *ompX*'-*gfp*-Fusionen zeigte sich durch *cpxR* Überexpression kein Effekt auf die Expression von *ompX*. Daher kann nicht von einer Regulation der *ompX* Genexpression durch den CpxR-ESR-Signalweg in *Y. enterocolitica* ausgegangen werden.

In dieser Arbeit führte eine vermehrte *rpoE* Expression zu einer signifikant verminderten *ompX* Expression bei 27°C und 37°C. Die reduzierte *ompX* Expression durch *rpoE*

Überexpression ist nicht nur bei beiden Temperaturen reproduzierbar, sondern auch unabhängig vom Zeitpunkt der Induktion der *rpoE*-Überexpression.

Die Ergebnisse der *ompX* Reporterexpression in der Durchflusszytometrie wurden im Immunoblot sowohl im *Y. enterocolitica* Stamm JB580v als auch im Stamm WA-314 bestätigt (Abb. 7a, c). In beiden Stämmen ist die OmpX Gesamtproteinmenge bei Überexpression von *rpoE* deutlich vermindert. Jedoch waren diese Ergebnisse nicht immer reproduzierbar, so dass nur bei 27°C ein signifikanter Unterschied zwischen dem *Y. enterocolitica* Stamm JB580v mit pBAD24 (Kontrolle) und mit pB-*rpoE* in der semi-quantitativen Analyse nachzuweisen war (Abb. 7b).

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit denen in *E. coli*. Rhodius *et al.* zeigten, dass eine vermehrte RpoE Aktivität zum vermehrten Abbau von *ompX* mRNA führt und damit zu einer reduzierten Produktion von OmpX (Rhodius *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass eine Überproduktion von OmpX zu einer vermehrten Expression von *rpoE* führt (Mecsas *et al.*, 1993; Mecsas *et al.*, 1995). Für RpoE wurde bereits beschrieben, dass es die Expression von mindestens zwei sRNAs (MicA und CyaA) induziert, die beide an *ompX* mRNA durch komplementäre Basenpaarung binden und dadurch die Translation verhindern (Johansen *et al.*, 2008; Papenfort *et al.*, 2006).

In der Durchflusszytometrie konnte für *ompX*'-*gfp* Expression in *Y. enterocolitica* bei 37°C (Temperatur bei Infektion des Wirtes) eine höhere Produktion als bei 27°C nachgewiesen werden. Dies ist ein Hinweis für eine posttranskriptionelle Regulation der OmpX Produktion.

**(II) Ail.** Die vermehrte Expression der beiden ESR-Gene *cpxR* bzw. *rpoE* führt in beiden *Y. enterocolitica* Stämmen JB580v und WA-314 zu einer geringeren Ail Proteinproduktion als bei fehlender ESR-Induktion. Diese Ergebnisse waren allerdings nicht immer reproduzierbar und erreichten daher in der semi-quantitativen Analyse keine statistische Signifikanz. Auch bei Kakoschke *et al.* ist die Ail Genexpression sehr variabel zwischen einzelnen Experimenten (Kakoschke *et al.*, 2016).

In der Durchflusszytometrie zeigt sich eine signifikant geringere *ail*'-*gfp* Expression/Reporterproduktion unter *cpxR* bzw. *rpoE* Überexpression bei 27°C bzw. 37°C und bei Induktion der Genexpression in früher bzw. mittlerer exponentieller Wachstumsphase. Die Unterschiede der Immunoblot-Ergebnisse und der *gfp*-Reporter-Ergebnisse sind möglicherweise durch post-transkriptionellen RNA- und Protease-Abbau (Blockierung der Translation, Transkriptabbau) und post-translationale Regulationen (Proteolyse, Proteinsekretionsdefekte) zu erklären.

Carlson *et al.* zeigten, dass *cpxA*-negative *Y. pseudotuberculosis* eine reduzierte *ail* Transkription aufweisen (Carlsson *et al.*, 2007a, 2007b). Diese Ergebnisse sind mit der

vorliegenden Arbeit kompatibel, da eine Mutation in *cpxA* zu einer unkontrollierten Aktivierung von CpxR führt und somit auch zu einer Inhibierung der Ail Genexpression in *Y. pseudotuberculosis*. Ob die Abwesenheit von CpxA in *Y. enterocolitica* zu ähnlichen Effekten der *ail* Genexpression führt, wie eine *cpxR*-Überproduktion, ist bisher noch nicht geklärt, da CpxA in *Y. enterocolitica* essentiell zu sein scheint (Rönnebäumer *et al.*, 2009).

Pierson und Falkow zeigten, dass *ail* in exponentieller Wachstumsphase sowohl bei 30°C als auch bei 37°C in *Y. enterocolitica* exprimiert wird (Pierson und Falkow, 1993). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten allerdings deutlich, dass der *ail*'-*gfp* Reporter bei 37°C, also bei Infektionstemperatur des Wirtes, deutlich stärker produziert wird als bei niedrigerer Temperatur. Zusammen mit den Ergebnissen einer gesteigerten *ompX*'-*gfp* Expression bei 37°C spricht dies für eine differenzielle Regulation der Pathogenitätsfaktoren in *Y. enterocolitica* bei Umgebungstemperaturen des Wirtes.

**(III) YadA.** In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Adhäsın YadA durch ESR-Induktion vermindert produziert wird. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen bestätigen, dass das auf dem pYV-Plasmid kodierte *yadA* insbesondere bei 37°C exprimiert wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Abb. 9) zeigen, dass sowohl bei 27°C als auch bei 37°C eine verminderte *yadA* Genexpression durch *cpxR*- bzw. *rpoE*-Überexpression ausgelöst wird. Die Ergebnisse im Immunoblot korrelieren mit den Resultaten der durchflusszytometrischen Untersuchungen bei 37°C. In beiden *Y. enterocolitica* Stämmen JB580v und WA-314 wird *yadA* unter *cpxR*- bzw. *rpoE*-Induktion schwächer exprimiert. Allerdings ist der Effekt der *rpoE* Überexpression auf die YadA Produktion in *Y. enterocolitica* Stamm JB580v in der semi-quantitativen Analyse (siehe Abschnitt 2.2.8.2) nicht signifikant. Eine Regulation der *yadA* Expression durch ESR-Signalwege wurde bisher nicht beschrieben. Allerdings zeigte Carlson *et al.*, 2007a, dass CpxR die Expression von vier Genen auf dem pYV-Plasmid, die für Sekretionsproteine kodieren, hemmt. Phosphoryliertes CpxR ist in der Lage den *lcrF*-Promotor zu blockieren. Es ist also plausibel, dass die *yadA* Genexpression durch CpxR-Repression der *virF* Transkription gehemmt wird (Carlsson *et al.*, 2007a).

**(IV) Invasin und Genexpression von RovA.** Die InvA Produktion wurde in Immunoblots (Abb. 10) und die *invA*- bzw. *rovA*-Genexpression in der Durchflusszytometrie mit Hilfe translationaler *gfp*-Fusionen untersucht (Abb. 11a und b). RovA ist ein Regulator der *invA* Transkription. Bei 27°C fördert RovA die *invA* Transkription und bei 37°C wird die *invA* Transkription indirekt über RovA reduziert, weil es bei 37°C zu einer Konformationsänderung und Degradation von RovA kommt (Cathelyn *et al.*, 2007; Herbst *et al.*, 2009; Heroven *et al.*, 2007; Uliczka *et al.*, 2011).

Bisher wurde in der Literatur beschrieben, dass die Invasin-Produktion *in vitro* bei niedrigeren Temperaturen deutlich stärker als bei 37°C ist (Isberg *et al.*, 1988; Nagel *et al.*, 2001; Pepe *et al.*, 1994; Uliczka *et al.*, 2011). Anders als bisher in der Literatur beschrieben, ist die *invA*'-*gfp* Expression in der vorliegenden Arbeit im *Y. enterocolitica* Stamm JB580v mit Leervektor pBAD24 weitgehend unabhängig von der Umgebungstemperatur.

Die Induktion von CpxR führt nicht zu einer Veränderung der InvA Produktion, außer bei CpxR Induktion bei 27°C in mittlerer exponentieller Wachstumsphase (Reduktion der InvA Produktion um 40-50%). Unter *cpxR* Überexpression kommt es bei 27°C zu einer verminderten *invA* Expression und bei 37°C zu einer verstärkten *invA* Expression, wengleich dieser Effekt bei 37°C und Induktion der *cpxR* Expression in mittlerer exponentieller Wachstumsphase nicht signifikant ist. Somit zeigte sich die *invA* Expression bei *envelope stress* im Vergleich zu den anderen untersuchten Adhäsinen abhängig von der Umgebungstemperatur. Ein Zusammenhang zwischen der InvA Genexpression und Proteinproduktion konnte nicht immer beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass post-translationale Mechanismen eine zusätzliche Rolle bei der Regulation der InvA Expression spielen (Brzostek *et al.*, 2007).

Durch Überexpression von *rpoE* kommt es in früher exponentieller Wachstumsphase in beiden *Y. enterocolitica* Stämmen JB580v und WA-314 zu einer verstärkten Invasin Produktion. Die Zunahme der InvA Produktion korreliert allerdings nicht mit der *invA* Reporterexpression bei 27°C, bei der es zu einer Abnahme der Genexpression um etwa 25% kommt. Möglicherweise führt eine RpoE-ESR Induktion in früher exponentieller Wachstumsphase zu einem Schutz für InvA vor Proteasen oder zu einer verminderten Produktion von Proteasen, die InvA abbauen. Bei Induktion der RpoE-ESR in mittlerer exponentieller Wachstumsphase kommt es zu keiner signifikanten Änderung der InvA Produktion, während die *invA* Genexpression bei 27°C um etwa 50% abnimmt. Denkbar wäre eine RpoE-vermittelte Hemmung der *invA* Genexpression bei 27°C indirekt über einen von zahlreichen transkriptionalen Regulatoren von *invA*. Da nur eine geringe Korrelation zwischen der *invA* und *rovA* Genexpression beobachtet werden konnte, ist der Effekt von RpoE auf die *invA* Genexpression nur teilweise durch eine verminderte *rovA* Genexpression zu erklären.

Die Expression von *rovA* ist sowohl bei 27°C als auch bei 37°C durch Überexpression von *cpxR* und *rpoE* reduziert (siehe Abb. 14, 15). RovA fördert bei 27°C die *invA* Transkription (Cathelyn *et al.*, 2007; Heroven *et al.*, 2007) und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Überexpression von *cpxR* bzw. *rpoE* bei 27°C die Expression von *rovA* und *invA* reduzieren. Die Ergebnisse zeigen auch, dass es bei 37°C zu einer Reduktion der *rovA* Expression unter Überexpression ESR-zugehöriger Gene, aber es nicht zu einer Reduktion

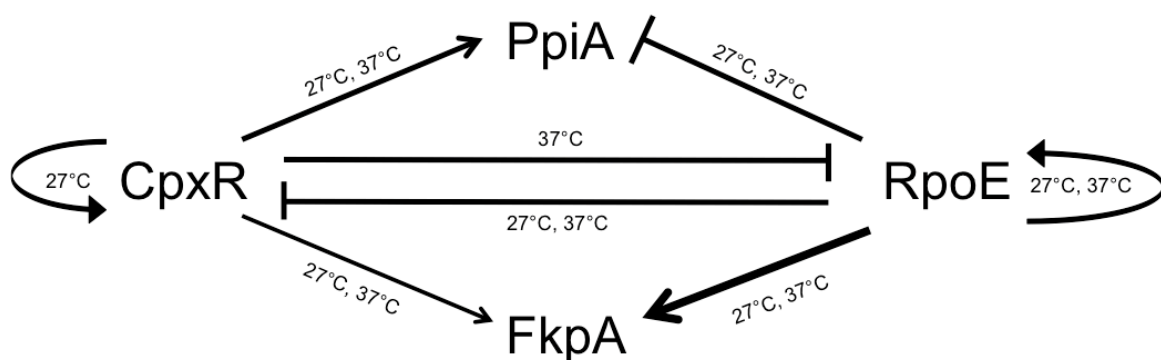
der *invA* Genexpression kommt. Uliczka *et al.* zeigten, dass die RovA-Bindung an DNA bei 37°C abnimmt und ein vermehrter RovA Abbau stattfindet, der wiederum in verminderter Transkription von *invA* resultiert (Uliczka *et al.*, 2011). Da RovA bei 37°C die *invA* Genexpression reduziert, kommt es bei *envelope stress*-bedingter Reduktion der *rovA* Genexpression zu einer Zunahme der *invA* Expression bei 37°C in früher exponentieller Wachstumsphase. Die *invA* Expression wird indirekt durch eine ESR-induzierte verminderte *rovA* Expression reduziert und nicht (nur) direkt über die Expression der ESR-Gene. In *Y. pseudotuberculosis* wurde gezeigt, dass CpxR-P direkt an den *invA* bzw. *rovA* Promotor bindet und als direkter Inhibitor auf die Transkription von *invA* bzw. *rovA* wirkt (Carlsson *et al.*, 2007b; Liu *et al.*, 2011). Die reduzierte *rovA* Transkription führt zu einer zusätzlichen, aber indirekten Hemmung der *invA* Transkription. Des Weiteren konnte in *Y. pseudotuberculosis* gezeigt werden, dass eine *cpxR* Deletion nicht nur zu vermehrter Transkription von *invA* und *rovA*, sondern in der Folge auch zu einer verbesserten Interaktion zwischen *Y. pseudotuberculosis* und eukaryotischen Zellen führt (Carlsson *et al.*, 2007b). Ob CpxR-P auch in *Y. enterocolitica* direkt an den *invA* Promotor bindet und/oder ob *envelope stress* einen indirekten Effekt über RovA auf die *invA* Expression hat, bedarf weiterer Abklärung.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es unter vermehrter Expression zweier ESR-Regulatoren zu einer reduzierten Expression der untersuchten Adhäsine (OmpX, Ail, YadA, InvA) kommt. Eine Ausnahme bildet das Invasin bei Überexpression von *rpoE*. Dies spricht dafür, dass OMP nicht oder nur vermindert während *envelope stress* an die Bakterienoberfläche transportiert werden oder im Periplasma proteolytisch degradiert werden, um zusätzlichen *envelope stress* zu vermeiden. Obwohl inzwischen zahlreiche Stressoren bekannt sind, die zu einer Aktivierung der ESR-Signalwege führen (z.B. Temperatur, Hyperosmolarität u.v.m.) (Rowley *et al.*, 2006), wird davon ausgegangen, dass das eigentlich aktivierende Signal für die Aktivität der ESR-Signalwege fehlgefaltete OMP im Periplasma sind (Mecsas *et al.*, 1993; Missiakas *et al.*, 1996; Raivio und Silhavy, 1999).

Da *omp* mRNA i.d.R. eine lange Halbwertszeit hat (von Gabain *et al.*, 1983), ist eine zügige Inaktivierung und Degradierung wichtig, um die Homöostase der bakteriellen Zellhülle während sistiertem Wachstum und/oder *envelope stress* zu erhalten, z.B. um die Expression von fehlgefalteten OMP an der Zelloberfläche zu verhindern (Costanzo und Ades, 2006). Möglicherweise wird die Herabregulation der OMP durch ESR-Signalwege zusätzlich durch ESR-zugehörige sRNA und Chaperone wie Hfq verstärkt. Ob eine Interaktion zwischen dem Chaperon Hfq und CpxR- bzw. RpoE-ESR-zugehörigen Gentranskripten in *Y. enterocolitica* besteht, wird im letzten Abschnitt dieser Diskussion besprochen.

#### 4.4 Wechselwirkungen zwischen dem CpxR- und dem RpoE-ESR-Regulon

In diesem Teil der Arbeit sollte die Interaktion zwischen den beiden ESR-Signalwegen und deren Wirkung auf die zwei periplasmatischen Chaperone/PPIasen PpiA und FkpA charakterisiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die bereits beschriebenen Wechselwirkungen zwischen ESR-Signalwegen und der Expression von periplasmatischen Chaperonen in *E. coli* und in *Y. enterocolitica* (Chen *et al.*, 2016; Guzman *et al.*, 1995; Heusipp *et al.*, 2004; Price und Raivio, 2009; Raivio und Silhavy, 1999). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist in Abb. 16 schematisch dargestellt.



**Abb. 16: Regulatorisches Netzwerk zwischen dem CpxR- und dem RpoE-ESR-Signalweg bei 27°C und 37°C.** Die Abbildung stellt eine schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dar: Positive und negative regulatorische Einflüsse auf die Produktion der jeweiligen Faktoren.

In *E. coli* wird die Transkription von *ppiA* durch den CpxR-ESR-Signalweg positiv beeinflusst (De Wulf *et al.*, 2002; Pogliano *et al.*, 1997) und auch für *Y. enterocolitica* konnte gezeigt werden, dass die verstärkte Genexpression der PPIase PpiA dem CpxR-ESR-Signalweg zugeordnet werden kann (Rowley *et al.*, 2006). Wie zu erwarten, hat eine vermehrte Transkription von *cpxR* in der vorliegenden Arbeit einen positiven Einfluss auf die Expression von *ppiA*. Diese positive Regulation der *ppiA* Expression basiert sehr wahrscheinlich auf der bereits experimentell in *E. coli* nachgewiesenen Bindung von CpxR an den Promotor von *ppiA* (Pogliano *et al.*, 1997).

Der RpoE-ESR-Signalweg kontrolliert in *E. coli* das Gen der periplasmatischen PPIase FkpA, indem RpoE die RNA Polymerase an den *fkpA* Promotor lenkt (Dartigalongue *et al.*, 2001; Rhodius *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte auch für *Y. enterocolitica* bestätigt werden, dass der RpoE-ESR-Signalweg die Expression von *fkpA* positiv beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass es durch Arabinose-induzierte Überexpression von *cpxR* zu vermehrter *cpxR-gfp* Expression, im Sinne einer positiven Rückkopplung kommt. Dieser Effekt war in der vorliegenden Arbeit nur bei 27°C zu beobachten. Auch in der

Arbeit von Rönnebäumer *et al.*, 2009 führt eine Überproduktion von CpxR zu einer vermehrten *cpxR* Transkription, die bei 27°C stärker ausgeprägt ist als bei 37°C. Rönnebäumer *et al.* haben diese Effekte allerdings nur durch transkriptionelle Fusionen zeigen können, in der vorliegenden Arbeit dagegen wurden die oben beschriebenen Effekte durch translationale Fusionen gezeigt.

Des Weiteren hat die Überexpression von *cpxR* bei 37°C einen hemmenden Effekt auf die Expression von *rpoE*. Rönnebäumer *et al.* zeigten, dass die Transkription von *cpxR* autoreguliert und durch CpxR-Überproduktion verstärkt wird. Die Transkription von *rpoE* wird durch CpxR-Überproduktion vermindert (Rönnebäumer *et al.*, 2009). Auch in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass CpxR-P die Expression des RpoE-Signalweges hemmt (De Wulf *et al.*, 2002). Rönnebäumer *et al.* konnten nachweisen, dass die Phosphorylierung des CpxR für die Aktivierung oder Inhibierung der Transkription von *cpxR* oder *rpoE* nicht notwendig ist (Rönnebäumer *et al.*, 2009). Daraus lässt sich schließen, dass CpxR sowohl als positiver (z.B. Transkriptionsaktivator) als auch als negativer Regulator (z.B. Repressor) der Transkription fungieren kann.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass *rpoE* Überexpression einen fördernden Effekt auf seine eigene Expression hat. Auf die Expression von *cpxR* und *ppiA* wirkt es hingegen hemmend. Da RpoE ein Aktivator der Transkription ist, ist sein negativer Einfluss auf die Expression von *cpxR* bzw. *ppiA* am ehesten indirekt, beispielsweise über sRNAs.

Aus den Ergebnissen kann man schließen, dass die Autoregulation der ESR-Signalwege über ein positives Feedback sicherstellt, dass es zu einer schnellen Zunahme von Proteinen kommt, die wichtig für die Erhaltung der Homöostase der Bakterienmembran unter *envelope stress* sind.

Vergleicht man die GFP-Reporterfusionsergebnisse der Stämme JB580v mit Leervektor pBAD24 untereinander, fällt auf, dass nur *fkpA* *envelope stress*-abhängig exprimiert wird. Die Gene *cpxR*, *ppiA* und *rpoE* werden dagegen auch *envelope stress*-unabhängig exprimiert. Auch in *E. coli* ist der RpoE-ESR-Signalweg sowohl unter *envelope stress* Bedingungen als auch bei normalem Wachstum aktiv (Ades, 2004; Alba und Gross, 2004; Ruiz und Silhavy, 2005).

#### 4.5 Interaktion zwischen dem CpxR- bzw. RpoE-ESR-Signalweg und dem RNA Chaperon Hfq

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Abwesenheit des Chaperons Hfq zu einem verlangsamten Wachstum von *Y. enterocolitica* (*hfq*-Deletionsmutante SOR17) und einer veränderten Zellmorphologie führt. Außerdem konnte in SOR17 gezeigt werden, dass neben verschiedenen Stoffwechselproteinen, Proteine der äußeren Bakterienmembran und auch Chaperone und Proteasen, die in *envelope stress* involviert sind, vermehrt produziert werden (Kakoschke *et al.*, 2014). Eine der Proteasen, die in der *hfq*-Mutante vermehrt nachgewiesen werden konnte, war die periplasmatische Protease DegP.

Da sowohl in der Literatur als auch in dieser Arbeit eine Interaktion zwischen DegP und dem CpxR- bzw. RpoE-ESR-Signalweg beschrieben wurde (Danese *et al.*, 1995; Dartigalongue *et al.*, 2001; Heusipp *et al.*, 2004; Pogliano *et al.*, 1997), sollte eine mögliche Interaktion zwischen Hfq und den ESR-Signalwegen in *Y. enterocolitica* charakterisiert werden. Ein Zusammenhang zwischen Hfq und ESR-Signalwegen wurde bereits in Salmonellen und in *E. coli* beschrieben (Ding *et al.*, 2004; Figueroa-Bossi *et al.*, 2006; Guisbert *et al.*, 2007; Vogt und Raivio, 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass in *Y. enterocolitica* die ESR-Signalwege CpxR und RpoE in Abhängigkeit von Hfq reguliert werden. Mit Hilfe von GFP-Reporterfusionen und quantitativer-PCR konnte gezeigt werden, dass eine *hfq*-Mutante (i) eine vermehrte Expression von RpoE-ESR-abhängigen Genen (*rpoE*, *fkpA*, *degP*) aufweist und (ii) eine deutlich verminderte *ppiA* Expression zeigt, wobei die Genexpression von *cpxR* und *cpxA* nicht verändert ist.

Unabhängig von Hfq zeigt *E. coli* in stationärer Wachstumsphase eine vermehrte Expression des *cpxRA* Operons, vermutlich, um eine adäquate CpxR-stress response bei Konditionen mit beschränkten Ressourcen sicherzustellen (De Wulf *et al.*, 1999). Dies lies sich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur teilweise bestätigen. Im *Y. enterocolitica* Stamm JB580v wird *cpxR* nur bei 37°C in stationärer Wachstumsphase vermehrt exprimiert, während sich bei 27°C kaum ein Unterschied der *cpxR* Expression zwischen exponentieller und stationärer Wachstumsphase zeigte. Allerdings muss in diesem Zusammenhang auch berücksichtigt werden, dass Konditionen, die zu einer Aktivierung des CpxR-ESR-Signalweges führen, für *Yersinia* und *E. coli* zum Teil unterschiedlich sind (Rönnebäumer *et al.*, 2009; Rowley *et al.*, 2006).

Durch quantitative-PCR wurden weitere ESR-Signalwege auf einen potentiellen Zusammengang mit Hfq getestet und es konnte gezeigt werden, dass der Psp-ESR-



Signalweg in *hfq*-negativen Stämmen aktiviert wird, während die Expression des BaeR- und Rcs-ESR-Signalweges in einer *hfq*-Mutante annähernd gleichbleibend war.

Viele Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien können *envelope stress* wie beispielsweise oxidativen Stress oder einen niedrigen pH in Abwesenheit von *hfq* nicht kompensieren (Chao und Vogel, 2010). Auch in den drei humanpathogenen *Yersinia* Spezies wurde Hfq schon im Zusammenhang mit Stress-Resistenz beschrieben (Geng *et al.*, 2009; Kakoschke *et al.*, 2014; Schiano *et al.*, 2010). Allerdings war bislang nicht gezeigt worden, dass Hfq in humanpathogenen *Y. enterocolitica* auch die CpxR- und RpoE-ESR-Signalwege beeinflusst.

In einigen Bakterien-Spezies konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Hfq zu einer Induktion des RpoE-ESR-Signalweges führt. In Salmonellen wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von Hfq zu einer vermehrten Aktivität von RseA (siehe Abb. 2) und damit zu einer Aktivierung des RpoE-ESR-Signalweges führt (Figuroa-Bossi *et al.*, 2006). Die Aktivität von RseA ist abhängig von der Protease DegS und kann durch Expression des *hfq* Gens vollkommen aufgehoben werden. Figuroa-Bossi *et al.* zufolge beeinflusst ein Verlust von Hfq die *envelope* Biogenese und imitiert eine Stress-Kondition die zur Aktivierung des RpoE-ESR-Signalweges führt (Figuroa-Bossi *et al.*, 2006). In *E. coli*, *Salmonella* und *Vibrio cholera* führt ein Verlust von Hfq ebenfalls zur Induktion des RpoE-ESR-Signalweges (Ding *et al.*, 2004; Guisbert *et al.*, 2007; Sittka *et al.*, 2007; Vytvytska *et al.*, 1998; Vytvytska *et al.*, 2000) und zu einer abgeschwächten Virulenz von *E. coli in vitro* (Kulesus *et al.*, 2008). Kulesus *et al.* konnten auch zeigen, dass sich *rpoE*- und *hfq*-Mutanten phänotypisch sehr ähnlich sind.

Ein weiterer regulatorischer Mechanismus, der während *envelope stress* aktiviert wird, ist die Produktion von Hfq-bindender sRNA. Beispielsweise wurde für *E. coli* und *S. enterica* beschrieben, dass der RpoE-ESR-Signalweg die Expression der Hfq-bindenden sRNA MicA und RybB reguliert (Johansen *et al.*, 2006; Papenfort *et al.*, 2006). Des Weiteren kommt es durch Basenpaarung zwischen Hfq und MicA bzw. RybB zu einer RpoE-abhängigen Destabilisierung der mRNA von OMP (Johansen *et al.*, 2008). Insgesamt wurden in *E. coli* und in *S. enterica* mindestens neun sRNA beschrieben, welche die Produktion von OMP regulieren (Johansen *et al.*, 2008; Papenfort *et al.*, 2008; Vogel und Papenfort, 2006).

## 4.6 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten ESR-Signalwege CpxR und RpoE haben einen Effekt auf das Wachstum und die Pathogenität von *Y. enterocolitica*. Zudem regulieren sie die Produktion von Chaperonen sowie Proteasen im periplasmatischen Raum und stehen im Zusammenhang mit dem zentralen regulatorischen RNA Chaperon Hfq.

Dabei ist wichtig zu verstehen welche Umgebungsbedingungen - *in vitro* oder im Wirt - zu einer Induktion der ESR-Signalwege führen. Dieses Wissen würde dazu beitragen zu verstehen, wie die gegenseitige Regulation der Signalwege die Zusammensetzung der bakteriellen Zellhülle moduliert und dadurch die bakterielle Infektion positiv beeinflusst.

Aufgrund der regulatorischen Effekte (in früher exponentieller Wachstumsphase) durch die ESR-Signalwege auf die Expression von DegP und der vier Adhäsine, ist davon auszugehen, dass auch in *Y. enterocolitica* (Hfq-abhängige) sRNAs eine Rolle in der post-transkriptionalen Regulation während *envelope stress* spielen. Mit Northern Blot-Versuchen und RNA-Sequenzierung könnte man die Expression von spezifischen sRNAs unter ESR-Genexpression nachweisen, die möglicherweise Oberflächen-assoziierten Proteine post-transkriptional regulieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass Hfq in die post-transkriptionale Regulation der Adhäsine Ail, OmpX und YadA involviert ist (Kakoschke *et al.*, 2016), allerdings konnten bisher noch keine Hfq-bindenden sRNAs identifiziert werden.

Eine Analyse der RpoE-abhängigen Chaperone und Proteasen wäre notwendig, um deren Einfluss auf den Abbau oder den Schutz von Oberflächen-assoziierten Proteinen während *envelope stress* zu verstehen.

Für den BaeR- und Rcs-ESR-Signalweg wurde beschrieben, dass sie in *E. coli envelope stress* durch Antibiotika wahrnehmen und die Überlebenschancen der Bakterien verbessern. Ein aktivierter BaeR-ESR-Signalweg reduziert die intrazelluläre Antibiotika-Konzentration durch aktiven Transport der Substanzen aus der Zelle durch Effluxpumpen und der Rcs-ESR-Signalweg trägt zur intrinsischen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika-Resistenz von *E. coli* bei (Baranova und Nikaido, 2002; Laubacher und Ades, 2008). Ob verschiedene Antibiotika-Klassen (Hemmstoffe der Zellwand- oder Proteinbiosynthese sowie Antibiotika mit Wirkung auf die bakterielle Nukleinsäure) in steigenden Konzentrationen zu einer Induktion der ESR-Signalwege in *Y. enterocolitica* führen, könnte mittels translationaler *gfp*-Fusionen getestet werden. An *Y. enterocolitica* mit *cpxR*- bzw. *rpoE*-Überexpression könnte geprüft werden, ob die aktiven ESR-Signalwege zu einer erhöhten Toleranz gegenüber verschiedenen Antibiotika-Klassen führen.

## 5 Zusammenfassung

*Envelope stress response* (ESR)-Signalwege sind ein wichtiger Mechanismus von Bakterien, um wechselnde Umgebungsbedingungen wahrzunehmen und Schutzmaßnahmen zu aktivieren. Dadurch können sich Bakterien anpassen und verbessern ihr Überlebenschancen in einer lebensfeindlichen Umgebung. Die Anpassung erfolgt durch Änderungen der Expression von Genen beispielsweise für Pathogenitätsfaktoren, Proteasen und Chaperone. Anpassung von Bakterien und insbesondere die Entwicklung von Resistenzen gegen Antibiotika spielen eine wichtige klinische Rolle. Daher bildet das Verständnis der ESR-Signalwege eine attraktive Grundlage für die Entwicklung neuer antimikrobieller Strategien.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Expression der regulatorischen Gene *cpxR* bzw. *rpoE* das Wachstum von *Y. enterocolitica* hemmen. Ferner wurden die Wechselwirkungen zwischen den ESR-Signalwegen CpxR und RpoE untersucht. Dabei zeigte sich eine positive Autoregulation der beiden ESR-Signalwege und zum Teil eine gegenseitige Inhibierung.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die ESR-Signalwege CpxR und RpoE die Zusammensetzung der bakteriellen Zellhülle regulieren. Die Expression periplasmatischer Proteine und Oberflächen-assoziiertes Pathogenitätsfaktoren wird durch ESR-Signalwege auf verschiedenen Ebenen moduliert: Durch Hemmung der Transkription von beispielsweise Adhäsinen und durch post-translationale Regulationsmechanismen.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde eine Interaktion zwischen den ESR-Signalwegen und dem hochkonservierten Chaperon Hfq charakterisiert. Hfq hat durch post-transkriptionale Regulation einen wichtigen Einfluss auf das Wachstum, den Stoffwechsel und die Expression von Pathogenitätsfaktoren. Die Abwesenheit von Hfq induziert wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, die Expression der RpoE-ESR-regulierten Gene. Die Beziehung zwischen Hfq und dem RpoE-ESR-Signalweg lässt auf post-transkriptionale Effekte durch RpoE-abhängige sRNAs schließen.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der CpxR- und RpoE-ESR-Signalweg sowie das RNA Chaperon Hfq in *Y. enterocolitica* ein komplexes Netzwerk zur Regulation der *envelope* Homöostase und zur Regulation von Adhäsinen, die entscheidend für die Pathogenität und das Überleben im Wirt sind, darstellen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, H., Teertstra, W., Demmers, J., Boesten, R., & Tommassen, J. (2003). Interactions between phage-shock proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *185*(4), 1174-1180.
- Ades, S. E. (2004). Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol*, *7*(2), 157-162. doi:10.1016/j.mib.2004.02.010
- Aiba, H., Nakasai, F., Mizushima, S., & Mizuno, T. (1989). Evidence for the physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, *264*(24), 14090-14094.
- Alba, B. M., & Gross, C. A. (2004). Regulation of the *Escherichia coli* sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol*, *52*(3), 613-619. doi:10.1111/j.1365-2958.2003.03982.x
- Ansong, C., Yoon, H., Porwollik, S., Mottaz-Brewer, H., Petritis, B. O., Jaitly, N., Adkins, J. N., McClelland, M., Heffron, F., & Smith, R. D. (2009). Global systems-level analysis of Hfq and SmpB deletion mutants in *Salmonella*: implications for virulence and global protein translation. *PLoS One*, *4*(3), e4809. doi:10.1371/journal.pone.0004809
- Arie, J. P., Sassoon, N., & Betton, J. M. (2001). Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, *39*(1), 199-210.
- Arnold, T., Poynor, M., Nussberger, S., Lupas, A. N., & Linke, D. (2007). Gene duplication of the eight-stranded beta-barrel OmpX produces a functional pore: a scenario for the evolution of transmembrane beta-barrels. *J Mol Biol*, *366*(4), 1174-1184. doi:10.1016/j.jmb.2006.12.029
- Autenrieth, I. B., & Firsching, R. (1996). Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol*, *44*(4), 285-294. doi:10.1099/00222615-44-4-285
- Baranova, N., & Nikaido, H. (2002). The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol*, *184*(15), 4168-4176.
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, *65*, 189-213. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102946
- Beauregard, A., Smith, E. A., Petrone, B. L., Singh, N., Karch, C., McDonough, K. A., & Wade, J. T. (2013). Identification and characterization of small RNAs in *Yersinia pestis*. *RNA Biol*, *10*(3), 397-405. doi:10.4161/rna.23590
- Becker, L. A., Bang, I. S., Crouch, M. L., & Fang, F. C. (2005). Compensatory role of PspA, a member of the phage shock protein operon, in rpoE mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, *56*(4), 1004-1016. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04604.x
- Bialas, N., Kasperkiewicz, K., Radziejewska-Lebrecht, J., & Skurnik, M. (2012). Bacterial cell surface structures in *Yersinia enterocolitica*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, *60*(3), 199-209. doi:10.1007/s00005-012-0168-z

- Biedzka-Sarek, M., Jarva, H., Hyytiainen, H., Meri, S., & Skurnik, M. (2008). Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun*, 76(9), 4100-4109. doi:10.1128/iai.00313-08
- Biedzka-Sarek, M., Venho, R., & Skurnik, M. (2005). Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect Immun*, 73(4), 2232-2244. doi:10.1128/iai.73.4.2232-2244.2005
- Bliska, J. B., & Falkow, S. (1992). Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(8), 3561-3565.
- Bottone, E. J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev*, 10(2), 257-276.
- Bottone, E. J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect*, 1(4), 323-333.
- Brennan, R. G., & Link, T. M. (2007). Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol*, 10(2), 125-133. doi:10.1016/j.mib.2007.03.015
- Bringer, M. A., Barnich, N., Glasser, A. L., Bardot, O., & Darfeuille-Michaud, A. (2005). HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*, 73(2), 712-721. doi:10.1128/iai.73.2.712-721.2005
- Brisette, J. L., Russel, M., Weiner, L., & Model, P. (1990). Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(3), 862-866.
- Brzostek, K., Brzostkowska, M., Bukowska, I., Karwicka, E., & Raczowska, A. (2007). OmpR negatively regulates expression of invasin in *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology*, 153(Pt 8), 2416-2425. doi:10.1099/mic.0.2006/003202-0
- Brzostek, K., Raczowska, A., & Zasada, A. (2003). The osmotic regulator OmpR is involved in the response of *Yersinia enterocolitica* O:9 to environmental stresses and survival within macrophages. *FEMS Microbiol Lett*, 228(2), 265-271.
- Buelow, D. R., & Raivio, T. L. (2005). Cpx signal transduction is influenced by a conserved N-terminal domain in the novel inhibitor CpxP and the periplasmic protease DegP. *J Bacteriol*, 187(19), 6622-6630. doi:10.1128/jb.187.19.6622-6630.2005
- Carding, S. R., Lu, D., & Bottomly, K. (1992). A polymerase chain reaction assay for the detection and quantitation of cytokine gene expression in small numbers of cells. *J Immunol Methods*, 151(1-2), 277-287.
- Carlsson, K. E., Liu, J., Edqvist, P. J., & Francis, M. S. (2007a). Extracytoplasmic-stress-responsive pathways modulate type III secretion in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun*, 75(8), 3913-3924. doi:10.1128/iai.01346-06
- Carlsson, K. E., Liu, J., Edqvist, P. J., & Francis, M. S. (2007b). Influence of the Cpx extracytoplasmic-stress-responsive pathway on *Yersinia* sp.-eukaryotic cell contact. *Infect Immun*, 75(9), 4386-4399. doi:10.1128/iai.01450-06
- Cathelyn, J. S., Ellison, D. W., Hinchliffe, S. J., Wren, B. W., & Miller, V. L. (2007). The RovA regulons of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* are distinct: evidence that many RovA-regulated genes were acquired more recently than the core genome. *Mol Microbiol*, 66(1), 189-205. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05907.x

- Chao, Y., Papenfort, K., Reinhardt, R., Sharma, C. M., & Vogel, J. (2012). An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs. *Embo j*, *31*(20), 4005-4019. doi:10.1038/emboj.2012.229
- Chao, Y., & Vogel, J. (2010). The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*, *13*(1), 24-33. doi:10.1016/j.mib.2010.01.001
- Chao, Y., & Vogel, J. (2016). A 3' UTR-Derived Small RNA Provides the Regulatory Noncoding Arm of the Inner Membrane Stress Response. *Mol Cell*, *61*(3), 352-363. doi:10.1016/j.molcel.2015.12.023
- Chen, S., Thompson, K. M., & Francis, M. S. (2016). Environmental Regulation of Yersinia Pathophysiology. *Front Cell Infect Microbiol*, *6*, 25. doi:10.3389/fcimb.2016.00025
- Clark, M. A., Hirst, B. H., & Jepson, M. A. (1998). M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of Yersinia pseudotuberculosis to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun*, *66*(3), 1237-1243.
- Clausen, T., Southan, C., & Ehrmann, M. (2002). The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell*, *10*(3), 443-455.
- Cordeiro, R. P., Krause, D. O., Doria, J. H., & Holley, R. A. (2014). Role of the BaeSR two-component regulatory system in resistance of Escherichia coli O157:H7 to allyl isothiocyanate. *Food Microbiol*, *42*, 136-141. doi:10.1016/j.fm.2014.03.011
- Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M. P., & Stainier, I. (1998). The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev*, *62*(4), 1315-1352.
- Costanzo, A., & Ades, S. E. (2006). Growth phase-dependent regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, by guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp). *J Bacteriol*, *188*(13), 4627-4634. doi:10.1128/jb.01981-05
- Cover, T. L., & Aber, R. C. (1989). Yersinia enterocolitica. *N Engl J Med*, *321*(1), 16-24. doi:10.1056/nejm198907063210104
- Craig, J. E., Nobbs, A., & High, N. J. (2002). The extracytoplasmic sigma factor, final sigma(E), is required for intracellular survival of nontypeable Haemophilus influenzae in J774 macrophages. *Infect Immun*, *70*(2), 708-715.
- Danese, P. N., & Silhavy, T. J. (1997). The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in Escherichia coli. *Genes Dev*, *11*(9), 1183-1193.
- Danese, P. N., & Silhavy, T. J. (1998). CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol*, *180*(4), 831-839.
- Danese, P. N., Snyder, W. B., Cosma, C. L., Davis, L. J., & Silhavy, T. J. (1995). The Cpx two-component signal transduction pathway of Escherichia coli regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev*, *9*(4), 387-398.
- Dartigalongue, C., Missiakas, D., & Raina, S. (2001). Characterization of the Escherichia coli sigma E regulon. *J Biol Chem*, *276*(24), 20866-20875. doi:10.1074/jbc.M100464200
- Darwin, A. J. (2005). The phage-shock-protein response. *Mol Microbiol*, *57*(3), 621-628. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04694.x

- Darwin, A. J., & Miller, V. L. (1999). Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol*, 32(1), 51-62.
- Darwin, A. J., & Miller, V. L. (2001). The *psp* locus of *Yersinia enterocolitica* is required for virulence and for growth in vitro when the Ysc type III secretion system is produced. *Mol Microbiol*, 39(2), 429-444.
- Datta, P., Ravi, J., Guerrini, V., Chauhan, R., Neiditch, M. B., Shell, S. S., Fortune, S. M., Hancioglu, B., Igoshin, O. A., & Gennaro, M. L. (2015). The Psp system of *Mycobacterium tuberculosis* integrates envelope stress-sensing and envelope-preserving functions. *Mol Microbiol*, 97(3), 408-422. doi:10.1111/mmi.13037
- de Cock, H., Pasveer, M., Tommassen, J., & Bouveret, E. (2001). Identification of phospholipids as new components that assist in the in vitro trimerization of a bacterial pore protein. *Eur J Biochem*, 268(3), 865-875.
- De Koning-Ward, T. F., & Robins-Browne, R. M. (1995). Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*, 63(10), 3790-3795.
- De Las Penas, A., Connolly, L., & Gross, C. A. (1997). SigmaE is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 179(21), 6862-6864.
- De Wulf, P., Kwon, O., & Lin, E. C. (1999). The CpxRA signal transduction system of *Escherichia coli*: growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons. *J Bacteriol*, 181(21), 6772-6778.
- De Wulf, P., McGuire, A. M., Liu, X., & Lin, E. C. (2002). Genome-wide profiling of promoter recognition by the two-component response regulator CpxR-P in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 277(29), 26652-26661. doi:10.1074/jbc.M203487200
- Deuretzbacher, A., Czymmek, N., Reimer, R., Trulzsch, K., Gaus, K., Hohenberg, H., Heesemann, J., Aepfelbacher, M., & Ruckdeschel, K. (2009). Beta1 integrin-dependent engulfment of *Yersinia enterocolitica* by macrophages is coupled to the activation of autophagy and suppressed by type III protein secretion. *J Immunol*, 183(9), 5847-5860. doi:10.4049/jimmunol.0804242
- DiGiuseppe, P. A., & Silhavy, T. J. (2003). Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system. *J Bacteriol*, 185(8), 2432-2440.
- Ding, Y., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2004). Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. *Mol Microbiol*, 53(1), 345-354. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04142.x
- Dorel, C., Lejeune, P., & Rodrigue, A. (2006). The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol*, 157(4), 306-314. doi:10.1016/j.resmic.2005.12.003
- Dorel, C., Vidal, O., Prigent-Combaret, C., Vallet, I., & Lejeune, P. (1999). Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, 178(1), 169-175.
- Dube, P. H., Handley, S. A., Revell, P. A., & Miller, V. L. (2003). The *rovA* mutant of *Yersinia enterocolitica* displays differential degrees of virulence depending on the route of infection. *Infect Immun*, 71(6), 3512-3520.

- Emody, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skurnik, M., Kapperud, G., O'Toole, P., & Wadstrom, T. (1989). Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol*, *171*(12), 6674-6679.
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*, *3*(11), e3647. doi:10.1371/journal.pone.0003647
- Erickson, J. W., & Gross, C. A. (1989). Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev*, *3*(9), 1462-1471.
- Erickson, K. D., & Detweiler, C. S. (2006). The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/commensals and activates ydel, a gene important for persistent *Salmonella* infection of mice. *Mol Microbiol*, *62*(3), 883-894. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05420.x
- Farizano, J. V., Torres, M. A., Pescaretti Mde, L., & Delgado, M. A. (2014). The RcsCDB regulatory system plays a crucial role in the protection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against oxidative stress. *Microbiology*, *160*(Pt 10), 2190-2199. doi:10.1099/mic.0.081133-0
- Farris, C., Sanowar, S., Bader, M. W., Pfuetzner, R., & Miller, S. I. (2010). Antimicrobial peptides activate the Rcs regulon through the outer membrane lipoprotein RcsF. *J Bacteriol*, *192*(19), 4894-4903. doi:10.1128/jb.00505-10
- Feklistov, A., Sharon, B. D., Darst, S. A., & Gross, C. A. (2014). Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annu Rev Microbiol*, *68*, 357-376. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155737
- Figueroa-Bossi, N., Lemire, S., Maloriol, D., Balbontin, R., Casadesus, J., & Bossi, L. (2006). Loss of Hfq activates the sigmaE-dependent envelope stress response in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, *62*(3), 838-852. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05413.x
- Flores-Kim, J., & Darwin, A. J. (2014). Regulation of bacterial virulence gene expression by cell envelope stress responses. *Virulence*, *5*(8), 835-851. doi:10.4161/21505594.2014.965580
- Franze de Fernandez, M. T., Eoyang, L., & August, J. T. (1968). Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature*, *219*(5154), 588-590.
- Fröhlich, K. S., & Vogel, J. (2009). Activation of gene expression by small RNA. *Curr Opin Microbiol*, *12*(6), 674-682. doi:10.1016/j.mib.2009.09.009
- Gal-Mor, O., & Segal, G. (2003). Identification of CpxR as a positive regulator of icm and dot virulence genes of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, *185*(16), 4908-4919.
- Galindo, C. L., Rosenzweig, J. A., Kirtley, M. L., & Chopra, A. K. (2011). Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *J Pathog*, *2011*, 182051. doi:10.4061/2011/182051
- Garzetti, D., Bouabe, H., Heesemann, J., & Rakin, A. (2012). Tracing genomic variations in two highly virulent *Yersinia enterocolitica* strains with unequal ability to compete for host colonization. *BMC Genomics*, *13*, 467. doi:10.1186/1471-2164-13-467



- Geng, J., Song, Y., Yang, L., Feng, Y., Qiu, Y., Li, G., Guo, J., Bi, Y., Qu, Y., Wang, W., Wang, X., Guo, Z., Yang, R., & Han, Y. (2009). Involvement of the post-transcriptional regulator Hfq in *Yersinia pestis* virulence. *PLoS One*, 4(7), e6213. doi:10.1371/journal.pone.0006213
- Grabowicz, M., & Silhavy, T. J. (2017). Envelope Stress Responses: An Interconnected Safety Net. *Trends Biochem Sci*, 42(3), 232-242. doi:10.1016/j.tibs.2016.10.002
- Grassl, G. A., Kracht, M., Wiedemann, A., Hoffmann, E., Aepfelbacher, M., von Eichel-Streiber, C., Bohn, E., & Autenrieth, I. B. (2003). Activation of NF-kappaB and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell Microbiol*, 5(12), 957-971.
- Green, R. C., & Darwin, A. J. (2004). PspG, a new member of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein regulon. *J Bacteriol*, 186(15), 4910-4920. doi:10.1128/jb.186.15.4910-4920.2004
- Grigorova, I. L., Chaba, R., Zhong, H. J., Alba, B. M., Rhodius, V., Herman, C., & Gross, C. A. (2004). Fine-tuning of the *Escherichia coli* sigmaE envelope stress response relies on multiple mechanisms to inhibit signal-independent proteolysis of the transmembrane anti-sigma factor, RseA. *Genes Dev*, 18(21), 2686-2697. doi:10.1101/gad.1238604
- Grosskinsky, U., Schutz, M., Fritz, M., Schmid, Y., Lamparter, M. C., Szczesny, P., Lupas, A. N., Autenrieth, I. B., & Linke, D. (2007). A conserved glycine residue of trimeric autotransporter domains plays a key role in *Yersinia* adhesin A autotransport. *J Bacteriol*, 189(24), 9011-9019. doi:10.1128/jb.00985-07
- Guest, R. L., & Raivio, T. L. (2016). Role of the Gram-Negative Envelope Stress Response in the Presence of Antimicrobial Agents. *Trends Microbiol*, 24(5), 377-390. doi:10.1016/j.tim.2016.03.001
- Guisbert, E., Rhodius, V. A., Ahuja, N., Witkin, E., & Gross, C. A. (2007). Hfq modulates the sigmaE-mediated envelope stress response and the sigma32-mediated cytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 189(5), 1963-1973. doi:10.1128/jb.01243-06
- Guo, M. S., Updegrave, T. B., Gogol, E. B., Shabalina, S. A., Gross, C. A., & Storz, G. (2014). MicL, a new sigmaE-dependent sRNA, combats envelope stress by repressing synthesis of Lpp, the major outer membrane lipoprotein. *Genes Dev*, 28(14), 1620-1634. doi:10.1101/gad.243485.114
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 177(14), 4121-4130.
- Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Toyokawa, Y., Saito, M., Kaneko, K., Kosuge, J., Kato, M., Ogawa, M., & Kapperud, G. (1995). Sources of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 in Aomori Prefecture, Japan. *Contrib Microbiol Immunol*, 13, 29-32.
- Heesemann, J. (2001). Die Gattung *Yersinia*, Yersiniose in *Medizinische Mikrobiologie* (8. Auflage). Urban & Fischer: Köhler W., Eggers H.J., Fleischer B., Marre R., Pfister H., Pulverer G. (Hrsg.). ISBN 3-437-41640-5
- Heesemann, J. (2016). Pathogenität und Virulenz in *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (8. Auflage). Springer: Suerbaum S., Hahn H., Burchard G.-D., Kaufmann S.H.E., Schulz T.F. (Hrsg.). ISBN 13 978-3-642-24166-6

- Heesemann, J., Algermissen, B., & Laufs, R. (1984). Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*, *46*(1), 105-110.
- Heesemann, J., Keller, C., Morawa, R., Schmidt, N., Siemens, H. J., & Laufs, R. (1983). Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis*, *147*(1), 107-115.
- Heesemann, J., Sing, A., & Trulzsch, K. (2006). *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol*, *9*(1), 55-61. doi:10.1016/j.mib.2005.10.018
- Herbst, K., Bujara, M., Heroven, A. K., Opitz, W., Weichert, M., Zimmermann, A., & Dersch, P. (2009). Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA. *PLoS Pathog*, *5*(5), e1000435. doi:10.1371/journal.ppat.1000435
- Heroven, A. K., Bohme, K., Tran-Winkler, H., & Dersch, P. (2007). Regulatory elements implicated in the environmental control of invasin expression in enteropathogenic *Yersinia*. *Adv Exp Med Biol*, *603*, 156-166. doi:10.1007/978-0-387-72124-8\_13
- Heusipp, G., Nelson, K. M., Schmidt, M. A., & Miller, V. L. (2004). Regulation of htrA expression in *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett*, *231*(2), 227-235. doi:10.1016/s0378-1097(03)00962-5
- Heusipp, G., Schmidt, M. A., & Miller, V. L. (2003). Identification of rpoE and nadB as host responsive elements of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett*, *226*(2), 291-298.
- Hirakawa, H., Nishino, K., Yamada, J., Hirata, T., & Yamaguchi, A. (2003). Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, *52*(4), 576-582. doi:10.1093/jac/dkg406
- Hoicyk, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., & Heesemann, J. (2000). Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo j*, *19*(22), 5989-5999. doi:10.1093/emboj/19.22.5989
- Horne, S. M., Kottom, T. J., Nolan, L. K., & Young, K. D. (1997). Decreased intracellular survival of an fkpA mutant of *Salmonella typhimurium* Copenhagen. *Infect Immun*, *65*(2), 806-810.
- Hu, W. S., Li, P. C., & Cheng, C. Y. (2005). Correlation between ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression of outer membrane proteins OmpW and Ail/OmpX-like protein, which are regulated by BaeR of a two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*, *49*(9), 3955-3958. doi:10.1128/aac.49.9.3955-3958.2005
- Huang, Y. H., Ferrieres, L., & Clarke, D. J. (2006). The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol*, *157*(3), 206-212. doi:10.1016/j.resmic.2005.11.005
- Humphreys, S., Rowley, G., Stevenson, A., Anjum, M. F., Woodward, M. J., Gilbert, S., Kormanec, J., & Roberts, M. (2004). Role of the two-component regulator CpxAR in the virulence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect Immun*, *72*(8), 4654-4661. doi:10.1128/iai.72.8.4654-4661.2004
- Humphreys, S., Stevenson, A., Bacon, A., Weinhardt, A. B., & Roberts, M. (1999). The alternative sigma factor, sigmaE, is critically important for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, *67*(4), 1560-1568.

- Hung, D. L., Raivio, T. L., Jones, C. H., Silhavy, T. J., & Hultgren, S. J. (2001). Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *Embo j*, 20(7), 1508-1518. doi:10.1093/emboj/20.7.1508
- Huovinen, E., Sihvonen, L. M., Virtanen, M. J., Haukka, K., Siitonen, A., & Kuusi, M. (2010). Symptoms and sources of *Yersinia enterocolitica*-infection: a case-control study. *BMC Infect Dis*, 10, 122. doi:10.1186/1471-2334-10-122
- Isaac, D. D., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J., & Silhavy, T. J. (2005). The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(49), 17775-17779. doi:10.1073/pnas.0508936102
- Isberg, R. R., Swain, A., & Falkow, S. (1988). Analysis of expression and thermoregulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* inv gene with hybrid proteins. *Infect Immun*, 56(8), 2133-2138.
- Johansen, J., Eriksen, M., Kallipolitis, B., & Valentin-Hansen, P. (2008). Down-regulation of outer membrane proteins by noncoding RNAs: unraveling the cAMP-CRP- and sigmaE-dependent CyaR-ompX regulatory case. *J Mol Biol*, 383(1), 1-9. doi:10.1016/j.jmb.2008.06.058
- Johansen, J., Rasmussen, A. A., Overgaard, M., & Valentin-Hansen, P. (2006). Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins. *J Mol Biol*, 364(1), 1-8. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.004
- Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J. M., Lazzaroni, J. C., Lejeune, P., & Dorel, C. (2005). CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 187(6), 2038-2049. doi:10.1128/jb.187.6.2038-2049.2005
- Kakoschke, T., Kakoschke, S., Magistro, G., Schubert, S., Borath, M., Heesemann, J., & Rossier, O. (2014). The RNA chaperone Hfq impacts growth, metabolism and production of virulence factors in *Yersinia enterocolitica*. *PLoS One*, 9(1), e86113. doi:10.1371/journal.pone.0086113
- Kakoschke, T. K., Kakoschke, S. C., Zeuzem, C., Bouabe, H., Adler, K., Heesemann, J., & Rossier, O. (2016). The RNA Chaperone Hfq Is Essential for Virulence and Modulates the Expression of Four Adhesins in *Yersinia enterocolitica*. *Sci Rep*, 6, 29275. doi:10.1038/srep29275
- Kampik, D., Schulte, R., & Autenrieth, I. B. (2000). *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections. *Infect Immun*, 68(5), 2484-2492.
- Kenyon, W. J., Thomas, S. M., Johnson, E., Pallen, M. J., & Spector, M. P. (2005). Shifts from glucose to certain secondary carbon-sources result in activation of the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 151(Pt 7), 2373-2383. doi:10.1099/mic.0.27649-0
- Kinder, S. A., Badger, J. L., Bryant, G. O., Pepe, J. C., & Miller, V. L. (1993). Cloning of the YenI restriction endonuclease and methyltransferase from *Yersinia enterocolitica* serotype O8 and construction of a transformable R-M+ mutant. *Gene*, 136(1-2), 271-275.

- Kingston, A. W., Liao, X., & Helmann, J. D. (2013). Contributions of the sigma(W) , sigma(M) and sigma(X) regulons to the lantibiotic resistome of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, *90*(3), 502-518. doi:10.1111/mmi.12380
- Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A. M., Skurnik, M., & Meri, S. (2008). *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog*, *4*(8), e1000140. doi:10.1371/journal.ppat.1000140
- Kleerebezem, M., Crielaard, W., & Tommassen, J. (1996). Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *Embo j*, *15*(1), 162-171.
- Kleerebezem, M., Heutink, M., & Tommassen, J. (1995). Characterization of an *Escherichia coli* rotA mutant, affected in periplasmic peptidyl-prolyl cis/trans isomerase. *Mol Microbiol*, *18*(2), 313-320.
- Koo, J. T., Alleyne, T. M., Schiano, C. A., Jafari, N., & Lathem, W. W. (2011). Global discovery of small RNAs in *Yersinia pseudotuberculosis* identifies *Yersinia*-specific small, noncoding RNAs required for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(37), E709-717. doi:10.1073/pnas.1101655108
- Kovacikova, G., & Skorupski, K. (2002). The alternative sigma factor sigma(E) plays an important role in intestinal survival and virulence in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, *70*(10), 5355-5362.
- Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M., & Clausen, T. (2002). Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature*, *416*(6879), 455-459. doi:10.1038/416455a
- Kulesus, R. R., Diaz-Perez, K., Slechta, E. S., Eto, D. S., & Mulvey, M. A. (2008). Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, *76*(7), 3019-3026. doi:10.1128/iai.00022-08
- Kurabayashi, K., Hirakawa, Y., Tanimoto, K., Tomita, H., & Hirakawa, H. (2014). Role of the CpxAR two-component signal transduction system in control of fosfomycin resistance and carbon substrate uptake. *J Bacteriol*, *196*(2), 248-256. doi:10.1128/jb.01151-13
- Lahesmaa, R., Skurnik, M., Granfors, K., Mottonen, T., Saario, R., Toivanen, A., & Toivanen, P. (1992). Molecular mimicry in the pathogenesis of spondyloarthropathies. A critical appraisal of cross-reactivity between microbial antigens and HLA-B27. *Br J Rheumatol*, *31*(4), 221-229.
- Lambert de Rouvroit, C., Sluiters, C., & Cornelis, G. R. (1992). Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*, *6*(3), 395-409.
- Lasaro, M., Liu, Z., Bishar, R., Kelly, K., Chattopadhyay, S., Paul, S., Sokurenko, E., Zhu, J., & Goulian, M. (2014). *Escherichia coli* isolate for studying colonization of the mouse intestine and its application to two-component signaling knockouts. *J Bacteriol*, *196*(9), 1723-1732. doi:10.1128/jb.01296-13
- Laubacher, M. E., & Ades, S. E. (2008). The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol*, *190*(6), 2065-2074. doi:10.1128/jb.01740-07

- Leblanc, S. K., Oates, C. W., & Raivio, T. L. (2011). Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *193*(13), 3367-3375. doi:10.1128/jb.01534-10
- Leclerc, G. J., Tartera, C., & Metcalf, E. S. (1998). Environmental regulation of *Salmonella typhi* invasion-defective mutants. *Infect Immun*, *66*(2), 682-691.
- Lee, T., & Feig, A. L. (2008). The RNA binding protein Hfq interacts specifically with tRNAs. *Rna*, *14*(3), 514-523. doi:10.1261/rna.531408
- Leo, J. C., & Skurnik, M. (2011). Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. *Adv Exp Med Biol*, *715*, 1-15. doi:10.1007/978-94-007-0940-9\_1
- Li, S. R., Dorrell, N., Everest, P. H., Dougan, G., & Wren, B. W. (1996). Construction and characterization of a *Yersinia enterocolitica* O:8 high-temperature requirement (htrA) isogenic mutant. *Infect Immun*, *64*(6), 2088-2094.
- Li, Y., Hu, Y., Francis, M. S., & Chen, S. (2015). RcsB positively regulates the *Yersinia* Ysc-Yop type III secretion system by activating expression of the master transcriptional regulator LcrF. *Environ Microbiol*, *17*(4), 1219-1233. doi:10.1111/1462-2920.12556
- Lipinska, B., Fayet, O., Baird, L., & Georgopoulos, C. (1989). Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* htrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol*, *171*(3), 1574-1584.
- List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) Verfügbar unter: <http://www.bacterio.net/yersinia.html> (abgerufen am 22.09.2016)
- Liu, J., Obi, I. R., Thanikkal, E. J., Kieselbach, T., & Francis, M. S. (2011). Phosphorylated CpxR restricts production of the RovA global regulator in *Yersinia pseudotuberculosis*. *PLoS One*, *6*(8), e23314. doi:10.1371/journal.pone.0023314
- Long, C., Jones, T. F., Vugia, D. J., Scheffelt, J., Strockbine, N., Ryan, P., Shiferaw, B., Tauxe, R. V., & Gould, L. H. (2010). *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections, FoodNet, 1996-2007. *Emerg Infect Dis*, *16*(3), 566-567. doi:10.3201/eid1603.091106
- Majdalani, N., & Gottesman, S. (2005). The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol*, *59*, 379-405. doi:10.1146/annurev.micro.59.050405.101230
- Majdalani, N., Heck, M., Stout, V., & Gottesman, S. (2005). Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *187*(19), 6770-6778. doi:10.1128/jb.187.19.6770-6778.2005
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H., Govan, J. R., Holloway, B. W., & Deretic, V. (1993). Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(18), 8377-8381.
- Maxson, M. E., & Darwin, A. J. (2004). Identification of inducers of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein system and comparison to the regulation of the RpoE and Cpx extracytoplasmic stress responses. *J Bacteriol*, *186*(13), 4199-4208. doi:10.1128/jb.186.13.4199-4208.2004
- Mecenas, J., Rouviere, P. E., Erickson, J. W., Donohue, T. J., & Gross, C. A. (1993). The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev*, *7*(12b), 2618-2628.

- Mecenas, J., Welch, R., Erickson, J. W., & Gross, C. A. (1995). Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, *177*(3), 799-804.
- Mfold Web Server. (2003) Verfügbar unter: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>. (abgerufen am 12.09.2017)
- Miajlovic, H., Cooke, N. M., Moran, G. P., Rogers, T. R., & Smith, S. G. (2014). Response of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* to human serum reveals a protective role for Rcs-regulated exopolysaccharide colanic acid. *Infect Immun*, *82*(1), 298-305. doi:10.1128/iai.00800-13
- Miller, V. L., Beer, K. B., Heusipp, G., Young, B. M., & Wachtel, M. R. (2001). Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol Microbiol*, *41*(5), 1053-1062.
- Miller, V. L., & Falkow, S. (1988). Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun*, *56*(5), 1242-1248.
- Missiakas, D., Betton, J. M., & Raina, S. (1996). New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol Microbiol*, *21*(4), 871-884.
- Missiakas, D., Mayer, M. P., Lemaire, M., Georgopoulos, C., & Raina, S. (1997). Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol*, *24*(2), 355-371.
- Model, P., Jovanovic, G., & Dworkin, J. (1997). The *Escherichia coli* phage-shock-protein (psp) operon. *Mol Microbiol*, *24*(2), 255-261.
- Mogensen, J. E., & Otzen, D. E. (2005). Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol*, *57*(2), 326-346. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04674.x
- Mullineaux, C. W., Nenninger, A., Ray, N., & Robinson, C. (2006). Diffusion of green fluorescent protein in three cell environments in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *188*(10), 3442-3448. doi:10.1128/jb.188.10.3442-3448.2006
- Mutalik, V. K., Nonaka, G., Ades, S. E., Rhodius, V. A., & Gross, C. A. (2009). Promoter strength properties of the complete sigma E regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, *191*(23), 7279-7287. doi:10.1128/jb.01047-09
- Nagel, G., Lahrz, A., & Dersch, P. (2001). Environmental control of invasins expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol*, *41*(6), 1249-1269.
- Nakayama, S., Kushiro, A., Asahara, T., Tanaka, R., Hu, L., Kopecko, D. J., & Watanabe, H. (2003). Activation of hilA expression at low pH requires the signal sensor CpxA, but not the cognate response regulator CpxR, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, *149*(Pt 10), 2809-2817. doi:10.1099/mic.0.26229-0
- Nakayama, S., & Watanabe, H. (1998). Identification of cpxR as a positive regulator essential for expression of the *Shigella sonnei* virF gene. *J Bacteriol*, *180*(14), 3522-3528.

- Nevesinjac, A. Z., & Raivio, T. L. (2005). The Cpx envelope stress response affects expression of the type IV bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *187*(2), 672-686. doi:10.1128/jb.187.2.672-686.2005
- Nieckarz, M., Raczkowska, A., Debski, J., Kistowski, M., Dadlez, M., Heesemann, J., Rossier, O., & Brzostek, K. (2016). Impact of OmpR on the membrane proteome of *Yersinia enterocolitica* in different environments: repression of major adhesin YadA and heme receptor HemR. *Environ Microbiol*, *18*(3), 997-1021. doi:10.1111/1462-2920.13165
- Norregaard-Madsen, M., Mygind, B., Pedersen, R., Valentin-Hansen, P., & Sogaard-Andersen, L. (1994). The gene encoding the periplasmic cyclophilin homologue, PPlase A, in *Escherichia coli*, is expressed from four promoters, three of which are activated by the cAMP-CRP complex and negatively regulated by the CytR repressor. *Mol Microbiol*, *14*(5), 989-997.
- Nuorti, J. P., Niskanen, T., Hallanvuo, S., Mikkola, J., Kela, E., Hatakka, M., Fredriksson-Ahomaa, M., Lyytikäinen, O., Siitonen, A., Korkeala, H., & Ruutu, P. (2004). A widespread outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:3 infection from iceberg lettuce. *J Infect Dis*, *189*(5), 766-774. doi:10.1086/381766
- Nuss, A. M., Heroven, A. K., & Dersch, P. (2017). RNA Regulators: Formidable Modulators of *Yersinia* Virulence. *Trends Microbiol*, *25*(1), 19-34. doi:10.1016/j.tim.2016.08.006
- Otto, K., & Silhavy, T. J. (2002). Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(4), 2287-2292. doi:10.1073/pnas.042521699
- Papenfort, K., Pfeiffer, V., Lucchini, S., Sonawane, A., Hinton, J. C., & Vogel, J. (2008). Systematic deletion of *Salmonella* small RNA genes identifies CyaR, a conserved CRP-dependent riboregulator of OmpX synthesis. *Mol Microbiol*, *68*(4), 890-906. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06189.x
- Papenfort, K., Pfeiffer, V., Mika, F., Lucchini, S., Hinton, J. C., & Vogel, J. (2006). SigmaE-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Mol Microbiol*, *62*(6), 1674-1688.
- Pelludat, C., Hogardt, M., & Heesemann, J. (2002). Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect Immun*, *70*(4), 1832-1841.
- Pepe, J. C., Badger, J. L., & Miller, V. L. (1994). Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* inv gene. *Mol Microbiol*, *11*(1), 123-135.
- Pepe, J. C., & Miller, V. L. (1993). *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(14), 6473-6477.
- Pierson, D. E., & Falkow, S. (1993). The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect Immun*, *61*(5), 1846-1852.
- Pogliano, J., Lynch, A. S., Belin, D., Lin, E. C., & Beckwith, J. (1997). Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev*, *11*(9), 1169-1182.

- Portnoy, D. A., Wolf-Watz, H., Bolin, I., Beeder, A. B., & Falkow, S. (1984). Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins. *Infect Immun*, *43*(1), 108-114.
- Price, N. L., & Raivio, T. L. (2009). Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100. *J Bacteriol*, *191*(6), 1798-1815. doi:10.1128/jb.00798-08
- Primer-BLAST. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2012) Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. (abgerufen am 12.09.2017)
- PrimerQuest® program. OligoAnalyzer Tool 3.1. (2012) Verfügbar unter: <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>. (abgerufen am 12.09.2017)
- Proveddi, R., Boldrin, F., Falciani, F., Palu, G., & Manganelli, R. (2009). Global transcriptional response to vancomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, *155*(Pt 4), 1093-1102. doi:10.1099/mic.0.024802-0
- Putzker, M., Sauer, H., & Sobe, D. (2001). Plague and other human infections caused by *Yersinia* species. *Clin Lab*, *47*(9-10), 453-466.
- Raczkowska, A., Skorek, K., Bielecki, J., & Brzostek, K. (2011). OmpR controls *Yersinia enterocolitica* motility by positive regulation of flhDC expression. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *99*(2), 381-394. doi:10.1007/s10482-010-9503-8
- Raffa, R. G., & Raivio, T. L. (2002). A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, *45*(6), 1599-1611.
- Raina, S., Missiakas, D., & Georgopoulos, C. (1995). The rpoE gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *Embo j*, *14*(5), 1043-1055.
- Raivio, T. L. (2005). Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol*, *56*(5), 1119-1128. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04625.x
- Raivio, T. L. (2014). Everything old is new again: an update on current research on the Cpx envelope stress response. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(8), 1529-1541. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.10.018
- Raivio, T. L., Popkin, D. L., & Silhavy, T. J. (1999). The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *J Bacteriol*, *181*(17), 5263-5272.
- Raivio, T. L., & Silhavy, T. J. (1997). Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *J Bacteriol*, *179*(24), 7724-7733.
- Raivio, T. L., & Silhavy, T. J. (1999). The sigmaE and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses. *Curr Opin Microbiol*, *2*(2), 159-165. doi:10.1016/s1369-5274(99)80028-9
- Raivio, T. L., & Silhavy, T. J. (2001). Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol*, *55*, 591-624. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.591
- Ramm, K., & Pluckthun, A. (2000). The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity in vitro. *J Biol Chem*, *275*(22), 17106-17113. doi:10.1074/jbc.M910234199
- Ramm, K., & Pluckthun, A. (2001). High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric *E. coli* peptidyl-prolyl-isomerase FkpA. *J Mol Biol*, *310*(2), 485-498. doi:10.1006/jmbi.2001.4747



- Revell, P. A., & Miller, V. L. (2000). A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol*, *35*(3), 677-685.
- Rhodijs, V. A., Suh, W. C., Nonaka, G., West, J., & Gross, C. A. (2006). Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol*, *4*(1), e2. doi:10.1371/journal.pbio.0040002
- Rimhanen-Finne, R., Niskanen, T., Hallanvuo, S., Makary, P., Haukka, K., Pajunen, S., Siitonen, A., Ristolainen, R., Poyry, H., Ollgren, J., & Kuusi, M. (2009). *Yersinia pseudotuberculosis* causing a large outbreak associated with carrots in Finland, 2006. *Epidemiol Infect*, *137*(3), 342-347. doi:10.1017/s0950268807000155
- Robert-Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin - Yersiniose. (13.02.2012 / Nr. 6) Verfügbar unter:  
[http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2012/Ausgaben/06\\_12.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2012/Ausgaben/06_12.pdf?__blob=publicationFile). ISSN 1430-0265 (Druck) (abgerufen am 22.09.2016)
- Robert-Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2015. (Stand 01.03.2016) Verfügbar unter:  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2015.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2015.pdf?__blob=publicationFile). ISBN 978-3-89606-270-3 (abgerufen am 22.09.2016)
- Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C. A., Truelzsch, K., Hoffmann, H., & Heesemann, J. (2003). Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol*, *185*(13), 3735-3744.
- Roggenkamp, A., Neuberger, H. R., Flugel, A., Schmoll, T., & Heesemann, J. (1995). Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol*, *16*(6), 1207-1219.
- Rönnebäumer, K., Sander, G., Shutinoski, B., Schmidt, M. A., & Heusipp, G. (2009). Controlled activation of the Cpx system is essential for growth of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett*, *296*(2), 274-281. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01649.x
- Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J., & Roberts, M. (2006). Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*, *4*(5), 383-394. doi:10.1038/nrmicro1394
- Rowley, G., Stevenson, A., Kormanec, J., & Roberts, M. (2005). Effect of inactivation of *degS* on *Salmonella enterica* serovar typhimurium in vitro and in vivo. *Infect Immun*, *73*(1), 459-463. doi:10.1128/iai.73.1.459-463.2005
- Ruiz, N., & Silhavy, T. J. (2005). Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol*, *8*(2), 122-126. doi:10.1016/j.mib.2005.02.013
- Schiano, C. A., Bellows, L. E., & Lathem, W. W. (2010). The small RNA chaperone Hfq is required for the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun*, *78*(5), 2034-2044. doi:10.1128/IAI.01046-09
- Schmidtke, C., Abendroth, U., Brock, J., Serrania, J., Becker, A., & Bonas, U. (2013). Small RNA sX13: a multifaceted regulator of virulence in the plant pathogen *Xanthomonas*. *PLoS Pathog*, *9*(9), e1003626. doi:10.1371/journal.ppat.1003626

- Schuchmann, M., Gerbes, A. L., Heesemann, J., & Sauter, G. (1997). Multiple liver abscesses caused by *Yersinia enterocolitica* in a patient receiving long-term transfusion therapy for osteomyelosclerosis. *Dig Dis Sci*, 42(12), 2501-2504.
- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., Kirsch, T., Swoboda, B., Bull, C., Goodman, S., & Emrich, F. (1993). Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect Immun*, 61(6), 2513-2519.
- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., von der Mark, K., & Emrich, F. (1992). Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect Immun*, 60(6), 2153-2159.
- Sittka, A., Lucchini, S., Papenfort, K., Sharma, C. M., Rolle, K., Binnewies, T. T., Hinton, J. C., & Vogel, J. (2008). Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet*, 4(8), e1000163. doi:10.1371/journal.pgen.1000163
- Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K., & Vogel, J. (2007). The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, 63(1), 193-217. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05489.x
- Skorek, K., Raczowska, A., Dudek, B., Mietka, K., Guz-Regner, K., Pawlak, A., Klaus, E., Bugla-Ploskonska, G., & Brzostek, K. (2013). Regulatory protein OmpR influences the serum resistance of *Yersinia enterocolitica* O:9 by modifying the structure of the outer membrane. *PLoS One*, 8(11), e79525. doi:10.1371/journal.pone.0079525
- Skurnik, M., & Toivanen, P. (1992). LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol*, 174(6), 2047-2051.
- Spiess, C., Beil, A., & Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 97(3), 339-347.
- Srinivasan, V. B., Vaidyanathan, V., Mondal, A., & Rajamohan, G. (2012). Role of the two component signal transduction system CpxAR in conferring cefepime and chloramphenicol resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. *PLoS One*, 7(4), e33777. doi:10.1371/journal.pone.0033777
- Storz, G., Vogel, J., & Wassarman, K. M. (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell*, 43(6), 880-891. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.022
- Strauch, K. L., Johnson, K., & Beckwith, J. (1989). Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol*, 171(5), 2689-2696.
- Strobel, E., Heesemann, J., Mayer, G., Peters, J., Müller-Wehrich, S., & Emmerling, P. (2000). Bacteriological and serological findings in a further case of transfusion-mediated *Yersinia enterocolitica* sepsis. *J Clin Microbiol*, 38(7), 2788-2790.
- Tacket, C. O., Davis, B. R., Carter, G. P., Randolph, J. F., & Cohen, M. L. (1983). *Yersinia enterocolitica* pharyngitis. *Ann Intern Med*, 99(1), 40-42.
- Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T., & Sasakawa, C. (1993). Transcriptional control of the invasion regulatory gene virB of *Shigella flexneri*: activation by virF and repression by H-NS. *J Bacteriol*, 175(19), 6142-6149.

- Troisfontaines, P., & Cornelis, G. R. (2005). Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)*, *20*, 326-339. doi:10.1152/physiol.00011.2005
- Trosky, J. E., Liverman, A. D., & Orth, K. (2008). Yersinia outer proteins: Yops. *Cell Microbiol*, *10*(3), 557-565. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01109.x
- Uliczka, F., Pisano, F., Schaake, J., Stolz, T., Rohde, M., Fruth, A., Strauch, E., Skurnik, M., Batzilla, J., Rakin, A., Heesemann, J., & Dersch, P. (2011). Unique cell adhesion and invasion properties of Yersinia enterocolitica O:3, the most frequent cause of human Yersiniosis. *PLoS Pathog*, *7*(7), e1002117. doi:10.1371/journal.ppat.1002117
- Valentin-Weigand, P., Heesemann, J., & Dersch, P. (2014). Unique virulence properties of Yersinia enterocolitica O:3--an emerging zoonotic pathogen using pigs as preferred reservoir host. *Int J Med Microbiol*, *304*(7), 824-834. doi:10.1016/j.ijmm.2014.07.008
- Van Noyen, R., Selderslaghs, R., Bekaert, J., Wauters, G., & Vandepitte, J. (1991). Causative role of Yersinia and other enteric pathogens in the appendicular syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *10*(9), 735-741.
- Vogel, J., & Luisi, B. F. (2011). Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol*, *9*(8), 578-589. doi:10.1038/nrmicro2615
- Vogel, J., & Papenfort, K. (2006). Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol*, *9*(6), 605-611. doi:10.1016/j.mib.2006.10.006
- Vogt, S. L., & Raivio, T. L. (2014). Hfq reduces envelope stress by controlling expression of envelope-localized proteins and protein complexes in enteropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol*, *92*(4), 681-697. doi:10.1111/mmi.12581
- von Gabain, A., Belasco, J. G., Schottel, J. L., Chang, A. C., & Cohen, S. N. (1983). Decay of mRNA in Escherichia coli: investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *80*(3), 653-657.
- Vytvytska, O., Jakobsen, J. S., Balcunaite, G., Andersen, J. S., Baccharini, M., & von Gabain, A. (1998). Host factor I, Hfq, binds to Escherichia coli ompA mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(24), 14118-14123.
- Vytvytska, O., Moll, I., Kaberdin, V. R., von Gabain, A., & Blasi, U. (2000). Hfq (HF1) stimulates ompA mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes Dev*, *14*(9), 1109-1118.
- Wang, D., Korban, S. S., & Zhao, Y. (2009). The Rcs phosphorelay system is essential for pathogenicity in Erwinia amylovora. *Mol Plant Pathol*, *10*(2), 277-290. doi:10.1111/j.1364-3703.2008.00531.x
- Waters, L. S., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, *136*(4), 615-628. doi:10.1016/j.cell.2009.01.043
- Weltgesundheitsorganisation. Plague - Fact sheet. (2017) Verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/en/>. (abgerufen am 12.09.2017)
- Williams, K., Oyston, P. C., Dorrell, N., Li, S., Titball, R. W., & Wren, B. W. (2000). Investigation into the role of the serine protease HtrA in Yersinia pestis pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett*, *186*(2), 281-286.

- Wolf, D., Kalamorz, F., Wecke, T., Juszcak, A., Mader, U., Homuth, G., Jordan, S., Kirstein, J., Hoppert, M., Voigt, B., Hecker, M., & Mascher, T. (2010). In-depth profiling of the LiaR response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 192(18), 4680-4693. doi:10.1128/jb.00543-10
- Yakhnina, A. A., McManus, H. R., & Bernhardt, T. G. (2015). The cell wall amidase AmiB is essential for *Pseudomonas aeruginosa* cell division, drug resistance and viability. *Mol Microbiol*, 97(5), 957-973. doi:10.1111/mmi.13077
- Yamashita, S., Lukacik, P., Barnard, T. J., Noinaj, N., Felek, S., Tsang, T. M., Krukoni, E. S., Hinnebusch, B. J., & Buchanan, S. K. (2011). Structural insights into Ail-mediated adhesion in *Yersinia pestis*. *Structure*, 19(11), 1672-1682. doi:10.1016/j.str.2011.08.010
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
- Yersin, A. (1994). [Bubonic plague in Hong Kong. 1894]. *Rev Med Suisse Romande*, 114(5), 393-395.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3406-3415.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
Ail	<i>attachment invasin locus</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BaeR	<i>bacterial adaptive response</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal
ca.	circa
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium Ionen
Carb	Carbenicillin
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
CFU	Kolonie-formende Einheiten ( <i>colony forming units</i> )
cm	Zentimeter
CpxR	<i>conjugative pilus expression</i>
$C_q$	Quantifizierungszyklus
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celcius
d	Tag
d.h.	das heißt
DegP	<i>degradation protease</i>
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
$\Delta$	Delta
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESR	<i>envelope stress response</i>
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FkpA	<i>FKBP-type peptidylprolyl isomerase A</i>

fmol	Femtomol
fwd	<i>forward</i> , 5' → 3'-Primer
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	Destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
Hfq	<i>host factor for the replication of RNA phage Q</i>
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IL	Interleukin
InvA	<i>invasin</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	Milliampere
MALT	Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe ( <i>mucosa associated lymphoid tissue</i> )
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
msek	Millisekunden
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

µm	Mikrometer
N-terminal	Amino-terminal
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
OMP	Proteine der äußeren Bakterienmembran ( <i>outer membrane protein</i> )
OmpX	<i>outer membrane protein X</i>
Ω	Ohm, elektrischer Widerstand
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P <sub>BAD</sub>	Arabinose-induzierbarer Promotor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	<i>pondus hydrogenii</i> , Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
pmol	Pikomol
PpiA	<i>peptidylprolyl cis-trans isomerase A</i>
Psp	<i>phage shock protein</i>
PVDF	Polyvinyliden difluorid, Membran für Immunoblot
pYV	Virulenzplasmid ( <i>plasmid of Yersinia virulence</i> )
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Rcs	<i>regulator of capsule synthesis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RovA	<i>regulator of virulence A</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RpoE	<i>RNA polymerase sigma factor</i>
RQI	RNA Qualitätsindikator
RT	Reverse Transkriptase
rvs	<i>reverse</i> , 3' → 5'-Primer

SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Sek.	Sekunden
SOB	Nährmedium ( <i>super optimal broth</i> )
SOC	SOB-Medium mit Glukose
Spec	Spectinomycin
sRNA	<i>small</i> Ribonukleinsäure
SYBR Green	Cyanin-Farbstoff zum Nachweis doppelsträngiger DNA in qPCR
T	Thymin
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
5'-UTR	5'- untranslatierte Region
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
W	Watt
wt	Wildtyp
X- $\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
xg	relative Zentrifugalkraft
YadA	<i>Yersinia adhesin A</i>
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
z.B.	zum Beispiel



## **8 Anhang**

### **8.1 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann danke ich sehr herzlich für das spannende Thema, die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes, meine Aufnahme in den Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“ des Förderprogramms für Forschung und Lehre der LMU sowie die vielen weiterführenden Gespräche.

Außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. Ombeline Rossier für ihre intensive Betreuung und die Zeit, die sie mir widmete, um mir die praktischen Fähigkeiten im Labor beizubringen und ihr unermüdliches Interesse an dem Fortschritt dieses Projektes.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Stefan Endres für meine Aufnahme als assoziiertes Mitglied in das Graduiertenkolleg 1202 der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Darüber hinaus danke ich Frau Kristin Adler und Frau Bettina Sedlmaier-Erlenfeld für ihre praktische Hilfe bei der Durchführung und beim Erlernen einiger Experimente. Ganz herzlich danke ich auch den Mitgliedern der AG Heesemann: Sara, Tamara, Matthias, Tobias, Maximilian, Saskia, Iliya, Kristina, Steffi und Nico, die mich über die Jahre begleitet haben und für ein angenehmes Arbeitsklima und eine schöne gemeinsame Zeit im Labor gesorgt haben. Ebenfalls bedanke ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer-Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre emotionale und finanzielle Unterstützung, ihre immer währende Geduld und ihr Verständnis während meines gesamten Studiums und meiner Promotion.

Abschließend danke ich meinem besten Freund und großen Liebe Christopher, der mich immer bestärkt und unterstützt hat, der immer für mich da ist, ein offenes Ohr für mich hat und mit dem ich alle Hoch- und Tiefpunkte meines Studiums teilen durfte.