Beeinflussung des Aktinzytoskeletts durch die *Yersinia* - Moduline YopE und YopT

Andreas Andor

Aus dem

Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

Beeinflussung des Aktinzytoskeletts durch die *Yersinia* - Moduline YopE und YopT

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andreas Andor

aus

München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. R. Gräf
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. D. Rapaport
	Prof. Dr. med. T. Löscher
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. M. Essler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	27. 05. 2004

Meinen Eltern

und

meiner Ehefrau

Patricia

INHALTSVERZEICHNIS

1.	**Vorwort**	**1**
2.	**Abkürzungen und Begriffe**	**2**
3.	**Stand der Forschung**	**3**
3.1.	Allgemeine Einführung	**3**
3.2.	Das TypIII-Sekretionssystem von *Yersinia*	**6**
3.3.	Toxine und Moduline von *Yersinia*	**9**
3.4.	Die kleinen GTPasen der Rho-Familie	**10**
3.5.	Wirkungsweise Rho-modulierender Toxine	**13**
4.	**Ziele und Fragestellung**	**14**
5.	**Material und Methoden**	**16**
5.1.	Bakterienstämme und Plasmide	**16**
5.2.	Endothelzell-Kultur	**17**
5.3.	Infektionsversuche und Endothelzell-Stimulation	**18**
5.4.	Makrophagenkultur, -Infektion und -Stimulation	**18**
5.5.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	**19**
5.6.	Nachweis von transloziertem YopE	**20**
5.7.	Fluoreszenzfärbung und mikroskopische Auswertung	**20**
5.8.	Herstellung rekombinanter Proteine	**21**
5.9.	Mikroinjektion	**22**

6. Ergebnisse **23**

6.1. Experimentelle Grundlagen **23**

6.2. Effekte der *Yersinia enterocolitica*-Infektion auf Aktinstrukturen in HUVEC **24**

6.3. Herstellung eines *Y. enterocolitica*-Stammes, welcher YopE als einzigen Effektor transloziert **26**

6.4. Effekt von YopE auf peripheres Aktin in konfluenten HUVEC **29**

6.5. Effekt von YopE auf CDC42Hs-, Rac- oder Rho-induzierte Aktinstrukturen in HUVEC **30**

6.6. Effekt von YopE auf CDC42Hs- oder Rac-abhängige Aktinstrukturen in primären Makrophagen **35**

6.7. Inaktivierung der GTPase Rho durch YopT **41**

7. Diskussion **43**

8. Zusammenfassung **50**

9. Literaturverzeichnis **52**

1. VORWORT

Bakterien sind seit den Arbeiten von Robert Koch Ende des 19. Jahrhunderts als pathogenetische Entitäten anerkannt. Sie sind heute wie damals Gegenstand zahlloser Forschungsdisziplinen, darunter der medizinischen Mikrobiologie. Im Laufe der Zeit erkannte man, dass häufig nicht die Bakterien als ganzes, sondern vielmehr deren Produkte - Toxine oder Pathogenitätsfaktoren - die eigentliche Ursache für das Krankheitsgeschehen darstellen. In anderen Fällen war es der befallene Wirtsorganismus, der sich im Rahmen pathologisch-immunologischer Abwehrreaktionen selbst schädigte. Man begann zu vermuten, dass ein wichtiger Teil zum Verständnis bakterieller Infektionskrankheiten im Studium des Wirtes und seiner Funktionen lag. Dabei konzentrierte man sich zwangsläufig auf die mikroskopischen und später molekularen Mechanismen der bakteriellen Pathogenität und der Immunologie des Wirtes. In der Zellbiologie klärte man eine Vielzahl verschiedenster Strukturen und Funktionen der Zelle auf und konnte auch bald deren Beeinflussung durch bakterielle Produkte darstellen. Wachsender Fortschritt in der Medizin und stetige Zunahme von Wissen führte zu einer immer strengeren Spezialisierung, da die einzelnen Fachgebiete immer unüberschaubarer wurden.

Mit der Erlangung von tieferen Einsichten in pathophysiologische Mechanismen erkannte man aber bald die Notwendigkeit der interdisziplinären Forschung. Heute weiß man zum Beispiel, dass sich Bakterien im Laufe der Evolution hervorragend an ihren Wirt angepasst haben und gezielt in dessen hochkomplizierte zelluläre Regulationsvorgänge eingreifen.

Dies zu ergründen ist das Ziel der zellulären Mikrobiologie, einem jungen Forschungszweig, der eine Mischung aus Zell- und Mikrobiologie darstellt. Wie auch in der vorliegenden Arbeit versucht man dort, die Interaktion von Krankheitserregern und deren Wirtszellen genauer zu charakterisieren und somit einen weiteren Teil zur Entschlüsselung des Geheimnisses „Leben“ beizutragen.

2. ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE

CDC42Hs	humanes CDC42 (Hs = Homo sapiens)
Filopodien	typische CDC42-regulierte Aktinstrukturen in Form stachelförmiger Ausläufer an der Zellperipherie; häufig synonym mit Microspikes verwendet
HUVEC	„human umbilical vein endothelial cells“, aus menschlichen Nabelschnurvenen gewonnene Endothelzellen
Lamellipodien	typische Rac-regulierte Aktinstrukturen in Form breiter, lamellenartiger Fortsätze an der Zellperipherie
Membrane Ruffles	(engl.) Synonym für Lamellipodien
Membrane Ruffling	(engl.) Vorgang der Lamellipodien-Bildung
Microspikes	(engl.) typische CDC42-regulierte Aktinstrukturen in Form stachelförmiger Ausläufer an der Zellperipherie; korrekterweise Vorstufe von Filopodien, häufig jedoch synonym verwendet
m.o.i.	„multiplicity of infection“, Verhältnis der Anzahl von Bakterien zur Zahl der infizierten Zellen, („Bakterien pro Zelle“)
pYV	Virulenzplasmid von *Yersinia*, auf dem alle Toxine und der dazugehörige TypIII-Sekretionsapparat sowie das *Yersinia*-Adhäsin YadA kodiert sind
Ruffles	siehe Membrane Ruffles
Ruffling	siehe Membrane Ruffling
Stressfasern	typische Rho-regulierte Aktinstrukturen in Form mehr oder weniger parallel verlaufender konzentrierter Aktinbündel im Zellinneren
Yop	„*Yersinia* outer protein“, von Yersinien sezernierte Proteine

3. STAND DER FORSCHUNG

3.1. Allgemeine Einführung

Bakterien der Gattung *Yersinia* gehören zu den fakultativ anaeroben gramnegativen Stäbchen der Familie *Enterobacteriaceae* und kommen in einer Vielzahl von Wirtsorganismen vor. Von den elf bisher bekannten Arten (Tabelle 1) gelten drei als humanpathogen: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* sowie *Y. pseudotuberculosis*, wobei sich erstere von den anderen beiden sowohl durch die Art der Infektion als auch durch das verursachte Krankheitsbild unterscheidet. Eine Übersicht über die Infektionswege gibt Abb. 1.

humanpathogene Arten	**nicht humanpathogene Arten**	
Yersinia pestis	*Yersinia aldovae*	*Yersinia kristensenii*
Yersinia enterocolitica	*Yersinia bercovieri*	*Yersinia molaretii*
Yersinia pseudotuberculosis	*Yersinia fredericksenii*	*Yersinia rhodei*
	Yersinia intermedia	*Yersinia ruckeri*

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten *Yersinia*-Arten

Der Erreger der Pest (*Y. pestis*) wird bei der klassischen Infektion durch den Biss des Rattenflohs (*Xenopsylla cheopis*) übertragen. Die Vermehrung der Keime in den regionären Lymphknoten führt zur Ausbildung sogenannter Bubonen mit dem klinischen Bild der Beulenpest. Ausgehend von diesen Herden kann es zur Generalisation mit Bakteriämie und Organbefall kommen. Eine Absiedelung der Erreger in die Lunge führt zur Lungenpest und ermöglicht eine Übertragung durch Tröpfcheninfektion. Im Mittelalter für zahllose Epidemien verantwortlich, spielt die Pest heutzutage nur noch eine geringfügige Rolle in wenigen Gebieten der Erde.

Bei enteropathogenen Yersinien (*Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*) handelt es sich um invasive Mikroorganismen, welche verschiedenste Krankheitsbilder wie Enteritis, Lymphadenitis aber auch extraintestinale Manifestationen in Form von diversen Vaskulitiden,

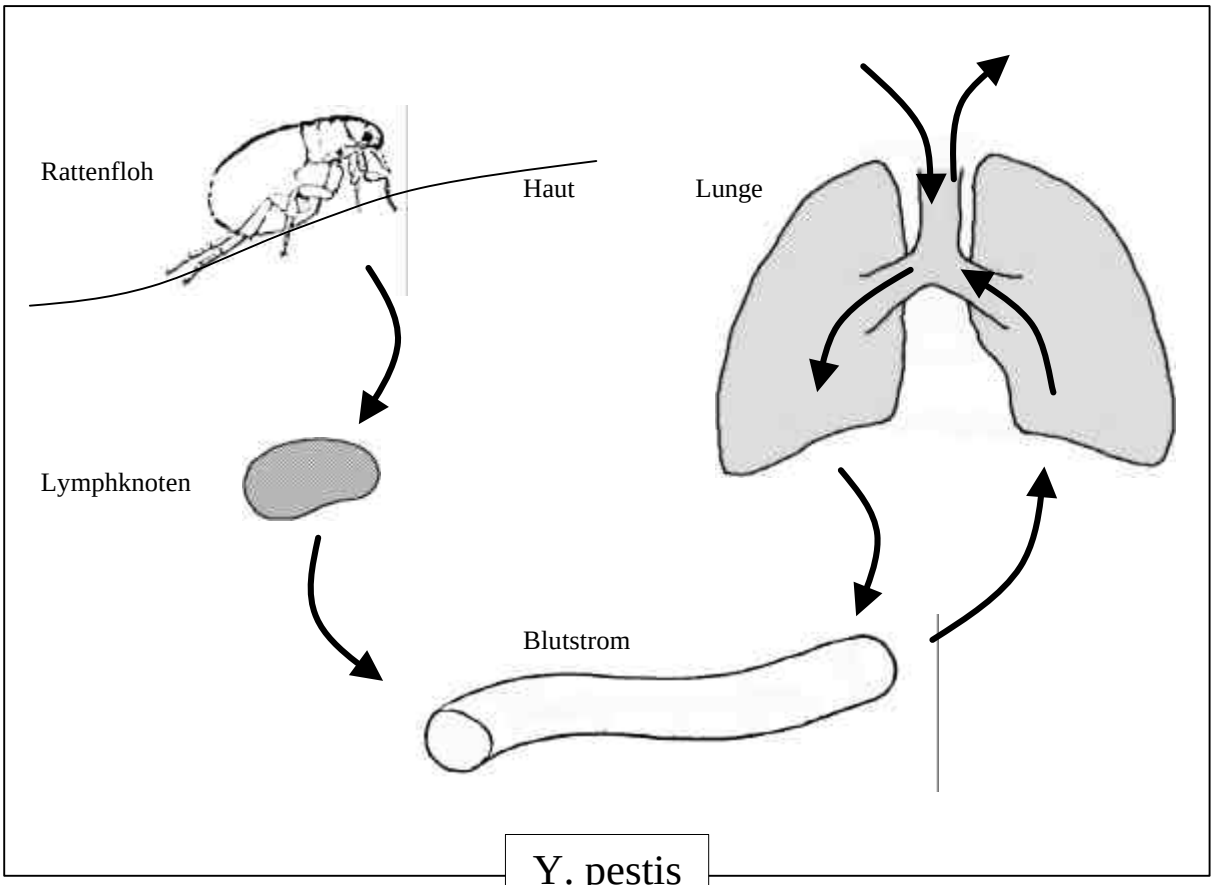
Enteritische Yersiniosen	**Extramesenteriale Yersiniosen**	**Immunpathologische Folgekrankheiten**
Enteritis	Sepsis	Reaktive Arthritis
Mesenteriale Lymphadenitis	Lymphadenopathie	Morbus Reiter
Pseudoappendizitis	Hepatitis (seltene Form)	Erythema nodosum
Ileitis (Pseudo-Crohn)	Fokale Infekte: Pleuritis,	
Kolitis	Endokarditis, Osteomyelitis,	
	Cholezystitis, Abszesse	

Tabelle 2: Mögliche Krankheitsbilder durch enteropathogene Yersinien

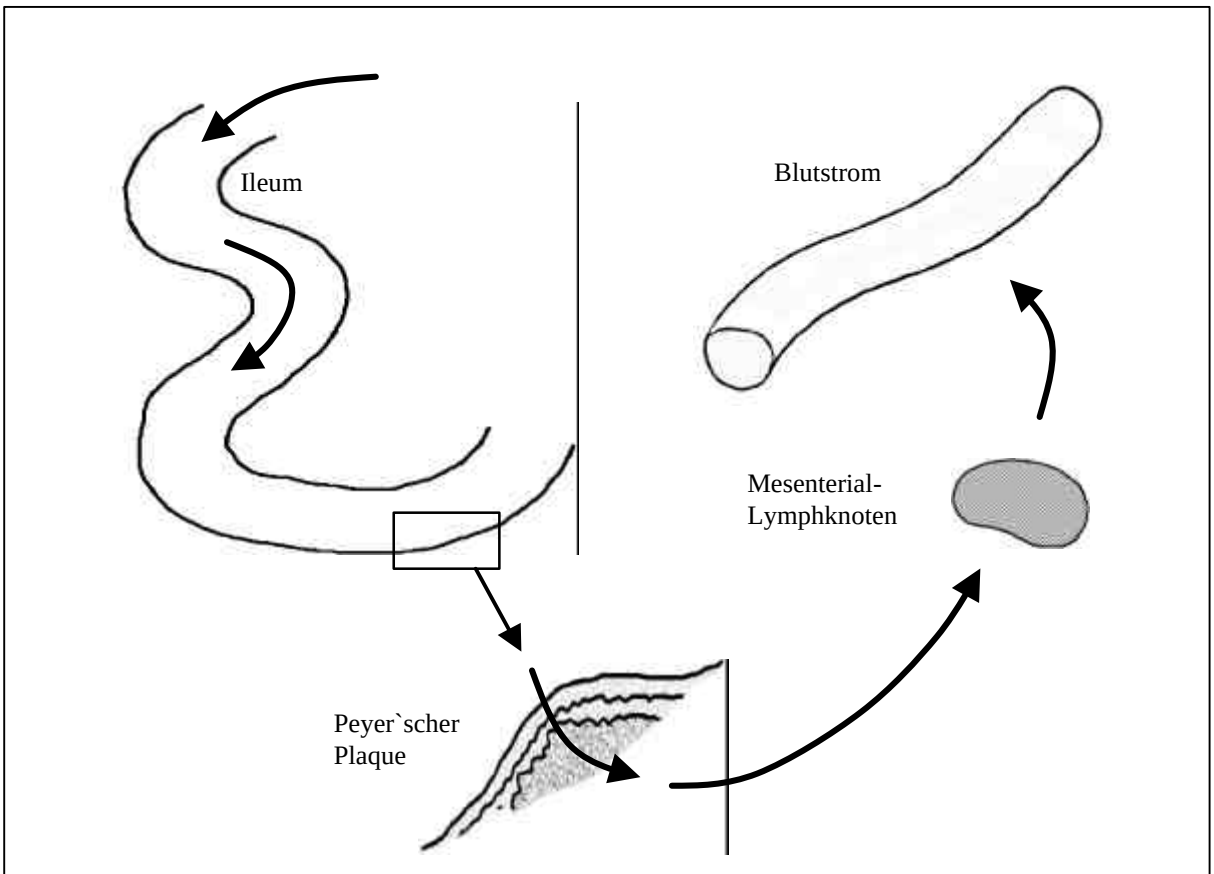
z.B. Synovialitis oder Erythema nodosum verursachen können (Tabelle 2). Nach dem zur Zeit vorherrschenden Modell durchwandern oben genannte Yersinien nach oraler Aufnahme die in der Submukosa des Dünndarms gelegenen Peyer`schen Plaques und injizieren mithilfe eines sogenannten TypIII-Sekretionsapparates (Pepe *et al.*, 1995; Autenrieth and Firsching, 1996; Cornelis and Wolf-Watz, 1997; Hueck, 1998) Effektorproteine (*Yersinia* outer proteins, Yops) in ihre Zielzellen (Abb. 3).

Zu diesen Zielzellen gehören Leukozyten, deren phagozytische Eigenschaften und die Fähigkeit zum „oxidative burst“ durch die injizierten Effektoren unterbunden wird. Das Gefäßendothel wurde aufgrund seiner Fähigkeit, die Leukozytenextravasation zu kontrollieren, ebenfalls als Angriffspunkt von Yersinien und ihren Effektoren vorgeschlagen (Cornelis *et al.*, 1998).

Abb. 1 (folgende Seite): Infektionsmechanismen humanpathogener Yersinien
Y. pestis wird entweder durch einen Flohbiss oder aerogen in Form von Tröpfchen auf den Menschen übertragen. Die enteropathogenen Yersinien *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* gelangen durch orale Aufnahme in den distalen Dünndarm und durchwandern dessen Wand im Bereich der Peyer`schen Plaques.



Y. pestis



Y. enterocolitica / Y. pseudotuberculosis

3.2. Das TypIII-Sekretionssystem von *Yersinia*

Das bereits erwähnte TypIII-Sekretionssystem erlaubt es den Yersinien, ihre Toxine direkt in die Wirtszellen einzubringen. Sowohl alle sezernierten Yops als auch sämtliche Proteine, welche den Sekretionsapparat bilden, sowie das *Yersinia*-Adhäsin YadA sind extrachromosomal auf dem 70 kb pYV-Virulenzplasmid kodiert (Abb. 2). Die sezernierten Yops gliedert man nach ihrer Funktion in Effektoren, Translokatoren und Regulatoren.

In einer früheren Arbeit (Roggenkamp *et al.*, 1995) war es gelungen, ein modulares Yop-Expressions-, Sekretions- und -Translokationssystem herzustellen, indem man eine durchgehende 20 kb-Region des pYV-Plasmids, die sogenannte *lcr*-Region, welche für die Regulation, Sekretion und Translokation der Yops benötigt wird, in ein Vektorplasmid einklonierte. In einen virulenzplasmidfreien *Y. enterocolitica*-Stamm hineintransformiert, war dieses pLCR genannte Konstrukt (Abb. 2) in der Lage, die Sekretion beliebiger Yops zu vermitteln, welche durch ein zweites rekombinantes Plasmid kodiert wurden.

Beim Transport der *Yersinia*-Toxine in die Wirtszelle unterscheidet man grundsätzlich zwei Schritte. Die Ausschleusung der Proteine aus der Bakterienzelle mit Passage der inneren und äußeren Bakterienmembran wird als Sekretion bezeichnet. Im Anschluss daran müssen die Yops die eukaryotische Plasmamembran überschreiten, um Zugang zum Zytosol der Wirtszelle zu erlangen. Diesen zweiten Schritt nennt man Translokation. Erstere kann *in vitro*, wo die optimale Wachstumstemperatur für Yersinien bei 27°C liegt, induziert werden. Durch Inkubation bei 37°C in Ca^{2+}-freiem Wachstumsmedium kommt es zum Stillstand des bakteriellen Wachstums und zur Sekretion der Yops in den Kulturüberstand (Abb. 4). *In vivo* ist jedoch der Kontakt mit einer Wirtszelle notwendig, um die Sekretions-/Translokationsmaschinerie in Gang zu setzen. Nach dem aktuellen Modell beginnt die temperaturabhängige Transskription der Yops bei 37°C. Solange kein Kontakt mit einer geeigneten eukaryotischen Zelle besteht, ist der Sekretionskanal geschlossen und es kommt zur Akkumulation der Yops und verschiedener Faktoren im Bakterienzytoplasma (Abb. 3A).

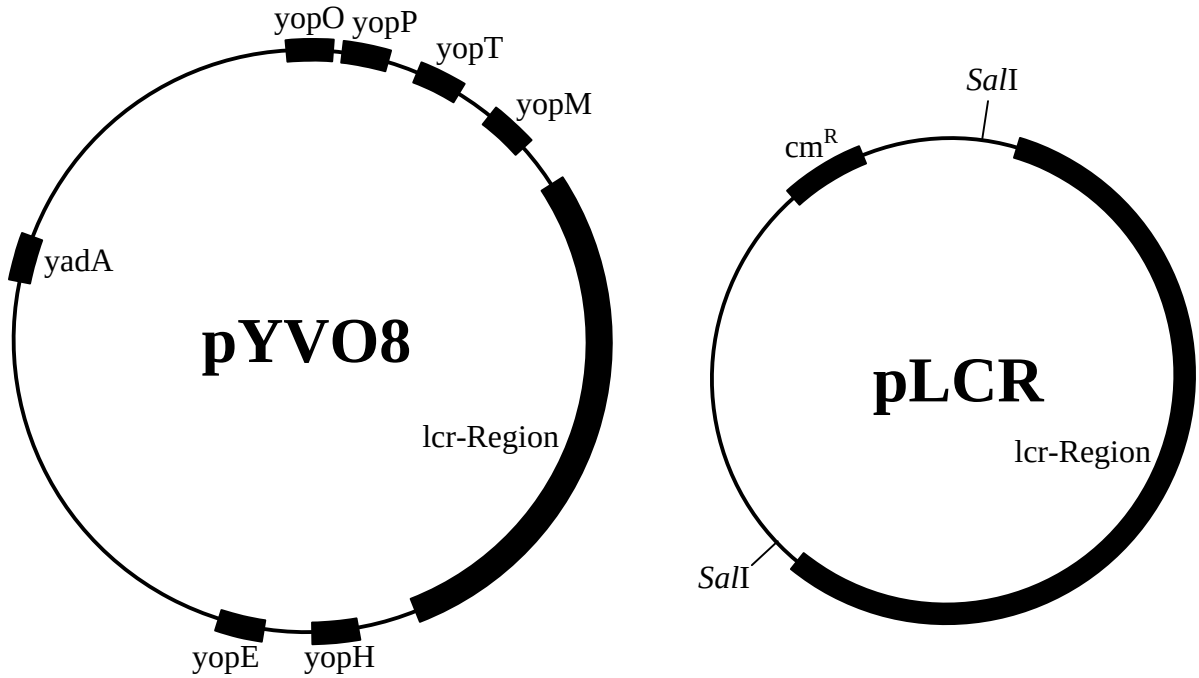


Abb. 2: Aufbau des Virulenzplasmids von *Yersinia enterocolitica*
Auf dem Virulenzplasmid pYVO8 (von *Y. enterocolitica* Serotyp O8) befindet sich die genetische Information für den kompletten TypIII-Sekretionsapparat, die Effektor-Yops mit ihren Chaperonen, sowie das Adhäsin YadA. Den für die Sekretion und Translokation benötigten Abschnitt stellt die *lcr*-Region dar. Diese konnte in einer früheren Arbeit auf ein Vektorplasmid übertragen werden, so dass man mit pLCR ein isoliertes Sekretionssystem ohne zugehörige Effektoren erhielt.

Nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung wird die weitere Yop-Produktion gehemmt. Erst durch Kontakt mit einer Wirtszelle öffnet sich der Sekretionskanal und erlaubt es den Yops, die Zelle zu verlassen (Abb. 3B). Frühere Untersuchungen zeigten, dass eine YopN-Mutante große Mengen von Proteinen in den Kulturüberstand sezernierte, unabhängig von der Anwesenheit von Ca^{2+} oder Kontakt mit Wirtszellen, was darauf hindeutet, dass YopN die Freigabe der anderen Yops durch den Sekretionskanal reguliert und diesen unter natürlichen Bedingungen blockiert, solange kein Kontakt mit einer Wirtszelle besteht. Die Tatsache, dass es in Ca^{2+}-freier Umgebung zur Sekretion kommt, wird ebenfalls auf YopN zurückgeführt (Forsberg *et al.*, 1991; Cornelis and Wolf-Watz, 1997), mit der Vermutung, dass Ca^{2+}-Entzug artifiziell die Blockierung des Sekretionskanals durch YopN aufhebt. Nachdem der Sekretionskanal geöffnet ist, bilden YopB und YopD einen Kanal in der Wirtszellmembran und ermöglichen den Übertritt der Effektor-Yops in das Zytosol.

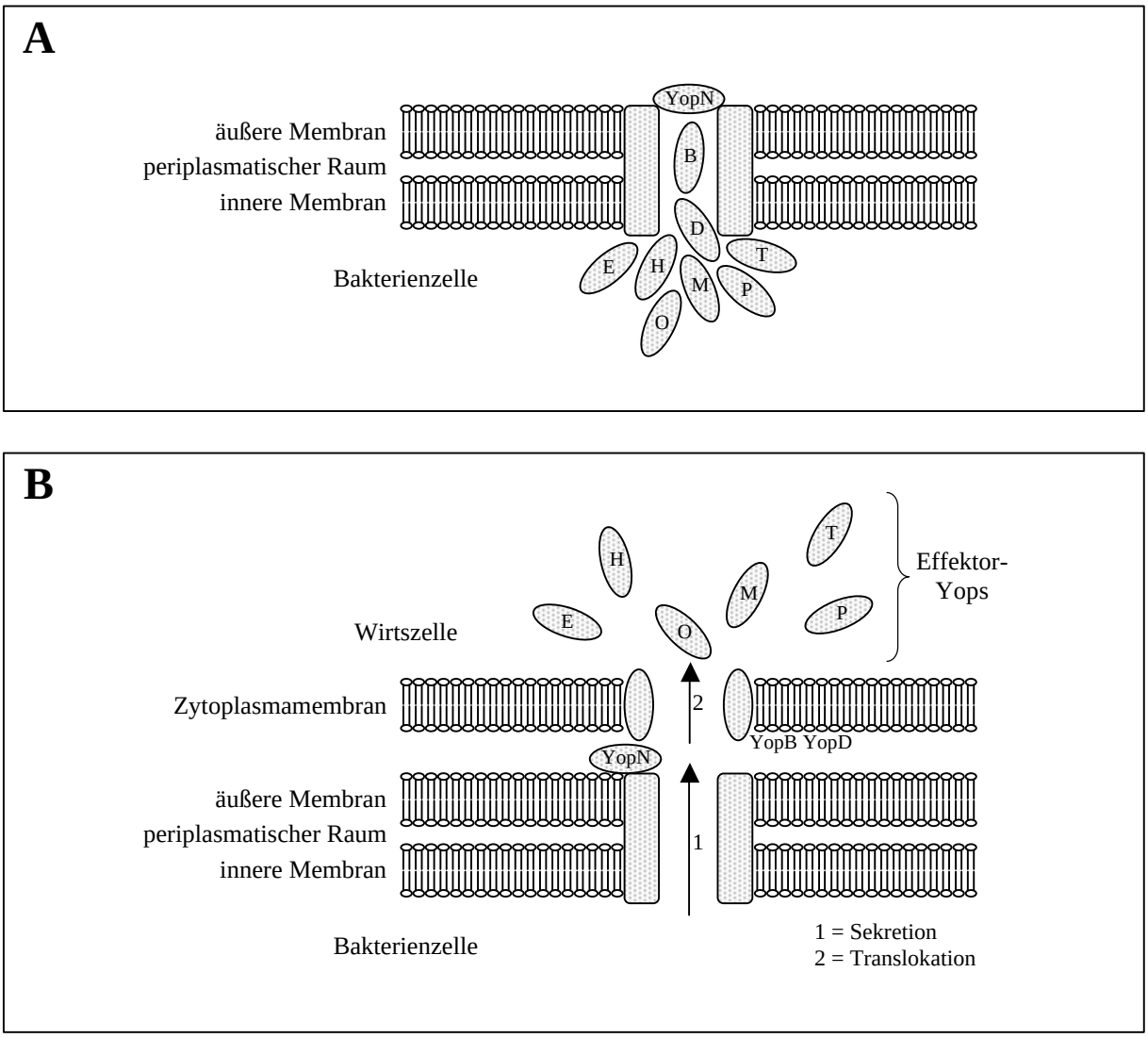
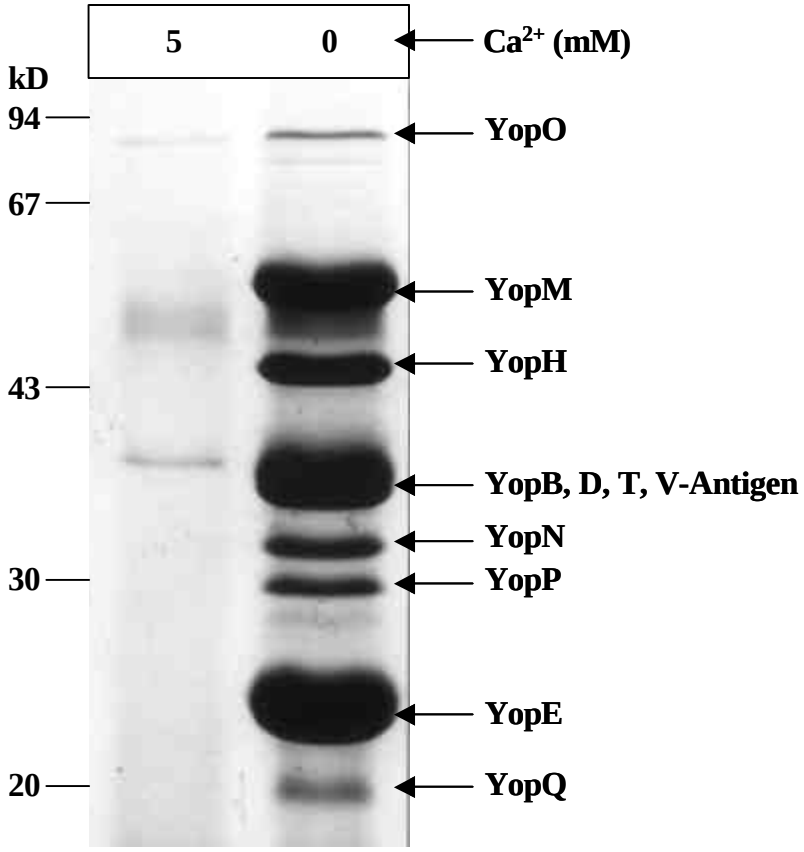


Abb. 3: Modell des TypIII-Sekretions-/-Translokationssystems von *Y. enterocolitica*
A) geschlossener Sekretionsapparat. YopN blockiert den Sekretionskanal und reguliert auf diese Weise die Sekretion der Yops.
B) offener Sekretionapparat. Nach Kontakt mit einer Wirtszelle gibt YopN den Sekretionskanal frei. YopB und YopD bilden eine Membranpore, welche den Übertritt bakterieller Proteine in das Zytosol der eukaryotischen Zelle ermöglicht.
Yops sind mit den ihnen entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet.

Abb. 4 (folgende Seite): Ca^{2+}-abhängige Sekretion der Yops *in vitro*
Coomassie-Färbung in den Kulturüberstand sezernierter *Yersinia*-Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Gel. Unter normalen Bedingungen ist der Sekretionskanal geschlossen, solange die Bakterienzelle keinen Kontakt mit einer Wirtszelle hat. Durch Ca^{2+}-Chelation wird über einen noch ungeklärten Mechanismus die Öffnung des Kanals induziert und damit die freie Sekretion von Yops ermöglicht. (Abbildung aus Aepfelbacher et al., 1999a).



3.3. Toxine und Moduline von *Yersinia*

In den vergangenen Jahren stellte sich heraus, dass es sich bei den durch das Typ III-Sekretionssystem freigesetzten *Yersinia*-Effektoren YopE, YopH, YopM, YopO (YpkA in *Y. pseudotuberculosis*), YopP (YopJ in *Y. pseudotuberculosis*) und YopT um höchst angepasste Proteine handelt, die auf spezifische Weise eukaryotische Signaltransduktionswege beeinflussen (Aepfelbacher et al., 1999b). Daher bezeichnet man diese *Yersinia*-Toxine auch als Moduline.

Bemerkenswerterweise konnte bei vier der sechs bekannten *Yersinia*-Effektorproteine, YopH, YopT, YopO und YopE gezeigt werden, dass diese am Aktinzytoskelett der befallenen Wirtszelle angreifen. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der zentralen Rolle, die Aktinumbauvorgänge in der Phagozytose, Chemotaxis, Gentranskription und bei enzymatischer Aktivität spielen (Aderem and Underhill, 1999; Provost *et al.*, 1999; Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999; Sotiropoulos *et al.*, 1999).

Bei YopH handelt es sich um eine Tyrosinphosphatase, welche zwei Bestandteile von Signalkomplexen, die Focal-Adhesion-Kinase Fak und $p130^{Cas}$, die die Verbindung zwischen Aktinfilamenten und dem intrazellulären Teil der Integrinrezeptoren in fokalen Adhäsionen regulieren, dephosphoryliert (Black and Bliska, 1997; Persson *et al.*, 1997). Über YopT weiß man durch unsere Arbeiten, dass es das GTP-bindende Protein RhoA, einen wichtigen Regulator von Aktinstrukturen (s. unten) modifiziert und inaktiviert (Zumbihl *et al.*, 1999). YopO ist eine autophosphorylierende Serin-/Threoninkinase, welche durch Aktin aktiviert wird und dieses sowohl phosphoryliert als auch Aktinstrukturen in bestimmten Zelltypen zerstört (Juris *et al.*, 2000). YopO bindet außerdem an die GTP- und GDP-gebundenen Formen der Rho-GTPasen Rho und Rac. Die genaue Rolle, welche diese Interaktion für die Aktivität von Rho-GTPasen oder die Aktinregulation spielt, ist jedoch bisher unklar (Barz *et al.*, 2000; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). Die Fähigkeit von YopE, das Aktinzytoskelett zu zerstören (Rosqvist *et al.*, 1991) konnte, während die Experimente zu dieser Dissertationsarbeit abliefen, auf seine GAP-Aktivität gegen GTPasen der Rho-Familie zurückgeführt werden (Black and Bliska, 2000; von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000).

3.4. Die kleinen GTPasen der Rho-Familie

Die Rho-GTPasen beinhalten nach heutigem Wissensstand mehr als zehn Vertreter, RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG, RhoL, Rac1, Rac2, Cdc42Hs, G25K, TTF und TC10, von denen sämtliche an der Aktinregulation beteiligt sind (Guasch *et al.*, 1998; Hall, 1994; Hall, 1998; Tapon and Hall, 1997). Die Rho-Familie stellt eine Untergruppe der Ras-Superfamilie dar, welche neben Rho die Subfamilien Ras, ARF, Rab und Ran beinhaltet. Diese werden im Gegensatz zu den größeren heterotrimeren G-Proteinen als kleine GTP-bindende Proteine bezeichnet. Die Bezeichnung Rho-GTPase ist auf die intrinsische GTPase-Aktivität zurückzuführen, mittels welcher gebundenes GTP in GDP und Phosphat gespalten wird.

Jede der drei Hauptgruppen der Rho-Familie, Rho, Rac und CDC42, führt zur Ausbildung einzigartiger Aktinstrukturen, nämlich Stressfasern, Lamellipodien („membrane ruffles“) oder Filopodien („microspikes“) (Hall, 1998). Rho, Rac und CDC42 können dabei unabhängig voneinander durch Plasmamembranrezeptoren für extrazelluläre Mediatoren aktiviert werden (Abb. 5), sind jedoch auch Teil eines komplexen Signalkaskaden-Netzwerks, in welchem eine GTPase eine andere ihr zugeordnete GTPase aktiviert oder inaktiviert (Van Aelst and D´Souza-Schorey, 1997; Sander *et al.*, 1999).

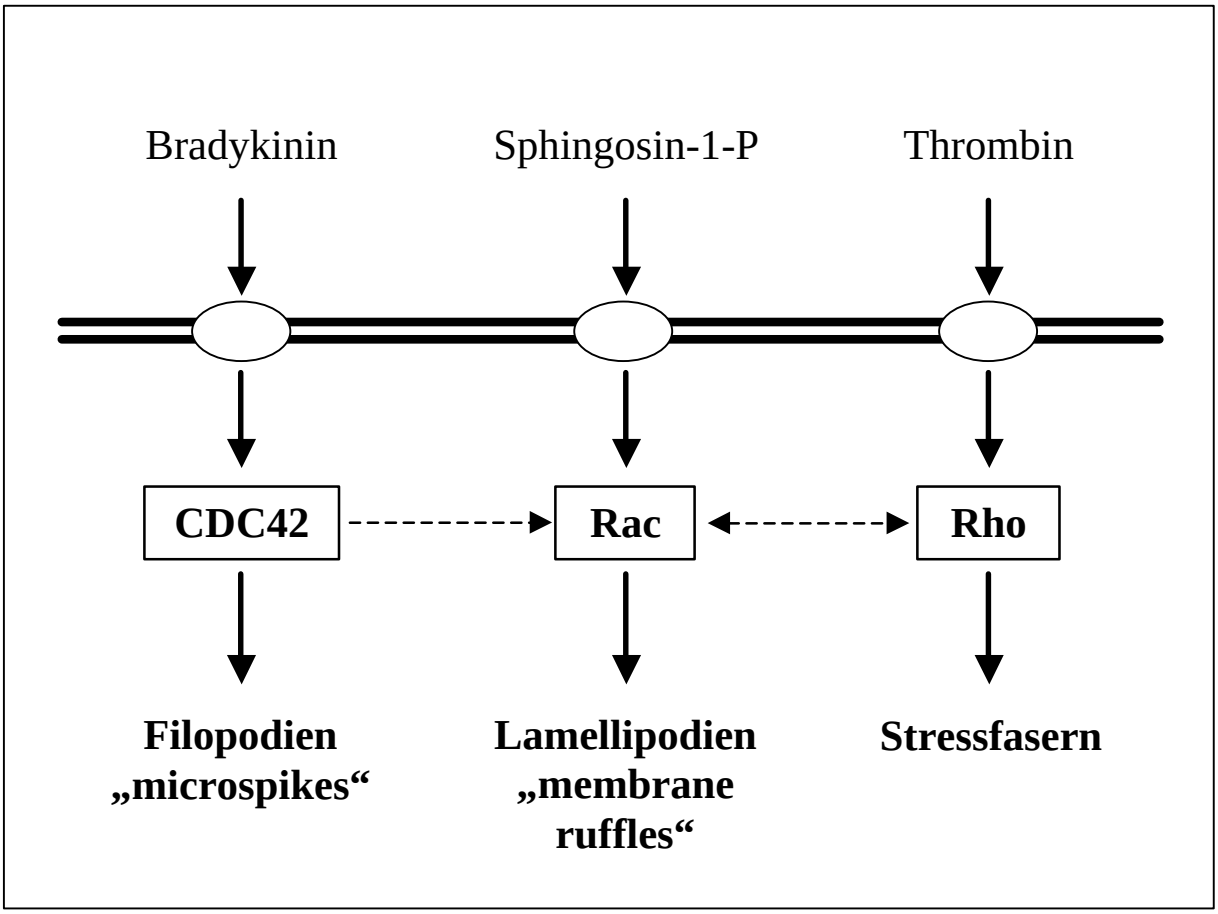


Abb. 5: Aktivierung von Rho-GTPasen und ihre Effekte auf das Aktinzytoskelett
Die drei Hauptvertreter der Rho-Proteine, CDC42, Rac und Rho werden durch verschiedene extrazelluläre Mediatoren über Plasmamembranrezeptoren aktiviert und führen zur Ausbildung typischer Strukturen des Aktinzytoskeletts. Untereinander stehen die Rho-GTPasen im Sinne eines kaskadenartigen Netzwerks in Verbindung (gestrichelte Pfeile), indem sie sich gegenseitig -je nach Zelltyp unterschiedlich- aktivieren oder inaktivieren können. (Sphingosin-1-P = Sphingosin-1-Phosphat; die doppelte Linie entspricht der Zytoplasmamembran, die Ovale repräsentieren spezifische Plasmamembranrezeptoren)

Rho-GTPasen verhalten sich wie molekulare Schalter, welche im GTP-gebundenen Zustand eingeschaltet und an GDP gebunden ausgeschaltet sind. Im GTP-gebundenen, aktiven Zustand können Rho-Proteine an verschiedene Zielmoleküle, welche direkt oder indirekt die Aktinorganisation kontrollieren, assoziieren und diese aktivieren (Abb. 6; Cooper and Schafer, 2000). Der Aktivierungsgrad der Rho-GTPasen wird reguliert durch 1. ihre intrinsische GTPase-Aktivität, 2. GDIs („guanine nucleotide dissociation inhibitors“) 3. GEFs („guanine nucleotide exchange factors“) und 4. GAPs („GTPase activating proteins“) (Van Aelst and D´Souza-Schorey, 1997).

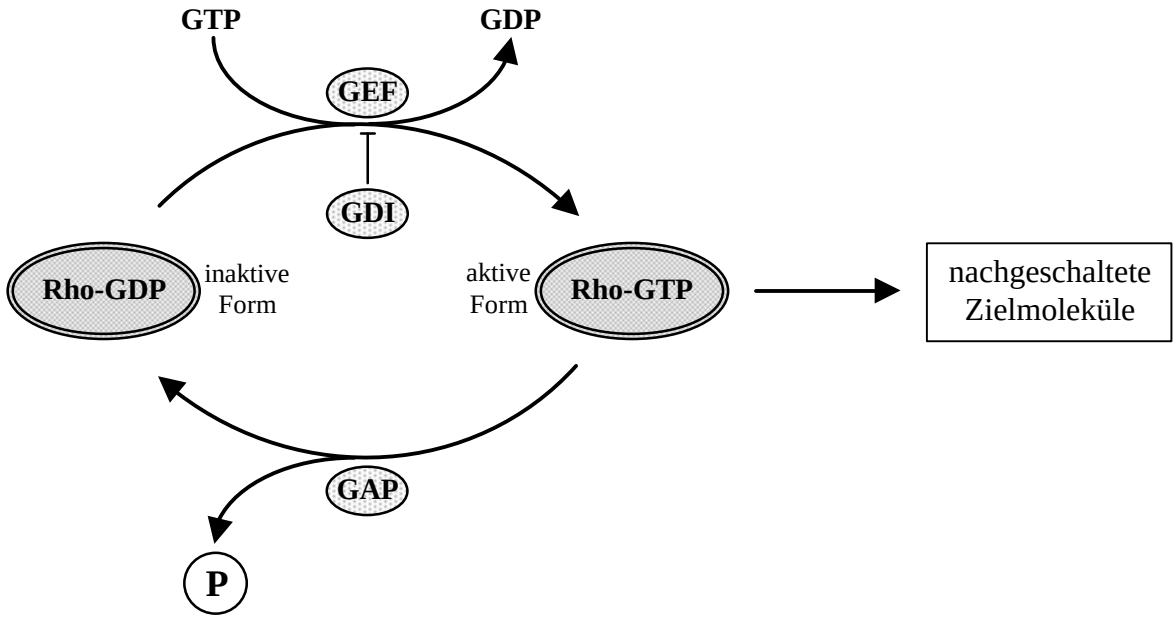


Abb. 6: Regulation der Aktivität von Rho-GTPasen
Der Übergang vom GDP-gebundenen, inaktiven Zustand zum aktiven, GTP-gebundenen Zustand geschieht durch einen von GEF vermittelten Austausch von GDP gegen GTP. GDIs verhindern die Abdissoziation von GDP und halten die Rho-GTPasen damit in ihrer inaktiven Form. Im Gegensatz dazu erfolgt die Inaktivierung der bereits aktiven Rho-GTPasen durch enzymatische Spaltung des gebundenen GTP in GDP und Phosphat. Die hierfür notwendige intrinsische GTPase-Funktion der Rho-Proteine wird durch „GTPase activating proteins“ (GAP) induziert. Hier am Beispiel von Rho gezeigt, gilt dieses Schema analog auch für CDC42 und Rac.

3.5. Wirkungsweise Rho-modulierender Toxine

Interessanterweise haben pathogene Bakterien Wege gefunden, sich jedes dieser regulativen Prinzipien zunutze zu machen. ADP-ribosylierende oder -glucosylierende Exotoxine von Clostridien zum Beispiel modifizieren bestimmte Aminosäuren in der Effektordomäne von Rho-GTPasen und blockieren auf diese Weise die Aktivierung der GTPasen oder deren Interaktion mit den Zielmolekülen (Aktories *et al.*, 2000).

Im Vergleich dazu deamidiert CNF (cytotoxic necrotizing factor) von *Escherichia coli* einen kritischen Glutaminrest welcher die intrinsische als auch GAP-stimulierte GTPase-Aktivität blockiert und damit verschiedene Rho-GTPasen konstitutiv aktiviert (Flatau *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1997). Ferner ist SopE, ein translozierter Effektor von *Salmonella* selbst ein höchst aktiver Austauschfaktor (GEF) für Rho-GTPasen (Hardt *et al.*, 1998). Wie im Fall von YopE, konnten auch die YopE-homologen Domänen im *Salmonella*-Effektor SptP und im *Pseudomonas aeruginosa*-Effektor ExoS als Rho-GAPs identifiziert werden. *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass es sich bei SptP um ein GAP für CDC42 und Rac handelt, wohingegen ExoS und YopE auf Rho, Rac und CDC42 wirken (Fu and Galan, 1999; Goehring *et al.*, 1999; von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000).

4. ZIELE UND FRAGESTELLUNG

Bei Beginn der experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation war klar, dass vier der sechs bekannten *Yersinia*-Moduline, nämlich YopE, YopT, YopH und YopO zu Veränderungen des Aktinzytoskeletts in Zielzellen führen. Für eine Reihe von Virulenzfaktoren bakterieller Pathogene konnten die kleinen GTPasen der Rho-Familie, welche das Zytoskelett regulieren, als Zielmoleküle identifiziert werden.

Bereits frühere Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe befassten sich mit dem Zusammenspiel bakterieller Toxine und Rho-GTPasen. In der Arbeit von Aepfelbacher *et al.* (1997) fand man heraus, dass die Toxine C3-Transferase von *Clostridium botulinum*, EDIN von *Staphylococcus aureus* beziehungsweise ToxinA von *Clostridium difficile* durch Hemmung von RhoA, RhoB und RhoC zu einer Störung der Migration menschlicher Endothelzellen in einem *in vitro*-Wundreparaturmodell führten. An anderer Stelle (Essler *et al.*, 1998b) untersuchte man die Erhöhung der endothelialen Permeabilität durch das *Pasteurella multocida*-Toxin PMT. Die Wirkung dieses Proteins führte zur Aktivierung des Rho-Signalweges und der Entstehung typischer Rho-abhängiger Stressfasern. Außerdem entdeckte man, dass die Thrombin-induzierte Aktivierung von Rho in Endothelzellen durch die oben genannte C3-Transferase inhibiert wurde (Essler *et al.*, 1998a).

Die Beziehung der *Yersinia*-Toxine zur Aktivität von Rho-GTPasen war zu Beginn der vorliegenden Arbeit jedoch noch weitgehend unklar. Es war daher interessant herauszufinden, auf welche Weise ein pathogener Erreger mit einem hochangepassten Sekretionssystem und einer Reihe von Effektorproteinen die Aktinregulation in den befallenen Wirtszellen beeinflussen könnte. Ebenfalls von Interesse war die Tatsache, dass mehrere Toxine, jedoch mit verschiedenen Angriffspunkten und Mechanismen auf die Regulation des Aktinzytoskeletts wirken.

Als eines der Ziele für Yersinien respektive *Yersinia*-Toxine wurde das Gefäßendothel vermutet (Cornelis *et al.*, 1998). Da sich morphologische Veränderungen des Aktinzytoskeletts in Endothelzellen aufgrund der flachen Form deutlich beurteilen lassen und die Aktivierung bestimmter Rho-GTPasen zur Ausbildung charakteristischer und zuverlässig reproduzierbarer Effekte führt, wurde die Arbeit im Endothelzellmodell gewählt. Hierfür verwendete man menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), welche mit einer erfahrungsgemäß guten Sensitivität auf Stimulation oder Hemmung aktinregulierender Vorgänge reagieren und sich daher ideal für diese Arbeit eigneten.

In Vorversuchen stellte sich heraus, dass die morphologisch deutlichsten Effekte auf das Aktinzytoskelett von den *Yersinia*-Modulinen YopE und YopT verursacht wurden. Selbige wurden deshalb zum Gegenstand dieser Arbeit, wobei insbesondere die Funktion von YopE genauer charakterisiert wurde.

Folgenden spezifischen Fragen sollte nachgegangen werden:

Welcher Effekt auf das Aktinzytoskelett in *Y. enterocolitica*-infizierten Zellen ist durch YopE bewirkt?

Ist dieser auf eine Störung Rho-GTPase-abhängiger Signalwege zurückzuführen?

Werden nur vorhandene Aktinstrukturen beeinflusst oder auch die Neubildung solcher?

Sind die beobachteten Effekte auf das Endothelzellmodell beschränkt oder auf andere Zelltypen übertragbar?

Zusätzlich wurde der Effekt von YopT auf das Zytoskelett mit den jetzt etablierten Methoden charakterisiert, mit dem Ziel herauszufinden, ob sich dessen Wirkungsmechanismus oder Angriffspunkt von dem von YopE unterscheidet. Diese initialen Beobachtungen haben zur Entdeckung der Modifikation von RhoA durch YopT geführt (Zumbihl *et al.*, 1999).

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Bakterienstämme und Plasmide

Escherichia coli DH5α wurde zur Herstellung von pYLCR und pLAF-E verwendet. Bakterien wurden in Luria-Bertani-(LB)Medium angezüchtet, *Y.enterocolitica* bei 27°C, *E.coli* bei 37°C. Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: Ampicillin (Ap) 100 µg ml^{-1}; Chloramphenicol (Cm) 20 µg ml^{-1}; Kanamycin (Km) 25 µg ml^{-1}; Nalidixinsäure (Nal) 60 µg ml^{-1}; Spectinomycin (Spc) 50 µg ml^{-1}; Tetracyclin (Tet) 20 µg ml^{-1}. Die Herstellung von pYLCR und pYLCR+E wurde wie im Folgenden beschrieben, durchgeführt (siehe auch Abb. 8).

Plasmid-DNA wurde mit Qiagen-Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert. PCR-Reaktionen, Restriktionsenzymverdau, Zurückgewinnung von DNA aus Low-Melting-Agarose, DNA-Ligationen und -Transfektionen wurden ausgeführt, wie von Ausubel *et al.* (1987) beschrieben. Enzyme, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und *Taq*-DNA-Polymerase wurden bei Pharmacia LKB eingekauft. Oligonukleotide wurden von Roth im TRITYL-OFF-Verfahren synthetisiert. Um das Typ III-Sekretionssystem von *Y.enterocolitica* WA-314 (*lcr*-Region) und *yadA* in pSUP102 einzufügen, wurde das *yadA*-Gen von *Y.enterocolitica* WA-314 mittels PCR amplifiziert unter Verwendung der Primer YB1 [Accession No. (acc.) X13882bp 56-77, zusätzliche *BamHI*-Schnittstelle am 5`-Ende] und YB2 (acc. X13882bp 2160-2137, eine *BamHI*-Schnittstelle wurde durch Austausch der Nukleotide 2149 und 2150 in g und g erzeugt). Nach dem enzymatischen Verdau mit *BamHI* wurde das 2,2 kb PCR-Fragment in pSUP102 (Guiney and Helinski, 1979) hineinligiert, mit dem Ergebnis von pSUP-A-1. Nachfolgend wurde das 30 kb Insert von pLCR (Roggenkamp *et al.*, 1995), bestehend aus der *lcr*-Region mithilfe von *SalI* ausgeschnitten und in pSUP-A-1 eingefügt. Das entstandene Plasmid wurde pYLCR benannt. Das *sycE/yopE*-Genfragment von *Y. enterocolitica* WA-314 wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer E1 (acc. M34278

bp 145 -161, 5'- zusätzliche *HindIII*-Schnittstelle) und E2 (acc. M34278 bp 1544 -1522, 5'- zusätzliche *HindIII*-Schnittstelle) kloniert. Die $YopE_{R144A}$ Mutante wurde konstruiert, indem man Arginin in Position 144 mithilfe der PCR durch Alanin ersetzte. Hierfür wurden das QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) und die folgenden Primer herangezogen:

5'-GCCACGGGCAGCGGCCCTCTTGCTGGCAGTATCCACTTCAATGCC-3' und 5'-GGCATTGAGTGATACTGCCAGCAAGAGGGCCGCTGCCCGTGGC-3'.

Nach enzymatischem Verdau mit *HindIII* wurden die entsprechenden PCR-Produkte in pLAFRII (Friedman *et al.*, 1982) hineinligiert, woraus sich pLAF-E beziehungsweise pLAF-E_{R144A} ergaben. Für Zellkulturexperimente und die Produktion von YopE wurden die Plasmide pYLCR und pLAF-E beziehungsweise pLAF-E_{R144A}, in den Stamm WA-C durch Konjugation kotransferiert, wie früher beschrieben (Roggenkamp *et al.*, 1995).

5.2. Endothelzell-Kultur

Endothelzellen wurden wie bei Aepfelbacher *et al.* (1997) beschrieben gewonnen, indem man menschliche Nabelschnur-Venen abschnittsweise mittels einer Kanüle punktierte, α-Chymotrypsin (Sigma) verabreichte und nach 30 min Einwirkzeit vorsichtig herausspülte. Nach Sammeln der ausgespülten Zellsuspension wurden die geernteten Zellen in gelatinebeschichteten Kunststoff-Zellkulturflaschen ausplattiert und in speziellem Wachstumsmedium (endothelial cell growth medium, ECGM; PromoCell, Heidelberg, Germany), einschließlich Wachstumszusätzen (endothelial cell growth supplement), 2% fetalem Kälberserum (FCS) und Heparin bebrütet. Allen Experimenten vorangehend wurden die Zellen in einer Dichte von $2x10^4$ Zellen/cm^2 ausgesät und 10 Tage bis zum Erreichen eines konfluenten Zellverbandes mit der typischen pflastersteinartigen Morphologie kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei oder drei Tage.

5.3. Infektionsversuche und Endothelzell-Stimulation

Yersinien wurden über Nacht in Luria-Bertani- (LB-) Medium bei 27°C unter antibiotischer Selektion bebrütet. Am nächsten Tag wurde die Übernachtkultur im Verhältnis 1:20 verdünnt und 30 min bei 37°C inkubiert, um die Yop-Produktion zu induzieren. HUVEC wurden zum Zwecke der späteren mikroskopischen Auswertung auf gelatinebeschichteten Deckgläsern oder zum Nachweis von transloziertem YopE in gelatinebeschichteten 6-Felder-Platten kultiviert, bis sie einen konfluenten Rasen bildeten. Eine Stunde vor Infektionsbeginn wurde das Wachstumsmedium entfernt und durch vorgewärmtes, serum- und antibiotikafreies Basalmedium (endothelial cell basal medium, ECBM; PromoCell) ersetzt. In ECBM resuspendierte Yersinien wurden durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit (115 g, 37°C für 3 min) mit einer Infektionsrate (multiplicity of infection, m.o.i.) von 50 an die HUVEC geheftet und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert. Um die verschiedenen Rho-GTPase-Signaltransduktionswege zu stimulieren, wurden die Zellen 3 h in serumfreiem ECBM vorinkubiert. Für Bakterien-infizierte Zellen schloss diese Zeitspanne auch die 2 h Infektionszeit mit Yersinien mit ein. Darauffolgend wurde das Basalmedium entfernt und die Zellen wurden stimuliert mit i) Bradykinin-Acetatsalz (Sigma, 100 ng/ml in ECBM) für 5 min, um CDC42Hs zu stimulieren oder für 15 min, um nachfolgend Rac via CDC42Hs zu stimulieren (Kozma *et al.*, 1995), ii) D-Erythro-Sphingosin-1-Phosphat (Calbiochem, 1 µM in ECBM) für 2 min, um Rac zu aktivieren oder iii) Thrombin aus humanem Plasma (Boehringer, 1 U/ml in ECBM) für 2 min, um Rho zu aktivieren (Essler *et al.*, 1998a). Anschließend wurden die Zellen sofort fixiert und für die Fluoreszenzfärbung weiterverarbeitet.

5.4. Makrophagenkultur, -Infektion und -Stimulation

Die Gewinnung primärer Makrophagen wurde nach dem Protokoll von Schell und Linder (2001) beziehungsweise Wiedemann *et al.* (2001) durchgeführt. Menschliche periphere

Blutmonozyten wurden durch Zentrifugation von Heparinblut im Ficoll-Gradienten (Ficoll Separating Solution, Biochrom KG) von anderen Blutzellen abgetrennt. Die Aufreinigung der Monozyten erfolgte mittels Anti-CD14-Antikörper-beschichteten Magnetbeads (Miltenyi Biotech) und einer MiniMACS-Säule (Miltenyi Biotech). Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von $5x10^4$ Zellen/cm^2 auf Coverslips ausgesät und bei 37°C in RPMI 1640-Medium (PAA Laboratories; Selektivmedium für Monozyten) inklusive autologem Serum mit Mediumwechsel alle drei oder vier Tage inkubiert. Innerhalb von fünf bis sieben Tagen differenzierten die Monozyten zu Makrophagen aus und konnten den Experimenten zugeführt werden.

Die Infektion erfolgte wie oben beschrieben, jedoch mit einer Infektionsdauer von 1,5 h.

Zur Stimulation CDC42Hs- und Rac-abhängiger Signale wurde das Wachstumsmedium 20 min vor Beginn der Infektion durch serum- und antibiotikafreies RPMI 1640 ersetzt. Nach Ablauf der Infektion wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden stimuliert mit i) fMLP-Ester (Sigma, 1 µg/ml in RPMI 1640) für (30-)60 min, um CDC42Hs und zusätzlich Rac via CDC42Hs zu stimulieren oder ii) D-Erythro-Sphingosin-1-Phosphat (Calbiochem, 10 µM in RPMI 1640) für 2 min, um Rac zu aktivieren. Anschließend wurden die Zellen sofort fixiert und für die Fluoreszenzfärbung weiterverarbeitet, wie unten beschrieben. Die Auswertung und Dokumentation der Präparate erfolgte mittels konfokalmikroskopischer, als digitale Bilder gespeicherter Aufnahmen.

5.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

In den Kulturüberstand sezernierte *Yersinia*-Proteine wurden exakt wie an anderer Stelle (Heesemann *et al.*, 1986) beschrieben, gewonnen. Die Auftrennung der Proteine wurde mittels SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erreicht. Für das Immunoblotting wurden die Proteine elektrophoretisch auf Bögen einer Polyvinylidin-Difluorid- (PVDF-) Membran übertragen (1,2 mA/cm^2 für 1 h). Diese wurden über Nacht mit PBS/3% BSA/0,05% Tween

20 bei Raumtemperatur geblockt. Zur Detektion von YopE wurde polyklonales Anti-YopE-Antiserum vom Kaninchen (gegen rekombinantes YopE gerichtet; Verdünnung 1:20000; Jacobi *et al.,* 1998) und ein Peroxidase-konjugierter sekundärer Anti-Kaninchen-Antikörper (Amersham; verdünnt 1:3000) für jeweils 1 h zugegeben. Die Detektion wurde unter Verwendung des Chemilumineszenz-Detektionssystems ECL von Amersham ausgeführt.

5.6. Nachweis von transloziertem YopE

Um transloziertes YopE nachzuweisen, wurde im Wesentlichen den von Jacobi *et al.* (1998) und Ruessmann *et al.* (2000) beschriebenen Vorgehensweisen gefolgt. Kurz zusammengefasst, wurden HUVEC nach Infektion in 6-Felder-Zellkulturplatten zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde PBS entfernt und dH_2O einschließlich 1 mM PMSF zugegeben. Die Zell-Lyse wurde beschleunigt durch Verwendung eines Vortexschüttlers für 30 min. Anschließend überführte man die Suspension in Zentrifugenröhrchen und zentrifugierte sie bei 3800 g, 4°C für 15 min. Der Überstand (HUVEC-Zytosolfraktion) wurde gesammelt, und die Proteine mit 10% TCA 1 h lang auf Eis präzipitiert. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (siehe oben) zurückgewonnen und das Protein-Pellet in eiskaltem Aceton gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (siehe oben) wurde die Proteinausbeute von einer 6-Felder-Platte in 100 µl SDS Probenpuffer gelöst. In einigen Versuchsansätzen wurde auch das Pellet aus dem ersten Zentrifugationsschritt (Zelldebris und Bakterien) in SDS-Probenpuffer resuspendiert, um Yops aus den Bakterienzellen freizusetzen.

5.7. Fluoreszenzfärbung und mikroskopische Auswertung

Die Aktinfärbung von HUVEC mit Hilfe von Rhodamin-Phalloidin wurde auf gleiche Weise durchgeführt wie vormals beschrieben (Aepfelbacher *et al.,* 1997). In Kürze zusammengefasst, wurden infizierte und / oder stimulierte Zellen auf Deckgläschen mit

PBS/3,7% Formaldehyd für 10 min fixiert, 5 min in kaltem Aceton bei –20°C permeabilisiert und anschließend luftgetrocknet. Die Glasplättchen wurden dann für 20 min mit Rhodamin-Phalloidin (Molecular Probes; 1:20 in PBS verdünnt) inkubiert und in Mowiol (Sigma), welches p-Phenylendiamin enthält, um das als Fading bezeichnete Verblassen der Färbung zu reduzieren, eingedeckt.

Für die Doppelfärbung von Aktin und adhärenten Bakterien wurden fixierte und permeabilisierte Zellen auf Glascoverslips für 10 min mit PBS/1% BSA geblockt, 45 min lang mit polyklonalem Kaninchen-Anti-Myf-Antikörper (1:500) und anschließend mit FITC-markiertem Anti-Kaninchen-IgG (1:100) sowie mit Rhodamin-Phalloidin (1:20) inkubiert. Zur immunzytochemischen Untersuchung der Lokalisation von YopE in WA(pYLCR+E)-infizierten HUVEC verwendete man einen affinitätsgereinigten polyklonalen Anti-YopE-Antikörper (1:20; Jacobi *et al*., 1998) als primären und FITC-markiertes Anti-Kaninchen-IgG (1:100) als sekundären Antikörper. Alle Schritte wurden von jeweils drei Waschvorgängen zu je 5 min in PBS/1% BSA zwischen Antikörperinkubationen und vor dem Eindecken in Mowiol begleitet. Die Präparate wurden mithilfe eines Leitz DM Fluoreszenzmikroskops untersucht und als digitale Bilder mittels einer „spot“-Camera (Visitron Systems, Puchheim, Germany) dokumentiert.

5.8. Herstellung rekombinanter Proteine

Rekombinantes N17Rac, V12CDC42Hs und N17CDC42Hs wurden als Glutathion-S-Transferase- (GST-) Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und auf Glutathion-Sepharose-Beads aufgereinigt, wie bereits früher beschrieben (Essler *et al.*, 1998a). Die Fusionsproteine wurden mit Thrombin gespalten, welches durch *p*-Aminobenzamidin-Beads (Sigma) entfernt wurde. Im Anschluss daran wurden die Proteine aufkonzentriert und gegen Mikroinjektionspuffer (siehe unten) dialysiert. Reinheitsgrad und vollständige Entfernung von Thrombin überprüfte man mit SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung. Die

Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) unter Verwendung von BSA als Standard ermittelt. Im zur Kontrolle angefertigten, Coomassie-gefärbten SDS-Gel zeigten die Protein-Präparationen im Wesentlichen nur eine Bande.

5.9. Mikroinjektion

Mikroinjektionen wurden mit einem Eppendorf Transjektor 5246 und einem Compic Inject Mikromanipulator (Cell Biology Trading, Hamburg, Germany) durchgeführt. Für diese Experimente wurden die Zellen auf Cellocate-Coverslips (Eppendorf)ausgesät und kultiviert. Rekombinante Proteine wurden in Mikroinjektionspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, und 5 mM $MgCl_2$) verdünnt und in einer Konzentration von 1,0 µg/µl in das Zytoplasma injiziert. Kontrollinjektionen mit Mikroinjektionspuffer oder GST führten zu keinen signifikanten Effekten bezüglich Zellmorphologie oder Aktinorganisation. Das mikroinjizierte Volumen betrug ungefähr $1\text{-}3x10^{-15}$ l/Zelle. Injizierte Zellen konnten durch Koinjektion von Ratten-IgG (5 µg/µl), gefolgt von einer Färbung mit FITC-konjugiertem Ziegen-Anti-Ratten-IgG (Dianova), identifiziert werden. In jedem Experiment wurden 50-100 Zellen injiziert und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

6. ERGEBNISSE

6.1. Experimentelle Grundlagen

Um in den später folgenden Experimenten mit reproduzierbaren und gut charakterisierten Versuchsparametern arbeiten zu können, war es zunächst notwendig, die geeigneten Bedingungen für eine *Yersinia*-Endothel-Interaktion herauszufinden. Die Darstellung der hierbei gewonnenen Daten würde im Verhältnis zur gelieferten Information zuviel Platz benötigen. Um unnötigen Ballast zu vermeiden, sei im folgenden nur die allgemeine Vorgehensweise erklärt.

In einer Vielzahl von Vorversuchen wurden verschiedenste Variablen eines Infektionsversuches im Zellkulturmodell ausgetestet. Dazu gehörten unter anderem Wachstumsstadium, Alter und Passage der Endothelzellen, das eingesetzte Verhältnis von Bakterien zu Zellen (multiplicity of infection, m.o.i.), die Art der Infektion (Sedimentation oder Zentrifugation der Bakterien auf die Zellen), sowie die eigentliche Zeit für die Interaktion. Letzteres erfolgte in Form von Zeitverläufen, um den Beginn sowie das Maximum morphologisch erfassbarer Yop-Effekte zu erkennen. Bezüglich der Art der Infektion wurden hauptsächlich zwei Methoden verglichen. Im ersteren Fall wurden entsprechende Volumina einer definierten Bakteriensuspension in die Zellkulturgefäße pipettiert und anschließend die Bakterien durch langsame Sedimentation an die HUVEC gebracht. Alternativ wurde das Absinken der Bakterien und damit der Beginn der Interaktion mit dem Endothel durch Zentrifugation sowohl beschleunigt als auch synchronisiert.

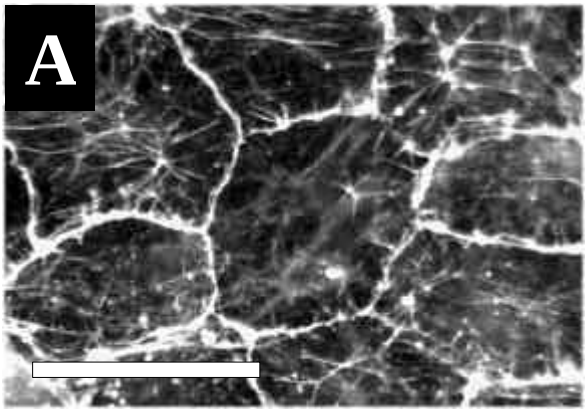
Ebenfalls im Rahmen dieser Vorversuche wurde die Wirkung verschiedener Bakterienstämme miteinander verglichen. Außerdem erfolgten Tests zur praktischen Durchführung der Stimulation Rho-GTPase-abhängiger Signale und deren Effekte in HUVEC. Eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten *Yersinia*-Stämme findet sich in Tabelle 3.

Stämme/Plasmide	Genotyp/Phänotyp	Quelle
WA-314	Serotyp O8; klinisches Isolat, enthält das Virulenzplasmid pYVO8	Heesemann *et al.*, 1986
WA-C	Plasmid-freies Derivat von WA-314	Ruckdeschel *et al.*, 1996
WA(pYLCR)	Mutante, enthält die *lcr*-Region und *yadA* auf dem Vektor pSUP102; fehlende Produktion von Effektor-Yops	Andor *et al.*, 2001
WA(pYLCR+E)	WA(pYLCR), komplementiert mit dem YopE und SycE kodierenden Plasmid pLAF-E	Andor *et al.*, 2001
WA(pYLCR+E_{R144A})	WA(pYLCR), komplementiert mit dem $YopE_{R144A}$ und SycE kodierenden Plasmid pLAF-E_{R144A}	Andor *et al.*, 2001
WA-C(pYV-515)	Mutante, fehlende Sekretion von Yops durch Tn5-insertionelle Inaktivierung von *lcrD* (kodiert LcrD, welches für die Yop-Sekretion notwendig ist)	Ruckdeschel *et al.*, 1996
WA-C(pYVO8ΔT)	Mutante, fehlende YopT-Produktion durch insertionelle Inaktivierung des *yopT*-Gens	Zumbihl *et al.*, 1999
WA-C(pYVO8ΔT/+T)	WA-C(pYVO8ΔT), rekomplementiert mit dem YopT kodierenden Plasmid pACYC184	Zumbihl *et al.*, 1999
WA-C(pYVO8ΔE)	Mutante, fehlende YopE-Produktion durch TnMax-insertionelle Inaktivierung des *yopE*-Gens	Zumbihl *et al.*, 1999

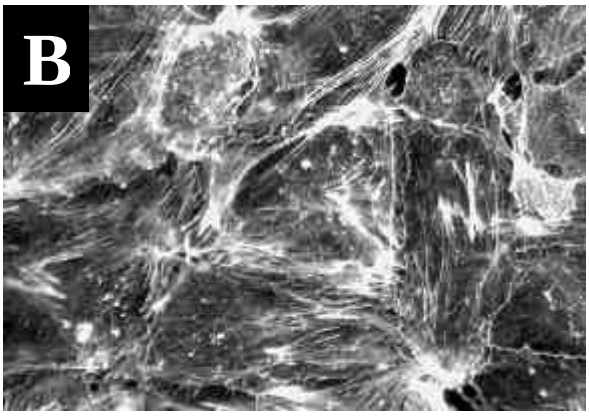
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten *Y. enterocolitica*-Stämme

6.2. Effekte der *Yersinia enterocolitica*-Infektion auf Aktinstrukturen in HUVEC

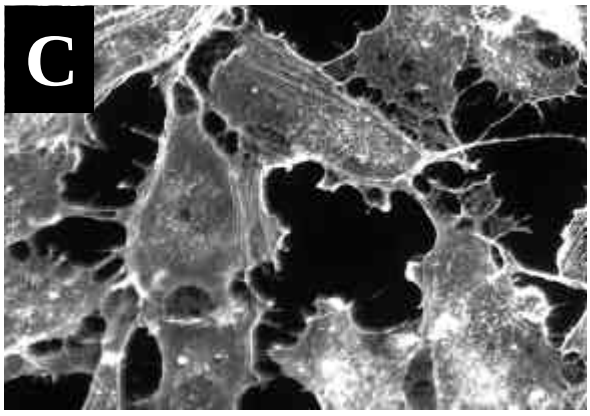
Mit dem Ziel, erste Effekte von *Yersinia enterocolitica*-Yops auf das Aktinzytoskelett abschätzen zu können, wurden konfluente HUVEC mit den Stämmen WA-C(pYV-515), WA-314, WA-C(pYVO8ΔT) und WA-C(pYVO8ΔE) infiziert, mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt und anschließend verglichen. Die *Yersinia*-Sekretionsmutante WA-C(pYV-515), unfähig Yops zu translozieren, führte zu einer morphologisch sichtbaren Veränderung des Aktinzytoskeletts im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollzellen (Abb. 7A und 7B). Es konnte eine Verdichtung der Aktinstrukturen zu Stressfasern mit einem insgesamt unruhigeren Zellbild beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich auf Aktivierungsmechanismen durch bakterielle Adhäsine oder Zellmembranbestandteile im Rahmen der Infektion zurückzuführen. Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit dem Wildtypstamm WA-314 zum Verschwinden der Aktin-Stressfasern sowie zu einer Veränderung der Zellform von einer polygonal- pflastersteinartigen hin zu einer unregelmäßigen Erscheinung mit einer ausgeprägten Kontinuitätsunterbrechung im



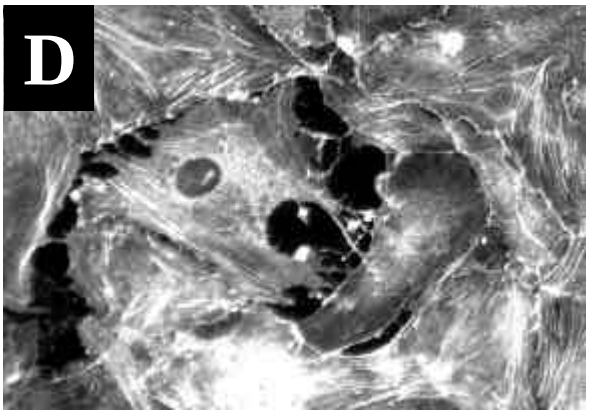
Kontrolle (uninfiziert)



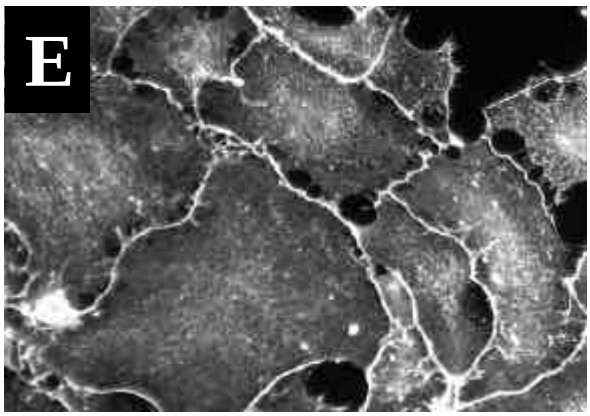
Infektion mit WA-C(pYV-515)



Infektion mit WA-314



Infektion mit WA-C(pYVO8ΔT)



Infektion mit WA-C(pYVO8ΔE)

Abb. 7: Effekte von verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen auf das Aktinzytoskelett in HUVEC

Rhodamin-Phalloidin-Färbungen von A) uninfizierten Zellen, sowie Zellen, welche mit B) WA-C(pYV-515), C) WA-314, D) WA-C(pYVO8ΔT) bzw. E) WA-C(pYVO8ΔE) infiziert wurden. Wie man erkennen kann, führte die Infektion mit dem Wildtypstamm in C zum Verschwinden von Stressfasern und zur Auflösung des Zellzusammenhalts mit Veränderung der Zellform. Ersterer Effekt fand sich nicht bei Infektion mit der YopT-Mutante in D, wohingen der zweite beschriebene Effekt nach Infektion mit der YopE-Mutante in E fehlte. Der weiße Balken in A entspricht 30 µm.

Bereich der Zell-Zell-Kontakte (Abb. 7C). Zellen, die mit der YopT-Mutante WA-C(pYVO8ΔT) infiziert wurden, einem Stamm mit der zytotoxischen Aktivität aller Yops bis auf YopT, zeigten ebenfalls die oben genannte Veränderung der Zellform. Die Bildung von Stressfasern dagegen war offensichtlich nur leicht beeinträchtigt und in einem Großteil der untersuchten Zellen immer noch sichtbar (Abb. 7D). Gegenteilig hierzu führte die Infektion von HUVEC mit WA-C(pYVO8ΔE), einem Stamm, der alle Toxine außer YopE in die Zielzellen transloziert, zum vollständigen Verschwinden von Stressfasern (Abb. 7E). Die Endothelzellen waren im Unterschied zu oben flach ausgebreitet, ohne die erwähnten Lücken an den Zellgrenzen aufzuweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die zytotoxisch bedingten morphologischen Veränderungen der infizierten Zellen aus mindestens zwei Komponenten zusammensetzen. Die Hemmung der Stressfasern ist nach diesen Daten zu urteilen, YopT-abhängig, wohingegen die beschriebene Veränderung der Zellform mit dem Aufbrechen der Zell-Zell-Kontakte einen durch YopE hervorgerufenen Effekt darzustellen scheint.

6.3. Herstellung eines *Y. enterocolitica*-Stammes, welcher YopE als einzigen Effektor transloziert

Um den Effekt von *Yersinia enterocolitica*-YopE auf Rho-GTPase gesteuerte Aktinregulationsvorgänge isoliert zu untersuchen, war es notwendig den störenden Einfluss der anderen Effektor-Yops auszuschalten, wobei jedoch weiterhin „physiologische“ Mengen von YopE in die Wirtszelle injiziert werden sollten.

Für diesen Zweck wurde die Tatsache genutzt, dass das gesamte TypIII-Sekretionssystem zusammen mit dem *Yersinia*-Adhäsin YadA und allen bekannten Effektor-Yops von *Yersinia* auf einem 70 kb Virulenzplasmid (im Falle von *Y. enterocolitica* O8 genannt pYVO8) kodiert ist. Davon ausgehend wurde ein zweiteiliges TypIII-Injektionssystem erschaffen (Abb. 8), indem man zunächst ein pYVO8-Fragment, welches alle für die Sekretion und Translokation

benötigten Gene enthält (die *lcr*-Region; Roggenkamp *et al.*, 1995) und ein pYVO8-Fragment einschließlich *yadA* in den Vektor pSUP102 kotransferierte, woraus das Plasmid pYLCR resultierte. In einem zweiten Schritt wurde ein Modul bestehend aus YopE (oder dessen GAP-negativer „Argininfinger"-Mutante $YopE_{R144A}$) und seinem Chaperon SycE in den Vektor pLAFRII geklont, woraus sich das Plasmid pLAF-E ergab (siehe Methodenteil für genauere Details).

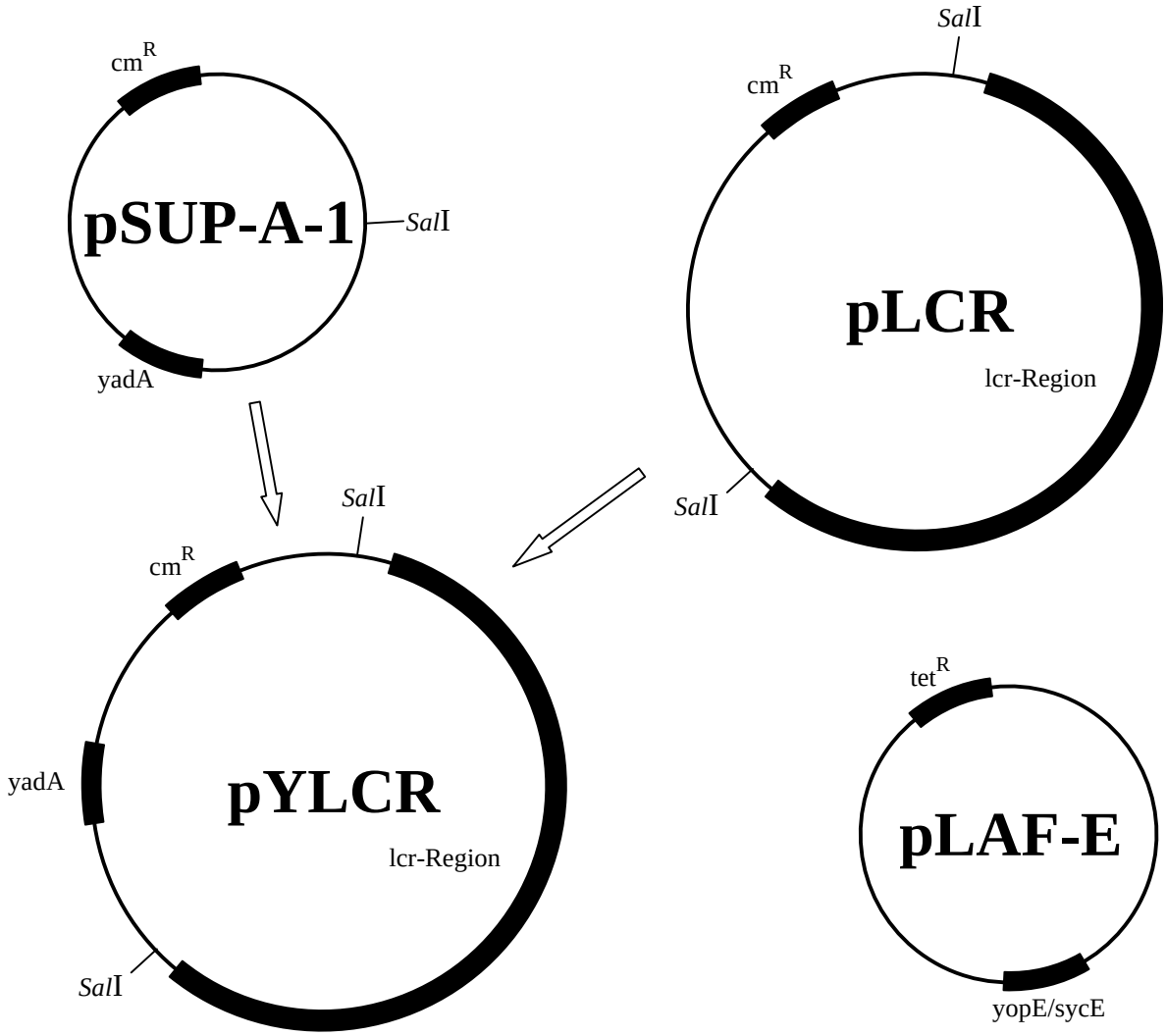


Abb. 8: Klonierungsstrategie und schematische Darstellung des pYLCR- und pLAF-E-Plasmids
Das Plasmid pSUP-A-1 entstand durch Einfügen des *yadA*-Gens in den Vektor pSUP102. Nach dem Restriktionsverdau von pLCR (Roggenkamp *et al.*, 1995) sowie pSUP-A-1 mit *Sal*I und anschließender Ligation entstand das neue Plasmid pYLCR, welches das TypIII-Sekretionssystem und *yadA* enthält. Durch Transformation des virulenzplasmidfreien *Y. enterocolitica*-Stammes WA-C mit pYLCR entstand WA(pYLCR). Zusätzliches Einbringen eines zweiten Plasmids pLAF-E in WA(pYLCR) führte zum Ergebnis eines *Y. enterocolitica*-Stammes WA(pYLCR+E), welcher YopE als einzigen Effektor transloziert.

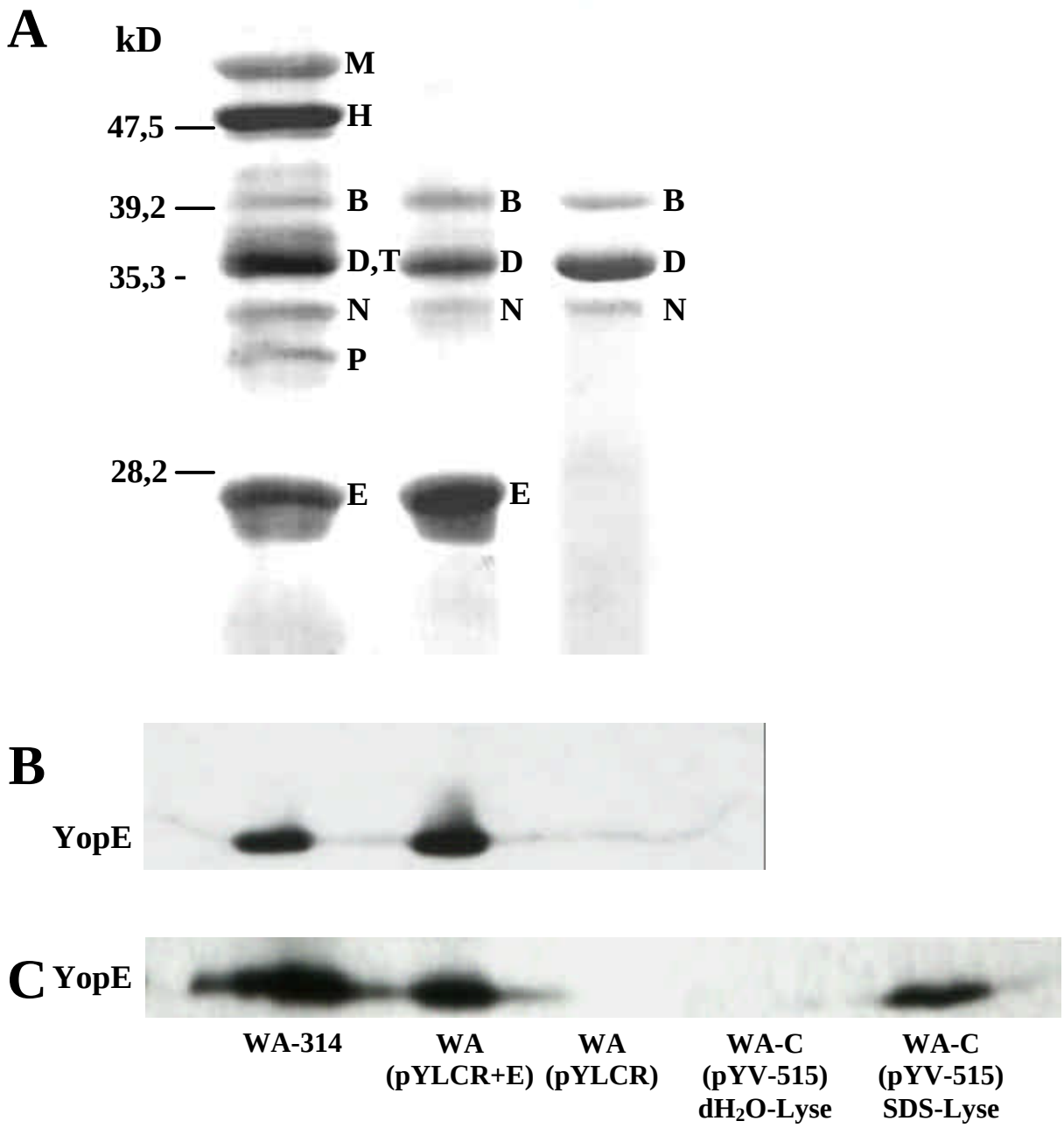


Abb. 9: Sekretion und Translokation von YopE durch WA(pYLCR+E)
A) Coomassie-Färbung elektrophoretisch aufgetrennter *Yersinia*-Proteine, sezerniert durch WA-314, WA(pYLCR+E) bzw. WA(pYLCR). Yops sind durch entsprechende Buchstaben gekennzeichnet.
B) Western-Blot-Analyse des sezernierten YopE
C) Western-Blot-Analyse von durch WA-314 und WA(pYLCR+E) in HUVEC transloziertem YopE. Um sicherzustellen, dass die im Text beschriebene dH2O-Lysemethode YopE aus HUVEC, jedoch nicht aus den Bakterienzellen freisetzt, wurde die *Yersinia*-Mutante WA-C(pYV-515) verwendet, welche YopE exprimiert, aber aufgrund einer insertionellen Inaktivierung von *lcrD* weder sezerniert noch transloziert. Es konnte kein YopE durch dH2O-Lyse aus WA-C(pYV-515)-infizierten HUVEC freigesetzt werden, wohingegen die Lyse mit SDS, 10 min bei 95°C, welche auch Bakterienzellen öffnet, zum Nachweis von YopE führte.

Zur Bestätigung der selektiven Freisetzung nur eines Effektors durch den neu hergestellten Stamm bediente man sich der anfangs beschriebenen Tatsache, dass Yersinien unter Inkubation bei 37°C in Ca^{2+}-freiem Wachstumsmedium ihre Yops in den Kulturüberstand sezernieren. Wie in Abb. 9A erkennbar, setzt der virulenzplasmidfreie *Yersinia*-Stamm WA-C, transformiert mit pYLCR [WA(pYLCR)], erwartungsgemäß zum Translokations-mechanismus gehörige Yops wie YopB, YopD und YopN frei, jedoch keine Effektor-Yops, welche normalerweise vom *Yersinia*-Wildtyp WA-314 freigesetzt werden. Der Stamm WA(pYLCR), kotransformiert mit dem *yopE* enthaltenden Plasmid pLAF-E [WA(pYLCR+E)] sezerniert YopE zusätzlich zu YopB, D und N (Abb. 9A und B).

Zum Nachweis der YopE-Translokation in Zellen infizierte man HUVEC mit verschiedenen *Yersinia*-Stämmen. Anschließend wurden die Endothelzellen, nicht jedoch die adhärenten Bakterienzellen mittels dH_2O-Lyse aufgeschlossen, durch Zentrifugation die zytosolische Fraktion gewonnen und auf das Vorhandensein von YopE untersucht. Wie in Abb. 9C deutlich sichtbar, ist WA(pYLCR+E) in der Lage, YopE in gleichen Mengen wie Wildtyp-Yersinien WA-314 in Zellen zu translozieren.

Aufgrund genannter Tatsachen eignet sich die Infektion von Endothelzellen mit WA(pYLCR+E) hervorragend zur Untersuchung der intrazellulären Funktion von YopE ohne Störung durch andere Effektor-Yops.

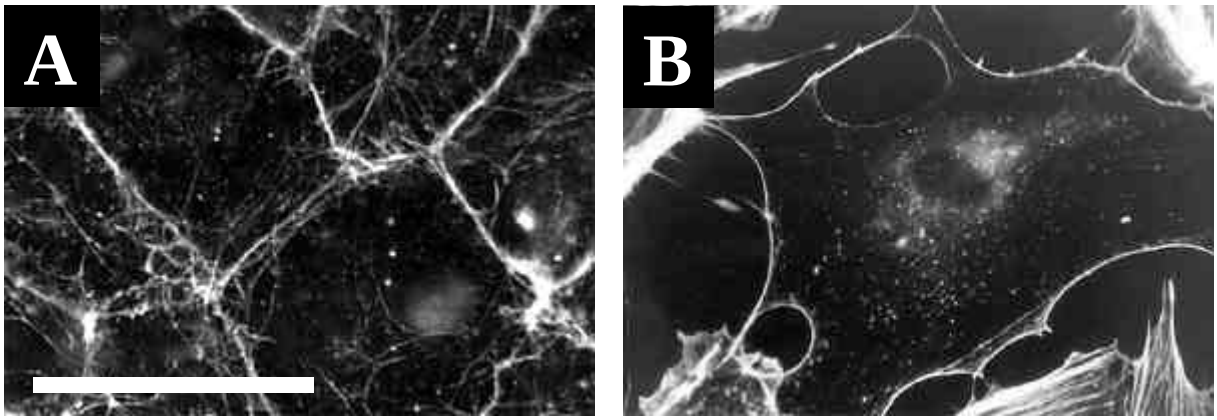
6.4. Effekt von YopE auf peripheres Aktin in konfluenten HUVEC

Um den Effekt von YopE auf zelluläres Aktin zu testen, wurden konfluente HUVEC mit den Stämmen WA(pYLCR), WA(pYLCR+E_{R144A}) oder WA(pYLCR+E) infiziert, mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt und miteinander verglichen. Die Infektion mit WA(pYLCR+E) bewirkte eine Zerstörung peripherer Aktinstrukturen an den Zell-Zell-Kontakten, Trennung der Endothelzellen voneinander sowie die Entstehung interzellulärer Lücken (Abb. 10D). Morphologische Veränderungen dieser Art waren nicht sichtbar nach Infektion mit

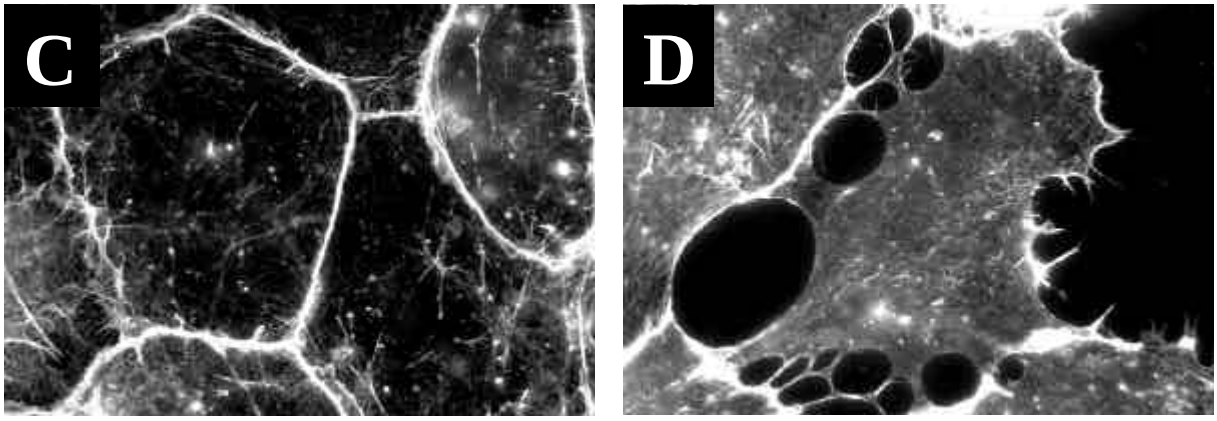
WA(pYLCR) (Abb. 10C) oder WA(pYLCR+E_{R144A}) (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass die beobachteten Effekte Folge der GAP-Aktivität von YopE waren. Die Abbildungen 10E und F zeigen, dass unter den Versuchsbedingungen in dieser Studie ungefähr gleiche Mengen von WA(pYLCR) oder WA(pYLCR+E) an HUVEC adhärierten. Bereits in vergangenen Arbeiten wurde die Rolle von Rho-GTPasen in der Regulation von Aktin an Zell-Zell-Kontakten charakterisiert (Braga *et al.*, 1997; Essler *et al.*, 1998a; Takaishi *et al.*, 1997). Im Vergleich mit diesen fiel auf, dass der Effekt von YopE auf periphere Aktinstrukturen eine starke Ähnlichkeit zu dem Effekt von mikroinjiziertem dominant negativen N17Rac aufwies (Abb. 10B). Auch konnte kürzlich von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Hemmung von RhoA mit C3-Transferase von Clostridium botulinum oder YopT von *Y. enterocolitica* Zell-Zell-Kontakte oder peripheres Aktin in HUVEC nicht signifikant zerstört (Aepfelbacher *et al.*, 1997; Essler *et al.*, 1998a; Zumbihl *et al.*, 1999). In gleicher Weise konnte man hier einen solchen Effekt mit mikroinjiziertem dominant negativen N17CDC42Hs auf periphere Aktinstrukturen in HUVEC nicht beobachten (Andor *et al.*, 2001). Diese Daten legen nahe, dass YopE in unstimulierten HUVEC über eine Hemmung von Rac zur Desorganisation von Aktin an Zell-Zell-Kontakten führt.

6.5. Effekt von YopE auf CDC42Hs-, Rac- oder Rho-induzierte Aktinstrukturen in HUVEC

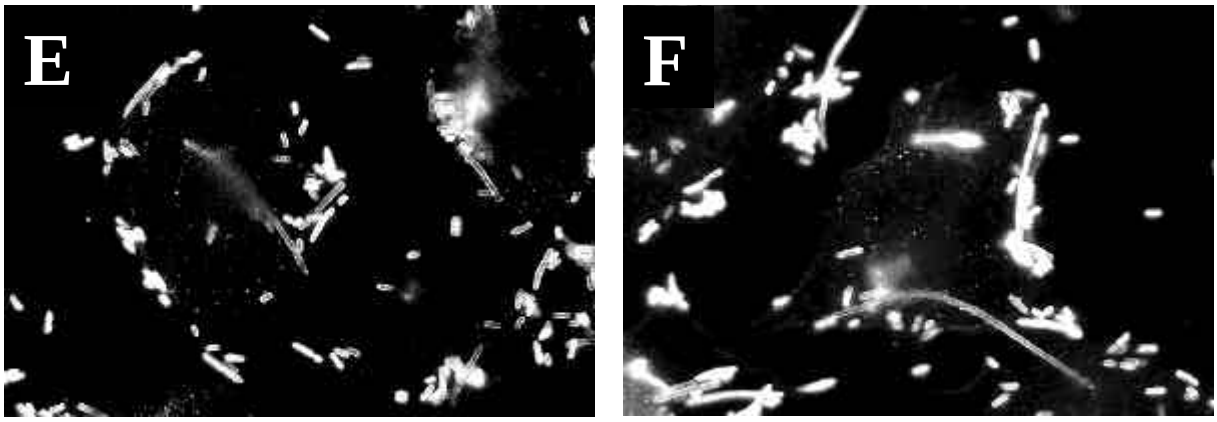
Als nächstes wurde untersucht, ob YopE die Neubildung Rho-, Rac- oder CDC42Hs-abhängiger Aktinstrukturen in HUVEC beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit WA(pYLCR), WA(pYLCR+E_{R144A}) oder WA(pYLCR+E) für zwei Stunden infiziert und anschließend mit 1) Bradykinin zur Induktion CDC42Hs-abhängiger Microspikes nach fünf Minuten, gefolgt von Rac-abhängigen Ruffles nach 15 Minuten (Abb. 11A und B); 2) Sphingosin-1-Phosphat zur direkten Stimulation Rac-abhängiger Ruffles (Abb. 12A) oder 3)



Kontrolle (uninfiziert) N17Rac-Mikroinjektion



Infektion mit WA(pYLCR) Infektion mit WA(pYLCR+E)



Bakterienfärbung zu C Bakterienfärbung zu D

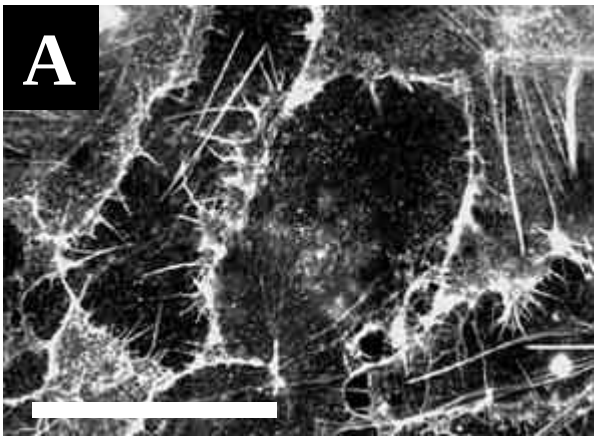
Abb. 10: Effekt von YopE auf Aktinstrukturen im Bereich der endothelialen Zell-Zell-Kontakte.
A) bis D) Rhodamin-Phalloidin-Färbungen von A) uninfizierten Zellen, B) Zellen, die mit dominant negativem N17Rac mikroinjiziert wurden, C) mit WA(pYLCR) bzw. D) mit WA(pYLCR+E) infizierten Zellen. Letztere zeigen eine ähnliche Morphologie wie die mikroinjizierten Zellen in B.
E) und F) Die infizierten Zellen in C bzw. D wurden zusätzlich mit einem polyklonalen Antikörper gegen das *Yersinia*-Oberflächenprotein Myf gefärbt, um adhärente Bakterien darzustellen. Der Balken entspricht 30 µm.

mit Thrombin zur Erzeugung von Stressfasern über die Aktivierung von Rho/Rho-Kinase (Abb. 12C) stimuliert.

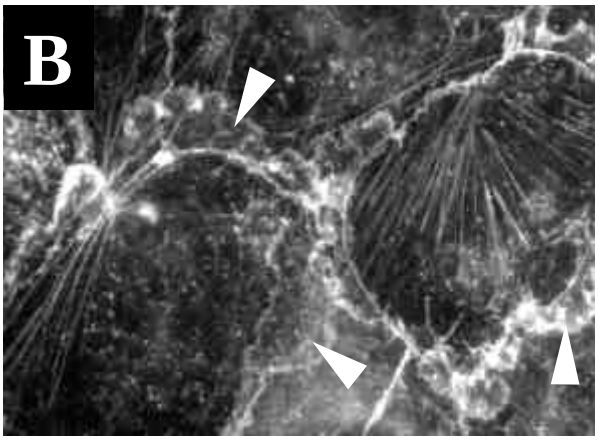
In Swiss 3T3-Fibroblasten aktiviert Bradykinin zunächst CDC42Hs, welches anschließend Rac aktiviert (Kozma *et al.*, 1995). Wir konnten zeigen, dass der gleiche Mechanismus in HUVEC existiert, da Mikroinjektion von N17CDC42Hs sowohl die Entstehung von Microspikes als auch von Ruffles nach Bradykininstimulation hemmte, wogegen N17Rac lediglich die Neubildung von Ruffles blockierte (Andor *et al.*, 2001).

Man konnte beobachten, dass HUVEC, welche zuerst mit WA(pYLCR+E) infiziert und anschließend mit Bradykinin stimuliert wurden, weiterhin Mikrospikes ausbildeten, die nachfolgende Entstehung von Ruffles jedoch war vollständig unterbunden (Abb. 11G, Abb. 13). Gleichermaßen lief die Neuformation von Microspikes nach Mikroinjektion von konstitutiv aktivem V12CDC42Hs auf normale Weise ab, während die anschließende Bildung von Ruffles in WA(pYLCR+E)-infizierten Zellen verhindert wurde (Andor *et al.*, 2001). In WA(pYLCR)- oder WA(pYLCR+E_{R144A})-infizierten HUVEC blieb die Entstehung von Microspikes und Ruffles nach Bradykininstimulation unverändert (Abb. 11C, 11D, 11H). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Aktivierung von CDC42Hs nicht gehemmt wird, während die CDC42Hs-induzierte Rac-Aktivierung in HUVEC durch YopE blockiert wird.

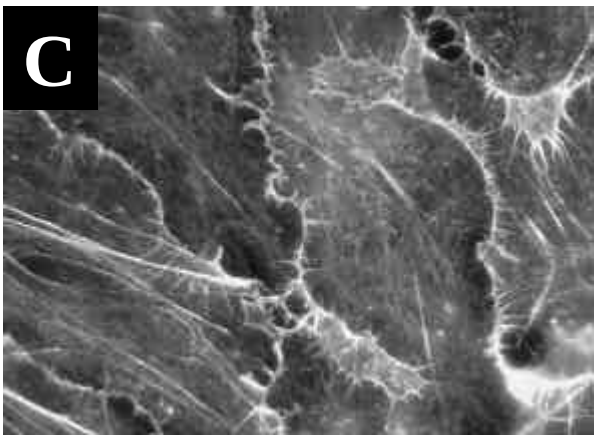
Sphingosin-1-Phosphat aktiviert ebenfalls Rac-abhängiges „Membrane Ruffling“ in HUVEC (Essler *et al.*, 2002). Mikroinjektion von N17Rac, jedoch nicht N17CDC42Hs konnte die Bildung Sphingosin-1-Phosphat-stimulierter Ruffles verhindern, was auf eine CDC42-unabhängige Rac-Aktivierung hinweist (Andor *et al.*, 2001). Überraschenderweise waren Zellen, welche mit WA(pYLCR+E) infiziert und anschließend mit Sphingosin-1-Phosphat stimuliert wurden, weiterhin in der Lage, Ruffles auszubilden (vgl. Abb. 12A mit B, Abb. 13). Die Zahl der infizierten Zellen, welche Ruffles aufwiesen, unterschied sich nicht signifikant von der Menge der nichtinfizierten Zellen mit Ruffles (Abb. 13).



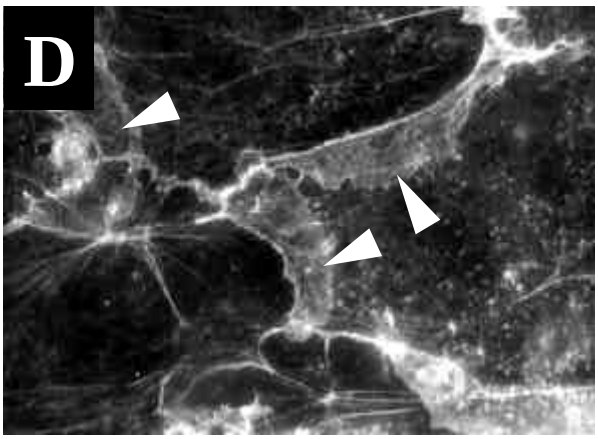
Kontrolle, Bradykinin 5 min



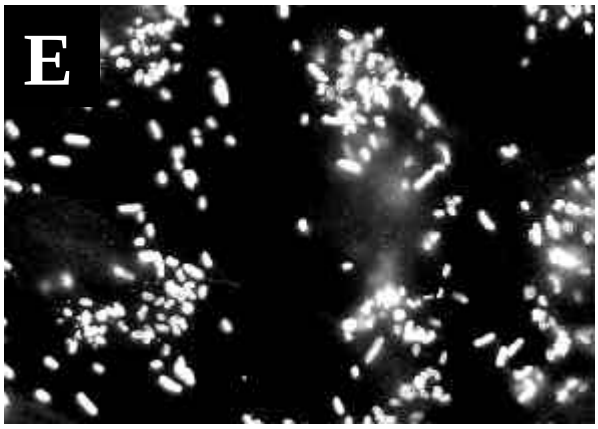
Kontrolle, Bradykinin 15 min



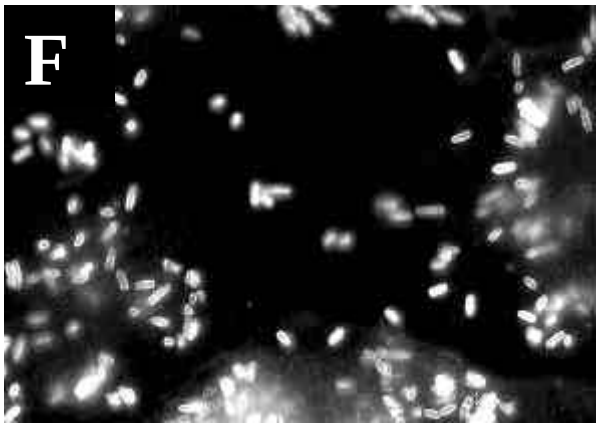
Infektion mit WA(pYLCR),
Bradykinin 5 min



Infektion mit WA(pYLCR),
Bradykinin 15 min

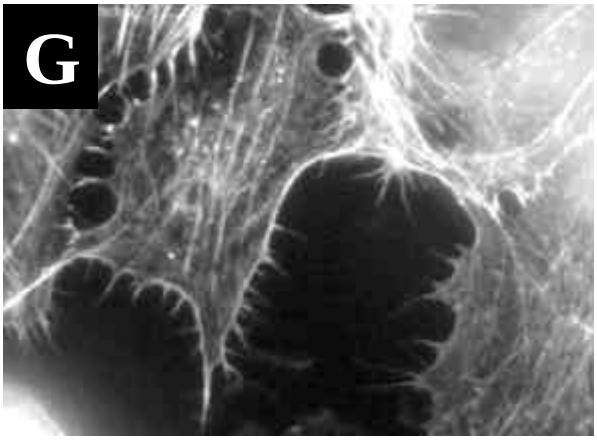


Bakterienfärbung zu C

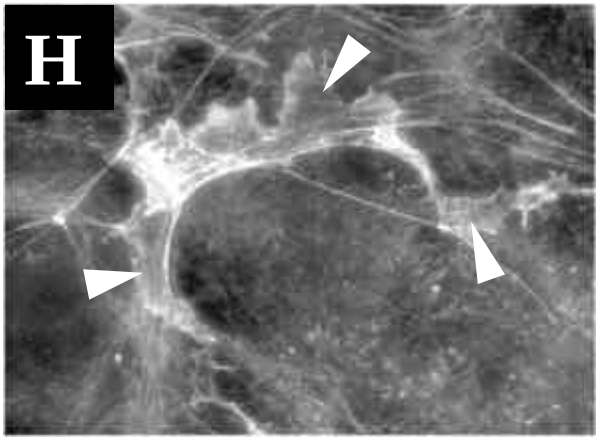


Bakterienfärbung zu D

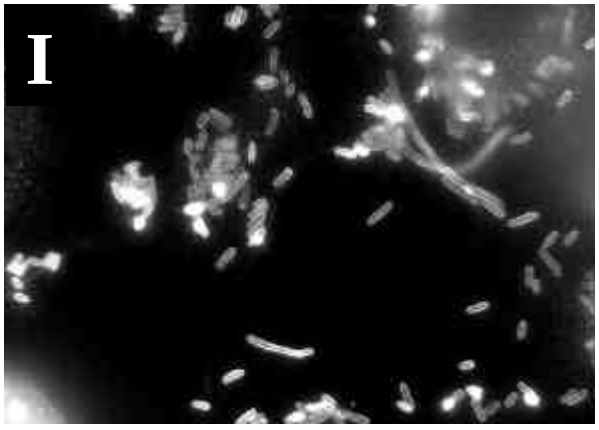
Abb. 11 (diese und folgende Seite): Effekt von YopE auf die Bradykinin-stimulierte Bildung von Lamellipodien.
Text siehe folgende Seite.



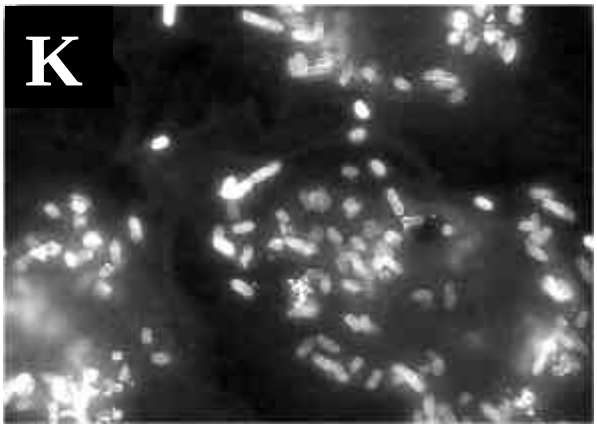
Infektion mit WA(pYLCR+E),
Bradykinin 15 min



Infektion mit WA(pYLCR+E_{R144A}),
Bradykinin 15 min



Bakterienfärbung zu G



Bakterienfärbung zu H

Abb. 11 (vorhergehende und diese Seite): Effekt von YopE auf die Bradykinin-stimulierte Bildung von Lamellipodien.
Die Zellen wurden mit Bradykinin (100 ng ml^{-1}) für 5 min (A, C) bzw. 15 min (B, D, G, H) stimuliert.
A, B, C, D, G, H) Rhodamin-Phalloidin-Färbungen von A, B) uninfizierten Zellen, C, D) mit WA(pYLCR), G) WA(pYLCR+E) bzw. H) WA(pYLCR+E_{R144A}) infizierten HUVEC.
E, F, I, K) Zusätzliche Färbung der infizierten Zellen in C, D, G, H mit einem Anti-Myf-Antikörper, um adhärente Bakterien sichtbar zu machen. Die Ruffles in B, D und H sind durch Pfeile gekennzeichnet. Wie man in G erkennen kann, induziert Bradykinin in Zellen, die mit WA(pYLCR+E) infiziert wurden, weiterhin Mikrospikes (Filopodien), jedoch keine Ruffles (Lamellipodien). Der Balken entspricht 30 µm.

Man konnte jedoch feststellen, dass die Ruffles in den infizierten Zellen geringfügig schmaler waren, vermutlich aufgrund der Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte (Abb. 12B).

Zuletzt wurde der Effekt von YopE auf die Thrombin-induzierte Stressfaserneubildung, welche durch Rho/Rho-Kinase reguliert wird (Essler *et al.*, 1998a), geprüft. Ungefähr 40% der Zellen auf dem Deckglas rundeten sich ab oder lösten sich von der Unterlage. Dieser Effekt war höchstwahrscheinlich auf die stark kontraktile Wirkung von Thrombin, verstärkt durch die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte nach WA(pYLCR+E)-Infektion zurückzuführen.

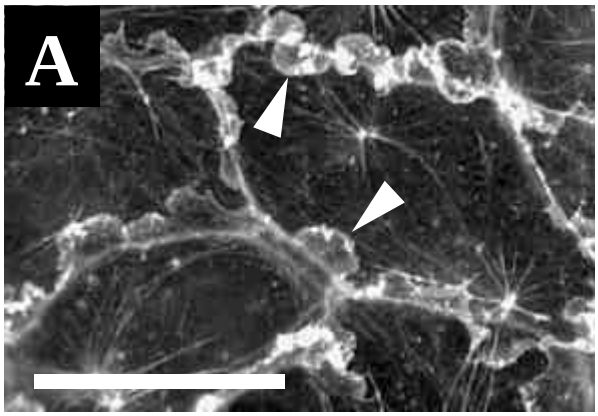
Man konnte daher lediglich diejenigen Zellen bezüglich Stressfaserneubildung bewerten, welche noch auf der Zellkulturplatte ausgebreitet waren (circa 60% der ursprünglichen Anzahl). Alle diese Zellen zeigten Stressfasern (vgl. Abb. 12C mit 12D) trotz deutlicher Anzeichen einer Infektion mit WA(pYLCR+E). Folglich war auch die Rho-abhängige Stressfaserentstehung unbehelligt von YopE.

Diese Daten zeigen, dass YopE von *Y. enterocolitica* in HUVEC selektiv eine zur Aufrechterhaltung von peripheren Aktinstrukturen benötigte basale Rac-Aktivität hemmt, ebenso wie die Aktivierung von Rac über CDC42Hs, jedoch nicht die Aktivierung von Rac über einen Plasmamembranrezeptor für Sphingosin-1-Phosphat.

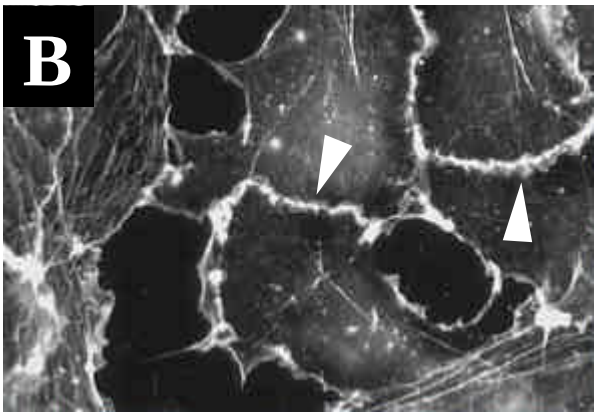
Dies liefert einen Hinweis für eine hohe Spezifität von YopE innerhalb primärer Zielzellen, welche man aus Studien der YopE-Aktivität *in vitro* nicht vorhersehen konnte (Abb. 17).

6.6. Effekt von YopE auf CDC42Hs- oder Rac-abhängige Aktinstrukturen in primären Makrophagen

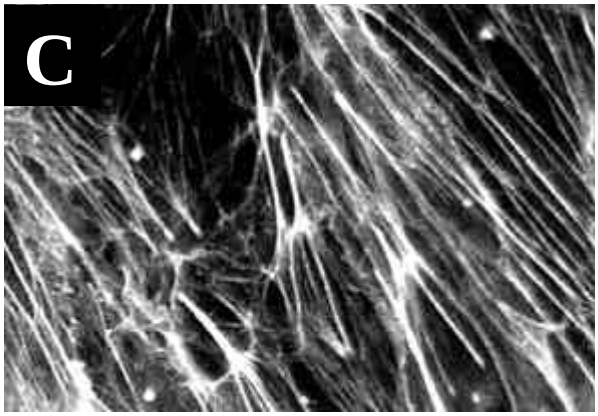
Um sicherzustellen, dass die intrazelluläre Spezifität von YopE nicht auf Endothelzellen beschränkt ist, haben wir noch ein anderes Zellmodell getestet. Wir wählten hierfür primäre humane Makrophagen, welche als professionelle Phagozyten natürlicherweise einen wichtigen Angriffspunkt im Rahmen einer Infektion mit Yersinien darstellen (Cornelis *et al.*, 1998; Cornelis and Wolf-Watz, 1997). Dazu wurden diese für 1,5 h mit WA(pYLCR)



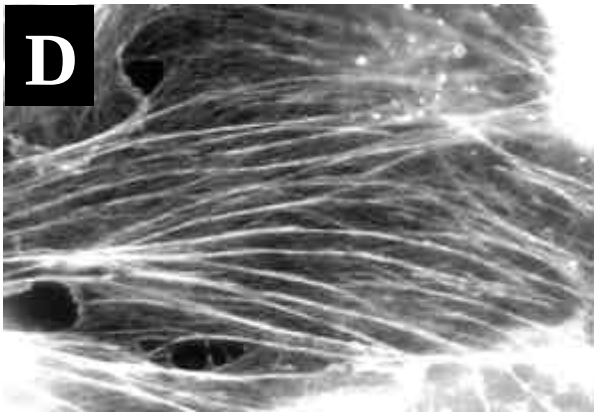
Kontrolle (uninfiziert), S1P 2 min



Infektion mit WA(pYLCR+E) S1P 2 min



Kontrolle (uninfiziert), Thrombin 2 min



Infektion mit WA(pYLCR+E), Thrombin 2 min

Abb. 12: Kein Effekt von YopE auf Sphingosin-1-Phosphat-stimulierte Bildung von Ruffles oder Thrombin-stimulierte Entstehung von Stressfasern.
Rhodamin-Phalloidin-Färbungen A, C) uninfizierter bzw. B, D) WA(pYLCR+E)-infizierter HUVEC, welche jeweils für 2 min mit 1 µM Sphingosin-1-Phosphat (A, B) bzw. mit 1 U ml^{-1} Thrombin (C, D) stimuliert wurden. Ruffles in A und B sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Balken entspricht 30 µm.

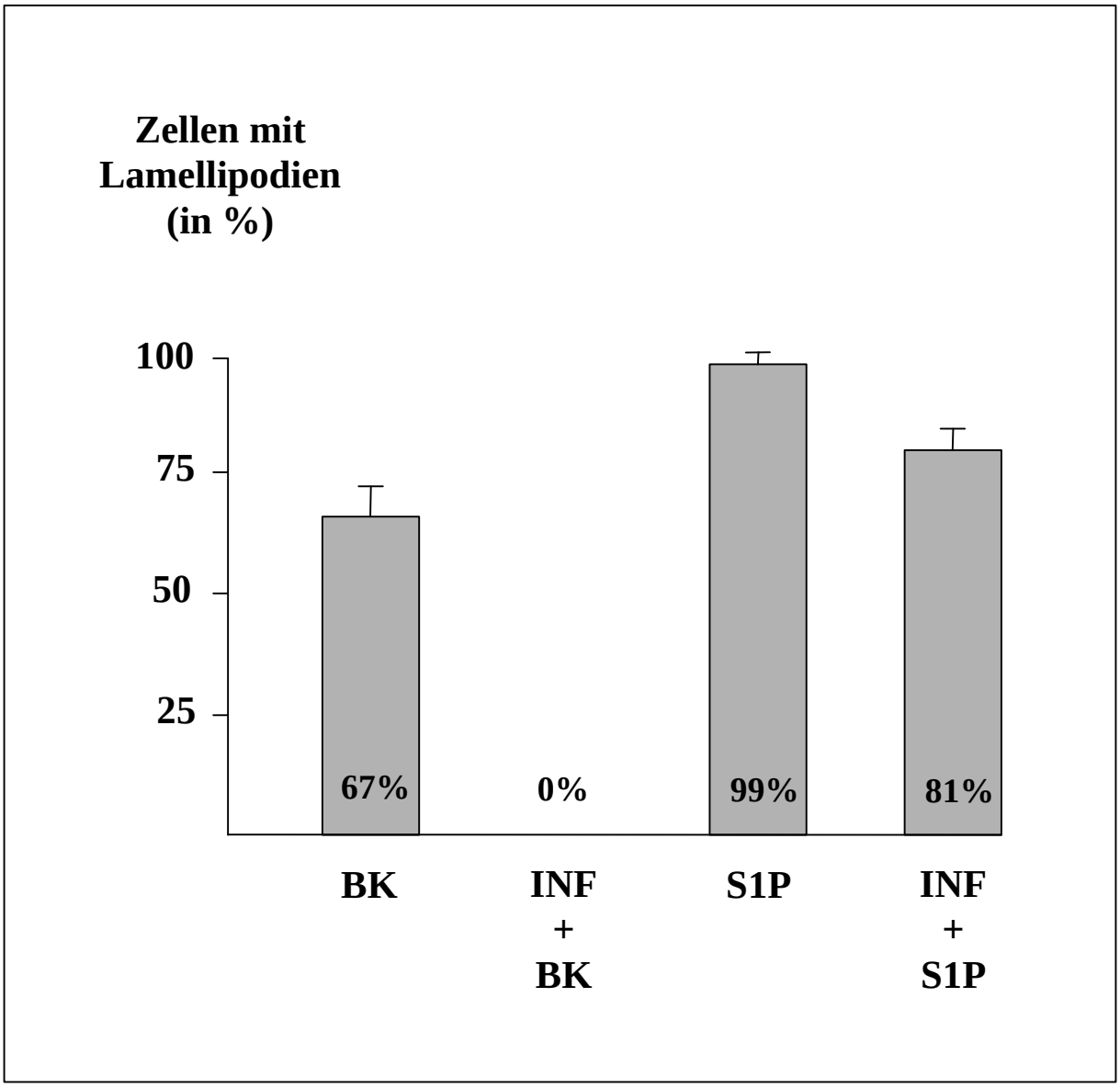
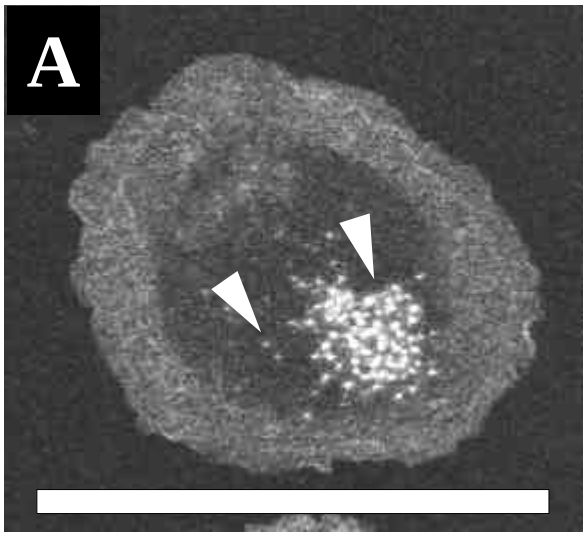


Abb. 13: Bradykinin-induzierte Bildung von Aktin-Ruffles wird durch YopE verhindert.
BK = Bradykinin 100 ng ml^{-1} für 15 min
S1P = Sphingosin-1-Phosphat 1 µM für 2 min
INF = Infektion mit WA(pYLCR+E) für 2 h
INF+BK = Infektion mit WA(pYLCR+E), gefolgt von Bradykinin-Stimulation
INF+S1P = Infektion mit WA(pYLCR+E), gefolgt von Sphingosin-1-Phosphat-Stimulation
Die Balken zeigen die Durchschnittswerte mit Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten. Je Experiment und Versuchsparameter wurden mindestens 300 Zellen ausgewertet.

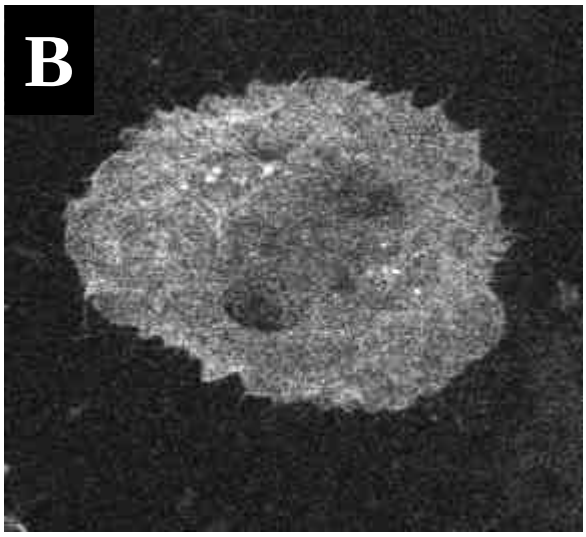
beziehungsweise WA(pYLCR+E) infiziert und im Anschluss zur mikroskopischen Auswertung mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Wie man erkennen kann, führte eine Infektion mit WA(pYLCR) zu keiner signifikanten Veränderung der Zellmorphologie (vergleiche Abb. 14A und 14B). Auch nach Infektion mit WA(pYLCR+E) war kein deutlicher Effekt auf die Zellmorphologie erkennbar. Sowohl WA(pYLCR)- als auch WA(pYLCR+E)-infizierte Zellen zeigten allerdings eine Verminderung sogenannter Podosomen, welche sowohl Rho-, Rac- und CDC42-abhängig sind als auch von einer Erhöhung intrazellulären Ca2+ (möglicherweise verursacht durch die Poren nach WA(pYLCR)-Infektion) desorganisiert werden (Linder and Aepfelbacher, 2003).

In einem zweiten Versuchsansatz stimulierte man die Makrophagen im Anschluss an die Infektion mit 1) fMLP zur Induktion von CDC42Hs-abhängigen Microspikes, mit anschließend zusätzlichem Auftreten von Rac-abhängigen Ruffles (Abb. 15A) oder 2) Sphingosin-1-Phosphat zur direkten Stimulation Rac-induzierter Ruffles (Abb. 15C und 15D). Ähnlich den Mechanismen in Endothelzellen, führt eine Aktivierung von CDC42Hs durch fMLP zur nachfolgenden Aktivierung von Rac, Sphingosin-1-Phosphat scheint dagegen Rac auf direktem Weg zu stimulieren. Mikroinjektion von N17CDC42Hs in Makrophagen hemmt beides, die Entstehung von Microspikes und Ruffles nach fMLP-Stimulation, während N17Rac lediglich die Neubildung von Ruffles inhibiert (A. Wiedemann, persönliche Mitteilung).

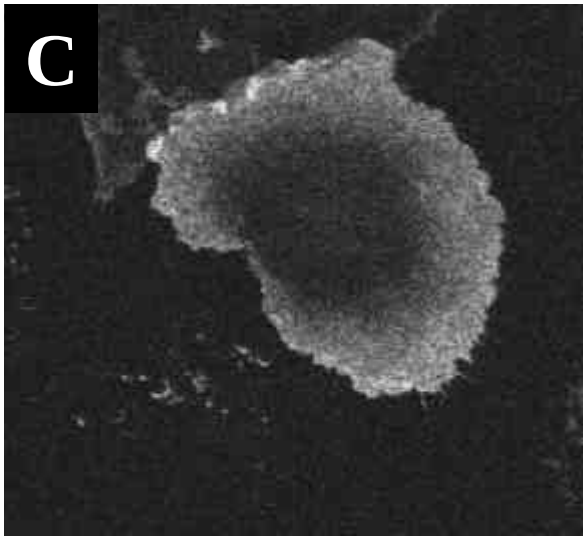
Bezüglich der indirekten Aktivierung von Rac durch CDC42Hs konnte in Makrophagen überraschenderweise keine solch scharfe zeitliche Trennung zwischen dem Auftreten von Filopodien und Lamellipodien erreicht werden wie im Falle der HUVEC, so dass man in Zellen, welche zuerst mit WA(pYLCR) infiziert und danach mit fMLP stimuliert wurden, beide genannten Aktinstrukturen nebeneinander erkennen konnte (Abb. 15A).



Kontrolle (uninfiziert)

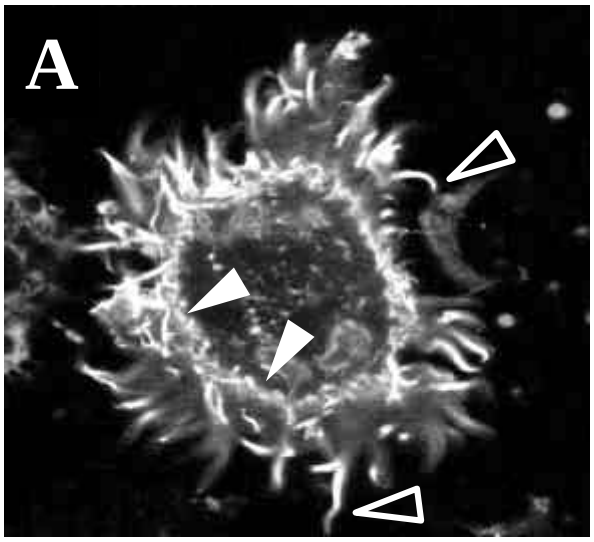


Infektion mit WA(pYLCR)

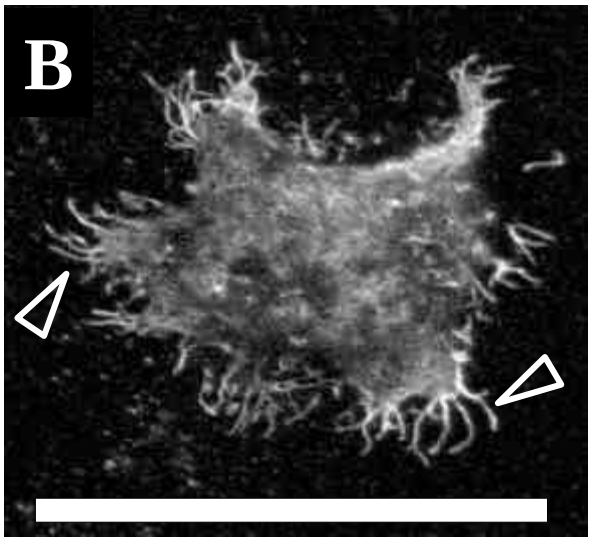


Infektion mit WA(pYLCR+E)

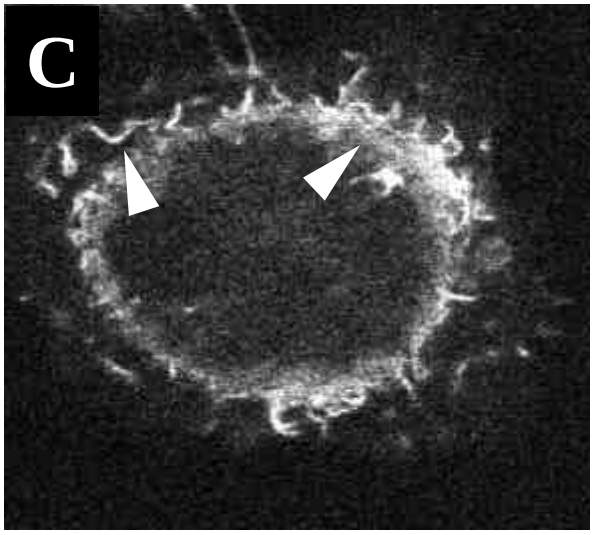
Abb. 14: Effekt von YopE auf Aktinstrukturen in primären Makrophagen
Rhodamin-Phalloidin-Färbungen von A) einer uninfizierten Zelle oder Zellen die mit B) WA(pYLCR) bzw. C) WA(pYLCR+E) infiziert wurden. Neben einer leichten Veränderung der Zellform in C erkennt man, dass sowohl WA(pYLCR) als auch WA(pYLCR+E) punktartige Aktinstrukturen, sogenannte Podosomen zerstörten. Podosomen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Konfokalmikroskopische Aufnahmen. Der Balken entspricht 50 µm.



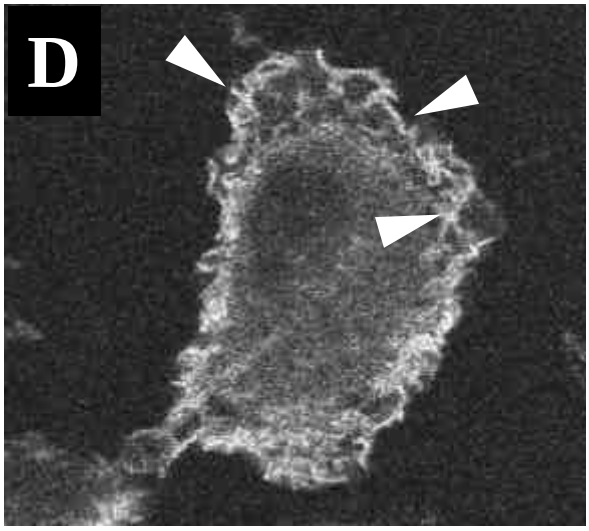
Infektion mit WA(pYLCR),
fMLP 60 min



Infektion mit WA(pYLCR+E),
fMLP 60 min



Infektion mit WA(pYLCR),
S1P 2 min



Infektion mit WA(pYLCR+E),
S1P 2 min

Abb. 15: Effekt von YopE auf extrazellulär stimulierte Lamellipodienbildung in primären Makrophagen.
Rhodamin-Phalloidin-Färbungen von A, C) WA(pYLCR) bzw. B, D) WA(pYLCR+E)-infizierten Zellen, welche für 1 h mit 1 µg ml^{-1} fMLP (A, B) bzw. für 2 min mit 10 µM Sphingosin-1-Phosphat (C, D) stimuliert wurden. Weder die Bildung von Mikrospikes noch die Entstehung von Sphingosin-1-Phosphat-stimulierten Ruffles wird durch YopE gehemmt.
Wie man jedoch in B erkennen kann, wird die fMLP-abhängige, indirekt stimulierte Lamellipodienbildung durch YopE unterbunden. Ruffles sind mit gefüllten Pfeilen, Microspikes in A) und B) mit offenen Pfeilen gekennzeichnet.
Konfokalmikroskopische Aufnahmen. Der Balken entspricht 50 µm.

Bei mit WA(pYLCR+E) infizierten Makrophagen waren hingegen nach fMLP-Stimulation lediglich Microspikes zu erkennen, während das Ruffling ausblieb (Abb. 15B). Die direkte Induktion von Lamellipodienbildung mittels Sphingosin-1-Phosphat-Stimulation wurde durch vorhergehende WA(pYLCR+E)-Infektion im Vergleich zur Infektion mit WA(pYLCR) nicht gehemmt (vergleiche Abb. 15C und 15D).

6.7. Inaktivierung der GTPase Rho durch YopT

Wie in Kapitel 5.2. beschrieben, erschien diejenige Komponente einer *Yersinia enterocolitica*-Infektion, welche zur Hemmung der Stressfaserbildung in HUVEC führte, YopT-abhängig. Aufbauend auf diese Ergebnisse konnte in der Arbeit von Zumbihl *et al.* (1999) gezeigt werden, dass YopT von *Y. enterocolitica* eine chemische Modifikation sowie eine intrazelluläre Umverteilung der GTPase RhoA, welche die Stressfaserbildung vermittelt, verursacht. Mittels zweidimensionaler SDS-Gelelektrophorese von Zytosolextrakten und anschließendem Western-Blot konnte gezeigt werden, dass die Infektion von COS-7-Zellen mit dem *Yersinia*-Wildtyp WA-314 zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes von RhoA in einen saureren Bereich führte (Abb. 16). Einen solchen Effekt konnte man weder in uninfizierten Kontrollzellen noch in Zellen, welche mit der YopT-Mutante WA-C(pYVO8ΔT) infiziert waren, erkennen. Wurde letztere Mutante jedoch mit *yopT* rekomplementiert [WA-C(pYVO8ΔT/+T)] und zur Infektion verwendet, kam es zur gleichen Veränderung des Laufverhaltens von RhoA wie nach Infektion mit dem Wildtyp. Die Änderung des isoelektrischen Punktes war demzufolge YopT-abhängig.

Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins ist festgelegt durch dessen Zusammensetzung aus bestimmten Aminosäuren. Einer Veränderung dieses definierten Punktes liegt eine chemische Modifikation des entsprechenden Proteins zugrunde, wie dies folglich auch bei RhoA der Fall war. Diese Daten legten nahe, dass sich der Funktionsmechanismus von YopT deutlich von

dem des *Yersinia*-Toxins YopE unterscheidet, indem bei ersterem nicht die Aktivierung einer GTPase im Signalkaskaden-Netzwerk, sondern die GTPase selbst den Angriffspunkt darstellt.

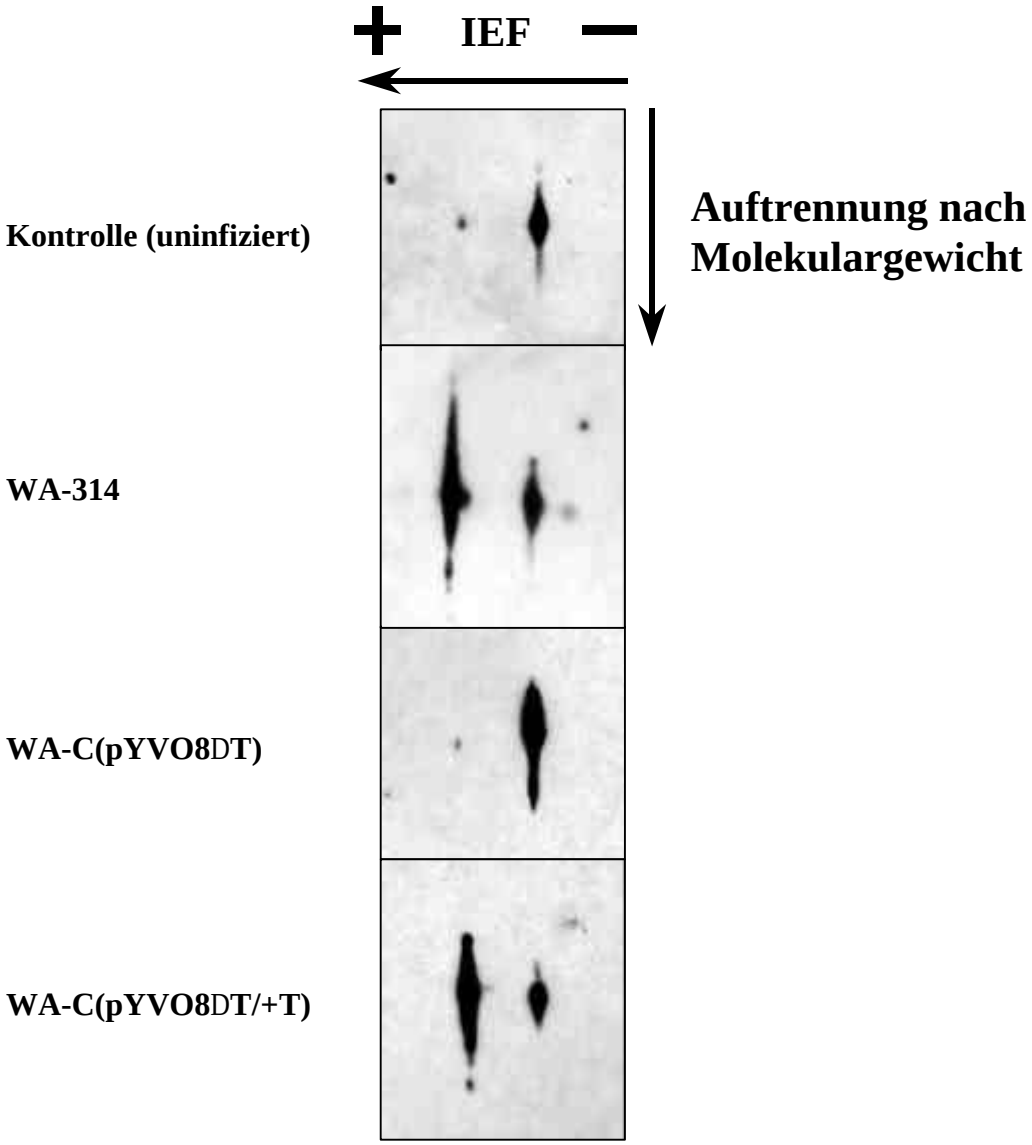


Abb. 16: Modifikation von RhoA durch YopT
Western-Blot-Nachweis von in zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrenntem RhoA aus Lysaten infizierter Zellen. Der senkrechte Pfeil symbolisiert die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht, der waagerechte Pfeil entspricht der isoelektrischen Fokussierung (IEF) im pH-Gradienten (+ = saurer, − = alkalischer pH). Wie man erkennen kann, führt sowohl die Infektion mit dem Wildtypstamm WA-314 als auch mit der rekomplementierten Mutante WA-C(pYVO8ΔT/+T) zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes von zellulärem RhoA in einen saureren Bereich (linke „Spots“). (Abbildung aus Zumbihl *et al.*, 1999).

7. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beeinflussung Aktinzytoskelett-regulierender Mechanismen durch die *Yersinia enterocolitica*-Moduline YopE und YopT untersucht.

Zu Beginn dieser Studien waren die Fähigkeiten von YopE (Rosqvist *et al.*, 1991) und YopT (Iriarte and Cornelis, 1998) bekannt, das Aktinzytoskelett eukaryotischer Zellen zu beeinflussen. Ebenso wusste man von der zentralen Rolle, welche Rho-GTPasen in der Aktinregulation und Ausbildung charakteristischer zytoskelettaler Strukturen spielen (Tapon and Hall, 1997). In den vergangenen Jahren erkannte man, dass sich viele pathogene Erreger diese Regulationsprinzipien zunutze machen und in die Rho-GTPase-Signalwege eingreifen.
Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde der Wirkung bakterieller Toxine auf Rho-GTPasen nachgegangen (Aepfelbacher *et al.*, 1997; Essler *et al.*, 1998a+b). Die genaue Funktionsweise der *Yersinia*-Moduline war jedoch noch weitgehend unklar, ebenso wie exakte Kenntnisse über die Effekte der *Yersinia*-Moduline auf natürliche Zielzellen von *Yersinia*. Als ein möglicher Angriffspunkt von Yersinien und ihren Effektoren wurde von Cornelis *et al.* (1998) das Gefäßendothel vermutet. In dieser Arbeit wurden die Wirkungen von YopE und YopT auf Rho-GTPase-abhängige Veränderungen des Aktinzytoskeletts im Endothelzellmodell untersucht. Dazu bediente man sich der Tatsache, dass das gesamte TypIII-Sekretionssystem zusammen mit dem *Yersinia*-Adhäsin YadA und allen bekannten Effektor-Yops von *Yersinia* auf einem 70 kb Virulenzplasmid kodiert ist und konstruierte eigens für die Untersuchung des YopE-Effektes einen Stamm, welcher lediglich YopE als Effektor in die infizierten Zellen transloziert.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass *Y.enterocolitica*-YopE, in „physiologischen“ Mengen in endotheliale Zielzellen injiziert, selektiv Rac-, aber nicht Rho- oder CDC42Hs-vermittelte

Aktin(-um-)organisation moduliert. Dieser Befund erweitert vorhergehende Studien, die *in vitro* zeigten, dass sich die GAP-Aktivität von YopE gleichermaßen effektiv auf Rho, Rac oder CDC42Hs auswirkt (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000). Über Unterschiede in der Aktivität von GAPs für Rho-GTPasen im Vergleich zwischen *in vitro* und *in vivo* wurde bereits früher berichtet (Ridley *et al.*, 1993). Weitere Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass YopE die Ruffle-Bildung, jedoch nicht die Entstehung von Microspikes in primären Makrophagen, stimuliert mit dem chemotaktisch wirksamen Agens fMLP, verhindern kann. Dies lässt vermuten, dass die intrazelluläre Spezifität von YopE nicht nur auf Endothelzellen beschränkt ist.

Gegenwärtig kann man darüber, wie die intrazelluläre Spezifität von YopE aufrechterhalten wird, lediglich Vermutungen anstellen. Auf Grund der Anwesenheit verschiedener Ionen oder organischer Moleküle könnte YopE im intrazellulären Milieu einfach eine höhere Affinität gegenüber Rac als zu CDC42Hs oder Rho aufweisen. Auf der anderen Seite könnte YopE wegen Sequestrierung durch Regulatoren oder nachgeschaltete Effektoren oder aufgrund seiner spezifischen Lokalisation in der Zelle keinen Zugang zu Rho und CDC42Hs erlangen.
Weiterhin kann man spekulieren, dass YopE zwar erfolgreich mit denjenigen GEFs konkurrieren kann, welche für die Aufrechterhaltung einer basalen Rac-Aktivität und zur Aktivierung von Rac über CDC42Hs verantwortlich sind, jedoch nicht mit den GEFs, die eine Rac-Aktivierung nach Stimulation des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors vermitteln. Übereinstimmend mit diesem Kräftemessen zwischen GEFs und YopE ist gezeigt worden, dass Überexpression des Rho1-GEFs Rom2 den hemmenden Effekt von YopE auf Rho1-vermitteltes Zellwachstum in Hefe umkehrte (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000).
Die Menge an Informationen bezüglich Identität und Regulation Rac-spezifischer GEFs ist relativ begrenzt. In hämatopoetischen Zellen kann Rac durch die tyrosinphosphorylierte Form von Vav aktiviert werden (Crespo *et al.*, 1997). Im Falle der Aktivierung von Rac durch

CDC42Hs wurde die Vermittlung durch PIX vorgeschlagen, einem Rac-GEF, welches an das CDC42Hs-Zielmolekül PAK bindet (Manser *et al.*, 1998). Außerdem nimmt man an, dass die Aktivierung von Rho durch „seven transmembrane spanning receptors“ (an heterotrimere G-Proteine gekoppelte Rezeptoren) – zu denen Sphingosinrezeptoren gehören (Moolenaar, 1999) – durch Regulatoren der G-Protein-Signaltransduktion (regulators of G-protein signalling, RGS) fortgeleitet wird. Letztere stellen sowohl GAPs für Gα-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine als auch GEFs für Rho-GTPasen dar (Kozasa *et al.*, 1998).

Eine wichtige Frage ist, in welcher Form *Yersinia* von der spezifischen Inaktivierung von Rac durch YopE profitieren könnte. Für das *Salmonella*-GAP SptP wurde vorgeschlagen, dass es Rac abschaltet, welches zuvor durch das *Salmonella*-GEF SopE aktiviert wird (Fu and Galan, 1999). In gleicher Weise könnte YopE von *Yersinia* während Fcγ-Rezeptor-vermittelter Phagozytose in Makrophagen stimuliertes Rac herunterregulieren (Caron and Hall, 1998; Massol *et al.*, 1998). Übereinstimmend mit dieser Vorstellung wurde die YopE-Translokation als bedeutend für die Phagozytoseresistenz virulenter *Yersinia spp*. gezeigt (Fallmann *et al.*, 1995; Mecsas *et al.*, 1998; Rosqvist *et al.*, 1988; Ruckdeschel *et al.*, 1996). Zukünftige Studien könnten untersuchen, ob YopE von *Yersinia* zusätzlich andere Rac-abhängige Zellfunktionen beeinflusst, die neben Phagozytose an der Immunabwehr beteiligt sind, wie NADPH-Oxidaseaktivität, Makrophagenchemotaxis oder Zytokinfreisetzung.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass die Hemmung von Stressfasern in Endothelzellen durch *Y. enterocolitica* YopT-abhängig ist. Vermutet wurde eine Beeinflussung der kleinen GTPase Rho, welche bekanntermaßen die Bildung dieser Aktinstrukturen reguliert (Hall, 1998). Tatsächlich fanden wir heraus, dass die Wirkung von YopT eine biochemische Modifikation von RhoA zur Folge hat und zu einer intrazellulären Umverteilung des Rho-Proteins von der Membran ins Zytosol führt (Zumbihl *et al.*, 1999).

Ob dieser Effekt noch weitere *Yersinia*-Faktoren benötigt, blieb zunächst unklar. Kürzlich veröffentlichte eine Arbeitsgruppe am Max von Pettenkofer-Institut ein modulares *Yersinia*-Sekretionssystem auf dem Plasmid pTTSS (Truelzsch *et al.*, 2003) ähnlich dem in dieser Arbeit beschriebenen pYLCR. Durch Klonierung von *yopT/sycT* auf jenen Vektor und anschließende Transformation des resultierenden Konstruktes in eine virulenzplasmidfreie Mutante entstand ein *Y. enterocolitica*-Stamm WA-C(pTTSS+pYopTSycT), welcher YopT als einzigen Effektor transloziert. Mit dessen Hilfe konnte man zeigen, dass die Modifikation von RhoA alleine durch YopT verursacht wird und unabhängig von anderen Effektor-Yops abläuft (Aepfelbacher et al., 2003b; Truelzsch *et al.*, 2003).

Shao *et al.* (2002) konnten nachweisen, dass YopT eine Cysteinprotease darstellt, welche die C-terminale Isoprenoidgruppe von Rho, Rac und CDC42 proteolytisch abspaltet und somit zur Ablösung der GTPasen von der Zellmembran führt. Wie im Fall früherer Studien bezüglich YopE handelte es sich auch hier um größtenteils *in vitro* beziehungsweise nach Überexpression der Substrate in Zellen gewonnene Daten. Weiterführende Untersuchungen im Zellkulturmodell unter physiologischeren Bedingungen zeigten, dass von Yersinien in Zellen transloziertes YopT an die Zytoplasmamembran der Wirtszelle assoziiert und spezifisch dort gebundenes RhoA, jedoch nicht Rac oder CDC42 entfernt (Aepfelbacher et al., 2003b).

Ein Erklärungsversuch in genannter Arbeit war, dass letztere beiden *in vitro*-Substrate und YopT in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sein könnten, da bekannt ist, dass sich RhoA an der Plasmamembran befindet, während Rac und CDC42 vor allem an anderen intrazellulären Membrankompartimenten liegen. Es wurde ferner nachgewiesen, dass YopT RhoA von dessen Regulator GDI-1 abtrennt, welcher unter anderem den membrangebundenen Zustand von RhoA vermittelt. Es gibt folglich auch im Fall von YopT eine deutliche Diskrepanz zwischen der Spezifität *in vitro* und *in vivo*.

Bemerkenswert sind auch die Unterschiede zwischen den zwei *Yersinia*-Effektoren YopE und YopT, welche durch vollkommen unterschiedliche Wirkungsweise auf Rho-GTPasen das Aktinzytoskelett modulieren. Zukünftig wäre es vorstellbar, sich diese Tatsache zunutze zu machen und die beiden Toxine therapeutisch, zum Beispiel in der Prophylaxe oder Behandlung entzündlicher oder proliferativer Erkrankungen einzusetzen. Die Rolle der Rho-GTPasen und ihrer Signalwege in der Biomedizin und der Physiologie wird durch den aktuellen Wissensstand immer bedeutender. Bereits heute bedient man sich der Kenntnisse über die Wirkungen bakterieller Toxine. Als Beispiel sei die sogenannte Botox-Therapie genannt, welche in Form von Injektionen des Toxins A von *Clostridium botulinum* unter anderem im neurologischen, ophthalmologischen, dermatologischen, kosmetischen oder HNO-Bereich Anwendung findet (Bresser, 2003).

Im Laufe einer Infektion haben Yersinien Kontakt mit verschiedenen Zelltypen wie M-Zellen, professionellen Phagozyten oder den Zellen des Gefäßendothels. Möglicherweise stehen je nach Zelltyp pathophysiologisch verschiedene Yops im Vordergrund. Eine selektive oder graduelle Translokation einzelner *Yersinia*-Effektoren ist bisher nicht beschrieben worden, jedoch könnten in bestimmten Arten von Wirtszellen entscheidende Zielmoleküle fehlen oder für Yops nicht zugänglich sein. Gewisse Zellen könnten zu Yop-Zielmolekülen redundante Proteine exprimieren, wie zum Beispiel RhoC, welches die aktinregulierenden Eigenschaften von RhoA besitzt, aber wahrscheinlich kein Substrat für YopT darstellt. In zukünftigen Studien könnte man zum Beispiel auch nach *in vivo*-Infektion im Mausmodell Zellen aus dem Bereich der Peyer`schen Plaques mittels FACS-Analyse nach Zelltypen getrennt untersuchen und YopT-modifiziertes RhoA nachweisen.

Vorstellbar wären auch zelluläre Schutzmechanismen, die zum Abbau beziehungsweise zur Modifikation von Yop-Proteinen führen könnten. Ebenso könnten allein aus Gründen der Kinetik einige Yop-Effekte in gewissen Zellen überwiegen. Spekuliert man weiter, würden in

einer zytotoxisch durch ein oder wenige *Yersinia*-Proteine stark geschädigten oder gar abgetöteten Zelle andere, langsamer wirkende Yops eine nur untergeordnete Rolle spielen.

Dies würde bedeuten, dass *Y. enterocolitica* über ein Arsenal an Toxinen und Modulinen verfügt, von denen je nach Art der Wirtszelle ein oder wenige bestimmte von vordergründiger Bedeutung sind. Auch für Effektoren mit ähnlichen Wirkungen könnte diese Annahme gelten.

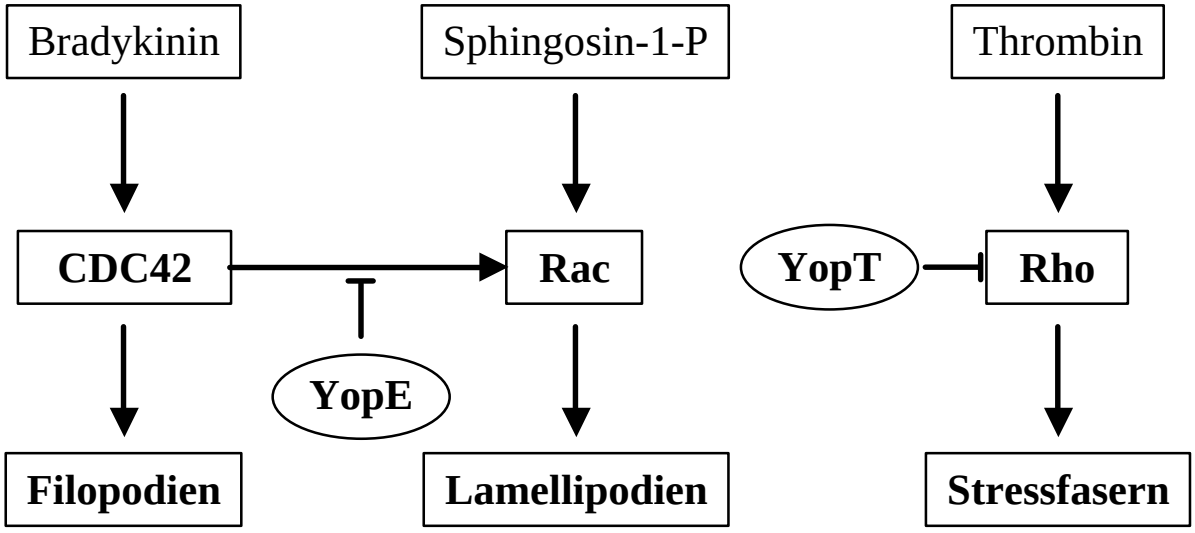


Abb. 17: Effekte von YopE und YopT auf Rho-GTPasen in HUVEC.
YopE hemmt die indirekte Aktivierung von Rac durch CDC42, jedoch nicht die direkte von außen stimulierte Aktivierung von Rac, CDC42Hs oder Rho. YopT führt zu einer chemischen Modifizierung von Rho und dessen Inaktivierung.

Von vier der sechs bisher bekannten Yops weiß man, dass diese das Aktinzytoskelett eukaryotischer Zellen angreifen. Unter den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsbedingungen zeigten sich im Endothelzellmodell die kombinierten Effekte von YopE und YopT, jedoch keine eindeutigen Hinweise auf morphologische Veränderungen durch YopH oder YopO, was auch in weiteren vorläufigen Ergebnissen bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Bindung von YopO an RhoA zum Beispiel könnte von dessen GDP- oder GTP-gebundenem Zustand abhängen. Genauso vorstellbar wäre auch, dass

YopT-modifiziertes RhoA oder YopE-gebundenes Rac für YopO keine geeigneten Substrate mehr darstellen, so dass sich unter dieser Annahme die Wirkungen einzelner Yops hemmen würden.

Dennoch wäre es möglich, dass sich *Yersinia*-Moduline unter anderen Bedingungen im Sinne eines Synergismus ergänzen. *In vivo* könnten Yops Wirtszellfunktionen, die durch verschiedene Rho-GTPasen kontrolliert werden, auf eine zusammenwirkende Art und Weise beeinflussen. Beispielsweise könnte das Rac-GAP YopE mit dem Rho-inaktivierenden YopT sowie dem RhoA- und Rac1-bindenden YopO zusammenarbeiten, um Komplementrezeptor- und Fcγ-Rezeptor-getriggerte Phagozytose oder Chemotaxis von Makrophagen zu beeinflussen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, insbesondere die gezeigte intrazelluläre Spezifität von YopE, könnten dazu beitragen, weitere Einsichten über die Infektionsstrategien von *Yersinia* zu erlangen. Daneben könnte der hier beschriebene YopE-exprimierende Stamm zukünftig auch als höchstspezifisches Werkzeug dienen, um das Zusammenspiel zwischen Rho-GTPasen in Signaltransduktionsnetzwerken zu untersuchen und letztendlich besser zu verstehen.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Pathogene Yersinien injizieren während einer Infektion über ihr TypIII-Sekretionssystem bakterielle Moduline, sogenannte Yops, in Immunzellen, um das Immunsystem zu stören. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die injizierten *Yersinia enterocolitica*-Moduline YopE und YopT das Aktinzytoskelett angreifen. Mit dem Ziel der näheren Charakterisierung der zugrunde liegenden Mechanismen wurde insbesondere der Effekt von *Y. enterocolitica*-YopE auf aktinregulierende Signaltransduktionswege in menschlichen Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein *Yersinia*-Stamm hergestellt, welcher YopE als einzigen Effektor transloziert.

Mit diesem Stamm infizierte ruhende HUVEC zeigten eine Veränderung des Aktinzytoskeletts ähnlich wie nach Mikroinjektion von dominant negativem N17Rac, was auf eine Inaktivierung von Rac hindeutete. Zur weiteren Untersuchung wurden in infizierten Endothelzellen durch extrazelluläre Stimuli einzelne Rho-GTPasen aktiviert und die dabei ausgebildeten Aktinstrukturen beobachtet. Dabei ergab sich keine Beeinträchtigung der Neubildung CDC42- und Rho-vermittelter Aktinstrukturen (Filopodien und Stressfasern) durch YopE, jedoch eine spezifische Hemmung Rac-induzierter Lamellipodien.

Frühere Untersuchungen hatten demonstriert, dass es sich bei YopE um ein sogenanntes GAP („GTPase activating protein“) handelt, welches *in vitro* die Proteine Rho, Rac und CDC42 hemmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass in Endothelzellen transloziertes YopE höchst selektiv auf die Ras-ähnliche GTPase Rac wirkt, jedoch keinen Effekt auf CDC42 oder Rho ausübt. Diese Ergebnisse zeigen, dass YopE von *Yersinia* Rho-GTPase-abhängige Signaltransduktionswege mit einer bemerkenswerten Spezifität in primären Zielzellen beeinflussen kann. Überdies wurde die genannte Spezifität auch in primären Makrophagen nachgewiesen.

Weiterhin zeigte sich im HUVEC-Infektionsversuch, dass die Hemmung der typischerweise Rho-vermittelten Aktin-Stressfasern YopT-abhängig ist. Morphologische Veränderungen von Aktinstrukturen, wie sie typischerweise bei der Unterbrechung von CDC42- oder Rac-vermittelten Signalen vorkommen, wurden nicht beobachtet. In Zusammenhang damit konnte

gezeigt werden, dass genannter Effekt auf eine chemische Modifikation und folgliche Inaktivierung von RhoA zurückzuführen ist (Zumbihl *et al.*, 1999).

Damit unterscheiden sich YopT und YopE in ihrem Wirkmechanismus und spezifischen Zielmolekül, greifen andererseits jedoch beide direkt an Rho-GTPasen an. Sie könnten deshalb synergistisch bei der Pathogenität von *Y. enterocolitica* wirken. Darüber hinaus könnten YopE und YopT aufgrund ihrer Spezifität zukünftig als wertvolle Hilfsmittel zur Untersuchung zellulärer Regulationsvorgänge dienen.

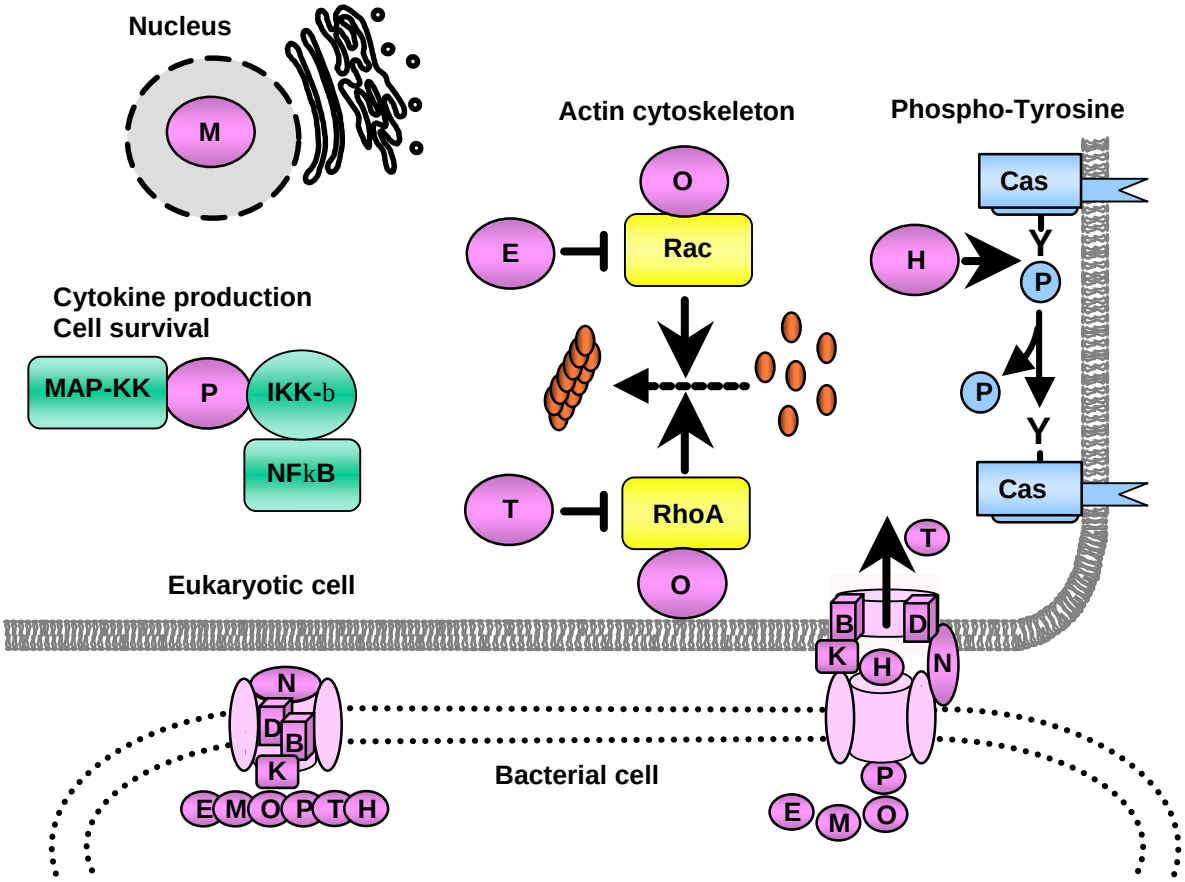


Abb. 18: Intrazelluläre Wirkorte der *Yersinia*-Effektoren.
Die ins Zytosol der Wirtszelle translozierten *Yersinia*-Moduline YopE, YopH, YopM, YopO, YopP und YopT greifen durch Beeinflussung verschiedener Regulationsvorgänge in die zelluläre Signaltransduktion ein. (Abbildung aus Ruckdeschel *et al.*, 2003).

9. LITERATURVERZEICHNIS

Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17: 593-623.

Aepfelbacher, M., Essler, M., Huber, E., Sugai, M., and Weber, P.C. (1997) Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1623-1629.

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

Aepfelbacher, M., Trasak, C., Wilharm, G., Wiedemann, A., Truelzsch, K., Krauss, K., Gierschik, P., and Heesemann, J. (2003b) Characterization of YopT effects on Rho GTPases in Yersinia enterocolitica infected cells. *J Biol Chem* Epub

Aepfelbacher, M., Zumbihl, R., Ruckdeschel, K., and Heesemann, J. (1999a) Pathogenicity of *Yersinia* or how to find an extracellular niche. *Nova Acta Leopoldina* 312: 181-192

Aepfelbacher, M., Zumbihl, R., Ruckdeschel, K., Jacobi, C.A., Barz, C., and Heesemann, J. (1999b) The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defense. *Biol Chem* 380: 795-802.

Aktories, K., Schmidt, G., and Just, I. (2000) Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem* 381: 421-426.

Andor, A., Truelzsch, K., Essler, M., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Heesemann, J., and Aepfelbacher, M. (2001) YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* 3: 301-310

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1987) *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.

Autenrieth, I.B., and 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: 285-294.

Barz, C., Abahji, T.N., Truelzsch, K., and Heesemann, J. (2000) The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett* 482: 139-143.

Black, D.S., and Bliska, J.B. (1997) Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J* 16: 2730-2744.

Black, D.S. and Bliska, J.B. (2000) The RhoGAP activity of the *Yersinia* pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* 37: 515-527.

Boettner, B., and Van Aelst, L. (1999) Rac and Cdc42 effectors. *Prog Mol Subcell Biol* 22: 135-158.

Braga, V.M., Machesky, L.M., Hall, A., and Hotchin, N.A. (1997) The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* 137: 1421-1431.

Bresser, H. (2003) Botulinumtoxin A: Sicher und wirksam bei “off-label-use”? *Münchner Ärztliche Anzeigen* 25: 3-4

Caron, E., and Hall, A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282: 1717-1721.

Cooper, J.A., and Schafer, D.A. (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol* 12: 97-103.

Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P., and Stainier, I. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1315-1352.

Cornelis, G.R., and Wolf-Watz, H. (1997) The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 23: 861-867.

Crespo, P., Schuebel, K.E. Ostrom, A.A., Gutkind, J.S., and Bustelo, X.R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 385: 169-172.

Dukuzumuremyi, J.M., Rosqvist, R., Hallberg, B., Akerstrom, B., Wolf-Watz, H., and Schesser, K. (2000) The *Yersinia* protein kinase A is a host-factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem* 275: 35281-35290.

Essler, M., Amano, M., Kruse, H.J., Kaibuchi, K., Weber, P.C., and Aepfelbacher, M. (1998a) Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 21867-21874.

Essler, M., Hermann, K., Amano, M., Kaibuchi, K., Heesemann, J., Weber, P.C., and Aepfelbacher, M. (1998b) *Pasteurella multocida* Toxin increases endothelial permeability via Rho kinase and myosin light chain phosphatase. *J Immunol* 161: 5640-5646.

Essler, M., Retzer, M., Ilchmann, H., Linder, S., and Weber, P.C. (2002) Sphingosine 1-phosphate dynamically regulates myosin light chain phosphatase activity in human endothelial cells. *Cell Signal* 14: 607-613.

Fallman, M., Andersson, K., Hakansson, S., Magnusson, K.E., Stendahl, O., and Wolf-Watz, H. (1995) *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect Immun* 63: 3117-3124.

Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C., and Boquet, P. (1997) Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 387: 729-733.

Forsberg, A., Viitanen, A.M., Skurnik, M., and Wolf-Watz, H. (1991) The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 5: 977-986.

Friedman, A.M., Long, S.R., Brown, S.E., Buikema, W.J., and Ausubel, F.M. (1982) Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18: 289-296.

Fu, Y., and Galan, J.E. (1999) A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401: 293-297.

Goehring, U.M., Schmidt, G., Pederson, K.J., Aktories, K., and Barbieri, J.T. (1999) The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* 274: 36369-36372.

Guasch, R.M., Scambler, P., Jones, G.E., and Ridley, A.J. (1998) RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol* 18: 4761-4771.

Guiney, D.G., and Helinski, D.R. (1979) The DNA-protein relaxation complex of the plasmid RK2: location of the site-specific nick in the region of the proposed origin of transfer. *Mol Gen Genet* 176: 183-189.

Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.

Hall, A. (1994) Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 10: 31-54

Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., and Galan, J.E. (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93: 815-826.

Heesemann, J., Gross, U., Schmidt, N., and Laufs, R. (1986) Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia sp.* grown in calcium-deficient media. *Infect Immun* 54: 561-567.

Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433.

Iriarte, M., and Cornelis, G.R. (1998) YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 29: 915-29.

Jacobi, C.A., Roggenkamp, A., Rakin, A., Zumbihl, R., Leitritz, L., and Heesemann, J. (1998) In vitro and in vivo expression studies of yopE from *Yersinia enterocolitica* using the gfp reporter gene. *Mol Microbiol* 30: 865-882.

Juris, S.J., Rudolph, A.E., Huddler, D., Orth, K., and Dixon, J.E. (2000) A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9431-9436.

Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M.J., Sternweis, P.M., Singer, W.D., Gilman, A.G., Bollag, G., and Sternweis, P.C. (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science* 280: 2109-2111.

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15: 1942-1952.

Linder, S., and Aepfelbacher, M. (2003) Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* 13: 376-385.

Manser, E., Loo, T.H., Koh, C.G., Zhao, Z.S., Chen, X.Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T., and Lim, L. (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* 1: 183-192.

Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J.C., and Chavrier, P. (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J* 17: 6219-6229.

Mecsas, J., Raupach, B., and Falkow, S. (1998) The *Yersinia* Yops inhibit invasion of *Listeria, Shigella* and *Edwardsiella* but not *Salmonella* into epithelial cells. *Mol Microbiol* 28: 1269-1281.

Moolenaar, W.H. (1999) Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res* 253: 230-238.

Obermeier, A., Ahmed, S., Manser, E., Yen, S.C., Hall, C., and Lim, L. (1998) PAK promotes morphological changes by acting upstream of Rac. *EMBO J* 17: 4328-4339.

Pederson, K.J., Vallis, A.J., Aktories, K., Frank, D.W., and Barbieri, J.T. (1999) The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. *Mol Microbiol* 32: 393-401.

Pepe, J.C., Wachtel, M.R., Wagar, E., and Miller, V.L. (1995) Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun* 63: 4837-4848.

Persson, C., Carballeira, N., Wolf-Watz, H., and Fallman, M. (1997) The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* 16: 2307-2318.

Provost, P., Samuelsson, B., and Radmark, O. (1999) Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins. *Proc-Natl Acad Sci U S A* 96: 1881-1885.

Ridley, A.J., Self, A.J., Kasmi, F., Paterson, H.F., Hall, A., Marshall, C.J., and Ellis, C. (1993) Rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J* 12:5151-5160.

Roggenkamp, A., Schubert, S., Jacobi, C.A., and Heesemann, J. (1995) Dissection of the *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid pYVO8 into an operating unit and virulence gene modules. *FEMS Microbiol Lett* 134: 69-73.

Rosqvist, R., Bolin, I., and Wolf-Watz, H. (1988) Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infect Immun* 56:2139-2143.

Rosqvist, R., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1991) Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* 59: 4562-4569.

Ruckdeschel, K., Richter, K., Aepfelbacher, M. (2003) *Yersinia* outer proteins (Yops) – modulators of host cell signalling during bacterial infection. *Biomed Prog* 16: 15-19

Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S., and Heesemann, J. (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* 64: 724-733.

Ruessmann, H., Weissmueller, A., Geginat, G., Igwe, E.I., Roggenkamp, A., Bubert, A., Goebel, W., Hof, H., and Heesemann, J. (2000) *Yersinia enterocolitica*-mediated translocation of defined fusion proteins to the cytosol of mammalian cells results in peptide-specific MHC class I-restricted antigen presentation. *Eur J Immunol* 30: 1375-1384.

Sanchez-Madrid, F., del Pozo, M.A. (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 18: 501-511.

Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A., and Collard, J.G. (1999) Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147: 1009-1022.

Schell, B. and Linder, S. (2001) Magnetisierte Monozyten. Isolation, Mikroinjektion und Stimulation primärer humaner Monozyten und Makrophagen. *Immunologie Aktuell* 1: 152-158.

Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W., and Dixon J.E. (2002) A *Yersinia* effector and a P*seudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109: 575-588.

Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M., and Aktories, K. (1997) Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* 387: 725-729.

Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., and Treisman, R. (1999) Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 98: 159-169.

Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., and Takai, Y. (1997) Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* 139: 1047-1059.

Tapon, N., and Hall, A. (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 9: 86-92.

Truelzsch, K., Roggenkamp, A., Aepfelbacher, M., Wilharm, G., Ruckdeschel, K., Heesemann, J. (2003) Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica. Int J Med Microbiol* 293: 167-177.

Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11: 2295-2322.

von Pawel-Rammingen, U., Telepnev, M.V., Schmidt, G., Aktories, K., Wolf-Watz, H., and Rosqvist, R. (2000) GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* 36: 737-748.

Wiedemann, A., Linder, S., Grassl, G., Albert, M., Autenrieth, I., and Aepfelbacher, M. (2001) *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol* 3: 693-702.

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

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten wurden zum Teil in folgenden Publikationen vorab veröffentlicht:

Originalarbeiten

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

Andor, A., Trülzsch, K., Essler, M., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Heesemann, J., and Aepfelbacher, M. (2001) YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* 3: 301-310

Übersichtsarbeiten (Reviews)

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

Abstracts

Andor, A. and Essler, M., Roggenkamp, A., Heesemann, J., and Aepfelbacher, M. (2000) YopE of *Yersinia enterocolitica* selectively abolishes Rac-induced membrane ruffling in human endothelial cells. *Biospektrum* Sonderausgabe 2000; Abstract 15.K.2.08, Seite 117

DANKSAGUNGEN

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher für die Überlassung des Themas, die jederzeitige Hilfsbereitschaft bezüglich fachlicher oder sonstiger Fragen, die kompetenten Anregungen und das konstruktive Feedback sowie das kontinuierliche Interesse am Fortschreiten der Arbeit und deren Korrektur.

Allen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer-Instituts, die mir bei Problemen und Rückfragen jedweder Art hilfreich zur Seite standen und mich bei vielen Aufgaben tatkräftig unterstützten.

Den Mitarbeitern vom Institut für Prophylaxe und Epidemiologie von Kreislaufkrankheiten für die großzügige und geduldige Unterstützung vor allem in der schwierigen Anfangsphase der Einarbeitung in eine neue Materie sowie Herrn Prof. Dr. med. W. Siess für die Aufnahme ins DFG-Graduiertenkolleg „Vaskuläre Biologie in der Medizin“.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann für das Privileg der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie.

LEBENSLAUF

Name: Andor

Vorname: Andreas

Geburtsdatum: 08.09.1974

Geburtsort: München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

1981-1985	Grundschule, München
1985-1994	Willi-Graf-Gymnasium, München
Oktober 1995	Beginn des Medizinstudiums an der LMU München
September 1997	Ärztliche Vorprüfung
August 1998	Erstes Staatsexamen
Oktober 1998	Beginn der Doktorarbeit am Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der LMU, München
Okt. 1998-Sept. 1999	Stipendiat des DFG-Graduiertenkollegs „Vaskuläre Biologie in der Medizin“
September 2001	Zweites Staatsexamen
Oktober 2002	Drittes Staatsexamen
Seit Januar 2003	AiP am Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der LMU, München