

Aus dem
Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Vorstand: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum



**Funktionelle Untersuchungen der Virulenz und
Stressregulation des Enteropathogens
*Yersinia enterocolitica***

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

vorgelegt von

Sara Carina Kakoschke

aus München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Löscher
Prof. Dr. Barbara Stecher-Letsch
Priv. Doz. Dr. Luisa Jiménez Soto

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Ombeline Rossier

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2022

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Sara Carina Kakoschke

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

**„Funktionelle Untersuchungen der Virulenz und Stressregulation des
Enteropathogens *Yersinia enterocolitica*“**

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

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

München, 30. Oktober 2022

Sara Carina Kakoschke

Meiner lieben Familie

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann für die Vergabe des interessanten Doktorarbeitsthemas sowie die konstruktive und stetige Unterstützung, die ich durch ihn erfahren durfte.

Frau Dr. rer. nat. Ombeline Rossier danke ich für die Mitbetreuung meiner Arbeit, Sie hatte immer ein offenes Ohr für mich und stand mir stets mit Rat zur Seite.

Meinen Mitstreitern im Labor Tamara Katharina Kakoschke, Catharina Zeuzem, Matthias Fischbach, Maximilian Frömberg und Kristina Gramlich danke ich für den kollegialen Austausch, die gute Stimmung und Zusammenarbeit während unserer gemeinsamen Zeit im Labor und unseren lieben und hilfsbereiten MTLAs Bettina Sedlmaier-Erlenfeld, Evelyn Weiss, Friederike Aicher, Susanna Röder, Kristin Adler und Anja Lau (Anatomische Anstalt LMU – Elektronenmikroskopie) für ihre Unterstützung bei den experimentellen Methoden.

Meinen Eltern Ingrid und Helmut danke ich für die stete und unerschütterliche Unterstützung und ihren positiven Zuspruch bei all meinen Höhen und auch kleineren Tiefen.

Meiner Schwester Tamara, die mir immer alles zugetraut hat, mit mir „Tag und Nacht“ im Max von Pettenkofer-Institut verbracht hat, mit der ich immer lachen, erfinderisch und kreativ sein konnte und die mich immer in all meinen Träumen und Wünschen bis heute unterstützt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die darmpathogenen *Yersinia enterocolitica* Serotypen O:3, O:8, O:9 und O:5.27 werden durch Lebensmittel (insbesondere Schweinefleisch) auf den Menschen übertragen und verursachen eine akute Enteritis (Yersiniose). In Deutschland werden ca. 2500 Fälle jährlich dem Robert-Koch-Institut gemeldet.

Selbst nach Abklingen der Magen-Darm-Symptomatik kann es zu Spätfolgen im Sinne postinfektiöser reaktiver Arthritis, Erythema nodosum und Uveitis kommen. Daher kann die Erforschung der Virulenz sowie deren Regulation zur Entwicklung neuer Strategien zur Therapie und Prävention der Yersiniose beitragen. Die Gattung *Yersinia* gehört zu den Gram-negativen Bakterien. Für die Adhäsion und Invasion von Wirtszellen spielen spezifische Proteine der äußeren Membran eine wichtige Rolle. Die Regulation der Produktion dieser Oberflächenproteine kann sowohl posttranskriptionell als auch posttranslational erfolgen. Bereits 2014 und 2016 konnte in unserer Arbeitsgruppe der Einfluss der posttranskriptionellen Regulation durch das RNA-Chaperon Hfq in *Y. enterocolitica* beschrieben werden (Kakoschke et al., 2014, Kakoschke et al., 2016). Diese Arbeit befasst sich mit dem Einfluss der nicht-kodierenden sRNAs MicA, RybB und CyaR sowie dem Regulator Hfq (sRNA Bindungsprotein) auf posttranskriptioneller Ebene als auch dem posttranslationalen Regulator DegP (Protein im periplasmatischen Raum). All diese Regulatoren sind in der Familie der *Enterobacteriaceae* konserviert. In dieser Arbeit werden erstmals Ergebnisse dieser Regulatoren in *Y. enterocolitica* beschrieben.

Zur Untersuchung der sRNAs wurde eine *micA*-Deletionsmutante (MicA⁻) und eine *rybB*- sowie *cyaR*-Überexpressionsmutante (RybB⁺, CyaR⁺) generiert. Hinsichtlich der posttranskriptionellen Regulation zeigen weder MicA⁻, RybB⁺ noch CyaR⁺ einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Bakterien in Flüssigmedien (LB, BHI und RPMI bei 27°C und 37°C). Jedoch kann ein Einfluss auf die Produktion von Virulenzfaktoren nach Wachstum in Zellkulturmedien nachgewiesen und durch FACS- und Immunoblot-Untersuchungen bestätigt werden.

MicA beeinflusst die Produktion von Adhäsinen (YadA, Ail und OmpX) zumeist negativ. Ebenfalls ist die Produktion des LPS durch MicA verringert im Vergleich zum MicA⁻-Stamm. Auf die Produktion des Invasin jedoch hat MicA einen positiven Effekt und auch das MyfA wird verstärkt produziert. **RybB**-Überproduktion führt zur erhöhten Produktion von YadA, InvA, OmpX und Ail. Auf LPS jedoch hat RybB einen negativen Einfluss und führt zu einer geringeren Produktion im Vergleich zum Ursprungsstamm. **CyaR**-Überproduktion führt zur Verminderung der Produktion von YadA, OmpX und Ail.

Im zweiten Teil wird der Einfluss von **Hfq** auf die Produktion von Virulenzfaktoren vergleichend mit dem Ausgangsstamm und die Stressresistenz sowie der Stickstoffstoffwechsel der *hfq*-Deletionsmutante untersucht.

Bei Anwesenheit des RNA-Chaperons Hfq wird die Produktion von YadA verstärkt, was zu dicht gepackten *Yersinia*-Mikrokolonien (Biofilm-ähnlichen Strukturen) bei Wachstum im Kollagengel führt (Gewebe-Modell). Auch ist die Resistenz gegenüber saurem und oxidativem Stress durch Hfq positiv beeinflusst. So zeigen die Δhfq -Mutanten ein vermindertes Wachstumsverhalten im sauren und oxidativen Milieu. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Hfq den Stickstoffmetabolismus von *Y. enterocolitica* beeinflusst. Indol wird in Abwesenheit von Hfq vermehrt aus Tryptophan produziert.

DegP, ein bifunktionelles im periplasmatischen Raum lokalisiertes Protein, welches sowohl als Protease fehlgefaltete Proteine degradiert als auch als Chaperon die Faltung von Proteinen positiv unterstützt, wirkt auch auf Virulenzfaktoren. Es wurde eine $\Delta degP$ -Mutante hergestellt. Zusätzlich wurde eine Doppelmutante mit Deletion von *degP* und *hfq* generiert. Es konnte gezeigt werden, dass YadA bei Fehlen von Hfq in geringerem Maße in die äußere Membran inseriert wird (Kakoschke et al., 2016), dagegen wird bei Abwesenheit von DegP YadA vermehrt inseriert. Die Doppelmutante ($Hfq^- DegP^-$) zeigt eine YadA-Produktion ähnlich der Δhfq -Mutanten. Die Doppelmutante zeigt auch einen verminderten Nachweis von InvA und OmpX in der äußeren Membran. Ail jedoch zeigt ein gegenläufiges Produktionsverhalten. Die $\Delta degP$ -Mutanten exprimiert weniger Ail, so auch die Doppelmutante, im Gegensatz dazu stehen die Δhfq -Mutanten, welche vermehrt Ail produzieren.

Zusätzlich konnte ein posttranskriptioneller bzw. posttranslationeller Einfluss auf **Motilität und Flagellinproduktion** in *Yersinia* durch MicA, Hfq und DegP nachgewiesen werden. MicA fördert die Produktion des Klasse 2 Regulators FliA (Sigmafaktor der Flagellin-Gene) und der Flagellenuntereinheit FleA. Insgesamt betrachtet unterdrückt MicA jedoch die Flagellenproduktion. Hfq unterstützt die Produktion der Flagellen durch Hochregulation der Produktion der Regulatoren FliHDC und FliA. Als periplasmatisches Protein zeigt DegP allerdings einen positiven Effekt auf das Flagellinproteinsekretionssystem (T3SS).

INHALTSVERZEICHNIS

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	3
WIDMUNG.....	4
DANKSAGUNG.....	5
ZUSAMMENFASSUNG.....	6
INHALTSVERZEICHNIS.....	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	11
PUBLIKATIONSLISTE.....	14
1. EINLEITUNG.....	15
1.1. Gattung <i>Yersinia</i>	15
1.1.1. <i>Yersinia enterocolitica</i>	15
1.2. Regulation der Genexpression in Bakterien.....	17
1.2.1. Posttranskriptionelle Regulatoren.....	20
1.2.1.1. RNA-Chaperon Hfq.....	20
1.2.1.2. Regulatorische kleine RNAs.....	22
1.2.1.2.1. MicA.....	22
1.2.1.2.2. RybB.....	23
1.2.1.2.3. CyaR.....	23
1.2.2. Posttranslationelle Regulation durch DegP.....	24
1.3. Virulenzfaktoren.....	24
1.3.1. Plasmid kodierte Virulenzfaktoren.....	24
1.3.1.1. <i>Yersinia</i> Adhäsine A.....	24
1.3.1.2. Typ-3-Sekretionssystem und Yops.....	25
1.3.2. Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren.....	26
1.3.2.1. Invasin.....	26
1.3.2.2. Adhäsine - Ail, OmpX und OmpA.....	26
1.3.2.3. Myf-Fimbrie.....	27
1.3.2.4. Lipopolysaccharid.....	28
1.4. Motilität von <i>Yersinia enterocolitica</i>	30
1.5. Zielsetzungen dieser Arbeit.....	32
2. MATERIAL UND METHODEN.....	34
2.1. Material.....	34
2.1.1. Bakterienstämme.....	34
2.1.2. Plasmide.....	36
2.1.3. Antikörper.....	37
2.1.4. Primer.....	37
2.1.5. Chemikalien und Enzyme.....	38
2.1.6. Kits.....	41
2.1.7. Kulturmedien.....	41
2.1.8. Biologische Marker/ Antibiotika.....	42
2.1.9. Puffer.....	42
2.1.10. Computerprogramme/ Statistische Analysen.....	43
2.1.11. Webseiten und Internetprogramme.....	43
2.1.12. Geräte und Zubehör.....	43
2.2. Methoden.....	46
2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion.....	46
2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.2.3. Aufreinigung genomischer DNA.....	47
2.2.4. Klonierung von Genen mittels geeigneter Vektoren.....	47
2.2.5. Künstlich induzierte Kompetenz und Transformation.....	48
2.2.5.1. Elektrokompente Yersinien.....	48
2.2.5.2. Calcium-Rubidium-induzierte Kompetenz von <i>E. coli</i>	49

2.2.5.3.	Elektrotransformation (<i>Y. enterocolitica</i>).....	49
2.2.5.4.	Hitzeschocktransformation (<i>E. coli</i>).....	49
2.2.6.	Herstellung der Deletionsmutanten in <i>Y. enterocolitica</i> über allelen Genaustausch.....	50
2.2.6.1.	Lambda-Red Methode.....	50
2.2.6.2.	Suizidvektor Methode.....	50
2.2.7.	Wachstumsversuche.....	52
2.2.7.1.	Photometer-Messung.....	52
2.2.7.2.	„Microplatereader“-Messung.....	52
2.2.8.	3D-Kollagengelexperiment.....	52
2.2.9.	Stressresistenzexperimente.....	53
2.2.9.1.	Resistenz gegen ovidativen und sauren Stress.....	53
2.2.9.2.	Resistenz gegen antibiotischen Stress.....	53
2.2.10.	Tryptophanase-Test – Indolproduktion.....	54
2.2.11.	Beweglichkeitstestung.....	55
2.2.12.	Herstellung von Gesamtzelllysat.....	55
2.2.13.	Isolierung der äußeren Membran und ihrer Proteine.....	56
2.2.14.	Herstellung von Flagellenproteinextrakten mittels TCA-Fällung.....	57
2.2.15.	SDS-PAGE und Western Blot.....	57
2.2.16.	Lipopolysaccharid (LPS)-Silberfärbung nach SDS-PAGE.....	60
2.2.17.	Durchflusszytometrie (FACS).....	61
2.2.18.	Immunfärbung von <i>Yersinia</i> -assoziierten Antigenen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	61
3.	ERGEBNISSE.....	63
3.1.	Herstellung der Deletionsmutante JB580v(<i>micA</i> ::CmR).....	63
3.2.	Versuche zur Herstellung einer Deletionsmutante JB580v(<i>rybB</i> ::CmR).....	63
3.3.	Überexpression von <i>rybB</i> und <i>cyaR</i>	64
3.4.	Deletionsmutante JB580v(Δ <i>degP</i>) und JB580v(<i>hfq</i> ::KanR- Δ <i>degP</i>).....	64
3.5.	Wachstumsverhalten von JB580v(<i>micA</i> ::CmR), JB580v pBAD- <i>rybB</i> und JB580v pBAD- <i>cyaR</i> in Flüssigmedium.....	65
3.6.	Wachstumsverhalten von JB580v(Δ <i>degP</i>) und JB580v(<i>hfq</i> ::KanR- Δ <i>degP</i>) in Flüssigmedium.....	66
3.7.	Wachstumsverhalten in 3D-KoG: JB580v(<i>micA</i> ::CmR) und JB580v(<i>hfq</i> ::KanR).....	67
3.8.	Stressresistenz von JB580v(<i>hfq</i> ::KanR), WA314(<i>hfq</i> ::KanR), sowie den Hfq- Überexpressionsmutanten.....	68
3.9.	Indolproduktion in der Hfq-Mutante.....	69
3.10.	Einfluss der sRNAs MicA, RybB und CyaR auf die Produktion von Virulenzfaktoren.....	70
3.10.1.	Posttranskriptionelle Regulation von Virulenzfaktoren durch MicA.....	70
3.10.1.1.	Einfluss von MicA auf YadA-Produktion.....	70
3.10.1.2.	Einfluss von MicA auf InvA-Produktion.....	72
3.10.1.3.	Einfluss von MicA auf Ail- und OmpX-Produktion.....	73
3.10.1.4.	Einfluss von MicA auf OmpA-Produktion.....	75
3.10.1.5.	Einfluss von MicA auf MyfA-Produktion.....	77
3.10.1.6.	Einfluss von MicA auf LPS-Produktion.....	78
3.10.2.	Posttranskriptionelle Regulation von Virulenzfaktoren durch RybB.....	79
3.10.2.1.	Einfluss von RybB auf YadA-Produktion.....	79
3.10.2.2.	Einfluss von RybB auf InvA-Produktion.....	81
3.10.2.3.	Einfluss von RybB auf Ail- und OmpX-Produktion.....	82
3.10.2.4.	Einfluss von RybB auf LPS-Produktion.....	84
3.10.3.	Posttranskriptionelle Regulation von Virulenzfaktoren durch CyaR.....	84
3.10.3.1.	Einfluss von CyaR auf YadA-Produktion.....	84
3.10.3.2.	Einfluss von CyaR auf Ail- und OmpX-Produktion.....	85
3.11.	Einfluss von Hfq und DegP auf die Produktion von Virulenzfaktoren.....	87
3.11.1.	Vergleich der Δ <i>hfq</i> - und Δ <i>degP</i> -Mutanten auf YadA-Produktion.....	87
3.11.2.	Vergleich der Δ <i>hfq</i> - und Δ <i>degP</i> -Mutanten auf InvA-Produktion.....	88

3.11.3. Vergleich der Δhfq - und $\Delta degP$ -Mutanten auf Ail- und OmpX-Produktion...	89
3.11.4. Vergleich der Δhfq - und $\Delta degP$ -Mutanten auf MyfA-Produktion.....	90
3.12. Einfluss von MicA, Hfq und DegP auf die Motilität von <i>Y. enterocolitica</i>	91
4. DISKUSSION UND AUSBLICK.....	97
4.1. Wachstumsverhalten, Stressresistenz und Indolproduktion.....	97
4.2. Posttranskriptionelle Regulation der Virulenz durch die regulatorischen sRNAs MicA, RybB und CyaR.....	99
4.3. Posttranskriptionelle und posttranslationelle Regulation der Virulenz durch Hfq und DegP.....	104
4.4. Einfluss von Hfq, DegP und MicA auf die Motilität von <i>Y. enterocolitica</i>	106
5. ANHANG.....	108
5.1. Bereits veröffentlichte Teile dieser Dissertationsarbeit.....	108
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	109

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	<u>A</u> bbildung
Ail	<u>A</u> ttachment and <u>I</u> nvasion <u>L</u> ocus
Amp	<u>A</u> mpicillin
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aar
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
Carb	<u>C</u> arbenicillin
CFU	Koloniebildende Einheit = <u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nit
Cm	<u>C</u> hloramphenicol
CmR	<u>C</u> hloramphenicol <u>r</u> esistenzkassette
conc.	Konzentration = <u>c</u> oncentration
Crp	<u>c</u> -AMP bindendes <u>R</u> ezeptor <u>p</u> rotein/Transkriptionsaktivator
CyaR	kleine regulatorische RNA - <u>c</u> yclic <u>A</u> MP activated <u>s</u> RNA
Da	<u>D</u> alton
DAP	<u>D</u> iaminopimelinsäure
DegP	periplasmatisches bifunktionales Protein (Chaperon/Protease)
DegS	periplasmatische Protease, verankert in der inneren Membran
DNA	<u>D</u> esoxyribon <u>u</u> kleinsäure
dNTP	<u>D</u> esoxyribon <u>u</u> kleotid <u>t</u> riphosphat
DS	<u>D</u> own- <u>S</u> tream Region eines Gens
<i>E.</i>	<u>E</u> scherichia
<i>E. coli</i>	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etraessigsäure
ESR	<u>e</u> nvelope <u>s</u> tress <u>r</u> esponse – Extrazelluläre Stressantwort
EZM	<u>E</u> xtrazelluläre <u>M</u> atrix
FACS	<u>f</u> luorescence- <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting/ <u>s</u> canning
fwd	<u>f</u> or <u>w</u> ard primer – Vorwärtsprimer/PCR
g	<u>G</u> ramm
gDNA	<u>g</u> enomische DNA
GFP	<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein – grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure

Hfq	<u>h</u> ost <u>f</u> actor of bacteriophage <u>Q</u> beta
HRP	<u>h</u> orse <u>r</u> adish <u>p</u> eroxidase – Meerrettichperoxidase
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
InvA	<u>I</u> nvasin <u>A</u>
Kan	<u>K</u> anamycin
KanR	<u>K</u> anamycin <u>r</u> esistenzkassette
kDa	<u>k</u> ilo- <u>D</u> alton
L	<u>L</u> iter
log.	<u>l</u> og phase – exponentielle Wachstumsphase
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
M	<u>M</u> olar
mA	<u>M</u> illiampere
mg	<u>M</u> illigramm
MicA	kleine regulatorische RNA
min	<u>M</u> inute
mL	<u>M</u> illiliter
mM	<u>M</u> illimolar
mRNA	<u>M</u> essenger- <u>R</u> NA
MyfA	<u>m</u> ucoid <u>Y</u> ersinia <u>f</u> actor <u>A</u> ntigen
nt	<u>N</u> ukleotid (ribosyl- oder desoxyribosyl)
OD	<u>o</u> ptical <u>d</u> ensity - optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OMP	<u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein – Protein der äußeren Membran
OmpA	<u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein <u>A</u>
OmpR	<u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein <u>r</u> egulator
OmpX	<u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein <u>X</u>
P	<u>P</u> rimers
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction – Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RBS	<u>r</u> ibosomal <u>b</u> inding <u>s</u> ite – ribosomale Bindestelle
rev	<u>r</u> everse primer – Rückwärtsprimer/PCR
RNA	<u>R</u> ibonukleinsäure
RovA	<u>r</u> egulator <u>o</u> f <u>y</u> irulence <u>A</u>
rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute - Drehzahl (Zentrifuge)
RpoE	<u>e</u> xtracytoplasmatic <u>R</u> NA <u>p</u> olymerase sigma factor - σ^E
RseA	Anti-RpoE-Faktor A

RseB	Anti-RpoE-Faktor B
RybB	kleine regulatorische RNA
s.	<u>s</u> iehe
S.	<u>S</u> almonella
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
s.o.	<u>s</u> iehe <u>o</u> ben
s.u.	<u>s</u> iehe <u>u</u> nten
SD	Shine Dalgarno-Region – Ribosom-Bindungsbereich
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate – Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	<u>s</u> ec <u>o</u> nd - Sekunde
sRNA	<u>s</u> mall <u>R</u> NA – kleine RNA
stat	<u>s</u> tationary phase – stationäre Wachstumsphase
TCA	<u>t</u> richloroacidic <u>a</u> cid – Trichloressigsäure
TEMED	<u>T</u> etramethylethylendiamin
Tet	<u>T</u> etrazyklin
US	<u>U</u> p- <u>S</u> tream Region eines Gens
UTR	<u>u</u> n <u>t</u> ranslated <u>r</u> egion – nichttranslatierte Sequenzregion eines Gens
UV	<u>U</u> ltra <u>V</u> iolett
Y.	<u>Y</u> ersinia
YadA	<u>Y</u> ersinia <u>A</u> dhäsin <u>A</u>
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Y. pestis</i>	<i>Yersinia pestis</i>
µg	<u>M</u> ikro <u>g</u> ramm
µL	<u>M</u> ikro <u>l</u> iter
µM	<u>M</u> ikro <u>m</u> olar
°C	Grad <u>C</u> elsius
3D-KoG	dreidimensionales (= <u>3D</u>) <u>K</u> ollagengel
3'	<u>3</u> - <u>S</u> trich-Ende einer DNA-Sequenz
5'	<u>5</u> - <u>S</u> trich-Ende einer DNA-Sequenz
%	Prozent

PUBLIKATIONSLISTE

* Kakoschke T, **Kakoschke S**, Magistro G, Schubert S, Borath M, Heesemann J, Rossier O - *The RNA chaperone Hfq impacts growth, metabolism and production of virulence factors in Yersinia enterocolitica* - PLoS One. 2014 Jan 15;9(1):e86113. doi: 10.1371/journal.pone.0086113

* Kakoschke TK, **Kakoschke SC**, Zeuzem C, Bouabe H, Adler K, Heesemann J, Rossier O - *The RNA Chaperone Hfq is Essential for Virulence and Modulates the Expression of Four Adhesins in Yersinia enterocolitica* - Sci Rep. 2016 Jul 8;6:29275. doi: 10.1038/srep29275

Leonhardt Y¹ and **Kakoschke SC**¹, Wagener J, Ebel F - *Lah is a transmembrane protein and requires Spa10 for stable positioning of Woronin bodies at the septal pore of Aspergillus fumigatus* - Sci Rep. 2017 Mar 10;7:44179. doi: 10.1038/srep44179

¹ These authors contributed equally to this work

* **Publikationen, in denen Teile dieser Promotion veröffentlicht wurden**

1. EINLEITUNG

1.1. Gattung *Yersinia*

Im Jahr 1894 konnte der Arzt und Biologe Alexandre Yersin in Hongkong erstmalig den Erreger der Pest, *Yersinia pestis*, isolieren und morphologisch beschreiben (Yersin, 1894). Alexandre Yersin gelang es den Zusammenhang der Erregerübertragung mit kleinen Nagern, wie Ratten oder Meerschweinchen, als Reservoir und dem Floh als Überträger darzustellen (Bibel and Chen, 1976).

Zu der Gattung *Yersinia* zählen aktuell mehr als achtzehn Spezies, drei von ihnen sind humanpathogen:

- *Yersinia pestis* → Erreger der Pest
- *Yersinia pseudotuberculosis* → Erreger der Yersiniose
- *Yersinia enterocolitica* → Erreger der Yersiniose

Yersinien gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* (Bercovier and Mollaret, 1984). Es handelt sich bei ihnen um Gram-negative Stäbchenbakterien, deren Temperaturoptimum für die Kultivierung zwischen 27 - 30°C liegt. Yersinien können sich jedoch auch bei niederen Temperaturen bis 4°C vermehren. Die Erreger der Yersiniose, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, sind peritrich begeißelt (Kapatral et al., 1996). Nur bei Temperaturen um die 27°C jedoch ist die Beweglichkeit der Bakterien nachweisbar (Straley and Perry, 1995). Abbildung 1 zeigt schematisch die Übertragungswege der drei humanpathogenen Erreger. *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* werden durch kontaminierte Lebensmittel übertragen. Ihr Reservoir sind insbesondere Schweine, aber auch im Boden und Gewässern kommen sie vor und sie können sogar über Haustiere übertragen werden (Heesemann and Aepfelbacher, 2001, Nuorti et al., 2004, Huovinen et al., 2010, Valentin-Weigand et al., 2014). *Y. pestis* wird über den Biss durch einen Floh übertragen (Bibel and Chen, 1976).

1.1.1. *Yersinia enterocolitica*

Y. enterocolitica kommt ubiquitär vor (Bottone, 1999). Die Art *Y. enterocolitica* umfasst 5 Biovare, von denen Typ 1B, 2, 3, 4 und 5 humanpathogen sind und der Typ 1A apathogen (Wauters et al., 1987).

Wie bereits erwähnt, kann es durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln zu gastrointestinalen *Yersinia*-Infektionen kommen. Im Dünndarm gelangen (Herold, 2014) die Yersinien über die Interaktion mit M-Zellen der Peyer'schen Plaques nach subepithelial, wo sie Mikrokolonien bilden. Von dort können sie in die mesenterialen Lymphknoten, Leber und

Milz disseminieren und im Gewebe persistieren (Oellerich et al., 2007, Heine et al., 2018). Die Virulenz der Yersinien wird durch zahlreiche Virulenzfaktoren bestimmt, diese werden in Kapitel 1.3. beschrieben.

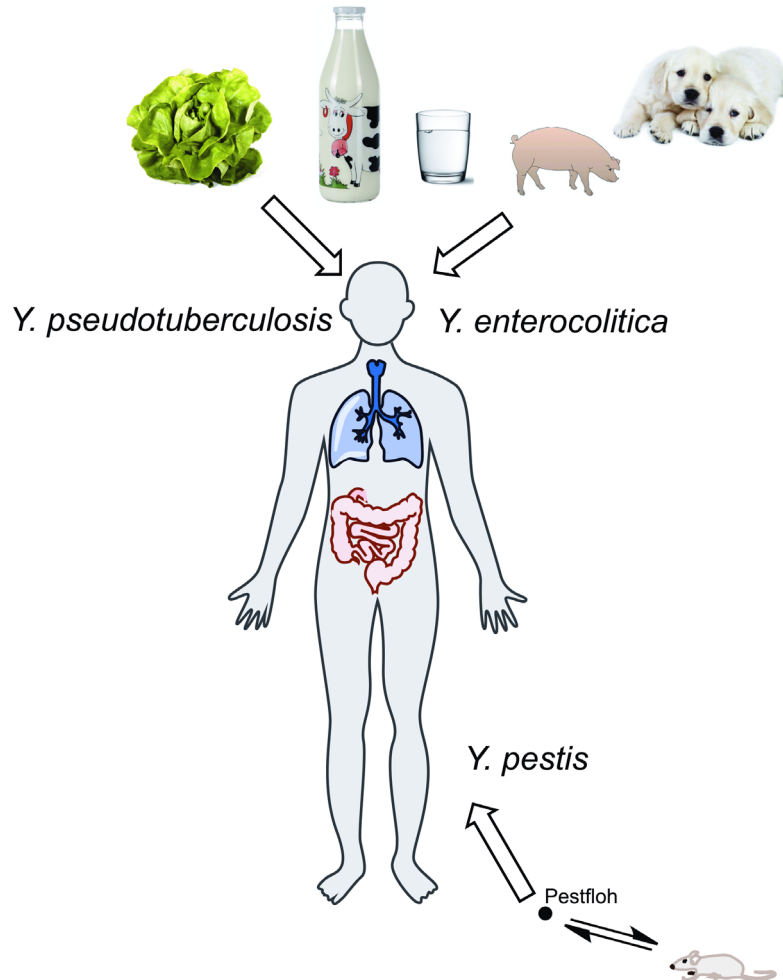


Abb. 1: Schematische Darstellung der Übertragungswege der drei humanpathogenen Yersinia-Arten

Klinisch manifestiert sich eine Infektion mit *Y. enterocolitica* oder *Y. pseudotuberculosis* als Yersiniose mit folgenden Symptomen: Gastroenteritis insbesondere bei Kleinkindern und geriatrischen Patienten, Pseudoappendizitis mit akuter Lymphadenitis mesenterica und Ileitis terminalis (Schapers et al., 1981, Knapp and Weber, 1981) sowie Durchfälle mit kolikartigen Bauchschmerzen (Herold, 2014). Bei Abwehrschwäche (Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz/ Dialysepflichtigkeit, Leberzirrhose, Lymphom, Leukämie u. a.) kann es zur *Yersinia*-Sepsis kommen. Nach der akuten Infektionsphase kann es bei Prädisposition (z. B. HLA-B27 Träger) zur postinfektiösen/ reaktiven Arthritis und/oder Erythema nodosum kommen (Helander et al., 1973, Knapp, 1981, Cribier et al., 1998, Wuorela and Granfors, 1998). Therapiert wird eine Yersiniose symptomatisch mit Flüssigkeits- und

Elektrolytsubstitution (Herold, 2014). In schweren Verläufen (systemische Infektion) kann antibiotisch therapiert werden (z. B. Ciprofloxacin).

Bundesweit ist eine *Y. enterocolitica*-Infektion bei Labornachweis namentlich meldepflichtig und in Sachsen besteht bei Erkrankung und Tod sowie Ausscheiden eine namentliche Meldepflicht (RKI, 22.03.2020).

1.2. Regulation der Genexpression in Bakterien

Die Genexpression in Prokaryoten kann auf transkriptioneller (DNA-), posttranskriptioneller (RNA-) und translationeller (Ribosomen-) Ebene reguliert werden. Darüber hinaus kann die Aktivität des Proteins posttranslationell reguliert werden (durch Proteinmodifikation).

Auf DNA-Ebene kann es durch Veränderungen der DNA-Struktur zu Veränderungen der Transkriptionsrate von Genen kommen. Hierzu zählen beispielsweise eine gesteigerte Kopienzahl eines Gens im Genom, was zu einer gesteigerten Expression wichtiger Strukturgene führen kann, die Methylierung des Replikationsursprungs, wobei dieser Mechanismus in Prokaryoten selten genutzt wird, sowie die ortsspezifische Rekombination von Promotoren wichtiger Zielgene. Letzteres kann zu einer vermehrten oder verminderten Transkriptionsrate führen. In der Regel werden in Bakterien eher Gene von Oberflächenproteinen oder Flagellen durch diesen Mechanismus reguliert, da eine Veränderung in diesen Strukturen eine Anpassung an neue Umweltbedingungen bedeutet und z.B. zu einem Überlebensvorteil gegenüber dem Immunsystem des Wirtes oder zur Bakteriophagenresistenz führen kann. Zusätzlich kann es auf DNA-Ebene zu einer Superhelikalität der DNA kommen. Das bedeutet, dass die DNA in sich stark verdrillt ist und somit die Promotorregionen von Zielgenen für die Transkriptionsmaschinerie nicht zugänglich sind (Fuchs, 2007a).

Die Regulation der Transkription von Bakterien ist im Wesentlichen stark abhängig vom Nährstoffangebot und Umweltveränderungen (z.B. Temperatur, Sauerstoffangebot, etc.). Transkriptions- und Regulationsfaktoren (σ -/ σ -Faktoren) werden durch diese äußeren Veränderungen oder auch äußeren Stress (Temperaturänderungen, Nahrungsmangel oder saure sowie oxidative Umgebung etc.) durch niedermolekulare Effektormoleküle direkt oder durch Signaltransduktionsketten oder Sensormoleküle indirekt aktiviert (s. Abb. 2 A). Die Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren/ Repressoren) bilden im aktiven Zustand in der Regel dimere Strukturen und können an die Promotorregion von Ziel-/ Strukturgenen binden. Nun können entsprechende σ -Faktoren an die spezifische Sequenz der Promotorregion binden und die Transkription initiieren (Fuchs, 2007a). Als Beispiel eines „Envelope Stress Response“-Signalweges (ESR) soll der RpoE-Signalweg dienen (Abb. 2 C). RpoE

(extracytoplasmatic RNA polymerase sigma factor/ σ^E) ist ein an der inneren Bakterienmembran an RseA-gebundener Regulator (Raivio and Silhavy, 2001). Dieser Signalweg ist in *Enterobacteriaceae* konserviert. RpoE ist an den Anti-RpoE-Faktor RseA gebunden, welcher selbst in der inneren Membran der Bakterien verankert ist (Alba and Gross, 2004). Im Periplasma ist ein zusätzlicher Regulator RseB an das RseA gebunden. Durch extrazelluläre Stimuli, insbesondere oxidativen Stress, Antibiotika und in vivo-Wachstum, kommt es im Periplasma gehäuft zu fehlgefalteten Proteinen (OMPs) und einer nicht koordinierten Produktion von LPS (s. hierfür Abschnitt 1.3.2.4.) (Heusipp et al., 2003, Rowley et al., 2006). Die falsch gefalteten Proteine können mit der periplasmatischen Serinprotease DegS interagieren und führen so zu einer Proteolyse der periplasmatischen Domäne von RseA. Danach folgt eine zweite Spaltung der Membrandomäne von RseA durch RseP mit Freisetzung von RpoE. Eine zweite Aktivierungsmöglichkeit besteht durch die vermehrte LPS-Produktion mit RseB-Bindung. RpoE kann sich dadurch unabhängig von DegS von RseA lösen (Abb. 2 C) (Guest and Raivio, 2016). Hierdurch kommt es zu einer Strukturänderung des membranständigen RseA-Ankers und somit zum Ablösen des Sigmafaktors RpoE. Das freie RpoE kann nun die Transkription zahlreicher von ihm abhängiger Gene beeinflussen, hierzu zählen *rpoE*, *rseA*, *degP* und auch die Gene einiger sRNAs, z. B. *micA* und *rybB* (s. Abb. 2 C) (Guest and Raivio, 2016, Grabowicz and Silhavy, 2017).

Die posttranskriptionelle Regulation beruht auf der Beeinflussung der Lebensdauer der mRNA. Es kann zur Stabilisierung oder Destabilisierung der mRNA kommen. Dies kann durch regulatorische RNA-bindende Proteine, kleine regulatorische RNAs (sRNAs) oder sRNA-Proteinkomplexe erfolgen. Darüber hinaus sekundär durch die mRNA-Struktur selbst. Durch die Bindung der Regulationsproteine oder sRNAs sowie die Veränderung der Sekundärstruktur der mRNA kann die Translation begünstigt oder gehemmt werden (Fuchs, 2007a). In Abschnitt 1.2.1. werden die in dieser Arbeit genauer untersuchten Regulatoren, wie das RNA-bindende Chaperon Hfq und die sRNAs MicA, RybB und CyaR, im Detail erläutert.

Posttranslational kann die Aktivität oder die Lokalisation eines Proteins durch enzymatische Modifikation (z.B. Phosphorylierung) reguliert werden. Im Wesentlichen dient sie der Kontrolle von Enzymen bei Stoffwechselprozessen aber auch dem gezielten Abbau oder Neufaltung fehlgefalteter Strukturproteine und Enzyme. Durch kovalente Modifikationen oder allosterischer Interaktion durch Effektormoleküle an Enzymen kann es zu Funktionsveränderungen in z.B. Stoffwechselprozessen kommen. Dies geschieht in der Regel im Zytosol. Die Neufaltung oder der Abbau von Proteinen durch Protein-Chaperone oder Proteasen kann in Gram-negativen Bakterien sowohl im Zytosol als auch im Periplasma

erfolgen (Fuchs, 2007a). In dieser Arbeit wird z.B. auch die Funktion des periplasmatischen bifunktionellen Proteins DegP untersucht und in Abschnitt 1.2.2. genauer erläutert.

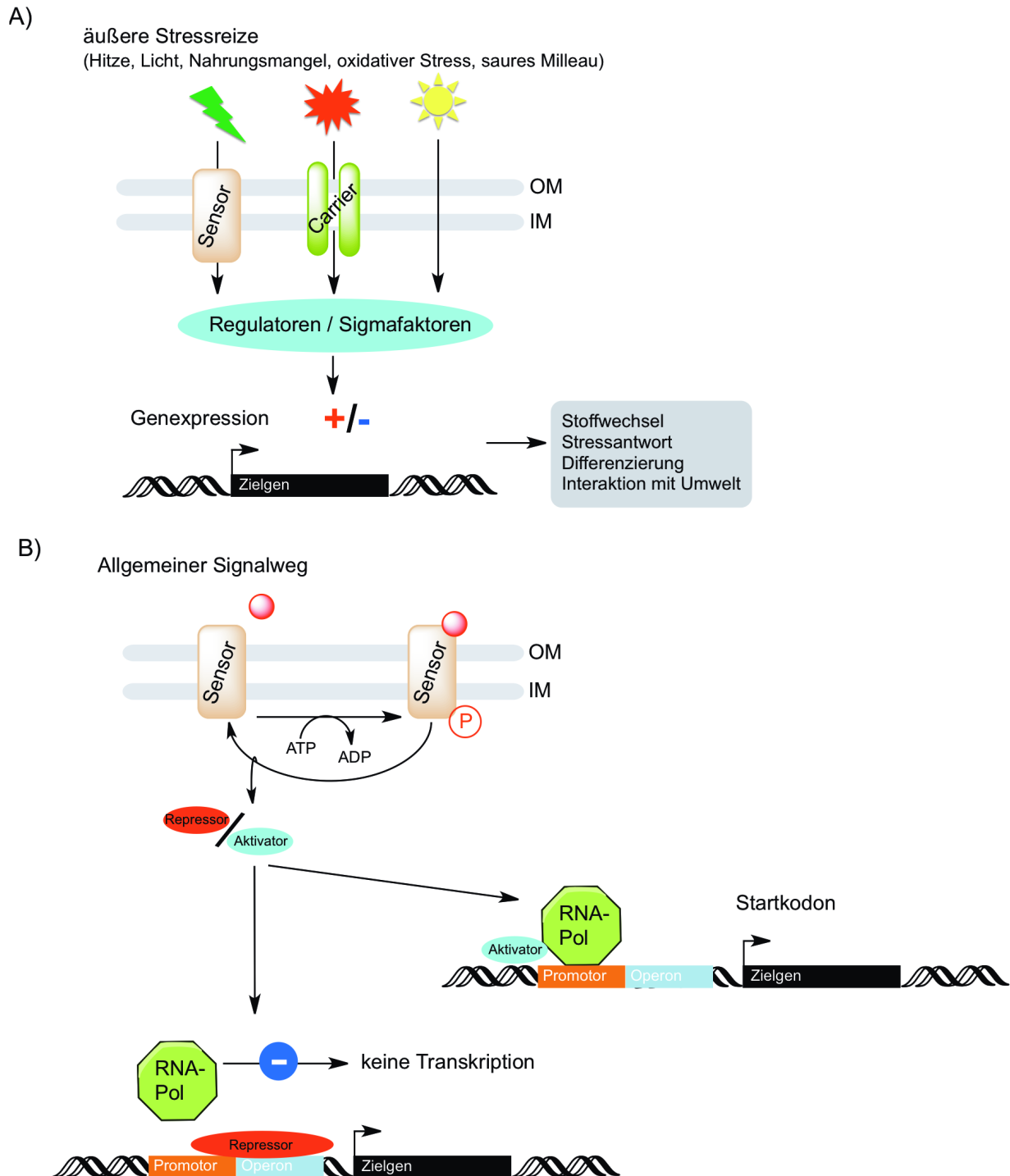


Abb. 2A und B: Schema Regulation der Transkription. A) Allgemeine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch äußeren Stress über Sensormoleküle oder proteolytischen Signalkaskaden indirekt oder über kleine Effektormoleküle direkt. Dies kann zur Expression von Zielgenen der Stressantwort, des Stoffwechsel oder der Differenzierung dienen. B) Durch Reizmoleküle (roter Kreis) kann ein in der bakteriellen Membran befindlicher Sensor (Rezeptor) aktiviert werden im Sinne einer Phosphorylierung. Ein Aktivator/ Repressor kann durch einen aktivierten Sensor aktiviert werden und darauf entweder zur Einleitung der Transkription bestimmter Zielgene oder Hemmung der Transkription führen, indem die DNA für die RNA-Polymerase zugänglich gemacht wird oder nicht.

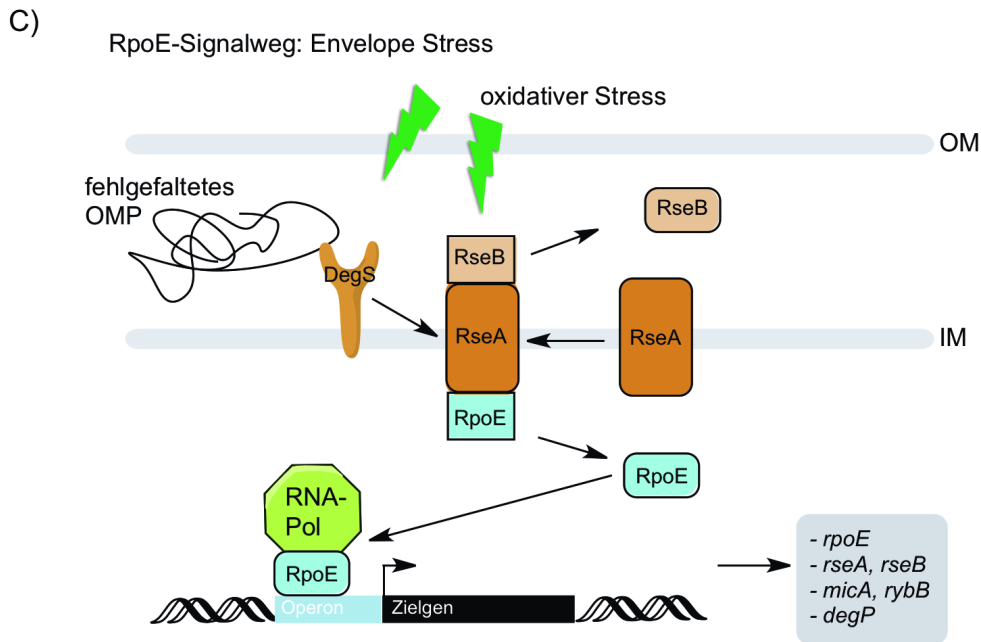


Abb. 2C: C) Schematische Darstellung des RpoE-Signalwegs nach Guest and Raivio 2016.

1.2.1. Posttranskriptionelle Regulatoren

1.2.1.1. RNA-Chaperon – Hfq

Hfq wurde erstmals 1968 in *Escherichia coli* beschrieben (Franze de Fernandez et al., 1968, August et al., 1970). Es zeigte sich in ersten Studien, dass Hfq essenziell für die Replikation des Bakteriophagen Q beta ist. Daraus ergab sich dann auch die Namensgebung Hfq = „Host Factor of Phage Q beta“ (August et al., 1970).

Nachdem in den 1990er-Jahren die posttranskriptionelle Regulation in den Fokus der Wissenschaft rückte, erkannte man weitere Funktionen des Hfq-Proteins (Vogel and Luisi, 2011). Schnell stellte sich heraus, dass Hfq ein RNA-bindendes Protein ist, welches über die Interaktion mit kleinen, nicht-kodierenden, regulatorischen RNAs (ca. 100-200 Nukleotiden) an mRNAs binden kann (siehe Kapitel 1.2.1.2) (Papenfert et al., 2006, Vogel and Papenfert, 2006). Somit trägt Hfq zur posttranskriptionellen Genregulation auf mRNA-Ebene bei. Außerdem zeigte sich, dass eine Deletion des *hfq*-Gens zu einer Abschwächung der Virulenz in Gram-negativen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *E. coli* und *Yersinia spp.* u.a. führt und auch eine geringere Stressresistenz der Mutanten daraus resultiert (Sonnleitner et al., 2003, Sittka et al., 2007, Kulesus et al., 2008, Chao and Vogel, 2010, Schiano et al., 2010, Kakoschke et al., 2014).

Durch die Interaktion mit kleinen regulatorischen RNAs kommt es entweder zur Stabilisierung oder Destabilisierung der Target-mRNA (siehe Abbildung 3; siehe Kapitel 1.2.1.2.). Bei Stabilisierung kann diese translatiert oder degradiert werden, wobei letzter

Mechanismus häufiger ist (Masse et al., 2003a, Masse et al., 2003b, Storz et al., 2011, Wagner, 2013, El-Mowafi et al., 2014).

Das Hfq-Protein bildet ein Homohexamer, das an zahlreiche RNAs insbesondere an AU-reichen Motiven binden und dann sequenzspezifisch mRNA erkennen kann (Schiano and Lathem, 2012).

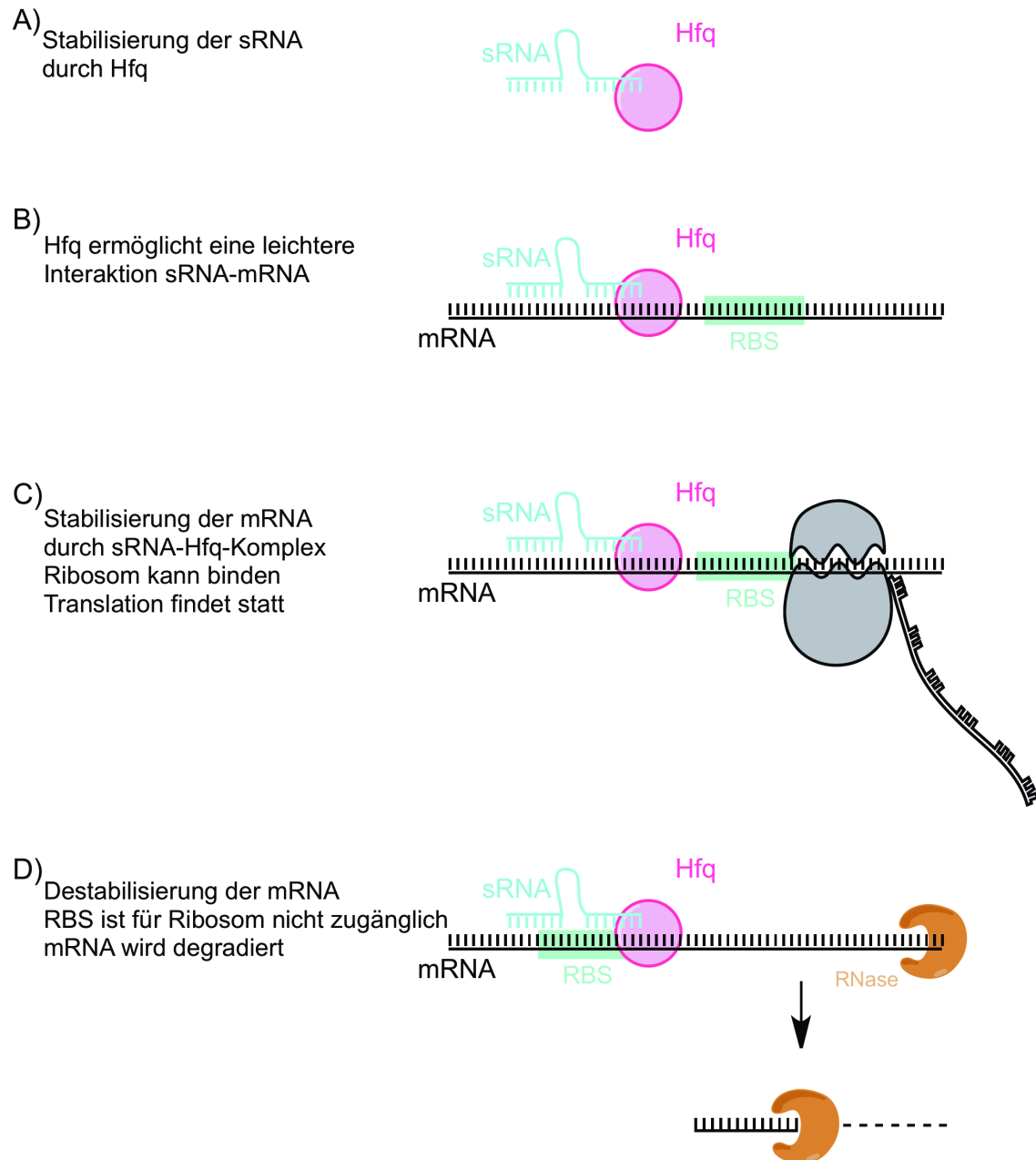


Abb. 3: Schematische Darstellung der Regulation der Genexpression durch den sRNA-Hfq-Komplex. A) Hfq kann die sRNA im Komplex durch komplementäre Bindung stabilisieren. B) Hfq ermöglicht der sRNA eine bessere Interaktion mit der mRNA. C) Der Komplex sRNA-Hfq kann sowohl zu einer Stabilisierung der mRNA und einer Exposition der ribosomalen Bindungsstelle (RBS) führen. Somit kann das Ribosom an die mRNA binden und die Translation starten. D) Andererseits kann der sRNA-Hfq-Komplex im Bereich der RBS binden, diese ist für das Ribosom somit nicht mehr zugänglich. Zusätzlich kann es zu einer Destabilisierung kommen und die mRNA durch RNasen (in der Regel RNaseE) degradiert werden.

1.2.1.2. Regulatorische kleine RNAs

Kleine nicht-kodierende RNAs (small RNAs/ sRNAs) in Gram-negativen Bakterien sind häufig ca. 50-350 nt lang (Michaux et al., 2014). Sie sind in der Lage die Genexpression posttranskriptionell zu regulieren. Zur Gruppe dieser regulatorischen sRNAs zählen trans-kodierte und cis-kodierte sRNAs (Thomason and Storz, 2010, Georg and Hess, 2011a, Georg and Hess, 2011b).

Cis-kodierte sRNAs binden an den Gegenstrang des DNA-Abschnittes der Ziel-mRNA. Sie sind komplementär zur mRNA. Diese cis-kodierten sRNAs können nur eine bis wenige mRNAs beeinflussen, eben durch deren Eigenschaft der direkten Komplementarität zur mRNA (Brantl, 2007).

Die häufigeren trans-kodierten sRNAs können mit mRNAs durch kurze Basenpaarungen interagieren und diese für die Translation blockieren oder auch stabilisieren und für Ribosomen besser zugänglich machen, um die Translation zu verbessern (Waters and Storz, 2009, Storz et al., 2011). Bei Ersterem erfolgt die Interaktion meist im Bereich der RBS (Ribosomal Binding Site) der mRNAs. Hierdurch wird eine Bindung des Ribosoms an die zu translatierende mRNA behindert. Bei Letzterem kommt es durch Wechselwirkung der sRNA mit der mRNA an einer RBS-ferneren Position (5'-UTR oder 3'UTR) zu einer Stabilisierung und die Translation kann erfolgen. Trans-kodierte sRNAs können mit multiplen mRNAs interagieren, da sie wie oben beschrieben, nur durch kurze Basenpaarungen und nicht einer vollständigen Komplementarität mit der Ziel-mRNA wechselwirken (Gottesman, 2005). Häufig erfolgt die Regulation durch die sRNAs im Komplex mit dem Hfq-Chaperon (s. Kapitel 1.2.1.1.) (Papenfert and Vogel, 2010, Storz et al., 2011).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der drei sRNAs MicA, RybB und CyaR im Kontext mit Hfq auf die posttranskriptionelle Regulation der Produktion von OMPs (Outer membrane proteins) und LPS bei *Y. enterocolitica* untersucht.

1.2.1.2.1. MicA

Bei der kleinen regulatorischen RNA MicA (auch SraD genannt) handelt es sich um eine trans-kodierte sRNA, die abhängig von äußerem Membranstress und der Aktivierung durch den σ -Faktor RpoE produziert wird (Vogel and Papenfert, 2006).

In der Familie der *Enterobacteriaceae* ist MicA konserviert (Van Puyvelde et al., 2015). Es ist bereits seit Längerem bekannt, dass MicA vor allem die Expression von OMPs (Outer membrane proteins) posttranskriptionell beeinflusst. Insbesondere bei OmpA konnte dieser Einfluss beschrieben werden. MicA ist in der Lage die Translation der OmpA-mRNA in *E. coli* zu unterdrücken (Vogel and Papenfert, 2006, Choi et al., 2017). Dies wurde bereits in *E. coli* gezeigt.

MicA bildet mit Hfq einen Protein-RNA-Komplex und tritt dann mit den OMP-mRNAs in Interaktion (Rasmussen et al., 2005, Udekwu et al., 2005). Hierbei kommt es dann zur Degradation der mRNA und damit zur reduzierten Produktion von OMPs. Aber auch eine Stabilisierung der mRNAs wurde beschrieben (Rasmussen et al., 2005, Udekwu et al., 2005).

In *Y. enterocolitica* ist die sRNA MicA 75 nt lang (KEGG-Genome, 2018, NCBI-Genome, 2018) und ihr Einfluss sowohl auf Virulenz als auch Resistenz wurde noch nicht beschrieben.

1.2.1.2.2. RybB

Bei der nicht-kodierenden, regulatorischen sRNA RybB handelt es sich ebenfalls um eine trans-kodierte sRNA, die ebenfalls wie MicA auch abhängig von äußerem Stress und der Aktivierung durch den σ -Faktor RpoE produziert wird (Vogel and Papenfort, 2006). Diese sRNA wurde in einem Screening für neue sRNAs in *E. coli* gefunden (Wassarman et al., 2001). Es zeigte sich, dass es sich auch hier um eine in *Enterobacteriaceae* konservierte sRNA handelt (Wassarman et al., 2001).

Eine Interaktion von RybB mit Hfq konnte bestätigt werden (Papenfort et al., 2008, Papenfort and Vogel, 2010). In *S. enterica* und *E. coli* zeigte sich, dass RybB einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der äußeren Membranproteine (OMPs) hat. Es kann sowohl zu einer vermehrten oder verminderten OMP-Produktion kommen.

In *Y. enterocolitica* ist diese sRNA ca. 81 nt lang (KEGG-Genome, 2018, NCBI-Genome, 2018) und ihre Funktion bisher nicht beschrieben.

1.2.1.2.3. CyaR

CyaR (früher RyeE genannt) ist eine ebenfalls mit dem Hfq-Protein interagierende in *Enterobacteriaceae* konservierte sRNA. Sie wurde ebenso wie RybB in *E. coli* zuerst beschrieben (Wassarman et al., 2001). Auch bei dieser kleinen regulatorischen RNA handelt es sich um eine trans-kodierte RNA (Waters and Storz, 2009).

RyeE wurde später in CyaR (cyclic AMP activated RNA) umbenannt, da gezeigt wurde, dass die *ryeE*-Transkription durch die Bindung von cAMP an seinen positiven Genregulator Crp (cAMP Rezeptor-Protein) begünstigt wird (Papenfort et al., 2008). In *S. enterica* zeigte CyaR einen positiven Einfluss auf die Regulation der OmpX-Expression (Papenfort et al., 2008).

Anders als bei MicA und RybB konnten die 5'- und 3'-Enden von CyaR nicht genau definiert werden. In *Y. enterocolitica* ist CyaR zwischen 87 und 89 nt lang (KEGG-Genome, 2018, NCBI-Genome, 2018). Untersuchungen zum regulativen Einfluss auf die Genexpression von *omp*-Genen in *Y. enterocolitica* werden erstmalig in dieser Dissertation beschrieben.

1.2.2. Posttranslationelle Regulation durch DegP

DegP gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die im Periplasma von Gram-negativen Bakterienzellen lokalisiert ist. DegP (Degradationsprotease - auch HtrA high temperature requirement protease A genannt) ist ein bifunktionelles Protein, d.h. es kann sowohl als Protease als auch als Protein-Chaperon agieren (Rollauer et al., 2015, Chang, 2016). Dieses Enzym ist in der Familie der *Enterobacteriaceae* konserviert (Rollauer et al., 2015).

DegP bildet spontan Trimere, die nach Aktivierung Hexamere, Dodecamere (DegP12), Pentdecamere, Octdecamere und Tetraikosamere (DegP24) bilden (Jiang et al., 2008, Krojer et al., 2008a, Krojer et al., 2008b, Shen et al., 2009). Das Hexamer ist inaktiv, kann jedoch in die aktiven Formen DegP12 und DegP24 übergehen und nun als Protease oder Chaperon fungieren (Krojer et al., 2002, Jomaa et al., 2007, Huber and Bukau, 2008, Krojer et al., 2008a, Krojer et al., 2008b, Rollauer et al., 2015). Bei der Bildung der aktiven Dodecamere und Tetraikosamere entstehen rohrähnliche Hohlräume, welche es den fehlgefalteten Proteinen ermöglicht, in die katalytische Domäne der Protease/Chaperon-Einheit (Proteasom-ähnlich) des DegP zu gelangen (Spiess et al., 1999).

Untersuchungen zum DegP-Protein und der Klasse der periplasmatischen Proteasen zeigten in *E. coli*, dass DegP bei niederen Temperaturen bis ca. 35°C sowohl als Chaperon als auch als Protease agieren kann. Bei Temperaturen jedoch von über 42°C verliert DegP die Fähigkeit, fehlgefaltete Proteine neu zu falten und fungiert dann hauptsächlich als Protease (Lipinska et al., 1988, Lipinska et al., 1989, Strauch et al., 1989).

1.3. Virulenzfaktoren

Virulenzfaktoren in Yersinien sind sowohl auf der chromosomalen Bakterien-DNA als auch auf dem extrachromosomalen *Yersinia* Virulenz-Plasmid (pYV) kodiert (de Rouvoit et al., 1992). Außerdem werden Virulenzfaktoren häufig temperaturabhängig exprimiert. Einige werden bei 37°C, z.B. Typ-3-Sekretionssystem und YadA, andere bei 27°C, z.B. InvA, stärker produziert (Kakoschke et al., 2016).

1.3.1. Plasmid kodierte Virulenzfaktoren

1.3.1.1. *Yersinia* Adhäsine A

Um mit Wirtszellen in Kontakt treten zu können, sind Adhäsine eine wichtige Gruppe der Virulenzfaktoren. Durch sie können Bakterien an die Zellwand der Wirtszellen binden. YadA ist das *Yersinia* Adhäsine A, welches ein Protein der äußeren Membran der Bakterienzelle ist und mit Proteinen der „Extrazellulären Matrix“ (EZM), wie beispielsweise Kollagen und

Fibronektin, sowie der intestinalen Mukosa und dessen Mukus interagieren kann (Skurnik and Wolf-Watz, 1989, Schulze-Koops et al., 1993, Tamm et al., 1993, Pepe et al., 1995, El Tahir and Skurnik, 2001).

Auch in der Serumresistenz spielt YadA eine wesentliche Rolle, es inhibiert die Aktivierung des Komplementsystems durch Bindung des H-Faktors (Heesemann and Laufs, 1983, Biedzka-Sarek et al., 2005, Biedzka-Sarek et al., 2008). Dieser Mechanismus könnte zur Chronifizierung der Yersiniose beitragen (Gaede and Heesemann, 1995, Skurnik, 1995).

YadA ist ein ca. 41 – 44 kDa großes Protein, welches als Autotransporter dem Typ5c-Sekretionssystem (T5cSS) zugeordnet wird. In der äußeren Membran bildet es Homotrimere (Meuskens et al., 2019). Das C-terminale Ende ist als „ β -Barrel“-Struktur in der äußeren Bakterienmembran verankert, wohingegen das N-terminale Ende exponiert ist. Die drei N-terminalen Enden bilden eine coiled-coil-Struktur, die in einer oval erscheinende Kopfdomäne (β -Faltblattstruktur) endet (= lollipop-like structure) (Hoicyk et al., 2000). YadA-Trimere, -Dimere und -Monomere sind hitzestabil und erscheinen daher in Proteinanalysen, wie z.B. SDS-PAGE, als Oligomere im Größenbereich von ca. 160 – 250 kDa (Tamm et al., 1993, Casutt-Meyer et al., 2010). Das Optimum der *yadA*-Genexpression liegt bei einer Temperatur von 37°C, somit der Körpertemperatur des Wirtes. Bei 27°C wird YadA in geringerer Menge produziert (Bottone, 1999). Bei 37°C kommt es aufgrund der Überexpression von YadA zu einer Autoagglutination der Bakterienzellen (Skurnik et al., 1994).

1.3.1.2. Typ-3-Sekretionssystem und Yops

Ebenfalls auf dem pYV-Plasmid kodiert sind die Gene des *Yersinia* Typ-3-Sekretionssystems (T3SS, Ysc) und deren Substrate (de Rouvrouit et al., 1992). Das pYV-Plasmid beinhaltet Gene, welche für das T3SS kodieren und auch für die sezernierten Effektorproteine (Yops: *y*ersinia *o*uter *p*roteins) (Aepfelbacher et al., 1999, Galan and Waksman, 2018). Das T3SS hat die Funktion einer „Injektionspritze“: die Yops werden vom Zytosol der *Yersinien*-Zelle direkt über die „Injektionsnadel“ in die Wirtszelle transloziert. Die Struktur des T3SS wird von ca. 25 Proteinen gebildet. Die Länge der „Injektionsnadel“ beträgt etwa 60-80 nm und der Außendurchmesser ca. 7 nm (Hoicyk and Blobel, 2001, Cornelis, 2002a, Cornelis, 2002b, Cornelis, 2002c). Drei Proteine (YopB, YopD und LcrV) an der Nadelspitze bilden in der Zielzellmembran eine Pore und agieren als Translokatoren für die Effektorproteine (Hakansson et al., 1996, Mueller et al., 2005, Edgren et al., 2012). Nach Translokation der Yops ins Zytosol der Zielzelle (Makrophagen oder Neutrophile) bewirken die Yops die Inhibition der Phagozytose und Abschwächung der Abwehrreaktion von Phagozyten (Cornelis, 2002a, Brubaker, 2003).

Zusammenfassend ist das T3SS mit den verschiedenen Yops (YopE, YopH, YopM, YopO, YopP und YopT) ein essenzieller Virulenzfaktor der pathogenen *Yersinia*-Arten.

1.3.2. Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren

1.3.2.1. Invasin

Das Invasin (InvA) ist ein ca. 92 kDa-großes Protein (Monomer) der äußeren Bakterienmembran und wird vom *invA*-Gen kodiert (Bialas et al., 2012, Deuschle et al., 2016). Es gehört zum Typ5e-Sekretionssystem (T5eSS - Autotransporter). Hierbei ist das N-terminale Ende als „ β -Barrel“-Struktur in der äußeren Bakterienmembran verankert und das C-terminale Ende exponiert (Oberhettinger et al., 2012, Meuskens et al., 2019). Die optimale Expressionstemperatur liegt bei 28°C, aber es wird auch bei 37°C in saurem Milieu produziert (Pepe and Miller, 1993a, Pepe and Miller, 1993b). Die *invA*-Genexpression wird durch RovA (regulator of virulence) kontrolliert (Revell and Miller, 2001). Bei 28°C überwiegt der Einfluss von RovA, sodass es an regulatorische Sequenzen von *invA* und *rovA* binden (Autoregulation) kann und das Histon-ähnliche Protein H-NS verdrängt. Somit kommt es zu einer vermehrten Produktion an InvA und RovA (Nagel et al., 2001). Bei 37°C allerdings bindet RovA nicht mehr gut an die regulatorischen Sequenzen und es wird zusätzlich proteolytisch abgebaut, sodass auch die Produktion von InvA abnimmt (Heroven et al., 2004, Heroven et al., 2007, Cathelyn et al., 2007). Zusätzlich wird die *invA*-Expression durch OmpR (outer membrane protein regulator) kontrolliert. OmpR kann in *Y. enterocolitica* direkt an den Promotor des *inv*-Gens binden und hemmt die Produktion an InvA. Diese Regulation ist RovA unabhängig (Brzostkowska et al., 2012, Skorek et al., 2013).

Das Adhäsion Invasin bindet direkt an β 1-Integrin der M-Zellen und fördert somit die M-Zellpenetration bei oraler Infektion (Isberg and Leong, 1990, Cossart and Sansonetti, 2004). Es kommt nach Bindung an das β 1-Integrin zur Kolonisierung der Peyer Plaques des Intestinaltraktes durch die Yersinien (Schulte et al., 2000). Die InvA- β 1-Integrin Interaktion führt zur Bakterieninternalisierung und zusätzlich zur Aktivierung von NF- κ B mit nachfolgender verstärkter Produktion von proinflammatorischen Zytokinen/ Chemokinen, wie IL-8, was wiederum zur Rekrutierung von Neutrophilen führt (Schulte and Autenrieth, 1998, Wiedemann et al., 2001).

1.3.2.2. Adhäsine - Ail, OmpX und OmpA

Ail, OmpX und OmpA sind typische äußere Membranproteine mit exponierten „loops“ zwischen den inserierten β -Faltblattdomänen.

Ail ist genomisch kodiert, hat eine Größe von 17 kDa und besteht aus 8 Beta-Faltblattstrukturen, welche in der bakteriellen äußeren Membran verankert sind. Die vier

extrazellulären Loop-Strukturen (Miller et al., 1990, Miller et al., 2001, Kakoschke et al., 2016) vermitteln die Bindung an die Wirtszelle. Auch für die Serumresistenz (Inhibierung der Komplementaktivierung) sind die Loops von wesentlicher Bedeutung (Miller et al., 2001, Biedzka-Sarek et al., 2005).

Ein dem Ail in Funktion und Struktur sehr ähnliches Protein ist das OmpX, welches für *Y. pestis* beschrieben wurde (Kolodziejek et al., 2007, Kolodziejek et al., 2010). Seine Funktion in *Y. enterocolitica* ist bislang noch unklar.

Ein weiteres äußeres Membranprotein (OMP), welches in *Enterobacteriaceae* konserviert ist, ist das OmpA (Singh et al., 2003, Chen et al., 2015). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass das OmpA in der Resistenz gegenüber äußerem Stress im Sinne von niedrigem pH, Humanserum, SDS u.a. eine wesentliche protektive Rolle spielt (Wang, 2002). Das OmpA hat drei funktional unterschiedliche Domänen: eine hydrophobe extrazelluläre Domäne, eine Transmembraneinheit für die „beta-Barrel“ Struktur und eine Peptidoglycan bindende Domäne (Wang, 2002, Shin et al., 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass OmpA für die Stabilität der äußeren Membran in *E. coli* mitverantwortlich ist (Wang, 2002). Zusätzlich scheint das OmpA in *E. coli* eine zelladhäsive Funktion zu haben (Shin et al., 2005). Die Funktion in *Y. enterocolitica* ist bisher nicht geklärt.

1.3.2.3. Myf-Fimbrie

Auch das *mycoid Yersinia factor* Antigen (MyfA) ist ein auf dem bakteriellen Chromosom von *Y. enterocolitica* kodierter Virulenzfaktor (Iriarte et al., 1993). Der Myf-Locus umfasst 5 Gene, *myfE,F,A,B* und C. MyfE und MyfF sind Transkriptionsfaktoren, die in der inneren *Yersinia*-Membran lokalisiert sind und für die Genexpression des *myfABC*-Operons essenziell sind (Fibrillenuntereinheiten) (Iriarte et al., 1993, Iriarte et al., 1995, Yang et al., 1996, Bialas et al., 2012). Der *psaEFABC*-Locus in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* hat die gleiche Funktionsweise (Quinn et al., 2019).

MyfA ist der Baustein für polymere fimbrienähnliche Strukturen auf der Oberfläche der Bakterien (Lindler et al., 1990, Iriarte et al., 1993). Auf dem *myf*-Genlocus sind auch *myfB* und *myfC* kodiert. MyfB ist ein Protein mit Chaperonfunktion im Periplasma, MyfC ist ein Protein an der äußeren Membran der Yersinien und dient der Assemblierung der MyfA-Fimbrien (Iriarte et al., 1993). Der Transport von MyfA an die äußere Membran geschieht durch einen MyfB/MyfC-Komplex. Die Produktion von MyfA wird bei Temperaturen um die 37°C und niedrigerem pH-Werte (< 6) gefördert (Iriarte et al., 1993, Yang et al., 1996).

In *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* entspricht das pH6-Antigen dem Myf-Antigen von *Y. enterocolitica*. Hier ist es für die Agglutination der Erythrozyten mitverantwortlich (Yang et al., 1996). Die genaue pathogenetische Funktion von MyfA ist in *Y. enterocolitica* bislang noch nicht vollständig geklärt.

1.3.2.4. Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharide sind ein wesentlicher Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien. LPS ist aus drei Einheiten aufgebaut. Das Lipid A ist hierbei die Einheit, welche das LPS in der äußeren Membran mittels 4-6 Fettsäuren verankert (Skurnik and Toivanen, 1993, Reines et al., 2012). Hierbei sind vier β -Hydroxyfettsäuren durch Esterbindungen an ein Disaccharid gebunden. In der Regel sind zwei β -Fettsäuren zusätzlich mit C₁₄- und C₁₆-Fettsäuren verestert. Freigesetztes Lipid A wirkt als Endotoxin. Der hexa-acylierte Lipid A-Anker kann mit den Wirtszellen über den Rezeptorkomplex CD14/TLR4 interagieren, wodurch eine Entzündungskaskade aktiviert wird mit Fieber und anderen Entzündungsreaktionen bis zur Apoptose von Zellen (Park and Lee, 2013). Die Kerneinheit (Core) bildet eine weitere funktionelle Einheit des LPS. Die Kerneinheit kann in eine innere und eine äußere Kernregion unterteilt werden. Die innere Kernregion bildet das 2-Keto-3-desoxy-octonat (KDO) (Skurnik and Toivonen, 2011). Für *Enterobacteriaceae* gilt allgemein folgendes LPS-Biosynthese-/ Transport-/ Modifikations-Modell: Lipid A und Kerneinheit werden an der zytosolischen Seite der inneren Membran synthetisiert und mittels der Flippase MgbA zur periplasmatischen Seite transloziert. Das O-Antigen wird getrennt von Lipid A synthetisiert, wobei der Membrananker Undecanyldiphosphat (C52) als Rezeptor gewertet wird. Die O-Antigeneinheit wird dann mittels Flippase Wzx transloziert und mittels Wzy polymerisiert und schließlich mittels Wzz-Ligase an die LipidA-Kern-Einheit ligiert und nachfolgend mittels des LPS-Transporters Lpx über die äußere Membran transloziert und in diese inseriert (Skurnik and Toivonen, 2011). Die terminale Einheit bildet das O-Antigen (Polysaccharid-Einheit). Es ist eine Abfolge von unterschiedlichen Sacchariden (z.B. Glukose, Galaktose etc.) und sehr variabel in seiner Kettenlänge durch die Anzahl der Oligosaccharid-Einheiten.

Das O-Antigen kann auch vollends fehlen (raues LPS: rLPS). Bereits im Zytoplasma werden kurze Zuckerketten (Oligosaccharide) gebildet, welche sich an die Innenseite der inneren Membran anlagern. Durch die Flippase Wzx, die in der inneren Membran der Yersinien befindlich ist, gelangen diese Molekülstrukturen in das Periplasma (s. Abb. 4). Im Periplasma werden die Oligosaccharide von Wzy, einem Enzym mit Glykosyltransferasefunktion, zu langen Ketten polymerisiert. Das Enzym Wzz dient der Längenkontrolle und kann die Funktion der Glykosyltransferase hemmen und bestimmt somit die Länge des O-Antigens (Brubaker, 1991, Bengoechea et al., 2002)(Skurnik and Bengoechea, 2003, Klein and Raina, 2019).

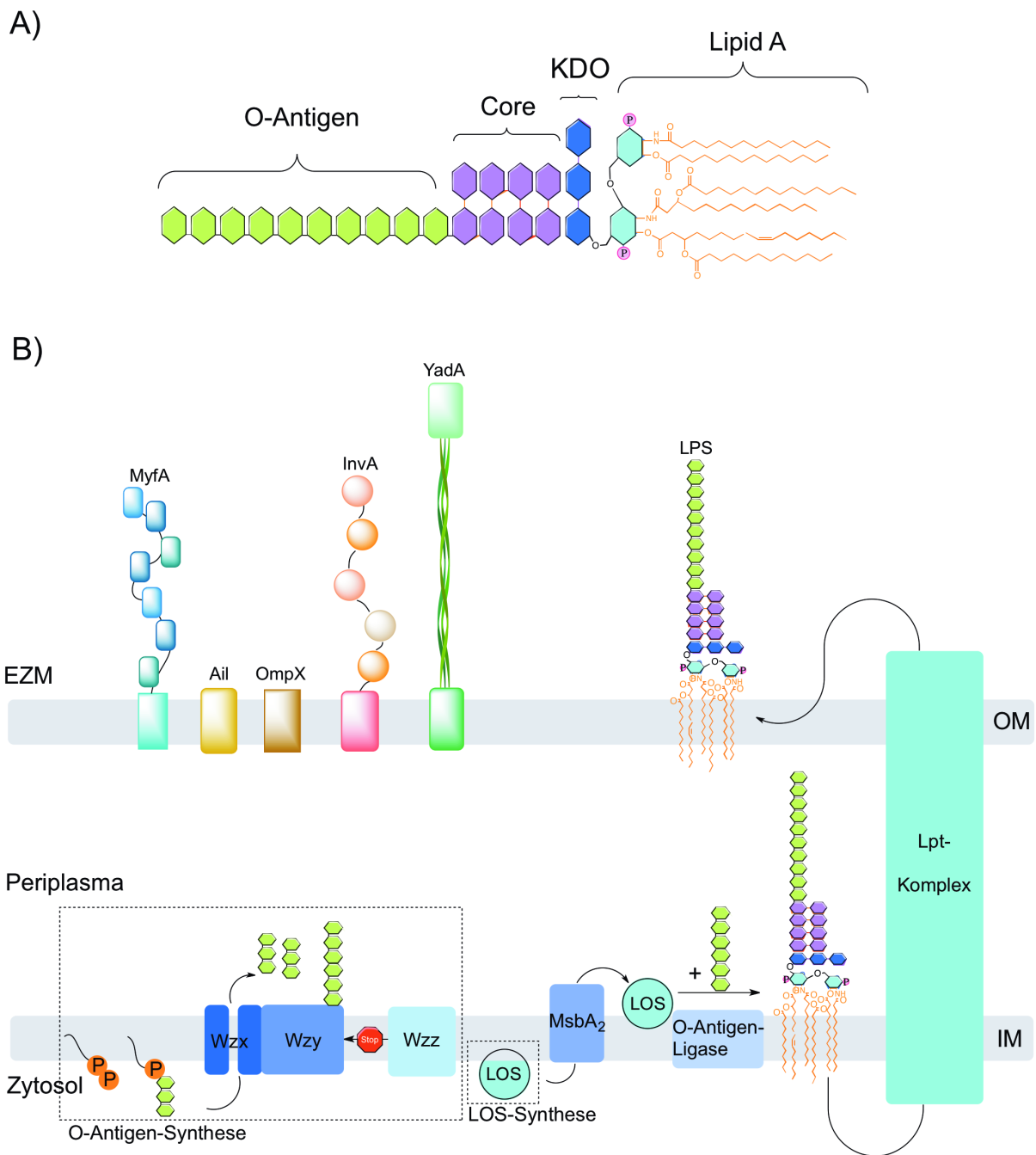


Abb. 4: A) Aufbau des LPS aus O-Antigen, Core, KDO und LipidA-Struktur. B) Schematische Darstellung der Syntheseregulation von LPS. Zellhülle mit äußerer Membran (OM), periplasmatischem Raum und innerer Membran (IM). In der OM inseriert sind MyfA, Ail, OmpX, InvA (Monomer), YadA (Trimer) und LPS dargestellt. In der IM von links nach rechts sind dargestellt: Undecaprenyldiphosphat als Anker für die O-Antigensynthese. Oligosaccharide lagern sich im Zytosol an die IM an. Dort werden sie von der Flippase Wzx erkannt. Durch Wzx werden die Oligosaccharide ins Periplasma transportiert. Im Periplasma werden sie dann von der Glykosyltransferase Wzy zu langen Ketten dem O-Antigen polymerisiert. Das Enzym Wzz dient der Längenkontrolle und kann die Funktion des Wzy hemmen. Die LOS-Synthese (Lipooligosaccharid-Synthese) findet zytosolseitig der inneren Membran statt. MsbA₂ agiert als Flippase und LOS wird ins Periplasma verlagert. Dort wird das LOS mit dem O-Antigen durch die O-Antigenligase zum LPS synthetisiert. Durch den Lpt-Komplex wird das LPS in die äußere Membran transportiert und dort verankert (Simpson and Trent, 2019, Whitfield et al., 2020).

1.4. Motilität von *Yersinia enterocolitica*

Ein Zusammenhang zwischen der Beweglichkeit durch Flagellen und der Virulenz von *Y. enterocolitica* wurde bereits beschrieben (Straley and Perry, 1995, Young et al., 2000, Bleves et al., 2002). Yersinien sind hauptsächlich bei Temperaturen unter 30°C motil (Kapatral et al., 1996). Bei höheren Temperaturen werden kaum Flagellen produziert. In *Y. enterocolitica* wird die Motilität als wichtige virulente Eigenschaft bei der Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle und der Invasion in den Wirtsorganismus diskutiert (Young et al., 2000).

Die Regulation der Produktion von Flagellen in *Enterobacteriaceae* ist konserviert (Horne and Pruss, 2006). In *E. coli* und *S. enterica* wird die Expression der Flagellen durch ein komplexes Regulationssystem kontrolliert, wobei zusätzlich cAMP-CAP und OmpR mitwirken (Shin and Park, 1995, Soutourina et al., 1999). Es besteht eine Regulationsmaschinerie mit 3 Ebenen: Klasse 1-3 Transkriptionsfaktoren/ Genen (Abb. 5). In Gram-negativen Bakterien (wie *E. coli*, *S. enterica* und *Y. enterocolitica*) werden ca. 60 Gene für die Synthese des Flagellin-eigenen T3SS, der Flagellin-Untereinheiten und deren Regulatoren benötigt (Chilcott and Hughes, 2000). Durch Umweltveränderungen (Temperaturschwankungen, saures Umgebungsmilieu etc.) kommt es zu einer Veränderung der Expression des Klasse-1-Regulators FlhD/C in *E. coli* und *S. enterica* (Bartlett et al., 1988, Horne and Pruss, 2006). Für *Y. enterocolitica* konnte gezeigt werden, dass FlhD/C nicht temperatur-abhängig produziert wird (Horne and Pruss, 2006). Dieser Klasse 1-Regulator ist in Gram-negativen Bakterien konserviert, wie in *E. coli* und *Y. enterocolitica* untersucht worden ist (Chilcott and Hughes, 2000). FlhD/C bildet in aktivierter Form Heterotetramere, die an die US-Region der Klasse-2-Gene binden (Liu and Matsumura, 1994, Chilcott and Hughes, 2000). Zu den Klasse-2-Proteinen zählen der wichtige Sigmafaktor FliA, sein Regulator der Anti-FliA-Faktor FlgM und auch Strukturproteine der Flagellenmaschinerie, wie der Basalkörper und das Hakenprotein (T3SS) (Chilcott and Hughes, 2000). FliA wird jedoch nicht ausschließlich durch FlhD/C reguliert, sondern auch durch Temperaturänderung der bakteriellen Umgebung (Kapatral et al., 1996, Horne and Pruss, 2006). Wie in Abschnitt 1.2. beschrieben, kann durch „envelope stress response“ (ESR) über den RpoE-Signalweg die Expression von *fliA* gesteigert werden (Zhang et al., 2015). FliA bindet als Sigmafaktor an den Promotor seines Operons (*fliA*, *flgM*). Über einen Rückkopplungsmechanismus durch Bindung von FlgM kann die Aktivität von FliA moduliert werden und damit auch die Operons der Klasse-3-Gene. Diese beinhalten die Gene der Flagellin-Untereinheiten sowie Motor- und Chemotaxis-Gene (Iriarte et al., 1995, Chilcott and Hughes, 2000, Bleves et al., 2002, Alberts, 2002b, Alberts, 2002a). Eine funktionstüchtige Flagelle besteht aus dem am Motorprotein-befindlichen Basalkörper (Basal Body), dem Haken und dem Filament, welches aus Flagellin-Untereinheiten aufgebaut ist. Der Basalkörper ist in der äußeren Membran verankert und mit dem Motorprotein (innere Membran) verbunden. An den Basalkörper bindet der

Flagellenhaken, der für den Transport (T3SS) der Flagellinproteine FleA, B und C benötigt wird (Fuchs, 2007b).

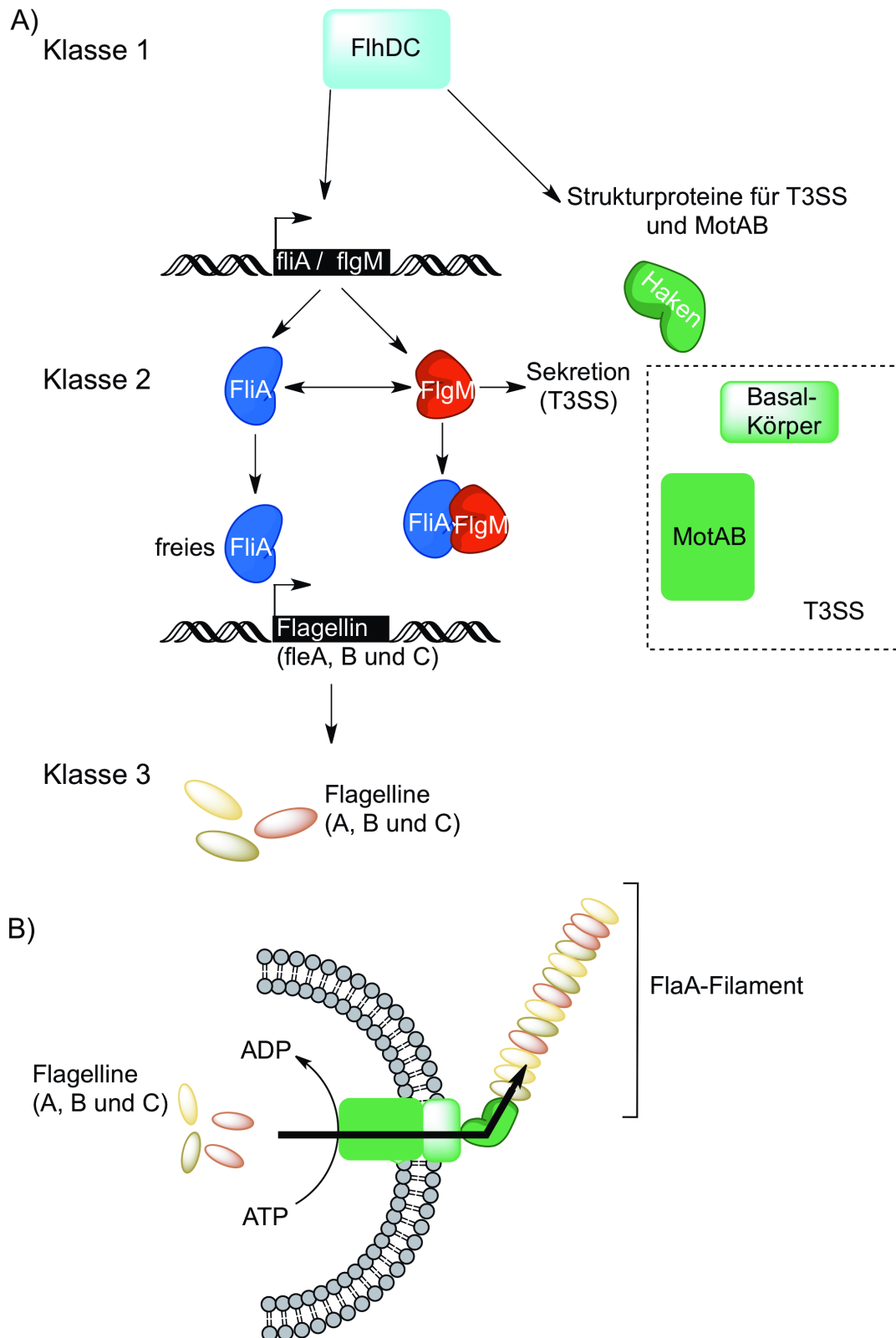


Abb. 5: A) Darstellung der Flagellenregulation durch die Klasse 1 und Klasse 2 Regulatoren, zu den Klasse 3 Proteinen als Flagellin-Einheiten. B) Schematische Darstellung der Verankerung der Flagelle (T3SS) in der Bakterienmembran und Verlängerung des Flagellen-Filamentes durch das T3SS. (Alberts, 2002b)

1.5. Zielsetzungen dieser Arbeit

Während der bakteriellen Infektion des Wirtes (Mensch, Nager u.a.) nehmen Bakterien die Veränderung in ihrer neuen Mikroumwelt wahr. Dabei müssen sie ihre Pathogenitätsmechanismen zum Überleben und Vermehren immer wieder neu an ihre Umgebung anpassen. Die Produktion der Virulenzfaktoren wird dabei auf transkriptioneller, posttranskriptioneller, translationeller und posttranslationeller Ebene beeinflusst. Die Analyse des genregulatorischen Netzwerkes ist nicht nur essenziell für das Verstehen der Infektionsbiologie dieser Erreger, sondern ermöglicht auch neue Strategien für Therapie, Diagnostik und Prävention von Infektionskrankheiten zu entwickeln.

Diese experimentelle Doktorarbeit befasst sich mit der posttranskriptionellen und posttranslationellen Regulation der Pathogenität von *Y. enterocolitica*.

Ein wichtiger posttranskriptioneller Regulator, der bereits seit einigen Jahren in unserer Arbeitsgruppe untersucht wird, ist das in Abschnitt 1.2.1.1. beschriebene RNA-Chaperon Hfq. Die Effekte, die Hfq auf die Virulenz von *Y. enterocolitica* hat, wurden bereits in Kakoschke et al. 2014 und Kakoschke et al. 2016 detailliert beschrieben. Hier wurde die Funktion von Hfq auf die Produktion von Virulenzfaktoren beschrieben und der Einfluss von Hfq auf die Adhäsion und Invasion mittels in-vivo-Experimenten dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass Hfq einen wesentlichen Einfluss auf das *Yersinia*-Wachstum hat. *Y. enterocolitica*-Mutanten, denen das Hfq fehlt, haben in vitro ein Wachstumsdefizit und erreichen früher die stationäre Phase (bei niedrigerer Zelldichte) als ihr Ausgangsstamm. Außerdem inhibiert Hfq die Produktion der Adhäsine Ail, OmpX und MyfA, die Produktion der Virulenzfaktoren YadA und InvA wird jedoch gefördert. Auch konnte gezeigt werden, dass Hfq sowohl den Kohlenhydrat-, Eisen- als auch Stickstoffstoffwechsel inhibiert. In der hier vorgelegten Doktorarbeit wird die Umwandlung von Tryptophan in Indol durch die Tryptophanase in *Y. enterocolitica* *hfq*-negativen Stämmen im Vergleich zum Ursprungstamm in einem Versuchsmodell unter zu Hilfenahme des Kovacs-Reagenz beschrieben. Unsere Arbeitsgruppe konnte die Ergebnisse bereits in Kakoschke et al. 2014 veröffentlichen. Auch wird in dieser Arbeit der Einfluss von äußerem Stress (ESR), im Sinne von pH-Wertänderungen und oxidativem Stress auf die Stressresistenz von *hfq*-negativen Stämmen im Vergleich zum Ursprungstamm untersucht. Auch diese Ergebnisse konnten in Kakoschke et al. 2014 veröffentlicht werden. Hfq ist eine wesentliche Regulatorkomponente der Stressresistenz. Eine weitere wichtige Untersuchung in dieser Arbeit war, ob Hfq einen Einfluss auf das Wachstum von *Y. enterocolitica* in der extrazellulären Matrix (EZM), hier im 3D-Kollagengel-Modell, hat und wie sich Hfq auf die Oberflächenbeschaffenheit der Yersinien in diesem Versuchsmodell auswirkt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden von unserer Arbeitsgruppe in Kakoschke et al. 2016 in Scientific Reports veröffentlicht.

Über die bereits publizierten Ergebnisse hinaus werden in der vorgelegten Arbeit noch nicht publizierte Ergebnisse zu der Funktion der regulatorischen sRNAs MicA, RybB und CyaR auf das Wachstumsverhalten sowie die posttranskriptionelle Regulation im Komplex mit Hfq auf die Expression der Adhäsine und Virulenzfaktoren in *Y. enterocolitica* untersucht. Primär werden hierfür Überexpressions- sowie Deletionsmutanten der o.g. sRNA generiert. Das Wachstumsverhalten in unterschiedlichen Nährmedien wird photometrisch untersucht. Um einen Effekt der posttranskriptionellen Regulatoren nachweisen zu können, werden Immunoblots von *Yersinia*-Zelllysaten und *Yersinia*-OMP-Proben untersucht. Zusätzlich wird die Expression der Gene für die Adhäsine und die Virulenzfaktoren mithilfe translationeller *gfp*-Fusionen (*green fluorescent protein-Gen*) unter Deletion von MicA getestet. Darüber hinaus wurde für MicA auch das Wachstumsverhalten in 3D-Kollagengelen untersucht (Mikrokoloniebildung, YadA-Produktion etc.).

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit posttranslationelle Effekte auf die quantitative Proteinproduktion überprüft. Anhand des in 1.2.2. beschriebenen bifunktionellen periplasmatischen Proteins DegP wird das Wachstum in verschiedenen Flüssigmedien sowie die Expression von Virulenzfaktoren und Adhäsinen mittels Immunoblot untersucht. Hierzu wird eine *degP*-Deletionsmutante generiert. Um eine Rückkopplung des periplasmatischen Chaperons DegP auf das RNA-Chaperon Hfq zu überprüfen, wird eine *degP-hfq*-Doppeldeletionsmutante generiert.

Auch die Motilität von *Yersinia* kann zur Virulenz beitragen (s. Abschnitt 1.4.): Die Flagellenbildung spielt eine wesentliche Rolle bei der Kontaktaufnahme der Bakterienzelle im Darmlumen. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss Hfq, MicA und DegP auf die Produktion der Flagellen haben. Hierzu wurden zunächst mittels Beweglichkeitsagar die Motilität von Wildtyp und Deletionsmutanten verglichen. Zusätzlich wurde die Produktion der Flagellen (s. Abbildung 5) mithilfe translationeller *gfp*-Fusionen (*green fluorescent protein-Gen*) geprüft. Außerdem sollte erarbeitet werden, auf welcher regulatorischen Stufe die Flagellenproduktion von Hfq, MicA und DegP abhängig ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

Die Tabellen 1 und 2 listen die in dieser Arbeit verwendeten *Y. enterocolitica*-Stämme und *E. coli*-Stämme auf.

Tabelle 1: *Y. enterocolitica* Serotyp O:8

Stamm	Ursprungsstamm	Referenz	Bekannter Phänotyp
JB580v	8081c	(Kinder et al., 1993)	O:8, pYV
JB580v (hfq::KanR) = SOR17	JB580v	(Kakoschke et al., 2014)	Kanamycin
JB580v (micA::CmR)	JB580v	diese Arbeit	Chloramphenicol
JB580v ΔdegP	JB580v	diese Arbeit	
JB580v (hfq::KanR ΔdegP)	JB580v (hfq::KanR)	diese Arbeit	Kanamycin
JB580v ΔfleABC	JB580V	Laborbestand	
JB580v pBAD	JB580v	diese Arbeit	Chloramphenicol
JB580v pBAD-rybB	JB580v	diese Arbeit	Chloramphenicol
JB580v pBAD-cyaR	JB580v	diese Arbeit	Chloramphenicol
JB580v pACYC184	JB580v	(Kakoschke et al., 2014)	Chloramphenicol
JB580v pAhfq	JB580v	(Kakoschke et al., 2014)	Chloramphenicol
WA-314	WA-314	(Heesemann and Laufs, 1983)	O:8, pYV, Mausletal
WA-314 (hfq::KanR) = SOR4	WA-314	(Kakoschke et al., 2014)	Kanamycin
WA-314 pACYC184	WA-314	(Kakoschke et al., 2014)	Chloramphenicol
WA-314 pAhfq	WA-314	(Kakoschke et al., 2014)	Chloramphenicol
JB580v pFX-0	JB580v	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v pFX-1	JB580v	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v pFX-yadA	JB580v	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v pFX-invA	JB580v	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v pFX-ail	JB580v	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v pFX-ompX	JB580v	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v pFX-ompA	JB580v	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v pFX-myfA	JB580v	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pFX-0	JB580v (hfq::KanR)	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pFX-1	JB580v (hfq::KanR)	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pFX-yadA	JB580v (hfq::KanR)	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pFX-invA	JB580v (hfq::KanR)	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pFX-ail	JB580v (hfq::KanR)	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pFX-ompX	JB580v (hfq::KanR)	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pFX-ompA	JB580v (hfq::KanR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pFX-myfA	JB580v (hfq::KanR)	(Kakoschke et al., 2016)	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pFX-0	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pFX-1	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pFX-yadA	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pFX-invA	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pFX-ail	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pFX-ompX	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pFX-ompA	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pFX-myfA	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin

JB580v pROBE	JB580v	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v pROBE-flhDC	JB580v	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v pROBE-fliA	JB580v	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v pROBE-fleA	JB580v	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v pROBE-fleB	JB580v	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR)pROBE	JB580v (hfq::KanR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pROBE-flhDC	JB580v (hfq::KanR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pROBE-fliA	JB580v (hfq::KanR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pROBE-fleA	JB580v (hfq::KanR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR) pROBE-fleB	JB580v (hfq::KanR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pROBE	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pROBE-flhDC	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pROBE-fliA	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pROBE-fleA	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (micA::CmR) pROBE-fleB	JB580v (micA::CmR)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v Δ degP pROBE	JB580v Δ degP	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v Δ degP pROBE-flhDC	JB580v Δ degP	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v Δ degP pROBE-fliA	JB580v Δ degP	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v Δ degP pROBE-fleA	JB580v Δ degP	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v Δ degP pROBE-fleB	JB580v Δ degP	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR Δ degP) pROBE	JB580v (hfq::KanR Δ degP)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR Δ degP) pROBE-flhDC	JB580v (hfq::KanR Δ degP)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR Δ degP) pROBE-fliA	JB580v (hfq::KanR Δ degP)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR Δ degP) pROBE-fleA	JB580v (hfq::KanR Δ degP)	diese Arbeit	Spectinomycin
JB580v (hfq::KanR Δ degP) pROBE-fleB	JB580v (hfq::KanR Δ degP)	diese Arbeit	Spectinomycin

Tabelle 2: *E. coli* – Stämme

Stamm	Referenz	Bekannter Phänotyp
DH5 α	(Hanahan, 1983)	
Top10	(Hanahan, 1983)	
<i>E. coli</i> β 2183	(Demarre et al., 2005)	DAP-abhängiges Wachstum (Δ dapA)

2.1.2. Plasmide

In dieser Arbeit verwendeten Plasmide werden in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Plasmidliste

Plasmid	Antibiotikaresistenz	Referenz
pACYC184	Chloramphenicol	New England Biolabs
pAhfq	Chloramphenicol	(Kakoschke et al., 2014)
pBAD	Chloramphenicol	(Guzman et al., 1995)
pBAD-rybB	Chloramphenicol	diese Arbeit
pBAD-cyaR	Chloramphenicol	diese Arbeit
pKD46	Ampicillin	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD3	Chloramphenicol	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD4	Kanamycin	(Datsenko and Wanner, 2000)
pFX-0	Spectinomycin	(Schmidtke et al., 2013)
pFX-1	Spectinomycin	(Schmidtke et al., 2013)
pFX-yadA	Spectinomycin	(Kakoschke et al., 2016)
pFX-invA	Spectinomycin	(Kakoschke et al., 2016)
pFX-ail	Spectinomycin	(Kakoschke et al., 2016)
pFX-ompX	Spectinomycin	(Kakoschke et al., 2016)
pFX-ompA	Spectinomycin	Laborbestand
pFX-myfA	Spectinomycin	(Kakoschke et al., 2016)
pROBE	Spectinomycin	(Miller et al., 2000)
pROBE-flhDC	Spectinomycin	Laborbestand
pROBE-fliA	Spectinomycin	Laborbestand
pROBE-fleA	Spectinomycin	Laborbestand
pROBE-fleB	Spectinomycin	Laborbestand
pROBE-fleC	Spectinomycin	Laborbestand
pSB890-degP-KO	Tetracyclin	(Weirich et al., 2017)

Die Klonierung von *rybB* und *cyaR* in die pBAD-Plasmide erfolgte durch PCR-Amplifikation der Gene mit Primern, deren flankierenden Regionen die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme tragen. Sowohl Plasmid als auch PCR Produkte wurden restriktionsverdaut (s. Tabelle 7), aufgereinigt und dann mittels Ligase ligiert. Die Plasmide wurden auf korrekte Insertion der Gene mittels Sequenzierung überprüft. pBAD trägt einen Arabinose-abhängigen Promotor. Durch Addition von Arabinose in das Nährmedium kann die Produktion von RybB und CyaR gesteuert werden. Ohne Arabinose im Nährmedium kommt es zu keiner Überexpression der oben genannten sRNAs. Die Plasmide für die Untersuchungen der Virulenzfaktoren in pFX (Translationsfusion) wurden mittels der Golden Gate Klonierungstechnik generiert (Engler et al., 2008, Kakoschke et al., 2016). Es wurde ein Bereich in das Plasmid hineinkloniert, der im 5'-UTR liegt, den Promoter und die RBS beinhaltet sowie 3 bis 16 Kodons des Proteins, welches im ORF mit dem *gfp*-Gen liegt (Kakoschke et al., 2016). Die Promotorregionen wurden aus der DNA des WA-314 Stammes amplifiziert. Der Promotor-Vektor pROBE-OT wurde für die Herstellung der Fusionsplasmide mit den Promotorregionen von *fleA*, *fleB*, *fleC*, *fliA* und *flhDC* mit dem promotorfreien *gfp*-Gen verwendet (Miller et al., 2000). Die Promotorregionen wurden aus der DNA des JB580v Stammes amplifiziert. Zum Restriktionsverdau wurde HindIII und BamHI verwendet. Die

Promotorregionen wurden in die HindIII/BamHI-Restriktionsschnittstelle des pROBE-OT dem *gfp* vorgeschaltet ligiert.

2.1.3. Antikörper

Antikörper dieser Arbeit sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Antikörperliste

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Referenz
anti-Ail (3C6)	Maus monoklonaler Antikörper	1:2000	(Kakoschke et al., 2016)
anti-flagellum	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen Flagellen der Yersinia-Serumgruppe O:8 und O:9	1:2000	Laborbestand
anti-InvA	Kaninchen polyklonaler Antikörper	1:2000	(Niefnecker, 2009)
anti-MyfA	Kaninchen polyklonaler Antikörper	1:2000	(Niefnecker, 2009)
anti-OmpA	Maus monoklonaler Antikörper	1:500	Laborbestand
anti-OmpX	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen OmpX von <i>E. coli</i>	1:5000	(Kakoschke et al., 2016)
anti-YadA (8D1)	Maus monoklonaler Antikörper	1:1000	(Roggenkamp et al., 1995)
anti-YadA	Kaninchen polyklonaler Antikörper	1:2000	(Heesemann et al., 1987)
anti-Kaninchen-HRP	Anti-Kaninchen IgG konjugiert mit HRP	1:20000	GE Healthcare
anti-Maus-HRP	Anti-Maus IgG konjugiert mit HRP	1:20000	GE Healthcare

2.1.4. Primer

In dieser Arbeit verwendete Primer werden in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Primerliste

Primer	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
OR20pKD46beta	CCTTTCCTGATAAGCAGAATG	zum Check pKD46 in Bakterien transformiert
OR21pKD46beta	AATCCAAGAGCTTTTACTGC	zum Check pKD46 in Bakterien transformiert
OR33 yscC-pYV fwd	ACCGCGAAACCTTATGTCAC	ca. 2 kb mit OR34 – pYV Plasmid Kontrolle
OR34 yscC-pYV rev	AAACCCTACTTCCAGACAAG	ca. 2 kb mit OR33 – pYV Plasmid Kontrolle
OR46-pBAD cln fwd	GGAGAAACAGTAGAGAGTTGC	Zum Klonieren von sRNA in pBAD24, Zur Amplifikation des Vektors
OR47-pBAD cln rev	TTTTTCTAGATTAATCAGAACGCAGA	Zum Klonieren von sRNA in pBAD24, Zur Amplifikation des Vektors
OR48-pBAD fwd	ATGCCATAGCATTTTTATCC	Amplifiziert 232 bp im leeren Vektor, amplifiziert 306 bp mit <i>cyaR</i> im Vektor, amplifiziert 274 bp mit <i>rybB</i> im Vektor mit OR49 – Kontrollprimer
OR49-pBAD rev	TTATCAGACCGCTTCTGC	Amplifiziert 232 bp im leeren Vektor, amplifiziert 306 bp mit <i>cyaR</i> im Vektor, amplifiziert 274 bp mit <i>rybB</i> im Vektor mit OR48 – Kontrollprimer
OR50 <i>cyaR</i> fwd pBAD	Ph- GTACAATCAAGAACTAAAAAAG	Amplifiziert 203 bp mit OR51; 5'-phosphoryliert zur besseren Enzymzugänglichkeit

OR51 <i>cyaR</i> rev pBAD	GTTATTTCTAGAGTGGGCTATTTGTG	XbaI- Restriktionsenzymbindesequenz, amplifiziert 203 bp mit OR50
OR54- <i>rybB</i> fwd pBAD	Ph- GCCACTGCTTTTCTTTGA	Amplifiziert 167 bp mit OR55; 5'-phosphoryliert zur besseren Enzymzugänglichkeit
OR55- <i>rybB</i> rev pBAD	GTTTTTCTAGAGCAGAAGTAGTGATG	XbaI- Restriktionsenzymbindesequenz, amplifiziert 167 bp mit
OR175 <i>degP</i> fwd	TTTGGTCTCTATTCTCTGATTATTGGTTCT CTGA	Amplifiziert 1888 bp mit OR 288 – DegP Amplifikation
OR177 pFX fwd	CCATGCTCAGAAAAGGCTTAACA	Amplifiziert 779 bp mit OR 178
OR178 pFX rev	CCGTATGTAGCATCACCTTCA	Amplifiziert 779 bp mit OR
OR191- <i>micA</i> fwd pBAD	Ph-TGAAAGACGCGCATTGTATC	Amplifiziert 200 bp mit OR192, 5'-phosphoryliert zur besseren Enzymzugänglichkeit
OR192 <i>micA</i> rev pBAD	CCGTCTAGAATTGCTAACTGAAGAG	XbaI- Restriktionsenzymbindesequenz, amplifiziert 200 bp mit OR191, amplifiziert 235 bp mit OR232
OR222 <i>rybB</i> -del fwd	TAAACATTTTTTAAAGCTTTTTTCATTTGCC CAGAACTTTCTTACTGGACGTGTAGGCTG GAGCTGCTTC	Amplifiziert 1114 bp mit OR223 – Deletion von <i>rybB</i>
OR223 <i>rybB</i> -del rev	TAATTTGTCTTAAGAAAGCCTTAAGGGG GAGGGATGGGGCTTGAATTTCCATATGAA TATCCTCCTTAG	Amplifiziert 1114 bp mit OR222 – Deletion von <i>rybB</i>
OR224 <i>micA</i> -del fwd	TTTTTTCGCAACTCATGAACTTTTTGGT ATCCCGCACGTCTTAATATGGTGTAGGCT GGAGCTGCTTC	Amplifiziert 1115bp mit OR225 – Deletion von <i>micA</i>
OR225 <i>micA</i> -del rev	GATAAGCTAAGCTTTGAAGAGTATTTGGC ACTACACGGCGGCCAATAAAACCATATGA ATATCCTCCTTA	amplifiziert 1115bp mit OR224 – Deletion von <i>micA</i>
OR232 <i>micA</i> fwd	GGTATGGTCTACGGTAAAGC	Amplifiziert 235 bp mit OR192
OR244 <i>rybB</i> fwd	CTCGCAGTAATATCCAGC	Amplifiziert 375 bp mit OR245
OR245 <i>rybB</i> rev	GCCTGGAGCAGAAGTAGTG	Amplifiziert 375 bp mit
OR288 <i>degP</i> rev (bra)	CAATTGCGCCAACAACTGACGTACAAG	Amplifiziert 1888 bp mit OR175 – DegP- Amplifikation

2.1.5. Chemikalien und Enzyme

Tabelle 6 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien. In Tabelle 7 sind die verwendeten Enzyme gelistet.

Tabelle 6: Chemikalienliste

Substanz	Summenformel	Hersteller	CAS-Nr. / Bestell-Nr.
Acrylamid	C ₃ H ₅ NO	PanReac-AppliChem	79-06-1
Agar		BD Bioscience	21-40-10
Agarose	C ₁₂ H ₁₈ O ₉	Serva Electrophoresis GmbH	9012-36-6
Ammoniak	NH ₃	Sigma Aldrich	7664-41-7
Ammoniummolybdat	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	Roth	12054-85-2
APS	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Merck	7727-54-0

Arabinose	$C_5H_{10}O_5$	Roth	147-81-9
ATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	ThermoScientific	56-65-5
β -Mercaptoethanol	C_2H_6OS	ThermoScientific	60-24-2
Bromphenol Blau	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Roth	115-39-9
Coomassie Brilliant Blue R-250	$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	ThermoScientific	6104-59-2
DAP (2,6-Diaminopimelinsäure)	$C_7H_{14}N_2O_4$	Sigma Aldrich	583-93-7
D-Glukose	$C_6H_{12}O_6$	Merck	50-99-7
Dinatriumcarbonat	Na_2CO_3	Sigma Aldrich	497-19-8
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Merck	7558-79-4
dNTPs		ThermoScientific	R0193
Doppelt destilliertes Wasser	H_2O_{dd}		
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Biomol	60-00-4
Eisensulfat Heptahydrat	$FeSO_4 \times 7 H_2O$	Fluka	7782-63-0
Essigsäure	$C_2H_4O_2$	Roth	64-19-7
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma Aldrich	1239-45-8
Fludioxonil	$C_{12}H_6F_2N_2O_2$	Sigma Aldrich	131341-86-1
Formaldehyd	CH_2O	Sigma Aldrich	50-00-0
Glycerol/Glycerin	$C_3H_8O_3$	Roth	56-81-5
Glycin	$C_2H_5NO_2$	Roth	56-40-6
Hefe Extrakt		MP Biomedical	0210330391
Indol	C_8H_7N	Sigma Aldrich	120-72-9
Isopropanol	C_3H_8O	Sigma Aldrich	67-63-0
Kaliumchloride	KCl	Merck	7447-40-7
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck	7778-77-0
Kaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	Merck	7758-11-4
Kaliumhydroxid	KOH	Merck	1310-58-3
Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	$C_4H_4KNaO_6$	Sigma Aldrich	6381-59-5
Kalziumchlorid Dihydrat	$CaCl_2 \times 2 H_2O$	Merck	10035-04-8
Kollagen-Lösung		Advanced Biomatrix	5005
Kovacs Reagenz (Dimethylaminobenzaldehyd)	$C_9H_{11}NO$	Sigma Aldrich	100-10-7
Kupfersulfat Pentahydrat	$CuSO_4 \times 5 H_2O$	Sigma Aldrich	7758-99-8

Magnesiumchlorid Tetrahydrat	$\text{MgCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	Fluka	7791-18-6
Magnesiumsulfat Heptahydrat	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich	10034-99-8
Manganchlorid	MnCl_2	Sigma Aldrich	7773-01-5
MEM (Minimal essential Medium)		Gibco™	15303571
meta-Periodsäure	HIO_4	ThermoScientific	10450-60-9
Milchpulver		Roth	T145.3
MOPS	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$	Sigma Aldrich	1132-61-2
Natriumbicarbonat	NaHCO_3	Sigma Aldrich	144-55-8
Natriumchloride	NaCl	Roth	7647-14-5
Natriumzitat Dihydrat	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	Merck	68-04-2
Natriumnitrat	NaNO_3	Merck	7631-99-4
Natron	NaOH	PanReac-AppliChem	1310-73-2
Rubidiumchlorid	RbCl	Roth	7791-11-9
Salzsäure	HCl	Roth	7647-01-0
SDS	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{24}\text{SO}_4$	Roth	151-21-3
Silbernitrat	AgNO_3	Roth	7761-88-8
TEMED	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$	Roth	110-18-9
Trichloressigsäure (TCA)	$\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$	Sigma-Aldrich	76-03-9
2,2,2-Trichlorethanol	$\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}$	Merck	115-20-8
Tris	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	MP Biomedical	1185-53-1
Trypton		Roth	91079-40-2
Tween (Polysorbat 20)	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	Roth	9005-64-5
Zinksulfat Heptahydrat	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	Merck	7446-20-0

Tabelle 7: Enzymliste

Enzym		Hersteller	Bestell-Nr.
Fast AP	Phosphorylase	ThermoScientific	EF0651
XbaI	Restriktionsendonuklease	ThermoScientific	ER0685
DpnI	Restriktionsendonuklease	ThermoScientific	ER1705
T4-Ligase	T4-DNA-Ligase	Invitrogen	15224025
T4-DNA-Polymerase	DNA-Polymerase	Invitrogen	EP0061
Dream Taq	DNA-Polymerase	ThermoScientific	EP0701
RedTaq	DNA-Polymerase	Sigma	D4309
Pfu	Proofreading DNA-Polymerase	ThermoScientific	EP0501
HighFidelity Taq	Proofreading DNA-Polymerase	ThermoScientific	K0191

2.1.6. Kits

Kommerziell erworbene Kits, welche verwendet wurden, sind in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Kit-Liste

Kits	Hersteller	Bestell-Nr.
GeneJet Genomic DNA Purification Kit	Fermentas/ ThermoFisher Scientific	K0721
NucleoSnap ^R Plasmid Midi	Macherey Nagel	740494.50
NucleoSpin ^R Plasmid EasyPure	Macherey Nagel	740727.50
Pure Yield TM Plasmid Midiprep System	Promega	A2495
Pure Yield TM Miniprep System	Promega	A1222
Wizard ^R SV Gel and PCR Clean-up System	Promega	A9282

2.1.7. Kulturmedien

Kulturmedien wurden unter folgenden Bedingungen für 20 min autoklaviert: 121 °C und 1 bar.

Luria-Bertani Medium (LB):

10 g Trypton

10 g NaCl

5 g Hefe Extrakt

ad 1l H₂O_{ddest}

Für Agarplatten wurde eine Endkonzentration von 1,5% Agar verwendet. Dies entspricht 15 g Agar pro Liter Medium.

Brain-Heart-Infusion Medium (BHI):

BHI-Pulver BD, Heidelberg

Für Agarplatten wurde eine Endkonzentration von 1,5% Agar angestrebt. Dies entspricht 15 g Agar pro Liter Medium.

RPMI-Zellkulturmedium:

(Simulation von in vivo Infektionsbedingungen)

RPMI 1640 Phenolrot, ohne Glukose Gibco™ Katalog-Nr. 88365

RPMI 1640 ohne Phenolrot und Glukose Gibco™ Katalog-Nr. A2494201

2.1.8. Biologische Marker/ Antibiotika

Verwendete Antibiotika.

Tabelle 9: Antibiotikalist

Antibiotika		Endkonzentration
Ampicillin	Amp	100 µg/ml
Carbenicillin	Carb	300 µg/ml
Choramphenicol	Cm	20 µg/ml
Kanamycin	Kan	50 µg/ml
Spektinomycin	Spec	100 µg/ml
Tetrazyklin	Tet	6 µg/ml

Der *E. coli* Stamm β 2183 (Δ dapA) hat einen DAP-Biosynthesedefekt und benötigt für sein Wachstum den Zusatz von DAP in einer Endkonzentration von 0,3 mM (Demarre et al., 2005).

2.1.9. Puffer

Kommerziell erworbene Pufferlösungen.

Tabelle 10: kommerziell erworbene Enzym-Puffer

Puffer	Hersteller	Bestell-Nr.
TangoPuffer 10 x *	ThermoScientific	B30
T4-Polymerase Puffer 10 x	ThermoScientific	B69
T4-Ligase Puffer 10 x	ThermoScientific	B70

* Verwendung beim Restriktionsverdau bei Klonierungsexperimenten

2.1.10. Computerprogramme/ Statistische Analysen

Verwendete Computerprogramme für Bioinformatik, Auswertung und Erarbeitung dieser Dissertationsschrift.

Tabelle 11: Computerprogramme

Software	Version	Software Producer
BD-FACS Diva Software	v6.1.2.	BD Bioscience
BioChemDraw Ultra	12.0.3.1216	CambridgeSoft
CLC DNA Workbench	6.0.2	CLC Bio
GraphPad Prism	5.01	GraphPad Software
ImageLab		BioRad Software
Leica LAS-AF	TCS-SP5-II	Leica Microsystems
Word 2008	12.3.6 (130206)	Microsoft
Excel 2008	12.3.6 (130206)	Microsoft

Statistische Analysen der Messdaten für Mittelwerte und Signifikanz (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns = nicht signifikant) wurden in der Regel von 3 oder mehr unabhängigen Experimenten für die Abbildungen 15-16, 18, 20, 22, 24, 43 und 45-46 mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt und Signifikanzwerte mittels „student unpaired t-test“ ermittelt (Kakoschke et al., 2014, Kakoschke et al., 2016). Relative densitometrische Proteinbestimmungen in Prozent (%) der Immunoblotexperimente wurden mit dem Normalisation-Tool des ImageLab Programmes kalkuliert (Kakoschke et al., 2016).

2.1.11. Webseiten und Internetprogramme

Die Literaturrecherche erfolgte über PubMed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Als Genomdatenbanken für den *Y. enterocolitica* Stamm 8081 dienen:

- NCBI Genom Datenbank https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_008800.1
- KEGG Genome https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=yen (Kanehisa et al., 2016)

Für die Kalkulation der Interaktionen der sRNAs mit den mRNAs und deren Promotorregionen wurde das Online-Programm IntaRNA (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp>) der Universität Freiburg verwendet (Busch et al., 2008, Wright et al., 2014, Mann et al., 2017, Raden et al., 2018).

2.1.12. Geräte und Zubehör

In folgenden Tabellen 12 und 13 sind in dieser Arbeit verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial aufgelistet.

Tabelle 12: Geräteliste

Gerät	Design	Hersteller
Blot-Gerät	Semidry-Blot Owl Hep 3 Semidry-Blotter	ThermoScientific Carl Roth
ChemiDoc MP CLARIOstar	MicroPlate Reader/ Photometer mit Thermostat	BioRad BMG Labtech
Elektrophoresekammer für DNA	miniRapide	OLS
Elektrophoresekammer für SDS	Mini-Protean Mini-Protean Tetra-Cell	BioRad
Elektroporationsgerät	GenePulser II	BioRad
FACS-Gerät	BD FACS Cantoll	BD Bioscience
Feinwaage	Fine Balance	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Sp5	Leica
Gefrierschrank	So-Low -80 Degree Chest Lab Freezer Econimic	TempPure Scientific BOSCH
Heizplatte	MR 3001 K	Heidolph
Inkubator	B6	Heraeus Instruments
Kühlschrank	Profiline	Liebherr
Kühlzentrifuge	3-30 K 6K 15	SIGMA SIGMA
Mikrowelle	Multiwave	LG
Nano drop	ND-1000	Thermo Scientific
PCR-Cycler	Personal Cycler T3 Thermocycler	Biometra Biometra
Photometer	Ultrospec 3100 pro	Ambesham Bioscience
Pipetten	Pipetman P10 – P1000 Research 10-1000 µl	Gilson Eppendorf
Pipettor	AccuJet	Brand
Sonifier 250	Model 450	Branson Ultrasonic
Sterilbank	UVF 6.18S UVF 6.15 S Herasafe HSP18	BKD BKD Heraeus Instruments
Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge	541R	Eppendorf
Tischzentrifuge	5402	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Optima TL 1000	Beckman
Vortexer	Vortex-Genie 2 REAX 2000	Scientific Industries Heidolph
Waage	PCB	Kern
Wasserbad		

Tabelle 13: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
10 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
100 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
1000 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
1 ml Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf
2 ml Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf
15 mL Falcon	Greiner
50 mL Falcon	Greiner
5 mL Einmalpipetten (steril)	Sarstedt
10 mL Einmalpipetten (steril)	Sarstedt

25 mL Einmalpipetten (steril)	Sarstedt
24-Well Platte	TPP
95-Well Platte	TPP
Breathe Easy Folie	Sigma Aldrich
Deckgläser	Hecht Karl
Elektroporationsküvetten	BioRad
μ-Slide 8-Well	Ibidi
Objektträger	ThermoScientific
Petrischalen	MP Biomedicals
Plastikküvetten	Greiner
PVDF-Membran	Carl Roth
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman

2.2. Methoden

2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion

Zur in vitro Amplifikation bestimmter Gene oder DNA-Abschnitte dient die Methode der PCR. Hierfür werden eine Template-DNA, Primer, dNTPs und eine DNA-Polymerase benötigt.

Die PCR diente in dieser Arbeit als eine Methode zur Amplifikation von Klonierungsprodukten, als auch zur Überprüfung der hergestellten Mutanten.

Durch einen Denaturierungsschritt bei 95°C wird der DNA-Doppelstrang getrennt, sodass zwei DNA-Einzelstränge entstehen. An die einzelsträngige DNA können komplementäre Primer spezifisch binden. Hierfür wird ebenfalls eine spezifische Temperatur, die „Annealing“-Temperatur, benötigt. Die DNA-Polymerase bindet an das 3'-Ende des hybridisierten Primers und synthetisiert den Tochterstrang. Dieser Schritt findet typischerweise zwischen 68°C und 72°C statt, bei der die jeweilig verwendete DNA-Polymerase ihr Temperaturoptimum hat.

Es folgt die zyklische Wiederholung der Teilschritte (Dissoziation – Hybridisierung – Assoziation) zwischen 25- und 35-mal. Tabelle 14 zeigt die PCR-Bedingungen für die RedTaq-Polymerase, Tabelle 15 für die HighFidelity-Polymerase auf.

Tabelle 14: PCR-Bedingungen für RedTaq-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	4 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	25-30
Annealing	zw. 52 und 58 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1000 bp/ min	
Terminale Elongation	72 °C	5 min	1
Ende	4 °C		1

Tabelle 15: PCR Bedingungen für HighFidelity-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	4 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	30-35
Annealing	zw. 52 und 58 °C	30 sec	
Elongation	70 °C	1000 bp/ min	
Terminale Elongation	70 °C	5 min	1
Ende	4 °C		1

Für die Klonierungs- und Deletionsexperimente wurde die HighFidelity-Polymerase verwendet. Sie verfügt über eine „Proofreading“-Funktion und baut somit weniger Fehler in die Amplifikate ein. Für Kontroll-PCRs wurde die RedTaq-Polymerase verwendet.

Die Reaktionsgemische wurden nach den Angaben der jeweiligen Hersteller hergestellt.

2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung und Darstellung der DNA-Fragmente. In dieser Arbeit wurden 1%-Agarosegele verwendet. An die ca. 10 cm langen Gele wurde für 30-45 min eine Spannung von 120 V angelegt. Aufgrund der Phosphatgruppen verhält sich DNA im elektrischen Feld als Anion und wandert zum positiven Pol (Anode). Im Agarose-Netzwerk kann die DNA dann der Größe nach aufgetrennt werden, d.h. große Fragmente wandern weniger schnell als kleinere.

Nach der Auftrennung der DNA wurden die Gele in einem Ethidiumbromid-Bad (EtBr) gefärbt. EtBr kann in die DNA interkalieren, wobei es zu einer 100-fachen Fluoreszenzverstärkung nach Anregung kommt und damit die DNA-Fragmente im Gel unter UV-Licht sichtbar werden.

Die Konzentration der EtBr-Färbelösung lag bei 10 µg/ml. Die Gele wurden ca. 30 min darin gefärbt. Die Geldokumentation erfolgte mittels UV-Illuminator.

50x-TAE-Puffer:

Tris	2 M
EDTA	0,05 M
Essigsäure	1M
ad 1 l H ₂ O _{dd}	

1%-Agarosegel:

Agarose	1g
ad 100 ml 1xTAE-Puffer	

6x-Loading Dye:

Bromphenolblau	2%
Glycerol	4,1 M
1xTAE-Puffer	70%

DNA-Leiter – **1kb-GeneRuler von ThermoScientific**

Katalog-No.	SM1333
-------------	--------

2.2.3. Aufreinigung genomischer DNA

Genomische DNA aus *Yersinia* wurde mithilfe des GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit extrahiert, dem Protokoll für Gram-negative Bakterien folgend. Die so isolierte DNA wurde für die Klonierungen und Deletionsversuche verwendet und zur Sequenzierung der Firma LGCgenomics geschickt.

2.2.4. Klonierung von Genen mittels geeigneter Vektoren

Ligationen wurden für die Genklonierungen mit den in Tabelle 3 gelisteten Vektoren durchgeführt. In Tabelle 16 ist die Zusammensetzung des „Ligation-Mix“ aufgelistet.

Tabelle 16: Reaktionsmischung für Ligationsexperimente

Mastermix für die Ligation des Vektors	
2 µl	10x T4-Ligation Puffer
1 µl	ATP
1 µl	T4-Ligase
5 µl	PCR Produkt
3 µl	Vektor
8 µl	Ampuwa-H ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

Alle Ligationen wurden bei 16°C über Nacht durchgeführt. Danach wurde die Ligase bei 70°C für 5 min inaktiviert. Die Ligationen konnten bei -20°C gelagert werden.

2.2.5. Künstlich induzierte Kompetenz und Transformation

Gram-negative Bakterien können für die DNA-Aufnahme und Replikation kompetent gemacht werden. In dieser Arbeit wurde für *Y. enterocolitica* die Elektroschockmethode und für *E. coli* die Calcium/Rubidium-Hitzeschocktransformationsmethode verwendet.

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden die benötigten Yersinien-Stämme bzw. die *E. coli*-Stämme DH5α und TOP10 auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 27°C bzw. 37°C über Nacht inkubiert. Für die Vorkulturen in Flüssigmedium wurden 20 ml LB mit den Bakterien beimpft und über Nacht bei 27°C (*Y. enterocolitica*) bzw. 37°C (*E. coli*) auf einem Schüttler inkubiert.

Eine Hauptkultur von 400 ml LB-Flüssigmedium wurde ausgehend von den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Die Bakterien wuchsen 3 – 4 h bei 27°C bzw. 37°C bis eine OD₆₀₀ der Kultur von ca. 0,5 erreicht wurde. Alle weiteren Schritte wurden entweder auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

Die Bakterienkulturen wurden in vorgekühlte, sterile 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und in einer Kühlzentrifuge bei 6 000 rpm für 20 min abzentrifugiert.

2.2.5.1. Elektrokompente Yersinien

Bei der Herstellung elektrokompenter *Y. enterocolitica* Stämme wurde das gewonnene Bakterienpellet mit 50 ml gekühlter 10% Glycerollösung gewaschen und bei 6 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Danach wurden die Bakterien in 1 ml 10%-igen Glycerol resuspendiert und in sterile Eppendorf-Röhrchen auf 80 µl aliquotiert. In flüssigem Stickstoff wurden die Zellen schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5.2. Calcium-Rubidium-induzierte Kompetenz von *E. coli*

Bei der Herstellung chemisch-induzierter Kompetenz wurde das gewonnene Bakterienpellet in 80 ml Transformationspuffer I resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut bei 6 000 rpm für 10 min zentrifugiert. In 8 ml Transformationspuffer II wurde das Pellet aufgenommen und die Suspension in sterilen vorgekühlten Eppendorf-*tubes* auf 100 µl aliquotiert. In flüssigem Stickstoff wurden die Zellen schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer für die Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli*:

Transformationspuffer I:

30 mM	Kaliumacetat	
100 mM	Rubidiumchlorid	
10 mM	Kalziumchlorid	
50 mM	Manganchlorid	
15 %	Glycerol	pH 5,8

Transformationspuffer II:

10 mM	MOPS-Natriumsalz	
75 mM	Kalziumchlorid	
10 mM	Rubidiumchlorid	
15 %	Glycerol	pH 6,5

2.2.5.3. Elektrotransformation (*Y. enterocolitica*)

Die elektrokompenten Bakterien wurden auf Eis mit 1-2 µl Plasmid-DNA für 10 min inkubiert und anschließend in Elektroporationsküvetten überführt. In der Elektroporationskammer wurde ein Impuls mit einer Spannung von 2500 V (25µF und 200 Ω) gesetzt. Gleich darauf wurde 1 ml LB zu den Bakterien gegeben und diese Suspension wurde in ein steriles Eppendorf-Röhrchen transferiert.

Ein Inkubationsschritt bei 37°C für 1 h auf einem Thermomixer bei 350 rpm folgte. Die Bakterien wurden daraufhin abzentrifugiert und von überflüssigem Überstand befreit. Die Bakterien wurden auf Agarplatten, die den Resistenzmarker Ampicillin (10 µg/ml) beinhalteten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.5.4. Hitzeschocktransformation (*E. coli*)

Bei der Hitzeschocktransformation wurden die *E. coli* mit 5-10 µl DNA für 20 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte der Hitzeschock bei 42°C für 1,5 min. Die Bakterien wurden anschließend sofort wieder im Eis für 2 min inkubiert. 1 ml LB wurde zu der

Bakteriensuspension gegeben und diese für 1 h bei 37°C und 350 rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Bakterien wurden auf Agarplatten mit Ampicillin (10 µg/ml), als Selektion für Plasmide, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die oben beschriebenen Transformationsmethoden wurde als Positivkontrolle, der Klonierungsvektor und als negativ Kontrolle Puffer mitgeführt um die Effizienz der Transformation zu prüfen und Kontaminationen auszuschließen.

2.2.6. Herstellung der Deletionsmutanten in *Y. enterocolitica* über allelen Genaustausch

2.2.6.1. Lambda-Red Methode

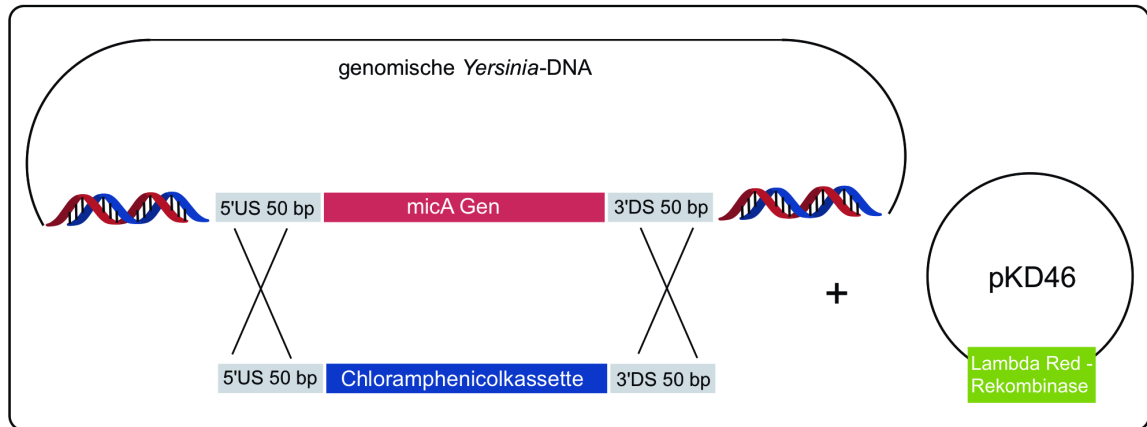
Die Lambda-Red Methode zur Herstellung von genomischen *Yersinia*-Deletionsmutanten wurde modifiziert nach Datsenko et al. 2000 durchgeführt (Genaustausch mittels homologer Rekombination). In den Ausgangsstamm, JB580v, wurde das pKD46 Plasmid transformiert. Dieses Plasmid trägt die λ -red Rekombinase (s. Abb. 6). In den Ausgangsstamm – JB580v (pKD46) – wurden die PCR-Amplifikate, die Resistenzkassetten tragen, aus den pKD3 und pKD4, welche mit „Up-stream“ und „Down-stream“ flankierenden Primern hergestellt wurden, transformiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 27°C für 1h im Schüttler inkubiert und danach übernacht bei RT (21°C) ohne Schütteln belassen. Die Bakterien wurden daraufhin abzentrifugiert und auf einer LB-Agarplatte mit Chloramphenicol (pKD3) oder Kanamycin (pKD4) bei 27°C inkubiert. Die sichtbaren Kolonien wurden auf frische LB-Platten ausgestrichen zwecks Reinigung und erneut übernacht bei 27°C inkubiert. Danach wurden Einzelkolonien mittels PCR-Primern auf inserierte DNA-Fragmente überprüft, die in Nachbarschaft der Klonierungsregion liegen, ob es zur Deletion des Zielgens kam. Auch wurde auf Verlust des pKD46 mittels PCR getestet.

2.2.6.2. Suizidvektor Methode

Die Deletionsmethode mittels Suizidvektor wurde nach Weirich et al., 2017 durchgeführt. Der verwendete Vektor pSB-*degP*-KO wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Weirich zur Verfügung gestellt und trägt eine Tetrazyklinresistenzkassette (TetR) und ein Levansucrase-Gen (*sacB*), welche ein toxisches Metabolit (Levane) durch die Metabolisierung von Saccharose produziert (Kaniga et al., 1991, Weirich et al., 2017). Im Periplasma der Bakterien wird Saccharose hydrolysiert und es kommt zum Transfer von Fruktosylgruppen an die Saccharose, welche zusätzlich zu Tri- oder Tetrasacchariden polymerisiert. Dieses Produkt hat eine toxische Wirkung auf Gram-negative Bakterien. Dies

kann man sich bei der Selektion des Plasmids in der Mutanten zu Nutze machen (Hapfelmeier et al., 2004).

Ausgangsstamm (JB580v)



Mutante (JB580v(micA::CmR))

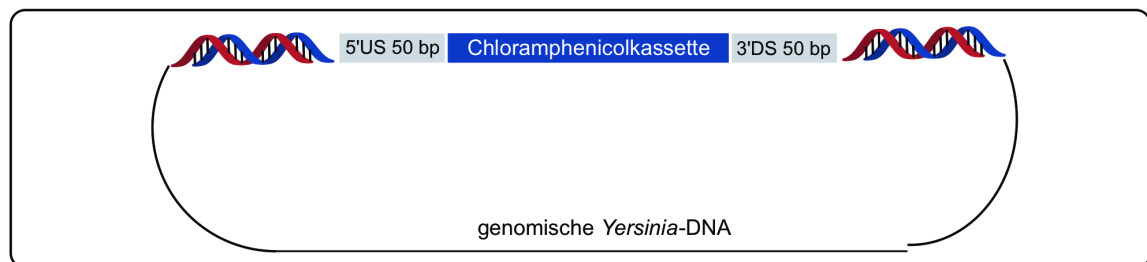


Abb. 6: Schematische Darstellung des allelen Austausches des *micA*-Gens durch ein Chloramphenicolresistenzgen mittels der Lambda-Red Methode

Das Suizidplasmid wurde in den *E. coli*-Stamm E.c. β 2163 (Δ *dapA*) transformiert. Der Stamm E.c. β 2163 kann nur mit 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) im Medium vital bleiben. Vorkulturen von E.c. β 2163 pSB-*degP*(TetR) wurden mit Vorkulturen der *Yersinia*-Stämme JB580v und JB580v(*hfq*::KanR) konjugiert. In diesem Schritt kommt es zur Deletion des *degP*-Gens in *Yersinia*. Darauf wurde die Bakterienmischsuspension auf LB-Agar plus DAP ausplattiert und bei 27°C über Nacht inkubiert.

Der entstandene Bakterienrasen wurde in 1ml LB resuspendiert und hiervon jeweils 100 μ l auf LB-Agar mit Tetrazyklin ausplattiert und übernacht bei 27°C inkubiert. Da ab diesem Schritt kein DAP den Medien mehr beigefügt wurde, kommt es zum Absterben der *E. coli* und somit sind in den weiterführenden Schritten ausschließlich *Yersinia*-Stämme vorhanden. Darauf wurden einzelne Kolonien isoliert und auf LB-Agar mit Tetrazyklin und Tetrazyklin/10% Saccharose ausgestrichen. Nur Klone, die ausschließlich auf den Tetrazyklinplatten gewachsen sind, wurden in 5 ml LB über Nacht bei 27°C inkubiert. Darauf wurden 100 μ l auf LB-Agar ausgestrichen.

Die Kolonien wurden mittels PCR auf die Deletion von *degP* kontrolliert. In dieser Arbeit wurde das Pendant der $\Delta degP$ -Mutante aus WA-314 von Weirich et al., 2017 in dem Ausgangsstamm JB580v und JB580v(*hfq::KanR*) hergestellt (s. Tabelle 1).

2.2.7. Wachstumsversuche

2.2.7.1. Photometer-Messung

Die Vorkulturen der benötigten *Yersinia* Stämme wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt in Triplikaten in je 50 ml LB-Flüssigmedium. Die Proben wurden im Schüttelinkubator bei 27°C und 37°C je 24 h inkubiert. Zunächst stündlich wurde je eine Probe entnommen und mittels einer photometrischen Messung bei OD₆₀₀ gemessen. Sobald die stationäre Phase erreicht wurde (OD₆₀₀ = 1) konnten die Messung alle 5 h durchgeführt werden. Die Proben kamen nach OD₆₀₀-Beurteilung sofort wieder in den Inkubator.

2.2.7.2. „Microplatereader“-Messung

Die Vorkulturen der benötigten *Yersinia*-Stämme wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Die Proben wurden in Triplikaten je 100 µl in 96-Mikrotiterplatten überführt.

Die Platten wurden mit einer luftdurchlässigen Folie (Breathe easy) abgedeckt und dann für 24 h bei 27°C oder 37°C in den CLARIOstar (Inkubator s. Tabelle 12) zur kontinuierlichen Messung der OD₆₀₀ gestellt. Die Messungen erfolgten alle 30 min mit regelmäßigem Schütteln der Platten im Intervall im Inkubator.

2.2.8. 3D-Kollagengelexperiment

Um das extrazelluläre Wachstum von *Y. enterocolitica* unter Infektionsbedingungen zu simulieren, wurden 3D-Kollagengele (3D-KoG) verwendet. Das Protokoll für die 3D-KoG wurden nach Freund et al., 2008 und Guggenberger et al., 2012 durchgeführt.

Die Vorkulturen der verwendeten Stämme wurden 1:10 in 20 ml LB-Nährmedium verdünnt und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Darauf wurde die Kultur abzentrifugiert und das Sediment in PBS einmal gewaschen und resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden photometrisch auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt. Für den Kollagenmix wurden 5 µl Natriumbicarbonat, 10 µl MEM und 75 µl Kollagen (1,78 mg/ml) mit 1 µl der o.g. Bakteriensuspension vermischt. Dieser 3D-KoG-Mix je Bakterienstamm wird in µ-Slide-Ibidi (4 Kammern auf Glasobjektträgern) pipettiert und darauf für 45 min bei 37°C und 5% CO₂ zur Gelierung inkubiert. Nachdem das 3D-KoG polymerisiert war, wurden die Kammern mit RPMI-Zellkulturmedium aufgefüllt bei 37°C und 5% CO₂ für weitere 18 h über Nacht inkubiert.

Das Wachstum und die Morphologie der Yersinien im 3D-KoG wurden lichtmikroskopisch untersucht und fotografisch dokumentiert.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die 3D-KoG-Proben in 1,17% Glutaraldehyd fixiert, mit 0,03% Rutheniumrot in 0,2 M Natriumkacodylatpuffer pH 7,2 für 1 h bei RT inkubiert und in die Anatomischen Anstalt der LMU zur weiteren Behandlung und elektronenmikroskopischen Analyse gebracht (Freund et al., 2008, Guggenberger et al., 2012, Kakoschke et al., 2016).

2.2.9. Stressresistenzexperimente

Im Rahmen der Infektion des Wirtes sind bakterielle Erreger unterschiedlichen Stresssituationen ausgesetzt (z.B. oxidativer und/ oder saurer Stress) oder Antibiotika-induziertem Stress. Daher ist die Untersuchung von Stressresistenz und somit dem Anpassungsvermögen von Bakterien ein wichtiger Anhaltspunkt für mögliche antimikrobielle Strategien.

2.2.9.1. Resistenz gegen oxidativen und sauren Stress

Um die Resistenz gegenüber saurem oder oxidativem Stress zu quantifizieren, wurden Übernachtkulturen der *Yersinia*-Stämme bei 27°C angezüchtet. Darauf wurden die Bakteriensuspensionen auf 10^7 CFU/ml verdünnt in 0,5 ml PBS. 0,5 ml der Bakteriensuspension wurden mit je 0,5 ml PBS pH 4.0 (mit Essigsäure eingestellt) oder 1mM H₂O₂ in PBS gemischt. Auch wurde eine Kontrollprobe mit PBS pH 7.5 durchgeführt. Diese Suspensionen wurden bei 37°C für 90 min inkubiert. Die Bakterien auf LB-Platten ausplattiert und die Anzahl der Kolonie-bildende Einheiten (CFU) nach Inkubation bei 27°C über Nacht bestimmt (Kakoschke et al., 2014).

Alternativ wurde die Stressresistenz auf LB-Agar mit Testplättchen bestimmt. Hierfür wurden Vorkulturen der Yersinien-Stämme auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Je 100 µl der Bakteriensuspension wurden auf LB-Agar ausplattiert. Auf diese Platten wurden Testplättchen (aus Filterpapier), welche entweder in H₂O₂ oder Essigsäure getränkt wurden, platziert. Nach einer Inkubation bei 27°C über Nacht wurde der Wachstumshemmdurchmesser um die Testplättchen ausgemessen.

2.2.9.2. Resistenz gegen antibiotischen Stress

Um die Resistenz der Yersinien-Stämme gegenüber Antibiotika zu bestimmen, wurden Vorkulturen bei 27°C angesetzt. Diese wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Auf LB-Agar wurden 100 µl dieser Bakteriensuspension ausplattiert und darauf kommerzielle Testplättchen mit Ampicillinverdünnungen aufgelegt. Nach einer Inkubation übernacht bei 27°C wurde auch hier der Hemmdurchmesser ausgemessen und somit die Resistenz gegenüber antibiotischem Stress bestimmt.

Des Weiteren wurden auf Agarplatten Yersinien mit einer OD_{600} von 0,1 ausplattiert. Auf diese Platten wurden M.I.C. Evaluator Strips auf die Platte aufgebracht und die minimale Hemmkonzentration nach übernacht Inkubation bestimmt.

Thermo Scientific™

Ampicillin Testplättchen 2 µg	Katalog-Nr.	10671655
Ampicillin Testplättchen 10 µg	Katalog-Nr.	11923052
Ampicillin Testplättchen 25 µg	Katalog-Nr.	11963992

M.C.I. Evaluator Strips Oxoid

Ampicillin Konzentration von 256 – 0,015 µg/ml	Katalog-Nr.	MA0110D
Gentamicin Konzentration von 256 – 0,015 µg /ml	Katalog-Nr.	MA0116D
Oxacillin Konzentration von 256 – 0,015 µg/ml	Katalog-Nr.	MA0114D

2.2.10. Tryptophanase-Test – Indolproduktion

Indol kann in Bakterien durch die Tryptophanase aus Tryptophan enzymatisch produziert werden. Abbildung 7 zeigt die durch die Tryptophanase induzierte chemische Reaktion. Als Nebenprodukte neben Indol entsteht Pyruvat und Ammonium.

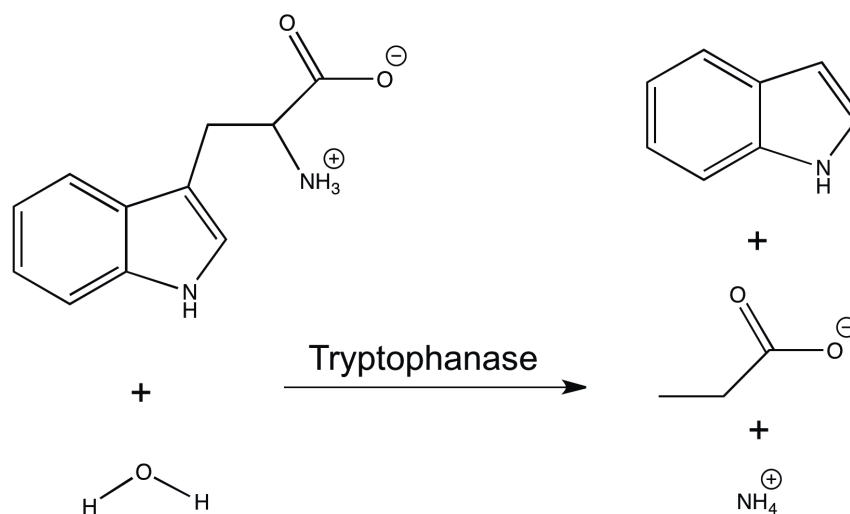


Abb. 7: Umwandlung von Tryptophan in Indol durch die Tryptophanase

In *Pseudomonas aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass Indol sowohl als „Autoinducer“ auf die Genregulation wirkt, in der Biofilmbildung integriert ist, als auch auf die Effluxpumpe der Bakterien wirkt, indem es zu einer cAMP-Induktion führt (Kim et al., 2017). Um die Indolproduktion zu messen, wurden die zu untersuchenden Stämme in LB-Medium angezüchtet. Die Bakterienkulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt und für 4 h bei 27°C inkubiert. In Anlehnung an Chant und Summers wurden 0,5 ml des Überstandes mit einem Mix aus HCl 25% in Amylalkohol gemischt (Chant and Summers, 2007). Daraus wurden 200 µl in je 1 ml des HCl-Amylakoholgemisches gegeben, welches Kovacs-Reagenz enthielt. Diese Mischung wurde in eine Küvette übertragen, gemischt (im Vortex) und die OD

bei 540 nm bestimmt. Darauf ließ sich die Indolkonzentration bzw. -produktion errechnen. Es wurde eine Indolstandardkurve mit steigender Indolkonzentration je durchgeführtem Experiment hergestellt. Die Indolkonzentration der zu untersuchenden Stämme wurde anhand dieser Eichkurve berechnet.

2.2.11. Beweglichkeitstestung

Modifizierter experimenteller Aufbau nach Iriarte et al., 1993: Die zu untersuchenden *Yersinia*-Stämme wurden bei 27°C über Nacht in LB-Flüssigmedium angezüchtet. Die OD₆₀₀ der Vorkultur bestimmt und mit LB-Medium die OD₆₀₀ auf 0,1 bzw. 0,01 eingestellt. In die Mitte von Beweglichkeitsagarplatten (LB-Medium mit 0,3% Agar) wurden je 5 µl der o.g. Bakteriensuspensionen aufgetragen. Die Platten wurden bei 27°C inkubiert. Nach 18 h und 24 h wurde der Durchmesser am Randsaum des sich ausbreitenden, motilen Bakterienrasens gemessen.

2.2.12. Herstellung von Gesamtproteinlysat

Eine Vorkultur der benötigten Bakterienstämme wurde bei 27°C in LB-, BHI-, BHI pH 5.5- oder RPMI-Flüssigkultur über Nacht inkubiert. Hauptkulturen von 20 ml wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,1 in den bereits genannten Medien für 4 h (exponentielle Phase – log.) und 24 h (stationäre Phase – stat.) inkubiert.

Die Proben wurden immer in Duplikaten hergestellt. Von den Hauptkulturen wurde je 1 ml in ein Eppendorfröhrchen überführt und für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum selben Zeitpunkt wurde die erreichte OD₆₀₀ photometrisch gemessen, um auf ihrer Basis mit nachstehender Formel die Menge an SDS-Protein-Loading Puffer zu berechnen, der den Proben beigefügt wurde, um auf dieselbe Proteinkonzentration zu gelangen.

$$X \mu\text{L} = 1 \text{ mL} \times 200 \times \text{OD}_{600}$$

Gemessene OD₆₀₀ bei 4 h bzw. 24 h

Volumen des SDS-Protein-Loading Puffers pro Probe

Die Proben wurden bei 95°C für 5 min solubilisiert, wobei die Hauptmasse der Proteine denaturiert wurde. Diese Proben konnten anschließend sofort für die SDS-PAGE verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

SDS-Protein-Loading Puffer pH 8,8 (50 ml):

5 ml	1M Magnesiumchlorid
20 ml	10% SDS-Lösung
5 ml	Glycerin
2,5 ml	β -Mercaptoethanol
25 mg	Bromphenolblau
4,875 ml	1M Tris pH 8,8
12,62 ml	H ₂ O _{dd}

2.2.13. Isolierung der äußeren Membran und ihrer Proteine

Aus einer Vorkultur, welche bei 27°C inkubiert wurde, wurden Hauptkulturen mit einem Volumen von 100 ml mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 27°C bzw. 37°C für 4 h (exponentielle Phase) und 24 h (stationäre Phase) bebrütet.

Danach wurden die Kulturen auf Eis gelegt und in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Proben wurden bei 4°C und 5000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 10 mM Hepes-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dieser Schritt wurde komplett auf Eis durchgeführt und war eine Abfolge von 30 sec Ultraschallbehandlung mit einem 30 sec-Intervall. Diese Abfolge wurde pro Probe 4-mal wiederholt. Die Proben wurden daraufhin bei 4°C und 3500 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen transferiert und bei 4°C und 100000 g für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dem Sediment wurden 2 ml 1%-Sarkosyllösung in 10 mM Hepes-Puffer beigefügt. Die Proben wurden bei RT für 30 min bei 300 rpm geschüttelt und in Abständen von 5 min „gevortext“. Hierauf erfolgte ein weiterer Ultrazentrifugenschritt bei 4°C und 100000 g für 1 h. Der Überstand wurde verworfen und 50 μ l H₂O auf das Proteinsediment gegeben und über Nacht im Kühlschrank belassen. Das Pellet wurde am folgenden Tag resuspendiert und die Proteinproben konnten bei -20°C gelagert werden.

Um die Proben für die SDS-PAGE und Westernblots auf dieselbe Proteinkonzentration zu bringen, wurde eine Lowry-Proteinbestimmung durchgeführt (Lowry et al., 1951, Peterson, 1977). Hierfür wurde eine Eichkurve mit einer Verdünnungsreihe von BSA in den Konzentrationen 10, 20, 30, 50 und 90 μ g in je 1 ml H₂O erstellt.

Reagenz A:

2 %	Na ₂ CO ₃
0,4 %	NaOH
0,16 %	KNaTartrat
1 %	SDS

Reagenz B:

4 % CuSO₄ x 5 H₂O

Vor der Proteinbestimmung wurden 100 ml Reagenz A und 1 ml Reagenz B zu Reagenz C frisch hergestellt.

Von den 50 µl Poteinproben wurden je 5 µl abgenommen und mit 995 µl H₂O gemischt. Zu den Proben wurden jeweils 3 ml des Reagenz C gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Darauf wurden 300 µl 50%-igen Folinsreagenz beigemischt und die Proben für weitere 45 min bei RT inkubiert. Es folgte die Absorptionsmessung bei 750 nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Eichkurve berechnet.

2.2.14. Herstellung von Flagellenproteinextrakten mittels TCA-Fällung

Für die Herstellung von Flagellenproteinextrakten wurden aus den Vorkulturen der benötigten *Yersinia*-Stämme 100 ml Hauptkulturen bei 27°C für 24 h inkubiert. Die Proben wurden in auf Eis gekühlten 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Die Proben wurden jeweils für dreimal 10 min auf maximaler Stufe homogenisiert (Vortex s. Tabelle 12). Dieser Schritt dient der Abscherung der Flagellen. Darauf wurden die Proben bei 4°C und 10000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue vorgekühlte 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und TCA (Endkonzentration 7%) zur Proteinfällung hinzugegeben und durchmischt. Die Proben wurden über Nacht im Kühlschrank gelagert. Danach wurden die Proben bei 4°C und 10000 rpm für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Flagellenproteinsedimente wurden mit Wasser zur Entfernung von TCA-Resten „gewaschen“ und bei -20°C gelagert.

2.2.15. SDS-PAGE und Western Blot

Für die SDS-PAGE Versuche wurden 10-14%-ige Gele nach den Rezepten von BioRad hergestellt (s. u.). Die Gele, welche für Western Blots weiterverwendet wurden, wurden mit 50 µl Trichloroethanol versetzt (Strainfree-Gels). Nach Auftragen der Proteinproben (Abschnitte: 2.2.12, 2.2.13, 2.2.14) wurde für 45 min unter eine Spannung von 200 V die elektrophoretische Proteintrennung durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie gefärbt. Hierfür wurden die Gele für 30 - 45 min auf einem Schüttler mit Coomassie-Lösung gefärbt und danach mit Wasser über Nacht entfärbt.

Die Semidry-Electro-Blotting-Methode wurde für die Western Blots verwendet. Bei der verwendeten Membran handelte es sich um eine PVDF-Membran, welche vor Benutzung mit MeOH aktiviert werden musste. Die Membran wurde zwischen jeweils zwei Filterpapieren

(Whatman Paper®) gelegt, die mit Blotting Puffer getränkt waren. Auf die Membran wurde das SDS-Gel blasenfrei gelegt. Bei 120 mA wurden die Proteinproben für 2 h transferiert. Die Membran wurde mit 5%-iger Milchpulverlösung in PBS-T übernacht bei 4°C geblockt, dann dreimal mit PBS-T für je 5 min gewaschen und darauf mit dem Erstantikörper für 1 h bei RT inkubiert (für Konzentration der Antikörper s. Tabelle 4 - Antikörperliste). Danach wurde erneut dreimal mit PBS-T für je 5 min gewaschen und der Zweitantikörper für 1 h bei RT hinzugegeben. Es folgte ein weiterer dreimaliger Waschschrift mit PBS-T. Die Membran wurde mit der Millipore Detection Solution versetzt und mit Hilfe des ChemiDoc dokumentiert. Die Auswertung der Immunoblots erfolgte dann mit der ImageLab Software von BioRad im Sinne einer densitometrischen Quantifizierung.

Rezept für SDS-PAGE-Gele nach BioRad:

10%	12%	14% Trenngel (Endvolumen 10 ml)	
4,1	3,4	2,7 ml	H ₂ O _{dd}
3,3	4,0	4,7 ml	Acrylamid/Bis
2,5	2,5	2,5 ml	1,5 M Tris pH 8,8
100	100	100 µl	10 % SDS-Lösung
50	50	50 µl	APS
5	5	5 µl	TEMED

4% Sammelgel (Endvolumen 10 ml)

6,1 ml	H ₂ O _{dd}
1,3 ml	Acrylamid/Bis
2,5 ml	0,5 M Tris pH 6,8
100 µl	10 % SDS-Lösung
50 µl	APS
10 µl	TEMED

Proteingrößenmarker– prestained pageruler 10 kDa – 250 kDa

Fermentas Katalog – No: 26616

Puffer für SDS-Page und Western Blot:

10x SDS-PAGE Laufpuffer:

100 ml 10% SDS-Lösung
 30,3 g Tris
 144 g Glycin
 auf 1l mit H₂O_{dd} auffüllen.

Coomassie Lösung:

250 ml Isopropanol
100 ml Essigsäure
500 mg Coomassie
auf 1 l mit H₂O_{dd} auffüllen.

10x Blotting Puffer:

116 g Tris
58 g Glycin
74 ml 10% SDS-Lösung
auf 2 l mit H₂O_{dd} auffüllen.

1x Blotting Puffer:

200 ml 10x Blotting Puffer
600 ml Methanol
auf 2 l mit H₂O_{dd} auffüllen.

10x PBS-Waschpuffer:

2 g Kaliumchlorid
80 g Natriumchlorid
2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat
14,4 g Dinatriumhydrogenphosphat
auf 1 l mit H₂O_{dd} auffüllen.

PBS-T-Puffer:

100 ml 10x PBS-Waschpuffer
1 ml Tween
auf 1 l mit H₂O_{dd} auffüllen.

Die Membranen konnten, nachdem die Antikörper mittels Strip-Puffer entfernt wurden, erneut mit anderen Antikörpern gefärbt werden. Für diesen Schritt wurde die Membran 30 min mit dem Strip-Puffer bei RT unter stetigem Schütteln inkubiert. Darauf wurde die Membran dreimal mit PBS-T für je 5 min gewaschen und die Membran erneut für 1 h bei RT in 5%-iger Milchpulverlösung in PBS-T „geblockt“.

Strip-Puffer:

1,876 g Glycin
50 ml 20% SDS-Lösung
950 ml H₂O_{dd}
mit Salzsäure auf einen pH von 2,0 bis 2,5 einstellen.

2.2.16. Lipopolysaccharid (LPS)-Silberfärbung nach SDS-PAGE

Das Protokoll zur LPS-Färbung wurde modifiziert nach Hitchcock und Brown wie folgt durchgeführt. Proteinase K (12,5 µg) wurde in 50 µl Gesamtproteinextrakt der Bakterien im Lyse-Puffer (entspricht dem SDS-Protein-Loading-Puffer aus Abschnitt 2.2.12.) zum Abbau der Proteine gegeben. Dieser Mix wurde bei 60°C für 1h inkubiert, wobei LPS freigesetzt wird. Die Proben konnten bei - 20°C gelagert werden. 20 µl der Proben wurden im 15% Polyakrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abschnitt 2.2.15. SDS-PAGE).

Die Gele wurden bei RT über Nacht mit Fixierlösung inkubiert. Darauf wurden die Gele für 30 min in Oxidationslösung bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Es folgten acht Waschschriffe mit je 200 ml H₂O_{dd} pro Gel für je 30 min bei RT. Der Färbeschritt mit der Silbernitrat-haltigen Lösung wurde für 15 min bei RT durchgeführt. Erneut folgten Waschschriffe, nun zwei mit je 200 ml H₂O_{dd} pro Gel für je 2 min bei RT. Die Detektionslösung wurde hinzugegeben und in der Färbewanne das Gel vorsichtig per Hand geschwenkt, bis sich nach 5 - 20 min braun-schwarze Banden zeigten, danach wurde die Silberreduktion mit der Blockierungslösung unterbrochen (Hitchcock and Brown, 1983).

Die Dokumentation erfolgte über die Nutzung des ChemiDoc und ImageLab.

Fixierlösung:

- 25 % Isopropanol
- 7 % Essigsäure

Oxidationslösung:

- 0,66 % meta-Periodsäure
- in einem Gemisch aus 3 ml Fixierlösung und 97 ml H₂O_{dd}

Färbelösung:

- 1,67 ml AgNO₃ (20%-ige Lösung)
- 9,3 ml NaOH (0,1 N)
- 1,2 ml NH₃ (25%-ige Lösung)
- 50 ml H₂O_{dd}

Detektionslösung:

- 12,5 mg NaZitrat
- 250 ml H₂O_{dd}
- 125 µl Formaldehyd (37%-ige Lösung)

Blockierungslösung:

10 ml Essigsäure (7%-ige Lösung)

200 ml H₂O_{dd}

2.2.17. Durchflusszytometrie (FACS)

Im Allgemeinen dient die Durchflusszytometrie (auch FACS, fluorescence-activated cell sorting/scanning) der Bestimmung der Größe, Form oder Eigenschaft einzelner Bakterien- oder Wirtszellen. Die Zellen fließen mit einer hohen Geschwindigkeit durch eine Kapillare. Ein Laser wird zur Messung der Zellgröße eingesetzt, diese kann durch die Streuung des Lichtes bestimmt werden. Durch Fluoreszenzanregung von spezifischen z.B. FITC-konjugierter Antikörpern kann der Zelltyp bestimmt werden (Valet, 2003). In der vorgelegten Arbeit wurden *Yersinia* Stämme untersucht, die entweder Derivate des pFX-Plasmides oder des pROBE-Plasmides tragen. Beide Plasmide tragen Reportergene für Translationsfusionsproteine von Gen X und GFP (green fluorescent protein). Das GFP wird in der Regel nicht sezerniert oder im Zytosol abgebaut. Bei FACS-Scanning kann die GFP-Fluoreszenz einer Bakterienzelle zugeordnet werden und mithilfe der Analysesoftware FACS Diva Software v6.1.2. die mittlere Fluoreszenzintensität der einzelnen *Yersinia*-Zelle ermittelt werden. Die Versuche wurden mit dem FACS Canto II Zytometer durchgeführt. Es wurde der FITC-Filter (auch für GFP anwendbar) verwendet und pro Probe 20 000 Ereignisse dokumentiert.

Die Probenvorbereitung erfolgte nach Anzucht der Vorkulturen in 2 ml Nährmedium (LB, BHI und BHI pH 5,5) durch eine 1:20-Verdünnung in 50 ml Flüssigmedium und einer Inkubation für je 4 h bzw. 24 h bei 27°C bzw. 37°C. Von allen Stämmen wurden pro Versuch unabhängige Triplikate verwendet. Zu den oben definierten Zeitpunkten wurden 2 µl der Bakterienkulturen mit je 200 µl PBS (log.-Phase) und 500 µl PBS (stat.-Phase) verdünnt. Die Proben wurden anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.18. Immunfärbung von *Yersinia*-assoziierten Antigenen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Bakterien wurden bei 27°C über Nacht inkubiert. Darauf wurden die Bakteriensuspensionen auf Objektträger aufgetragen und bei RT getrocknet. Die Bakterien wurden hitzefixiert. Die Objektträger wurden mit PBS vorsichtig dreimal gewaschen. Darauf wurde als Erstantikörper ein Anti-Flagellum-Kaninchenserum (1:200 Verdünnung) in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT mit *Yersinia* inkubiert. Danach folgte erneut dreimaliges Waschen mit PBS. Als Zweitantikörper wurde der Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Alexa Fluor 488 verwendet (1:1000 Verdünnung). Dieser wurde ebenfalls bei RT für 1 h in der Dunkel-Feuchtkammer inkubiert.

Darauf folgte erneut ein dreimaliges Waschen. Die Proben wurden mit dem SlowFade Eindeckmedium und einem Deckglas abgedeckt.

Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488

Invitrogen – Katalog-Nr. A32731

SlowFade™ Gold Antifade Mountant with DAPI

ThermoFischer Scientific – Katalog-Nr. S36942

3. ERGEBNISSE

3.1. Herstellung der Deletionsmutante JB580v(*micA*::CmR)

Die sRNA MicA ist bei *E. coli* in der posttranskriptionellen Regulation der äußeren Membranproteine, insbesondere OmpA involviert. Für die Herstellung der *Yersinia-micA*-Deletionsmutante wurde eine Deletionskassette mit *micA*-flankierenden Bereichen einer Chloramphenicol-Resistenz-Kassette mittels PCR hergestellt und in den Ausgangsstamm JB580v mit Plasmid pKD46 (Lambda-Red Rekombination - s. Abschnitt 2.2.6.1.) transformiert und auf allelen Austausch selektiert (Abb. 6). Die Deletion des Gens wurde mittels PCR nachgewiesen. Abbildung 8 zeigt die PCR-Produkte der Deletionskassette (A) und den Nachweis des Austausches des *micA*-Gens gegen die Chloramphenicol-Resistenzkassette (B).

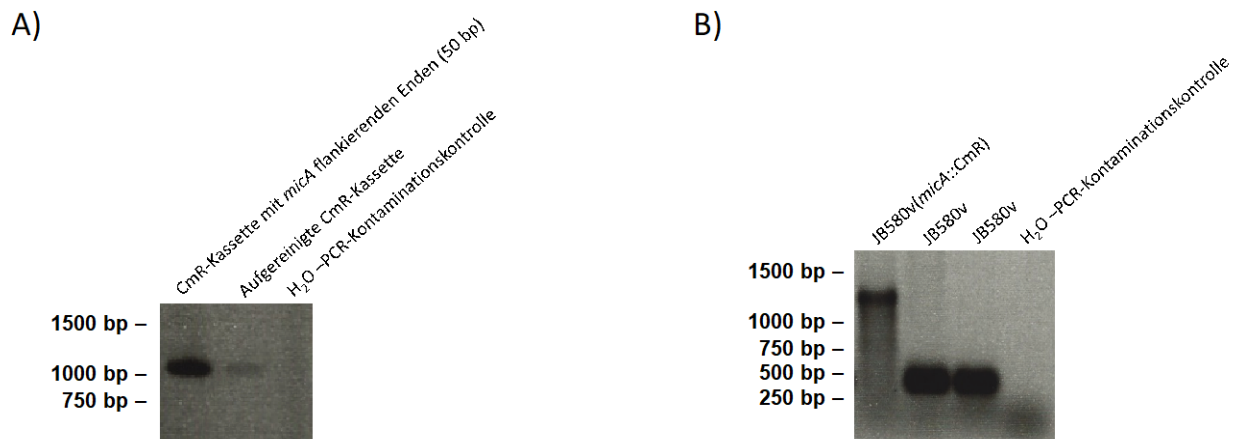


Abb. 8: A) Deletionskassette mit Chloramphenicol-Resistenz (CmR) und *micA* flankierenden Enden (PCR-Produkt ca. 1100 bp groß) B) PCR - *micA*-Gen über Deletionsmutante und Ausgangsstamm. PCR-Produkt der *micA*-Deletionsmutante JB580v(*micA*::CmR) ca. 1350 bp, PCR-Produkt des Ausgangsstammes JB580v ca. 350 bp.

Zum sicheren Nachweis wurde die genomische DNA der Deletionsmutante JB580v(*micA*::CmR) sequenziert, was die korrekte Deletion des *micA*-Gens bestätigte.

3.2. Versuche zur Herstellung einer Deletionsmutante JB580v(*rybB*::CmR)

Eine Deletion des *rybB*-Gens war nach über 30 Versuchen nicht möglich. Es ist davon auszugehen, dass RybB eine essenzielle Funktion in *Y. enterocolitica* hat und daher eine Deletion die Überlebensfähigkeit stark beeinträchtigt und Mutanten deshalb unter Standardwachstumsbedingungen nicht lebensfähig sind.

3.3. Überexpression von *rybB* und *cyaR*

Um zu prüfen, ob die sRNAs RybB und CyaR in der Regulation wichtiger *Yersinia*-Virulenzfaktoren beteiligt sind, wurden ihre Gene in die Arabinose-induzierbaren pBAD-Vektoren kloniert. Es sollte geprüft werden, ob die sRNAs RybB, CyaR und auch MicA das im Zytosol vorhandene Hfq binden können, wodurch es zu starkem „envelope stress“ kommen sollte. Abbildung 9 zeigt die PCR über den „leeren“ Vektor und den pBAD-*rybB* und Abbildung 10 über den leeren Vektor und den pBAD-*cyaR*. Die Klonierung war in beiden Fällen erfolgreich. Die Ergebnisse wurden mittels Sequenzierung bestätigt.

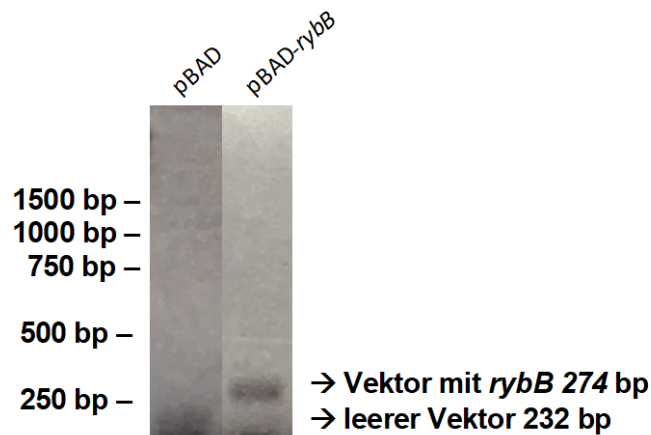


Abb. 9: PCR über die Klonierung von pBAD-*rybB*. Der Vektor mit dem *rybB*-Gen weist eine Größe von 274 bp auf mit den Kontrollprimern OR48 und OR 49.

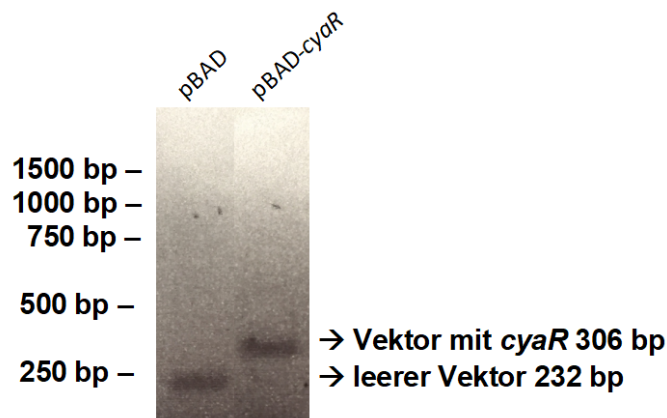


Abb. 10: PCR über Klonierung von pBAD-*cyaR*. Der Vektor, das *cyaR*-Gen beinhaltend, weist eine Größe von 306 bp in der PCR mit den Kontrollprimern OR48 und OR49 auf.

Für das *micA*-Gen war eine Klonierung in den pBAD-Überexpressionsvektor nach 20 Versuchen nicht möglich. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Überexpression von *micA* toxisch für Yersinien ist.

3.4. Deletionsmutante JB580v($\Delta degP$) und JB580v(*hfq*::KanR- $\Delta degP$)

DegP ist eine wichtige periplasmatische Protease unter „envelope stress“-Bedingungen, da sie missgefaltete sezernierte Proteine im Periplasma proteolytisch degradiert. Die

Herstellung der $\Delta degP$ -Mutanten erfolgte wie in Abschnitt 2.2.6.2. beschrieben mit dem Plasmid pSB890-*degP*-KO von Weirich et al., 2017. Mittels PCR wurde die Deletion des *degP*-Gens bestätigt. In Abbildung 11 sind die PCR-Produkte sowohl des Ausgangstammes JB580v als auch der Deletionsmutanten JB580v($\Delta degP$) und JB580v(*hfq*::KanR- $\Delta degP$) dargestellt und belegen die Deletion von *degP*.

Zur sicheren Bestätigung der Deletion wurde die genomische DNA von JB580v($\Delta degP$) und JB580v(*hfq*::KanR- $\Delta degP$) sequenziert.

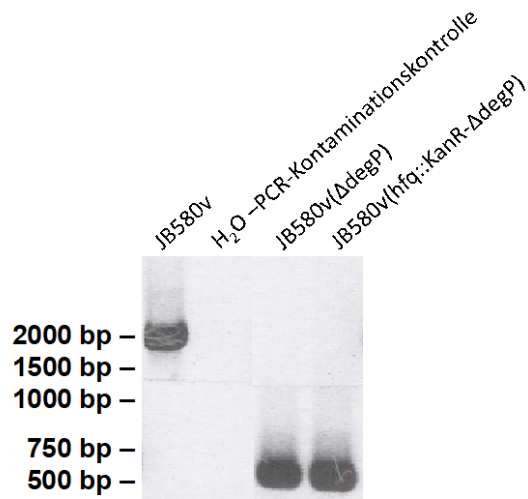


Abb. 11: PCR über *degP*-Gen – PCR-Produkt Ausgangstamm 1888 bp, PCR-Produkt Deletionsmutanten 520 bp

3.5. Wachstumsverhalten von JB580v(*micA*::CmR), JB580v pBAD-*rybB* und JB580v pBAD-*cyaR* in Flüssigmedium

Bei den Wachstumsversuchen über 24 Stunden in LB bzw. BHI (pH 5,5) (Säurestress) bei 27°C oder 37°C konnte kein signifikanter Unterschied der Wachstumskurven zwischen dem Ausgangstamm JB580v und der Deletionsmutante JB580v(*micA*::CmR) festgestellt werden (Abbildung 12 A, B). Das Wachstumsverhalten wurde auch in RPMI-Zellkulturmedium (pH 7,2 – Simulation von in-vivo-Wachstumsbedingungen) und BHI (pH 7,0) untersucht, aber auch hier konnte kein Unterschied festgestellt werden (Daten nicht abgebildet).

Die Überexpression von *rybB* und *cyaR* wurde ebenfalls in Wachstumsversuchen untersucht. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede der Wachstumskurven zwischen dem Ausgangstamm und den Überexpressionsmutanten festgestellt werden. Die Wachstumsversuche wurden ebenfalls in LB, BHI, BHI pH5.5 und RPMI durchgeführt, wobei zur Aktivierung des Promotors nach 1 h Wachstum Arabinose ins Medium hinzugefügt wurde (Daten nicht abgebildet).

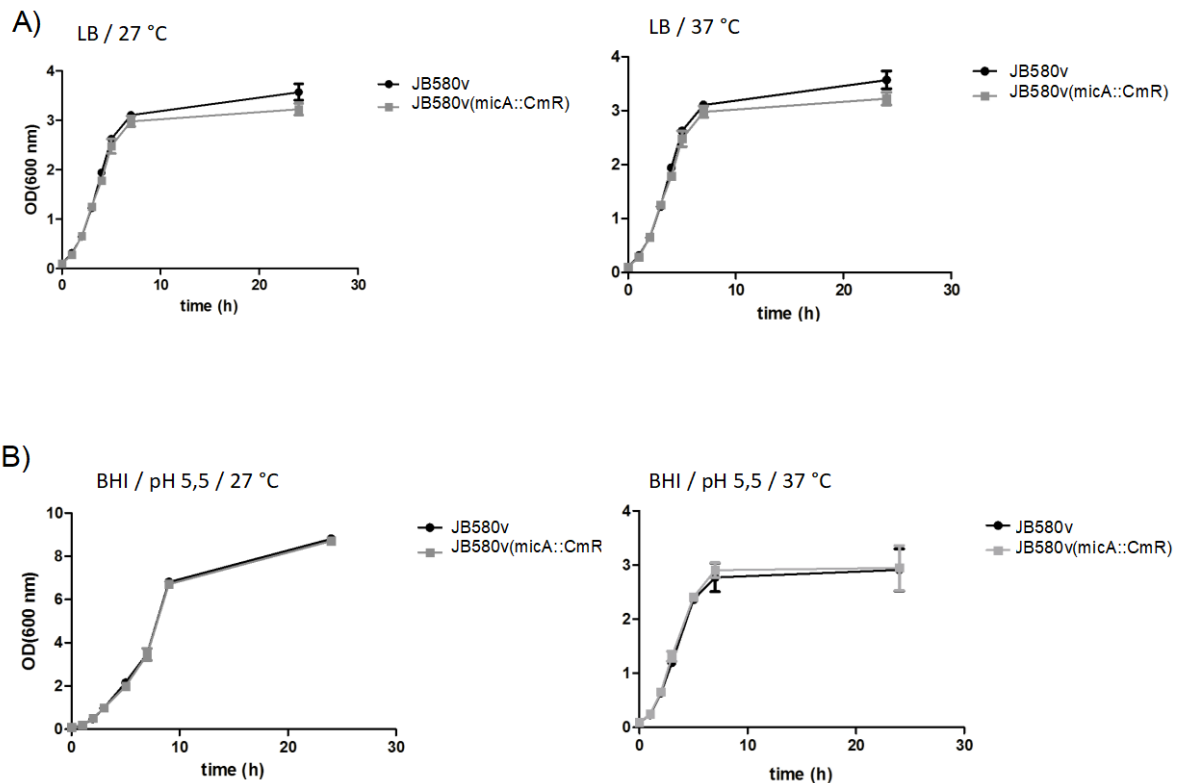


Abb. 12: A) Wachstumskurve zu JB580v und JB580v(*micA::CmR*) in LB bei 27 °C und 37 °C. B) Wachstumskurve zu JB580v und JB580v(*micA::CmR*) in BHI pH 5,5 bei 27 °C und 37 °C. (Photometer-Messung – nicht kontinuierlich; n=3).

3.6. Wachstumsverhalten von JB580v($\Delta degP$) und JB580v(*hfq::KanR- $\Delta degP$*) in Flüssigmedium

Um das Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten JB580v($\Delta degP$) und JB580v(*hfq::KanR- $\Delta degP$*) im Vergleich zum Ausgangsstamm JB580v zu analysieren wurden Wachstumskurven erstellt.

Abbildung 13 zeigt das Wachstumsverhalten in LB und BHI. Bereits 2014 wurde von Kakoschke et al. ein Wachstumsdefizit der JB580v(*hfq::KanR*) gegenüber dem Ursprungsstamm JB580v beschrieben, das in diesen Experimenten reproduzierbar war. Die *degP*-Mutante zeigt verglichen mit JB580v keinen Unterschied im Wachstumsverhalten. Die JB580v(*hfq::KanR- $\Delta degP$*)-Doppelmutante zeigt ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die JB580v(*hfq::KanR*)-Mutante. Es zeigt sich in den Wachstumskurven ein stärkerer Einfluss von Hfq im Vergleich zu DegP.

Die Wachstumskurven in RPMI und BHI (pH 5,5) zeigen einen fast identischen Verlauf (Daten nicht abgebildet).

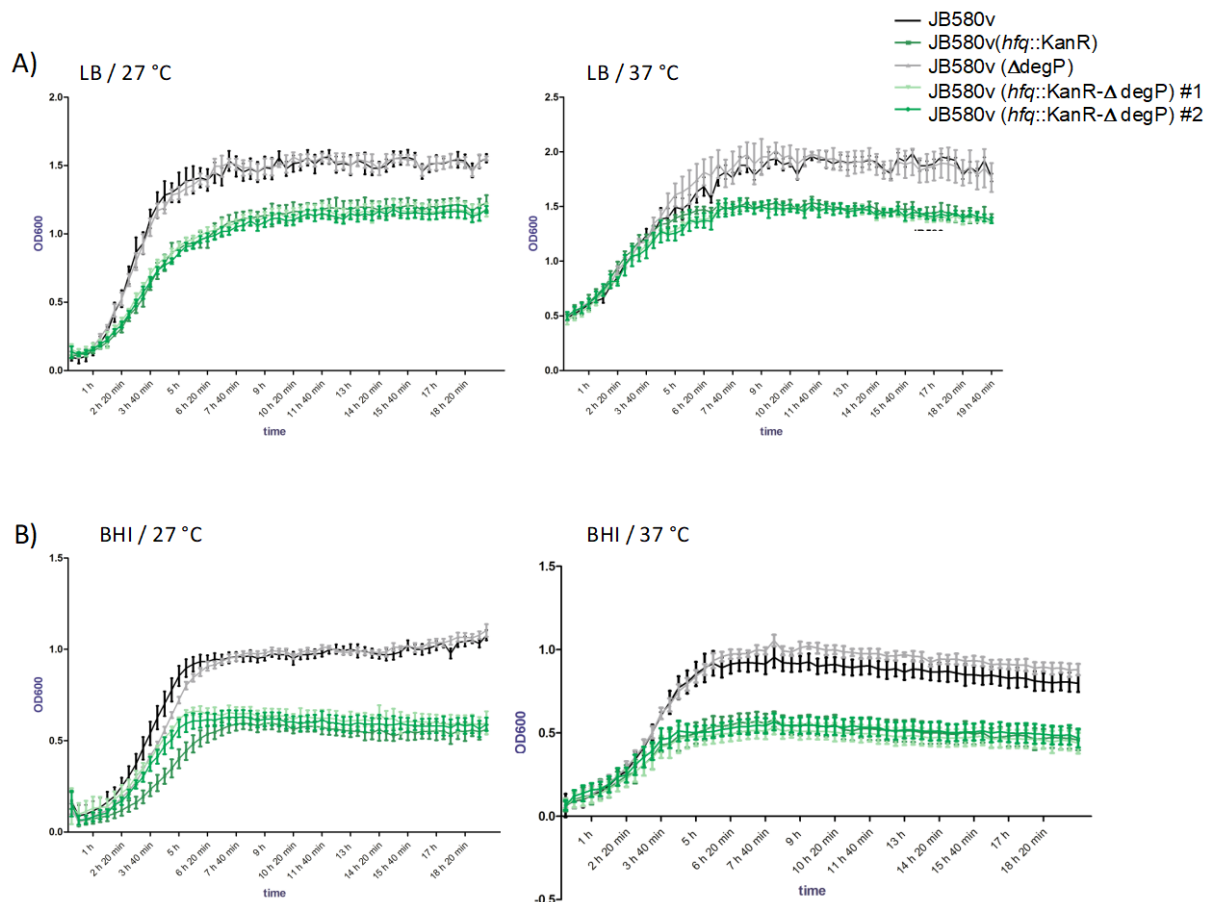


Abb. 13: Wachstumskurven zu JB580v, JB580v(*hfq::KanR*), JB580v($\Delta degP$) und JB580v(*hfq::KanR-ΔdegP*) in LB (A) und BHI (B) bei 27 °C und 37 °C. Kein Wachstumsdefizit der *DegP*-Mutante im Vergleich zum Ursprungstamm. Beschriebenes Wachstumsdefizit der *Hfq*-Mutante gegenüber dem Ursprungstamm (Kakoschke et al., 2014). Die Doppelmutante JB580v(*hfq::KanR-ΔdegP*) verhält sich der *Hfq*-Mutante gleich. (CLARIOstar-Messung – kontinuierlich; n=3).

3.7. Wachstumsverhalten in 3D-KoG: JB580v(*micA::CmR*) und JB580v(*hfq::KanR*)

Die Untersuchung des bakteriellen Wachstums in 3D-KoG dient als Modell einer Infektion im Gewebe (Yersinien befinden sich extrazellulär). Die Mikrokoloniebildung ähnelt dem Infektionsgeschehen im Gewebe des Wirtes (Mikrokolonien mit Neutrophileninfiltration). Im Vergleich zum Ursprungstamm JB580v zeigt JB580v(*micA::CmR*) lichtmikroskopisch keinen Unterschied in der Koloniebildung im Kollagengelen auf. Die Mikrokolonien von JB580v(*micA::CmR*) weisen die gleiche Größe auf und haben die gleiche glatte Randformation wie die Kolonien des Ursprungstamms JB580v (\varnothing ca. 2-4mm). Die JB580v(*hfq::KanR*)-Mutante jedoch zeigt im Vergleich zu JB580v bereits lichtmikroskopisch kleinere Mikrokolonien (\varnothing ca. 1mm). Die Überexpression von *Hfq* führt lichtmikroskopisch zu größeren und kompakteren Kolonien (Daten nicht abgebildet).

Um detaillierte Informationen zur Mikrokoloniebildung zu erhalten, wurden Ultradünnschnitte für die Transmissionselektronenmikroskopie angefertigt (Abb. 14) (Kakoschke et al., 2016). *Hfq* zeigt einen wesentlichen Einfluss auf die Anlagerung des bakteriellen *YadA* an die Kollagenfasern. Diese Daten wurden in Kakoschke et al., 2016 publiziert.

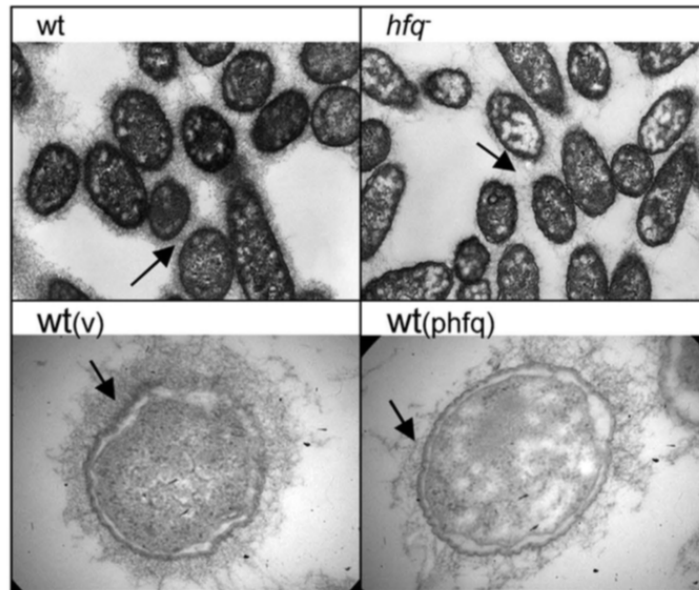


Abb. 14: Wachstum von Yersinien in 3D-KoG bei 37°C nach 24 h. Elektronenmikroskopische Aufnahme – obere Reihe 1:15000-fache Vergrößerung – untere Reihe 1:21000-fache Vergrößerung. Hfq beeinflusst die Dichte der Kollagenfaseranlagerung an YadA in *Y. enterocolitica* © (Kakoschke et al., 2016). Die Hfq-Deletionsmutante (*hfq*) zeigt eine geringere Produktion von YadA auf und damit eine weniger geordnete Bindung von Kollagenfibrillen im Vergleich zum Wildtyp (*wt*). Die Überexpression des Hfq (*wt(phfq)*) führt zu einer verstärkten Bindung von YadA an das Kollagen.

3.8. Stressresistenz von JB580v(*hfq::KanR*), WA314(*hfq::KanR*), sowie den Hfq-Überexpressionsmutanten

Im Vergleich zum Ursprungstamm zeigt die JB580v(*hfq::KanR*)- sowie die WA314(*hfq::KanR*)-Mutanten eine geringere Resistenz gegenüber Säure bzw. oxidativen Stress. Wird Hfq überexprimiert, zeigt sich jedoch kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Ursprungstamm und der Überexpressionsmutante (Abbildung 15). Diese Daten wurden bereits in Kakoschke et al., 2014 publiziert.

Die Überlebensraten wurden nach 1,5h Stress-Wachstum durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen und anschließender Inkubation über 24h bei 27°C als Kolonie-bildende Einheiten (CFU) bestimmt.

Die Untersuchungen bezüglich der Resistenz gegenüber antibiotischem Stress wurde ebenfalls auf multiple Antibiotika getestet (Ampicillin, Oxacillin und Gentamicin). Allerdings konnte in der WA314(*hfq::KanR*) im Vergleich zum Ausgangsstamm keine erhöhte Sensitivität bezogen auf die MHK (minimale Hemmkonzentration) bestimmt werden (Daten nicht dargestellt) (Kakoschke et al., 2014).

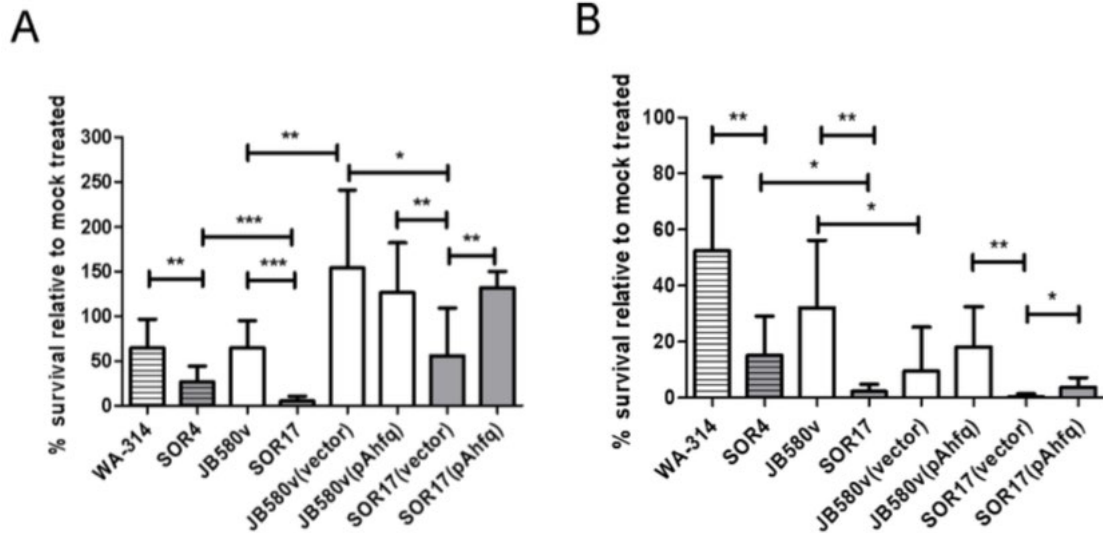


Abb. 15: Einfluss von Hfq auf die bakterielle Resistenz gegenüber Säure bzw. oxidativem Stress © (Kakoschke et al., 2014). A) Bakterielle Resistenz gegenüber pH 4,0 für 90 min. B) Bakterielle Resistenz gegenüber 1 mM H₂O₂ für 90 min. (SOR4 = WA-314(*hfq::KanR*), SOR17 = JB580v(*hfq::KanR*)) (n=3 – jeweils in Triplikaten pro Stamm; Statistik mittels GraphPad Prism „unpaired student t-test“ – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

3.9. Indolproduktion in der Hfq-Mutante

Yersinien können Tryptophan in Indol mittels Tryptophanase abbauen (s. Abb. 7). Indol kann in Gram-negativen Bakterien die Biofilmbildung, Effluxpumpen und Betalaktamasen induzieren. Deshalb wurden die Mutanten vergleichend mit den Ausgangstämmen auf Indolbildung getestet.

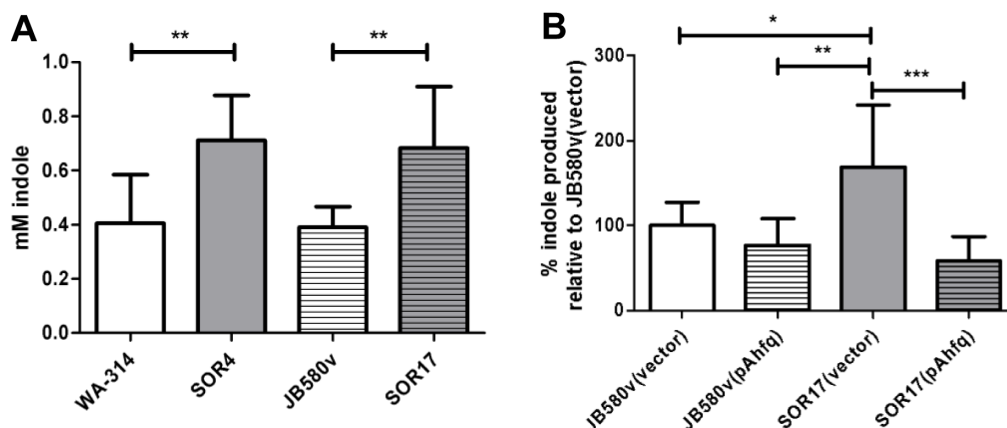


Abb. 16: © (Kakoschke et al., 2014) A) Produktion von Indol durch den Ursprungstamm sowie die (*hfq::Kan*)-Mutante im Kulturüberstand (4h, 27°C, LB). B) Überexpression und Komplementierung von Hfq im Ursprungstamm sowie der (*hfq::Kan*)-Mutante im Kulturüberstand (4h, 27°C, LB). (SOR4 = WA-314(*hfq::KanR*), SOR17 = JB580v(*hfq::KanR*)) (n=3 – jeweils in Triplikaten pro Stamm; Statistik mittels GraphPad Prism „unpaired student t-test“ – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

Abbildung 16 zeigt die Produktion von Indol. Ist Hfq abwesend, wird mehr Indol produziert. Somit lässt sich folgern, dass Hfq die Produktion von Tryptophanase oder eines seiner Regulatoren negativ beeinflusst (Kakoschke et al., 2014).

Für eine Überexpression von Hfq in den Stämmen JB580v sowie JB580v(*hfq::KanR*), als Komplementierung, zeigt sich jedoch kein wesentlicher Effekt auf die Indolproduktion (Abb. 16 B). Diese Daten wurden in Kakoschke et al., 2014 publiziert.

3.10. Einfluss der sRNAs MicA, RybB und CyaR auf die Produktion von Virulenzfaktoren

Mithilfe des Online-Programmes IntaRNA wurde zu Beginn der Untersuchungen der Hybridisierungsgrad der sRNAs mit der mRNA von Virulenzfaktoren ermittelt. Hierfür wurde die sRNA mit der Sequenz der entsprechenden mRNA (inklusive 5'UTR) untersucht.

Danach wurden gezielte Experimente im Sinne von Western Blots (Protein) und FACS-Analyse (translationale GFP-Reporterfusion) durchgeführt.

3.10.1. Posttranskriptionelle Regulation von Virulenzfaktoren durch MicA

3.10.1.1. Einfluss von MicA auf YadA-Produktion

In Abbildung 17 sind die IntaRNA Ergebnisse der Interaktion von MicA und YadA dargestellt. In der 5'-UTR-Region des *yadA*-Gens (Bindungsenergie von -8,3 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -18,2 kcal/mol) als auch in der *yadA*-kodierenden Sequenz kann es zur Komplementation kommen (Bindungsenergie liegt hier bei -11,3 kcal/mol, die Hybridisierungsenergie bei -15,2 kcal/mol).

In beiden Bereichen sind die Energiewerte der Interaktionen realistisch, sodass ein Effekt auf die Produktion von YadA durch die sRNA MicA erwartet wird.

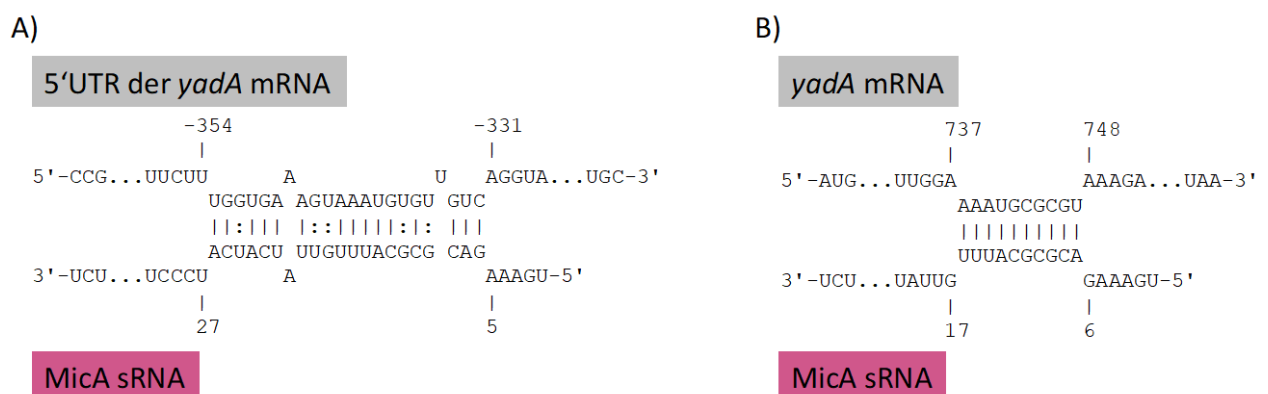


Abb. 17: A) Interaktion komplementärer Bereiche der sRNA MicA mit der 5'UTR der mRNA von YadA. B) Interaktion der sRNA MicA mit kodierenden Sequenzen der mRNA für YadA.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Immunoblots und FACS-Analysen für MicA-abhängige YadA-Produktion. Obwohl durch die IntaRNA-Vorhersage eine klare Interaktionstendenz erkennbar ist, zeigt sich sowohl in den FACS-Analysen, als auch in den Immunoblots weder eine verringerte oder verstärkte Produktion von YadA zwischen dem Ausgangsstamm und der MicA-Mutante. Bevorzugt wurden die Immunoblots von 37°C-Kulturen durchgeführt, da es sich hierbei um die optimale Temperatur für die *yadA*-Genexpression handelt.

Die Western Blots wurden mit Vollzelllysaten (27°C und 37°C Anzucht) und Membranproteinproben von 27°C und 37°C Kulturen wie auch die FACS-Experimente durchgeführt (Daten nicht gezeigt) und zeigten in beiden Fällen ähnliche Ergebnisse.

Es muss von einer direkten Wechselwirkung der sRNA MicA mit der *yadA*-mRNA ausgegangen werden.

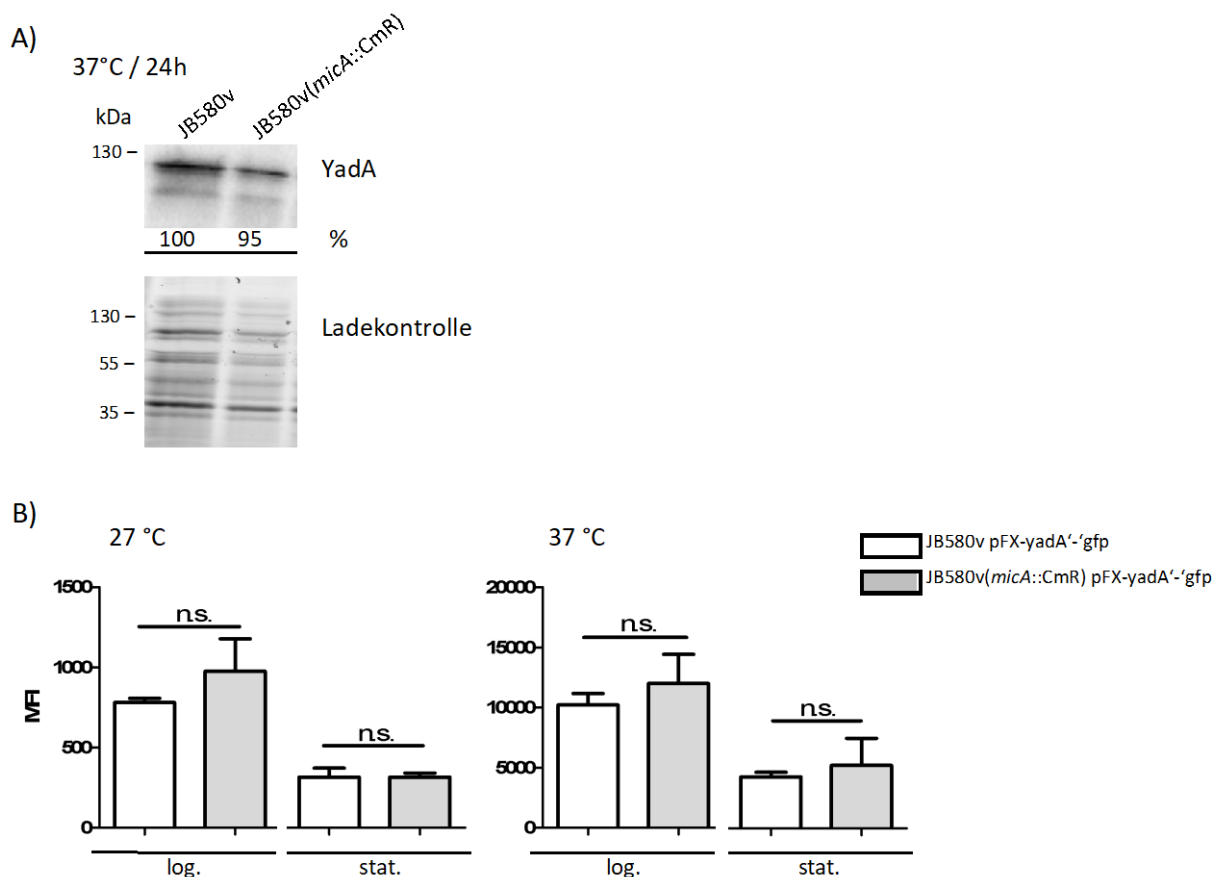


Abb. 18: A) YadA-Immunoblot (Ganzzelllysate Anzucht bei 37°C in LB-Medium) mit Kaninchen anti-YadA Serum. Es zeigt sich kein wesentlicher Unterschied der Produktion im Vergleich: Ausgangsstamm (100%) und Mutante (95%). (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab). **B)** Auch in der FACS-Analyse kann kein Einfluss von MicA auf die Produktion von YadA im Sinne einer Reporter-GFP Messung (YadA'-GFP) festgestellt werden, sowohl in der log.-(4h)- als auch stat.-(24h)-Wachstumsphase. (n=9 – Standardabweichung – Statistik mittels GraphPad Prism „unpaired student t-test“ – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

3.10.1.2. Einfluss von MicA auf InvA-Produktion

Auch hier wurde zuerst die Bindungsenergie von MicA mit InvA mittels IntaRNA rechnerisch ermittelt (Abb. 19). Die Bindungsenergie der Interaktion von MicA mit der 5'UTR des *invA*-Gens liegt bei -6,1 kcal/mol, die Hybridisierungsenergie bei -10,9 kcal/mol. MicA sollte auch mit der kodierenden *invA*-mRNA interagieren (Bindungsenergie von -7,9 kcal/mol und einer Hybridisierungsenergie von -12,1 kcal/mol). Diese Werte lassen darauf schließen, dass es zu einer Interaktion kommt, die auf die Produktion von InvA einwirken kann.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, wird die Produktion von InvA in Abwesenheit von MicA verstärkt. Dies kann man sowohl den Daten der Immunoblots entnehmen, als auch den FACS-Analysen (Abb. 20). Im Immunoblot zeigt sich eine um > 30% gesteigerte InvA-Produktion. Daraus lässt sich schließen, dass die sRNA *micA* wahrscheinlich die mRNA des Invasin A destabilisiert.



Abb. 19: A) Interaktion komplementärer Bereiche der sRNA MicA mit der 5'-UTR der mRNA für InvA. B) Interaktion der sRNA MicA mit der InvA-kodierenden Sequenz der mRNA.

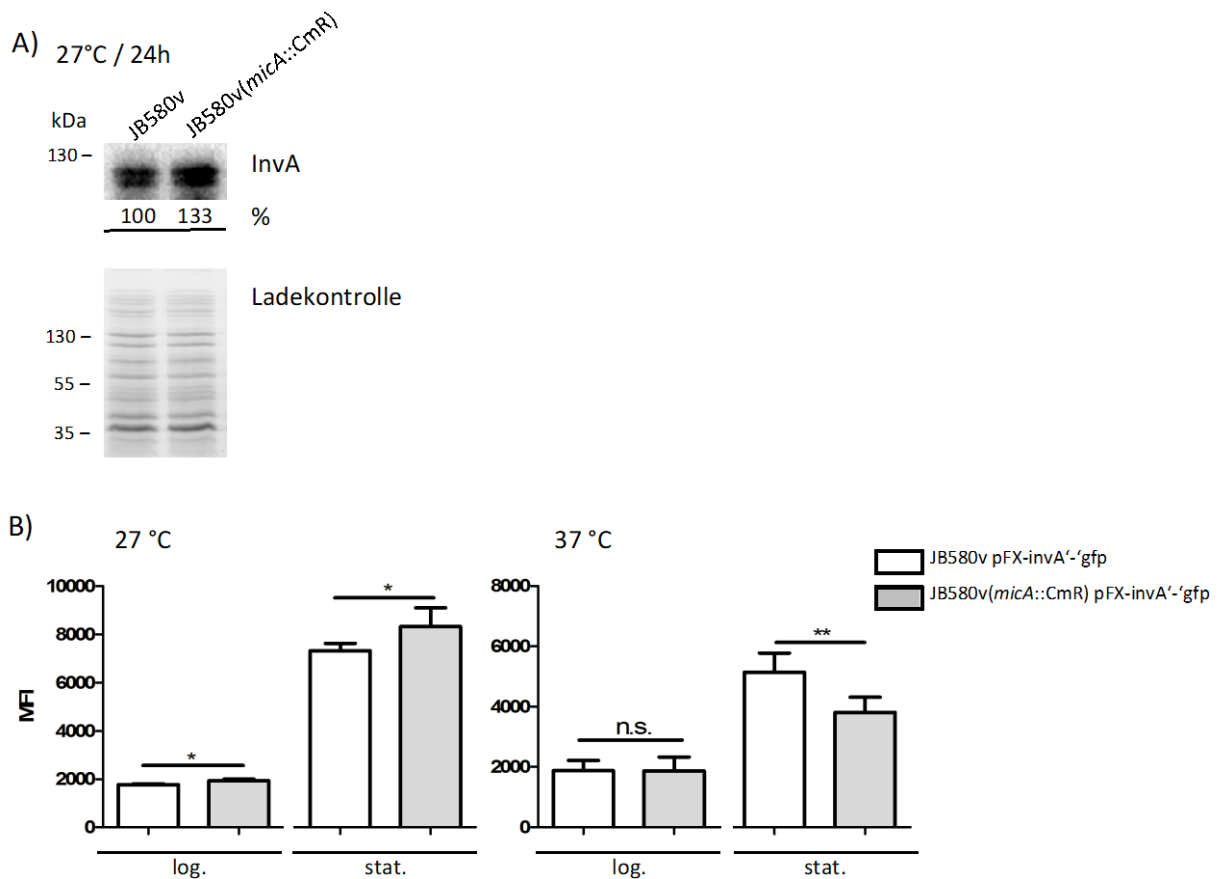


Abb. 20: A) InvA-Immunoblot (Ganzzelllysate Anzucht bei 27°C in LB-Medium) mit Kaninchen anti-InvA Serum. In der *micA*-Deletionsmutante wird mehr InvA produziert als im Ausgangsstamm. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab). B) Ebenfalls in der FACS-Analyse zeigt sich ein Einfluss von *MicA* auf die Produktion von InvA. Auch hier kommt es in Abwesenheit von *micA* zu einer vermehrten Produktion von Invasin (InvA'-GFP), insbesondere bei 27°C Anzuchttemperatur, der optimalen Temperatur für die *invA*-Genexpression. (n=9 – Standardabweichung – Statistik mittels GraphPad Prism „unpaired student t-test“ – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

Die Immunoblots wurden mit Gesamtproteinextrakten und Membranproteinproben (Daten nicht dargestellt) durchgeführt. Beide Methoden ergaben übereinstimmende Ergebnisse. Die bevorzugte Temperatur für die Herstellung der Proteinproben liegt bei 27°C, der optimalen Temperatur für die *invA*-Genexpression.

3.10.1.3. Einfluss von *MicA* auf Ail- und OmpX-Produktion

Ail und OmpX sind äußere Membranproteine mit Adhäsionsfunktion. Mögliche Interaktion der sRNA *MicA* mit den Sequenzen der 5'UTR und der kodierenden mRNA von *ail* und *ompX* mittels IntaRNA sind in Abbildung 21 dargestellt.

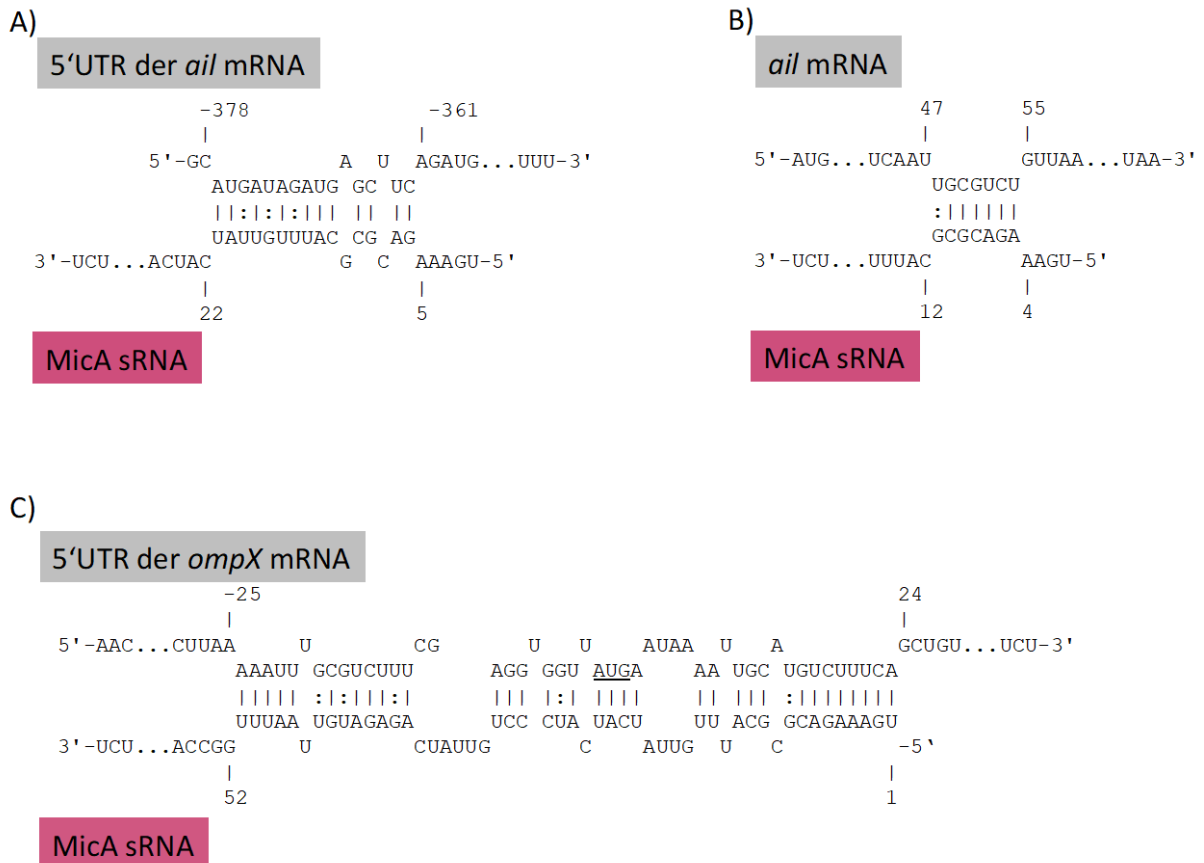


Abb. 21: A) Interaktion der sRNA MicA mit komplementären Bereichen der 5'-UTR der mRNA für Ail. Es ergibt sich eine Bindungsenergie von -8,3 kcal/mol und eine Hybridisierungsenergie von -12,7 kcal/mol. B) Interaktion der sRNA MicA mit der Ail-kodierenden mRNA. Es ergibt sich eine Bindungsenergie von -6,8 kcal/mol und eine Hybridisierungsenergie von -10,2 kcal/mol. C) Interaktion der sRNA MicA mit dem 5'UTR-Bereich sowie dem Anfang der OmpX-kodierenden Sequenz der mRNA. Die berechnete Bindungsenergie ergab -16,1 kcal/mol, die Hybridisierungsenergie -30,9 kcal/mol.

Aufgrund der hohen kalkulierten negativen Energiewerte kann durch die Interaktion von MicA sowohl mit *ail* als auch *ompX* ein Effekt in der Genexpression erwartet werden. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Immunoblotanalysen der JB580v(*micA*::CmR)-Mutante gegenüber dem Ausgangsstamm JB580v. Die Produktion von Ail ist bei 27°C unbeeinflusst von MicA. Jedoch führt bei 37°C die Abwesenheit von MicA zu einer um bis zu 45% gesteigerten Ail-Produktion (Abb. 22 A). Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass MicA bei 37°C zu einer Destabilisierung der mRNA von *ail* führt und diese somit nicht mehr gut für die Ribosomen zugänglich ist und wahrscheinlich vorzeitig degradiert wird.

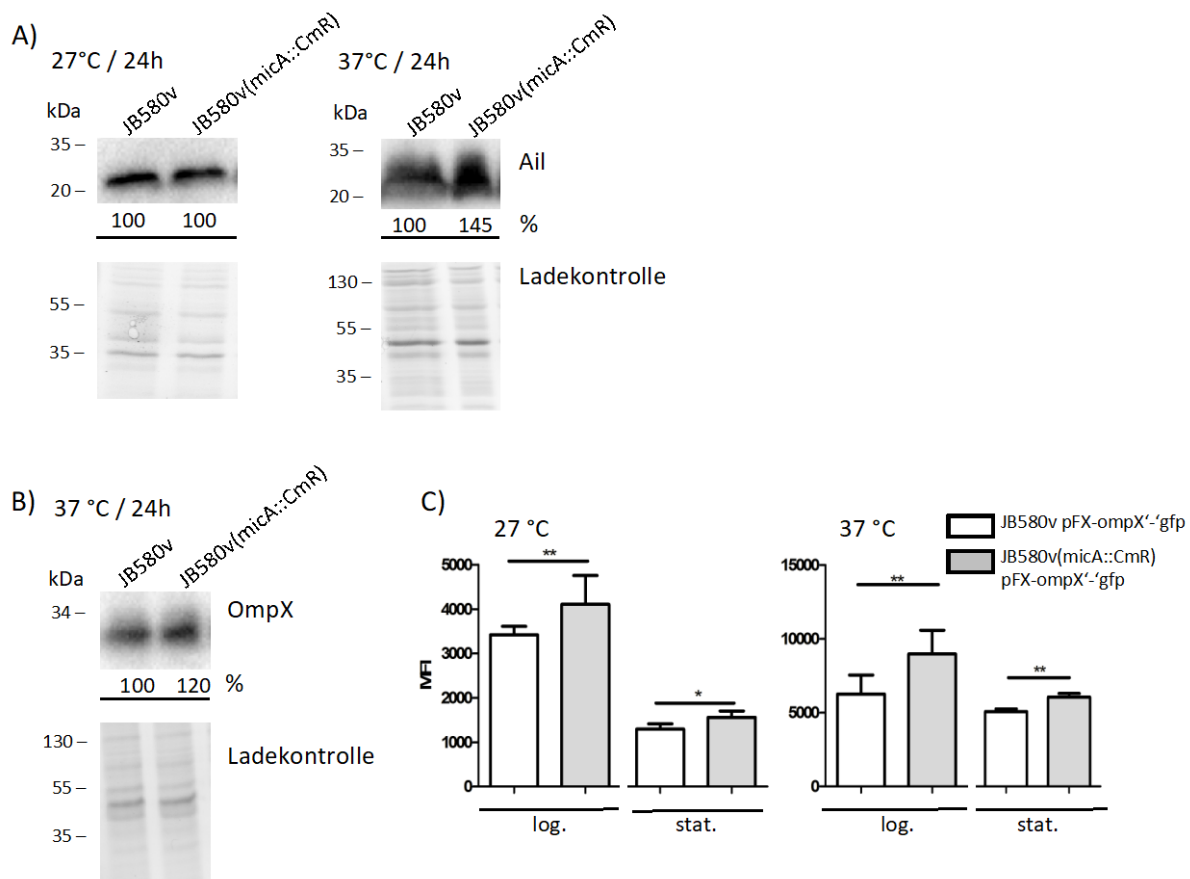


Abb. 22: A) Ail- Immunoblot über Ganzzelllysate von JB580v und JB580v(micA::CmR). Bei den 27°C-Proben zeigt sich kein Einfluss von MicA auf die Ail-Produktion. In Abwesenheit von MicA kommt es bei 37°C zu einer gesteigerten Produktion von Ail. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab). B) OmpX-Immunoblot über Ganzzelllysate von JB580v und JB580v(micA::CmR). Exemplarisch bei 37°C. In Abwesenheit von MicA kommt es zu einer leicht gesteigerten Produktion des OmpX. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab). C) FACS-Analyse zum OmpX-Nachweis. Es zeigt sich sowohl bei 27°C als auch bei 37°C eine verstärkte Produktion der Reporterfusion in Abwesenheit von MicA. (n=9 – Standardabweichung – Statistik mittels GraphPad Prism „unpaired student t-test“ – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

Im OmpX-Immunoblot zeigt sich eine ähnliche Tendenz wie bei Ail (Abb. 22 B). In Abwesenheit von MicA kommt es zu einer stärkeren Produktion von OmpX (ca. 20%). Der Effekt zeigt sich jedoch in geringerem Ausmaß als bei der Untersuchung des Ail-Proteins. In der FACS-Analyse zu *ompX* konnte gezeigt werden, dass auch hier ein leicht signifikanter Effekt nachgewiesen werden kann. In Abwesenheit von MicA kommt es sowohl bei 27°C als auch 37°C zu einer vermehrten Produktion von OmpX'-GFP (Abb. 22 C). Auch in diesem Fall ist davon auszugehen, dass die sRNA MicA destabilisierend auf die mRNA für OmpX einwirkt.

3.10.1.4. Einfluss von MicA auf OmpA-Produktion

Für eine mögliche Interaktion der sRNA MicA mit der mRNA von *ompA* für den 5'UTR-Bereich ergeben sich günstige Energiewerte (Bindungsenergie = -12 kcal/mol und Hybridisierungsenergie = -14 kcal/mol) (Abb. 23 A). Auch in der kodierenden mRNA-

Sequenz gibt es komplementäre Sequenzen zur sRNA MicA für eine Beeinflussung der OmpA-Produktion (Abb. 23 B).

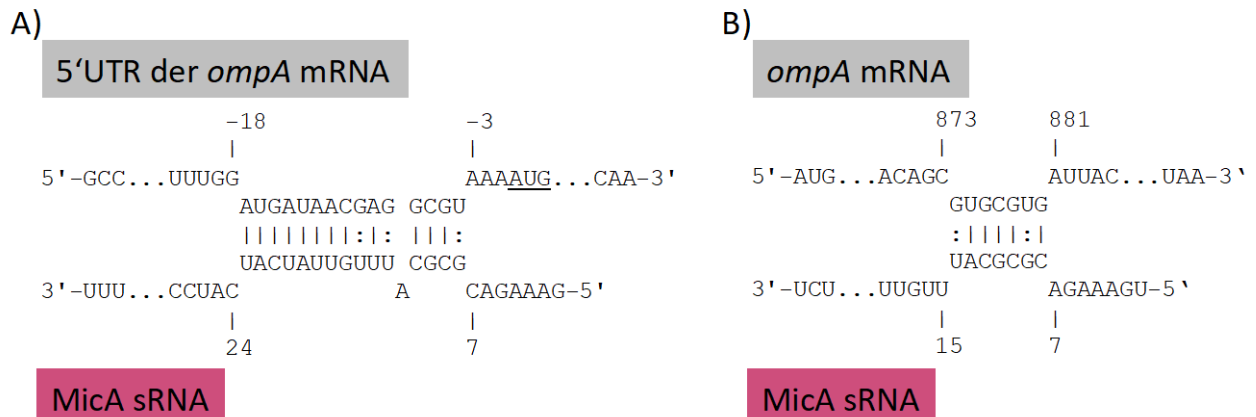


Abb. 23: A) Komplementärer Bereich der sRNA MicA mit der 5'UTR der mRNA für OmpA (Startkodon AUG unterstrichen). Mittels IntaRNA konnte eine Bindungsenergie von -12 kcal/mol und einer Hybridisierungsenergie von -14 kcal/mol bestimmt werden. B) Komplementärer Bereich der sRNA MicA mit der mRNA für OmpA. Die Bindungsenergie konnte mit -5,3 kcal/mol ermittelt werden, die Hybridisierungsenergie liegt bei -9,9 kcal/mol.

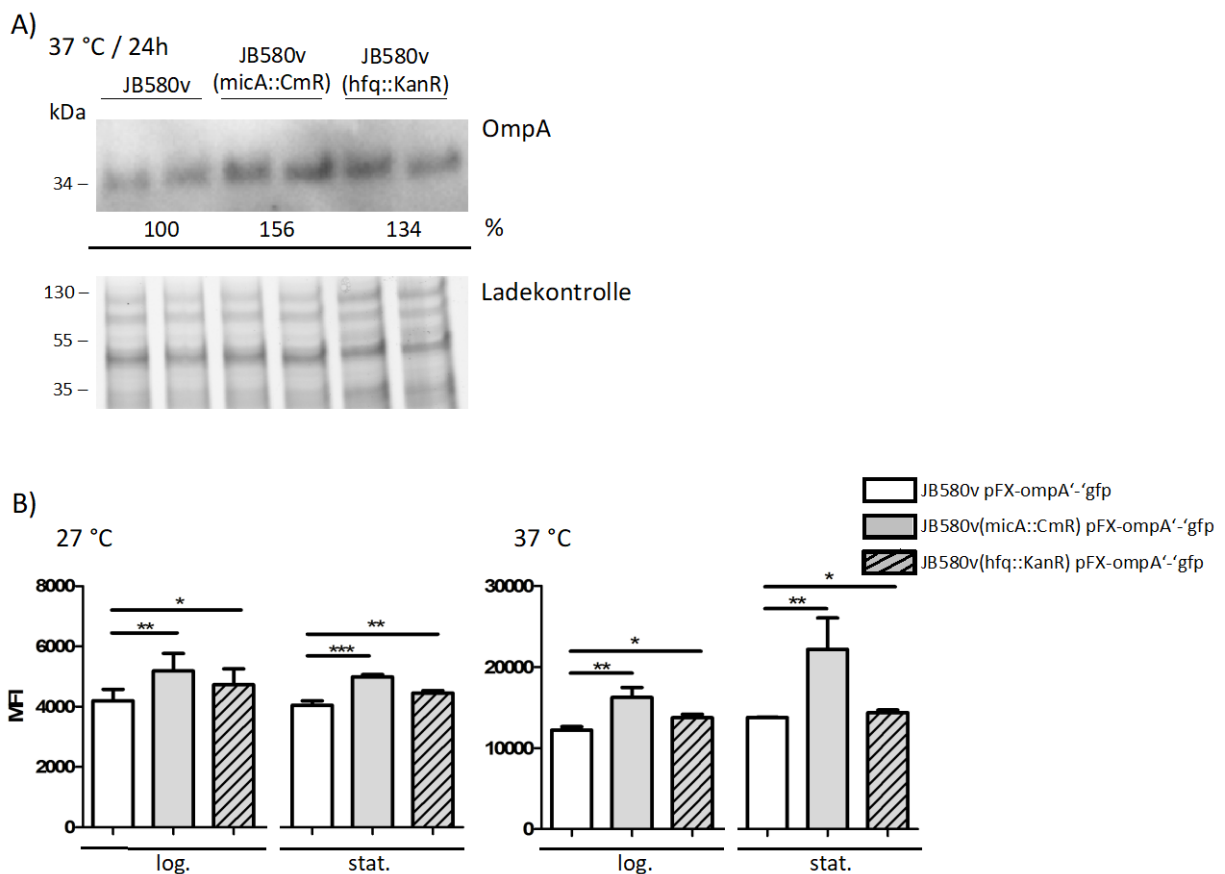


Abb. 24: A) OmpA-Immunoblot von Ganzzelllysaten (LB-Medium) von JB580v(micA::CmR) und JB580v(hfq::KanR) im Vergleich zum Ursprungstamm. Sowohl in Abwesenheit von MicA als auch Hfq kommt es zu einer vermehrten Produktion von OmpA. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab). B) In der FACS-Analyse zeigt sich ebenfalls, dass in Abwesenheit von MicA und Hfq OmpA verglichen mit JB580v stärker transkribiert wird (Anzuchttemperatur 27°C bzw. 37°C). (n=9 – Standardabweichung– Statistik mittels GraphPad Prism „unpaired student t-test“ – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

Aufgrund der hohen Komplementarität von MicA mit OmpA-mRNA wurden Immunoblot-Experimente durchgeführt. Sowohl in den Membranproteinextrakten (Daten nicht dargestellt), als auch in den Ganzzelllysaten (Abb. 24 A) zeigt, dass die Abwesenheit des *micA*-Gens die Produktion von OmpA um ca. 50% verstärkt. Dieser Effekt ist auch in der Hfq-Mutante feststellbar (ca. 30%).

Auch in den folgenden FACS-Analysen zeigt sich für die MicA- und Hfq-Mutante eine verstärkte OmpA'-GFP-Produktion (Abb. 24 B).

Damit wurde die Annahme bestätigt, dass MicA eine destabilisierende Wirkung und somit einen direkten Einfluss auf die mRNA von OmpA hat.

3.10.1.5. Einfluss von MicA auf MyfA-Produktion

Für die Berechnung der MicA sRNA Interaktion mit der 5'UTR der mRNA des *myfA*-Gens ergab mit IntaRNA keine komplementären Bereiche. Dagegen konnte ein komplementärer Bereich im Sequenzbereich der MyfA-kodierenden mRNA (Bindungsenergie von -7,5 kcal/mol und einer Hybridisierungsenergie von -14 kcal/mol) nachgewiesen werden (Abb. 25).

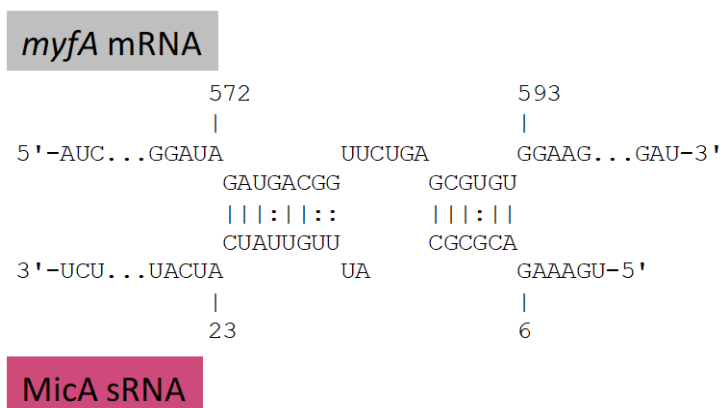


Abb. 25: Komplementärer Bereich von sRNA MicA mit mRNA von MyfA.

Inwieweit diese relative schwachen Energiewerte zu einer direkten Beeinflussung der MyfA-Produktion führen, wurde mit MyfA-Immunoblots und MyfA-FACS-Analysen überprüft (Abb. 26).

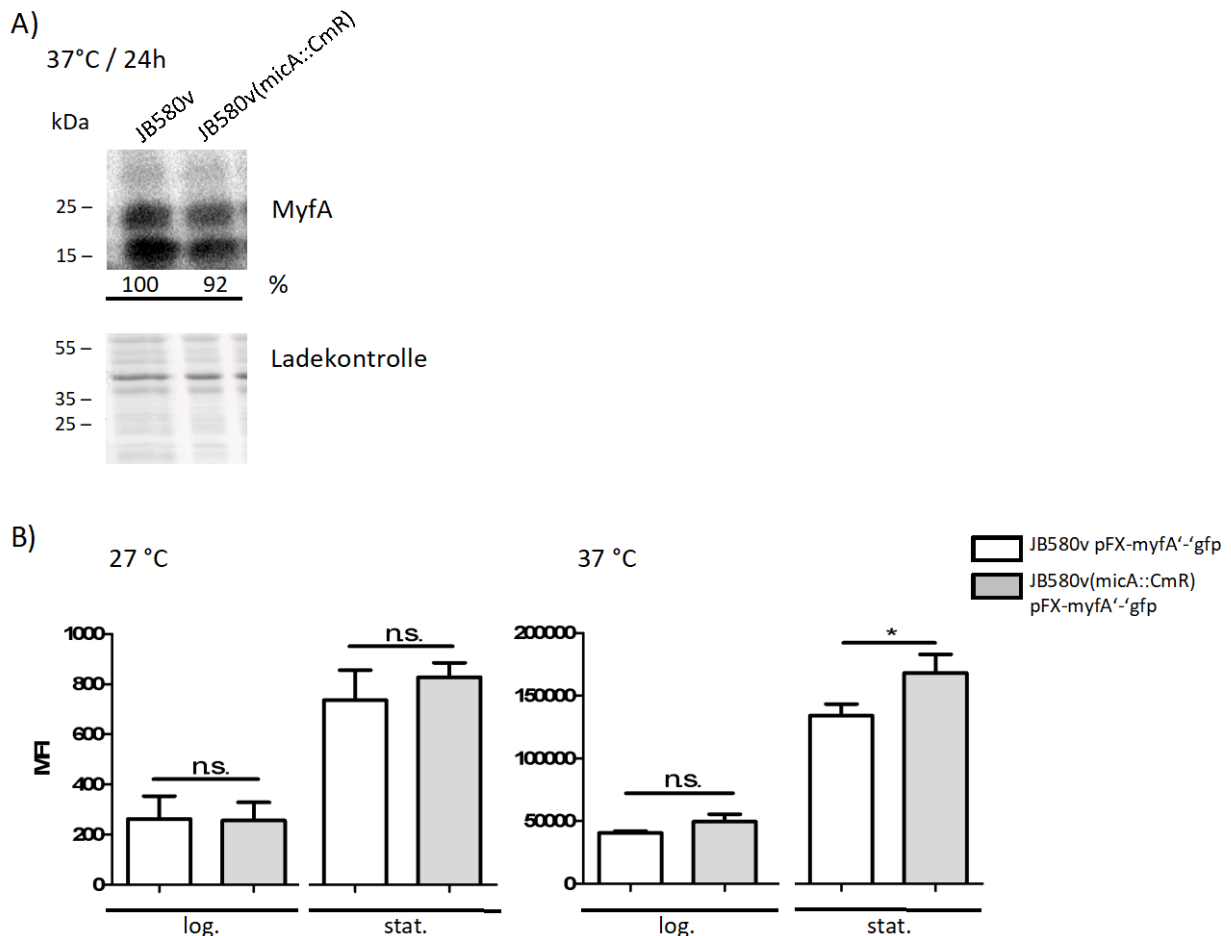


Abb. 26: A) MyfA-Immunoblot von Ganzzelllysaten (37°C-Anzucht in LB) der Stämme JB580v und JB580v(*micA*::CmR). Es zeigt sich kein wesentlicher Einfluss von MicA auf die Produktion von MyfA. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab). B) MyfA-FACS-Analyse der Stämme JB580v und JB580v(*micA*::CmR) (Anzucht bei 27°C und 37°C) zeigen keinen signifikanten Einfluss MicA auf die MyfA-Produktion. (n=9 – Standardabweichung – Statistik mittels GraphPad Prism „unpaired student t-test“ – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

Die Immunoblotanalysen und die FACS-Analysen zeigen übereinstimmend keinen signifikanten Einfluss von MicA auf die Proteinproduktion von MyfA.

3.10.1.6. Einfluss von MicA auf LPS-Produktion

Es ist bekannt, dass die Biosynthese von LPS bei Yersinien temperatur-abhängig ist: Bei 27°C Anzucht wird vermehrt langkettiges LPS und bei 37°C vermehrt kurzketziges LPS produziert (im SDS-PAGE nach Silberfärbung als „Leiter“ erkennbar). Wahrscheinlich ist der LPS-O-Antigen-Längenregulator Wzz temperaturabhängig (s. Abb. 4 S. 29).

Die LPS-Produktion des Ausgangsstammes JB580v wurde mit der *micA*- bzw. *hfq*-Mutante verglichen. Es zeigt sich, dass es in Abwesenheit von MicA zu vermehrtem LPS mit O-spezifischen Polysaccharidblöcken kommt (LPS-Leitermuster) (Abb. 27).

Als weiterer Kontrollstamm wurde die Hfq-Mutante verwendet. Wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe publiziert, zeigt die *hfq*-Mutante eine vermehrte Produktion von langkettigem LPS (Kakoschke et al. 2016).

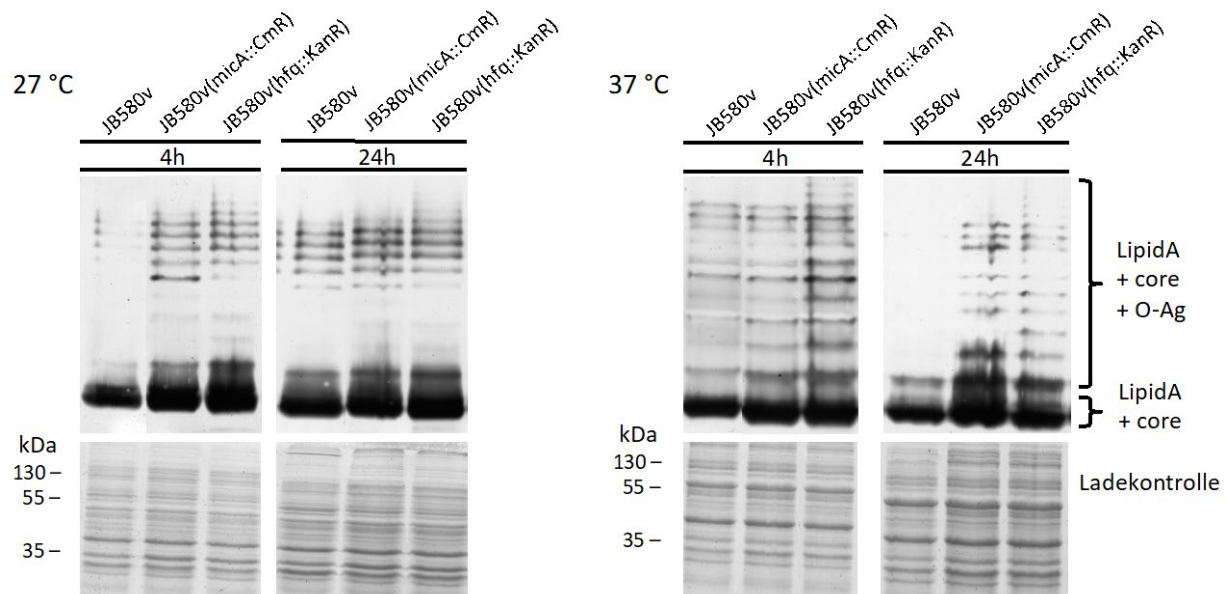


Abb. 27: LPS-SDS-PAGE nach Silberfärbung (obere Bildhälfte) und SDS-PAGE zur Kontrolle (untere Bildhälfte) Proben der Stämme JB580v, JB580v (*micA::CmR*) und JB580v(*hfq::KanR*) nach Anzucht bei 27°C bzw. 37°C in RPMI. Sowohl bei beiden Temperaturen als auch in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase zeigt sich in Abwesenheit von MicA eine vermehrte Produktion von langkettigem LPS. Insbesondere die Bestandteile Lipid A und das Core werden vermehrt gebildet. (n=3).

Die LPS-Analysen wurden mit Yersinien, die in unterschiedlichen Medien (LB, RPMI und BHI) angezogen wurden, durchgeführt. Am deutlichsten stellt sich der Effekt in RPMI dar (Abb. 27). LB- und BHI-Kulturen der Stämme zeigen weder qualitative noch deutlich quantitative Unterschiede zwischen Ausgangsstamm, MicA- und Hfq-Mutante.

3.10.2. Posttranskriptionelle Regulation von Virulenzfaktoren durch RybB

Wie bereits in 3.2. beschrieben konnte keine Deletionsmutante für die sRNA RybB generiert werden. Daher wurde der Einfluss der RybB-Überexpression auf die Expression der Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* untersucht. Da MicA und RybB häufig ähnliche bis identische Inhibition von mRNAs bewirken, wäre ein Parallelversuch mit pBAD-*micA* angezeigt. Jedoch konnte wie bereits in 3.3. beschrieben kein Überexpressionsvektor für MicA generiert werden.

3.10.2.1. Einfluss von RybB auf YadA-Produktion

Mittels IntaRNA wurde die mögliche Interaktion zwischen der sRNA RybB mit der 5'UTR des *yadA*-Gens und der Gensequenz bestimmt (Abb. 28). Es zeigt sich eine für die 5'UTR eine Bindungsenergie von -8,8 kcal/mol und eine Hybridisierungsenergie von -12,7 kcal/mol. In der kodierenden Sequenz des *yadA*-Gens zeigt sich einen zweiten möglichen

Interaktionsbereich mit einer Bindungsenergie von -10,4 kcal/mol und einer Hybridisierungsenergie von -16,2 kcal/mol.

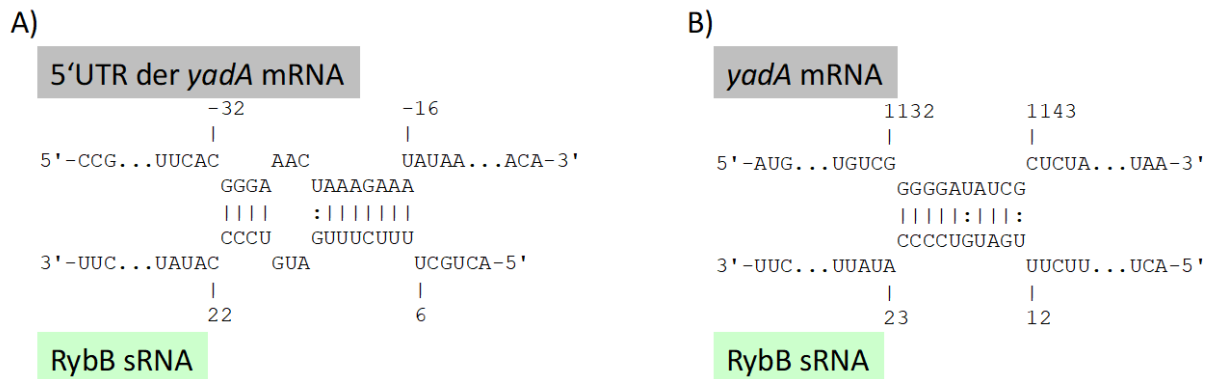


Abb. 28: A) Komplementärer Bereich der sRNA RybB mit der 5'UTR der mRNA für YadA. B) Komplementärer Bereich der sRNA RybB mit dem kodierenden Bereich der mRNA für YadA.

Beide Interaktionen aus Abbildung 28 weisen durch die starken Bindungsenergien auf einen Einfluss der sRNA RybB auf die Proteinproduktion des YadA hin.

Eine induzierte Überexpression von RybB im Stamm JB580v pBAD-*rybB* (s. Tab. 1 Abschnitt 2.1.1.) führt zu einer vermehrten YadA-Produktion verglichen mit dem Ausgangsstamm (Abb. 29 – YadA-Immunoblot). In der exponentiellen (log.) Phase wird die YadA-Produktion um etwa 60 % und in der stationären (stat.) Phase um etwa 100% gesteigert.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die mRNA des *yadA*-Gens durch RybB stabilisiert wird und es daher zu einer vermehrten Produktion von YadA kommt.

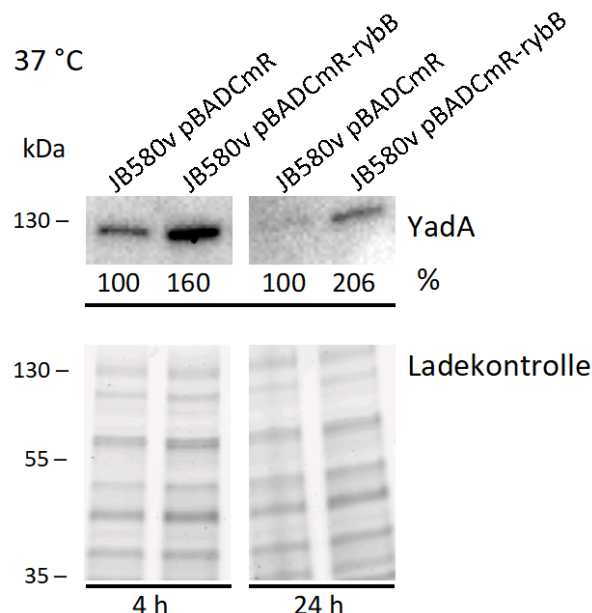


Abb. 29: YadA-Immunoblot aus Ganzzelllysaten (Anzucht 37°C in LB): Es zeigt sich sowohl in der log.- (4h) als auch der stat.- (24h) Phase nach densitometrischer Auswertung eine stark vermehrte YadA-Produktion bei Überexpression von RybB (JB580v pBADcMr-*rybB*) im Vergleich zum Ausgangsstamm JB580v pBADcMr. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

3.10.2.2. Einfluss von RybB auf InvA-Produktion

Komplementäre Sequenzbereiche von RybB mit der 5'UTR und dem kodierenden Bereich der *invA*-mRNA sind in Abbildung 30 dargestellt. Für die 5'UTR ergibt sich eine Bindungsenergie -7,3 kcal/mol, sowie eine Hybridisierungsenergie -17,6 kcal/mol. Im kodierenden Bereich wurde eine Bindungsenergie von -14,1 kcal/mol und eine Hybridisierungsenergie von -18,5 kcal/mol berechnet. Daraus lässt sich schließen, dass RybB auf die InvA-Produktion einwirken kann.

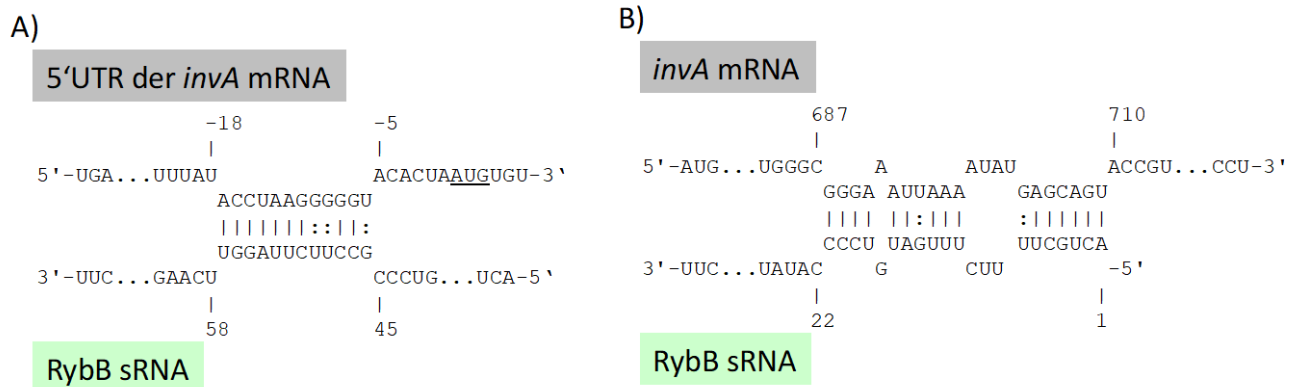


Abb. 30: A) Mittels IntraRNA berechnete Interaktion komplementärer Bereich der sRNA RybB mit der 5'UTR des *invA*-mRNA. B) Komplementärer Bereich von RybB in der *invA*-kodierenden mRNA (Startkodon AUG unterstrichen).

Im InvA-Immunoblot zeigt sich in der exponentiellen Phase eine vermehrte InvA-Produktion bei Überexpression der sRNA RybB im Vergleich zum Ausgangsstamm. In der stationären Phase kommt es zu einer verminderten Produktion von InvA.

RybB scheint bei diesem Virulenzfaktor eine wachstumsphasen-abhängige Wirkung auf die Stabilität der mRNA zu haben. In der exponentiellen Phase wird die mRNA wahrscheinlich stabilisiert und für die Ribosomen besser zugänglich gemacht. In der stationären Phase tritt genau der gegenteilige Effekt auf. Die mRNA für InvA wird destabilisiert und eher abgebaut.

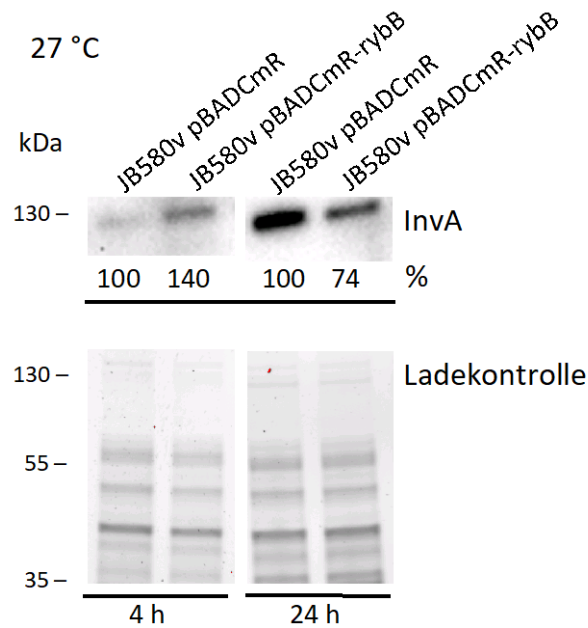


Abb. 31: InvA-Immunoblot aus Ganzzelllysaten. Nach 4h Anzucht (log.-Phase) in LB-Medium bei 27°C konnte eine vermehrte Produktion an InvA bei Überexpression von RybB im Vergleich zum Ausgangsstamm. Nach 24 h (stat.-Phase) kommt es bei RybB-Überexpression zu einer verminderten Produktion von InvA. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

3.10.2.3. Einfluss von RybB auf Ail- und OmpX-Produktion

Mittels IntaRNA wurden auch komplementäre Bereiche von RybB mit *ail*- und *ompX*-mRNA berechnet (Abb. 32). Die Ergebnisse weisen auf eine Interaktion im 5'UTR als auch im kodierenden Bereich der *ail*-mRNA auf einen Effekt in der Proteinproduktion von Ail hin. Auch in der 5'UTR und den kodierenden Bereich der *ompX*-mRNA konnten Interaktionen ermittelt werden, die ebenfalls einen Effekt vermuten lassen, jedoch aufgrund der niedrigeren Energiewerte mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit.

Die Überexpression von RybB zeigt sowohl auf die Produktion von Ail als auch OmpX einen positiven Effekt (Abb. 33). Es kann gefolgert werden, dass RybB die mRNA von Ail und OmpX stabilisiert und somit zu einer gesteigerten Produktion beiträgt.

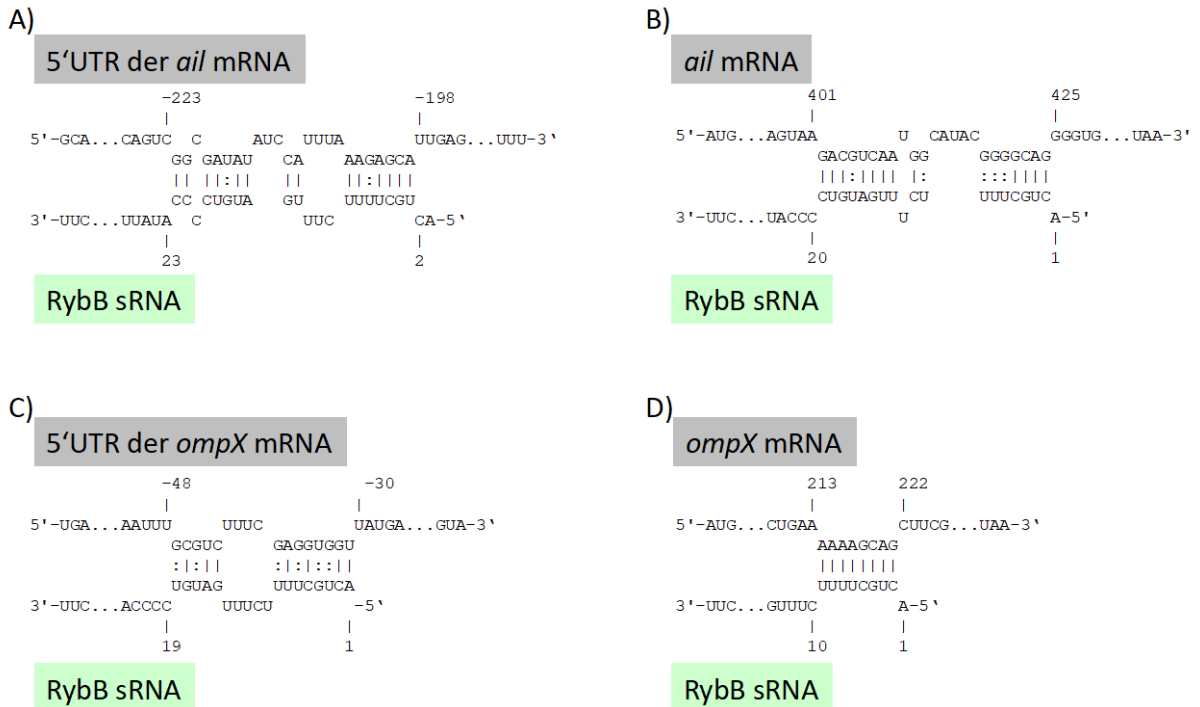


Abb. 32: Mittels IntaRNA berechnete komplementäre Bereiche zwischen RybB und der mRNA für Ail (A,B) und für OmpX (C,D). A) RybB/5'UTR der mRNA für Ail: Bindungsenergie von -5,1 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -11,3 kcal/mol. B) RybB/mRNA für Ail: Bindungsenergie von -10,2 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -16,5 kcal/mol. C) RybB/5'UTR für OmpX: Bindungsenergie von -3,5 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -10,6 kcal/mol. D) RybB/mRNA für OmpX: Bindungsenergie von -6,6 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -9 kcal/mol.

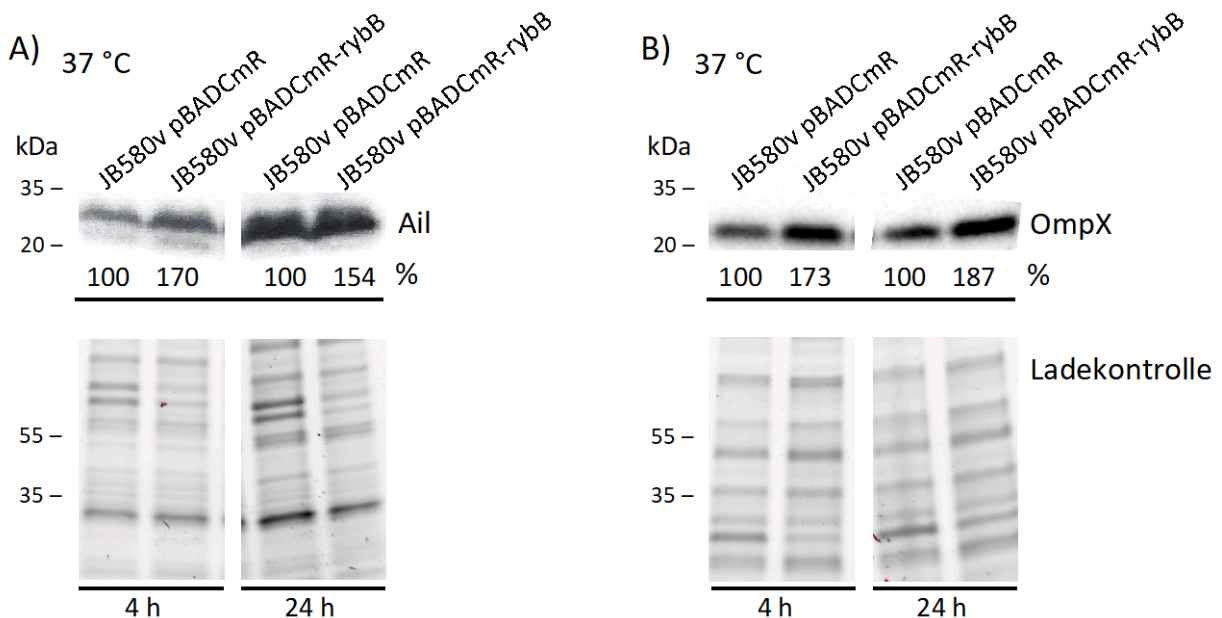


Abb. 33: A) Ail-Immunoblot aus Ganzzelllysate (Anzucht bei 37°C – log.-Phase (4h) und stat.-Phase (24h)): Sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase kommt es bei Überexpression von RybB zu einer vermehrten Produktion von Ail. B) OmpX-Immunoblot aus Ganzzelllysate (Anzucht bei 37°C – log.-Phase (4h) und stat.-Phase (24h)): Die Überexpression von RybB führt einer vermehrten Produktion von OmpX in der exponentiellen und der stationären Phase. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

3.10.2.4. Einfluss von RybB auf LPS-Produktion

Der Einfluss von RybB auf die LPS-Produktion wurde zwischen JB580v pBADCmR (Kontrolle) und dem überproduzierenden Stamm JB580v pBADCmR-*rybB* vergleichend mittels SDS-PAGE-Silberfärbung analysiert. Es zeigt sich eine leicht verminderte Produktion von LPS in dem JB580v pBADCmR-*rybB* Stamm im Vergleich zum Ausgangsstamm JB580v pBADCmR (Abb. 34). Insbesondere bei 27°C in der exponentiellen Phase ist der Effekt deutlicher (Abb. 34 A).

Sowohl bei beiden Temperaturen als auch in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase zeigt sich bei Überexpression von RybB eine leicht verminderte Produktion an LPS verglichen mit dem Ausgangsstamm JB580v pBADCmR.

Dieser Versuch wurde mit LB und BHI-Proben ebenfalls durchgeführt und zeigt auch in diesen Fällen eine ähnliche Tendenz mit leicht verminderter LPS-Produktion bei vermehrtem RybB (Daten nicht dargestellt).

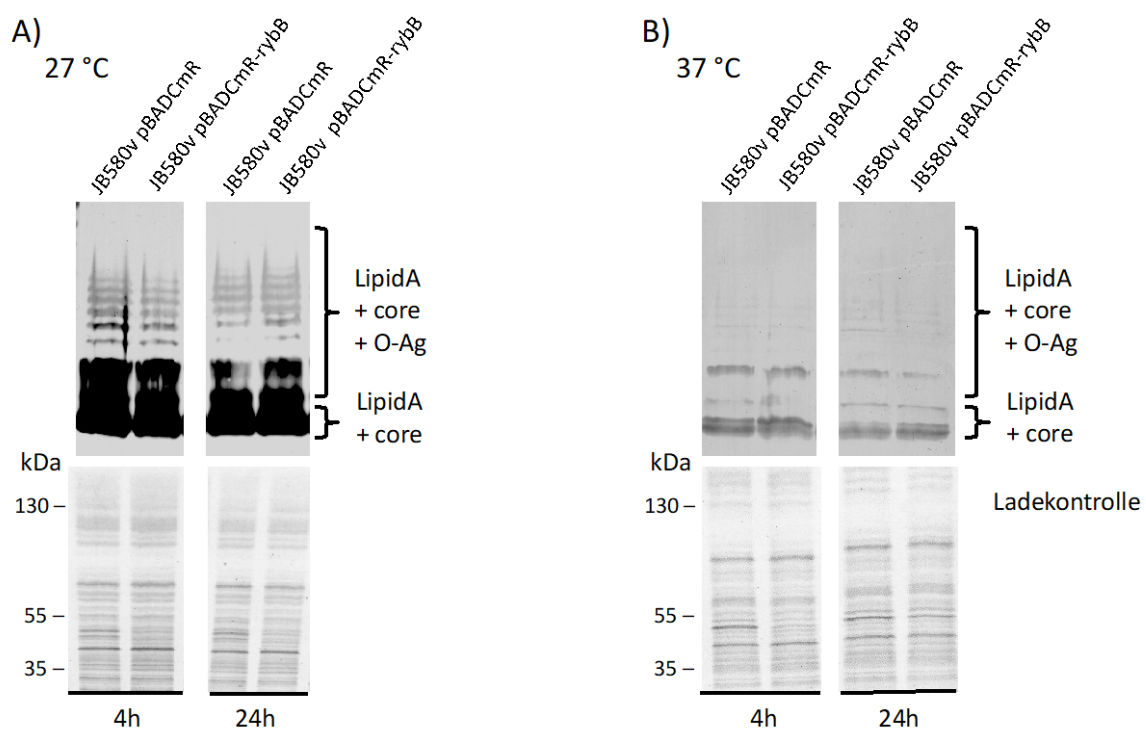


Abb. 34: Silberfärbung des LPS von Yersinien (nach Protease K-Verdau) kultiviert in RPMI nach 4h (log. Phase) und 24h (stat.-Phase) bei A) 27 °C und B) 37°C. (n=3).

3.10.3. Posttranskriptionelle Regulation von Virulenzfaktoren durch CyaR

3.10.3.1. Einfluss von CyaR auf YadA-Produktion

Mittels IntaRNA Berechnung konnten komplementäre Sequenzbereiche zwischen CyaR und der mRNA von *yadA* festgestellt werden. Es zeigt sich, dass in der 5'UTR eine schwache Interaktion möglich ist (Abb. 35 A). Mit der kodierenden *yadA*-mRNA-Sequenz konnten

höhere Bindungs- und Hybridisierungsenergien zur sRNA CyaR identifiziert werden (Abb. 35 B).

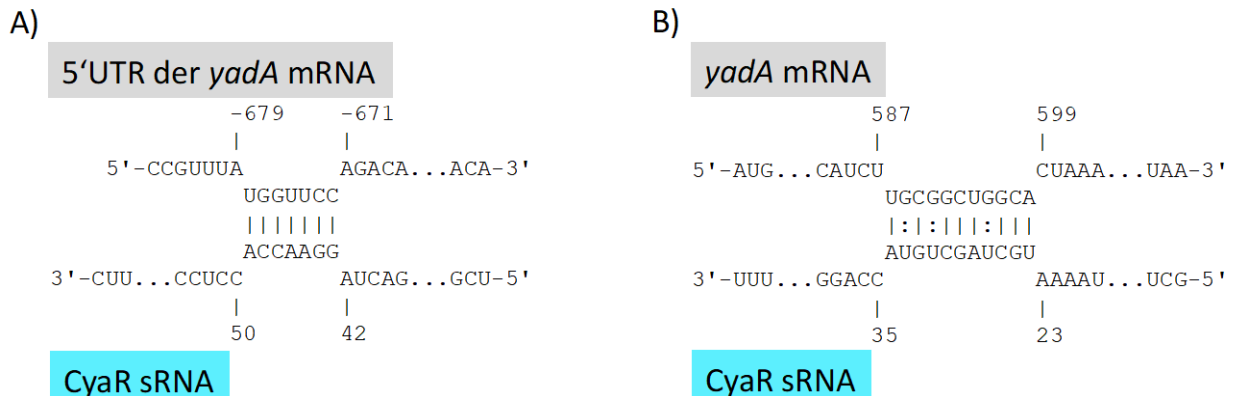


Abb. 35: A) Komplementärer Bereich der sRNA CyaR mit der 5'UTR der mRNA für YadA: Bindungsenergie von -5,6 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -11,3 kcal/mol. B) Komplementärer Bereich der sRNA CyaR mit dem kodierenden Bereich der mRNA für YadA: Bindungsenergie von -11,5 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -17,2 kcal/mol.

Im Vergleich zum Ausgangsstamm JB580v zeigt sich im Immunoblot eine um 20 – 30 % verminderte YadA-Produktion bei Überexpression der sRNA CyaR (Abb. 36). Eine plausible Erklärung wäre, dass CyaR die YadA-kodierende mRNA destabilisiert und zu einer Degradation derselben führen könnte.

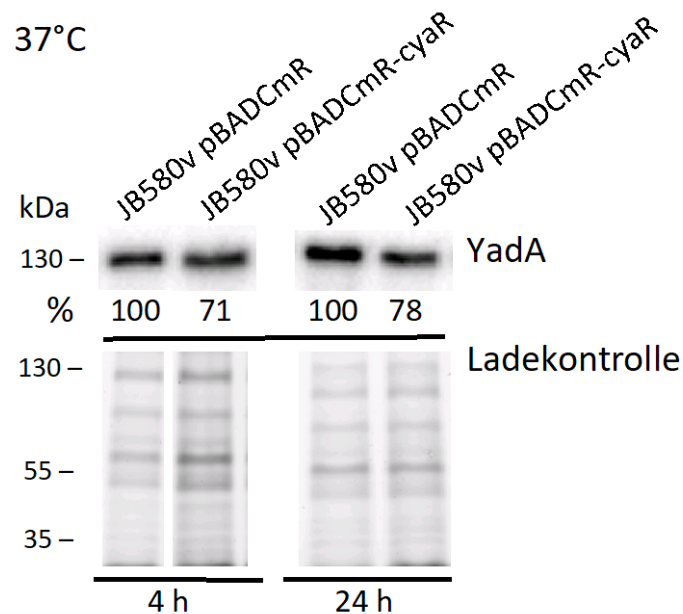


Abb. 36: YadA-Immunoblot von Ganzzelllysaten (Anzucht bei 37°C in LB für 4h bzw. 24h): Bei Überexpression von CyaR kommt es zu einer leicht verminderten Produktion von YadA, sowohl in der exponentiellen als auch der stationären Phase. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

3.10.3.2. Einfluss von CyaR auf Ail- und OmpX-Produktion

Mittels IntaRNA Berechnung konnten komplementäre Sequenzbereiche zwischen CyaR und der mRNA von *invA* festgestellt werden.

Im Bereich der 5'UTR der *ail*-mRNA wurden nur geringe Energiewerte (Bindungsenergie -3,9 kcal/mol/ Hybridisierungsenergie -7,3 kcal/mol) bestimmt (Abb. 37 A). Dagegen zeigt die *Ail*-kodierende mRNA-Sequenz eine Interaktion mit wesentlich höheren Energiewerten (Abb. 37 B): die Bindungsenergie liegt bei -9,2 kcal/mol, die Hybridisierungsenergie bei -15,6 kcal/mol.

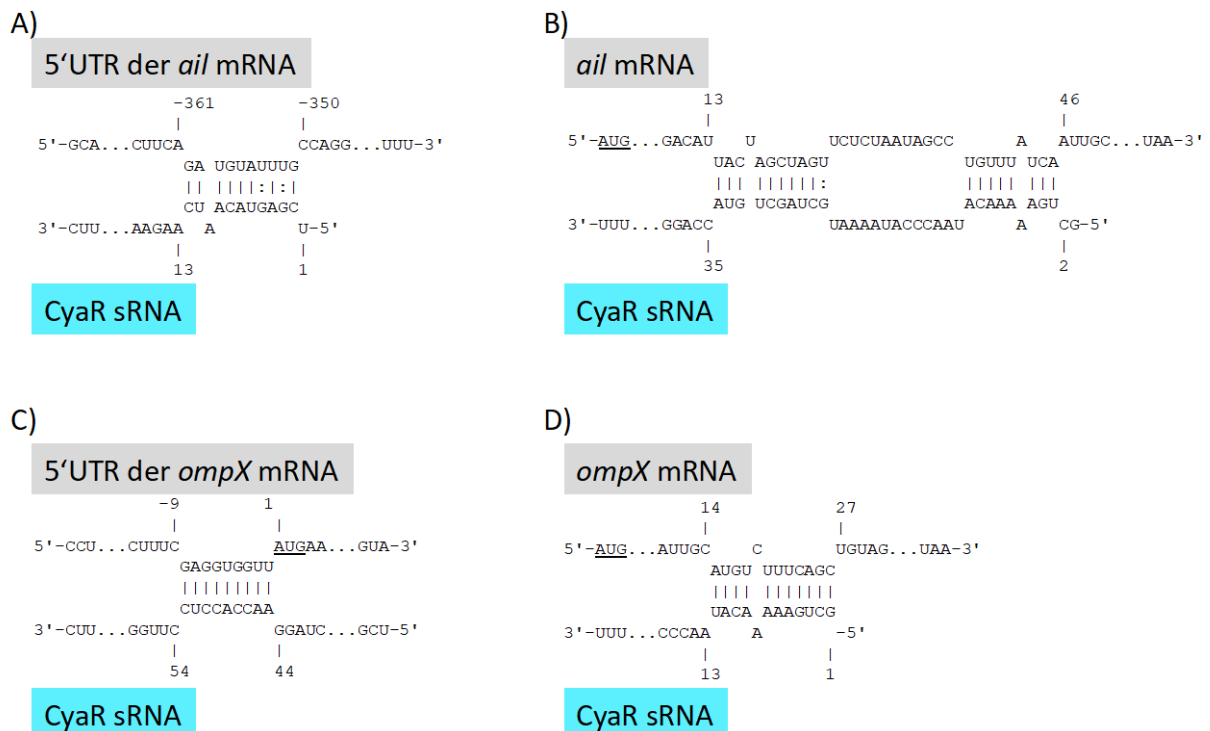


Abb. 37: Mittels IntaRNA berechnete komplementäre Bereiche zwischen CyaR und der mRNA für Ail (A,b) und für OmpX (C,D). A) CyaR/5'UTR der mRNA für Ail: Bindungsenergie von -3,9 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -7,3 kcal/mol. B) CyaR/mRNA für Ail: Bindungsenergie von -9,2 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -15,6 kcal/mol. C) CyaR/5'UTR für OmpX: Bindungsenergie von -8,9 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -15,4 kcal/mol. D) CyaR/mRNA für OmpX: Bindungsenergie von -10,4 kcal/mol und Hybridisierungsenergie von -12,5 kcal/mol.

Die Interaktion von CyaR mit der *ompX*-mRNA zeigt in der 5'UTR eine Bindungsenergie von -8,9 kcal/mol und eine Hybridisierungsenergie von -15,4 kcal/mol. Auch direkt in der Gensequenz kommt es zu einer guten Interaktion (Abb. 37 C und D). Aufgrund dieser berechneten Energiewerte ist von einem Einfluss dieser sRNA auf die OmpX-Produktion auszugehen.

Die Ail-Produktion wird in der exponentiellen Phase, die OmpX-Produktion in der exponentiellen und stationären Phase bei Überexpression von CyaR vermindert (Abb. 38). OmpX ist wie in 1.3.2.2. bereits erwähnt ein Ail-like Protein, daher ist eine ähnliche Tendenz der Wirkung von CyaR auf die Ail-Produktion anzunehmen. Dies deckt sich mit den im Immunoblot ermittelten Daten.

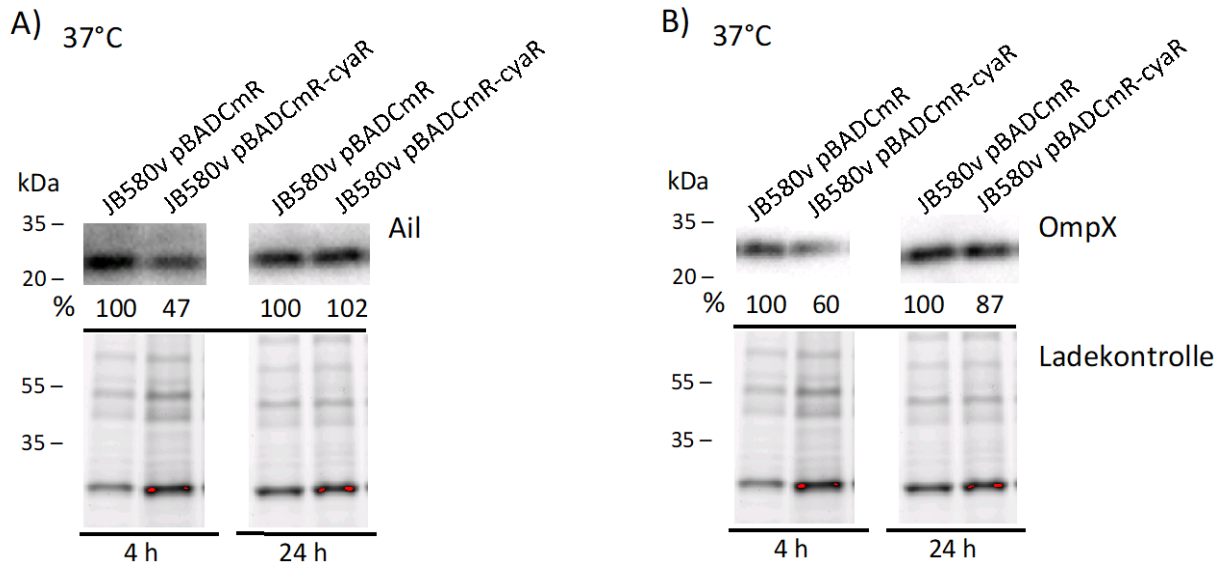


Abb. 38: A) Ail-Immunoblot von Ganzzelllysaten (Anzucht bei 37°C in LB): Bei Überexpression zeigt sich nach 4h (log.-Phase) eine um ca. 50% verminderte Ail-Produktion. In der stationären Phase (24h) ist kein Effekt erkennbar. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab). B) OmpX-Immunoblot von Ganzzelllysaten (Anzucht bei 37°C in LB): Sowohl in der exponentiellen als auch der stationären Phase kommt es zu einer verminderten OmpX-Produktion. Nach 4h um 40%, nach 24 h um ca. 13% vermindert. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

3.11. Einfluss von Hfq und DegP auf die Produktion von Virulenzfaktoren

Ergebnisse zum Einfluss von Hfq auf die Virulenzfaktoren YadA, InvA, Ail, OmpX und MyfA wurden bereits 2016 von unserer Arbeitsgruppe mit mir als Co-Autor publiziert (Kakoschke et al., 2016). Die Wirkung der periplasmatischen Protease DegP auf die in der äußeren Membran befindlichen Adhäsine wurde von Weidrich et al. 2017 auf Basis des WA-314 Ausgangsstammes (*Y. enterocolitica* Serotyp O:8) beschrieben.

Da es sich beim WA-314 Stamm um einen anderen Genotyp bezogen auf den Stamm JB580v handelt, ist eine Überprüfung der JB580v($\Delta degP$)-Mutante berechtigt.

3.11.1. Vergleich der Δhfq - und $\Delta degP$ -Mutanten auf YadA-Produktion

Die Wirkung von Hfq auf YadA wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert (Kakoschke et al., 2016). Es zeigte sich eine verminderte Produktion von YadA bei der Δhfq -Mutante. Auch die Wirkung von DegP, der periplasmatischen Protease, wurde bereits 2017 von Weidrich et al. im Hintergrund des Stammes WA-314 beschrieben. Es gab keinen wesentlichen Unterschied in der YadA-Produktion zwischen der $\Delta degP$ -Mutante und dem Ausgangsstamm. Die Stämme JB580v, JB580v(*hfq::KanR*) und JB580v($\Delta degP$) dienen in den von mir durchgeführten Untersuchungen als Kontrollstämme für die hier neu beschriebene Doppelmutante JB580v(*hfq::KanR*- $\Delta degP$). Abbildung 39 zeigt in der Doppelmutante im Vergleich mit dem Ausgangsstamm JB580v eine verminderte Produktion von YadA um 20 %. Verglichen mit der DegP-Mutante ergibt sich ebenfalls eine verminderte

YadA-Produktion. Wird die Doppelmutante mit der Hfq-Mutante verglichen, ist die YadA-Produktion unverändert (Abb. 39).

Daraus lässt sich folgern, dass in der Doppelmutante JB580v(*hfq*::KanR- Δ *degP*) die Funktion des Hfq-Proteins überwiegt und der Effekt des DegP keinen wesentlichen Einfluss aufweist, weil Hfq einen pleiotropen Effekt hat (Garzetti et al., 2012).

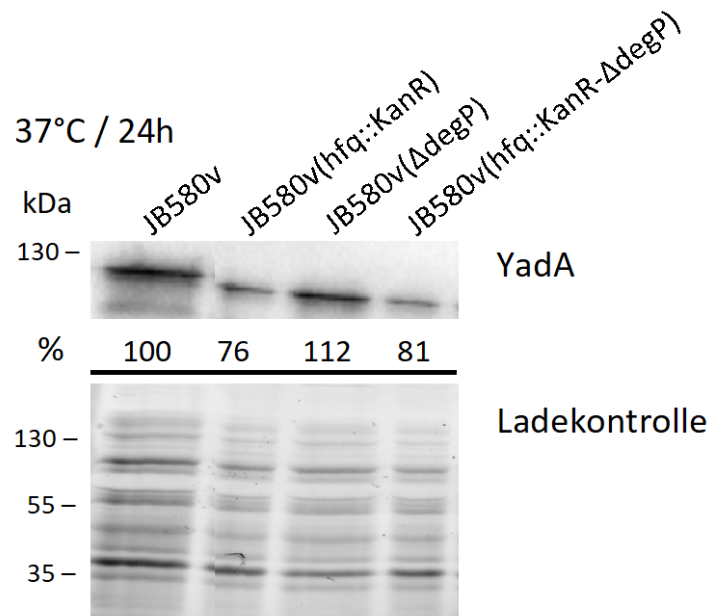


Abb. 39: YadA-Immunoblot von Ganzzelllysaten (Anzucht bei 37°C in LB über 24h): Verglichen mit dem Ausgangsstamm zeigt die JB580v(*hfq*::KanR) eine verminderte YadA-Produktion, JB580v(Δ *degP*) fast gleichbleibende YadA-Produktion und die Doppelmutante JB580v(*hfq*::KanR- Δ *degP*) eine der Δ *hfq*-Mutante gleichartige verminderte Produktion. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

Auch für die exponentielle Phase (4h Anzucht in LB bei 37°C) wurden ähnliche Ergebnisse erhoben (Daten nicht dargestellt).

3.11.2. Vergleich der Δ *hfq*- und Δ *degP*-Mutanten auf *InvA*-Produktion

Wie bereits von unserer Arbeitsgruppe mit mir als Co-Autor publiziert (Kakoschke et al., 2016), wird durch die Abwesenheit von Hfq ca. 30% weniger Invasin im Vergleich mit JB580v produziert. Zu dem in Weidrich et al., 2017 beschriebenen Anstieg der Produktion von *InvA* der DegP-Mutante im Vergleich zum Ausgangsstamm WA-314 konnte im JB580v-Hintergrund ein ähnliches Ergebnis zur DegP-abhängigen *InvA*-Produktion erzielt werden. Die Produktion in der DegP-Mutante ist um ca. 70% verglichen mit dem Ursprungsstamm erhöht (Abb. 40). In der Doppelmutante dominiert das Fehlen von Hfq, die Mutante JB580v(*hfq*::KanR- Δ *degP*) produziert in etwa gleiche Mengen an *InvA* wie die JB580v(*hfq*::KanR)-Mutante. Es kommt zu einer 30%-igen Minderung der *InvA*-Produktion (Abb. 40).

Die verwendeten Yersinienstämme wurden bei 27°C angezogen, da es sich hier um die optimale *invA*-Expressionstemperatur handelt. Ähnliche Ergebnisse zu Abbildung 40 konnten auch zum Zeitpunkt der exponentiellen Phase bestimmt werden (Daten nicht dargestellt).

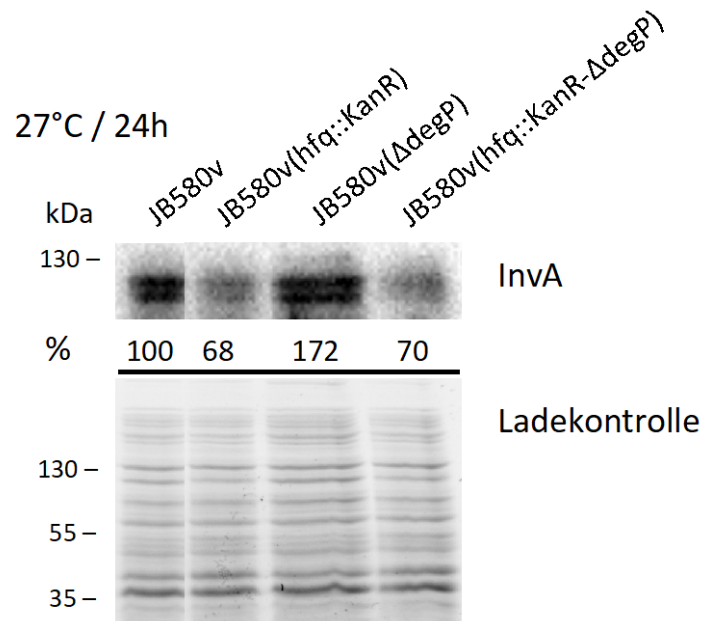


Abb 40: InvA-Immunoblot von Ganzzelllysaten (Anzucht bei 27°C in LB für 24h): Verglichen mit dem Ursprungsstamm zeigt die Hfq-Mutante eine verminderte InvA-Produktion, die Δ *degP*-Mutante einer gesteigerte InvA-Produktion und die Doppelmutante eine der Δ *hfq*-Mutante gleichartige verminderte Produktion. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

3.11.3. Vergleich der Δ *hfq*- und Δ *degP*-Mutanten auf Ail- und OmpX-Produktion

Der Einfluss von Hfq auf die Produktion von Ail und OmpX wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert (Kakoschke et al., 2016). Die Hfq-Mutante dient auch in diesem Experiment als zweiter Kontrollstamm.

Die Produktion von Ail ist in der Δ *hfq*-Mutante um ca. 35% bezogen auf den Ursprungsstamm JB580v vermehrt. In der JB580v(Δ *degP*)-Mutante kommt es zu einer um ca. 30% verminderten Ail-Produktion. Ebenfalls zu einer verringerten Produktion kommt es in der JB580v(*hfq*::KanR- Δ *degP*)-Mutante, hier sogar um ca. 50% (Abb. 41 A). Im Falle der Ail-Produktion scheint die DegP-Funktion in der Doppelmutante zu überwiegen.

Die OmpX-Produktion ist in JB580v(*hfq*::KanR) um 70% verstärkt im Vergleich zu JB580v. Auch in der Δ *degP*-Mutante kommt es zu einer um ca. 80% vermehrten Produktion von OmpX. Jedoch wirkt sich die Deletion von *hfq* und *degP* negativ auf die OmpX-Produktion aus. Es wird im Vergleich zum JB580v-Ausgangsstamm um 10% weniger in der Doppelmutante produziert. Verglichen mit den Einzelmutanten sogar bis zu 90% weniger OmpX (Abb. 41 B).

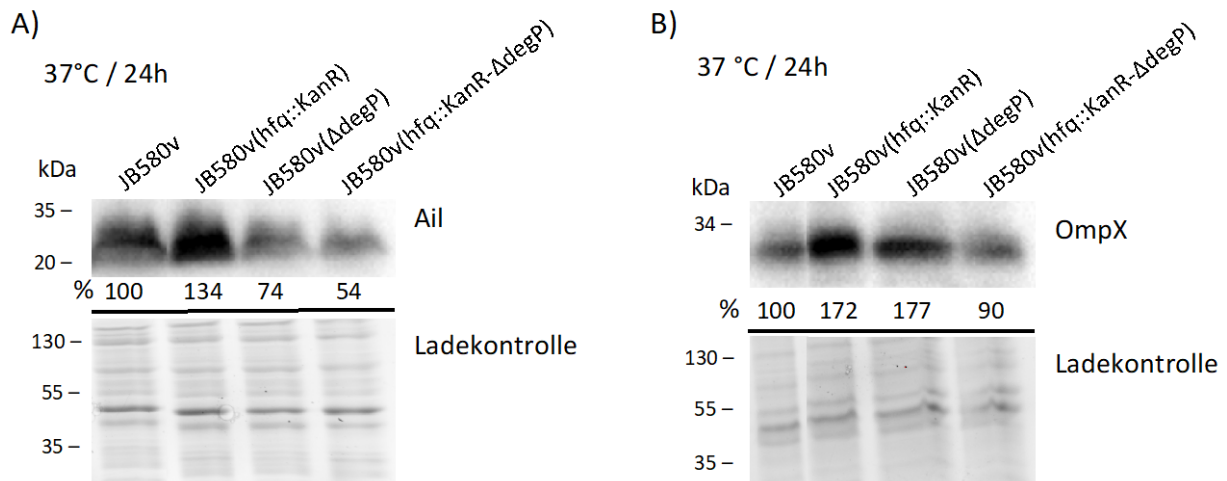


Abb. 41: A) Ail-Immunoblot von Ganzzelllysaten (Anzucht bei 37°C in LB für 24h): Verglichen mit dem Ursprungstamm zeigt die *Hfq*-Mutante eine erhöhte Ail-Produktion, die *DegP*-Mutante eine verminderte Ail-Produktion und die Doppelmutante eine der *DegP*-Mutante gleichartige verminderte Produktion. **B)** OmpX-Immunoblot von Ganzzelllysaten (Anzucht bei 37°C in LB für 24h): Verglichen mit dem Ursprungstamm zeigt die *Hfq*-Mutante eine gesteigerte OmpX-Produktion, die *DegP*-Mutante ebenfalls eine gesteigerte OmpX-Produktion und die Doppelmutante eine leicht verminderte Produktion. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

Eventuell führt die Doppelmutation dazu, dass die positiven Effekte der Einzelmutanten einen gegenläufigen Effekt haben. Es könnte sich um einen Reaktionskreis zwischen *Hfq* und *DegP* in *JB580v(hfq::KanR- $\Delta degP$)* handeln, der zu einer doppelten negativen Rückkopplung führt. *DegP* und *Hfq* wirken antagonistisch. Da Ganzzelllysate analysiert wurden bleibt unbekannt, ob Ail im Zytosol verbleibt.

Ähnliche Ergebnisse zu Abbildung 41 konnten auch zum Zeitpunkt der exponentiellen Phase erhalten werden sowohl bei 27°C als auch bei 37°C (Daten nicht dargestellt).

3.11.4. Vergleich der Δhfq - und $\Delta degP$ -Mutanten auf MyfA-Produktion

Die leicht erhöhte Produktion von MyfA bei *hfq*-Deletion verglichen mit dem Ausgangstamm *JB580v* wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert (Kakoschke et al., 2016). Auch in diesem Experiment dient die *Hfq*-Mutante als zweiter Kontrollstamm.

Die *JB580v($\Delta degP$)*-Mutante zeigt eine verminderte Produktion an MyfA um 20%. In der Doppelmutante *JB580v(hfq::KanR- $\Delta degP$)* zeigt sich kein wesentlicher Unterschied zum Ursprungstamm (Abb. 42).

Die Yersinien wurden bei 37°C und einem pH von 5,5 kultiviert, da es sich dabei um die optimalen *myfA*-Expressionsbedingungen handelt und dann wie beschrieben lysiert. Die Lysate aus der exponentiellen Wachstumsphase zeigten in der SDS-PAGE im MyfA-Immunoblot ähnliche Ergebnisse (Daten nicht dargestellt).

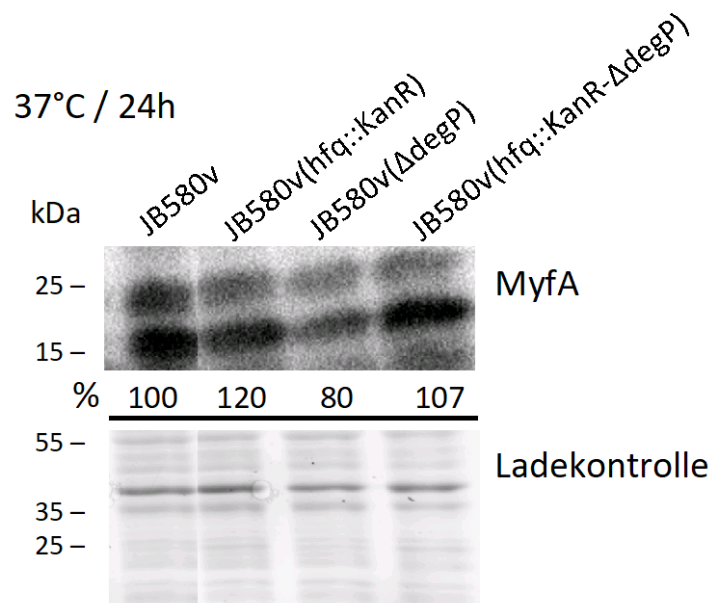


Abb. 42: MyfA-Immunoblot von Ganzzelllysaten (Anzucht bei 37°C in BHI pH 5,5 für 24h): Verglichen mit dem Ausgangsstamm zeigt die JB580v(*hfq::KanR*) eine leicht vermehrte MyfA-Produktion, JB580v($\Delta degP$) eine leicht verminderte MyfA-Produktion und die Doppelmutante JB580v(*hfq::KanR*- $\Delta degP$) kaum einen Unterschied in der MyfA-Produktion. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

3.12. Einfluss von MicA, Hfq und DegP auf die Motilität von *Y. enterocolitica*

Zunächst wurden Experimente zum Motilitätsverhalten mit der Beweglichkeitsagar-Methode durchgeführt. Hier zeigte sich, dass sowohl MicA als auch Hfq die Beweglichkeit beeinflussen (Abb. 43). In Abwesenheit des *micA*-Gens kommt es zu einer statistisch leicht signifikant verstärkten Motilität im Agar im Vergleich zum Ausgangsstamm. Die Abwesenheit von Hfq zeigt eine verminderte Beweglichkeit im Vergleich zu JB580v. Die $\Delta degP$ -Mutante zeigt im Motilitätstest keinen Unterschied im Vergleich zum Ausgangsstamm. Hält man sich erneut vor Augen, dass DegP im Periplasma befindlich ist, so wird deutlich, dass es kaum einen Einfluss auf das Flagellen-T3SS haben kann. Außerdem gelangen die Flagellen selbst nicht ins Periplasma. Bei der Doppelmutante JB580v(*hfq::KanR*- $\Delta degP$) dominiert der Einfluss von Hfq: Einfach- und Doppelmutante zeigen gleiche Motilität.

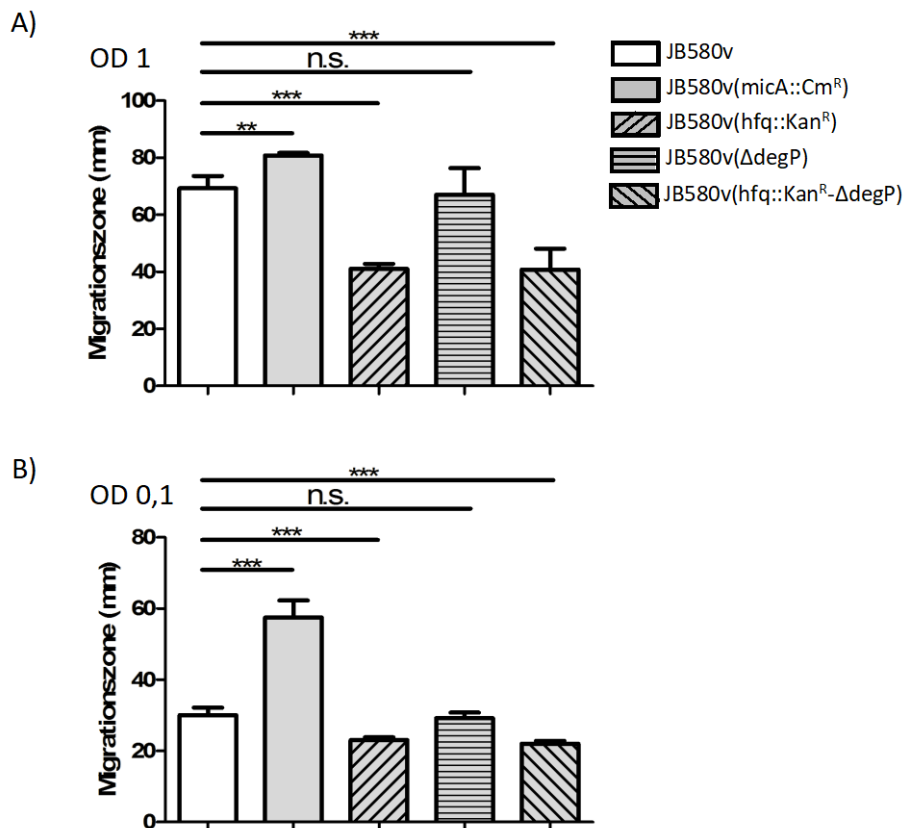


Abb. 43: Motilitätstest im Weichagar-Modell. Die Bakterien wurden bei 27 °C für 18 h in Weichagar inkubiert. Die Abwesenheit von MicA führt zu einer gesteigerten Motilität, die von Hfq zu einer deutlich verringerten. DegP hat keinen wesentlichen Einfluss und verhält sich ähnlich dem Ausgangsstamm. In der Doppelmutante ist der Einfluss des Hfq stärker ausgeprägt. Die $\Delta fleABC$ -Mutante wird hier nicht dargestellt. Sie weist kein Migrationsverhalten auf. Die Bakteriensuspensionen wurden auf eine Ausgangs-OD₆₀₀ von 1 (A) bzw. 0,1 (B) eingestellt. (n=4 – jeweils in Triplikaten pro Stamm – Standardabweichung – Statistik mittels GraphPad Prism „unpaired student t-test“ – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

Die Beweglichkeit von Bakterien im Weichagar ist abhängig von der Flagellenlänge, Anzahl der Flagellen und der Energiezufuhr für den „Rotationsmotor“ (Rotator) über die PMF (proton motive force) und Chemotaxis (gerichtete Motilität). Es wurden deshalb die Flagellenproteine isoliert und quantitativ nach SDS-PAGE-Auftrennung untersucht (TCA-Flagellin-Fällungen – angereicherte Flagellin-Fraktion s. Abschnitt 2.2.14). Abbildung 44 zeigt die Ergebnisse. Die MicA-Mutante zeigt im Vergleich zum Ursprungstamm eine um ca. 50% gesteigerte Flagellenproduktion als der Ausgangsstamm. Dagegen zeigten die Mutanten JB580v(hfq::Kan^R) und JB580v(ΔdegP) eine um etwa 40% geringere Flagellenproduktion. In der Doppelmutante JB580v(hfq::Kan^R-ΔdegP) zeigte sich sogar eine im Vergleich zur Hfq- und DegP-Mutante stärkere Reduktion der Flagellenproduktion auf 48% im Vergleich zum Ausgangsstamm (100%).

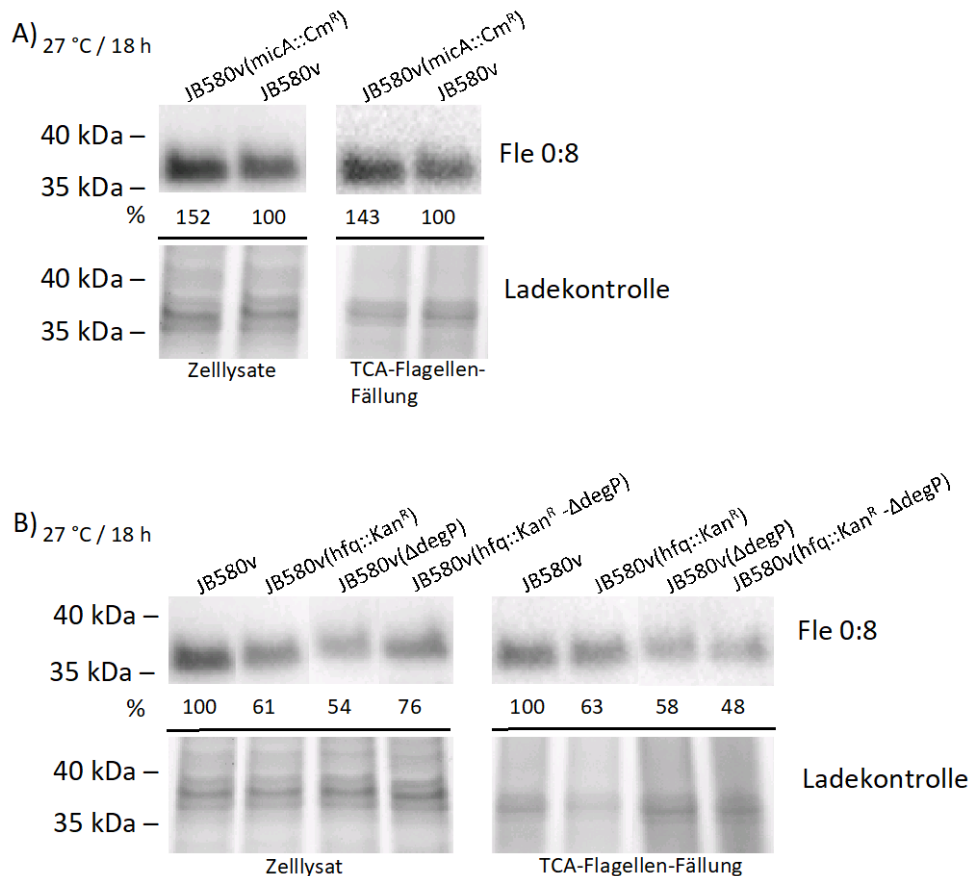


Abb. 44: Fle-Flagellin-Immunoblot Ganzzelllysate und isolierten Flagellen nach TCA-Fällung (Anzucht bei 27°C in LB für 18h). A) Die MicA-Mutante zeigt eine gesteigerte Flagellenproduktion auf. B) Sowohl die Einzeldelationen von *hfq* bzw. *degP*, als auch die Doppeldeletionsmutante zeigen eine verminderte Produktion im Vergleich zum Ausgangsstamm. (n=3 – densitometrische Bestimmung in % mittels ImageLab – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

Daraufhin wurde untersucht, auf welcher Ebene der Regulation der Flagellenproduktion MicA, Hfq und DegP Einfluss nehmen. Es wurden FACS-Versuche mit Translationsfusionen durchgeführt. Hierfür wurden Plasmide, die die Promotorregion von *fleA*, *fleB*, *fleC*, *fliA* bzw. *fliHDC* fusioniert mit dem promotorfreien *gfp*-Gen verwendet (s. 2.1.2.).

MicA hat sowohl auf der Ebene der Klasse I (FlhDC) und II (FliA) Regulatoren einen leichten Einfluss, aber auch die Klasse III-Gene *fleA* und *fleB* werden beeinflusst, wie Abbildung 45 zeigt. Der Hauptregulator FlhDC wird in Abwesenheit von MicA dezent hochreguliert. FliA wird durch MicA insbesondere in der exponentiellen Phase stark herunterreguliert. Auf Ebene der Flagellengene *fleA* und *fleB* zeigt die $\Delta micA$ -Mutanten bei FleA eine verringerte Produktion und bei FleB eine gesteigerte Produktion im Vergleich zum Ursprungstamm. Da *fleB* und *fleC* ein Operon teilen, zeigt sich hier ein ähnliches Ergebnis.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der Beweglichkeitsagarexperimente und des Immunoblots. Jedoch muss auf dieser Ebene der Versuche beachtet werden, dass nicht alle Regulatoren gleich stark beeinflusst werden. So erscheint beispielsweise die Abschwächung der FleA-Produktion widersprüchlich zum Ergebnis des Immunoblots. Jedoch werden FleB und FleC stärker produziert und wie in der Einleitung bereits beschrieben (s.

1.4.), werden die Flagellen aus allen drei Flagellin-Bausteinen A, B und C zusammengesetzt. Somit könne hier darauf geschlossen werden, dass die Flagellen der *MicA*-Mutante mehr FleB- und FleC-Bausteine enthalten als FleA.

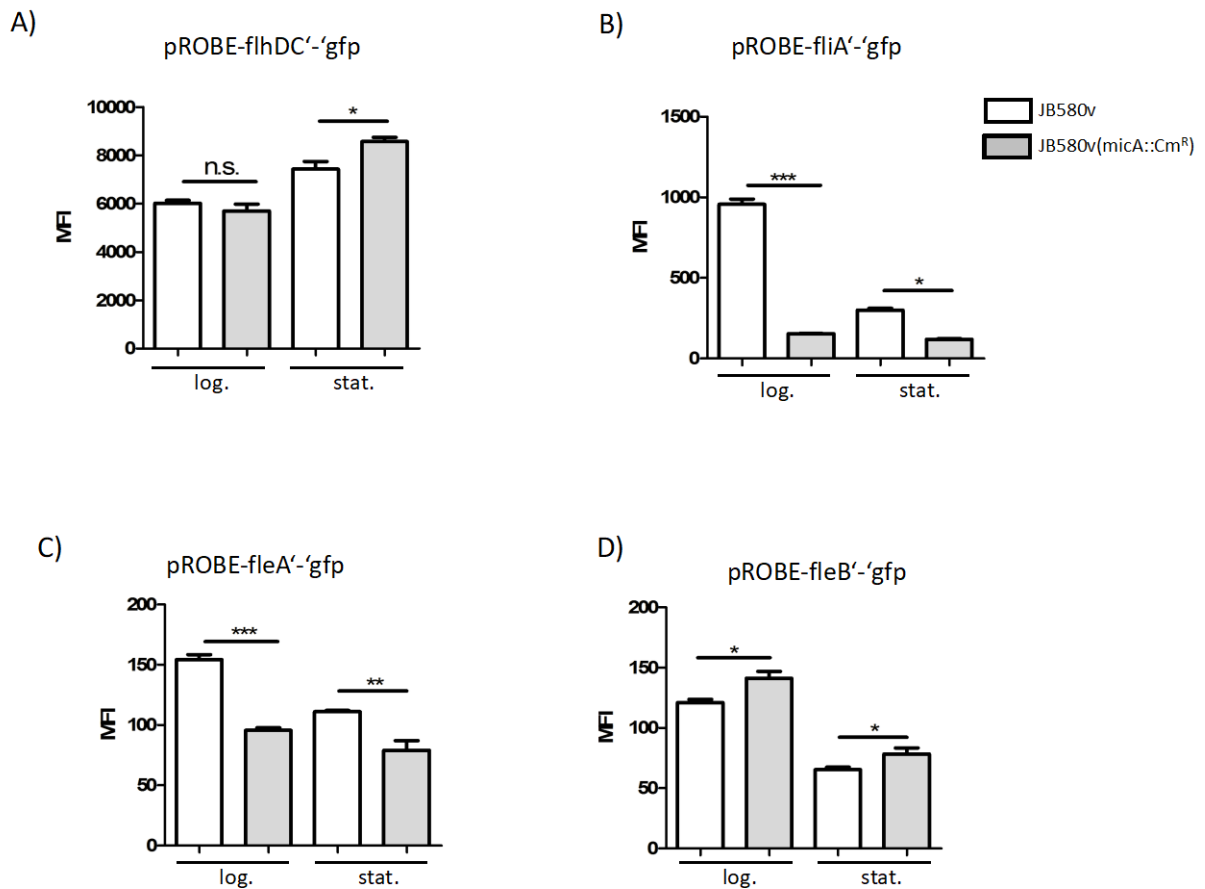


Abb. 45: FACS-Analyse zur Expression der translationalen gfp-Reporterfusion der Flagellenregulatoren FlhDC und FliA, sowie der Flagellengene *fleA* und *fleB* im Vergleich vom Ausgangsstamm zur $\Delta micA$ -Mutanten (Anzucht bei 27°C in LB für 4h und 24h). A) In der log.-Phase zeigt sich kein Unterschied der $\Delta micA$ -Mutante zum Ausgangsstamm, in der stationären Phase leichte Tendenz der Überproduktion von FlhDC, Klasse I Regulator. B) Die Produktion von FliA wird in Abwesenheit von MicA sowohl in der log.-Phase, als auch in der stat.-Phase herabgesetzt. C) und D) In Abwesenheit von MicA wird die Produktion von FleA runterreguliert, wohingegen die Produktion von FleB, sowie auch von FleC (Daten hier nicht dargestellt) leicht hochreguliert werden. (n=9 – Standardabweichung – Statistik mittels GraphPad Prism „unpaired student t-test“ – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

In Abwesenheit von Hfq wird die Produktion sowohl von FlhDC, als auch von FliA verringert. Die Produktion von FleA, FleB und FleC werden ebenfalls herabgesetzt (Abb. 46). Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus Motilitätsversuch und Immunoblot. Die Hfq-Mutante setzt die Produktion aller drei Baustein A, B und C für die Produktion der Flagelle in gleichem Maße herab.

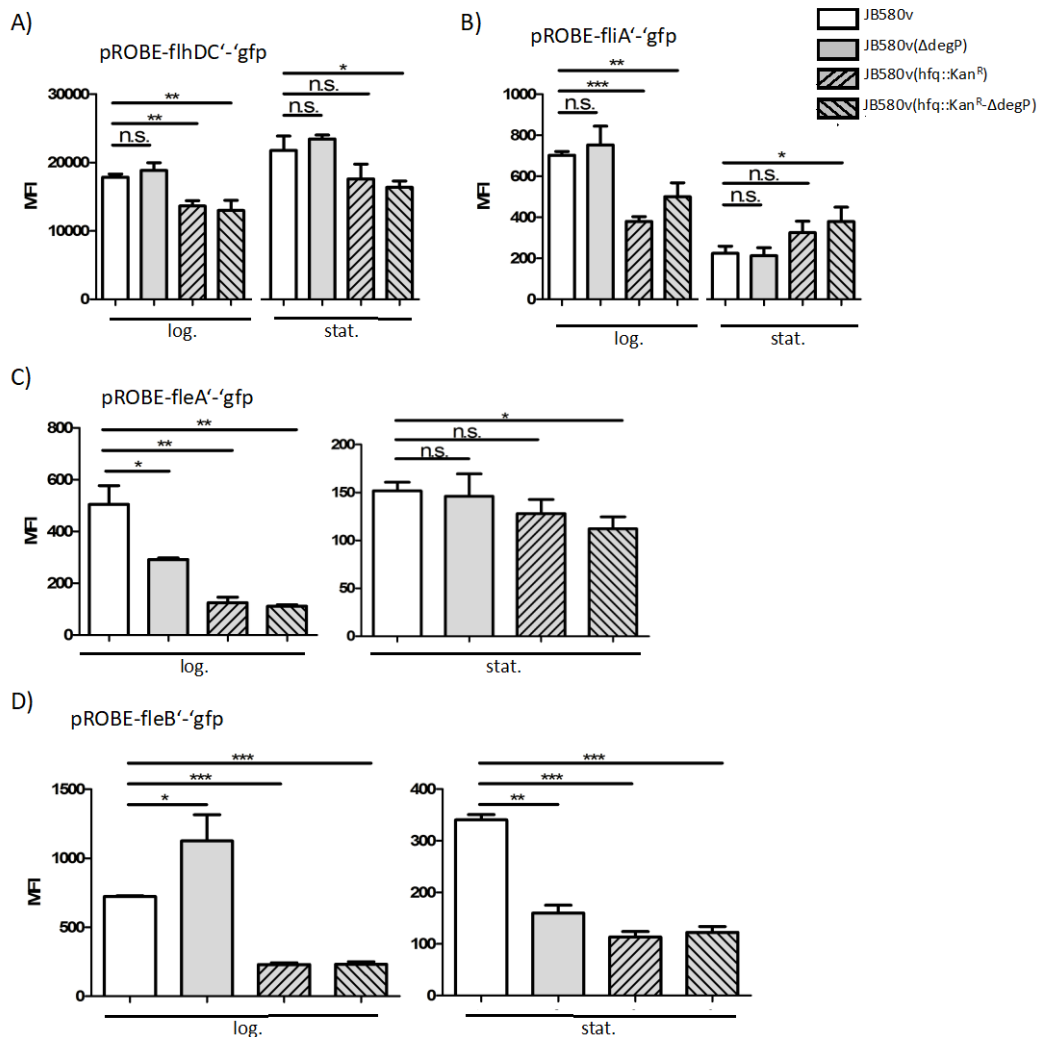


Abb. 46: FACS-Analyse zur Expression der translationalen gfp-Reporterfusion der Flagellenregulatoren FlhDC und FliA, sowie der Flagelline *fleA* und *fleB* im Vergleich vom Ausgangsstamm zur $\Delta micA$ -Mutanten (Anzucht bei 27°C in LB für 4h und 24h). A) FACS-Analyse über FlhDC. Die Abwesenheit von DegP nimmt keinen Einfluss auf die Produktion. Sowohl die Hfq- als auch die Doppelmutante führen zu einer signifikanten Reduktion der FlhDC-Produktion. B) FACS-Analyse über FliA. In der JB580v($\Delta degP$) Deletionsmutante ist keine Abweichung der Produktion von FliA verglichen mit dem Ausgangsstamm darstellbar. In den Mutanten JB580v(*hfq::Kan^R*) und JB580v(*hfq::Kan^R- $\Delta degP$*) ist die FliA-Produktion vermindert. C) FACS-Analyse über FleA. Die Abwesenheit von DegP führt in der log.-Phase zu einer reduzierten Produktion von FleA, in der stationären Phase nimmt DegP keinen Einfluss. Sowohl die Hfq- als auch die Doppelmutante führen zu einer Reduktion der FleA-Produktion in der exponentiellen und stationären Phase. D) FACS-Analyse über FleB. In der JB580v($\Delta degP$) Deletionsmutante ist während der exponentiellen Phase eine erhöhte Produktion darstellbar. Nach 24 h kommt es zu einer Umkehr und die FleB-Produktion ist verglichen mit dem Ausgangsstamm JB580v reduziert. In den Mutanten JB580v(*hfq::Kan^R*) und JB580v(*hfq::Kan^R- $\Delta degP$*) ist die FleB-Produktion nach 4 h und 24 h stark reduziert. (n=9 – Standardabweichung – Statistik mittels GraphPad Prism „unpaired student t-test“ – s. S. 43 Abschnitt 2.1.10).

DegP als periplasmatisches bifunktionelles Enzym nimmt wie erwartet keinen Einfluss auf die Regulatoren FlhDC und FliA (Abb. 46 A und B). Die Flagelline werden durch das Flagellin-T3SS vom Zytosol aus sezerniert (s. Abschnitt 1.4.) und sollten keinen Zugang zu DegP im periplasmatischen Raum haben. Außerdem handelt es sich bei den Reporterfusionsproteinen um Proteine, die das Zytosol in diesem Versuchsaufbau nicht verlassen. Dennoch ist ein Effekt der DegP-Deletion auf die Flagellenproduktion

nachweisbar. Möglicherweise gibt es über DegP einen Rückkopplungsmechanismus auf Flagellinuntereinheiten im Zytosol. Hierfür wären weitere Untersuchungen über den Rahmen dieser Arbeit hinaus notwendig.

Um die Flagellen direkt nachzuweisen, wurden Flagellenimmunfärbungen durchgeführt und diese Proben fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 47).

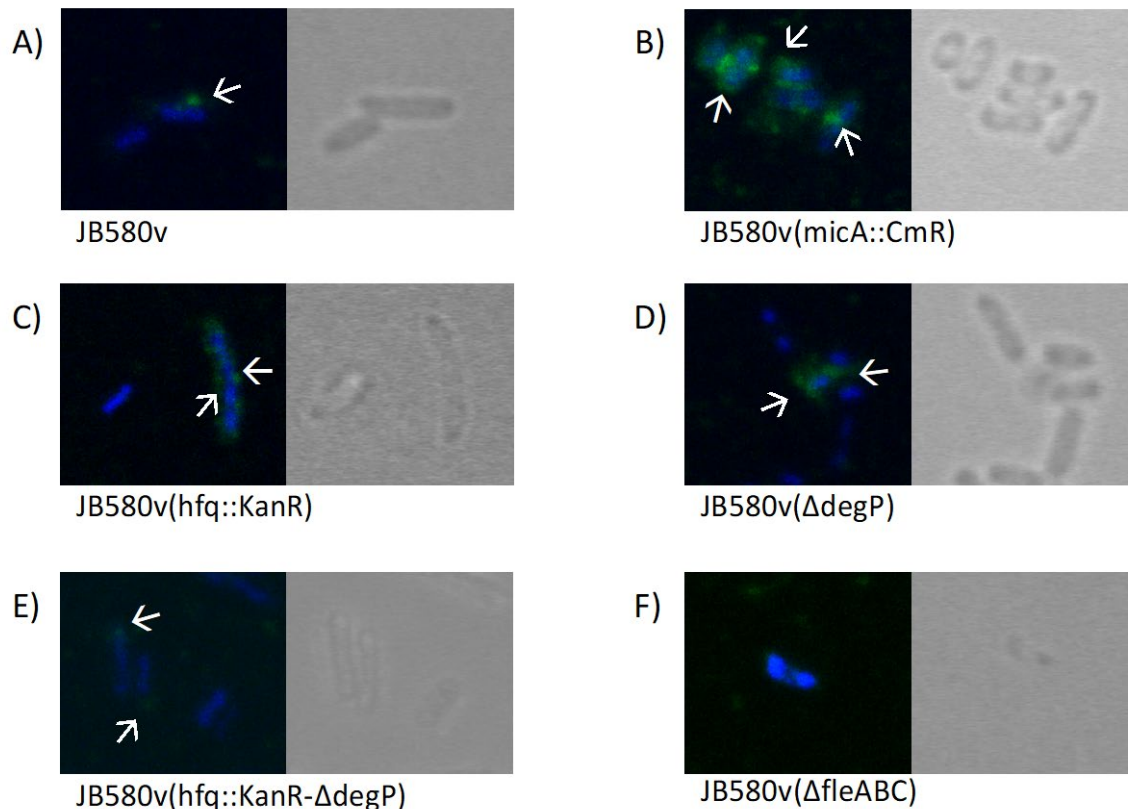


Abb. 47: Floreszenzmikroskopische Untersuchung der Flagellenfärbung. DAPI-gefärbte bakterielle DNA im Zytoplasma (blau) und Flagellenfärbung mit Erstantikörper anti-Flagellin und Zweitantikörper Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (grün), weißer Pfeil deutet auf Flagellen. A) JB580v: Es zeigt sich eine deutliche Flagellenfärbung etwa in der Mitte des Bildes im Bereich eines Bakterienpols. Diese Darstellung dient als Kontrollfärbung. B) JB580v(*micA::CmR*): Verglichen mit dem Ausgangsstamm zeigt sich eine verstärkte Produktion an Flagellen. Um die gesamten Bakterien ist die Färbung darstellbar. C) JB580v (*hfq::KanR*): Eine dem Ursprungstamm verminderte Flagellendarstellung und auch nicht distinkt an einem Pol. D) JB580v($\Delta degP$): Hier zeigt sich eine verminderte Flagellenfärbung verglichen mit JB580v. E) JB580v(*hfq::KanR- $\Delta degP$*): Kaum Flagellenproduktion, die Färbung ist sehr gering und kaum erkennbar. F) JB580v($\Delta fleABC$): Dieser Stamm kann keine Flagellen mehr produzieren und dient als Negativkontrolle.

Die *MicA*-Mutante zeigt im Vergleich zum Ursprungstamm JB580v einen stärkeren Anteil von Antikörper-gefärbten Flagellen. Dagegen zeigen die Mutanten JB580v(*hfq::KanR*), JB580v($\Delta degP$) und JB580v(*hfq::KanR- $\Delta degP$*) eine reduzierte Flagellenimmunfärbung wie der Ausgangsstamm. Als Kontrollstamm wurde die Mutante JB580v($\Delta fleABC$) verwendet, welcher keine Flagellen produzieren kann.

4. DISKUSSION UND AUSBLICK

Y. enterocolitica ist von humanmedizinischer Bedeutung und auch ein geeigneter extrazellulärer pathogener Modellorganismus zur Erforschung der molekularbiologischen und zellbiologischen Aspekte der Darmpathogenität. Die wichtigsten Pathogenitätsfaktoren werden chromosomal (z.B. Invasin, Yersiniabactin) und extrachromosomal (z.B. T3SS, YadA, Yops) kodiert.

In dieser Arbeit wurden Aspekte der posttranskriptionellen Regulation der Produktion von Pathogenitätsfaktoren bei *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 (mausvirulent) von Tamara Katharina Kakoschke (2010-2012) und von mir (2014-2016) untersucht und die wichtigsten Ergebnisse publiziert (Kakoschke et al., 2014, Kakoschke et al., 2016). Bereits in Kakoschke et al. 2014 und Kakoschke et al. 2016 publizierte Ergebnisse meiner Untersuchungen konnten zeigen, dass sowohl das Wachstumsverhalten, die Resistenz gegenüber äußerem Stress (Antibiotika, sauren pH und H₂O₂) und die Expression der Pathogenitätsfaktoren auf posttranskriptioneller Ebene durch Hfq maßgeblich reguliert werden.

In dieser vorliegenden Dissertationsschrift werden die von mir erzielten und publizierten Ergebnisse kurz dargestellt und die nicht publizierten detailliert beschrieben und diskutiert.

In dieser Arbeit sollen zusätzlich die Effekte der kleinen nicht-kodierenden RNAs MicA, RybB und CyaR auf die posttranskriptionelle Regulation des Wachstumsverhaltens und der Produktion von Virulenzfaktoren (YadA, InvA, Ail, OmpX, OmpA und LPS) beschrieben werden.

Zusätzlich wurde die posttranslationelle Regulation des Wachstumsverhaltens und der Virulenz von *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 (mausletal) durch das bifunktionelle periplasmatische Protein DegP (Chaperon und Serinprotease) untersucht.

Da auch die Motilität der Bakterien von wesentlicher Bedeutung für das Pathogenitätsverhalten ist, wurde der Einfluss von Hfq, MicA und DegP auf die Regulation der Motilität untersucht.

4.1. Wachstumsverhalten, Stressresistenz und Indolproduktion

Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, ist der Effekt der kleinen regulatorischen nicht-kodierenden RNAs MicA, RybB und CyaR auf die Wachstumsrate von *Y. enterocolitica* sehr gering. Dieser Befund kann wahrscheinlich damit erklärt werden, dass die o. g. sRNAs entweder nicht in den Metabolismus und die Replikation von *Y. enterocolitica* unter in-vitro-Bedingungen einwirken oder die Effekte sich kompensieren, sodass kein signifikanter

Unterschied zwischen dem Ursprungsstamm und den Mutanten phänotypisch festgestellt werden konnte.

Die *hfq*-Deletionsmutante zeigt hingegen insbesondere bei 37°C ein deutliches Wachstumsdefizit, aber auch bei 27°C (Kakoschke et al., 2014). Dies ist plausibel, da Hfq über 100 verschiedene sRNAs binden und somit diverse mRNAs blockieren, degradieren oder stabilisieren kann. Dies kann man sich insbesondere dahingehend erklären, da DegP als Regulator von äußerem Stress (envelope stress) agiert. Gibt es keinen Stress (Nahrungsdefizit, oxidativer Stress, pH-Schwankungen etc.) werden sich am ehesten am Wachstumsverhalten der Deletionsmutante im Vergleich zum Ausgangsstamm keine Unterschiede zeigen. Bei der Doppelmutante mit Deletion des *hfq*- und *degP*-Gens hingegen kommt es aufgrund des Einflusses von Hfq zu einem Wachstumsdefizit wie in der *hfq*-Deletionsmutante gezeigt wurde.

Die Versuche zum Wachstumsverhalten im 3D-KoG sollen die Infektion im Wirtsgewebe simulieren. Hierbei kommt es bei Infektion mit pYV-Plasmid tragenden Stämmen zu der Bildung von Mikrokolonien mit Bindung von Kollagenfibrillen an YadA, die Mikroabszessen in infizierten Gewebe der Maus (Milz, Peyer-Plaques) ähneln (Freund et al., 2008, Kakoschke et al., 2016). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den Mutanten mit Überexpression von RybB und CyaR oder Deletion von MicA und dem Ursprungsstamm. Die Hfq-Mutante jedoch zeigt nach elektronenmikroskopischer Untersuchung wesentlich kleinere Mikrokolonien sowie eine geringere Produktion des für die Bindung an die Kollagenfasern wichtigen YadA (Kakoschke et al., 2016). Dieses Ergebnis lässt darauf hindeuten, dass Hfq eine wesentliche Rolle in der Produktion von YadA und damit der Bildung von Mikrokolonien spielt.

Hfq fördert die Resistenz der Yersinien gegenüber oxidativem Stress auch in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* (Geng et al., 2009, Chao and Vogel, 2010, Schiano et al., 2010, Kakoschke et al., 2014). Zusätzlich weisen Stämme, in welchen Hfq fehlt, eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid (reaktiver Sauerstoff) auf. Auch gegenüber sauren pH-Werten zeigte sich, dass die Abwesenheit von Hfq zu einer gesteigerten Empfindlichkeit der Bakterien führt. Folglich spielt Hfq auch für Resistenz gegenüber saurem Milieu eine wesentliche Rolle (Kakoschke et al., 2014). Jedoch konnte kein Einfluss von Hfq auf die Resistenz (minimale Hemmkonzentration – MHK) gegenüber Antibiotika (Ampicillin, Oxacillin, Gentamycin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol) festgestellt werden (Kakoschke et al., 2014).

Außerdem wurde der Einfluss von Hfq auf die Indolproduktion untersucht (Kakoschke et al., 2014). Indol wirkt als Signalmolekül und hemmt die Biofilmproduktion, die Resistenz gegenüber Antibiotika und beeinflusst die Produktion der Virulenzfaktoren (Lee and Lee,

2010). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass eine *hfq*-Deletion zu einer gesteigerten Produktion von Indol führt, was wir ebenfalls für die Deletion des *hfq*-Gens in *Y. enterocolitica* feststellen konnten (Zhang and Hong, 2009, Kakoschke et al., 2014). Indolproduktion von *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* führt zur Inhibition der Biofilmbildung (Lee and Lee, 2010; Kim et al., 2017). Diese Ergebnisse könnten erklären, dass auch bei der *Yersinia hfq*-Deletionsmutante die verstärkte Indolproduktion die Mikrokoloniebildung im Gewebe fördert (Abb. 14).

4.2. Posttranskriptionelle Regulation der Virulenz durch die regulatorischen sRNAs **MicA**, **RybB** und **CyaR**

Bislang ist bekannt, dass die kleine regulatorische nicht-kodierende RNA **MicA** an mRNAs diverser OMPs mit Hilfe von Hfq binden kann. Dieser Hfq-MicA Komplex kann dann entweder zur Stabilisierung der mRNA oder zur mRNA-Degradation führen (Papenfort et al., 2006, Vogel and Papenfort, 2006, Johansen et al., 2008). Tabelle 17 zeigt zusammengefasst die Ergebnisse der Berechnung mittels IntaRNA der RNA-Interaktionen in komplementären Sequenzbereichen von der sRNA MicA mit kodierenden Bereichen von mRNAs und deren 5'UTR von OMPs, als auch die Ergebnisse der Protein- und FACS- Experimente.

Tabelle 17: Ergebnisse der Berechnung mittels IntaRNA der RNA-Interaktionen in komplementären Sequenzbereichen von MicA mit kodierenden Bereichen der mRNAs und deren 5'UTR von OMPs, sowie Ergebnisse der Protein- und FACS- Experimente. (Bindungsenergie: 0 (0-3 kcal/mol), + (3-6 kcal/mol), ++ (6-12 kcal/mol), +++ (> 12 kcal/mol); Hybridisierungsenergie: 0 (0-5 kcal/mol), * (5-10 kcal/mol), ** (10-15 kcal/mol), * (> 15 kcal/mol)).**

sRNA MicA	IntaRNA 5'UTR	IntaRNA kodierender Bereich	Immunoblot	FACS
YadA	++/**	++/**	n.s. ³⁾	n.s.
InvA	++/**	++/**	↓ ³⁾	↓ bis ↓↓
Ail	++/**	++/**	↓	
OmpX	+++/** ¹⁾	kein Wert ermittelbar	↓↓	↓ bis ↓↓
OmpA	++/**	+/*	↓	↓↓
MyfA	kein Wert ermittelbar	++/**	n.s	n.s.

¹⁾ Die kalkulierte Interaktion findet am Übergang der 5'UTR zum kodierenden Bereich der mRNA für OmpX statt

²⁾ n.s. - nicht signifikant

³⁾ ↓ - Reduktion

YadA: YadA ist als Trimer in die äußere Membran inseriert. Der Einfluss von MicA auf die mRNA von YadA wurde bislang noch nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte durch Sequenzvergleich von MicA mit der *yadA*-mRNA stabile Interaktion beider RNAs sowohl im kodierenden Bereich als auch in der 5'UTR festgestellt werden.

In den weiterführenden experimentellen Untersuchungen konnte jedoch kein regulatorischer Effekt festgestellt werden. Sowohl im Immunoblot als auch in den FACS-Analysen gab es keinen signifikanten Unterschied der YadA-Produktion im Vergleich zwischen der *micA*-Deletionsmutante und dem Ausgangsstamm. Folglich sollte es keinen regulatorischen Effekt von MicA auf die *yadA*-mRNA geben, was experimentell bestätigt wurde.

InvA: Bisher wurde der Einfluss von MicA auf die Produktion von Invasin in *Y. enterocolitica* noch nicht erforscht. Auch zum Analog des Invasins Intimin in *E. coli* gibt es aktuell noch keine Forschungsergebnisse (Oberhettinger et al., 2012).

Mittels IntaRNA-Software konnte eine theoretische Interaktion der MicA-sRNA-Sequenz mit der mRNA-Sequenz des *invA*-Gens im Bereich der 5'UTR und im kodierenden Bereich vorhergesagt werden. Die Ergebnisse der Immunoblot- und FACS-Untersuchungen lassen darauf schließen, dass MicA in der Interaktion mit der *invA*-mRNA und Hfq zu einer Destabilisierung der mRNA führt, was die verminderte InvA-Produktion des Mutterstammes verglichen mit der *micA*-Deletionsmutante erklärt.

Ail und OmpX: Die Regulation von *ail* und *ompX* durch die sRNA MicA wurde erstmalig von mir untersucht. Die prädiktive Berechnung einer stabilen Interaktion der sRNA mit den 5'-UTR der mRNAs von *ail* und *ompX* zeigen eine mittlere bis hohe Bindungsenergie in den komplementären Bereichen der RNA-Sequenzen. Mittels Immunoblot zeigt sich sowohl für Ail als auch für OmpX eine verminderte Proteinproduktion. Auch in den FACS-Untersuchungen zu OmpX ist dieses Phänomen nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass MicA die 5'UTR der jeweiligen mRNA bindet und somit die Proteinproduktion vermindert.

OmpA: Für *Salmonella enterica* ist bereits beschrieben, dass MicA zu einer Destabilisierung der *ompA*-mRNA führt (Papenfert et al., 2006). Bislang wurde weder über den Einfluss von MicA noch von Hfq auf die *ompA*-Genexpression bzw. OmpA-Produktion in *Y. enterocolitica* berichtet.

MicA zeigt eine starke Interaktionsenergie in der IntaRNA-Analyse mit der kodierenden *ompA*-mRNA und der 5'-UTR auf. Die Immunoblot- und FACS-Analysen bestätigen den negativen Effekt von MicA auf die Produktion von OmpA. Folglich kann auch in *Y. enterocolitica* MicA-Bindung an die 5'UTR vorliegen und es somit zu einer Destabilisierung der *ompA*-mRNA kommen.

Die Untersuchungen zum Einfluss des Hfq auf die Produktion von OmpA zeigen einen ähnlichen Effekt. Hfq führt zu einer Destabilisierung und wahrscheinlich zur Degradierung der *ompA*-mRNA.

MyfA: Mittels IntaRNA konnte eine Interaktionsregion zwischen der *myfA*-mRNA und MicA vorhergesagt werden. Meine experimentelle Studie zeigt, dass MicA keinen Einfluss auf die MyfA-Produktion hat, weder im Immunoblot noch in den FACS-Experimenten.

LPS: LPS ist ein wichtiger Baustein der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien. Diese Arbeit untersucht die Auswirkungen von MicA auf die LPS-Produktion in *Y. enterocolitica*. Es ist bekannt, dass Hfq, das RNA-Chaperon, die LPS-Produktion negativ beeinflusst (Kakoschke et al., 2016). In Abwesenheit des *hfq*-Gens wird vermehrt langkettiges LPS produziert. Es stellte sich folglich die Frage, welche kleine nichtkodierende RNA mit Hfq im Komplex auf die LPS-Produktion einwirken kann. MicA zeigt in dieser Arbeit den gleichen Effekt wie Hfq in Kakoschke et al. 2016 bereits beschrieben. Für die Regulation des LPS scheint daher MicA im Komplex mit Hfq in Frage zu kommen. Wie bereits in Abschnitt 1.3.2.4 beschrieben, gibt es im Aufbau des LPS multiple Struktureinheiten (Lipid A, Core, KDO und O-Antigen). All diese Bausteine bedürfen einer Synthese- und Exportmaschinerie, welche die Länge des O-Antigens bestimmen und das vollständige LPS in der äußeren Membran verankern (s. Abb. 4). Daher sind viele Enzyme und Proteine an diesem Mechanismus beteiligt, die wesentlich für die Assemblierung des LPS sind. So sollte in weiterführenden Studien der Einfluss der sRNA micA auf z.B. die Enzyme Wzx (Flippase), Wzy (Glykosyltransferase) und Wzz (hemmt Wzy-Längenkontrolle) untersucht werden, um ein besseres Verständnis der komplexen Regulierung der LPS-Produktion zu erzielen. Gleiches gilt für das RNA-Chaperon Hfq. Auch spielt die Zusammensetzung der äußeren Membran eine Rolle für die Aufnahme der LPS-Moleküle. Außerdem könnte das trimere YadA mit seiner „lollipop“-Struktur einen großen Einfluss auf die LPS-Insertion in die äußere Membran haben (Hoiczky et al., 2000).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die mRNAs der Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica* durch **MicA** größtenteils destabilisiert und folglich abgebaut werden.

Es ist bekannt, dass **RyxB** an die mRNAs von OMPs bindet und somit deren Produktion mitbeeinflussen kann (Johansen et al., 2008). Zahlreiche Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* befinden sich ebenfalls an der äußeren Membran und zählen somit zu den OMPs. Welchen Einfluss **RyxB** auf die Produktion der Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* hat, wurde bisher noch nicht systematisch untersucht.

Tabelle 18: Ergebnisse der Berechnung mittels IntaRNA der RNA-Interaktionen in komplementären Sequenzbereichen von RybB mit kodierenden Bereichen der mRNAs und deren 5'UTR von OMPs, sowie Ergebnisse der Immunoblot-Experimente. (Bindungsenergie: 0 (0-3 kcal/mol), + (3-6 kcal/mol), ++ (6-12 kcal/mol), +++ (> 12 kcal/mol); Hybridisierungsenergie: 0 (0-5 kcal/mol), * (5-10 kcal/mol), ** (10-15 kcal/mol), * (> 15 kcal/mol)).**

sRNA RybB	IntaRNA 5'UTR	IntaRNA kodierender Genbereich	Immunoblot
YadA	++/**	++/***	↑↑↑ ¹⁾
InvA	++/***	+++/***	↑(log.)↓(stat.) ^{2) 3)}
Ail	+/**	++/***	↑↑
OmpX	+/**	++/*	↑↑

¹⁾ ↑ - Verstärken

²⁾ Wachstumsphasenabhängig

³⁾ ↓ - Reduktion

YadA: Mittels IntaRNA konnten wahrscheinlich stabile Interaktionen zwischen RybB und der 5'-UTR sowie der kodierenden Sequenz des *yadA*-Gens vorhergesagt werden. Eine RybB-Überproduktion führt in Immunoblot-Analysen zu einer gesteigerten Produktion von YadA. RybB stabilisiert daher wahrscheinlich die *yadA*-mRNA und macht ihre RBS gut zugänglich.

InvA: Die errechneten Bindungsenergien einer Wechselwirkung von RybB mit den Sequenzen von *InvA* lassen vermuten, dass es zwischen diesen RNAs zu einer stabilen Wechselwirkung in komplementären RNA-Bereichen kommt. Im Immunoblot zeigt sich eine vermehrte *InvA*-Produktion. Auch für diesen Pathogenitätsfaktor konnte gezeigt werden, dass RybB die mRNA von *invA* stabilisiert (Abb. 31).

Ail und OmpX: Die ermittelten Energien der Interaktion von *ail* und *ompX* mit RybB lassen lediglich auf eine leichte bis mittel stabile Wechselwirkung schließen. Die Ergebnisse der Immunoblot-Analyse jedoch zeigen, dass sowohl *Ail* als auch *OmpX* bei RybB-Überproduktion stärker produziert werden. Folglich ist auch hier von einer Stabilisierung der mRNAs auszugehen.

LPS: Die Ergebnisse der LPS-Analyse lassen keinen großen Einfluss von RybB auf die LPS-Produktion erkennen. LPS-Produktion und das LPS-Muster (langkettig/ kurzkettig) wird durch RybB in geringem Maße verringert bzw. verändert. Auch hier wäre eine Untersuchung des Einflusses von RybB auf die an der Assemblierung und Verankerung des LPS beteiligten Proteine und Enzyme als weiterführende Untersuchung angezeigt (s. Abschnitt 1.3.2.4).

Insgesamt zeigt sich, dass **RybB** die mRNAs der Virulenzfaktoren wahrscheinlich größtenteils stabilisiert und somit zu einer vermehrten Proteinproduktion o.g. Virulenzfaktoren führt. Um genauer herauszufinden, ob in vivo die RNA-RNA-Interaktion im

kodierenden Bereich oder der 5'UTR der mRNA liegt, sollten, wie für MicA oben gezeigt, ebenfalls FACS-Analysen durchgeführt werden.

Auch **CyaR** zählt zu den sRNAs, die mit Hfq einen Komplex bilden und somit mRNA-Translation regulieren können (Johansen et al., 2008). Für **CyaR** konnte bereits in *E. coli* und *Salmonella enterica* gezeigt werden, dass sie die Produktion von OmpX herabsetzt (Papenfort et al., 2008). Durch Bindung an die SD-Region der *ompX*-mRNA wird die Translation verhindert.

Tabelle 19: Ergebnisse der Berechnung mittels IntaRNA der RNA-Interaktionen in komplementären Sequenzbereichen von CyaR mit kodierenden Bereichen der mRNAs und deren 5'UTR von OMPs, sowie Ergebnisse der Immunoblot-Experimente. (Bindungsenergie: 0 (0-3 kcal/mol), + (3-6 kcal/mol), ++ (6-12 kcal/mol), +++ (> 12 kcal/mol); Hybridisierungsenergie: 0 (0-5 kcal/mol), * (5-10 kcal/mol), ** (10-15 kcal/mol), * (> 15 kcal/mol)).**

sRNA CyaR	IntaRNA 5'UTR	IntaRNA kodierender Genbereich	Immunoblot
YadA	+/**	++/**	↓ ¹⁾
Ail	+/*	++/**	↓↓ (log.)/n.s. (stat.) ²⁾
OmpX	++/**	++/**	↓↓ (log.)/n.s. (stat.)

¹⁾ ↓ - Reduktion

²⁾ Wachstumsphasenabhängig

YadA: Mittels IntaRNA-Analyse konnte eine gute Bindungsenergie zwischen CyaR und der *yadA*-mRNA vorhergesagt werden. Somit ist es wahrscheinlich, dass es zwischen den beiden RNAs zu einer stabilen Interaktion kommt. Im Immunoblot zeigt sich, dass CyaR zu einer verminderten YadA-Produktion führt, was auf CyaR bedingte mRNA-Instabilität oder Hemmung der Translation hinweisen könnte.

Ail und OmpX: Sowohl für die Bindung von CyaR an *ail*-mRNA als auch *ompX*-RNA konnten mittels IntaRNA stabile Interaktionen vorhergesagt werden (5'UTR und kodierende Sequenz). Für OmpX waren die Bindungsenergien höher als für Ail. Mittels Immunoblot konnte nachgewiesen werden, dass die Produktion von Ail und OmpX in der Wachstumsphase jeweils verringert war, in der stationären Phase jedoch kein Effekt nachzuweisen war.

Auch für die Untersuchungen zur Funktion von **CyaR** gilt: Um genauere Ergebnisse zu erhalten, ob die komplementäre Interaktion der RNAs im 5'UTR oder kodierenden Sequenzbereich liegt, müssten weiterführende Analysen zur translationalen Reporterfusion durchgeführt werden.

Zusammenfassend führen die sRNA **MicA** und **CyaR** eher zu einer verminderten, **RybB** zu einer vermehrten Produktion von membranständigen Pathogenitätsfaktoren in *Y. enterocolitica*. Untersuchungen zum Einfluss und der Regulation der Virulenz durch kleine regulatorische RNAs können hilfreich sein, um neue Strategien zur Entwicklung von Antinfektiva mit Wirkung auf sRNAs zu erhalten. Bereits jetzt gibt es Hinweise, dass sRNAs auch Antibiotikaresistenzgene regulieren (Dersch et al., 2017).

4.3. Posttranskriptionelle und posttranslationelle Regulation der Virulenz durch Hfq und DegP

YadA: 2007 wurde beschrieben, dass eine Faltungsmutante von YadA in *E. coli* verstärkt von DegP im Periplasma degradiert wird und damit weniger YadA in die äußere Membran inseriert wird (Grosskinsky et al., 2007).

Meine Charakterisierung zur YadA Insertion in die äußere Membran von Yersinien konnte ebenso zeigen, dass bei Fehlen von DegP mehr exponiertes YadA vorliegt als im Ausgangsstamm. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem in *E. coli* bereits beschriebenen Ergebnissen (Grosskinsky et al., 2007).

In Kakoschke et al., 2016 konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des *hfq*-Gens zu einer verringerten Produktion von YadA oder Insertion von YadA in die äußere Membran führt. Wahrscheinlich kann in Abwesenheit von Hfq die mRNA von *yadA* nicht mehr stabilisiert werden und sie wird im Zytosol degradiert (Kakoschke et al., 2016). Zusätzlich zeigen die Reporterergebnisse (pFX-YadA-gfp) auch ein verringertes YadA-Signal was transportunabhängig ist und damit auf geringere mRNA-Stabilität hinweist (Kakoschke et al., 2016).

Wenn kein Hfq produziert wird, dann kann es auch durch sRNAs nicht zu einer Stabilisierung der 5'UTR oder des kodierenden Bereichs der mRNA-Sequenz kommen. Folglich wird weniger YadA produziert. Dieser Mechanismus ist DegP unabhängig.

InvA: Periplasmatische Proteine wie das DegP sind für die Biogenese von Autotransportern wie dem Invasin in *Y. enterocolitica* von wesentlicher Bedeutung (Bos et al., 2007, Oberhettinger et al., 2012). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass DegP die entscheidende Protease der Intimin-Degradation ist (Oberhettinger et al., 2012).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass in Abwesenheit von DegP die Invasin-Produktion um fast das Zweifache im Vergleich zum Ursprungsstamm ansteigt. DegP ist wahrscheinlich als Protease für die Degradation des falsch gefalteten InvA verantwortlich.

In Abwesenheit von Hfq kommt es zu einer verminderten Expression von *invA*, da dessen Regulatoren RovA und OmpR durch das Hfq mitreguliert werden (Revell and Miller, 2001,

Kakoschke et al., 2016). OmpR wird durch das Hfq inhibiert und kann folglich die Expression von *invA* in Anwesenheit von Hfq nicht unterdrücken (Kakoschke et al., 2016).

In der Doppelmutante führt die *hfq*-Deletion annähernd zu dem gleichen Ergebnis wie in der Einfachmutante 2016 bereits beschrieben, da keine Aktivierung der InvA-Produktion durch RovA in Abwesenheit von Hfq erfolgt. Auch hier würde DegP nur fehlgefaltetes Protein im Periplasma degradieren. Es hat keinen Einfluss auf die translationelle Regulation.

Ail und OmpX: In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass in Abwesenheit des bifunktionellen Proteins DegP weniger Ail in der äußeren Membran vorhanden ist. Wahrscheinlich agiert DegP im Bezug auf Ail als periplasmatisches Chaperon und korrigiert so missgefaltetes Ail, sodass es in Folge stärker in der äußerem Membran vorkommt. Im Vergleich dazu zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass OmpX durch DegP degradiert wird. Bislang gibt es hierzu keine vergleichbaren Daten. Ail und OmpX sind hinsichtlich ihrer Struktur zwei ähnliche OMPs, welche durch das Hfq in ähnlicher Weise reguliert werden. Hfq führt zu einer Destabilisierung der mRNA von Ail und OmpX und somit zu einer verringerten Produktion dieser OMPs (Kakoschke et al., 2016).

Obwohl sich Ail und OmpX strukturell sehr ähneln, werden sie im Periplasma offenbar von DegP unterschiedlich wahrgenommen. Ail scheint unbeschadet vom Periplasma in die äußere Membran inseriert zu werden, während ein signifikanter Anteil des OmpX degradiert wird.

Werden beide Regulatoren, das posttranskriptionelle Hfq und das translationell wirkende DegP, untersucht, so überwiegt in Bezug auf Ail die DegP-Funktion. In Bezug auf OmpX kommt es zu einem paradoxen Verhalten. Die Einzeldelensionsmutanten JB580v(*hfq::KanR*) und JB580v(Δ *degP*) zeigen eine vermehrte Produktion von OmpX. Sind jedoch beide Gene ausgeschaltet (Doppelmutante) kommt es zu einer dem Ausgangsstamm näherungsweise gleichen Produktion von OmpX. Wahrscheinlich gelangt in der Doppelmutante dennoch genug Protein ins Periplasma, das aber auch fehlgefaltet, also ohne DegP Kontrolle, in die äußere Membran eingebaut wird.

MyfA: Meine experimentelle Studie zeigt, dass MyfA durch das DegP stabilisiert und nicht abgebaut wird. Unsere Arbeitsgruppe konnte (Kakoschke et al., 2016) zeigen, dass in *Y. enterocolitica* JB580v(*hfq::KanR*) zur Steigerung der MyfA-Produktion führt. Sind beide Regulatoren (Hfq und DegP) gleichzeitig aktiv, kommt es zur gegenseitigen Aufhebung der Wirkungen bezüglich der MyfA-Produktion. Auch hier ist ein Rückkopplungsmechanismus zu vermuten.

Bekannt ist, dass DegP bei Temperaturen zwischen 24°C und 37°C sowohl als Chaperon als auch als Protease agieren kann, erst bei Temperaturen von über 42°C verliert das DegP die Chaperon-Eigenschaft (Lipinska et al., 1988, Lipinska et al., 1989, Strauch et al., 1989). Bei der Produktion der Virulenzfaktoren der äußeren Bakterienmembran scheinen nach den Ergebnissen dieser Arbeit beide Funktionen von DegP eine Rolle zu spielen.

4.4. Einfluss von Hfq, DegP und MicA auf die Motilität von *Y. enterocolitica*

In *Y. enterocolitica* gilt die Motilität als wichtige Eigenschaft bei der intestinalen Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle und der Invasion in den Wirtsorganismus (Young et al., 2000).

In einigen Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien wie *Bacillus subtilis* (Jagtap et al., 2016) und *Xantomonas axonopodis* (Liu et al., 2019) konnte ein positiver Einfluss von Hfq auf die Flagellenproduktion und einige Chemotaxisgene (Fla-Gene) beschrieben werden. Für *Y. enterocolitica* wurden bisher von anderen Gruppen keine Daten zum Einfluss von Hfq auf die Flagellenproduktion oder Chemotaxis publiziert. In dieser Promotion konnte ich zeigen, dass Hfq positiv auf die Flagellenproduktion wirkt. Ist Hfq abwesend, kommt es wie in Abbildung 44 B und Abbildung 47 C (Immunoblot und Flagellenfärbung) zu einer Reduktion der Flagellenproduktion und damit wahrscheinlich auch zur Virulenzminderung der Bakterien. Außerdem zeigt sich in den FACS-Analysen, dass Hfq auf der Ebene der Klasse 1 (FlhDC) und 2 (FliA) Regulatoren eingreift. Die Produktion der Flagellenuntereinheiten FleA, B und C (Klasse 3) wird nicht wesentlich von Hfq mitreguliert (s. Abb. 46).

Die Produktion von Flagellen wird in *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* auch durch periplasmatische Regulatoren kontrolliert (De Lay and Gottesman, 2012, Borrero-de Acuna et al., 2017), jedoch wird bisher kein Einfluss von DegP auf die Flagellenproduktion in Gram-negativen Bakterien beschrieben. In dieser Arbeit zeigt sich, dass DegP keinen Einfluss auf die Motilität von *Y. enterocolitica* hat, noch auf die Regulatoren der Klasse 1 und 2. Dieses Ergebnis ist plausibel, da DegP nicht im bakteriellen Zytosol zu finden ist und auch nicht translationell wirkt. Im Immunoblot und den FACS-Analysen konnte ich zeigen, dass die Abwesenheit von DegP zu einer verminderten Produktion von Flagellen an der Oberfläche der Yersinienzellen führt. Wie bereits in Kapitel 1.2.2. beschrieben agiert DegP als ein periplasmatischer Regulator mit Chaperon- und Proteaseeigenschaft. Fehlt DegP, kommt es folglich nicht mehr zu einem Abbau fehlgefalteter Flagelleneinheiten A-C oder auch Korrektur dieser fehlgefalteten Proteine und somit zu weniger Flagellen auf der Bakterienoberfläche.

MicA als regulatorische RNA kann in *E. coli* an die mRNA von *flhDC* dem Klasse 1-Regulator der Flagellenproduktionskaskade binden (De Lay and Gottesman, 2012). MicA führt dabei zu einer Hochregulierung der Motilität, was durch eine Stabilisierung der mRNA des *flhDC*

erklärt werden kann (De Lay and Gottesman, 2012). Für Yersinien wurde noch keine Studie zum Einfluss der sRNA MicA auf die Motilität und die Regulation der Flagellenproduktion durchgeführt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass bei Abwesenheit von MicA es zu einer signifikant verstärkten Beweglichkeit der Yersinien kommt (Abb. 43). Im Immunoblot zeigt sich, dass die Abwesenheit vom MicA zu einer vermehrten Produktion von Flagellenproteinen an der äußeren Membran der Bakterien führt (TCA-Flagellen-Fällung Abb. 44). In den FACS-Analysen (Abb. 45) konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von MicA zu einer verminderten Produktion des FliA (Sigmafaktor) führt, keinen Einfluss auf FlhDC hat und bei den Flagellen zu einer vermehrten Produktion von FleB und FleC führt, jedoch zu einer verminderten Produktion von FleA (differenzielle Regulation).

Eine wesentliche Erkenntnis dieser Dissertation ist, dass die Berechnung von Interaktionen kleiner regulatorischer RNAs mit Ziel-mRNAs mittels IntaRNA sinnvoll ist. Die errechneten Energiewerte (Bindungsenergie und Hybridisierungsenergie), sowohl im kodierenden Bereich als auch im 5'UTR-Bereich der Ziel-mRNA, können direkte Wechselwirkungen mit den sRNAs vorhersagen lassen. Am Beispiel der Interaktion von MicA mit der *myfA*-mRNA ergab sich keine Interaktion mit dem 5'UTR-Bereich der mRNA und nur eine schwache Interaktion mit dem translatierenden Bereich der mRNA (Bindungsenergie -7,5 kcal/mol und Hybridisierungsenergie -14 kcal/mol). Bei allen anderen hier untersuchten mRNA-Interaktionen konnten sowohl im 5'UTR-Bereich als auch im translatierenden Bereich Bindungsenergiewerte zwischen -7 und -15 kcal/mol und Hybridisierungsenergien von -13 bis -17 kcal/mol ermittelt werden, die auch zur Beeinträchtigung der jeweiligen Proteinproduktion führten. Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Interaktion von sRNAs an 5'UTR und translatierende Bereiche erfolgen sollte, damit die Proteinproduktion beeinträchtigt wird.

5. ANHANG

5.1. Bereits veröffentlichte Teile dieser Dissertationsarbeit

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 3.8. zur Resistenz von *Y. enterocolitica* gegenüber oxidativem, saurem und antibiotika-induziertem „Envelope Stress“ sowie die Ergebnisse aus Kapitel 3.9. zur Indolproduktion wurden 2014 in PLoS ONE veröffentlicht (Kakoschke et al., 2014).

Die Analyse der Mikrokolonienbildung in 3D-Kollagengelen in Abhängigkeit des Adhäsins YadA (siehe Kapitel 3.7.) wurden 2016 in Scientific Reports veröffentlicht (Kakoschke et al., 2016). Zudem trugen Immunoblot- und FACS-Analysen zu den Erkenntnissen zum Einfluss von Hfq auf Virulenzfaktoren in *Y. enterocolitica* bei (Kakoschke et al., 2016).

6. LITERATURVERZEICHNIS

- AEPFELBACHER, M., ZUMBIHL, R., RUCKDESCHEL, K., JACOBI, C. A., BARZ, C. & HEESEMAN, J. 1999. The tranquilizing injection of Yersinia proteins: a pathogen's strategy to resist host defense. *Biol Chem*, 380, 795-802.
- ALBA, B. M. & GROSS, C. A. 2004. Regulation of the Escherichia coli sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol*, 52, 613-9.
- ALBERTS, B. J., A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2002a. *Molecular Biology of the Cell*, New York, Garland Science.
- ALBERTS, B. J., A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2002b. *Molecular Biology of the Cell*, New York, Garland Science.
- AUGUST, J. T., EOYANG, L., DE FERNANDEZ, M. T., HASEGAWA, S., KUO, C. H., RENSING, U. & SHAPIRO, L. 1970. Phage-specific and host proteins in the replication of bacteriophage RNA. *Fed Proc*, 29, 1170-5.
- BARTLETT, D. H., FRANTZ, B. B. & MATSUMURA, P. 1988. Flagellar transcriptional activators FlbB and Flal: gene sequences and 5' consensus sequences of operons under FlbB and Flal control. *J Bacteriol*, 170, 1575-81.
- BENGOECHEA, J. A., ZHANG, L., TOIVANEN, P. & SKURNIK, M. 2002. Regulatory network of lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in Yersinia enterocolitica includes cell envelope-dependent signals. *Mol Microbiol*, 44, 1045-62.
- BERCOVIER, H. & MOLLARET, H. H. 1984. *Yersinia*, Baltimore, Williams and Wilkins.
- BIALAS, N., KASPERKIEWICZ, K., RADZIEJEWSKA-LEBRECHT, J. & SKURNIK, M. 2012. Bacterial cell surface structures in Yersinia enterocolitica. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 60, 199-209.
- BIBEL, D. J. & CHEN, T. H. 1976. Diagnosis of plaque: an analysis of the Yersin-Kitasato controversy. *Bacteriol Rev*, 40, 633-51.
- BIEDZKA-SAREK, M., SALMENLINNA, S., GRUBER, M., LUPAS, A. N., MERI, S. & SKURNIK, M. 2008. Functional mapping of YadA- and Ail-mediated binding of human factor H to Yersinia enterocolitica serotype O:3. *Infect Immun*, 76, 5016-27.
- BIEDZKA-SAREK, M., VENHO, R. & SKURNIK, M. 2005. Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of Yersinia enterocolitica Serotype O:3. *Infect Immun*, 73, 2232-44.
- BLEVES, S., MARENNE, M. N., DETRY, G. & CORNELIS, G. R. 2002. Up-regulation of the Yersinia enterocolitica yop regulon by deletion of the flagellum master operon flhDC. *J Bacteriol*, 184, 3214-23.
- BORRERO-DE ACUNA, J. M., TIMMIS, K. N., JAHN, M. & JAHN, D. 2017. Protein complex formation during denitrification by Pseudomonas aeruginosa. *Microb Biotechnol*, 10, 1523-1534.
- BOS, M. P., ROBERT, V. & TOMMASSEN, J. 2007. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol*, 61, 191-214.
- BOTTONE, E. J. 1999. Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect*, 1, 323-33.
- BRANTL, S. 2007. Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol*, 10, 102-9.
- BRUBAKER, R. R. 1991. The V antigen of yersiniae: an overview. *Contrib Microbiol Immunol*, 12, 127-33.
- BRUBAKER, R. R. 2003. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to Yersiniae: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect Immun*, 71, 3673-81.
- BRZOSTKOWSKA, M., RACZKOWSKA, A. & BRZOSTEK, K. 2012. OmpR, a response regulator of the two-component signal transduction pathway, influences inv gene expression in Yersinia enterocolitica O9. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 153.
- BUSCH, A., RICHTER, A. S. & BACKOFEN, R. 2008. IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. *Bioinformatics*, 24, 2849-56.

- CASUTT-MEYER, S., RENZI, F., SCHMALER, M., JANN, N. J., AMSTUTZ, M. & CORNELIS, G. R. 2010. Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword. *PLoS One*, 5, e15159.
- CATHELYN, J. S., ELLISON, D. W., HINCHLIFFE, S. J., WREN, B. W. & MILLER, V. L. 2007. The RovA regulons of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* are distinct: evidence that many RovA-regulated genes were acquired more recently than the core genome. *Mol Microbiol*, 66, 189-205.
- CHANG, Z. 2016. The function of the DegP (HtrA) protein: Protease versus chaperone. *IUBMB Life*, 68, 904-907.
- CHANT, E. L. & SUMMERS, D. K. 2007. Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids. *Mol Microbiol*, 63, 35-43.
- CHAO, Y. & VOGEL, J. 2010. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 13, 24-33.
- CHEN, Y., DUAN, R., LI, X., LI, K., LIANG, J., LIU, C., QIU, H., XIAO, Y., JING, H. & WANG, X. 2015. Homology analysis and cross-immunogenicity of OmpA from pathogenic *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Mol Immunol*, 68, 290-9.
- CHILCOTT, G. S. & HUGHES, K. T. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 694-708.
- CHOI, H. I., KIM, M., JEON, J., HAN, J. K. & KIM, K. S. 2017. Overexpression of MicA induces production of OmpC-enriched outer membrane vesicles that protect against *Salmonella* challenge. *Biochem Biophys Res Commun*, 490, 991-996.
- CORNELIS, G. R. 2002a. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol*, 158, 401-8.
- CORNELIS, G. R. 2002b. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 742-52.
- CORNELIS, G. R. 2002c. The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol*, 291, 455-62.
- COSSART, P. & SANSONETTI, P. J. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304, 242-8.
- CRIBIER, B., CAILLE, A., HEID, E. & GROSSHANS, E. 1998. Erythema nodosum and associated diseases. A study of 129 cases. *Int J Dermatol*, 37, 667-72.
- DATSENKO, K. A. & WANNER, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6640-5.
- DE LAY, N. & GOTTESMAN, S. 2012. A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 86, 524-38.
- DE ROUVROIT, C. L., SLUITERS, C. & CORNELIS, G. R. 1992. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*, 6, 395-409.
- DEMARRE, G., GUEROUT, A. M., MATSUMOTO-MASHIMO, C., ROWE-MAGNUS, D. A., MARLIERE, P. & MAZEL, D. 2005. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalpha) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Res Microbiol*, 156, 245-55.
- DERSCH, P., KHAN, M. A., MUHLEN, S. & GORKE, B. 2017. Roles of Regulatory RNAs for Antibiotic Resistance in Bacteria and Their Potential Value as Novel Drug Targets. *Front Microbiol*, 8, 803.
- DEUSCHLE, E., KELLER, B., SIEGFRIED, A., MANNCKE, B., SPAETH, T., KOBERLE, M., DRECHSLER-HAKE, D., REBER, J., BOTTCHER, R. T., AUTENRIETH, S. E., AUTENRIETH, I. B., BOHN, E. & SCHUTZ, M. 2016. Role of beta1 integrins and bacterial adhesins for Yop injection into leukocytes in *Yersinia enterocolitica* systemic mouse infection. *Int J Med Microbiol*, 306, 77-88.
- EDGREN, T., FORSBERG, A., ROSQVIST, R. & WOLF-WATZ, H. 2012. Type III secretion in *Yersinia*: injectisome or not? *PLoS Pathog*, 8, e1002669.

- EL TAHIR, Y. & SKURNIK, M. 2001. YadA, the multifaceted Yersinia adhesin. *Int J Med Microbiol*, 291, 209-18.
- EL-MOWAFI, S. A., ALUMASA, J. N., ADES, S. E. & KEILER, K. C. 2014. Cell-based assay to identify inhibitors of the Hfq-sRNA regulatory pathway. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 5500-9.
- ENGLER, C., KANDZIA, R. & MARILLONNET, S. 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*, 3, e3647.
- FRANZE DE FERNANDEZ, M. T., EOYANG, L. & AUGUST, J. T. 1968. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature*, 219, 588-90.
- FREUND, S., CZECH, B., TRULZSCH, K., ACKERMANN, N. & HEESEMANN, J. 2008. Unusual, virulence plasmid-dependent growth behavior of Yersinia enterocolitica in three-dimensional collagen gels. *J Bacteriol*, 190, 4111-20.
- FUCHS, G. 2007a. *Allgemeine Mikrobiologie*, Stuttgart - New York, Georg Thieme Verlag.
- FUCHS, G. 2007b. *Allgemeine Mikrobiologie*, Stuttgart - New York, Georg Thieme Verlag.
- GAEDE, K. I. & HEESEMANN, J. 1995. Arthritogenicity of genetically manipulated Yersinia enterocolitica serotype O8 for Lewis rats. *Infect Immun*, 63, 714-9.
- GALAN, J. E. & WAKSMAN, G. 2018. Protein-Injection Machines in Bacteria. *Cell*, 172, 1306-1318.
- GARZETTI, D., BOUABE, H., HEESEMANN, J. & RAKIN, A. 2012. Tracing genomic variations in two highly virulent Yersinia enterocolitica strains with unequal ability to compete for host colonization. *BMC Genomics*, 13, 467.
- GENG, J., SONG, Y., YANG, L., FENG, Y., QIU, Y., LI, G., GUO, J., BI, Y., QU, Y., WANG, W., WANG, X., GUO, Z., YANG, R. & HAN, Y. 2009. Involvement of the post-transcriptional regulator Hfq in Yersinia pestis virulence. *PLoS One*, 4, e6213.
- GEORG, J. & HESS, W. R. 2011a. cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75, 286-300.
- GEORG, J. & HESS, W. R. 2011b. Regulatory RNAs in cyanobacteria: developmental decisions, stress responses and a plethora of chromosomally encoded cis-antisense RNAs. *Biol Chem*, 392, 291-7.
- GOTTESMAN, S. 2005. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet*, 21, 399-404.
- GRABOWICZ, M. & SILHAVY, T. J. 2017. Envelope Stress Responses: An Interconnected Safety Net. *Trends Biochem Sci*, 42, 232-242.
- GROSSKINSKY, U., SCHUTZ, M., FRITZ, M., SCHMID, Y., LAMPARTER, M. C., SZCZESNY, P., LUPAS, A. N., AUTENRIETH, I. B. & LINKE, D. 2007. A conserved glycine residue of trimeric autotransporter domains plays a key role in Yersinia adhesin A autotransport. *J Bacteriol*, 189, 9011-9.
- GUEST, R. L. & RAIVIO, T. L. 2016. Role of the Gram-Negative Envelope Stress Response in the Presence of Antimicrobial Agents. *Trends Microbiol*, 24, 377-390.
- GUGGENBERGER, C., WOLZ, C., MORRISSEY, J. A. & HEESEMANN, J. 2012. Two distinct coagulase-dependent barriers protect Staphylococcus aureus from neutrophils in a three dimensional in vitro infection model. *PLoS Pathog*, 8, e1002434.
- GUZMAN, L. M., BELIN, D., CARSON, M. J. & BECKWITH, J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 177, 4121-30.
- HAKANSSON, S., SCHESSER, K., PERSSON, C., GALYOV, E. E., ROSQVIST, R., HOMBLE, F. & WOLF-WATZ, H. 1996. The YopB protein of Yersinia pseudotuberculosis is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J*, 15, 5812-23.
- HANAHAH, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.
- HAPFELMEIER, S., EHRBAR, K., STECHER, B., BARTHEL, M., KREMER, M. & HARDT, W. D. 2004. Role of the Salmonella pathogenicity island 1 effector proteins SipA,

- SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun*, 72, 795-809.
- HEESEMAN, J. & AEPFELBACHER, M. 2001. The fight between cells and bacteria: modulation of eukaryotic signalling by bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 291, 241-2.
- HEESEMAN, J., EGGERS, C. & SCHRODER, J. 1987. Serological diagnosis of yersiniosis by immunoblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic *Yersiniae*. *Contrib Microbiol Immunol*, 9, 285-9.
- HEESEMAN, J. & LAUFS, R. 1983. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J Bacteriol*, 155, 761-7.
- HEINE, W., BECKSTETTE, M., HEROVEN, A. K., THIEMANN, S., HEISE, U., NUSS, A. M., PISANO, F., STROWIG, T. & DERSCH, P. 2018. Loss of CNFY toxin-induced inflammation drives *Yersinia pseudotuberculosis* into persistency. *PLoS Pathog*, 14, e1006858.
- HELANDER, I., OLKKONEN, L. & HOPUSU-HAVU, V. K. 1973. *Yersinia* infection as a cause of erythema nodosum. *Z Haut Geschlechtskr*, 48, 399-404.
- HEROLD, G. 2014. *Innere Medizin*, Köln, Gerd Herold.
- HEROVEN, A. K., BOHME, K., TRAN-WINKLER, H. & DERSCH, P. 2007. Regulatory elements implicated in the environmental control of invasin expression in enteropathogenic *Yersinia*. *Adv Exp Med Biol*, 603, 156-66.
- HEROVEN, A. K., NAGEL, G., TRAN, H. J., PARR, S. & DERSCH, P. 2004. RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and rovA expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol*, 53, 871-88.
- HEUSIPP, G., SCHMIDT, M. A. & MILLER, V. L. 2003. Identification of rpoE and nadB as host responsive elements of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett*, 226, 291-8.
- HITCHCOCK, P. J. & BROWN, T. M. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol*, 154, 269-77.
- HOICZYK, E. & BLOBEL, G. 2001. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4669-74.
- HOICZYK, E., ROGGENKAMP, A., REICHENBECHER, M., LUPAS, A. & HEESEMAN, J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J*, 19, 5989-99.
- HORNE, S. M. & PRUSS, B. M. 2006. Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid-encoded virulence genes. *Arch Microbiol*, 185, 115-26.
- HUBER, D. & BUKAU, B. 2008. DegP: a Protein "Death Star". *Structure*, 16, 989-90.
- HUOVINEN, E., SIHVONEN, L. M., VIRTANEN, M. J., HAUKKA, K., SIITONEN, A. & KUUSI, M. 2010. Symptoms and sources of *Yersinia enterocolitica*-infection: a case-control study. *BMC Infect Dis*, 10, 122.
- IRIARTE, M., STAINIER, I., MIKULSKIS, A. V. & CORNELIS, G. R. 1995. The fliA gene encoding sigma 28 in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, 177, 2299-304.
- IRIARTE, M., VANOOTEGHEM, J. C., DELOR, I., DIAZ, R., KNUTTON, S. & CORNELIS, G. R. 1993. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*, 9, 507-20.
- ISBERG, R. R. & LEONG, J. M. 1990. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*, 60, 861-71.
- JAGTAP, C. B., KUMAR, P. & RAO, K. K. 2016. *Bacillus subtilis* Hfq: A role in chemotaxis and motility. *J Biosci*, 41, 347-58.
- JIANG, J., ZHANG, X., CHEN, Y., WU, Y., ZHOU, Z. H., CHANG, Z. & SUI, S. F. 2008. Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 11939-44.
- JOHANSEN, J., ERIKSEN, M., KALLIPOLITIS, B. & VALENTIN-HANSEN, P. 2008. Down-regulation of outer membrane proteins by noncoding RNAs: unraveling the cAMP-CRP- and sigmaE-dependent CyaR-ompX regulatory case. *J Mol Biol*, 383, 1-9.

- JOMAA, A., DAMJANOVIC, D., LEONG, V., GHIRLANDO, R., IWANCZYK, J. & ORTEGA, J. 2007. The inner cavity of Escherichia coli DegP protein is not essential for molecular chaperone and proteolytic activity. *J Bacteriol*, 189, 706-16.
- KAKOSCHKE, T., KAKOSCHKE, S., MAGISTRO, G., SCHUBERT, S., BORATH, M., HEESEMANN, J. & ROSSIER, O. 2014. The RNA chaperone Hfq impacts growth, metabolism and production of virulence factors in Yersinia enterocolitica. *PLoS One*, 9, e86113.
- KAKOSCHKE, T. K., KAKOSCHKE, S. C., ZEUZEM, C., BOUABE, H., ADLER, K., HEESEMANN, J. & ROSSIER, O. 2016. The RNA Chaperone Hfq Is Essential for Virulence and Modulates the Expression of Four Adhesins in Yersinia enterocolitica. *Sci Rep*, 6, 29275.
- KANEHISA, M., SATO, Y., KAWASHIMA, M., FURUMICHI, M. & TANABE, M. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res*, 44, D457-62.
- KANIGA, K., DELOR, I. & CORNELIS, G. R. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of Yersinia enterocolitica. *Gene*, 109, 137-41.
- KAPATRAL, V., OLSON, J. W., PEPE, J. C., MILLER, V. L. & MINNICH, S. A. 1996. Temperature-dependent regulation of Yersinia enterocolitica Class III flagellar genes. *Mol Microbiol*, 19, 1061-71.
- KEGG-GENOME, J. V. 2018. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=yen [Online]. Japan: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Accessed].
- KIM, J., SHIN, B., PARK, C. & PARK, W. 2017. Indole-Induced Activities of beta-Lactamase and Efflux Pump Confer Ampicillin Resistance in Pseudomonas putida KT2440. *Front Microbiol*, 8, 433.
- KINDER, S. A., BADGER, J. L., BRYANT, G. O., PEPE, J. C. & MILLER, V. L. 1993. Cloning of the YenI restriction endonuclease and methyltransferase from Yersinia enterocolitica serotype O8 and construction of a transformable R-M+ mutant. *Gene*, 136, 271-5.
- KLEIN, G. & RAINA, S. 2019. Regulated Assembly of LPS, Its Structural Alterations and Cellular Response to LPS Defects. *Int J Mol Sci*, 20.
- KNAPP, W. 1981. [Yersinia arthritis. frequency of enteral yersinias and their diagnosis (author's transl)]. *MMW Munch Med Wochenschr*, 123, 1903-7.
- KNAPP, W. & WEBER, A. 1981. [Enteritis from "atypical" Yersinia]. *Dtsch Med Wochenschr*, 106, 444.
- KOLODZIEJEK, A. M., SCHNIDER, D. R., ROHDE, H. N., WOJTOWICZ, A. J., BOHACH, G. A., MINNICH, S. A. & HOVDE, C. J. 2010. Outer membrane protein X (Ail) contributes to Yersinia pestis virulence in pneumonic plague and its activity is dependent on the lipopolysaccharide core length. *Infect Immun*, 78, 5233-43.
- KOLODZIEJEK, A. M., SINCLAIR, D. J., SEO, K. S., SCHNIDER, D. R., DEOBALD, C. F., ROHDE, H. N., VIAL, A. K., MINNICH, S. S., HOVDE, C. J., MINNICH, S. A. & BOHACH, G. A. 2007. Phenotypic characterization of OmpX, an Ail homologue of Yersinia pestis KIM. *Microbiology*, 153, 2941-51.
- KROJER, T., GARRIDO-FRANCO, M., HUBER, R., EHRMANN, M. & CLAUSEN, T. 2002. Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature*, 416, 455-9.
- KROJER, T., PANGERL, K., KURT, J., SAWA, J., STINGL, C., MECHTLER, K., HUBER, R., EHRMANN, M. & CLAUSEN, T. 2008a. Interplay of PDZ and protease domain of DegP ensures efficient elimination of misfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7702-7.
- KROJER, T., SAWA, J., SCHAFFER, E., SAIBIL, H. R., EHRMANN, M. & CLAUSEN, T. 2008b. Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature*, 453, 885-90.
- KULESUS, R. R., DIAZ-PEREZ, K., SLECHTA, E. S., ETO, D. S. & MULVEY, M. A. 2008. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun*, 76, 3019-26.

- LEE, J. H. & LEE, J. 2010. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev*, 34, 426-44.
- LINDLER, L. E., KLEMPNER, M. S. & STRALEY, S. C. 1990. Yersinia pestis pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. *Infect Immun*, 58, 2569-77.
- LIPINSKA, B., FAYET, O., BAIRD, L. & GEORGOPOULOS, C. 1989. Identification, characterization, and mapping of the Escherichia coli htrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol*, 171, 1574-84.
- LIPINSKA, B., SHARMA, S. & GEORGOPOULOS, C. 1988. Sequence analysis and regulation of the htrA gene of Escherichia coli: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res*, 16, 10053-67.
- LIU, X. & MATSUMURA, P. 1994. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the Escherichia coli flagellar class II operons. *J Bacteriol*, 176, 7345-51.
- LIU, X., YAN, Y., WU, H., ZHOU, C. & WANG, X. 2019. Biological and transcriptomic studies reveal hfq is required for swimming, biofilm formation and stress response in Xanthomonas axonopodis pv. citri. *BMC Microbiol*, 19, 103.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.
- MANN, M., WRIGHT, P. R. & BACKOFEN, R. 2017. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 45, W435-W439.
- MASSE, E., ESCORCIA, F. E. & GOTTESMAN, S. 2003a. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli. *Genes Dev*, 17, 2374-83.
- MASSE, E., MAJDALANI, N. & GOTTESMAN, S. 2003b. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 6, 120-4.
- MEUSKENS, I., SARAGLIADIS, A., LEO, J. C. & LINKE, D. 2019. Type V Secretion Systems: An Overview of Passenger Domain Functions. *Front Microbiol*, 10, 1163.
- MICHAUX, C., VERNEUIL, N., HARTKE, A. & GIARD, J. C. 2014. Physiological roles of small RNA molecules. *Microbiology*, 160, 1007-1019.
- MILLER, V. L., BEER, K. B., HEUSIPP, G., YOUNG, B. M. & WACHTEL, M. R. 2001. Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol Microbiol*, 41, 1053-62.
- MILLER, V. L., BLISKA, J. B. & FALKOW, S. 1990. Nucleotide sequence of the Yersinia enterocolitica ail gene and characterization of the Ail protein product. *J Bacteriol*, 172, 1062-9.
- MILLER, W. G., LEVEAU, J. H. & LINDOW, S. E. 2000. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol Plant Microbe Interact*, 13, 1243-50.
- MUELLER, C. A., BROZ, P., MULLER, S. A., RINGLER, P., ERNE-BRAND, F., SORG, I., KUHN, M., ENGEL, A. & CORNELIS, G. R. 2005. The V-antigen of Yersinia forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science*, 310, 674-6.
- NAGEL, G., LAHRZ, A. & DERSCH, P. 2001. Environmental control of invasin expression in Yersinia pseudotuberculosis is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol*, 41, 1249-69.
- NCBI-GENOME, J. V. 2018. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_008800.1 [Online]. USA: US National Library of Medicine National Institutes of Health. [Accessed].
- NIEFNECKER, J. 2009. *Identifizierung von Virulenzassoziierten Antigenen bei enteropathogenen Yersinien und Campylobacter* Promotionsarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU).
- NUORTI, J. P., NISKANEN, T., HALLANVUO, S., MIKKOLA, J., KELA, E., HATAKKA, M., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., LYTTIKAINEN, O., SIITONEN, A., KORKEALA, H. & RUUTU, P. 2004. A widespread outbreak of Yersinia pseudotuberculosis O:3 infection from iceberg lettuce. *J Infect Dis*, 189, 766-74.
- OBERHETTINGER, P., SCHUTZ, M., LEO, J. C., HEINZ, N., BERGER, J., AUTENRIETH, I. B. & LINKE, D. 2012. Intimin and invasin export their C-terminus to the bacterial cell

- surface using an inverse mechanism compared to classical autotransport. *PLoS One*, 7, e47069.
- OELLERICH, M. F., JACOBI, C. A., FREUND, S., NIEDUNG, K., BACH, A., HEESEMANN, J. & TRULZSCH, K. 2007. Yersinia enterocolitica infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect Immun*, 75, 3802-11.
- PAPENFORT, K., PFEIFFER, V., LUCCHINI, S., SONAWANE, A., HINTON, J. C. & VOGEL, J. 2008. Systematic deletion of Salmonella small RNA genes identifies CyaR, a conserved CRP-dependent riboregulator of OmpX synthesis. *Mol Microbiol*, 68, 890-906.
- PAPENFORT, K., PFEIFFER, V., MIKA, F., LUCCHINI, S., HINTON, J. C. & VOGEL, J. 2006. SigmaE-dependent small RNAs of Salmonella respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Mol Microbiol*, 62, 1674-88.
- PAPENFORT, K. & VOGEL, J. 2010. Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe*, 8, 116-27.
- PARK, B. S. & LEE, J. O. 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*, 45, e66.
- PEPE, J. C. & MILLER, V. L. 1993a. The biological role of invasin during a Yersinia enterocolitica infection. *Infect Agents Dis*, 2, 236-41.
- PEPE, J. C. & MILLER, V. L. 1993b. Yersinia enterocolitica invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6473-7.
- PEPE, J. C., WACHTEL, M. R., WAGAR, E. & MILLER, V. L. 1995. Pathogenesis of defined invasion mutants of Yersinia enterocolitica in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun*, 63, 4837-48.
- PETERSON, G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, 83, 346-56.
- QUINN, J. D., WEENING, E. H., MINER, T. A. & MILLER, V. L. 2019. Temperature Control of psaA Expression by PsaE and PsaF in Yersinia pestis. *J Bacteriol*, 201.
- RADEN, M., ALI, S. M., ALKHNABASHI, O. S., BUSCH, A., COSTA, F., DAVIS, J. A., EGGENHOFER, F., GELHAUSEN, R., GEORG, J., HEYNE, S., HILLER, M., KUNDU, K., KLEINKAUF, R., LOTT, S. C., MOHAMED, M. M., MATTHEIS, A., MILADI, M., RICHTER, A. S., WILL, S., WOLFF, J., WRIGHT, P. R. & BACKOFEN, R. 2018. Freiburg RNA tools: a central online resource for RNA-focused research and teaching. *Nucleic Acids Res*, 46, W25-W29.
- RAIVIO, T. L. & SILHAVY, T. J. 2001. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol*, 55, 591-624.
- RASMUSSEN, A. A., ERIKSEN, M., GILANY, K., UDESEN, C., FRANCH, T., PETERSEN, C. & VALENTIN-HANSEN, P. 2005. Regulation of ompA mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Mol Microbiol*, 58, 1421-9.
- REINES, M., LLOBET, E., DAHLSTROM, K. M., PEREZ-GUTIERREZ, C., LLOMPART, C. M., TORRECABOTA, N., SALMINEN, T. A. & BENGOCHEA, J. A. 2012. Deciphering the acylation pattern of Yersinia enterocolitica lipid A. *PLoS Pathog*, 8, e1002978.
- REVELL, P. A. & MILLER, V. L. 2001. Yersinia virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett*, 205, 159-64.
- RKI. 22.03.2020.
www.rki.de/DE/Content/Infekt/IfSG/Meldepflichtige_Krankheiten/Meldepflichtige_Krankheiten_Erreger.pdf?blob=publicationFile [Online]. Robert Koch Institut. [Accessed].
- ROGGENKAMP, A., NEUBERGER, H. R., FLUGEL, A., SCHMOLL, T. & HEESEMANN, J. 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of Yersinia enterocolitica abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol*, 16, 1207-19.
- ROLLAUER, S. E., SOORESHJANI, M. A., NOINAJ, N. & BUCHANAN, S. K. 2015. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370.

- ROWLEY, G., SPECTOR, M., KORMANEC, J. & ROBERTS, M. 2006. Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 4, 383-94.
- SCHAPERS, R. F., REIF, R., LENNERT, K. & KNAPP, W. 1981. Mesenteric lymphadenitis due to *Yersinia enterocolitica*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 390, 127-38.
- SCHIANO, C. A., BELLOWES, L. E. & LATHEM, W. W. 2010. The small RNA chaperone Hfq is required for the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun*, 78, 2034-44.
- SCHIANO, C. A. & LATHEM, W. W. 2012. Post-transcriptional regulation of gene expression in *Yersinia* species. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 129.
- SCHMIDTKE, C., ABENDROTH, U., BROCK, J., SERRANIA, J., BECKER, A. & BONAS, U. 2013. Small RNA sX13: a multifaceted regulator of virulence in the plant pathogen *Xanthomonas*. *PLoS Pathog*, 9, e1003626.
- SCHULTE, R. & AUTENRIETH, I. B. 1998. *Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation. *Infect Immun*, 66, 1216-24.
- SCHULTE, R., GRASSL, G. A., PREGER, S., FESSELE, S., JACOBI, C. A., SCHALLER, M., NELSON, P. J. & AUTENRIETH, I. B. 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J*, 14, 1471-84.
- SCHULZE-KOOPS, H., BURKHARDT, H., HEESEMANN, J., KIRSCH, T., SWOBODA, B., BULL, C., GOODMAN, S. & EMMRICH, F. 1993. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect Immun*, 61, 2513-9.
- SHEN, Q. T., BAI, X. C., CHANG, L. F., WU, Y., WANG, H. W. & SUI, S. F. 2009. Bowl-shaped oligomeric structures on membranes as DegP's new functional forms in protein quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 4858-63.
- SHIN, S., LU, G., CAI, M. & KIM, K. S. 2005. *Escherichia coli* outer membrane protein A adheres to human brain microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 330, 1199-204.
- SHIN, S. & PARK, C. 1995. Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J Bacteriol*, 177, 4696-702.
- SIMPSON, B. W. & TRENT, M. S. 2019. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nat Rev Microbiol*, 17, 403-416.
- SINGH, S. P., WILLIAMS, Y. U., MILLER, S. & NIKAIDO, H. 2003. The C-terminal domain of *Salmonella enterica* serovar typhimurium OmpA is an immunodominant antigen in mice but appears to be only partially exposed on the bacterial cell surface. *Infect Immun*, 71, 3937-46.
- SITTKA, A., PFEIFFER, V., TEDIN, K. & VOGEL, J. 2007. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, 63, 193-217.
- SKOREK, K., RACZKOWSKA, A., DUDEK, B., MIETKA, K., GUZ-REGNER, K., PAWLAK, A., KLAUSA, E., BUGLA-PLOSKONSKA, G. & BRZOSTEK, K. 2013. Regulatory protein OmpR influences the serum resistance of *Yersinia enterocolitica* O:9 by modifying the structure of the outer membrane. *PLoS One*, 8, e79525.
- SKURNIK, M. 1995. Role of YadA in *Yersinia-enterocolitica*-induced reactive arthritis: a hypothesis. *Trends Microbiol*, 3, 318-9.
- SKURNIK, M. & BENGOCHEA, J. A. 2003. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae*. *Carbohydr Res*, 338, 2521-9.
- SKURNIK, M., EL TAHIR, Y., SAARINEN, M., JALKANEN, S. & TOIVANEN, P. 1994. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect Immun*, 62, 1252-61.
- SKURNIK, M. & TOIVANEN, P. 1993. *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide: genetics and virulence. *Trends Microbiol*, 1, 148-52.
- SKURNIK, M. & TOIVONEN, S. 2011. Identification of distinct lipopolysaccharide patterns among *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like bacteria. *Biochemistry (Mosc)*, 76, 823-31.

- SKURNIK, M. & WOLF-WATZ, H. 1989. Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol*, 3, 517-29.
- SONNLEITNER, E., HAGENS, S., ROSENAU, F., WILHELM, S., HABEL, A., JAGER, K. E. & BLASI, U. 2003. Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog*, 35, 217-28.
- SOUTOURINA, O., KOLB, A., KRIN, E., LAURENT-WINTER, C., RIMSKY, S., DANCHIN, A. & BERTIN, P. 1999. Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the flhDC master operon. *J Bacteriol*, 181, 7500-8.
- SPIESS, C., BEIL, A. & EHRMANN, M. 1999. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 97, 339-47.
- STORZ, G., VOGEL, J. & WASSARMAN, K. M. 2011. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell*, 43, 880-91.
- STRALEY, S. C. & PERRY, R. D. 1995. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends Microbiol*, 3, 310-7.
- STRAUCH, K. L., JOHNSON, K. & BECKWITH, J. 1989. Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol*, 171, 2689-96.
- TAMM, A., TARKKANEN, A. M., KORHONEN, T. K., KUUSELA, P., TOIVANEN, P. & SKURNIK, M. 1993. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*, 10, 995-1011.
- THOMASON, M. K. & STORZ, G. 2010. Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annu Rev Genet*, 44, 167-88.
- UDEKWU, K. I., DARFEUILLE, F., VOGEL, J., REIMEGARD, J., HOLMQVIST, E. & WAGNER, E. G. 2005. Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev*, 19, 2355-66.
- VALENTIN-WEIGAND, P., HEESEMANN, J. & DERSCH, P. 2014. Unique virulence properties of *Yersinia enterocolitica* O:3--an emerging zoonotic pathogen using pigs as preferred reservoir host. *Int J Med Microbiol*, 304, 824-34.
- VALET, G. 2003. Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *J Biol Regul Homeost Agents*, 17, 213-22.
- VAN PUYVELDE, S., VANDERLEYDEN, J. & DE KEERSMAECKER, S. C. 2015. Experimental approaches to identify small RNAs and their diverse roles in bacteria--what we have learnt in one decade of MicA research. *Microbiologyopen*, 4, 699-711.
- VOGEL, J. & LUISI, B. F. 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol*, 9, 578-89.
- VOGEL, J. & PAPENFORT, K. 2006. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol*, 9, 605-11.
- WAGNER, E. G. 2013. Cycling of RNAs on Hfq. *RNA Biol*, 10, 619-26.
- WANG, Y. 2002. The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 292, 396-401.
- WASSARMAN, K. M., REPOILA, F., ROSENOW, C., STORZ, G. & GOTTESMAN, S. 2001. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev*, 15, 1637-51.
- WATERS, L. S. & STORZ, G. 2009. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 136, 615-28.
- WAUTERS, G., KANDOLO, K. & JANSSENS, M. 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol*, 9, 14-21.
- WEIRICH, J., BRAUTIGAM, C., MUHLENKAMP, M., FRANZ-WACHTEL, M., MACEK, B., MEUSKENS, I., SKURNIK, M., LESKINEN, K., BOHN, E., AUTENRIETH, I. & SCHUTZ, M. 2017. Identifying components required for OMP biogenesis as novel targets for anti-infective drugs. *Virulence*, 8, 1170-1188.
- WHITFIELD, C., WILLIAMS, D. M. & KELLY, S. D. 2020. Lipopolysaccharide O-antigen-bacterial glycans made to measure. *J Biol Chem*, 295, 10593-10609.

- WIEDEMANN, A., LINDER, S., GRASSL, G., ALBERT, M., AUTENRIETH, I. & AEPFELBACHER, M. 2001. Yersinia enterocolitica invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol*, 3, 693-702.
- WRIGHT, P. R., GEORG, J., MANN, M., SORESCU, D. A., RICHTER, A. S., LOTT, S., KLEINKAUF, R., HESS, W. R. & BACKOFEN, R. 2014. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Res*, 42, W119-23.
- WUORELA, M. & GRANFORS, K. 1998. Infectious agents as triggers of reactive arthritis. *Am J Med Sci*, 316, 264-70.
- YANG, Y., MERRIAM, J. J., MUELLER, J. P. & ISBERG, R. R. 1996. The psa locus is responsible for thermoinducible binding of Yersinia pseudotuberculosis to cultured cells. *Infect Immun*, 64, 2483-9.
- YERSIN, A. 1894. La peste bubonique a Hong-Kong. *Annales de l'institut Pasteur Paris*, 8, 662-667.
- YOUNG, G. M., BADGER, J. L. & MILLER, V. L. 2000. Motility is required to initiate host cell invasion by Yersinia enterocolitica. *Infect Immun*, 68, 4323-6.
- ZHANG, Q., ZHANG, Y., ZHANG, X., ZHAN, L., ZHAO, X., XU, S., SHENG, X. & HUANG, X. 2015. The novel cis-encoded antisense RNA AsrC positively regulates the expression of rpoE-rseABC operon and thus enhances the motility of Salmonella enterica serovar typhi. *Front Microbiol*, 6, 990.
- ZHANG, Y. & HONG, G. 2009. Evidences of Hfq associates with tryptophanase and affects extracellular indole levels. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 41, 709-17.