

**Analyse der Translokation von *Yersinia*
enterocolitica Yop in Wirtszellen mit
Hilfe eines β -Lactamase
Reportersystems**

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von
Annegret Klein-Günther
aus Bad Soden
vorgelegte

Dissertation

2010

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2010

Dekan: Prof. Dr. Mallot

1. Berichterstatter: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Forchhammer

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|--------------|
| 1. Einleitung | 5-19 |
| 1.1 <i>Yersinia enterocolitica</i> | 5 |
| 1.2 Epidemiologie, Pathogenese, Krankheitsbild von <i>Yersinia enterocolitica</i> | 5 |
| 1.3 Sekretionssystem | 6 |
| 1.4 Pathogenitätsfaktoren | 9 |
| 1.5 Infektionsverlauf bei der murinen Yersiniose | 14 |
| 1.6 Reportersysteme | 16 |
| 1.7 Ziel dieser Arbeit | 19 |
| 2. Material und Methoden | 20-55 |
| 2.1 Materialien | 20-36 |
| 2.1.1 Geräte | 20 |
| 2.1.2 Verbrauchsmittel | 21 |
| 2.1.3 Chemikalien | 23 |
| 2.1.4. Antikörper | 25 |
| 2.1.4.1 Immunfluoreszenz und Western Blot | 26 |
| 2.1.4.2 FACS-Antikörper | 26 |
| 2.1.5. Kommerzielle Kits | 26 |
| 2.1.6. Größenstandards | 26 |
| 2.1.7. Enzyme | 26 |
| 2.1.9 Zellkultur | 27 |
| 2.1.10. Bakterienstämme | 28 |
| 2.1.11. Bakterien-Nährmedien | 30 |
| 2.1.12 Mäusestämme | 31 |
| 2.1.13 Puffer und Lösungen | 31-36 |
| 2.1.13.1 Antibiotika-Lösungen und Desferoxamin | 31 |
| 2.1.13.2 Allgemeine Puffer und Lösungen | 32 |
| 2.1.13.3 Puffer für proteinchemisches Arbeiten | 33 |
| 2.1.13.4 Beta-Lactamase Färbelösung | 35 |
| 2.1.14. Synthetische Oligonukleotide | 35 |
| 2.1.15. Plasmide und Vektoren | 36 |
| 2.2 Methoden | 37-55 |
| 2.2.1. Arbeiten mit Bakterien | 37-40 |
| 2.2.1.1 Bakterienanzucht | 37 |
| 2.2.1.2 Herstellung von Bakterienstocks | 37 |
| 2.2.1.3 Vorbereitung der Bakterien zur Infektion von Zellkulturen | 37 |
| 2.2.1.4. Herstellung der Bakterienkulturen für die intravenöse Infektion von Mäusen | 38 |
| 2.2.1.5 Vorbereitung der Bakterien zur Infektion von Mäusen | 38 |

| | |
|---|-------|
| 2.2.1.6 Herstellung von chemischkompetenten (kalziumkompetenten) Bakterien | 39 |
| 2.2.1.7 Transformation von DNA in Bakterien | 39 |
| 2.2.1.8. Herstellung von elektrokompententen Bakterien | 39 |
| 2.2.1.9 Elektroporation von Bakterien | 40 |
| 2.2.2. Zellkulturen | 40-44 |
| 2.2.2.1 Kultivierung von Gewebekulturzellen HeLa | 40 |
| 2.2.2.2 Kultivierung von Gewebekulturzellen GD25 bzw. GD25 β -1 Integrin | 41 |
| 2.2.2.3 Isolation und Kultivierung von Maus-Knochenmarksmakrophagen | 41 |
| 2.2.2.5 Lebendzellzahlbestimmung | 42 |
| 2.2.2.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen | 42 |
| 2.2.2.7 Infektion von Zellkulturen mit Yersinien | 43 |
| 2.2.2.8 Adhäsionsassay | 43 |
| 2.2.2.9 <i>In vitro</i> Transfektion von HeLa Zellen mit ExGen 500 | 44 |
| 2.2.3 Tierexperimentelles Arbeiten | 45-48 |
| 2.2.3.1 <i>In vivo</i> Infektion von Mäusen | 45 |
| 2.2.3.2 Herstellung primärer Milzzellkulturen | 45 |
| 2.2.3.3 Kultivierung der Milzzellen | 45 |
| 2.2.3.4 Bestimmung der Keimzahl in Milzen infizierter Mäuse | 46 |
| 2.2.3.5 Antikörper-Färbung zellulärer Oberflächenmarker für die Analyse am Durchflusszytometer | 46 |
| 2.2.3.6 β -Lactamasefärbung | 46 |
| 2.2.3.7 Messen mit dem Durchflusszytometer | 45 |
| 2.2.3.8 Sortieren der Zellen | 48 |
| 2.2.4 Molekularbiologische Methoden | 48-52 |
| 2.2.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 48 |
| 2.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese | 49 |
| 2.2.4.3 Elution von DNA aus Agarosegelen | 50 |
| 2.2.4.4 Präparation von Plasmiden | 50 |
| 2.2.4.5 Plasmid Präparation durch alkalische Lyse ohne Säulchen | 50 |
| 2.2.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mit der TENS-Methode | 51 |
| 2.2.4.7 Fällung von RNA oder DANN | 51 |
| 2.2.4.8 Restriktionsanalysen von DANN | 51 |
| 2.2.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten | 52 |
| 2.2.5 Proteinchemisches Arbeiten | 52-55 |
| 2.2.5.1 Gewinnung von sekretierten <i>Yersinia</i> Proteinen | 52 |
| 2.2.5.3 Proteinbestimmung | 53 |
| 2.2.5.4 Gel-Elektrophorese | 53 |
| 2.2.5.5 Gelherstellung | 53 |
| 2.2.5.6 SDS-Gel-Elektrophorese | 54 |
| 2.2.5.7 Gel-Blotting | 54 |
| 2.2.5.8 Färben mit Ponceau-S-Lösung | 54 |
| 2.2.5.9 Immunreaktion | 54 |
| 2.2.5.10 Entwicklung der Membran | 55 |

| | |
|--|---------------|
| 3. Ergebnisse | 56-109 |
| 3.1 Etablierung eines Reportersystem für die Translokation von Yops in die Zielzelle | 56-67 |
| 3.1.1 Klonierung des Reporterplasmids | 57 |
| 3.1.2 Sekretion von YopE53- β -Lactamase und YopE | 60 |
| 3.1.3 Überprüfung der Spezifität des Reportersystems | 62 |
| 3.1.4 Nachweis der Yop Translokation in HeLa Zellen | 63 |
| 3.1.5.1 Infektion von HeLa Zellen mit E40 Reporterstämmen | 64 |
| 3.1.5.2 Infektion von HeLa Zellen mit WA-314 Reporterstämmen | 66 |
| 3.1.5.3 Nachweis der Yop Injektion in HeLa Zellen im zeitlichen Verlauf | 67 |
| 3.2. Untersuchung der Yop Injektion in primären Zellen | 68-82 |
| 3.2.1 Nachweis der Yop Injektion in Knochenmarksmakrophagen | 68 |
| 3.2.2 Nachweis der Yop Injektion in Milzzellen | 72 |
| 3.2.3 Yop Injektion in Abhängigkeit von der Infektionsdosis | 74 |
| 3.3 Untersuchung der Subpopulationen in einer Zellkultur infizierten Milzzellsuspension | 76 |
| 3.4 Einfluss von β_1 -Integrin auf die Yop-Translokation | 79 |
| 3.5 Einfluss von YadA auf die Yop Translokation | 81 |
| 3.6 Etablierung eines β -Lactamase Reportersystems <i>in vivo</i> | 82 |
| 3.6.1 Sortierung von β -Lactamase positiven Zellen | 86 |
| 3.6.2 Zusammenhang zwischen Infektionsdauer bzw. Infektionsdosis und Anzahl blauer Zellen nach Infektion mit E40-pBla. | 89 |
| 3.6.3 Korrelation zwischen Keimzahl in der Milz und Yop Injektion. | 91 |
| 3.7 In welche Zellen werden Yops während einer Infektion von Mäusen transloziert ? | 92-95 |
| 3.7.1 Quantitative Bestimmung der Zellpopulationen in der Milz vor und nach Infektion | 92 |
| 3.8 Einfluss von definierten Immundefekten auf die Yop Injektion | 95-109 |
| 3.8.1 Untersuchung der Milzzell-Subpopulationen von <i>in vivo</i> infizierten IFN γ R $^{-/-}$ im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen. | 97 |
| 3.8.2 Untersuchung der Milzzell-Subpopulationen von <i>in vivo</i> infizierten Myd88 $^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen. | 101 |
| 3.8.3 Untersuchung der Milzzell-Subpopulationen von <i>in vivo</i> infizierten TNFRp55 $^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen. | 104 |

| | |
|--|----------------|
| 4. Diskussion | 110-125 |
| 4.1. Etablierung eines Reportersystems | 110 |
| 4.2 Ist Nachweis der β -Lactamaseaktivität mit Yop Injektion assoziiert? | 113 |
| 4.3 Einfluss von β_1 -Integrin und YadA auf die Yop-Translokation | 113 |
| 4.4 Etablierung des Reportersystems <i>in vivo</i> | 115 |
| 4.5 Welche Zellen sind von der Yop Translokation betroffen? | 117 |
| 4.6 Einfluss von Zytokinen, Adaptermolekülen und Rezeptoren auf die Translokation von Yops | 120 |
| 5. Zusammenfassung | 126-128 |
| 6. Abkürzungen | 129 |
| 7. Literaturverzeichnis | 130-141 |
| 8. Publikationen | 142 |
| 9. Danksagung | 143 |
| 10. Lebenslauf | 144 |

1 Einleitung

1.1 *Yersinia enterocolitica*

Die Gattung *Yersinia* gehört zu der Familie der *Enterobacteriaceae* (30, 91). *Yersinien* sind fakultativ anaerobe, gramnegative, nicht sporenbildende Kurzstäbchen (130). Eine Besonderheit dieser Bakterien ist ihre Fähigkeit bei niedrigen Temperaturen zu überleben und zu wachsen (91). Sie wachsen optimal bei 27-30°C.

Von den 11 *Yersinia* Arten sind drei humanpathogen: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia pestis* (30). *Yersinien* verursachen eine Zoonose, die von Wild- und Nutztieren übertragen wird. Trotz der unterschiedlichen Virulenz und Übertragungswege vermehren die drei Spezies sich vor allem in lymphatischem Gewebe und können sich der angeborenen Immunantwort des Wirts entziehen (62). Am häufigsten beim Menschen kommt *Yersinia enterocolitica* vor.

Yersinia enterocolitica wird fäkal-oral oder über kontaminiertes Trinkwasser bzw. Nahrungsmittel auf den Menschen übertragen. *Yersinia enterocolitica* wird in verschiedene Serotypen eingeteilt, wovon aber nur O:3, O:5,27, O:8 und O:9 human- und tierpathogen sind (41). *Yersinia enterocolitica* ist ein extrazelluläres Bakterium (11), tritt aber auch in seltenen Fällen intrazellulär auf (82).

1.2 Epidemiologie, Pathogenese, Krankheitsbild von *Yersinia enterocolitica*

Der Name *Yersinia enterocolitica* wird von Frederiksen 1964 an ein Bakterium vergeben das vorher *Bacterium enterocoliticum*, *Pasteurella pseudotuberculosis Typ B* und *Pasteurella X* genannt wird (120). Der Erreger wird über kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser aufgenommen (21, 79, 126). Eine Infektion durch direkten Kontakt mit erkrankten Tieren oder tierischen Überträgern ist selten. Die Keime werden durch den unteren Intestinaltrakt über die M-Zellen eingeschleust und gelangen so in die Makrophagen. Die Makrophagen transportieren die Bakterien in das GALT (Peyer'schen Plaques, Mesenteriallymphknoten) (63).

Bei Kindern kann es zu einer Fehldiagnose kommen. Die Symptome weisen auf eine *Salmonellen*-, *Shigellen*- oder *E. coli*-Infektionen hin. Die Kinder haben erhöhte Temperatur, Durchfall, akute abdominale Schmerzen und bisweilen Kopfschmerzen. Spätere klinische Manifestationen können Gelenkschmerzen sein. Eine Enteritis kombiniert mit arthritischen Symptomen ist möglich, aber häufig wird die Arthritis zusätzlich von anderen Bakterien verursacht (5). Bei immuninkompetenten Patienten kann es zu einer Sepsis kommen. Erwachsene leiden bei einer *Yersinia enterocolitica*-Infektion unter Muskelschmerzen mit akuten Schmerzen im Ileozökalbereich, Erbrechen und Durchfall (5). Es kann zu Komplikationen bei einer allergischen Reaktion auf das Bakterium kommen. Es können Erythema nodosum oder Arthritis auftreten (27, 127).

Yersinia enterocolitica kann aus dem Stuhl, aus einem rektalen Abstrich, aus dem Blut, aus den Lymphknoten sowie aus dem Nahrungsmittel, der Quelle der Infektion, isoliert werden. Die Diagnose kann ziemlich sicher durch einen kulturellen Nachweis gestellt werden (5, 27). Außerdem kann man *Yersinia enterocolitica* über spezielle Agglutinations-Antikörper nachweisen (127).

Bei Tieren ist *Yersinia enterocolitica* eine weit verbreitete Infektionskrankheit. Latent infizierte Warmblüter sind für die Bakterien ein wichtiges Reservoir. Durch sie kommt es zu einer Kontamination der Vegetation, des Bodens und des Oberflächenwassers.

1.3 Sekretionssysteme

Bakterien können über sogenannte Sekretionssysteme Protein, aber auch DNA sekretieren. Hierbei unterscheidet man zwischen Sec-abhängige und Sec-unabhängige Sekretionssysteme. So handelt es sich bei den Sekretionssystemen des Types II und V um Sec-abhängige Sekretionssysteme (z.B. bei *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*). Es werden unter anderem Maltose-Bindeproteine, β -Lactamasen, Phosphate sekretiert. Die Proteine werden hierbei durch die Cytoplasmamembran hindurchgeführt und mittels der Sec-Maschinerie, bestehend aus 12 verschiedenen Sec-Proteinen, transloziert, prozessiert und sekretiert (9, 54, 55, 95, 118). Das Typ V Sekretionssystem unterscheidet sich von dem des Typ II Sekretionssystem insofern der Transport von Cytoplasma zum periplasmatischen Raum sec-abhängig ist, jedoch der Transport in die äußere Membran autokatalytisch erfolgt. Typ V Sekretionssysteme findet man vor allem bei gram-negativen Bakterien z.B. *Neisseria gonorrhoeae* (70).

Die Sekretionssysteme der Typen I, III und Typ IV sind Sec-unabhängig.

Das Typ I Sekretionssystem ist ein ABC-Transporter. ABC-Transporter findet man in Säugetieren, Bakterien und Pflanzen. Sie gehören zu einer Klasse von Membranproteinen, die als gemeinsames Strukturelement eine ATP-bindende Kasette (von englisch: *ATP binding cassette*, ABC) besitzen und spezifische Substrate aktiv über eine Zellmembran transportieren. Für den Transport von Substraten gegen einen Konzentrationsgradienten über den ABC-Transporter, muss für den Vorgang Energie in Form von ATP aufgewendet werden. Dies geschieht durch die Bindung und Hydrolyse von ATP an der ABC-Einheit. Das Protein wird in einem Schritt durch die cytoplasmatische und äußere Membran transportiert; ein Beispiel wäre die Hämolyseinsekretion bei *E. coli* (50, 70, 76).

Bei dem Typ IV Sekretionssystem wird die Wirtszelle mit der Bakterienzelle über einen Pilusapparat verbunden. Durch diese Konjugationsbrücke wird einzelsträngige DNA oder manche Proteine vom Bakterium in die Wirtszelle transferiert. Das Typ IV Sekretionssystem wird unter anderem von *Agrobacterium tumefaciens* zur Übertragung von DNA genutzt (45, 70).

Das Typ III Sekretionssystem kommt fast ausschließlich in gram-negativen Bakterien (*Yersinia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Bordetella spp.*, und *Pseudomonas aeruginosa* sowie der enteropathogenen *Escherichia coli*) vor. Das Ziel der pathogenen Organismen ist ihre Proteintoxine in das Cytosol der Wirtszelle abzugeben, um zelluläre Funktionen der Zielzelle zu manipulieren und dadurch eine Krankheit auszulösen (107). Die extrazellulären Bakterien heften sich an die Oberfläche des Wirtes und injizieren ihre Proteine in die Wirtszelle über einen Porenapparat, der sich über die bakterielle- sowie die Wirtszellmembran erstreckt. Die Transkription der Komponenten des Sekretionsapparates hängt von Faktoren wie Temperatur, Osmolarität, Nahrungsangebot sowie von zweiwertigen Kationen (Ca^{2+}), pH-Wert und Wachstumsphase ab (56).

Tab. 1: Sekretionssysteme

| Sekretionssystem | Prototyp | Transporter | Sec-abhängig/ Sec-unabhängig | Arten |
|------------------|--|---|---------------------------------|--|
| Typ I | α -Hämolysin- Transportsystem | ABC- Transporter | Sec-unabhängig | <i>Escherichia coli</i> , <i>Serratia</i> , <i>Bordetella</i> <i>pertussis</i> |
| Typ II | Pullulanase- Sekretionssystem | | Sec-abhängig | <i>Klebsiella</i> <i>oxytoca</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>) |
| Typ III | <i>Yersinia</i> outer proteins (Yops) | Porenapparat, Pilus- ähnlichen Sekretions- apparates | Sec-unabhängig | <i>Yersinia</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Bordetella</i> spp., und <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> sowie der enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> |
| Typ IV | Pertussis toxin Vir-System | Konjugations- ähnlichen Pilusapparates | Sec-unabhängig | <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> , <i>Bordetella</i> <i>pertussis</i> |
| Typ V | IgA-Protease | Der erste Schritt erfolgt Sec-abhängig, der zweite Schritt erfolgt autokatalytisch | Sec-abhängig | <i>Neisseria</i> <i>gonorrhoeae</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>E.</i> <i>coli</i> |

Der Typ III Sekretionsapparat bei *Y. enterocolitica* besteht aus ungefähr 25 Proteinen. Einige der Proteine sind so genannte Effektorproteine, sie werden in das Zytosol der Zielzelle indiziert. Die anderen sind die Translokatoren. Sie helfen den Effektoren durch die Membran in die Eukaryontenzelle zu kommen. Die Effektoren beeinflussen die zellulären Signalkaskaden oder das Zytoskelett (44). Der Sekretionsapparat besteht aus zwei Teilen: Einem großen Hauptteil, dem basalen Körper, welcher in den Bakterienmembranen und in der Peptidoglyanschicht verankert ist, sowie einer außerhalb des Bakteriums befindlichen, nadelähnlichen Struktur.

Der Nadelkomplex hat eine lange hohle Struktur und wird in zwei Domänen aufgeteilt: Einen nadelähnlichen Anteil, der aus der Bakteriellenzelle herausragt, und eine zylinderförmige Basis, welche in der inneren und äußeren Membran ankert. Der Basalapparat besteht aus drei Proteinen InvG (ein Mitglied der Sekretinfamilie) und zwei Lipoproteinen. Am proximalen Ende des Basalkörpers befindet sich eine Proteinpumpe, an deren Antrieb maßgeblich eine als YscN bezeichnete ATPase beteiligt ist. Die Nadel besteht aus multimerisiertem YscF. Die Nadellänge ist genetisch kontrolliert und positiv korreliert mit der Größe von YscP (44, 56, 77, 83, 96, 138).

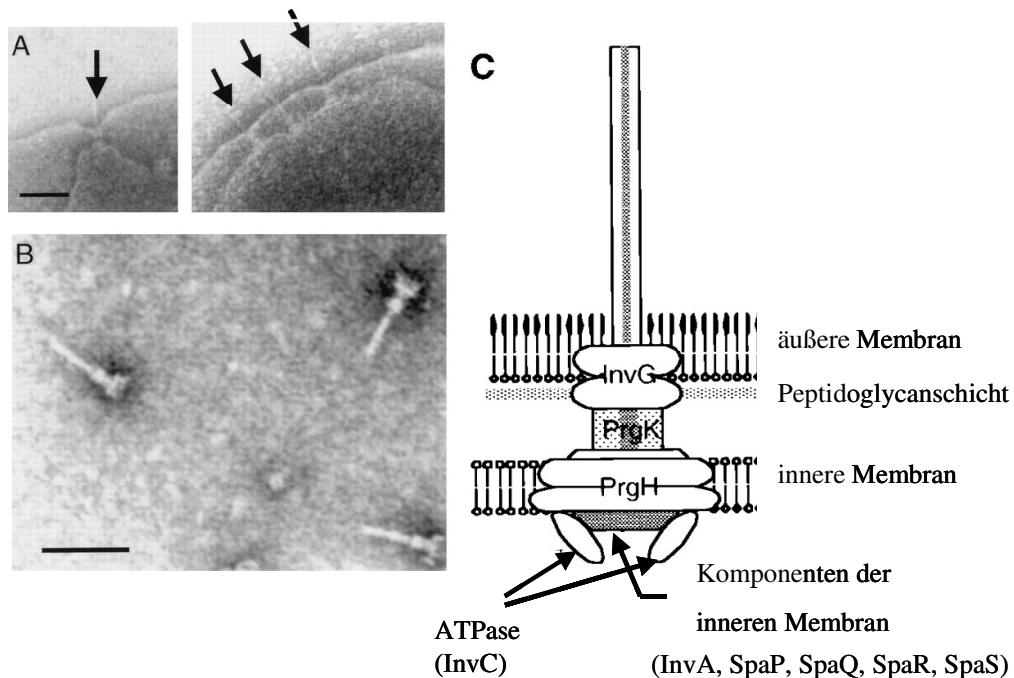


Abb.1: Nadelkomplex von *Salmonella typhimurium*, welche der von *Yersinia enterocolitica* sehr ähnlich ist; nach (56).

1.4 Pathogenitätsfaktoren

Die Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica* kann man in plasmid-kodierte sowie chromosomal-kodierte Pathogenitätsfaktoren einteilen. Das Plasmid wurde 1980 bei *Yersinia enterocolitica* gefunden. Das Plasmid wird zur Invasion der Bakterien in den Wirtsorganismus benötigt. Das Plasmid unterliegt einer Calcium- und temperatur-abhängigen Regulation (60, 105). Die Plasmide von *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* sind identisch und austauschbar. Sie sind zu 50 % homolog mit dem Plasmid von *Yersinia enterocolitica* (60, 105). Das 70 kb große Virulenzplasmid kodiert eine Reihe von Virulenzfaktoren, unter anderem das *Yersinia Adhäsion A* (Yad A), das Typ III Sekretionssystem (TTSS) und die *Yersinia outer membrane protein* (Yops) (43).

Es sind ungefähr 25 Gene des Sekretionssystems, die in einige große Transkriptionseinheiten zusammengefasst werden. Zum virOperon gehört *yscBCDEFGHIJKL*, *yscNOPQRSTU* und *yopNtyeAsycNyscXYV*, sowie *yscW*. Außer *yscB* und *yscH* sind alle genannten Gene essentiell für die Yop Translokation.

Einige Proteine sind wichtig für die Expression von Yops bei 37° C. Sie werden in VirA, VirB, VirC und VirF unterteilt. VirF wird bereits bei 25° C exprimiert. Die Transkription von *virC* ist von *virF* abhängig (93). Das *virF* Gen ist auf dem Virulenzplasmid von allen drei pathogenen Yersinienspezies zu finden (107).

Das plasmidkodierte Adhäsion Yada vermittelt Adhärenz an z.B. Epithelzellen und Phagozyten durch Bindung an zelluläres Fibronectin und Laminin. Yada ist weiterhin ein wichtiger Faktor für die Komplementresistenz und kann eine proinflammatorische Wirtsantwort auslösen (102, 109). Nach dem Kontakt mit der Zielzelle wird in einer sequentiellen Reihenfolge zunächst der Sekretionsapparat aufgebaut, anschließend YopB, YopD und LcrV sekretiert. Die Sekretion der Effektor-Yops erfolgt zum Schluss. LcrV bildet ein „Assembly-platform“ für YopB und YopD, welche in der Plasmamembran der Wirtszelle eine Pore bilden. Durch die Pore werden die Effektor-Yops in die Wirtszellen transloziert. Es gibt mindestens sechs Yops, die in die Wirtszellen transloziert werden, nämlich YopP, YopT, YopH, YopE, YopM, YopO.

Um einen korrekten Transport durch den Hohlraum des Typ III Sekretionssystem zu gewährleisten werden für einige der Yops spezifische Chaperone benötigt, die korrekte Faltung der Yops für den Transport gewährleisten, aber selbst nicht sekretiert werden. So wird z.B. für den korrekten Transport von YopE das Chaperon SycE benötigt (144, 145). SycE und YopE stehen beide unter Kontrolle des YopE Promoters.

Chaperone interagieren mit den Proteinen und beschleunigen so die Faltung sowie die Assoziation der Proteine. Für viele Yops gibt es die entsprechenden Chaperone.

YopE, YopT und YopO sind Mitglieder der großen Familie von bakteriellen Toxinen, die auf Rho GTPasen wirken. Rho GTPasen sind kleine GTP-bindende Proteine, die eine große Vielzahl von Zellfunktionen regulieren von der dynamischen Regulation des Aktinzytoskelettes bis hin zu Genexpression. Am besten charakterisiert sind hierbei RhoA, Rac-1 und CDC-42, die jedes für sich die Bildung individueller Zytoskelettelemente wie Stressfasern (RhoA), Lammellipodien (Rac-1) und Filopodien (Cdc42) regulieren (4). Die biologische Aktivierung dieser GTPasen beruht auf der Fähigkeit GTP zu binden und zu hydrolysieren. Die Bindung von GTP führt zur Konformationsänderung, Bindung und Aktivierung von weiteren Signalmolekülen und zu biologischen Aktivitäten. Im Gegensatz dazu sind die GTPasen durch Konformationsänderung nach Hydrolyse und Bindung von GDP inaktiv. Die strikte Kontrolle des GTP-Bindungs- und Hydrolyse-Zyklus wird reguliert durch „Guanylateaustauschfaktoren“ (GEF), welche GTP durch GDP austauschen und

aktivieren, Guanylate-aktivierenden Proteine (GAP), die hydrolysieren und inaktivieren, und Guanylatedissoziationsfaktoren (GDI), deren Bindung an GTPasen, die Assoziation an Membranen, an denen GTPasen ihre Wirkung entfalten, verhindern (2, 7, 147).

YopE ist ein 23 kDa großes Protein und einer der zuerst identifizierten Yop-effektoren. YopE ist ein GTPase aktivierendes Protein (GAP). Durch die GTPase deaktivierende Funktion von YopE und Zerstörung des Zytoskelettes verursacht YopE eine Abrundung und Ablösung von Zellen in Zellkultur, was als zytotoxischer Effekt bezeichnet wird (53, 78, 110, 111). YopE interagiert wahrscheinlich stärker mit Rac-1 als RhoA. YopE ist an der Inhibition von Phagozytose von Yops beteiligt und ist beteiligt an der Hemmung der Caspase-1 vermittelten „Reifung“ von Prointerleukin-1 β zu Interleukin-1 β . YopE ist ein wichtiger Virulenzfaktor und eine YopE Nullmutante ist bei einer Infektion von Mäusen weniger virulent.

YopO, auch YpkA bei *Yersinia pestis* und *pseudotuberculosis* genannt, besitzt N-terminal eine Serin/Threonin Protein Kinase Domäne. Außerdem am C-terminalen Ende eine Domäne, welche die Bindung sowohl von GDP als auch GTP-gebundenes RhoA oder Rac-1 vermittelt. Die Serin/Threonin Protein Kinase Domäne kann artifizielle basische Substrate als auch Aktin phosphorylieren. YopO kann das Zytoskelett von kultivierten Zellen zerstören und ist an der Hemmung von Phagozytoseaktivität beteiligt. YopO ist essentiell für die Virulenz im Mausinfektionsmodell, die zelluläre Wirkungsweise wird zur Zeit jedoch nur teilweise verstanden (57, 58).

YopT, ein 35,5 kDa Protein, ist wie YopE und YopO an der Abrundung von Zellen durch Zerstörung des Zytoskelettes und Phagozytoseinhibition beteiligt. YopT kann die Rho GTPasen inaktivieren und nimmt Einfluss auf Phagozytose und Internalisation. YopT und YopE wirken über verschiedene Mechanismen (62, 125, 141).

Mit Hilfe seiner Cysteinproteaseaktivität entfernt YopT, die über Prenyl-Gruppen mit einem N-terminalen Cystein an der Zellmembran verankerten Rho GTPasen von der Zellmembran. (124, 125). Unter Zellkulturbedingungen wirkt YopT präferentiell auf RhoA, und weniger auf Rac und CDC42. YopT ist auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert, RhoA findet man ebenfalls an der Plasmamembran, aber Rac und CDC42 binden auch endosomal und an die Golgi Membran. Die strukturelle Anordnung könnte der Grund sein, weswegen YopT *in vivo* präferentiell nur RhoA entfernt (2, 62). Die Bedeutung für die Pathogenität für *Yersinien* ist

weitgehend unklar. Im Mausinfektionsmodell ist ein YopT Mutante genauso virulent wie ein Wildtypstamm.

Das 51 kDa große YopH ist ein sehr wichtiger Virulenzfaktor. Es handelt sich um eine sehr aktive Proteintyrosinphosphatase, deren katalytische Domäne strukturell denen von eukaryotischen Proteintyrosinphosphatasen ähnelt. Die katalytische Aktivität von YopH hemmt Signaltransduktionswege, die mit Phagozytose von Wirtszellen assoziiert sind (19, 20). Der am besten untersuchte phagozytische Pfad hierbei ist die Phagozytose via β 1-Integrine, die durch Invasin aktiviert wird. Darüber hinaus hemmt YopH Prozesse, die mit Phagozytose assoziiert sind, wie den oxidativen „burst“ in Makrophagen und Granulozyten. Die Inhibition der Integrin-vermittelten Phagozytose erfolgt wahrscheinlich durch Dephosphorylierung, der an diesem Prozess beteiligten Proteinen wie Fak und Cas in Epithelzellen und Fak und Pyk2 in Makrophagen. YopH beeinflusst darüber hinaus das adaptive Immunsystem. Die Phosphataseaktivität von YopH wirkt auf die T-Zell Zytokinproduktion sowie die B-Zell-Kostimulation (150). Der B-Zell- und der T-Zell-Signalweg werden oberhalb der Aktivierung der Proteinkinase C und des Ca^{2+} Influxes inhibiert. So wurde beschrieben, dass YopH und die Proteinkinase Lck bindet und dephosphoryliert. Lck ist mit den frühen Schritten der T-Zellrezeptoraktivierung assoziiert (150).

YopM, ein 41 kDa großes Protein, hat als einziges der Effektor-Yops keine enzymatische Aktivität und wandert nach Translokation in den Zellkern von Säugetierzellen (18). YopM hat eine leucin-reiche Domäne, die auch in vielen anderen Proteinen wie RNase Inhibitoren, Toll-Rezeptoren und Proteoglykanen vorkommen (80, 81). Es wurde die Bindung von YopM an zwei zytoplasmatische Kinasen (RSK1 und RSK2) beschrieben. Die biologische Signifikanz dieser Bindung ist unklar. Trotz der soweit unbekanntes Funktion von YopM in Wirtszellen handelt es sich um einen wichtigen Virulenzfaktor, dessen Fehlen zum deutlich abgeschwächten Infektionsverlauf in Mausinfektionsmodellen führt.

YopP (YopJ in *Y. pestis* und *pseudotuberculosis*) ist ein 32,5 kDa Protein und funktioniert als potenter Inhibitor der MAPK und NF- κ B Signaltransduktionswege. YopP bindet und blockiert MAPKinasen und IKK, was zur Suppression von Zytokinproduktion und Apoptose führt (94, 112). YopP ist eine Cysteinprotease. Die Aktivierung von Apoptose in Makrophagen durch YopP erfordert sowohl die Hemmung der NF- κ B Aktivierung als auch

die Aktivierung von Apoptosesignalwegen. Darüber hinaus hat YopP wahrscheinlich einen starken Einfluss auf das adaptive Immunsystem. So induziert YopP Apoptose, hemmt Zytokinproduktion und Antigenaufnahme von dendritischen Zellen, den wichtigsten Zellen für die Aktivierung von T Zellen (101, 103, 112). Während YopJ keine Rolle für die Virulenz von *Y. pestis* in Mausinfektionsmodellen spielt, scheint YopP/J eine gewisse Rolle bei der Infektion mit *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* zu haben. Nach oraler *Y. enterocolitica* Infektion mit einer YopP Mutante wird weder die Kolonisierung im Darm noch in den Peyer'schen Plaques verhindert. Ebenso wenig wird die systemische Verbreitung der Yersinien limitiert. Allerdings waren die Mäuse in der Lage im Gegensatz zu einem Wildtypstamm die Infektion zu kontrollieren.

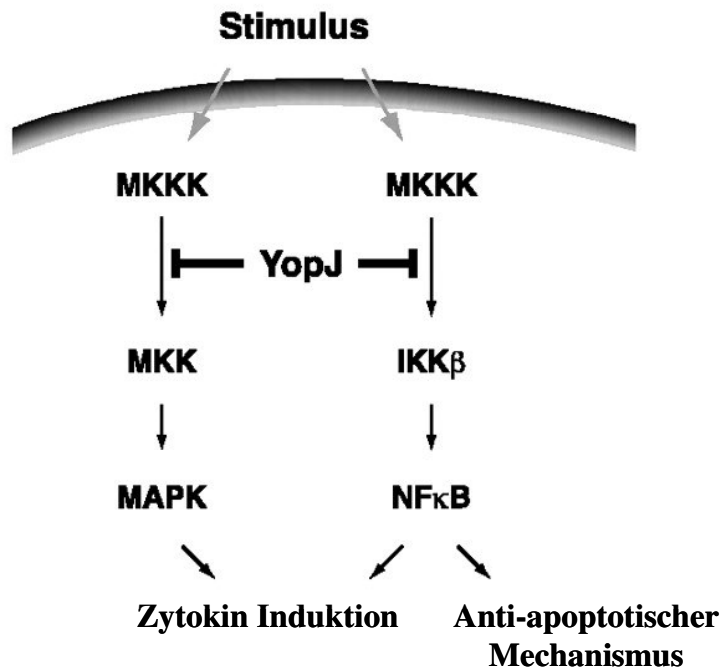


Abb.2: Schematische Darstellung der Interaktion von YopJ nach (101).

Neben den für die Virulenz von *Yersinia* äußerst wichtigen plasmid-kodierten Faktoren ist eine Vielzahl chromosomal-kodierter Virulenzfaktoren bekannt, die teilweise für die Virulenz von wichtiger Bedeutung sind, wie z.B. die Superoxiddismutase oder das Siderophor Yersiniabactin auf die hier jedoch nicht im einzelnen eingegangen werden soll.

1.5 Infektionsverlauf im experimentellen Mausinfektionsmodell

Yersinia enterocolitica kann bei Nagern eine Yersiniose auslösen (36). Die Yersiniose bei Labortieren zeigt auffallende Ähnlichkeiten mit der beim Menschen. Aus diesem Grund eignet sich das Tiermodell (Maus) auch hervorragend um die Pathogenitätsmechanismen der Yersiniose genauer zu untersuchen (35). Die Symptomatik bei einer oralen Infektion einer Maus ist sehr ähnlich zu der beim Menschen (34).

Veränderungen treten im distalen Ileum und im Caecum auf (33).

Die M-Zellen im Follikel-assoziierten Epithel der Peyer'schen Plaques des Dünndarms sind das primäre Ziel von *Yersinia enterocolitica* (11, 63). Das Bakterium gelangt über β 1-Integrine durch die M-Zellen in die Peyer'schen Plaques und vermehrt sich dort (11, 123). Die Peyer'schen Plaques weisen zuerst im distalen Ileum Schwellungen und Hyperämie auf (34). Nach der Vermehrungsphase findet man die Bakterien in mesenterialen Lymphknoten sowie in Organen des retikulo-endothelialen Systems wie Leber und Milz. Die Ausbreitung geht möglicherweise über Leukozyten (116), B-Lymphozyten (89) oder dendritische Zellen (121), die als Vehikel benutzt werden. Man sieht ein Anschwellen der mesenterialen Lymphknoten, die im weiteren Verlauf makroskopische Läsionen aufweisen, die bluthaltig und eitrig werden. Am Tag 12 bei einer oralen Infektion mit 10^8 Bakterien sieht man große Läsionen in der Leber, Milz und Lunge. Die Peyer'schen Plaques im Ileum werden groß und eitrig, das führt zu einem Verkleben der Peritonealhöhle mit der peritonealen Wand. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Zerstörung der Peyer'schen Plaques. Es findet eine Einwanderung von Neutrophilen statt. Der Thymus ist deutlich reduziert. Allerdings findet man kein Anzeichen einer Infektion in Niere und peripheren Lymphknoten (34). Bei einer intravenösen Infektion findet man die Bakterien in der Milz, Leber und in der späten Phase der Infektion auch in der Lunge. In der Milz sind die meisten Bakterien lokalisiert. Man findet in den Organen einige große Abszesse (35). Je nach Dosis endet die Yersiniose mit dem Tod. Am Tag eins der Infektion findet man in der Milz im nekrotischen Teil viele Leukozyten (Neutrophile und Monozyten) und Zelltrümmer. Am Tag zwei beginnen sich in der roten Pulpa Abszesse zu bilden, es werden immer mehr unreife Leukozyten differenziert (16, 35). Es gibt histologisch drei verschiedene Typen von Läsionen in der Milz: Typ I: schmale nicht pyogene granulom-ähnliche entzündliche Herde bestehend aus mononuklearen Zellen ohne Zeichen von Nekrose. Typ II: Mikroabszesse vorwiegend gebildet aus Leukozyten, es fehlt aber eine bestimmte zelluläre Abgrenzung zum normalen Gewebe. Typ III: große Abszesse mit einem nekrotischen Teil in der Mitte, der Rand wird deutlich durch Phagozyten und Lymphozyten abgegrenzt (13).

Die infizierten Milzen bestehen zu 30-40% aus CD3 positiven T-Zellen, die relative und absolute Menge von T-Zellen bleibt konstant während einer Infektion. Das Verhältnis von CD4/CD8 ist ungefähr 2:1 und ändert sich nicht signifikant während der Infektion. T-Zellen induzieren in der frühen Phase der Infektion eine effiziente Wirtsantwort.

In der frühen Phase der Infektion ist der Anteil an PK136 positiven Zellen (NK-Zellen) erhöht, im Verlauf der Infektion steigen sie bis auf 16%. Parallel dazu gibt es einen Zustrom von CD11b/18 positiven Zellen, die bis zu 18% ansteigen. Sowohl die PK136 positiven Zellen als auch die CD11b/18 positiven Zellen verschwinden langsam bis zu einem normalen Niveau am Ende der Infektion (13, 16).

In der Lunge werden die Alveolaren zerstört. Das intestinale Gewebe (mesenteriale Lymphknoten und Peyer'sche Plaques) ist frei von Zeichen einer Infektion (34).

Die Infektion verläuft in verschiedenen Mauslinien unterschiedlich schwer. C57BL/6 Mäuse sind resistenter gegen eine Yersinieninfektion als BALB/c Mäuse (68). Zytokine wie z.B. TNF- α und IFN- γ werden zur Bekämpfung einer Yersiniose in der Maus benötigt (14, 24). T-Zellen, vielmehr CD4 positive Th1-Zellen in Kooperation mit Makrophagen, sind in einer ersten Klärung einer Yersinien-Infektion involviert. Für die Aktivierung der T-Zellen werden Zytokine wie TNF- α und IFN- γ gebraucht (10, 12). IFN- γ hat einen ausgeprägteren Effekt in der späten Phase der Infektion (12). Die meisten Effekte von TNF werden über TNFRp55 vermittelt, wie der cytotoxische Effekt, der zu Nekrose und Apoptose führt. TNF- α aktiviert Makrophagen und reguliert Adhäsionsmoleküle hoch (15, 17). TNFRp55-/- Mäuse sind in der frühen Phase einer Yersinieninfektion resistenter gegen die Bakterien. Es findet eine bessere Bekämpfung statt, das Gewebe zeigt deutlich weniger Beschädigungen. Die NK-Zellen zeigen keinen Unterschied zu denen in C57BL/6 Mäusen, es findet keine Abnahme der CD4 positiven Zellen statt. Die Zytokinproduktion von IFN- γ steigt an, dafür nimmt die IL-10 Produktion ab (151).

MyD88 steht für „Myeloid Differentiation Factor 88“. Es ist ein cytoplasmatisches Adaptermolekül. Myd88 vermittelt über FADD die Apoptose (113) und von Toll-like Rezeptoren (TLR) ausgehende proinflammatorische Signaltransduktion. Bei defizienten Mäusen ist die Immunantwort auf bakterielle Komponenten, die von den TLRs erkannt werden, sowie die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1 und IL-18, gestört. Dies führt zu einer erhöhten Mortalität der defizienten Mäuse bei einer Infektion mit gram-positiven Bakterien (137).

1.6 Reportersysteme

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Translokation von Effektoren durch Bakterien in eukaryotische Zellen zu beobachten. Effektoren können über Immuncytochemie oder Western Blot detektiert werden (3, 66, 149). Bei Fusionierung der Effektoren mit Proteinen wie z.B. Elk-Tag oder CyaA können translozierte Effektoren spezifischer nachgewiesen werden (46, 131). Mit Hilfe des Elk-Tags kann man die Yop Expression, Sekretion und Translokation in eukaryontische Zellen beobachten. Dazu wurden YopE und YopN mit Elk markiert, einem Protein-Tag der nur in eukaryotischen Zellen phosphoryliert wird. Transloziertes Phospho-Elk konnte dann mit spezifischen Antikörpern in Western Blots der Lysate infizierter Zellen sichtbar gemacht werden. Diese Untersuchungen fanden mit einem *Yersinia pestis* Wildtyp-Stamm und verschiedenen Deletionsstämmen statt. Mit diesem System konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *yopN*, *tyeA*, *sycN* und *yscB* die Yop Translokation reduziert und dass YopN transloziert wird (46). Bei einem anderen Ansatz wurden YopH und YopE mit CyaA (Calmodulin-abhängige Adenylate-Cyclase) fusioniert und in *Yersinia enterocolitica* exprimiert. CyaA ist im Bakterium inaktiv, erst in der Zelle wird es durch Calmodulin aktiviert. Die aktivierte X-Cyclase wandelt ATP zu cAMP, dies kann sehr gut gemessen werden. Durch Infektion einer Maus-Makrophagenlinie mit *Yersinia enterocolitica yopB* und *yopD* Deletionsmutanten konnte mit diesem System gezeigt werden, dass YopB und YopD für die Yop Translokation notwendig sind. (131).

Bei Fusionierung von YopE mit GFP (green fluorescent protein) oder mit Cre Rekombinase kann man den Effektor sowohl über ein Fluoreszenzmikroskop als auch über ein Durchflusszytometer detektieren (31, 75). GFP wurde mit YopE fusioniert und in *Yersinia enterocolitica* gebracht. Es konnten Untersuchungen in Zellkulturen und in der Maus durchgeführt werden. Vor allem im Peritoneum, in der Milz, in der Leber und in den Peyer'schen Plaques sah man grün fluoreszierende Bakterien und Zellen unter dem Mikroskop. Mit diesem System kann man die Sekretion und Translokation von YopE direkt sichtbar machen. Doch nur wenn GFP partiell ungefaltet ist, kann es die Nadel des Typ- III Sekretionssystems von *Yersinia enterocolitica* passieren (75), aus diesem Grund konnten andere Gruppen dieses Ergebnis nicht bestätigen.

Ein anderer Ansatz war, die Cre Rekombinase des Bakteriophagen P1 mit dem Salmonella Effektor SopE zu fusionieren.. Mit diesem System kann Typ III Effektortranslokation durch *Salmonella enterica in vitro* durch Messung induzierter Luciferase-Aktivität in Zelllysaten oder durch Messung induzierter eGFP Expression auf Einzelzellebene nachgewiesen werden.

Es wurden auch *in vivo* Untersuchungen gemacht, allerdings nur mit ROSA 26 Mäusen, da nur Mäuse mit Cre aktivierbarem Promotor sich für diese Untersuchungen eignen. Die Möglichkeiten dieses Systems bei *in vivo* Untersuchungen waren sehr begrenzt, da nur Luziferaseaktivität in Zelllysaten gemessen werden konnte (31).

Die verschiedenen Untersuchungen zeigten, dass die aufgeführten Reportersysteme sich nur auf ein kleines Anwendungsgebiet beschränken und mit großen Fehlern behaftet sind. Insbesondere eignen sie sich nicht so gut für umfassende *in vivo* Untersuchungen.

Es wurde ein Reportersystem in *Escherichia coli* vorgestellt, bei dem der Cif Effektor mit einer TEM-1- β -Lactamase fusioniert ist. Die TEM-1- β -Lactamase kann über den Farbstoff CCF2 nachgewiesen werden (39).

Die Verwendung der Lactamase wird ebenfalls für ein Reportersystem in *Yersinia pestis* genutzt. Es wird zusätzlich zu den Pathogenitätsplasmiden (bei *Y. pestis* im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* 3 Pathogenitätsplasmide) ein weiteres Plasmid in das Bakterium gebracht. Das zusätzliche Plasmid kodiert YopM oder YopE fusioniert mit einer β -Lactamase. Mit Hilfe dieses Reporterplasmids kann man nachweisen, in welche Zellen die Effektoren transloziert werden, da bei der Sekretion der Effektoren in die Zielzelle das YopE/YopM- β -Lactamase Fusionsprotein ebenso in die Zielzelle gebracht wird.

Regt man den Farbstoff CCF4-AM/CCF2-AM bei 409nm an, emittiert er im ungespaltenen Zustand bei 520nm über ein FRET („Fluorescence Resonance Energy Transfer“).

β -Lactamase spaltet den zellmembrangängigen Farbstoff CCF4-AM/CCF2-AM, mit dem die infizierten Zellen gefärbt werden. Durch die Spaltung emittiert er dann im blauen Bereich bei 447nm. Der zellwandgängige Farbstoff CCF4-AM/CCF2-AM wird im Cytoplasma durch die endogene cytoplasmatische Esterase von CCF4-AM/CCF2-AM zu CCF4/CCF2 gespalten. Durch den Verlust des lipophilen Ester-Rests bleibt der Farbstoff in der Zelle (90).

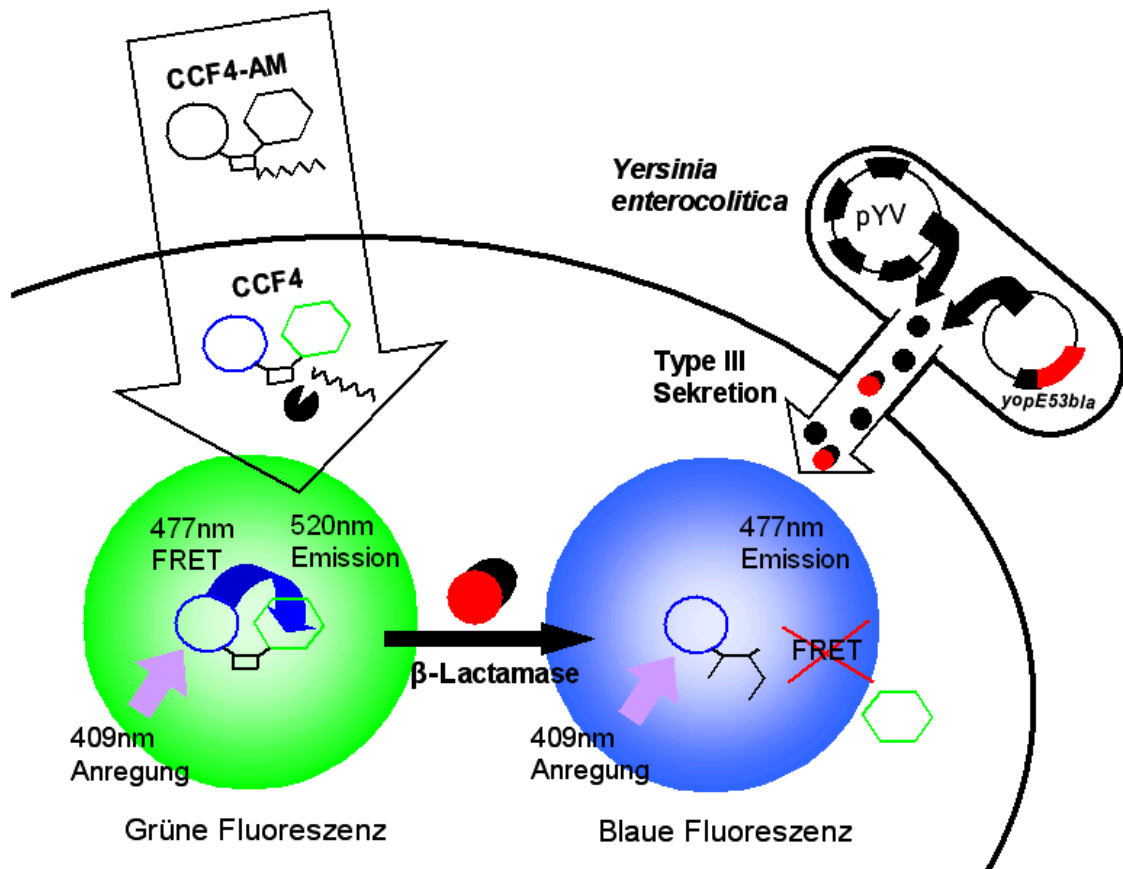


Abb.3: Schematische Darstellung des β -Lactamase Reportersystems nach (39).

Dieses Reportersystem erwies sich als besonders effektiv. Es wurde herausgefunden, dass *in vivo* in einem *Yersinia pestis* Mausinfektionsmodell in der Milz vor allem Phagozyten von Yop Translokation betroffen sind, da β -Laktamaseaktivität vor allem in CD11b⁺, Gr1⁺ und CD11c⁺ Zellen nachgewiesen wurde (90).

Bei *in vivo* Infektion von Mäusen mit einem *Salmonella typhimurium* Stamm, bei dem die β -Lactamase mit den Effektoren SipA und SptP fusioniert wurde, konnte ebenfalls Translokation auf Einzelzellebene nachgewiesen werden.

Die Zahl einiger Zellen in der Milz war nach Infektion mit *Salmonella* doppelt so hoch wie bei einer uninfizierten Maus. Es handelte sich hierbei vor allem um die Zellen, welche die Marker CD11b und Gr1 trugen. In dieser Zellpopulation konnten auch die meisten β -Laktamase-positiven-Zellen nachgewiesen werden (59).

Mit diesem Reportersystem scheint man daher sehr effektiv Translokation *in vivo* sowie *in vitro* nachzuweisen.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Bei einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* kommt es durch das Typ III Sekretionssystem zur Translokation der Yops in eukaryontische Zellen. Zum besseren Verständnis der Yersinien Infektion ist es wichtig die Zielzellen der Translokation zu kennen.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein β -Lactamase Reportersystem zum Nachweis der Yop-Translokation in Wirtszellen durch *Yersinia enterocolitica* zu etablieren.

Es soll in zwei Schritten vorgegangen werden.

In vitro soll das Reportersystem etabliert, charakterisiert und spezifiziert werden. Die Translokation der β -Lactamase wird nach Infektion von verschiedenen Zellkulturen mikroskopisch und mit dem Durchflusszytometer auf Einzelzellebene untersucht.

Um die Spezifität des Systems zu überprüfen, wird eine YscN-Deletionsmutante verwendet. Schaltet man YscN aus, können keine Effektoren mehr sekretiert werden.

Mit einem YopE53-Ova exprimierenden Kontrollstamm soll die unter Infektionsbedingungen vorhandene unspezifische Fluoreszenz ermittelt werden.

Im zweiten Schritt soll das Reportersystem *in vivo* etabliert werden.

Es soll die Sensitivität und Spezifität des Reportersystems ermittelt werden. Die Zielzellen einer Yersinien Infektion sollen ermittelt werden. Anschließend wird der Einfluss verschiedener Zytokine, Adaptermoleküle oder Rezeptoren wie zum Beispiel des TNF-Rezeptors, des IFN- γ -Rezeptors oder von MyD88 untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es mit Hilfe des β -Lactamase Reportersystem mehr über *die Yersinia enterocolitica* Infektion *in vivo* zu erfahren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

| | |
|--|-----------------------------|
| Agarose-Gel-Elektrophoresekammern | BioRad, München |
| Analysewaagen (R160P, PT 1200) | Sartorius, Göttingen |
| Axiocam HRc | Zeiss, Jena |
| Axiovision 4.4 Software | Zeiss, Jena |
| Bakterien-Brutschrank (B20) | Heraeus, Hanau |
| Biophotometer | Eppendorf, Hamburg |
| Drehschüttler (Rotator 220) | Bachofer, Reutlingen |
| CyAn ATP Flow Cytometer | DakoCytomation, Dänemark |
| Elektroporationsapparatur | BioRad, München |
| ELISA Reader | Tecan, Crailsheim |
| Entwicklermaschine: Curix 60 | AGFA, Köln |
| Eppendorf-Zentrifuge (Centrifuge 5417R) | Eppendorf, Hamburg |
| French Pressure Cell Press | SLM Instruments, NY,USA |
| Gelelektrophoreseapparatur PowerPac 1000 | BioRad, München |
| Gel-Schüttler | Ika Labortechnik, Staufen |
| Gradientencycler | Biometra, Göttingen |
| Heizblock (TR-L-288) | Eppendorf, Hamburg |
| Heizplatte (RCT basic) | Ika Labortechnik, Staufen |
| Mikroskop Axiovert 200, AxioLab | Zeiss, Jena |
| Multistepper | Eppendorf, Hamburg |
| Neubauer-Zählkammer | Brand, Landshut |
| PCR-Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400) | Perkin Elmer, Weiterstadt |
| pH-Meter: Modell inoLab [®] Level 2 | WTW, Weilheim i. OB |
| Photometer Ultrospec 3000 pro | AmershamPharmacia |
| Pipettierhilfen | Eppendorf, Hamburg |
| Quarzküvette | Hellma, Müllheim |

| | |
|--|----------------------------------|
| Rotoren (SM24, SS-34) | Sorvall, Hanau |
| Replikatorstempel | Roth, Karlsruhe |
| Schüttelinkubatoren (Certomat BS-1) | Braun Biotech, Melsungen |
| SDS-PAGE-Kammern (Protean III; Mini Protean) | BioRad, München |
| Sicherheitswerkbank (BDK-S 1800) | BDK Luft- und Reinraumtechnik |
| Thermocycler | Biometra, Göttingen |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Vortexer mixer 7-2020 | neoLab, Heidelberg |
| Wasserbad | Memmert, Schwabach |
| Zellkultur-Brutschrank (BBD C220) | Heraeus, Hanau |
| Zentrifuge Eppendorf 5412 R, Minispin plus | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge Multifuge 3S-R | Heraeus, Hanau |
| Zentrifuge (Sorvall RC5c Plus) | DuPont, Bad Homburg |

2.1.2 Verbrauchsmittel

| | |
|---|----------------------------------|
| Bottle Top Filter | Corning Inc, USA |
| Combitips | Eppendorf, Hamburg |
| Deckgläser | Roth, Karlsruhe |
| Einmalküvetten | Sarstedt, Berlin |
| Elektroporationsküvetten | Eurogentech, Seraing, Belgien |
| Eppendorf-Gefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml) | Eppendorf, Hamburg |
| FACS-Röhrchen | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Glaskolben und Flaschen | Schott Duran, Mainz |
| Handschuhe | Derma clean, Ansell |
| Impfösen (1µl, 10 µl) | Sarstedt, Berlin |
| Kanülen (Sterican 0,90 x 40 mm, 0,40 x 20 mm) | B. Braun, Melsungen |
| Membranen für Immunoblots (Cellulosenitrat) | Schleicher&Schuell, Dassel |
| Mikrotiter-Platten (Spitzboden, Rundboden) | Greiner, Nürtingen |
| Objektträger | Langenbrick, |

| | |
|---|---------------------------------|
| Parafilm | American National Can, USA |
| Pasteurpipetten | WU, Mainz |
| PCR-Gefäße | Fisher Scientific, Schwerte |
| pH-Indikatorpapier (pH 1 - 14) | Merck, Darmstadt |
| Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Pipettenspitzen weiß (10 →1) | Gilson, USA |
| Pipettenspitzen gelb (200 →10) | Brand, Wertheim |
| Pipettenspitzen blau (1000 →100) | Sarstedt, Berlin |
| Plastik-Petrischalen | Greiner, Nürtingen |
| Plastik-Petrischalen groß | Greiner, Nürtingen |
| Reaktionsgefäße 1,5ml | Greiner, Nürtingen |
| Rundboden-Röhrchen (5ml, 14 ml) | Greiner, Nürtingen |
| Röntgenfilme (Kodak X-OMAT) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Skalpelle | B. Braun, Melsungen |
| Spitzboden-Röhrchen (15 ml, 50 ml) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml) | B. Braun, Melsungen |
| Spritzenvorsatzfilter (0,20 µm, 0,45 µm, Celluloseacetat, Ø 26 mm) | Sartorius AG, Göttingen |
| Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm, PVDF, Ø 13 mm,) | Millipore, Eschborn |
| Vorratsflasche (250ml, 500ml, 1000ml, 2000ml) | Corning Inc, USA |
| Zellkulturflaschen (25, 80, 175 cm ²) | Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96-Napf) | Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Zellkulturschalen (100 mm) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Zellschaber | Corning Inc, USA |
| Zellsiebe 40µm | Becton Dickinson, Heidelberg |

Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)

Becton Dickinson,
Heidelberg

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid / Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)

Roth, Karlsruhe

Agarose

Eurobio, Les Iles Ulies,
Frankreich

APS (Ammoniumpersulfat)

Merck, Darmstadt

Beta Lactamase Ladelösung

Invitrogen, Carlsbad
Canada

BSA

Biomol, Hamburg

Bromphenolblau

Sigma-Aldrich,
Taufkirchen

Calciumchlorid CaCl₂

Sigma-Aldrich,
Taufkirchen

Chloramphenicol

Sigma-Aldrich,
Taufkirchen

Coomassie R-250

Roth, Karlsruhe

Cytochalasin D

Sigma-Aldrich,
Taufkirchen

Desferoxaminmesylat

Sigma-Aldrich,
Taufkirchen

DMEM

Gibco, Karlsruhe

dNTPs

Roche, Mannheim

ECL-Westernblotdetektionssystem

Amersham Pharmacia,
Freiburg

Essigsäure 100% p.a.

Roth, Karlsruhe

Ethidiumbromid

Sigma-Aldrich,
Taufkirchen

ExGen

Fermentas, Ontario Fötales

Kälberserum (FCS)

Sigma-Aldrich,
Taufkirchen

| | |
|---|---------------------------------|
| Fluoprep | Biomérieux, France |
| Gentamycin | ICN, USA |
| Glucose | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Hank´s Salt Solution | Gibco, Karlsruhe |
| Hefeextrakt | ICN, USA |
| HEPES | Biochrom AG, Berlin |
| Kanamycin | ICN, USA |
| L-Glutamin | Gibco, Karlsruhe |
| Nalidixinsäure | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Natriumpyruvat | Gibco, Karlsruhe |
| nicht essentielle Aminosäuren f. Zellkultur | Biochrom, Berlin |
| OptiMEM | Gibco, Karlsruhe |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| PBS Dulbecco | Gibco, Karlsruhe |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom, Berlin Taufkirchen |
| Puromycin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Pferdeserum | Gibco, Karlsruhe |
| Ponceau S Lösung | Serva, Heidelberg |
| Propidiumjodid | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| RPMI 1640 | Biochrom, Berlin Taufkirchen |
| Streptomycin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Tris | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

| | |
|---------------------|-------------------------------|
| Triton-X 100 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Trypan-Blau | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Trypsin-EDTA-Lösung | Gibco, BRL, Eggenstein |
| Trypton Peptone | ICN, USA |

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und besitzen den Reinheitsgrad p.a.

2.1.4. Antikörper

2.1.4.1 Immunfluoreszenz und Western Blot

| | |
|-------------------------------|------------------|
| Kaninchen anti -YopE | AG Autenrieth |
| Kaninchen anti-Beta Lactamase | Chemicon, USA |
| Schwein anti -Kaninchen-HRP | Dianova, Hamburg |

2.1.4.2 FACS-Antikörper

| | |
|---------------------|------------------------|
| CD3e APC | BD Pharmingen, USA |
| CD4 APC | Beckman & Coulter, USA |
| CD8a APC | BD Pharmingen, USA |
| CD11b APC | BD Pharmingen, USA |
| CD11b APC | Beckman & Coulter, USA |
| CD11c APC | Natu Tec, Frankfurt |
| CD19 APC | Beckman & Coulter, USA |
| CD49b/Pan-NK APC | BD Pharmingen, USA |
| F4/80 APC | Serotec, Oxford |
| Ly6g/Ly6c (Gr1) APC | BD Pharmingen, US |

Isotypen

| | |
|---|---------------------|
| Anti-rat IgG2b k-isotype APC | BD Pharmingen, USA |
| Anti-mouse IgG2a, k-isotype control APC | BD Pharmingen, USA |
| Anti-Hamster IgG APC | Natu Tec, Frankfurt |
| Anti-Hamster IgG1, k APC | BD Pharmingen, USA |

2.1.5. Kommerzielle Kits

| | |
|--|-----------------------|
| mi-Plasmidminiprep Kit | Metabion, Martinsried |
| Nucleobond AX100 | Machery-Nagel, Düren |
| Nucleo Spin ExtractII | Machery-Nagel, Düren |
| Nucleobond Spin Plasmid | Machery-Nagel, Düren |
| Qiagen Plasmid Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick PCR Purification Kit (Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus Agarosegelen) | Qiagen, Hilden |

Bei der Verwendung von Kits wurden die jeweils von der Herstellerfirma mitgelieferten Puffer verwendet und nach Herstelleranleitung vorgegangen.

2.1.6. Größenstandards

| | |
|---------------------------------|-----------------------|
| DNA mass ladder | Invitrogen, Karlsruhe |
| GeneRuler DNA Ladder Mix | Fermentas, Ontario |
| GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus | Fermentas, Ontario |
| PageRuler Protein Ladder | Fermentas, Ontario |

2.1.7. Enzyme

| | |
|----------------|--------------------|
| <i>HindIII</i> | Fermentas, Ontario |
| <i>BamHI</i> | Fermentas, Ontario |
| <i>Sall</i> | Fermentas, Ontario |

T4-DNA-Ligase

New England Biolabs,
Frankfurt

Taq-Polymerase

Roche, Mannheim

Pfu DNA-Polymerase

Stratagene, Amsterdam,
NL

2.1.9 Zellkultur

Für die *in vitro* Experimente wurden verschiedene Makrophagen-, Epithelzell- und Fibroblastenzelllinien verwendet, sowie Knochenmarksmakrophagen und Milzzellen, die aus Mäusen gewonnen wurden.

Tab. 2: Medium für verschiedenen Zelllinien

| Zelllinie | Was für eine Zelllinie | Medium |
|-------------------------|--|--|
| GD25 | Zellen des embryonalen Stammzellklons G201 aus β 1-Integrin defizienten Mäusen (51) | DMEM (fertige Lösung Gibco, Karlsruhe) +10% fötales Kälberserum +2 mM L-Glutamin (200 mM) |
| GD25 β 1-Integrin | ist aus der GD25 Zelllinie entstanden welche mit Wildtyp β 1-Integrin cDNA transfiziert wurde (146) | DMEM +10% fötales Kälberserum +100 ng/ml Puromycin |
| HeLa | sind humane epitheliale Zellen aus einem Zervixkarzinom und wurden ursprünglich von der American Type Culture Collection, MD, USA, bezogen (No. CCL-2) | RPMI1640 (fertige Lösung Gibco, Karlsruhe) +10% FCS + 2 mM Glutamin +100 units Penicillin-Streptomycin Stammlösung |
| Milzzellen | | DMEM (fertige Lösung Gibco, Karlsruhe) +10% FCS + 4 mM Glutamin + 2 mM Natriumpyruvat |
| Knochen- | | DMEM |

| | | |
|------------------|--|--|
| Marksmakrophagen | | +10% FCS +5% Pferdeserum +100 units Penicillin-Streptomycin Stammlösung +2 mM Glutamin + 1 mM Natriumpyruvat 25% Überstand von L929-Zellen (enthält Makrophagen-stimulierender Faktor) Für die Infektion wird ein Medium mit DMEM(fertige Lösung Gibco, Karlsruhe) +10% FCS (Sigma) +2 mM Glutamin (Gibco, Karlsruhe) + 1 mM Natriumpyruvat (Gibco, Karlsruhe) genommen. |
|------------------|--|--|

Das fötale Kälberserum (FCS) wurde vor Zugabe für 30 min bei 56° C inaktiviert.

2.1.10. Bakterienstämme

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

| Stämme | Abkürzung | Eigenschaften | Herkunft |
|-------------------------------|-----------|--|-----------------------|
| <i>E. coli</i> | | | |
| DH5 α | | <i>endA1 hsdR17(r_km_{k+}) supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1Δ (lacZYA-argF)U169</i> (Φ 80lacZ Δ M15) | (67) |
| <i>E. coli</i> One Shot TOP10 | | Chemisch kompetenter Klonierungsstamm | Invitrogen, Karlsruhe |
| <i>Y. enterocolitica</i> | | | |
| E40 | E40 WT | <i>Y. enterocolitica</i> Wildtypstamm E40, Serotyp O:9, Nal ^R , Ars ^R | (119) |

| | | | |
|---|--------------------|---|---------------------------|
| E40 asd- | E40 | <i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 Δ asd, (Klinisches Isolat mit chromosomaler asd Deletion) Nal ^R , Ars ^R ,, DAP auxotroph | Cornelis (unv.) |
| E40 asd- pYV- | | <i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 Δ asd ohne pYV Plasmid, Nal ^R , DAP auxotroph | Klein-Günther |
| E40 asd- pMK <i>yopE53bla</i> | E40-pBla | <i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 Δ asd, mit Reporterplasmid pMK <i>yopE53bla</i> , Nal ^R , Ars ^R , Kan ^R | Klein-Günther/ Köberle |
| E40 asd- pMK <i>yopE53ova</i> | E40-pOva | <i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 Δ asd, mit Kontrollplasmid pMK <i>yopE53ova</i> , Nal ^R , Ars ^R , Kan ^R | Klein-Günther/ Köberle |
| E40 asd- Δ YscN pMK <i>yopE53bla</i> | Δ YscN-pBla | <i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 Δ asd und <i>YscN</i> , mit Kontrollplasmid pMK <i>yopE53bla</i> , Nal ^R , Ars ^R , Kan ^R | Cornelis (62) |
| E40 asd- Δ YadA pMK <i>yopE53bla</i> | Δ YadA-pBla | <i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 Δ asd und <i>YadA</i> , mit Kontrollplasmid pMK <i>yopE53bla</i> , Nal ^R , Ars ^R , Kan ^R , Sm ^R | Cornelis (62) |
| WA-314 | WA-314 | <i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 (Klinisches Isolat) Nal ^R | (69) |
| WA-314 pMK <i>yopE53bla</i> | WA-314-pBla | <i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314, mit Reporterplasmid pMK <i>yopE53bla</i> , Nal ^R , Kan ^R | Klein-Günther/ Köberle |
| WA-314 pMK <i>yopE53ova</i> | WA-314-pOva | <i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314, mit Reporterplasmid pMK <i>yopE53ova</i> , Nal ^R , Kan ^R | Klein-Günther/ Köberle |

2.1.11. Bakterien-Nährmedien

Alle Medien wurden nach der Herstellung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Für Selektivmedien wurden nach dem Autoklavieren geeignete Antibiotika zugesetzt, danach erfolgte die Lagerung bei 4°C.

| | | |
|--|-----------|--------------------------|
| Luria-Bertani (LB)-Medium: | 10 g/l | Trypton |
| | 5 g/l | Hefeextrakt |
| | 5 g/l | NaCl |
| | ad 1 l | Aqua dest. |
| | pH 7,5 | |
| Hirn-Herz-Medium (BHI): (<i>Brain Heart Infusion</i>) | 37 g/l | BHI-Pulver (Hersteller?) |
| | ad 1 l | Aqua. bidest. |
| | pH 7,4 | |
| SOC-Medium: | 20 g/l | Trypton |
| | 5,5 g/l | Hefeextrakt |
| | 10 mM | NaCl-Lösung |
| | 10 mM | KCl-Lösung |
| | 20 mM | Glukose |
| | ad 100 ml | Aqua. dest |
| pH 7,0 | | |

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem Medium 15g/l Agar hinzugefügt. Die fertigen Platten wurden bei 4°C gelagert.

Transformations- und Einfrierlösung für chemisch kompetente Bakterien:

| | |
|----------|--|
| | LB Medium |
| 10% | PEG(3350 oder 8000) |
| 5% | DMSO |
| 20-50 mM | Mg ²⁺ (MgSO ₄ oder MgCl ₂) |
| | pH 6,5 |

Die Lösung sollte steril filtriert werden.

GYT (Einfriermedium für elektrokompetente Bakterien):

| | |
|------------------|-------------|
| 10% | Glycerol |
| 0,125% | Hefeextrakt |
| 0,25 % | Trypton |
| <i>ad</i> 0,25 l | Aqua.dest |

2.1.12 Mausstämme

| | |
|-------------------|----------------------------|
| C57/BL-6 | Harlan Winkelmann, Borchen |
| IFN γ R-/- | eigene Zucht nach (72) |
| MyD88-/- | eigene Zucht nach (1) |
| TNF-/- | eigene Zucht nach (104) |

2.1.13 Puffer und Lösungen

2.1.13.1 Antibiotika-Lösungen und Desferoxamin

Tab. 4: Antibiotika-Lösungen und Desferoxamin

| | |
|-----------------------------|--|
| Antibiotika-Lösung | |
| Ampicillin-Stammlösung | 100 mg/ml in Wasser, stabil bei -20°C dem Medium 1:1000 zugesetzt |
| Arsenit-Stammlösung | 400 μ M stabil bei -20°C 400 μ M dem Medium zugesetzt |
| Chloramphenicol-Stammlösung | 50 mg/ml in Ethanol, stabil bei -20°C dem Medium 1:2000 zugesetzt |
| Gentamycin-Stammlösung | 10 mg/ml in Wasser, stabil bei -20°C dem Medium 1:100 zugesetzt |
| Kanamycin-Stammlösung | 50 mg/ml in Wasser, stabil bei -20°C dem Medium 1:2000 zugesetzt |
| Nalidixinsäure | 10 mg/ml in Wasser, stabil bei -20°C |

| | |
|-------------------------------------|---|
| | dem Medium 1:1000 zugesetzt |
| Penicillin-Streptomycin-Stammlösung | je 10 000 Units/ml, stabil bei –20°C dem Medium 1:100 zugesetzt |
| Puromycin-Stammlösung | 10 mg/ml in Wasser, stabil bei –20°C dem Medium 1:100 zugesetzt |
| Streptomycin-Stammlösung | 50 mg/ml in Wasser, stabil bei –20°C dem Medium 1:2000 zugesetzt |
| Desferoxaminmesylat (DFO, Desferal) | 50 mg/ml in PBS, stabil bei -20°C pro Maus 2,5 mg/ml |

2.1.13.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS: 4 mM KH₂PO₄
 16 mM Na₂HPO₄
 115 mM NaCl

5 x TBE-Puffer (1 Liter) : 54 g/l Tris-Base
 27,5 g/l Borsäure
 10 mM EDTA
 pH-Wert 8,3 (eingestellt mit Essigsäure)

FACS-Puffer: 500 ml PBS
 2% FCS
 2 mM EDTA
 0,01% Natriumazid

Milzzellresuspensionspuffer: Hank's Balanced Salt Solution
 2% FCS
 1M Hepes Puffer

Erythrozyten-Lysispuffer: 160 mM NH₄CL
 1,7mM Tris
 pH 7,2

mit Milliporewasser auf 1 l
auffüllen und steril filtrieren

FcγII/III-Receptor-Blocker

steril filtrierter Zellkulturüberstand
von HB-197 (Hybridom 24G2
ATCC-Zelllinie)

2.1.13.3 Puffer für proteinchemisches Arbeiten

Absättigungspuffer

50 mM Tris (pH 7,4)
200 mM NaCl
0,1% Twen 20
5% Magermilchpulver (5%)
mit Milliporewasser auffüllen

Blot-Puffer Semi dry 10x

58,2 g/l Tris
29,3 g/l Glycin
0,38% SDS
mit Milliporewasser auf auffüllen pH 9,2

Blot Puffer Semi dry 1x

200 ml Blot Puffer 10x
200 ml Methanol
1600 ml Wasser

ECL

Lösung A
440 µg/ml Luminol (44mg/ml in DMSO)
132 µg/ml Coumarinsäure (15 mg/ml in
DMSO) DMSO)
auf 25 ml auffüllen mit 100mM Tris/HCl pH
8,5

Lösung B:
0,03% H₂O₂

| | | |
|-------------------------|--|---|
| | 100 mM pH 8,5 | Tris/HCl |
| Elektrophoresepuffer 5x | 30,25 g/lg 144 g/l 5 g/l | Tris Glycin SDS mit Milliporewasser auffüllen |
| Lämmli-Puffer 5x | 2,5 ml 77 mg/l 10% 100 mg/ml | Tris /HCL (pH 6,8) DTT Glycerol SDS mit Wasser auffüllen |
| LämmliPuffer 1x | 1M 15,4 mg/ml 2 % 1 % | Tris/HCl (pH 6,8) DTT SDS Glycerol |
| Western-Waschpuffer 10x | 90 g/l 0,1 M 0,2 % | NaCl Tris pH 7,4 Tween 20 mit Wasser auffüllen und auf pH 7,4 einstellen |
| TENS-Lösung: | 0,5 mM 0,0,1 mM 0,1 M 0,5% ml | Tris pH 7,5 EDTA pH 8,0 NaOH SDS mit Wasser auffüllen |

Alle anderen Lösungen sind unter der zugehörigen Methode beschrieben.

2.1.13.4 Beta-Lactamase Färbelösung

Für alle Versuche, die am Durchflusszytometer gemessen wurden, wurden die Zellen mit CCF4-AM angefärbt.

| | |
|------|---|
| 83% | Hank's Salt Solution |
| 0,1% | Lösung A: CCF4-AM gelöst in DMSO |
| 1% | Lösung B: 100mg/ml Pluronic-F127 Tensid in DMSO und 0,1% Essigsäure |
| 16% | Lösung C: 24% PEG 400, 18%TR-40 in Wasser |

Bei Zellen, die sich schlecht anfärben ließen wurde 1% Probenecid Lösung dazu gegeben.

| | | |
|---------------------|--------|-----------------------|
| Probenecid Lösung : | 25 g/l | Probenecid |
| | 400 Mm | NaOH |
| | 100 Mm | Natriumphosphatpuffer |
| | pH 8,0 | |

2.1.14. Synthetische Oligonukleotide

Für die Klonierung und PCR wurden die in Tab. 2 aufgeführten synthetischen Oligonukleotide eingesetzt, die von der Thermo Electron GmbH synthetisiert wurden.

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Sequenz in 5' → 3' – Richtung | Eigenschaften |
|----------------|---------------------------------------|--|
| Bla BamHI fwd | GGA TCC ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG | Für die Amplifikation von β -Lactamase |
| Bla SalI rev | GTC GAC AAC TTG GTC TGA CAG TTA CC | Für die Amplifikation von β -Lactamase |

2.1.15. Plasmide und Vektoren

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren

| Vektor | Beschreibung | Referen |
|----------------------|--|---------------------------|
| pCR Blunt II | Diente als Klonierungsvektor für PCR Produkte | Invitrogen, Karlsruhe |
| pCR2.1 | Diente als Klonierungsvektor für PCR Produkte | Invitrogen, Karlsruhe |
| pCDNA3 | Zur Transfektion von Zellen, Kontrollplasmid | Invitrogen, Karlsruhe |
| pCDNA3 <i>bla</i> | Zur Transfektion von Zellen, Reporterplasmid | Klein- Günther/Köberle |
| pMKyopE53 <i>bla</i> | Reporterplasmid | Klein- Günther/Köberle |
| pMKyopE53 <i>ova</i> | Kontrollplasmid | Klein- Günther/Köberle |

2.2 Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Bakterien

Es wurden *Yersinia enterocolitica* Wildtypstämme und verschiedene daraus hergestellte defiziente Stämme verwendet, bei denen verschiedene Yops („*yersinia outer proteins*“) nicht vorhanden sind oder gar keine Yops gebildet werden.

2.2.1.1 Bakterienanzucht

Die Bakterien wurden bei 27° C in LB Medium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit LB Medium 1:20 verdünnt. Die Subkultur wurde 3 Stunden bei 37° C wachsen gelassen. Bei 37° C exprimiert *Yersinia enterocolitica* das Typ III Sekretionssystem, die Yops und weitere Pathogenitätsfaktoren.

2.2.1.2 Herstellung von Bakterienstocks

Yersinia enterocolitica wurden bei 27° C über Nacht angezogen (*E. coli* bei 37° C). Am nächsten Tag wurden die Bakterien in der Zentrifuge bei 4495 g 5 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien mit PBS einmal gewaschen. Das Pellet wurde in LB-Medium mit 20% Glycerin aufgenommen und in Aliquots von jeweils 500 µl auf 1,5ml Eppendorfgefäße verteilt. Die Bakterien sollten möglichst schnell bei -80° C eingefroren werden .

2.2.1.3 Vorbereitung der Bakterien zur Infektion von Zellkulturen

Die Bakterien wurden angezogen (siehe 2.2.1.1), sedimentiert und mit PBS gewaschen. Für die Titerbestimmung durch OD₆₀₀-Messung am Photometer wurden 50µl Bakteriensuspension in PBS 1:20 verdünnt. Die Bakterienzahl wurde mittels OD₆₀₀ ermittelt.

Durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen konnte man feststellen, dass eine OD₆₀₀ von 0,5 entspricht $2,5 \cdot 10^8$ Bakterien pro Milliliter.

Eine MOI von 20 heißt auf eine eukaryontische Zelle kommen 20 Bakterien. Anhand der gemessenen OD₆₀₀ kann man das entsprechende Volumen der Bakteriensuspension berechnen. Die Zellen wurden in der Regel mit einer MOI von 50 infiziert.

2.2.1.4. Herstellung der Bakterienkulturen für die intravenöse Infektion von Mäusen

Es wurden 10ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit den Bakterien über Nacht bei 27°C angeimpft. Am nächsten Tag wurden die 10ml Bakteriensuspension in 200ml LB Medium mit Antibiotika überführt. Nach drei bis vier Stunden bei 37°C wurde die Bakteriensuspension sedimentiert. Das Pellet wurde in 20ml LB-Medium mit 20% Glycerin aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 500 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Am nächsten Tag wurde zur Titerbestimmung je ein Aliquot vom Anfang, von der Mitte und vom Ende genommen, drei Mal mit PBS gewaschen und 1:10 verdünnt. Es wurden 8 Verdünnungen hergestellt und die drei höchsten auf MH-Platten ausplattiert. Nach zwei Tagen Inkubation bei 27°C im Brutschrank wurden die Kolonien ausgezählt und der Titer der Bakterienkulturen bestimmt.

2.2.1.5 Vorbereitung der Bakterien zur Infektion von Mäusen

Zuvor hergestellte Bakterienkulturen wurden aufgetaut und in der Zentrifuge bei 5000g 5 Minuten bei 4°C sedimentiert. Die Bakterien wurden drei Mal mit 500µl PBS gewaschen.

Die Bakterien wurden entsprechend der gewünschten Infektionsdosis so verdünnt, dass sie in 200 µl in die Maus injiziert werden konnten. Zur Überprüfung der Infektionsdosis wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und ein Teil davon auf MH-Test Platten ausplattiert. Anhand der nach 2 Tagen (bei 27 °C) gewachsenen Kolonien wurde die tatsächliche Keimzahl bestimmt.

2.2.1.6 Herstellung von chemischkompetenten (kalziumkompetenten) Bakterien

Für die Transformation rekombinanter Plasmide benötigt man kompetente Bakterien. Kompetente Bakterien sind Bakterien, die die Fähigkeit besitzen DNA aus ihrer Umwelt aufzunehmen. Neben natürlich vorkommenden kompetenten Bakterienarten gibt es die Möglichkeit, Bakterien durch Behandlung mit chemischen Substanzen kompetent zu machen. Das Prinzip der Kompetenzbildung beruht auf einer Modifikation der Lipiddoppelschicht, die das Bakterium umgibt. Es wurden 5ml Übernachtskultur beimpft.

Am nächsten Tag wurde 1 ml der Übernachtskultur 1:100 in LB Medium verdünnt. Es wurde bei 37° inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 erreicht war. Dann wurden die Bakterien sedimentiert. Das Sediment wurde in 1/40 seines Ursprungsvolumens aufgenommen (2,5ml) und in eiskalter Transformations- und Einfrierlösung resuspendiert. Die Bakterien wurden in 50 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.2.1.7 Transformation von DNA in Bakterien

Die kalziumkompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 4 µl Ligationsansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfuhren die Bakterien 45 Sekunden einen Hitzeschock bei 42°C. Nach einer kurzen Kühlung wurde 1ml SOC-Medium dazu gegeben. Die Bakterien wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert und dann auf entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert.

2.2.1.8. Herstellung von elektrokompetenten Bakterien

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden diese in 5 ml Medium angeimpft. Am nächsten Tag wurden 100ml LB- Medium mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft. Es wurde bei 37° inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 erreicht war. Nach 5 Minuten auf Eis wurden die Bakterien sedimentiert. Das Pellet wurde in 10% Glycerin gelöst in Wasser resuspendiert. Der Vorgang wurde 3-4mal wiederholt. Nach den Waschvorgängen wurde das Pellet in 1ml GYT resuspendiert. Aliquots von 50µl wurden bei -80°C eingefroren.

2.2.1.9 Elektroporation von Bakterien

Bei der Elektroporation wird mittels eines elektrischen Impulses das gewünschte Plasmid in das Bakterium transformiert.

Es wurden 50µl kompetenter Bakterien mit 1-2µl Menge in ng oder µgDNA auf Eis 4 Minuten inkubiert. Die vorgekühlte Elektroporationsküvette mit Bakterien und DNA wurde einem elektrischen Impuls von 2,5kV bei 200-600Ω ausgesetzt. Nach der Transformation gab man 1ml SOC-Medium dazu. Die Bakterien wurden eine Stunde bei 27°C inkubiert und dann auf entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert.

2.2.2. Zellkulturen

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank ausgeführt. Die dafür benötigten Materialien und Lösungen wurden steril bezogen oder steril filtriert.

Es wurde hauptsächlich mit HeLa und verschiedenen Primärzellen aus der Maus gearbeitet, da sich die anderen Zellen wegen ihrer schwierigen Anfärbbarkeit für diese Versuche nicht eigneten.

Alle Zellen wurden bei 37°C und unter 5% CO₂-Atmosphäre mit 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.2.1 Kultivierung von Gewebekulturzellen HeLa

Die Zellen wurde drei Mal pro Woche passagiert. Hier für wurde zunächst das Medium abgenommen und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2,5ml EDTA-Trypsin auf die Zellen gegeben Nach 5 Minuten Einwirkzeit und leichtem Klopfen gegen die Flasche lösten sich die Zellen. Das Trypsin wurde durch Zugabe des zweifachen Volumens Medium neutralisiert. Die Zellsuspension wurde sedimentiert (400g für 5 Minuten). Das Zellsediment wurde in Medium resuspendiert. In der Regel wurde ¼ der Zellsuspension wieder in eine neue Flasche gegeben, so dass in einer 80 cm² Flasche ca. 2x10⁶ Zellen pro 10 ml Medium waren.

2.2.2.2 Kultivierung von Gewebekulturzellen GD25 bzw. GD25 β -1 Integrin

Die Zellen wurden zunächst mit PBS, anschließend mit 2,5ml EDTA-Trypsin-Lösung gewaschen und 5 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschliessend wurde um eine weitere Aktivität des Trypsin zu verhindern das zweifache Volumen an Medium dazu gegeben. Die abgelösten Zellen wurden zentrifugiert, resuspendiert und etwa 2×10^6 Zellen in 10 ml Medium in einer 80cm² Zellkulturflasche kultiviert. Den GD25 β -1-Integrin Zellen wurde zusätzlich noch 100 ng/ml Puromycin zugesetzt.

2.2.2.3 Isolation und Kultivierung von Maus-Knochenmarksmakrophagen

Zur Gewinnung von Maus-Knochenmarksmakrophagen wurde eine C57/BL-6 Maus getötet. Die Maus wurde zur Desinfektion mit 70%igem Isopropanol besprüht. Sie wurde auf den Rücken auf ein Präparierbrett gelegt. Mit Kanülen wurden die Füße und die Haut am Rand des Bauches festgesteckt, so dass die Beine gespannt waren.

Die Haut wurde über dem Knie und von dort bis zur Hüfte und Pfote aufgeschnitten und von den Muskeln getrennt. Der freigelegte Beinknochen wurde am Hüftgelenk und am Gelenk der Pfote durchtrennt. Der herauspräparierte Knochen wurde zur Aufbewahrung in ein mit PBS gefülltes 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben (auf Eis).

Unter der sterilen Werkbank wurde das restliche Gewebe von den Knochen mit 70%igem isopropanol-getränkten Tüchern entfernt. Ober- und Unterschenkel wurden am Knie voneinander getrennt. Die Gelenke wurden mit der Schere abgeschnitten, so dass man an beiden Seiten des Knochens das rote Knochenmark sah. Mit einer mit PBS gefüllten Spritze mit einer 0,4/19 mm Kanüle wurde von oben das Knochenmark durch Spülen und Schaben aus dem Knochen gelöst, bis dieser weiß war. Das Knochenmark wurde sedimentiert. In einer großen Zellkulturschale wurden 40 ml DMEM Medium supplementiert mit 5% Pferdeserum, 10% FCS, 20% L929 Überstand vorgelegt. Der L929 Überstand enthält M-CSF, einen Faktor, der die im Knochenmark enthaltenen Stammzellen zur Differenzierung zu Makrophagen stimuliert. Das Sediment wurde im Medium gut resuspendiert und in die vorbereiteten Schalen überführt. Pro Maus wurden 4 große Petrischalen verwendet. Die Zellkulturen wurden 8 Tage inkubiert.

Am 8. Tag wurden die Zellen mit dem vorhandenen Medium gespült.

Das Medium wurde abgenommen und auf die Zellen eiskaltes PBS gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis lösten sich die Zellen. Die Zellsuspension wurde in ein Gefäß überführt und sedimentiert. In einem Volumen von 10-20 ml wurden die Zellen gezählt. Es wurden 0,5 bis 1×10^6 Zellen in 6-Napf Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Versuche eingesetzt.

Herstellung primärer Milzzellkulturen siehe unter 2.2.3.2

2.2.2.5 Lebendzellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde in 90 μ l Trypan-Blau 10 μ l Zellsuspension 1:10 verdünnt und resuspendiert. Trypan-Blau kann nur in tote Zellen mit nicht mehr intakter Membran eindringen und diese blau anfärben. Auf eine Neubauer-Zählkammer (0,100mm; 0,0025mm²) wurde 10 μ l des Trypan-Blau-Zellgemisches gegeben und unter dem Mikroskop die vier großen Quadrate ausgezählt. Die Multiplikation der gemittelten Anzahl der nicht angefärbten Zellen in einem Großquadrat (bestehend aus 16 Kleinquadraten) mit dem Kammerfaktor (1×10^4 Zellen/ml) und dem Verdünnungsfaktor ergab die Konzentration der Zellen in der ursprünglichen Zellsuspension pro Milliliter Medium.

2.2.2.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden wie bei der Zellkultivierung abgelöst und sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in Einfriermedium, (FCS mit 10% DMSO) resuspendiert und in Einfriererörchen aliquotiert.

Die Rörchen wurden in eine Einfrierbox mit 70%igem 2-Propanol gestellt und dann in einer -80° C Gefriertruhe über Nacht eingefroren. Das 2-Propanol und DMSO bewirken, dass die Zellen sehr langsam gefrieren und somit keine Kristalle gebildet werden, welche die Zellen zerstören könnten. Am nächsten Tag konnten die Einfriererörchen in den Stickstoff-Tank überführt werden.

Für das Auftauen der Zellen wurden sie aus dem flüssigen Stickstoff geholt und in einem 37° C warmen Wasserbad vorsichtig aufgetaut. Während dessen wurde eine Zellkulturflasche mit warmem Medium befüllt und in den Brutschrank gestellt.

Die Zellsuspension wurde dann möglichst schnell in das vorgewärmte Medium in der Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden über Nacht in den Zellkulturbrutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt um das DMSO vollständig zu entfernen

2.2.2.7 Infektion von Zellkulturen mit Yersinien

Eine halbe bis eine Million Zellen wurden in einer 6-Napf-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mindestens eine Stunde vor der Infektion zwei mal mit PBS gewaschen und dann 2 Milliliter antibiotikafreies Medium dazu gegeben. Es wurde die benötigte MOI Bakterien auf die Zellen gegeben (siehe Bakteriovorbereitung 2.2.1.3). Die Bakterien wurden anschließend 5 Minuten bei 400 g auf die Zellen zentrifugiert.

Eine Stunde nach der Infektion wurde Gentamycin (1: 100 verdünnt) zugegeben. Das Gentamycin bewirkt, dass alle extrazellulären Bakterien getötet werden.

Je nach Infektionsdauer wurden die Zellen weiterhin im Brutschrank inkubiert. Bei manchen Experimenten wurden die Zellen vor Infektion für 24 Stunden mit Zyokinen unterschiedlicher Konzentration vorstimuliert.

Am Ende der Infektionszeit wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und mit CCF4-AM gefärbt.

2.2.2.8 Adhäsionsassay

Um die Adhäsion bestimmter Bakterienstämme an Zellen zu bestimmen, wurden 1×10^5 Zellen pro Napf über Nacht in einer 24 Napf-Platte bei 37°C inkubiert. Eine Stunde vor der Infektion wurde das Medium gewechselt und antibiotikafreies Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit einer MOI von 100 infiziert (2.2.1.3). Die Platte wurde für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert und danach 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Um die nicht adherenten Bakterien zu entfernen wurde jeder Napf drei mal mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Dazu wurden sie 5 Minuten mit 1ml PBS / 1%

Triton-X-100 inkubiert und resuspendiert. Das Gemisch wurde in ein Eppendorfgesäß überführt um geeignete Verdünnungen mit PBS zu machen. Von jeder Verdünnung wurden 100 µl auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen.

Die LB-Agar-Platten wurden über Nacht bei 37° C bebrütet und durch Auszählen die Menge an adhärenen Bakterien ermittelt.

2.2.2.9 *In vitro* Transfektion von HeLa Zellen mit ExGen 500

Um die Aufnahme der Transfektionsvektoren in die Zellen zu ermöglichen, wurden diese mit Polyethylenimin (22 kDa) komplexiert, welches als „Protonenschwamm“ Wasserstoffbrückenbindungen mit der DNA ausbildet und so ermöglicht, dass diese auf die Zellen zentrifugiert und dort phagozytiert werden kann.

Am Vortag der Transfektion wurden für jeden Ansatz $1 \cdot 10^6$ HeLa Zellen in eine 6-Napf-Platte mit 2 ml Vollmedium ausgesät.

Am Tag der Transfektion wurden die Zellen mit 2 ml PBS (37 °C) gewaschen und mit 2 ml OptiMEM bedeckt.

Transfektionslösungen:

Tab. 7: Ansatz Transfektionslösung

| Ansatz | Lösung A | Lösung B |
|----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| $2 \cdot 10^6$ | 32 µl ExGen + 368 µl 150 mM NaCl | 12 µg DNA, 150 mM NaCl ad 400 µl |

Lösung A wurde zu Lösung B pipettiert und sofort 10 Sekunden gemischt. Die Transfektionslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen. Die DNA-Komplexe wurden bei 400 g, 5 Minuten auf die Zellen zentrifugiert. Nach zwei Stunden im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium entfernt, durch Vollmedium ersetzt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten die β-Lactamasefärbung mit anschließender durchflusszytometrischer Untersuchung.

β-Lactamasefärbung der Zellen mit CCF4-AM und Messen am Durchflusszytometer ist unter tierexperimentelles Arbeiten unter Punkt 2.2.3.6 und 2.2.3.7 zu finden.

2.2.3 Tierexperimentelles Arbeiten

2.2.3.1 *In vivo* Infektion von Mäusen

Den Mäusen wurden die Bakterien intravenös appliziert. Um diesen Vorgang zu erleichtern wurden die Mäuse zur Vasodilatation mit Rotlicht bestrahlt. Für Infektionsversuche mit dem Stamm *Y. enterocolitica* E40 O:9 wurden den Tieren eine Stunde vor der Yersinieninfektion eine Lösung mit 2,5 mg/ml Desferal in einem Volumen von 200 µl intravenös verabreicht.

Es wurden stets 200 µl der Bakteriensuspension injiziert. Nach Beendigung der Versuche wurden die Mäuse mit CO₂ getötet.

2.2.3.2 Herstellung primärer Milzzellkulturen

Um die Milz zu entfernen wurde die tote Maus auf die rechte Seite gelegt. Die Maus wurde durch Absprühen desinfiziert. Die Haut der Maus wurde aufgeschnitten. Die dunkelrote Milz wurde dabei zum Rücken hin sichtbar. Das Peritoneum wurde durchgeschnitten und die Milz angehoben und entfernt, so dass man sie in ein Röhrchen mit 5 ml HBSS auf Eis überführen konnte. Die Milzen wurden routinemässig gewogen.

Anschließend wurden die Milzzellen mit Hilfe eines Zellsiebes (Porengrösse 5 µm) in 5 ml HBSS homogenisiert und je nach Experiment weiter verwendet. Bei Infektionsexperimenten wurde ein Aliquot von 250 µl für spätere Keimzahlbestimmungen auf Eis gestellt. Die restlichen Zellen wurden zentrifugiert, in 2 ml Erythrozyten-Lysispuffer resuspendiert und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lysisreaktion wurde durch Zugabe von 5 ml HBSS gestoppt. Die Zellen wurden anschliessend zweimal mit HBSS gewaschen und die Zellzahl mit einer Neubauerkammer bestimmt.

2.2.3.3 Kultivierung der Milzzellen

Für Zellkulturexperimente wurden 1×10^6 Zellen pro 6-Napf-Platte ausgesät und unverzüglich mit der Infektion oder Stimulation fortgeföhren.

2.2.3.4 Bestimmung der Keimzahl in Milzen infizierter Mäuse

Zur Bestimmung der Keimzahl in Milzen wurde eine Verdünnungsreihe bestehend aus 5 1:10 Verdünnungen hergestellt. Es wurden von den verschiedenen Verdünnungsstufen 1000 µl Aliquots auf einer MH-Agar-Platte ausplattiert.

Die Platten wurden 1-2 Tage bei 27° C in einem Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kolonien pro Platte ausgezählt und die Keimzahl pro Milz bestimmt, indem man Anzahl der Kolonien mit der Verdünnung und 50 multiplizierte (auf jede Platte kamen nur 100 µl, da man aber 5 ml Gesamtvolumen hatte musste noch mit 50 multipliziert werden).

2.2.3.5 Antikörper-Färbung zellulärer Oberflächenmarker für die Analyse am Durchflusszytometer

Mit Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelten Antikörper ist es möglich, eine Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar zu machen und somit ein bestimmtes Antigen zu detektieren. Mit dieser Methode können Zellen über spezifische Oberflächenproteine identifiziert werden.

Je nach Zahl der Ansätze wurden 0,5-1 Million Zellen in Eppendorfgefäße oder in eine 96er-Napf-Platte pipettiert. Nach dem Sedimentieren wurden 100 µl FcγII/III-Receptor-Blocker auf die Zellen gegeben und 15 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit Allophycocyanin (APC) gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker der wichtigsten Milzzellpopulationen gefärbt. Die Antikörper wurden 1:100 bzw. 1:200 mit FACS-Puffer verdünnt. Nach 30 Minuten Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen dreimal gewaschen. Zum Schluß wurden die Zellen in FACS-Röhrchen mit 500 µl Facspuffer überführt.

2.2.3.6 β-Lactamasefärbung

Der Fluorophor der Lactamase Färbelösung ist CCF4-AM. CCF4-AM besteht aus einem Cephalosporin-Kern mit einem 7-Hydroxycoumarin- und einem Fluorescein-Rest. Durch die lipophile Veresterung ist CCF4-AM gut membrangängig. Im Cytosol spalten zelluläre Esterasen die Ester-Bindung, das nun negativ geladene CCF4 bleibt so im Cytosol. Ist keine β-Lactamase in der Zelle, wird der Coumarin-Rest angeregt, es entsteht ein FRET

(fluorescence resonance energy transfer) zum Fluorescein. Das Fluorescein emittiert eine grüne Fluoreszenz (520 nm). Wenn β -Lactamase in der Zelle ist, spaltet sie den Laktam-Ring des Cephalosporin-Kerns, wobei auch der Fluorescein-Rest entfernt der FRET zerstört wird. Der verbliebene Coumarin-Rest emittiert im blauen Bereich (447 nm).

Die Färbelösung wurde aus CCF4-AM, Puffer B und C sowie Medium hergestellt und 100 μ l auf das Zellpellet gegeben. Nach 20-30 Minuten wurden die Zellen mit 500 ml FACS-Puffer verdünnt und dann am Durchflusszytometer vermessen.

Der Farbstoff verbleibt nur in lebenden Zellen, deswegen ist eine Fixierung der Zellen mit PFA nicht möglich.

2.2.3.7 Messen mit dem Durchflusszytometer

Die Grundlage des Funktionsprinzips des Durchflusszytometers beruht auf der simultanen Messung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von mit Fluoreszenzfarbstoff versetzten Zellsuspensionen. Größe und Granularität der Zellen werden über die Lichtstreuung gemessen, die gleichzeitig mit der Untersuchung der Fluoreszenz ausgeführt wird.

Die Zellsuspension, die mit spezifischen Oberflächenantikörpern gefärbt ist, wird aus dem Proberöhrchen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Meßküvette eingeführt. Durch die umgebende Trägerflüssigkeit werden die Zellen beschleunigt und zum Analysenpunkt transportiert. Die Lichtstreuung wird durch Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Die zeitlich parallel ablaufenden Messungen der Fluoreszenz beruhen auf der Absorption von Lichtenergie in einem für die jeweilige fluoreszierende Verbindung charakteristischen Wellenlängenbereich durch das Anheben von Elektronen auf ein höheres Energieniveau und der darauf folgenden langwelligeren Photoemission durch das Zurückfallen auf das energetische Grundniveau. Die Autofluoreszenz der Zellsuspension wird mit Hilfe einer Negativ-Kontrolle ermittelt. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiozyanat (FITC) wird bei einer Wellenlänge von 495 nm angeregt und sein Emissionsmaximum liegt bei 519 nm, bei Phycoerythrin B (PE) liegen die Absorptionsmaxima bei 480 nm und 565 nm und das Emissionsmaximum bei 578 nm, bei Peridin-Chlorophyll-a-Proteinkomplex (PerCP) liegen Anregung und Emission bei 490 nm bzw. 675 nm und bei Allophycocyanin (APC) bei 650 nm bzw. 660 nm.

2.2.3.8 Sortieren der Zellen

Der Einsatz von Durchflusszytometern mit einer Trenneinrichtung ermöglicht die Isolation individueller Zellpopulationen aus Zellgemischen aufgrund bestimmter Eigenschaften der Zellen (zum Beispiel fluoreszierende Antikörper gegen Zelloberflächenproteine). Zur Zelltrennung werden Flüssigkeitströpfchen in denen sich die Zellen befinden, je nach Fluoreszenz mit verschiedenen Ladungen versehen. Die Tröpfchen gelangen durch ein elektrisches Feld und werden geladene. Über einen geladene Ablenkplatten werden die Tröpfchen in das jeweilige Auffangröhrchen abgelenkt.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die PCR wurde zunächst folgender Ansatz in ein 0,2 ml Eppendorfgefäß vorgelegt:

Tab. 8: Ansatz für eine PCR.

| | Endkonzentration | Vol. für 1 Reaktion in μl |
|-------------------------------|-------------------------|---|
| Wasser | | 18,77 |
| PCR Puffer +MgCl ₂ | 10x | 2,50 |
| dNTPs | 10mM | 0,88 |
| Primer fwd | 10pM | 0,75 |
| Primer rev | 10pM | 0,75 |
| Polymerase | 5U/ μ l | 0,36 |
| Template | | 1,00 |
| | | |
| Gesamt | | 25 |

Das Eppendorfgefäß mit dem Template und den Enzymen wurde in einen vorgeheizten PCR-Cycler (Biometra Thermoblock) gestellt. Folgendes Programm wurde gestartet:

Tab. 9: Programm aus dem Cycler.

| Schritt | Vorgang | Temperatur | Zeit |
|---|--|------------|------------------|
| 1 | Eingangsdennaturierung | 95°C | 60 Sekunden |
| 2 | DNA Denaturierung Beide Stränge trennen sich | 95°C | 30 Sekunden |
| 3 | Primeranlagerung Temperatur wird gesenkt um den Primern zu ermöglichen an die DNA zu hybridisieren | 58°C | 30 Sekunden |
| 4 | DNA Elongation. Die Temperatur wird auf das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht um eine Zweitstrangsynthese zu erlauben. Am Ende eines Zyklus ist die DNA- Menge (nahezu) verdoppelt. | 72°C | 30 Sekunden |
| Wiederholung Schritt 1.-3.: 22 mal entspricht 23 Zyklen | | | |
| 5 | Abschließende DNA Extension | 72°C | 7 min |
| 6 | Dauerkühlung | 4°C | Bis zur Entnahme |

Die PCR-Produkte wurden bei 4° C im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode, um die DNA verschiedener Größen aufzutrennen. Dabei wandern die DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen. Die zurückgelegte Strecke ist abhängig von der Größe der Fragmente, der Stromstärke und der Agarosekonzentration des Gels. Die Lage der DNA im Agarosegel kann durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidium-Bromid sichtbar gemacht werden. Ethidium-Bromid interkaliert in die DNA. Durch Vergleich mit einem mitlaufenden Längenstandard ist es möglich die Größe der Fragmente abzuschätzen.

Es wurden 25 µl des PCR-Produktes mit 2 µl Ladepuffer vermischt und davon 10 µl auf das Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung eines 1,5% Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 0,5-fach TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Die Agarose wurde in einen Gel-Schlitten mit Kamm gegossen. Das Aushärten des Gels dauerte ungefähr 15 Minuten. Das feste Agarosegel wurde dann mit Schlitten in eine Elektrophoresekammer mit 0,5-fach TBE-Puffer gelegt. Der Kamm wurde entfernt und in die Taschen 10 µl der Probe pipettiert. In die erste Tasche kamen 5 µl des Längenstandards. Die Elektrophorese wurde bei 80V durchgeführt. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel 15-30 Minuten gefärbt.

Nach der Färbung wurde das Gel noch 30 Minuten entfärbt und dann im Transilluminator unter UV-Licht angesehen und fotografiert.

2.2.4.3 Elution von DNA aus Agarosegelen

Das Agarosegel wurde behandelt wie unter 2.2.4.2 beschrieben. Anschließend wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4.4 Präparation von Plasmiden

Plasmide wurden je nach Verwendungszweck auf unterschiedliche Weise isoliert.

Für die Sequenzierung erfolgte die Isolation über eine Säule mit dem Nucleobond Spin Plasmid Kit um eine besonders reine Präparation zu erhalten. Größere Mengen wurden mit dem Nucleobond AX-100 Kit von Machery-Nagel aufgereinigt. Hierbei wurden die Standardprotokolle verwendet, die den Kits beilagen.

2.2.4.5 Plasmid Präparation durch alkalische Lyse ohne Säulchen

Die Plasmidpräparation ohne Säulchen wurde besonders bei der Isolation von großen Plasmiden wie z.B. dem pYV Plasmid angewandt. Es wurden 5 ml Übernachtskultur 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Es wurden 200 µl Lysisbuffer dazu gegeben und danach 200 µl Bindepuffer (Nucleobond AX100 Machery-Nagel).

Aus der Suspension wurde danach 10 Minuten bei -80° C die genomische DNA und Proteine als SDS-Präzipitate gefällt. Nach dem Auftauen, wurde 15 Minuten bei 12000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 60% des Volumens Ethanol (100%) dazu gegeben (bei ungefähr 550 µl Überstand 330 µl Ethanol). Es wurde 1 Stunde bei -20° C eingefroren. Danach wurde 15 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde das Pellet getrocknet und in 30 µl Wasser aufgenommen.

2.2.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mit der TENS-Methode

Diese Methode lässt sich hauptsächlich zur Plasmid-Präparation für den Kontrollverdau verwenden. Die DNA ist nicht sauber, kann also nicht zum Sequenzieren verwendet werden, die Methode ist aber schnell und preiswert.

Es wurden 1,5 ml Bakterienkultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 Minuten bei 13000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl TENS-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde 5 Sekunden gemischt und dann 150 µl Natriumacetat (3M pH 5,2) zugefügt. Nach dem gemischt und sedimentiert wurde, wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 0,9 ml Ethanol 100% dazu gegeben. Nach 10-minütigem zentrifugieren, wurde der Überstand verworfen und 1 ml 70% Ethanol hinzugefügt. Das sedimentierte Pellet wurde getrocknet. Anschließend wurde es in 35 µl Wasser aufgenommen und dann z.B. in eine Restriktionsanalyse eingesetzt.

2.2.4.7 Fällung von RNA oder DNA

Wenn die Konzentration der RNA oder DNA zu gering war, wurde sie durch Fällung konzentriert.

Es wurde zur DNA ein Zehntel des Volumens 3 M Natriumacetat und das zweifache Volumen 100% Ethanol gegeben und gemischt. Nach einer Stunde Inkubation bei -20° C wurde die DNA sedimentiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem möglichst geringen Volumen Wasser gelöst.

2.2.4.8 Restriktionsanalysen von DNA

Zur Kontrolle von Plasmiden wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Anhand der Größe, der durch den Verdau entstandenen Fragmente, ließ sich dann die Identität der Plasmide feststellen. Für die Restriktionsanalyse wurden Menge in µg DNA mit 2 µl des benötigten 10-

fach Puffers 0,3 µl Enzym (ungefähr 3 units pro µg/DNA) und 13 µl Wasser gemischt. Das Volumen des Ansatzes ist abhängig von der DNA-Menge. Wenn die Plasmide mittels der TENS-Methode gewonnen wurden, gab man zusätzlich 5 units RNase dazu.

Der Restriktionsansatz wurde über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz mit DNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit T4 Ligase wurde vorgenommen, um DNA Fragmente in einen Vektor zu ligieren. Das Fragment wurde in der Regel in 2,5-3-fachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Die Mengen wurden mit Hilfe eines Agarosegels abgeschätzt. Der Ligationsansatz mit Puffer und T4 Ligase wurde über Nacht bei 14° C inkubiert und konnte dann für die Transformation verwendet werden. (2.2.1.7).

2.2.5 Proteinchemisches Arbeiten

2.2.5.1 Gewinnung von sekretierten *Yersinia* Proteinen

Von der Übernachtskultur wurden 250 µl in 5 ml BHI überimpft. Nach 2 Stunden bei 37° C wurde 50 µl EGTA (500mM), 50 µl MgCl₂ (1M) und 50 µl Glukose (20%) zur Bakterienbouillon gegeben und weitere 2-3 Stunden bei 37° C und 200 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden bei 2987 g 15 Minuten sedimentiert. Der Überstand und das in 5 ml H₂O resuspendierte Pellet wurden in säurestabile Zentrifugenröhrchen überführt. Zu Überstand und Pellet wurden 5 ml 100%ige Trichloressigsäure gegeben. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurden die Röhrchen 20 Minuten bei 4° C bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml eiskaltem Aceton abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. .

Die Suspension wurde 15 Minuten bei 13000 rpm sedimentiert. Das Pellet wurde noch weitere zwei mal mit Aceton gewaschen. Danach wurde das Pellet in Wasser aufgenommen und neutralisiert. Anschließend wurde die Proteinbestimmung durchgeführt.

2.2.5.3 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen wurde der Biorad Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Danach wurden die mit 2-fach Lämmli versetzt und bei 95° C 10 Minuten gekocht. Die abgekühlten Proben konnten dann für die SDS-Gel-Elektrophorese verwendet werden.

2.2.5.4 Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen.

Die Auftrennung beruht auf der Bindung zwischen Proteinen und SDS (Natrium-Dodecylsulfat). Durch die Bindung erhalten alle Proteine die selbe (negative) Ladung, die Proteine unterscheiden sich dann nur noch durch ihre Größe. Beim Wandern im elektrischen Feld zum Pluspol werden die Proteine durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt, da sich größere Proteinkomplexe in der Polyacrylamidmatrix langsamer bewegen.

2.2.5.5 Gelherstellung

Das Trenngel und das Sammelgel bestanden aus Wasser, 30% Acrylamid Mix, 1,5 ml Tris (pH 8,8; Sammelgel pH 6,8) 10% SDS, 10% Ammonium Persulfat und TEMED. Je nach Acrylamidgehalt des Gels variierten die Mengen einiger Komponenten des Trenngels.

Die Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt und in die dafür vorgesehenen Gussrahmen eingespannt. Es wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Durch Einsetzen eines Kamms wurden die Taschen für den Probenauftrag geschaffen.

2.2.5.6 SDS-Gel-Elektrophorese

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingebaut und der Elektrophoresepuffer dazugegeben. Die Proben und der Marker wurden in die Taschen überführt. Die Elektrophorese wurde bei 20-40 mA durchgeführt bis die blaue Lauffront das Gel verlassen hatte.

2.2.5.7 Gel-Blotting

Für den Nachweis von bestimmten Proteinen in Bakterienextrakten wurden nach der SDS-Gelelektrophorese die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dadurch können die übertragenen Proteine durch eine spezifische, sehr sensitive Immunreaktion nachgewiesen werden (Immunoblot) (140). Dafür wurden eine Membran und 4 Whatmanpapiere 20 Minuten in Semidry-Blotpuffer eingelegt. Danach wurden zwei Whatmanpapiere in eine Blotkammer gelegt, dann die Membran, darauf luftblasenfrei das Gel und wieder zwei Whatmanpapiere. Die Blotzeit betrug 1 Stunde bei 70 mA pro Gel.

2.2.5.8 Färben mit Ponceau-S-Lösung

Nach dem Transfer wurde die Membran mit Methanol behandelt und getrocknet, um die geblotteten Proteine zu fixieren. Danach wurde die Membran 15 Minuten mit Ponceau-S-Lösung gefärbt (117) und anschließend mit Wasser entfärbt bis die Banden gut sichtbar waren. Der Marker wurde mit einem Stift auf der Membran markiert.

2.2.5.9 Immunreaktion

Nach der Färbung mit Ponceau-S-Lösung wurde die Membran vollständig mit Waschpuffer entfärbt. Anschließend wurde die Membran für mindestens eine Stunde mit Absättigungspuffer geblockt um unspezifische Proteinbindung an die Membran zu verhindern. Nach dem Blocken wurde die Membran mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte über Nacht die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:10.000 in Absättigungspuffer bei 4°

C). Nach der Antikörperinkubation wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:1000 in Absättigungspuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur gefolgt von dreimaligem Waschen mit Waschpuffer.

2.2.5.10 Entwicklung der Membran

Die Membran wurde eine Minute mit ECL-Reagenz inkubiert. Zum Entwickeln wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Entwicklerkassette gegeben. Ein Röntgenfilm wurde 20 Sekunden bis 5 Minuten belichtet und anschließend entwickelt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Reportersystems für die Translokation von Yops in die Zielzelle

Es wurden in der Vergangenheit verschiedene Ansätze gestartet, um Yops in Zielzellen nachweisen zu können. So konnten translozierte Yops durch Immunocytochemie oder mittels Western Blot nachgewiesen werden (3, 64). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Effektor-Yops mit einer Reporter-Domäne zu fusionieren. So wurden Yops mit GFP (72), der Adenylat Cyclase CyA (131), Cre-Rekombinase (31) oder β -Lactamase (39, 90) fusioniert. Es traten bei den meisten Nachweismethoden Probleme auf besonders *in vivo*.

GFP wird nur sekretiert, wenn GFP partiell ungefalted ist. Ansonsten wird es nicht sekretiert, da es nicht durch die Nadel von *Yersinia enterocolitica* kommt (75).

Die Untersuchungen mit der Adenylat Cyclase CyA sind eine relativ einfache Methode, um die Expression und Translokation von Yops *in vitro* nachzuweisen. Allerdings kann man das Adenylat Cyclase CyA Reportersystem nicht für *in vivo* Untersuchungen in Einzelzellen nutzen. Die Nachweismethodik beruht darauf, dass die CyaA Aktivität in Lysaten der infizierten Zellen nachgewiesen wird. Eine Markierung der Oberflächenantigene ist mit dieser Nachweismethodik nicht möglich (131).

Versuche mit der Cre-Rekombinase funktionierten mit *Yersinia enterocolitica in vivo* nicht (Köberle, unveröffentlicht). Außerdem ist man bei der Wahl der Mäuse sehr eingeschränkt, da dieses System nur in Mäusen mit Cre-aktivierbaren Reportergenen wie z.B. ROSA 26 Mäusen funktioniert (31).

Im Jahre 2005 konnten durch ein β -Lactamase Reportersystem mit *Yersinia pestis* detaillierte Analysen der Yop Translokation *in vitro* und *in vivo* durchgeführt werden. Die β -Lactamase wurde mit YopE oder YopM fusioniert und gelangte über das Typ III Sekretionssystem in die Zelle. Die lebenden Zellen konnten mittels des Farbstoffs CCF2-AM gefärbt werden. Bei Anwesenheit von β -Lactamase im Zytoplasma der Zelle wird der Farbstoff gespalten und fluoresziert dann im blauen Bereich, ungespalten dagegen im grünen Bereich. Es wurde herausgefunden, dass *in vivo* nach einer *Yersinia pestis* Infektion bei einer Maus besonders Zellen in der Milz, welche die Oberflächenantigene CD11b, Gr1 oder CD11c tragen, von der Translokation der β -Lactamase betroffen sind (90). Ein ähnliches Reportersystem sollte nun für *Yersinia enterocolitica* entwickelt werden.

3.1.1 Klonierung des Reporterplasmids

Als Reporterplasmid wurde ein Plasmid benötigt, welches für eine translationale Fusion von β -Lactamase mit einem Effektor-Yop kodiert. Aufgrund von Vorversuchen, die in der Arbeitsgruppe (Sandra Kovacevic, unveröffentlicht; Martin Köberle, Diplomarbeit) durchgeführt wurden, fiel die Wahl auf ein N-terminales, 53 Aminosäuren langes YopE Fragment (YopE53).

Ein YopE- β -Lactamase Fusionsprotein wurde als Reporter gewählt, weil YopE sehr stark sekretiert und transloziert wird. Um ein möglichst kleines Fusionsprotein verwenden zu können, wurde nur ein N-terminales Fragment der ersten 53 Aminosäuren verwendet. Die ersten 15 Aminosäuren von YopE sind für die Sekretion notwendig, aber nicht ausreichend für Yop Injektion (52), während ein YopE Fragment mit den ersten 53 Aminosäuren für Sekretion und Translokation als optimal beschrieben wurde (52)

Dieses Fragment ist ausreichend für die Erkennung des Fusionsproteins als Substrat des Typ III Sekretionssystems. Für die Sekretion von YopE wird außerdem noch SycE, ein YopE spezifisches Chaperon benötigt.

Zur Herstellung des Reporterplasmids konnte ein in der Arbeitsgruppe vorhandenes pACYC184 Derivat (38) verwendet werden, das als Insert ein *HindIII* / *SalI* Fragment der für SycE und YopE53-GFP kodierenden Sequenzen sowie die Promotorregion von *sycE* und *yopE* enthält (pBME53-G1). Dieses war aus dem Plasmid pCJE138-G1 (72) hergestellt worden, das ein *sycE* und *yopE138-gfp* Insert enthält. Dazu wurde ein 793bp großes *sycE* - *yopE53* PCR Produkt (Primer siehe 2.1.17 Tab. 5) in CR-Blunt II gebracht und als *HindIII* / *BamHI* Fragment dazu verwendet, um das *HindIII* *sycE* - *yopE138* *BamHI* Fragment in pCJE138-G1 zu ersetzen.

Das β -Lactamase-Gen (*bla*) wurde von pCR2.1 amplifiziert und ebenso in pCR-Blunt II gebracht. Die β -Lactamase kodierende Sequenz wurde als *BamHI* und *SalI* Fragment verwendet, um das *BamHI-gfp-SalI* in pBME53-G1 zu ersetzen, so dass eine translationale YopE53- β -Lactamase Fusion erhalten wurde (pBME53-*bla*). Parallel wurden das *bla*-Gen in den Vektor pCDNA3 eingefügt, um die Expression in eukaryontischen Zellen zu ermöglichen und so eine Positivkontrolle zu schaffen (pCDNA3-*bla*).

Um die Funktionalität des β -Lactamase-Gens zu überprüfen, wurden HeLa Zellen transient für 24 Stunden mit pCDNA3-*bla* transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit CCF4-AM gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Eine Farbstofffluoreszenz in dem blauen Bereich konnte dargestellt werden (Abb. 4). Damit konnte gezeigt werden, dass das verwendete β -Lactamase Konstrukt funktionell ist.

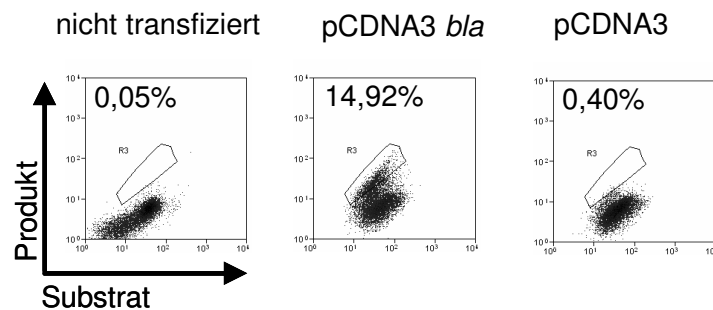


Abb. 4: Transfektion von HeLa Zellen: HeLa Zellen wurden mit pCDNA3 *bla* und pCDNA3 (Leervektor) transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt und die CCF4 Fluoreszenzen im Durchflusszytometer gemessen.

Um einen Stamm zu entwickeln, der auch *in vivo* das Reporterplasmid stabil behält und das Reporterprotein exprimiert, wurde durch Jaime Mota (Kooperationspartner am Biozentrum in Basel) ein metabolisch stabilisiertes System geschaffen. Dazu wurde das *asd*-Gen auf dem Chromosom des *Y. enterocolitica* Stamms ausgeschaltet, der das Reporterplasmid erhalten sollte. Das *asd*-Gen kodiert die L-Aspartat-Dehydrogenase. Dieses Enzym ist für die Synthese der Zellwandkomponente L-Lysin essenziell. Es ist erforderlich für das Wachstum von Bakterien.

Zudem wurde das *asd*-Gen in pIV2-SycE-YopE53-Cre (Martin Köberle, Diplomarbeit), ein Derivat des Vektors pIV2 gebracht. Der Vektor pIV2 ist das Derivat eines kryptischen Plasmids eines apathogenen *Yersinia enterocolitica* Stamms und ist daher schon per se sehr stabil in *Yersinia enterocolitica* und weist gute Expressionseigenschaften auf (134). Das so erhaltene Plasmid wurde pMK4 genannt. Es ist essentiell für einen *asd*-negativen Wirtstamm und daher auch ohne Selektionsdruck stabil.

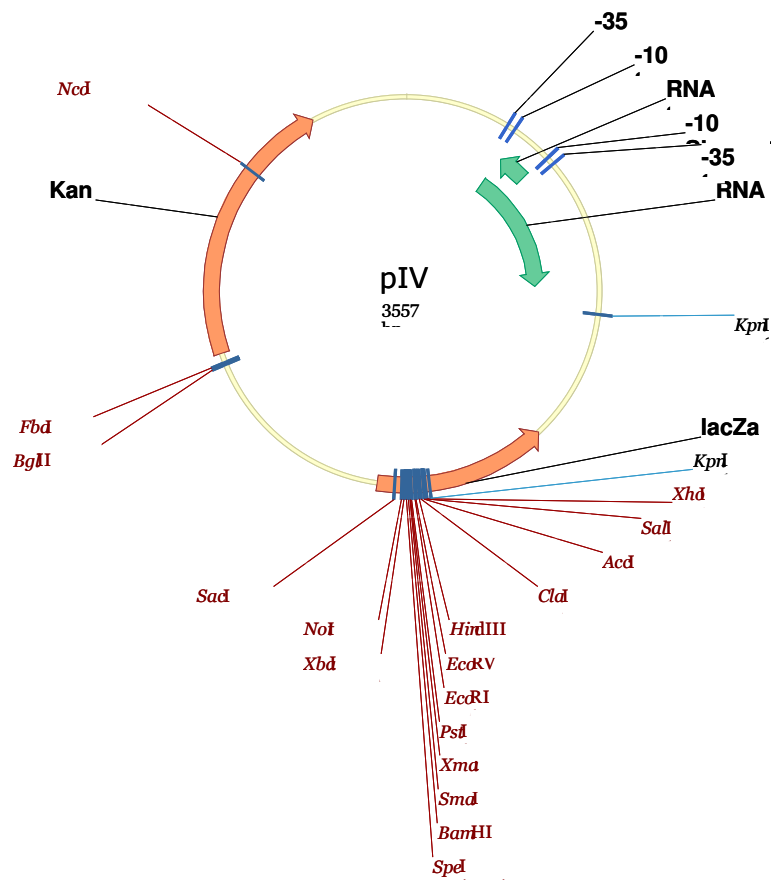


Abb. 5: Vektor pIV2 (134): Von einem apathogenen *Yersinia enterocolitica* Stamm. Mit einer „multiple-cloning site“ und einer Kanamycin Resistenzkassette.

Das *sycE yopE53 bla* Fragment wurde über die Schnittstellen *HindIII* und *SalI* aus dem pBME53-*bla* ausgeschnitten und in die „multiple-cloning site“ des Plasmids pMK4 gebracht (pMK-*bla*).

Für das Kontrollplasmid wurde aus dem pYopE53Ova₂₄₇₋₃₅₅ (148) ein *ova247-355 BamHI / SalI* Fragment gewonnen, durch welches das β -Lactamase *BamHI / SalI* Fragment in pBME53-*bla* ersetzt wurde, um so das Plasmid pBME53-*ova* zu erhalten. Aus diesem konnte dann *HindIII / SalI* ein *sycE yopE53 ova247-355* Fragment ausgeschnitten und anstelle des *sycE yopE53 bla* Inserts in den pMK-*bla* Vektor gebracht werden (pMK-*ova*).

Das pMK-*bla* und das pMK-*ova* wurden in die *Yersinia enterocolitica* Stämme E40 Δ *asd* und WA-314 gebracht, so dass wir die Reporterstämme E40/WA-314-pBla und die Kontrollstämme E40/WA-314-pOva erhalten hatten.

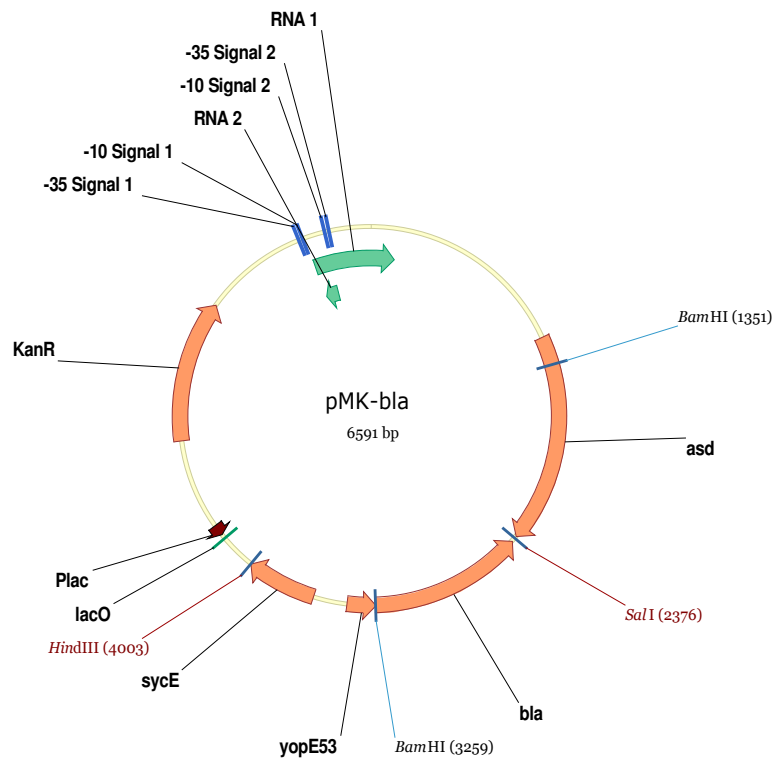


Abb. 6: Das fertige Plasmid pMK-bla. Das fertige Plasmid pMK-bla kodiert für das Chaperon SycE und das Fusionsprotein bestehend aus YopE53- und β -Lactamase Domäne. Der Kontrollvektor kodiert anstelle der β -Lactamase ein Ovalbuminfragment. Darüber hinaus enthalten die Plasmide das *asd* Gen und eine Kanamycinresistenz.

3.1.2 Sekretion von YopE53- β -Lactamase und YopE

Die Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica* sind plasmid- und chromosomal kodiert. Die Expression der plasmidkodierten Komponenten des Typ III Sekretionssystem und dessen Substrate (den Yops) sind temperaturabhängig und erfolgt nur bei 37 °C. Die Sekretion der Yops kann *in vitro* durch Calcium Depletion ausgelöst werden (60, 105).

Um zu überprüfen, ob die zusätzlichen Typ III Substrate pMK-bla und pMK-ova in *Yersinia enterocolitica* exprimiert und sekretiert werden, wurden die Bakterien zur Sekretion (2.2.5.1) angeregt.

Die sekretierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Abb. 7). Anschließend wurde die Membran mit Antikörpern gegen YopE und β -Lactamase inkubiert und die Proteine mit ECL detektiert (2.2.5.2-2.2.5.7).

Wie in Abbildung 7 zu sehen, konnte mit Hilfe von YopE und β -Lactamase spezifischen Antikörpern durch Westernblot-Analysen die Sekretion von YopE-53bla (37 kDa), YopE (25 kDa) und YopE53-Ova (16,6 kDa) detektiert werden. Die Plasmide pMK-bla und pMK-ova sind funktionell und ermöglichen die Expression und Sekretion der Fusionen von YopE53 mit β -Lactamase und Ovalbumin.

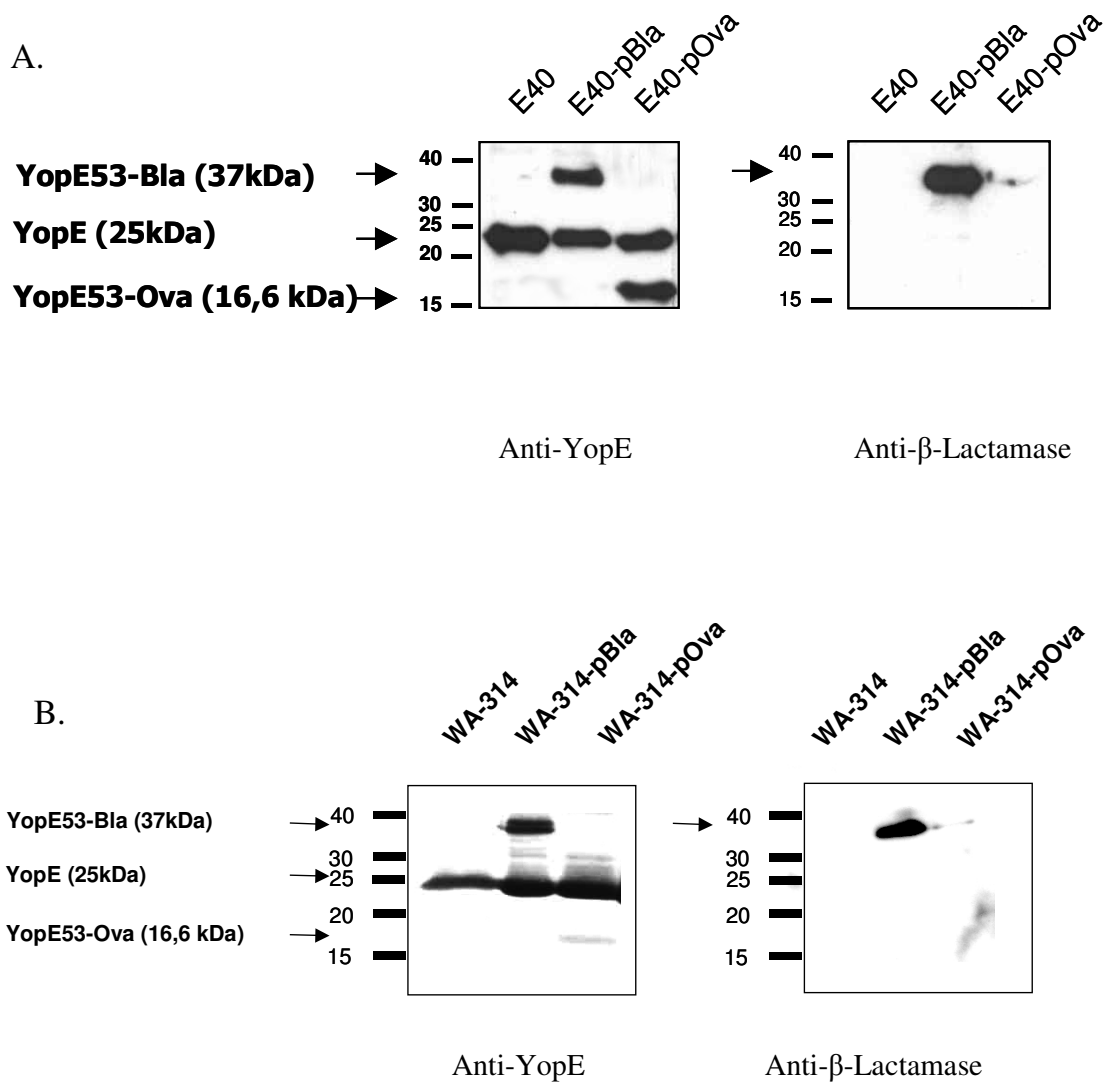


Abb. 7: Sekretion von WA-314 und E40 -pBla, -pOva und dem Wildtyp in den Überstand. Mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit Antiseren gegen YopE und β -Lactamase wurde die Sekretion von *Yersinia enterocolitica* in den Überstand untersucht.

Die Pfeile markieren die unterschiedlichen Proteine: 37 kDa Fusionsprotein YopE53-bla, 25 kDa YopE und bei 16,6 kDa das Fusionsprotein YopE53Ova.

Abbildung A zeigt die Sekretion von E40-pBla und -pOva und dem Wildtyp E40 in den Überstand.

Abbildung B zeigt die Sekretion von WA-314 -pBla und -pOva und dem Wildtyp WA-314 in den Überstand.

3.1.3 Überprüfung der Spezifität des Reportersystems

Am proximalen Ende des Basalkörpers des Sekretionsapparates befindet sich eine Proteinpumpe, an deren Antrieb maßgeblich eine als YscN bezeichnete ATPase beteiligt ist (30). Schaltet man YscN aus, können keine Effektoren mehr sekretiert werden.

Um zu überprüfen, ob der Stamm *E40ΔasdΔYscN-pBla* (kurz Δ YscN-pBla) keine Effektoren mehr sekretiert, wurden die Bakterien zur Sekretion (2.2.5.1-2.2.5.7) angeregt. Als Kontrolle wurden noch die Stämme E40-pBla und E40-pOva sowie der Wildtypstamm (E40) mitgeführt. Die sekretierten Proteine sowie die Proteine aus dem Bakterienpellet wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 8). Anschließend wurde die Membran mit Antikörpern gegen YopE inkubiert und die Proteine mit ECL detektiert.

Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, konnte gezeigt werden, dass der Stamm Δ YscN-pBla keine YopE und kein YopE53-Bla Fusionsproteine in den Überstand sekretiert. YopE53-bla (37 kDa) sowie YopE (25 kDa) konnten aber im Pellet detektiert werden.

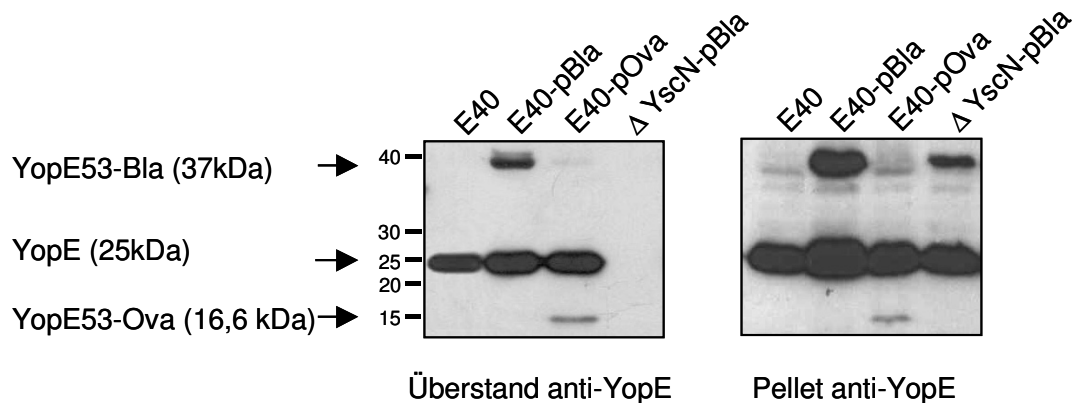


Abb. 8: Sekretion von E40-pBla/E40-pOva und YopE von *Yersinia enterocolitica* E40 in den Überstand. Mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit Antiseren gegen YopE wurde die Sekretion von *Yersinia enterocolitica* E40-pBla, E40-pOva und Δ YscN-pBla in den Überstand und im Pellet untersucht. Die Pfeile markieren die unterschiedlichen Proteine: 37 kDa Fusionsprotein YopE53-bla, 25 kDa YopE und bei 16,6 kDa das Fusionsprotein YopE53Ova.

3.1.4 Nachweis der Yop Translokation in HeLa Zellen

Um zu untersuchen, ob nach Infektion von HeLa Zellen β -Lactamase-Aktivität in den Zellen nachweisbar ist, wurden diese mit den Stämmen E40-pBla, E40-pOva und Δ YscN-pBla mit einer MOI von 100 beziehungsweise mit den Stämmen WA-314-pBla, Wa314-pOva mit einer MOI von 200 eine Stunde infiziert (2.2.2.7). Anschließend wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht und photographiert.

Bei einer Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz sieht man bei den Zellen, die mit dem Reporterstamm -pBla infiziert waren, eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenz in den blauen Bereich. Der Stamm -pBla ist also in der Lage bei der Infektion von HeLa Zellen den Farbstoff CCF4-AM, mit dem die HeLa-Zellen gefärbt wurden, zu spalten.

Die Bakterienmutante Δ YscN-pBla kann keine Yops sekretieren und mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskopes ist lediglich eine Fluoreszenz im grünen Bereich nachweisbar. Sowohl nach Infektion mit dem Stamm E40-pBla als auch mit dem Stamm WA-314-pBla konnten blaue Zellen, also Yop-Injektion in Zellen nachgewiesen werden.

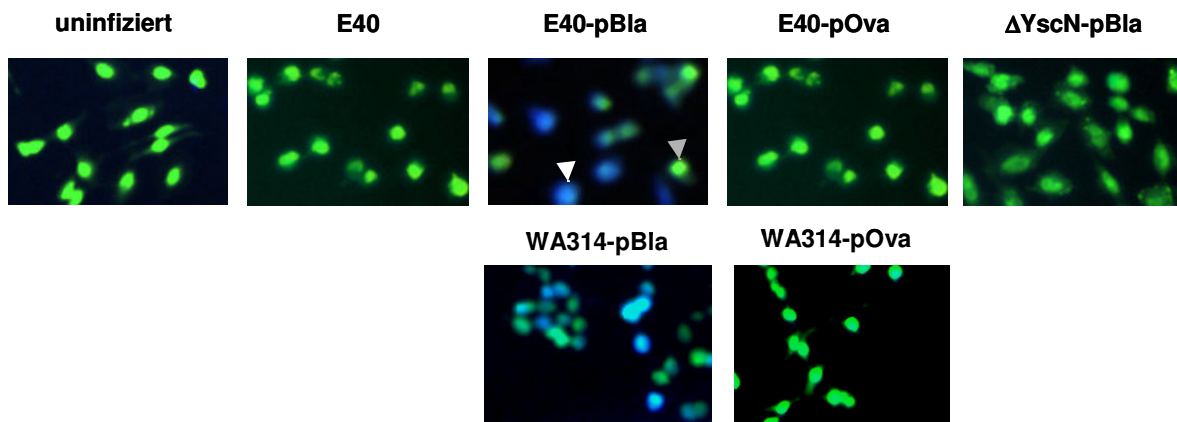


Abb. 9: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von β -Lactamase-Aktivität in *Yersinia* infizierten HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden mit den Bakterienstämmen E40-pBla, E40-pOva und Δ YscN-pBla und einer MOI 100 beziehungsweise bei den Stämmen WA-314-pBla und WA-314-pOva mit einer MOI 200 infiziert für eine Stunde. Die Zellen wurden anschließend mit CCF4-AM gefärbt. Es folgten Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop. In den gezeigten Bildern wurden die Aufnahmen der grünen und blauen Fluoreszenz kombiniert.

3.1.5.1 Infektion von HeLa Zellen mit E40 Reporterstämmen

Zur Quantifizierung der Anzahl an Zellen, die nach Infektion mit den Yersinien als „blau“ identifiziert werden können, wurden HeLa Zellen mit einer MOI von 50 mit den *Yersinia enterocolitica* Stämmen E40-pBla und E40-pOva für eine Stunde infiziert (2.2.2.7). Es wurden die lebenden Zellen mittels Propidiumjodid-Färbung ermittelt. In weiteren Untersuchungen wurden nur die lebenden Zellen analysiert.

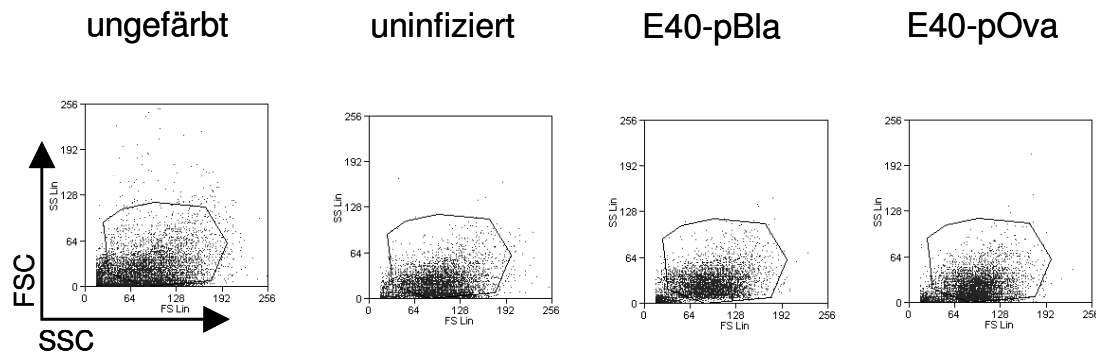


Abb. 10: Darstellung von infizierter HeLa-Zellen in einer Punktwolkendarstellung. Es wurden HeLa Zellen mit E40-pBla und E40-pOva mit einer MOI von 50 eine Stunde infiziert. Danach wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt. Dargestellt ist FSC (Vorwärtslichtstreuung) gegen SSC (Seitwärtslichtstreuung).

HeLa Zellen wurden eine Stunde mit MOI 50 infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt und am Durchflusszytometer vermessen.

Zunächst wurde die Fluoreszenz des ungespaltenen, grün fluoreszierenden Farbstoffes von allen lebenden Zellen in einem Histogramm (Substrat) dargestellt. Mit Hilfe der ungefärbten Zellen als Referenz wurde bestimmt, welche Zellen den Farbstoff aufgenommen hatten und welche nicht (Abb. 11). Für die Analyse der β -Lactamase-Aktivität („blauen Zellen“) wurden nur die Zellen verwendet, die tatsächlich grünen Farbstoff aufgenommen hatten.

Nach Infektion mit E40-pBla sieht man sowohl in der Histogramm- als auch in der „Dotplot“ (Punktwolke-) Darstellung eine deutliche Erhöhung der Intensität der blauen Fluoreszenz. Mehr als 50% der Zellen sind blau gefärbt. Nach Infektion mit E40-pOva ist der Anteil an blauen Zellen (1,5%) vergleichbar mit dem von uninfizierten Zellen (1,4%). Daraus kann geschlossen werden, dass die nach Infektion mit E40-pBla detektierte Blaufärbung spezifisch auf die β -Lactamase-Aktivität zurück zu führen ist. Der Anteil an unspezifischer Färbung ist

gering. Nach Infektion mit dem Stamm $\Delta YscN$ -pBla wurden bis zu 1,2% blaue Zellen detektiert. Da es sich um einen Stamm handelt, bei dem Yops nicht mehr sekretiert werden können, zeigt dieses Ergebnis, dass die Sekretion von Yops die Voraussetzung für den spezifischen Nachweis von β -Lactamase-Aktivität ist.

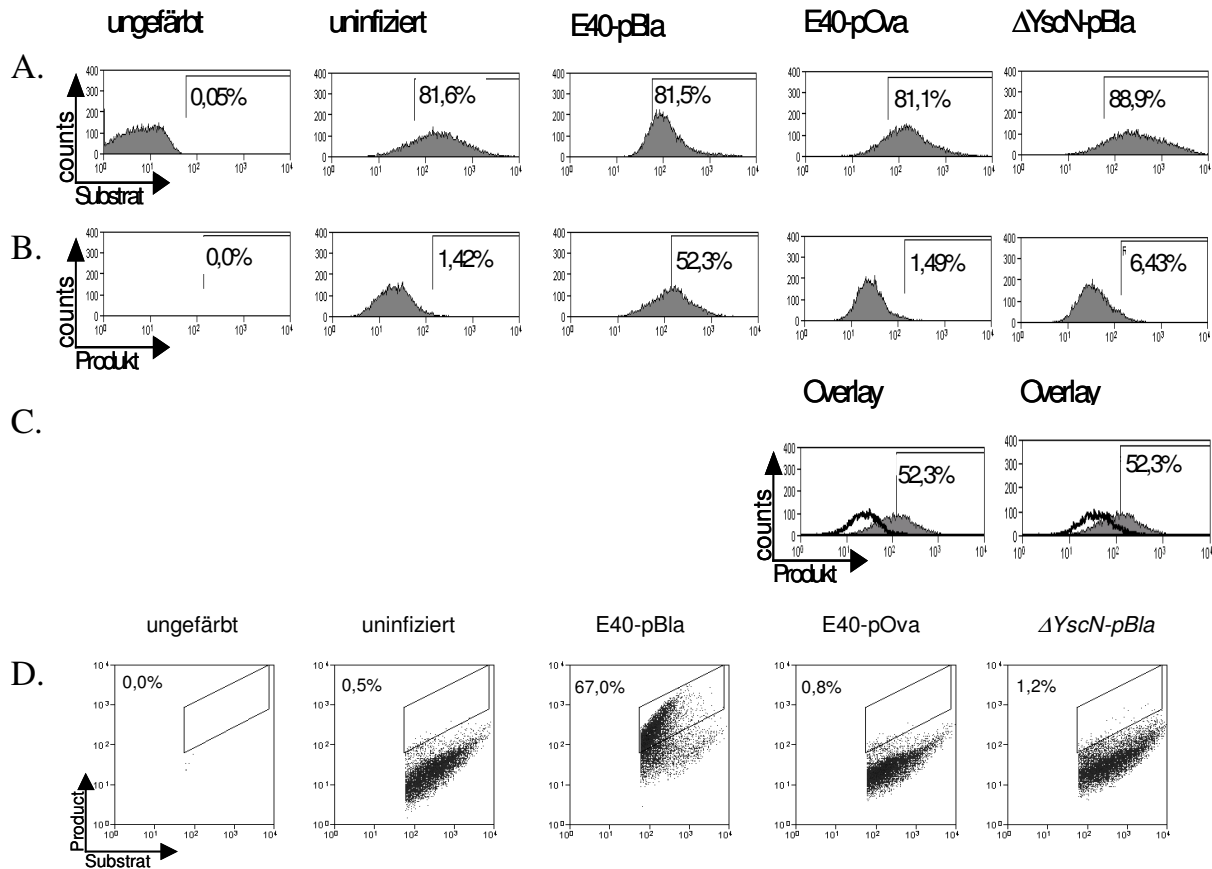


Abb. 11: Durchflusszytometrischer Nachweis von β -Lactamase Aktivität nach Infektion von HeLa Zellen mit *Yersinia enterocolitica*. HeLa Zellen wurden mit den Bakterienstämmen E40-pBla, E40-pOva und $\Delta YscN$ -pBla mit Moi 50 eine Stunde infiziert.

Danach wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt. Abb. A: Darstellung der grünen Fluoreszenz nach CCF4-AM Färbung. Für die Detektion der blauen Fluoreszenz in Abb. B, Abb. C und Abb. D wurden nur die stark grün gefärbten Zellen, wie oben indiziert, analysiert. Abb. B: Darstellung der blauen Fluoreszenz der Zellen als Histogramm. Abb. C: „Overlay“ der blauen Fluoreszenzintensitäten von E40-pBla (grau gefüllt) und E40-pOva bzw. $\Delta YscN$ -pBla (dunkle Linie) Abb. D: Darstellung der blauen Fluoreszenzintensitäten in der Punktwolkendarstellung Die Prozentzahlen zeigen an wie viele Zellen sich in der Auswahl befinden.

3.1.5.2 Infektion von HeLa Zellen mit WA-314 Reporterstämmen

Um zu untersuchen, ob der Nachweis von Yop Injektion in Wirtszellen ebenfalls nach Infektion mit dem Stamm WA-314-pBla möglich ist, wurden HeLa Zellen für eine Stunde mit den Stämmen WA-314-pBla und WA-314-pOva infiziert und mittels Durchflusszytometrie die Anzahl blauer Zellen bestimmt. Wie in Abb. 12 dargestellt, konnten $2.8\% \pm 2.6\%$ ($n = 4$ Experimente) blaue Zellen nachgewiesen werden. Hier zeigte sich, dass Yop Injektion mit diesem Stamm sich im Vergleich zur Infektion mit E40 Reporterstämmen wesentlich schlechter in HeLa Zellen nachweisen lässt.

Für die statistischen Analysen wurden die Werte aus der Punktwolkendarstellung verwendet.

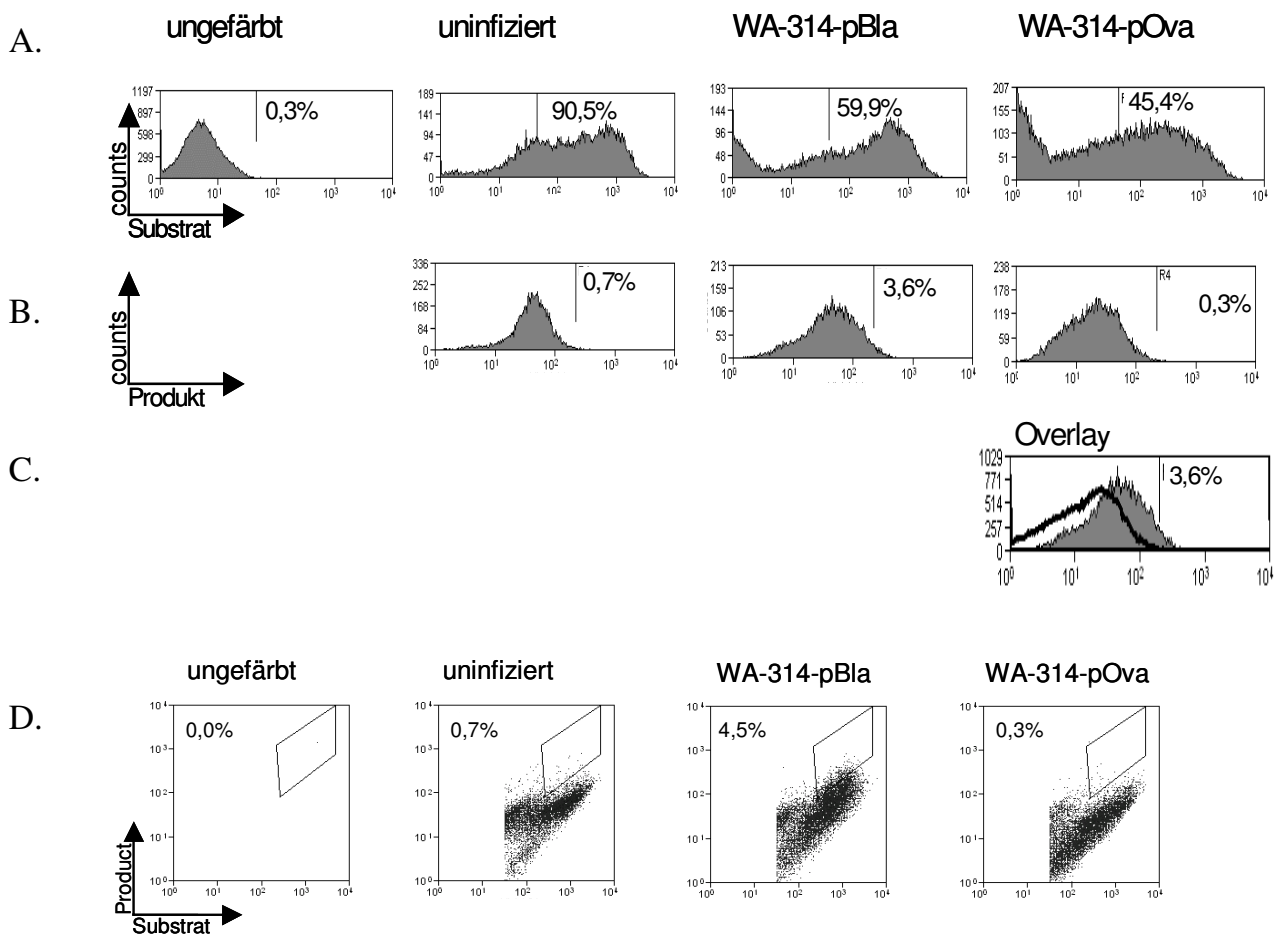


Abb. 12: Durchflusszytometrischer Nachweis von β -Lactamase Aktivität nach Infektion von HeLa Zellen mit *Yersinia enterocolitica*. HeLa Zellen wurden mit den Bakterienstämmen WA-314-pBla und WA-314-pOva mit einer Moi 50 eine Stunde infiziert.

Danach wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt. Abb. A: Darstellung der grünen Fluoreszenz nach CCF4-AM Färbung. Für die Detektion der blauen Fluoreszenz in Abb. B, Abb. C und Abb. D wurden nur die stark grün gefärbten Zellen wie oben indiziert, analysiert. Abb. B: Darstellung der blauen Fluoreszenz der Zellen als Histogramm. Abb. C: „Overlay“ der blauen

Fluoreszenzintensitäten von WA-314-pBla (grau gefüllt) und WA-314-pOva (dunkle Linie) Abb. D: Darstellung der blauen Fluoreszenzintensitäten in der Punktwolkendarstellung. Die Prozentzahlen zeigen an wie viele Zellen sich in der Auswahl befinden.

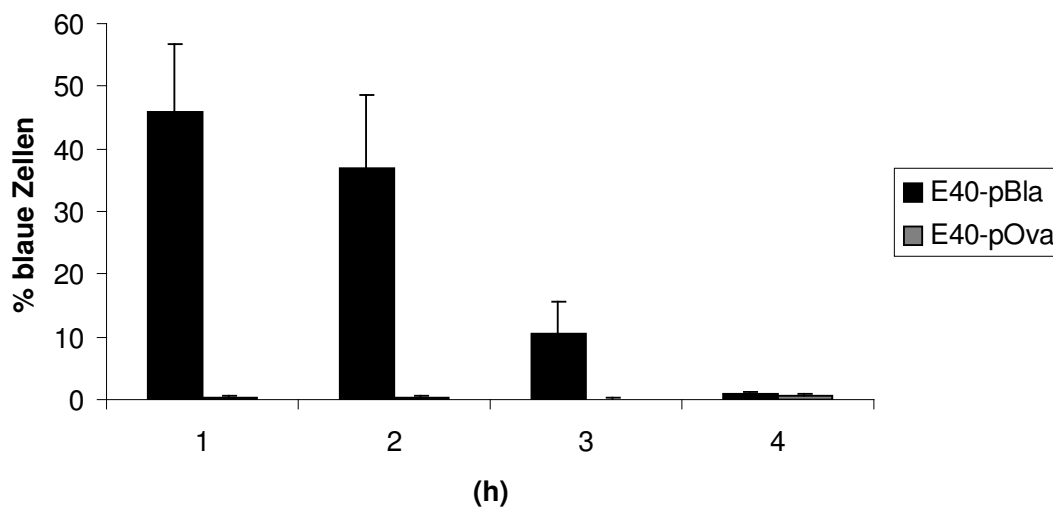
3.1.5.3 Nachweis der Yop Injektion in HeLa Zellen im zeitlichen Verlauf

In diesen Experimenten sollte untersucht werden zu welchen Zeitpunkten optimalerweise Yop Injektion nachweisbar ist. Hierfür wurden HeLa Zellen eine, zwei, drei und vier Stunden mit E40 bzw. WA-314-pBla oder E40 bzw. WA-314-pOva (MOI 50) infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Eine Stunde nach Infektion mit E40-pBla bzw. WA-314-pBla konnte β -Lactamase-Aktivität in $40\% \pm$ Standardabweichung bzw. $2\% \pm$ Standardabweichung aller Zellen nachgewiesen werden. Die Anzahl β -Lactamase positiver Zellen nahm zu späteren Zeitpunkten kontinuierlich ab. Eine Detektion von β -Lactamase ist in HeLa Zellen daher nur in einem Zeitfenster bis 3 Stunden nach Infektion möglich.

A.

E40



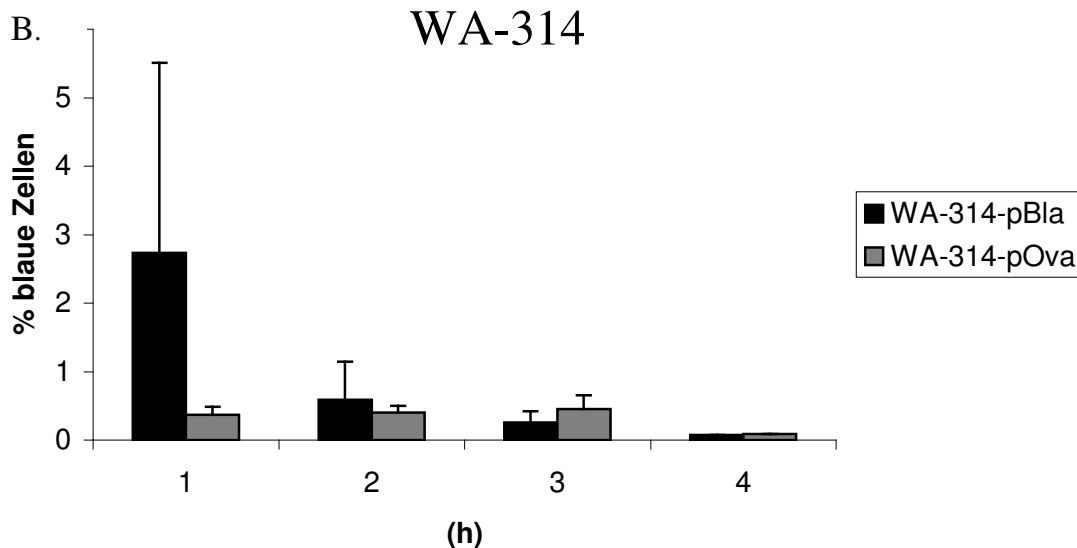
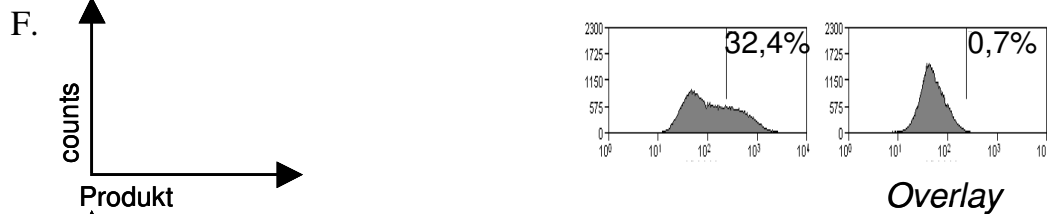
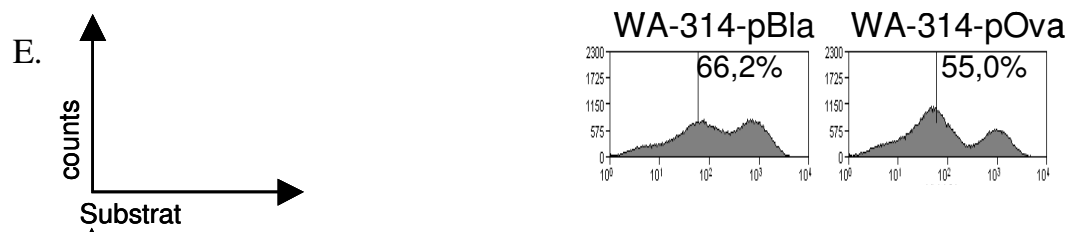
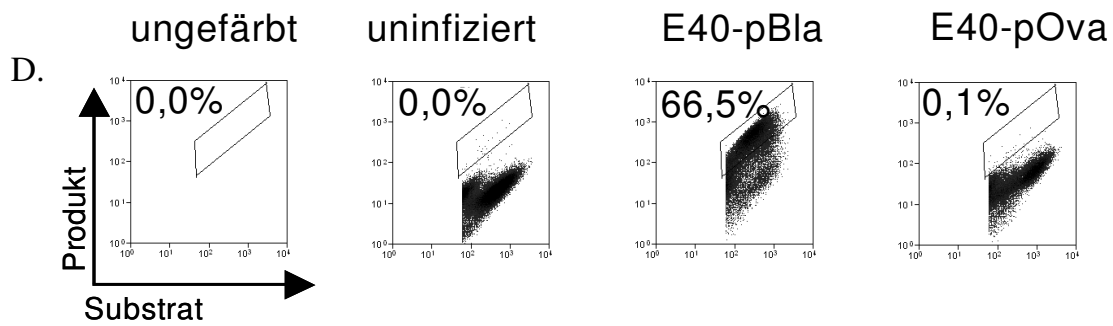
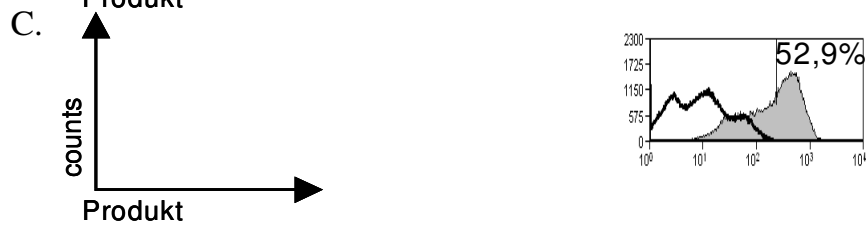
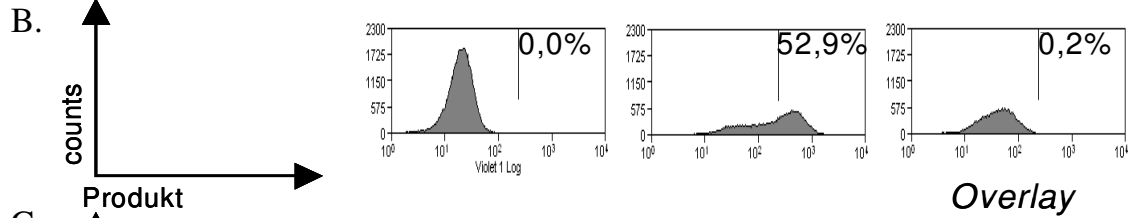
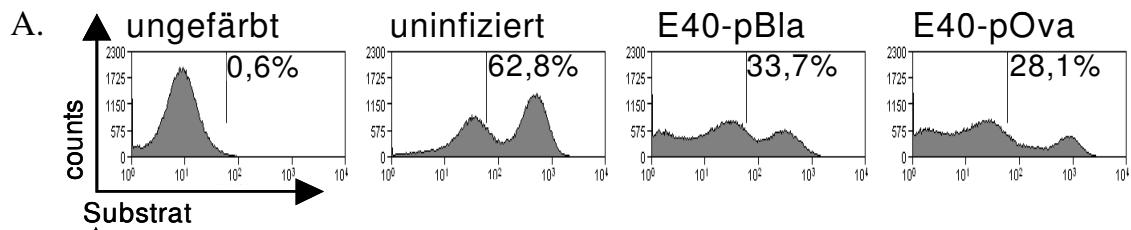


Abb. 13: Detektion von Yop-Injektion nach Infektion von HeLa Zellen im zeitlichen Verlauf. HeLa Zellen wurden eine bis vier Stunden mit Abb. A E40-pBla oder E40-pOva bzw. Abb. B WA-314-pBla oder WA-314-pOVA infiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils an blauen Zellen \pm Standardabweichungen aus Abbildung 11D bzw. 12D. Die Mittelwerte stammen aus vier (Abb. A) bzw. drei (Abb. B) unabhängigen Experimenten. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede ($P < 0,05$).

3.2. Untersuchung der Yop Injektion in primären Zellen

3.2.1 Nachweis der Yop Injektion in Knochenmarksmakrophagen

Um zu untersuchen, ob Yop Injektion in Wirtszellen auch in primären Zellen nachweisbar ist, wurden Knochenmarksmakrophagen mit E40 bzw. WA-314-pBla oder -pOva eine Stunde infiziert und anschließend die Anzahl blauer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Ähnlich wie bei HeLa Zellen waren nach Infektion mit E40-pBla mehr Zellen blau ($>60\% \pm$ Standardabweichung 11%) als nach Infektion mit WA-314 ($30\% \pm$ Standardabweichung $2,8\%$).



WA-314-pBla WA-314-pOva

H.

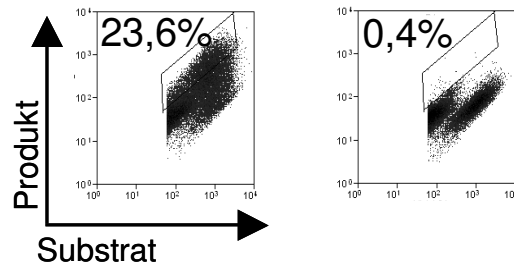


Abb. 14: Darstellung der infizierten Knochenmarksmakrophagen im Histogramm und in der Punktwolkendarstellung. Es wurden Knochenmarksmakrophagen mit *Yersinia enterocolitica*, Abbildung A-D, mit E40-pBla und E40-pOva und Abbildung E-H, mit WA-314-pBla und WA314-pOva mit MOI 50 für eine Stunde infiziert. Abb. A und Abb. E: Darstellung der grünen Fluoreszenz nach CCF4-AM Färbung. Für die Detektion der blauen Fluoreszenz in Abb. B, C und D bzw. F, G und H wurden nur die stark grün gefärbten Zellen wie oben indiziert analysiert. Abb. B. und F: Darstellung der blauen Fluoreszenz der Zellen als Histogramm. Abb. C: „Overlay“ der blauen Fluoreszenzintensitäten von E40-pBla (grau gefüllt) und E40-pOva bzw. Δ yscN-pBla (ohne Füllung) Abb. G: Overlay“ der blauen Fluoreszenzintensitäten von WA-314-pBla (grau gefüllt) und WA-314-pOva (ohne Füllung) Abb. D und H: Darstellung der blauen Fluoreszenzintensitäten in der Punktwolkendarstellung Die Prozentzahlen zeigen an wie viele Zellen sich in der Auswahl befinden.

Es konnte gezeigt werden (Abb.13), dass β -Lactamase-Aktivität bis zu drei Stunden in HeLa Zellen nachweisbar ist, und es sollte nun die β -Lactamase-Aktivität in Knochenmarksmakrophagen im zeitlichen Verlauf nach Infektion untersucht werden.

Knochenmarksmakrophagen wurden eine bis vier Stunden mit WA-314 bzw. E40-pBla und E40-pOva MOI 50 infiziert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch vermessen.

Eine Stunde nach Infektion wurden beim Stamm E40-pBla ungefähr 50% blaue (positive) Zellen detektiert. Die β -Lactamase-Aktivität nimmt mit dem Zeitverlauf kontinuierlich ab. Vier Stunden nach Infektion ist keine β -Lactamase-Aktivität mehr nachweisbar.

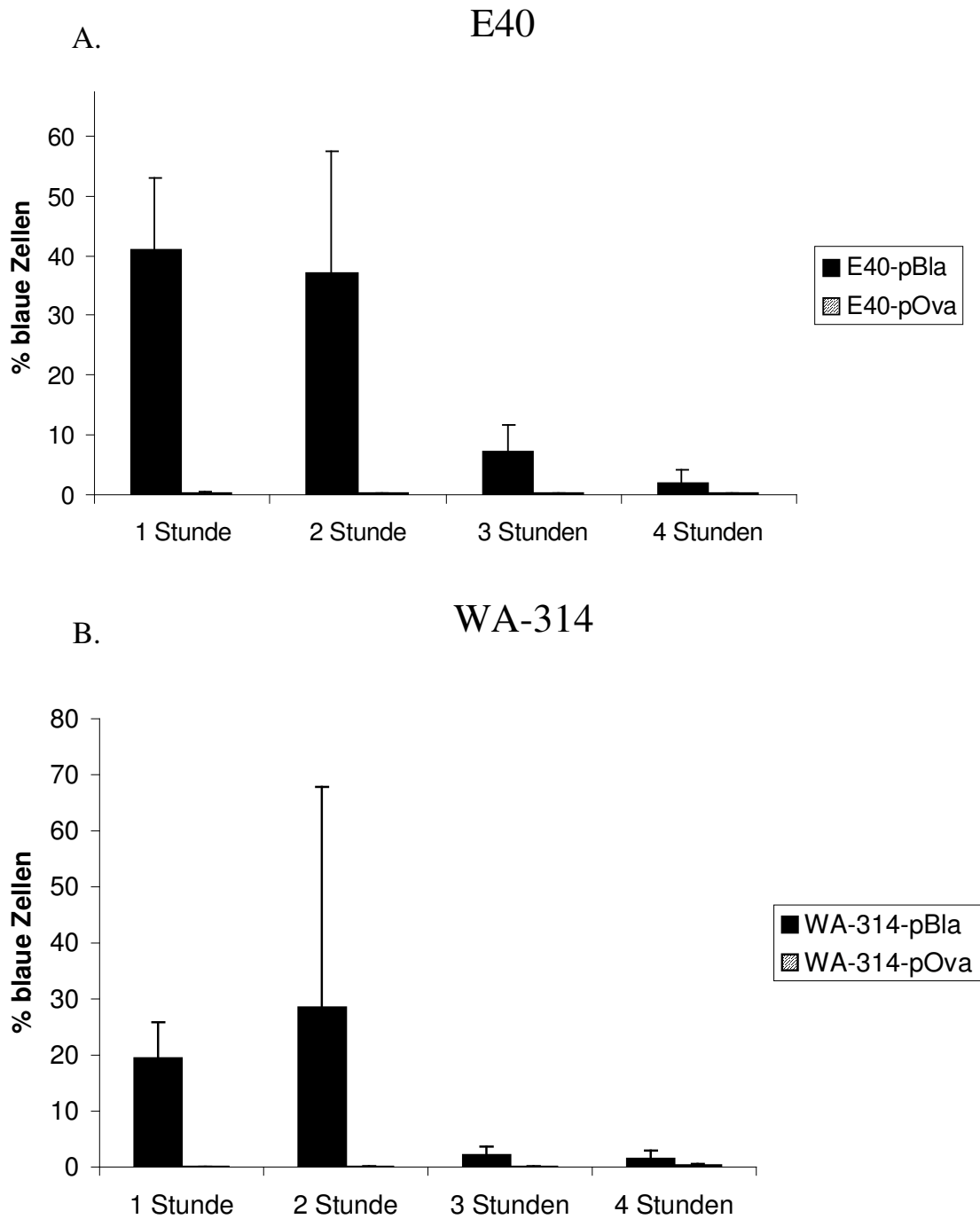


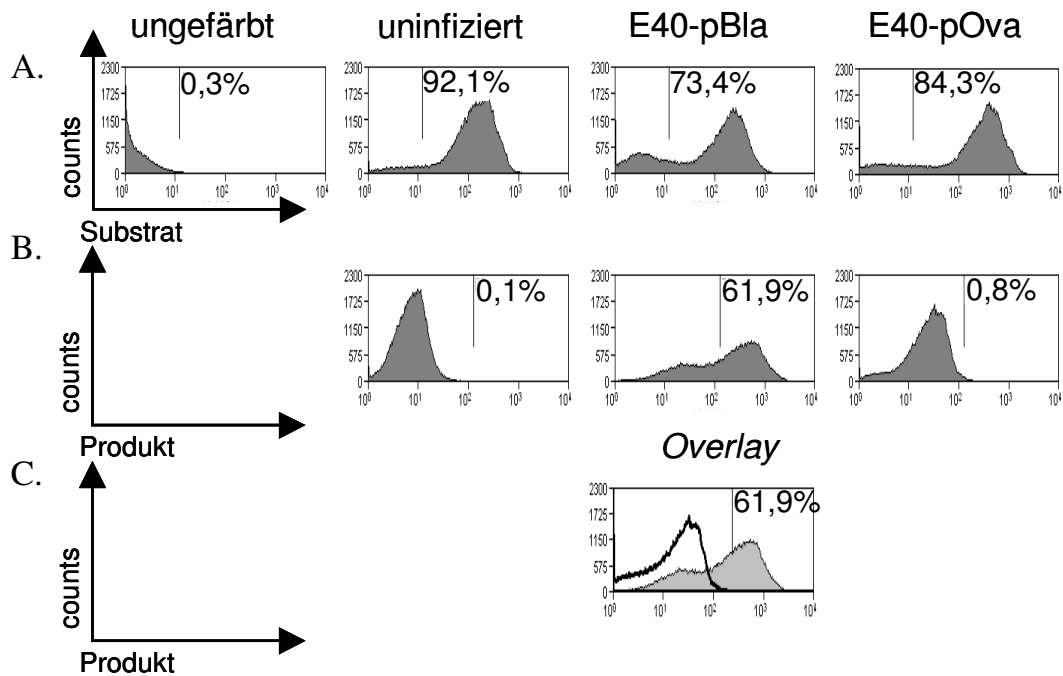
Abb. 15: Nachweis der β -Lactamase-Aktivität nach Yersinieninfektion von Knochenmarksmakrophagen im zeitlichen Verlauf

Es wurden Knochenmarksmakrophagen mit Abb. A E40-pBla und E40-pOva und Abb. B WA-314-pBla und WA-314-pOva für eine bis vier Stunden mit MOI 50 infiziert. In dem Säulendiagramm dargestellt sind die Prozentzahlen aus Abb. A drei bzw. Abb. B zwei Experimenten \pm Standardabweichung.

3.2.2 Nachweis der Yop Injektion in Milzzellen

Milzzellen wurden mit E40-pBla, E40-pOva oder Δ YscN-pBla für eine Stunde infiziert und nach CCF4-AM Färbung wurden blaue Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

In ähnlicher Weise wie HeLa Zellen konnte nur mit E40-pBla eine spezifische Blaufärbung der Milzzellen nachgewiesen werden (75%). Uninfizierte Zellen und Milzzellen infiziert mit E40-pOva oder Δ YscN-pBla zeigten eine geringe unspezifische Färbung (0,05% \pm Standardabweichung). Dies bedeutet, dass für den Nachweis der β -Lactamase-Aktivität in Milzzellen Yops sekretiert werden müssen. In den Bakterien exprimierte β -Lactamase kann nicht detektiert werden.



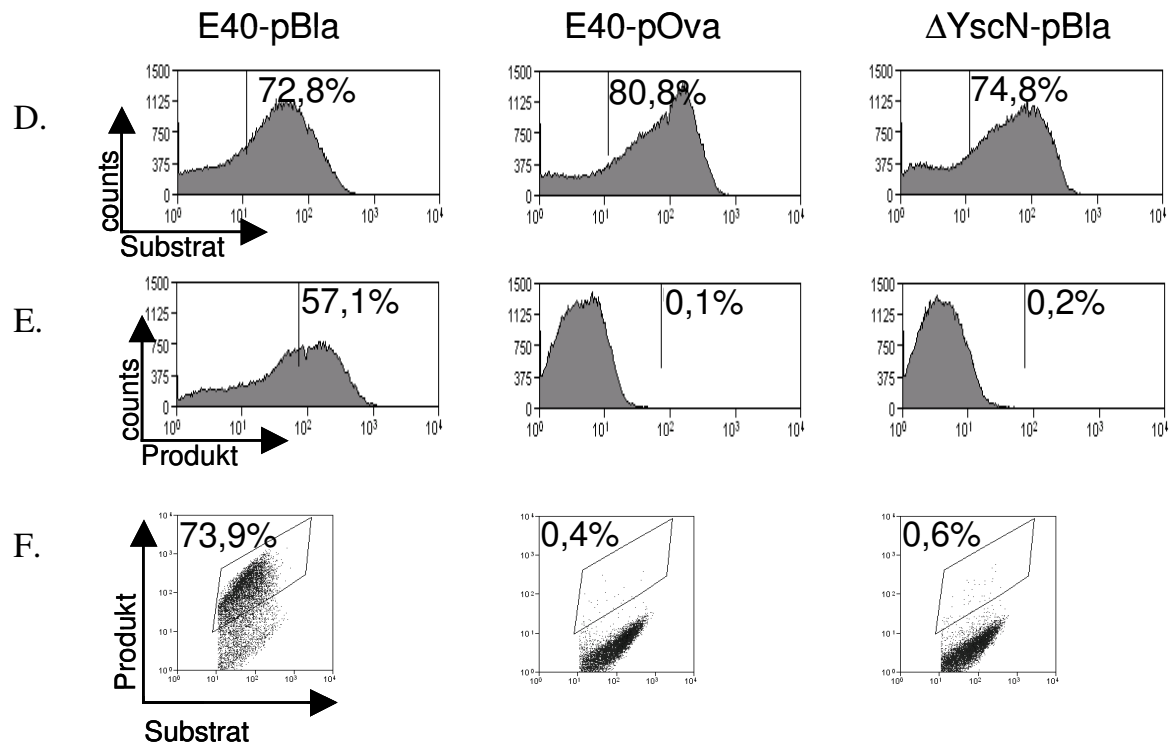


Abb. 16: Darstellung der infizierten Milzzellen im Histogramm und in der Punktwolkendarstellung. Es wurden Milzzellen mit *Yersinia enterocolitica* Abbildung A.-C. mit E40-pBla und E40-pOva und Abbildung D.-F. zusätzlich noch mit Δ YscN-pBla (MOI 50) für eine Stunde infiziert. Abb. A und D: Darstellung der grünen Fluoreszenz im Histogramm nach CCF4-AM Färbung. Für die Detektion der blauen Fluoreszenz in Abb. B, und C bzw. E und F wurden nur die stark grün gefärbten Zellen analysiert. Abb. B und E: Darstellung der blauen Fluoreszenz der Zellen als Histogramm. Abb. C: „Overlay“ der blauen Fluoreszenzintensitäten von E40-pBla (grau gefüllt) und E40-pOva (dunkle Linie) Abb. F Darstellung der grünen und blauen Fluoreszenz in der Punktwolkendarstellung. Die Prozentzahlen zeigen an wie viele Zellen sich in der Auswahl befinden.

Zum Vergleich wurden ebenfalls Milzzellen mit WA-314-pBla für eine Stunde infiziert. In ähnlicher Weise wie bei Knochenmarksmakrophagen und HeLa Zellen waren bei einer MOI von 50 ein wesentlich geringerer Anteil an Milzzellen blau gefärbt. Daraus folgt, dass der Stamm E40 wesentlich besser zum Nachweis von Yop Injektion geeignet ist als der Stamm WA-314.

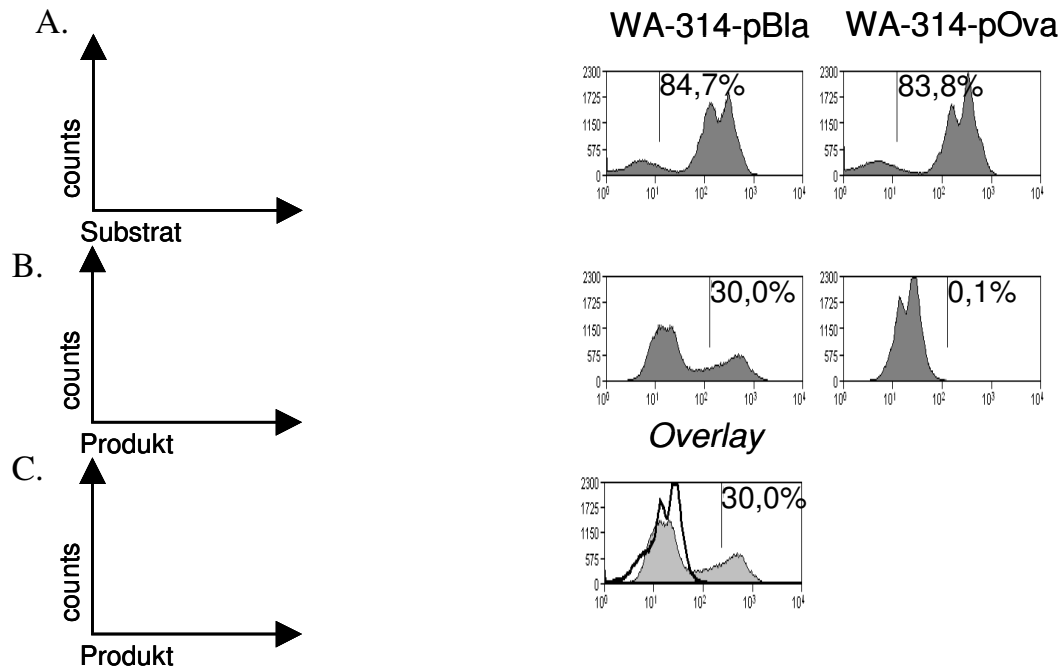


Abb. 17: Darstellung der infizierten Milzzellen im Histogramm und in der Punktwolkendarstellung. Es wurden Milzzellen mit *Yersinia enterocolitica* WA-314-pBla und WA-314-pOva (MOI 50) für eine Stunde infiziert. Abb. A: Darstellung der grünen Fluoreszenz nach CCF4-AM Färbung. Für die Detektion der blauen Fluoreszenz in Abb. B und C wurden nur die stark grün gefärbten Zellen wie oben indiziert analysiert. Abb. B: Darstellung der blauen Fluoreszenz der Zellen als Histogramm. Abb. C: „Overlay“ der blauen Fluoreszenzintensitäten von WA314-pBla (grau gefüllt) und WA314-pOva. Die Prozentzahlen zeigen an wie viele Zellen sich in der Auswahl befinden.

3.2.3 Yop Injektion in Abhängigkeit von der Infektionsdosis

Es konnte gezeigt werden, dass die Translokation von YopE53-Bla in kultivierte Milzzellen bei einer MOI von 50 nachweisbar ist. Es stellte sich die Frage, wie viele Bakterien benötigt werden, um Yop Injektion nachweisen zu können. Um dies genauer zu untersuchen wurden Milzzellen mit den Bakterienstämmen E40-pBla und E40-pOva für eine Stunde mit einer MOI von 5, 10, 25, 50 und 100 infiziert. Die Zellen wurden mit CCF4-AM gefärbt und dann durchflusszytometrisch analysiert. Mit der MOI nahm auch der prozentuale Anteil an blauen Zellen zu (Abb. 18).

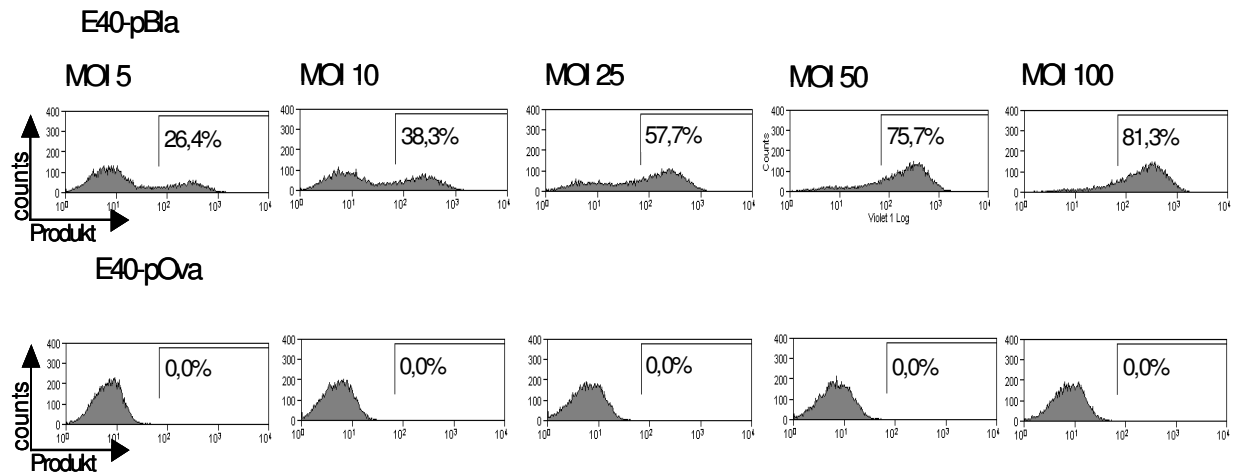


Abb. 18: Nachweis von Yop Injektion in Milzzellen in Abhängigkeit von der Infektionsdosis. Milzzellen wurden mit den Bakterienstämmen E40-pBla und E40-pOva für eine Stunde mit unterschiedlichen Infektionsdosen (MOI) infiziert. Danach wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt. Der Anteil blauer Zellen von allen lebenden gefärbten Zellen wurde im Histogramm dargestellt.

Der prozentuale Anteil an blauen Zellen nimmt dosisabhängig zu (siehe Abb. 19). Die Korrelation zwischen Infektionsdosis (MOI) und dem prozentualen Anteil blauer Zellen nach Infektion mit E40-pBla lässt sich durch eine hyperbolische Regressionskurve ($y = 84 \cdot x / (16.9 \cdot x + 1)$) mit einer Anpassungsgüte von $r^2 = 0.977$ annähern. Mit dieser Regressionskurve lässt sich berechnen, dass man theoretisch mit einer MOI von 16.9 ± 1.9 50% blaue Milzzellen nach E40-pBla Infektion erhält.

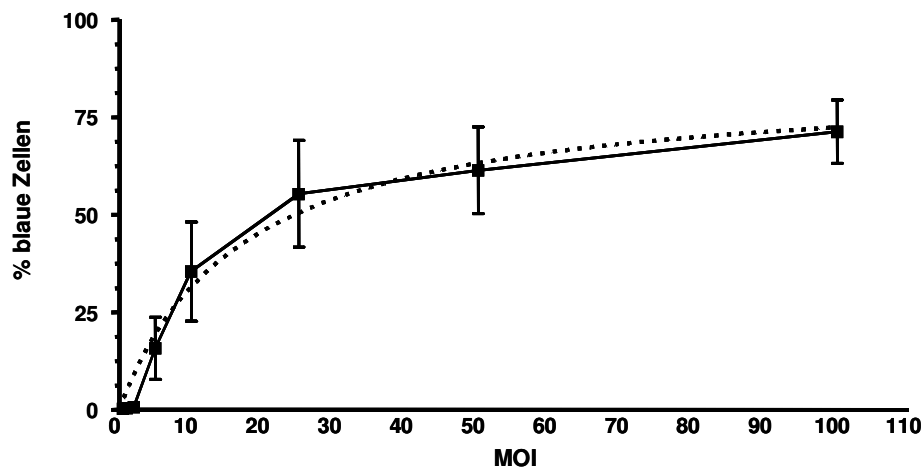


Abb. 19: Nachweis von Yop Injektion in Milzzellen nach Infektion in Abhängigkeit von der Infektionsdosis. Milzzellen wurden mit dem Bakterienstamm *E40-pBla* eine Stunde mit MOI 0,5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 und 100 infiziert. Danach wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichungen des prozentualen Anteils blauer Zellen in Abhängigkeit von der Infektionsdosis (MOI) (n=4). Die gestrichelte Linie zeigt eine hyperbolische Regressionskurve ($y = 84 \cdot x / (16.9 \cdot x)$) mit einer Anpassungsgüte von $r^2 = 0.977$.

3.3 Untersuchung der Subpopulationen in einer Zellkultur infizierten Milzzellsuspension

Zur Vorbereitung von Mausinfektionsversuchen sollte geklärt werden, ob die Yop Injektion durch *Yersinien* in die verschiedenen Zellpopulationen der Milz mit gleicher Effektivität erfolgt. Daher wurden Milzzellen für eine Stunde mit E40-pBla und E40-pOva (MOI 50) infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern spezifisch für Oberflächenmarker, die charakteristisch für bestimmte Zellpopulationen sind, gefärbt (2.2.3.5). Es wurden Antikörper zur Erkennung von Gr1 (Granulozyten), F4/80 (Makrophagen), CD11c (dendritische Zellen), CD49 (NK Zellen), CD3 (T Zellen) und CD19 (B Zellen) verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt und eine durchflusszytometrische Messung vorgenommen.

In Abbildung 20 ist der Mittelwert des prozentualen Anteils jeder der untersuchten Zellpopulationen mit Standardabweichung dargestellt. In der Milz tragen 50% den Marker CD19, 10% den Marker CD11b, F4/80 und Gr1, 30% den Marker CD3, CD4 und CD8, 8% den Marker CD49 und 2% den Marker CD11c.

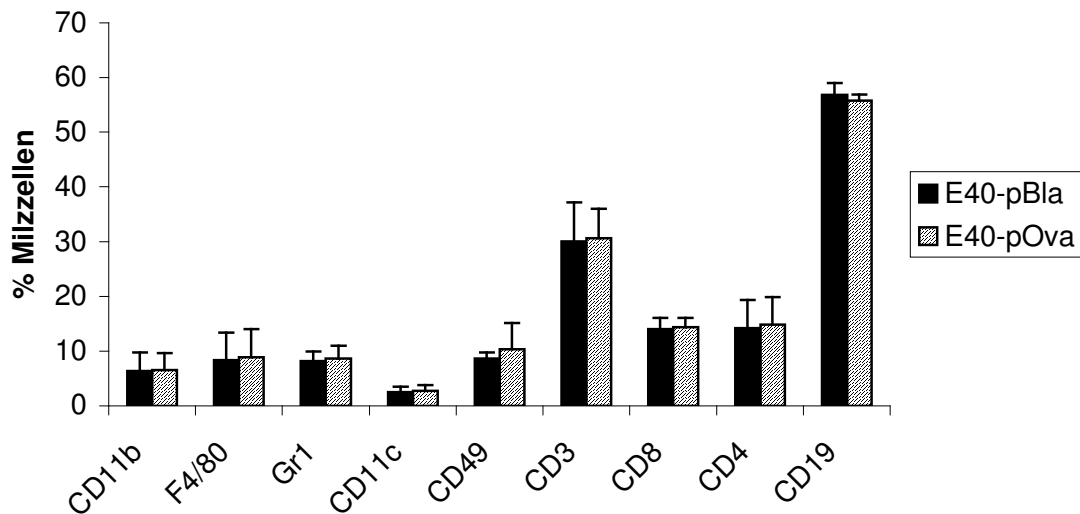


Abb. 20: Darstellung der Subpopulationen von *in vitro* infizierten Milzzellen. Eine Milz wurde einer C57BL/6-Maus entnommen, die Zellen vereinzelt, und infiziert. Nach einer Stunde Infektionszeit wurden die Zellen mit verschiedenen Oberflächenantikörpern gefärbt. Man sieht die prozentuale Aufteilung von verschiedenen Oberflächenantigenen, die für verschiedene Zelltypen in der Milz stehen. Die Mittelwerte wurden aus drei Versuchen berechnet.

70% aller Zellen der einzelnen Subpopulationen waren blau gefärbt. Statistische Untersuchungen mit Hilfe einer Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur ergaben jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede, die darauf hin deuten würden, dass Yop Injektion in verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlicher Effektivität erfolgen würde (Abb. 21).

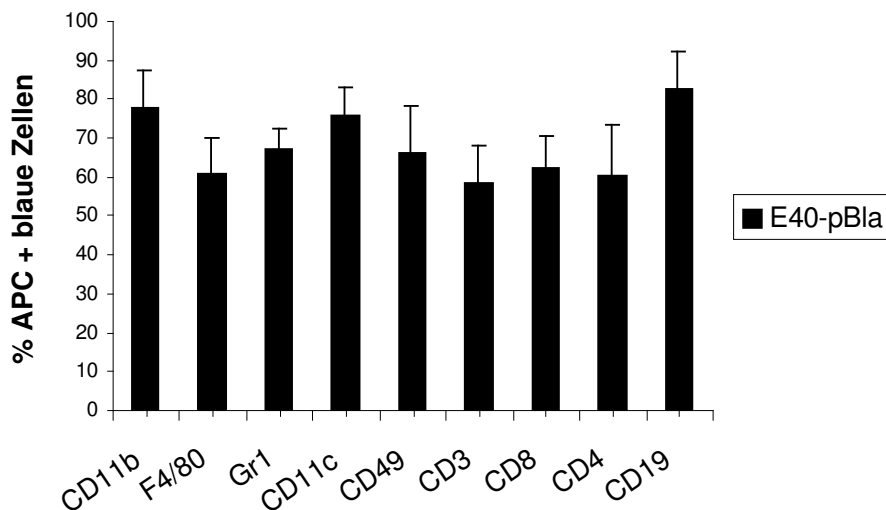


Abb. 21: Anteil der β -Lactamase positiven (blauen) Zellen an der Gesamtzahl der Zellen die den Oberflächenmarker tragen. Eine Milz wurde einer C57BL/6-Maus entnommen, die Zellen vereinzelt und infiziert. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit verschiedenen Oberflächenantikörpern gefärbt. APC konjugierte Antikörper gegen zelltypspezifische Marker wurden genutzt zur Bestimmung des prozentualen Anteils blauer Zellen in jeder Population (n=3).

Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellpopulationen an der Gesamtzahl der blauen Zellen entsprach dem Anteil an der Gesamtzellzahl in der Milz (Abb. 22).

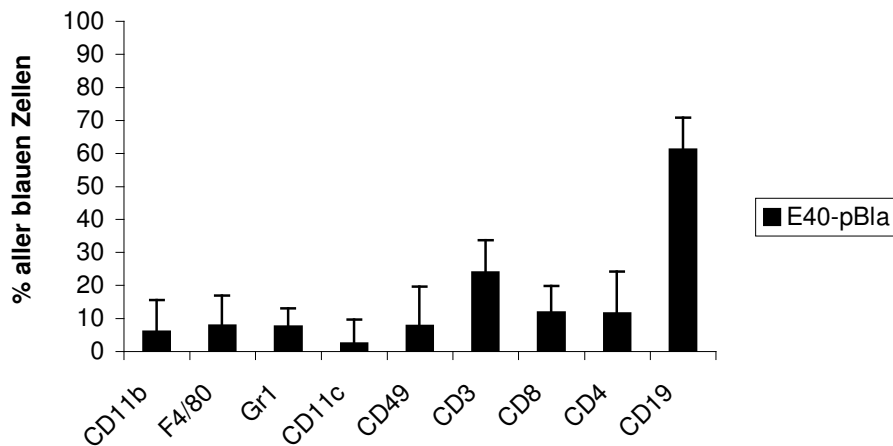


Abb. 22: Anteil der einzelnen Zellpopulationen an der Gesamtheit der β -Lactamase positiven (blauen) Zellen. Eine Milz wurde einer C57BL/6-Maus entnommen und die Zellen vereinzelt, danach wurden die Zellen infiziert. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker gefärbt. Gezeigt sind die prozentualen Anteile einzelner Zellpopulationen an der Gesamtheit aller β -Lactamase positiven Zellen.

Um Unterschiede in der Farbintensität der CCF4-Färbung heraus zu mitteln wurde der Quotient aus den Prozentzahlen aus Abbildung 21 mit den Zahlen aus Abbildung 22 genommen. Es treten keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 23).

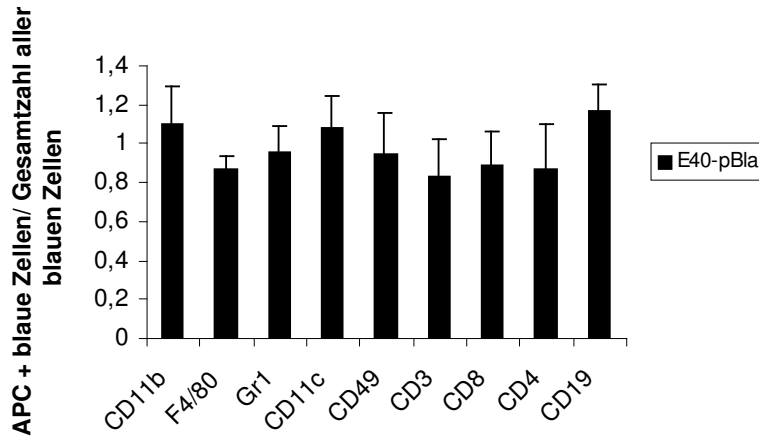


Abb. 23: Säulendiagramm vom Quotient aus Zellen die den Oberflächenantikörper tragen und blau sind durch die Gesamtzahl von allen blauen Zellen. Es wurde einer C57BL/6-Maus die Milz entnommen, die Zellen vereinzelt und infiziert. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit APC markierten Oberflächenantikörpern, spezifisch für die Subpopulationen der Milz, gefärbt. Dargestellt ist der Quotient aus den blauen Zellen, die den Oberflächenantikörper tragen und der Gesamtheit aller blauen Zellen.

3.4 Einfluss von β_1 -Integrin auf die Yop Translokation

Es sollte untersucht werden, ob β_1 -Integrine für die Yop Translokation von Bedeutung sind.

Die Integrine sind eine große Familie von heterodimeren Transmembran-Rezeptoren, die Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen vermitteln. Invasin von *Yersinia enterocolitica* bindet an β_1 -Integrine. Durch die Anheftung an einen β_1 -Integrin Rezeptor wird die Adhäsion des Bakteriums ermöglicht und die Zellpenetration initiiert (48, 49, 74).

Bei GD25 handelt es sich um eine murine β_1 -Integrin defiziente Fibroblastenzelllinie. Die Zellen wurden aus dem Stammzellklon G201 aus β_1 -Integrin defizienten Mäusen isoliert (51). GD25 β_1 -Integrin Zellen wurden aus der GD25 Zelllinie durch stabile Transfektion mit β_1 -Integrin cDNA generiert (146).

Zur Überprüfung der β_1 -Integrin Expression wurden GD25 bzw. GD25 β_1 -Integrin Zellen mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD29 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass nur die GD25 β_1 -Integrin Zellen, aber nicht GD25 Zellen β_1 -Integrin (CD29) exprimieren (Abb. 24).

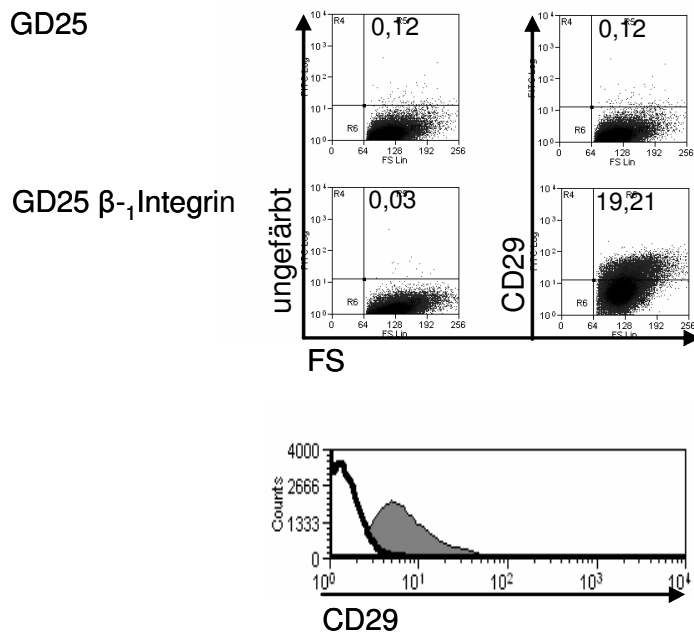


Abb. 24: Expression von β_1 -Integrinen (CD29) auf GD25 und GD25 β_1 -Integrin Zellen. GD25 und GD25 β_1 -Integrin Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD29 fluoreszenzmarkiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abb. A: Dotplot-Darstellung der β_1 -Integrin Expression; FL-1 (CD-29 FITC) gegen die Zellgröße (FSC). Als Kontrolle dienten die ungefärbten Zellen. Abb. B: Darstellung der β_1 -Integrin Expression von GD25 (weiß) mit GD25 β_1 -Integrin (grau) Zellen im Vergleich.

Zur Bestimmung der Yop Translokation in GD25 und GD25 β_1 -Integrin Zellen wurden diese mit E40-pBla oder E40-pOva (MOI 50) für eine bis vier Stunden infiziert (2.2.2.7). Die Zellen wurden ausschließlich mit CCF4-AM gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Der prozentuale Anteil an blau fluoreszierenden Zellen wurde bestimmt.

Nach einer Stunde Infektion mit E40-pBla war in $14,7\% \pm 1,2$ der GD25 β_1 -Integrin Zellen β -Lactamase-Aktivität (Blaufärbung) nachweisbar. Bei GD25 Zellen war der prozentuale Anteil blauer Zellen $1\% \pm 0,1$ signifikant niedriger ($p < 0,05$).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass β_1 -Integrine für die Translokation von Yops benötigt werden.

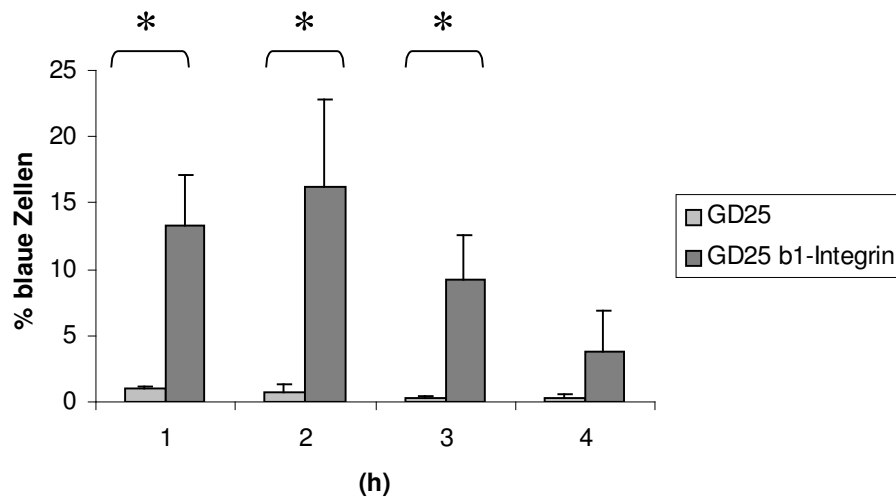


Abb. 25: Nachweis von Yop Translokation in GD25 und GD25 β_1 -Integrin Zellen nach Infektion mit E40-pBla.

GD25 und GD25 β_1 -Integrin wurden eine bis vier Stunden mit E40-pBla infiziert. Die Zellen wurden mit CCF4-AM gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der prozentuale Anteil blauer Zellen (aus vier unabhängigen Experimenten) ist als Säulendiagramm dargestellt. Sternchen bezeichnen einen signifikanten Unterschied der Expression blauer Zellen für die einzelnen Zeitpunkte ($p < 0,05$).

3.5 Einfluss von YadA auf die Yop Translokation

Um zu untersuchen ob YadA einen Einfluss auf die Yop Translokation hat, wurden Milzzellen mit E40-pBla und Δ YadA-pBla mit verschiedenen MOIs infiziert, die Zellen CCF-4AM gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abbildung 19 und 26 dargestellt, nimmt die Anzahl der blauen Zellen abhängig von der Infektionsdosis sowohl nach Infektion mit E40-pBla als auch mit Δ YadA-pBla zu. Wie bereits für E40-pBla gezeigt, (Abb.19), besteht auch nach Infektion von Milzzellen mit Δ YadA-pBla eine Korrelation von Infektionsdosis und dem prozentualen Anteil blauer Zellen, welche sich durch eine hyperbolische Regressionskurve beschreiben lässt ($y = 81.2 \cdot x / (5.2 \cdot x)$, Anpassungsgüte von $r^2 = 0.0992$). Mit Hilfe der Regressionsgerade lässt sich für die Infektion mit Δ yadA-pBla theoretisch berechnen, dass die Infektion mit einer MOI von $5,2 + 1,1$ zu 50% blaue Zellen führt. Statistische Analysen (Zweiweg Varianzanalyse) ergaben, dass sowohl die Infektionsdosis ($p < 0,0001$) als auch die verwendeten Bakterienstämme E40-pBla und Δ yad-pBla ($p < 0,0001$) das Ergebnis (% blaue Zellen) beeinflussen. Nach Infektion mit MOIs zwischen 2 und 10 war der prozentuale Anteil blauer Zellen nach Infektion mit E40-pBla und Δ yadA-pBla signifikant unterschiedlich

$p < 0,05$). Diese Ergebnisse zeigen, dass geringere Infektionsdosen von $\Delta yadA$ -pBla im Vergleich zu E40-pBla benötigt werden um Yop Injektion detektieren zu können. Daher wird angenommen, dass die Yada Expression Yop Injektion negativ beeinflusst.

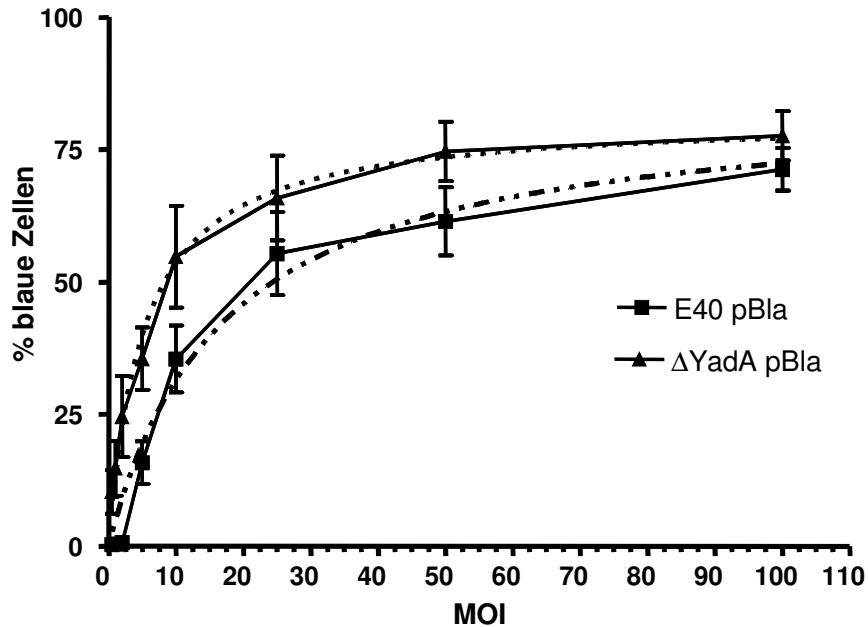


Abb.26: Vergleich der Yop Injektion in Milzzellen mit E40-pBla und $\Delta yadA$ -pBla.

Milzzellen wurden mit verschiedenen Infektionsdosen von E40-pBla und $\Delta yadA$ -pBla für eine Stunde infiziert, CCF4-AM gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Anteils von drei bis vier Versuchen. Die gestrichelten Linien zeigen hyperbolische Regressionskurven. Durchgeführt von Martin Köberle (unveröffentlicht).

3.6 Etablierung eines β -Lactamase Reportersystems *in vivo*

Nach dem gezeigt werden konnte, dass Translokation von YopE53-Bla in der Zellkultur detektiert werden kann, stellte sich nun die Frage, ob eine Detektion ebenfalls im Mausinfektionsmodell möglich ist.

Die Zellkulturexperimente zeigten, dass der Nachweis von Yop Translokation wesentlich effizienter nach Infektion mit E40-pBla erfolgte als nach Infektion mit WA-314-pBla. Daher wurden für die Mausinfektionsversuche der Stamm E40-pBla gewählt. Der Stamm E40 ist

jedoch weniger virulent als der Stamm WA-314, dies ist darauf zurück zu führen, dass der Stamm unfähig ist das Yersiniabactin zu synthetisieren.

Um dennoch hohe Keimzahlen in den Milzzellen zu erreichen, wurden die Mäuse zuvor mit dem Siderophor Desferrioxamin vorbehandelt.

Um Yop Translokation im Mausinfektionsmodell zu untersuchen, wurden in einem Pilotexperiment zunächst Mäuse mit dem Stamm E40-pBla und als Kontrolle E40-pOva nach Gabe von Desferal intravenös (iv.) durch Bakterieninjektion in die Schwanzvene infiziert (2.2.3.1). Zwei beziehungsweise drei Tage nach Infektion mit $5 \cdot 10^5$ oder $2 \cdot 10^6$ Bakterien wurde die Milz entnommen und die Zellen vereinzelt. Es wurde die Zellzahl der Milz, das Gewicht der Milz, und die Bakterienanzahl (Colony forming units = CFU) in der Milz bestimmt.

Nach Infektion mit E40-pBla bzw. E40-pOva wurde die Anzahl an Milzzellen bestimmt. Die Zellzahlen schwankten zwischen 5×10^6 und $1,8 \times 10^7$ pro Milz. Aufgrund der geringen Anzahl an Proben dieses Pilotexperimentes können keine Aussagen gemacht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen Milzzellzahl, Infektionsdosis und Infektionsdauer gibt.

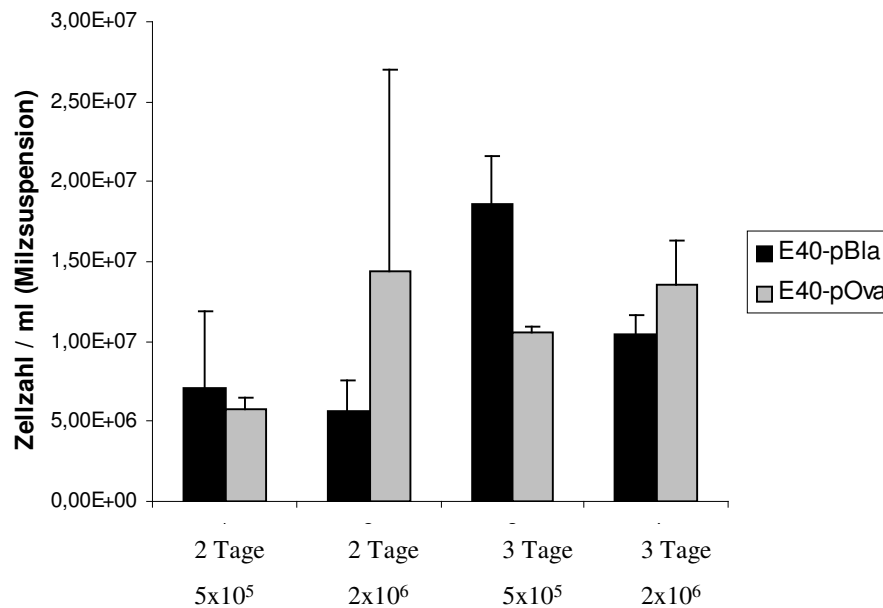


Abb. 27: Bestimmung der Milzzellzahl. Es wurden Mäuse ($n = 2$ pro Gruppe) mit E40-pBla und E40-pOva zwei und drei Tage sowie mit zwei Dosen infiziert. Die Mäuse wurden getötet und die Milz entnommen. Ein Teil der Milzsuspension wurde mit Trypanblau gefärbt und die lebenden Zellen wurden gezählt.

Die Bestimmung der Keimzahl in der Milz nach Infektion mit E40-pBla bzw. E40-pOva ergab zwei Tage nach Infektion Keimzahlen zwischen 1×10^7 und $1,5 \times 10^7$. Diese ersten Versuche deuteten darauf hin, dass die Keimzahl sowohl bei den gewählten Infektionsdosen als auch bei den gewählten Bakterienstämmen E40-pBla und E40-pOva ähnlich war. Drei Tage nach Infektion war die Keimzahl mit dem Bakterienstamm E40-pBla tendenziell etwas niedriger (5×10^6) als nach zwei Tagen ($1,3 \times 10^7$). Bei Infektionen mit dem Stamm E40-pOva war die Keimzahl an Tag zwei ($1,8 \times 10^7$) und drei vergleichbar ($1,5 \times 10^7$).

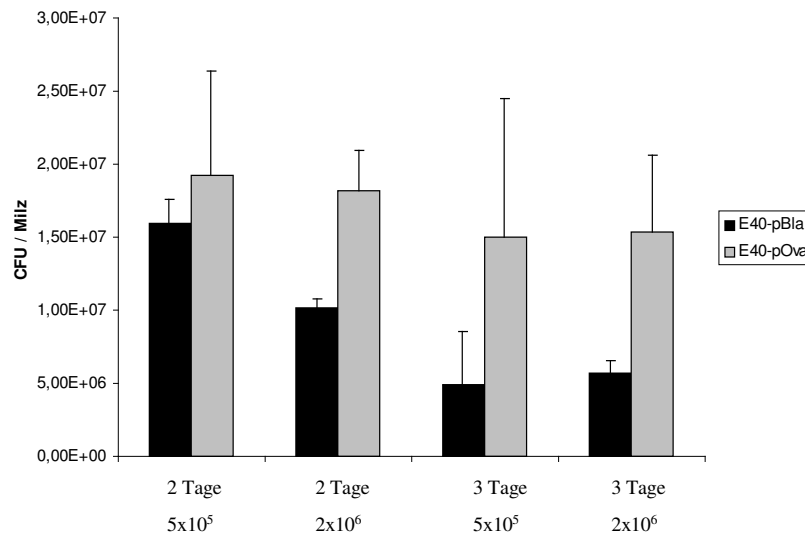


Abb. 28: Bestimmung der Keimzahl in der Milz nach Infektion mit verschiedenen Infektionsdosen und zu verschiedenen Zeitpunkten. Es wurden Mäuse (n = 2 pro Gruppe) mit E40-pBla und E40-pOva zwei und drei Tage sowie mit zwei Dosen infiziert. Die Mäuse wurden getötet und die Milz entnommen. Ein Teil der Milzsuspension wurde ausplattiert und so die CFU bestimmt.

Das Gewicht der Milz nahm mit der Dauer der Infektion zu.

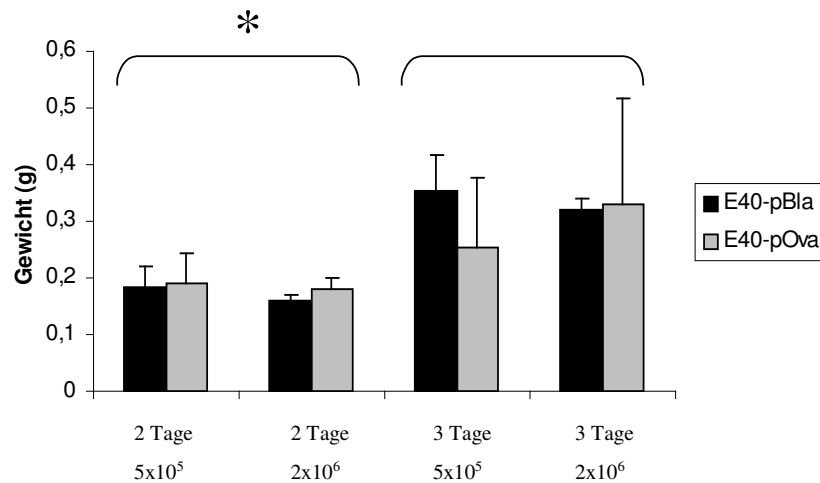


Abb. 29: Gewicht der Milzen von mit E40-pOva und E40-pBla infizierten Mäusen.

Es wurden Mäuse (n=2) mit E40-pBla und E40-pOva zwei und drei Tage sowie mit zwei Dosen infiziert. Die Maus wurde getötet die Milz entfernt und gewogen. Die Graphik zeigt das Gewicht in Gramm zu verschiedenen Zeitpunkten und verschiedenen Dosen.

Der Stern kennzeichnet den signifikanten Unterschied zwischen der Infektionsdauer zwei und drei Tage.

Nach Isolation der Milz wurden die vereinzelt Zellen (2.2.3.2) mit CCF4-AM gefärbt (2.2.3.6) und anschließend durchflusszytometrisch vermessen.

Mit den hier gewählten Infektionsdosen und Infektionsdauer konnten, nach Infektion mit *E40-pBla* $2,8 \pm 4,3\%$ und nach Infektion mit *E40-pOva* $0,2 \pm 0,4\%$, blaue Zellen nachgewiesen werden. Die geringfügige Hintergrundfärbung nach Infektion mit *E40-pOva* zeigt, dass das Reportersystem zur Bestimmung der Yop Injektion im Mausinfektionsmodell geeignet zu sein scheint. Die unterschiedlichen Infektionsbedingungen hatten keinen großen Einfluss auf den prozentualen Anzahl blauer Zellen bzw. Zellen, in die Yops injiziert wurden.

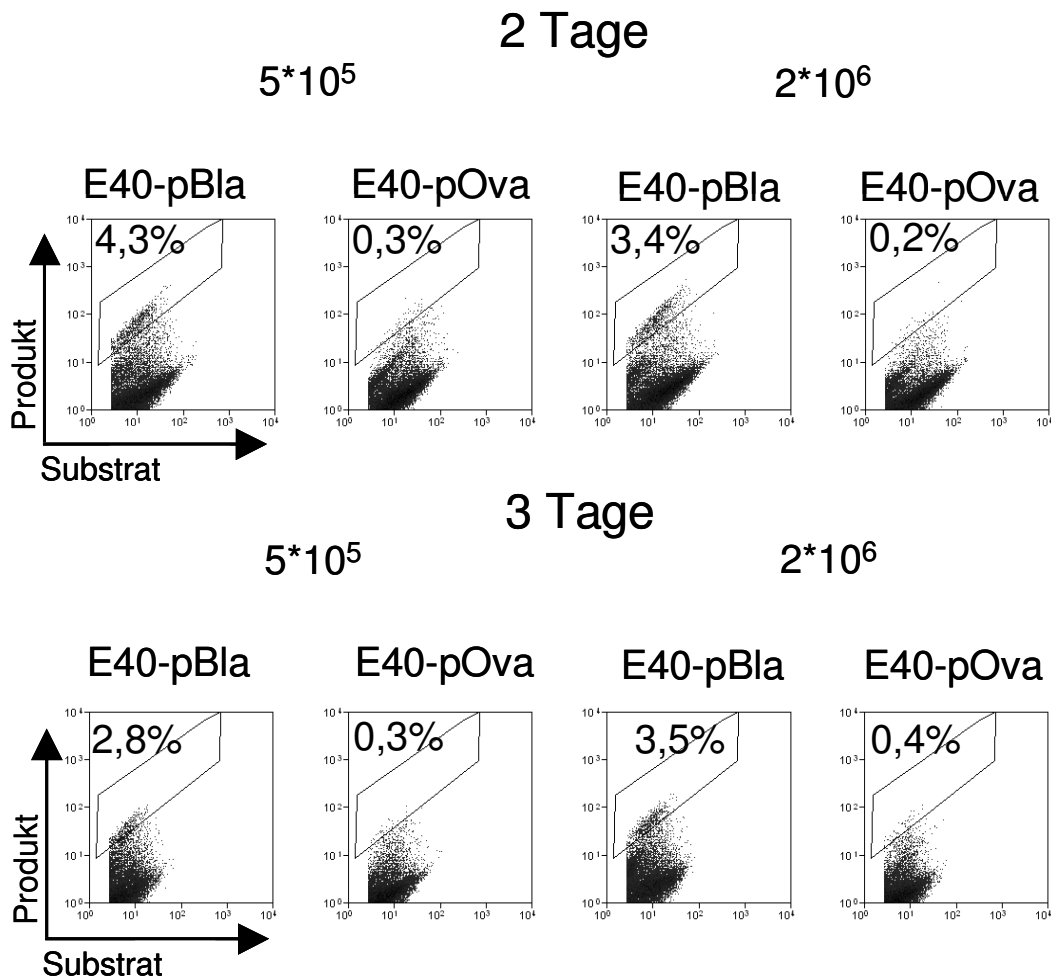


Abb. 30: Bestimmung der Yop Translokation in Milzzellen nach Infektion von Mäusen mit unterschiedlichen Infektionsdosen und unterschiedlicher Infektionsdauer. Es wurden je 2 Mäuse pro Gruppe mit E40-pBla und E40-pOva zwei und drei Tage mit zwei Dosen infiziert. Die Mäuse wurden getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt und am Durchflusszytometer vermessen. Für die Punktwolkendarstellung wurden die lebenden Zellen ausgewählt und die Substratfluoreszenz (blau) gegen die Produktfluoreszenz (grün) aufgetragen. Die Auswahl zeigt die positiven (blauen) Zellen.

3.6.1 Sortierung von β -Lactamase positiven Zellen

Zur Überprüfung des Reportersystems wurden Milzzellen aus infizierten Mäusen sortiert. Die sortierten Zellen sollten lysiert und anschließend ausplattiert werden, um festzustellen, ob Bakterien in den Zellen vorhanden sind und ob die durchflusszytometrisch nachgewiesene Fluoreszenz auch am Fluoreszenzmikroskop zu sehen ist.

Es wurden C57BL/6-Mäuse nach Gabe von Desferal iv. in die Schwanzvene mit 5×10^5 Bakterien der Stämme E40-pBla oder E40-pOva infiziert (2.2.3.1). Nach zwei Tagen Infektionszeit wurde die Milz entnommen und die Zellen vereinzelt (2.2.3.2). Danach wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt und am Durchflusszytometer (FACS Aria) sortiert.

Bei der Sortierung der Milzzellen aus der E40-pBla infizierten Maus wurden Zellen, sowohl bei denen der ungespaltene Farbstoff vorhanden war (grüne Zellen), als auch Zellen, in denen der Farbstoff durch β -Lactamase gespalten worden war und die blau fluoreszierten, isoliert. Als Kontrolle wurden grüne Zellen aus einer E40-pOva infizierten Maus und einer uninfizierten Maus sortiert.

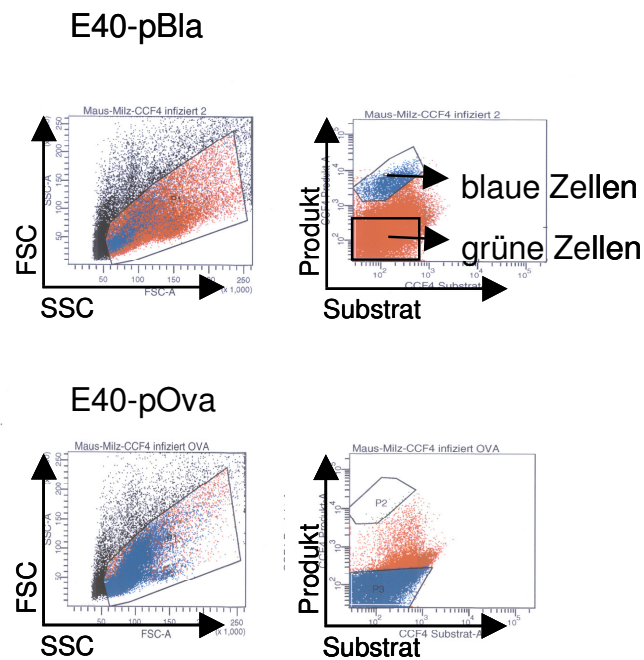


Abb. 31: Zellsortierung mit FACS Aria. Es wurden Mäuse mit E40-pBla und E40-pOva zwei Tage infiziert. Die Mäuse wurden getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt und am Durchflusszytometer sortiert. Im linken Bild sind die Zellen umrahmt, die für die Sortierung verwendet wurden. In der Mitte sind in der Punktwolkendarstellung Zellen mit grüner Fluoreszenz gegen Zellen mit blauer Fluoreszenz dargestellt. Die umrahmten Bereiche kennzeichnen die Zellen, die sortiert wurden. Rot dargestellt wurden die grünen Zellen, blau dargestellt wurden die blauen Zellen.

Zur Kontrolle wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung wurden die Zellen mit 409 nm angeregt.

Mit Hilfe verschiedener Filter wurde die Emission bei 520 nm (grün) und bei 447 nm (blau) angesehen. Von beiden Emissionen wurden Photographien angefertigt, die übereinander gelegt wurden. Es konnte durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass die nach Infektion mit

E40-pBla mit dem FACS-Gerät sortierten blauen Zellen tatsächlich auch blau waren und die als grün sortierten Zellen auch grün waren (Abb.32)

Uninfizierte und mit dem Stamm E40-pOva infizierte Zellen zeigten ausschließlich grüne Nettofluoreszenz.

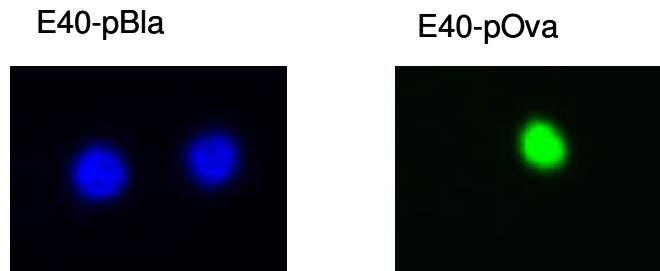


Abb. 32: Mikroskopische Aufnahmen von Milzzellen von infizierten Mäusen. Es wurden Mäuse mit E40-pBla und E40-pOva zwei Tage infiziert. Die Mäuse wurden getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt. Die Zellen wurden sortiert und danach am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Exemplarisch sind Zellen, die aus den entsprechenden Bereichen in Abbildung 31 sortiert wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Hierbei wurden Fluoreszenzmikroskopiebilder nach Detektion grüner und blauer Fluoreszenz übereinander gelegt.

Nach Zellsortierung wurden jeweils 10^5 Milzzellen für eine Stunde mit und ohne Gentamycin kultiviert. Anschließend wurden die Milzzellen lysiert und die Anzahl an Yersinien nach serieller Verdünnung durch Ausplattieren auf Müller-Hinton Agarplatten bestimmt. Da Gentamycin nur extrazellulär lokalisierte Bakterien abtötet, kann durch den Vergleich der Anzahl an Bakterien, die ohne und mit Gentamycin behandelt werden, die Anzahl an intrazellulär lokalisierten Bakterien bestimmt werden.

In den Fraktionen der sortierten Zellen konnte nur eine geringe Anzahl an Bakterien nachgewiesen werden (etwa 500 bis 3000 Bakterien/ 10^5 Milzzellen). Diese Anzahl würde etwa einer MOI von 0,005 bis 0,03 entsprechen. Der Anteil an intrazellulären Bakterien liegt bei einer MOI von 0 bis 0,025. Die geringe Anzahl an Bakterien, die mit den Zellen assoziiert sind, spricht daher gegen die Möglichkeit, dass die nachgewiesene β -Lactamase-Aktivität durch Yop Translokation nach der Präparation der Milzzellen bedingt ist, durch eine hohe Anzahl von Bakterien, die nach der Milzzellisolation entweder außen an den Milzzellen adhärerten oder internalisiert worden waren.

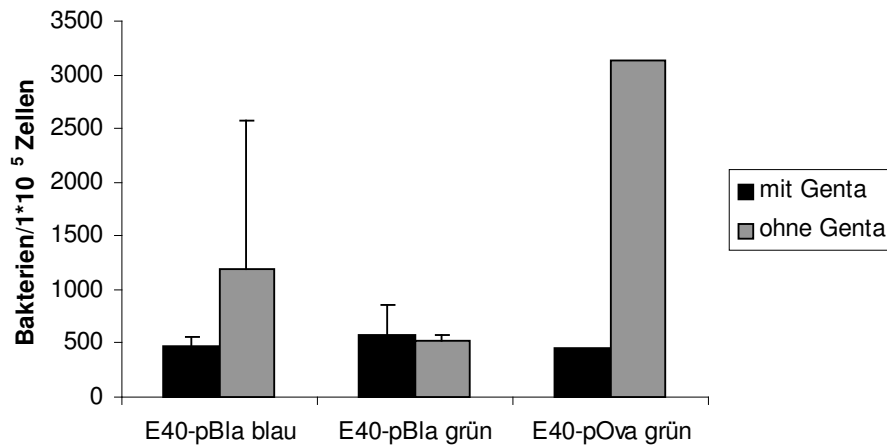


Abb. 33: Bestimmung von Bakterien nach Infektion von Mäusen und anschließender Zellsortierung. Nach Infektion von Mäusen wurden die Milzzellen isoliert und mit einem Zellsortiergerät wurden blaue oder grüne Zellen fraktioniert. Jeweils 1×10^5 Zellen der Fraktionen wurden lysiert und die Bakterienanzahl bestimmt (ohne Gentamycin grau). Bei der Behandlung mit Gentamycin (schwarz) wurden die Zellen vor dem Ausplattieren eine Stunde mit Gentamycin inkubiert.

3.6.2 Zusammenhang zwischen Infektionsdauer bzw. Infektionsdosis und Anzahl blauer Zellen nach Infektion mit E40-pBla

Um eine optimale Infektionsdauer für die Durchführung weiterer Experimente zu bestimmen, wurden C57BL/6-Mäuse zunächst für 6-, 24-, 48- und 72-Stunden mit 5×10^5 E40-pBla infiziert und sowohl die Keimzahl als auch der Prozentsatz blauer Zellen in der Milz bestimmt. Die Anzahl der Bakterien in der Milz nahm im zeitlichen Verlauf zu und erreichte ein Maximum im Bereich zwischen 24-, 48- und 72-Stunden nach Infektion, danach nahm die Anzahl an Bakterien in der Milz tendenziell ab. In ähnlicher Weise stieg die prozentuale Anzahl an Zellen bei denen Yop Injektion detektierbar war (blaue Zellen) im zeitlichen Verlauf an und zeigte einen maximalen Wert zwei bis drei Tage nach Infektion. Aus diesem Experiment ergab sich als optimaler Zeitpunkt für weitere Experimente eine Infektionsdauer von zwei Tagen.

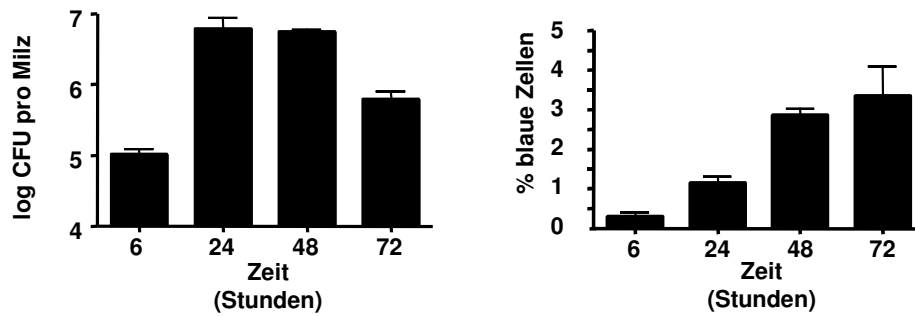


Abb 34. Bestimmung von Keimzahl und Yop Injektion nach Infektion mit E40-pBla im zeitlichen Verlauf. C57BL/6-Mäuse wurden mit 5×10^5 E40-pBla infiziert und die Keimzahl in der Milz und Yop-Injektion in Milzzellen (% blaue Zellen) bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier bis acht Mäusen dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede (einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur: Keimzahlen $p < 0.05$ 6h vs 24 und 48h, 72h vs 24 und 48h) (Martin Köberle, unveröffentlicht).

Um die optimale Infektionsdosis zu bestimmen, wurden C57BL/6-Mäuse mit verschiedenen Infektionsdosen für zwei Tage infiziert und die Keimzahl in der Milz und Yop-Injektion in Milzzellen (% blaue Zellen) bestimmt. Mit Erhöhung der Infektionsdosis steigt die Keimzahl in der Milz signifikant an. Ab einer Infektionsdosis von 5×10^3 kommt es jedoch nicht zu einer weiteren signifikanten Erhöhung der Keimzahl in der Milz. In ähnlicher Weise steigt der prozentuale Anteil an Zellen mit Yop Injektion mit Erhöhung der Infektionsdosis an. Ab einer Infektionsdosis von mehr als 5×10^5 ist dieser Anstieg nicht mehr signifikant. Um bei einer maximalen Bakterienanzahl in der Milz einen möglichst hohen Prozentsatz an blauen Zellen detektieren zu können, wurden weiterführende Experimente mit einer Infektionsdosis von 5×10^5 für zwei Tage durchgeführt.

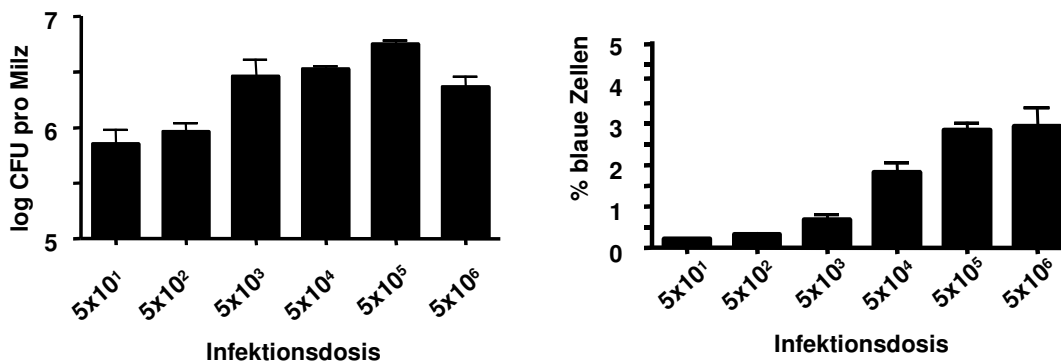


Abb. 35. Bestimmung von Keimzahl und Yop Injektion nach Infektion mit E40-pBla im zeitlichen Verlauf. C57BL/6-Mäuse wurden mit verschiedenen Dosen von E40-pBla infiziert

und die Keimzahl in der Milz und Yop-Injektion in Milzzellen (% blaue Zellen) bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier Mäusen dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede (einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur: Keimzahlen $p < 0,05$ 5×10^1 und 5×10^2 vs 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 und 5×10^1 vs 5×10^6) ($p < 0,05$). Alle Gruppen unterscheiden sich signifikant mit Ausnahme von 5×10^1 vs 5×10^2 und 5×10^3 bzw. 5×10^5 vs 5×10^6 (Martin Köberle unveröffentlicht).

3.6.3 Korrelation zwischen Keimzahl in der Milz und Yop Injektion.

Durch Zusammenfassung der bereits beschriebenen und später beschriebenen Experimente sollte untersucht werden, welche Korrelation es zwischen Keimzahl in der Milz und Prozent blauer Zellen gibt. Hierfür wurden Ergebnisse aus Experimenten mit verschiedenen Infektionsdosen und Infektionsdauer zusammengefasst. Es wurde der prozentuale Anteil blauer Zellen gegen die Keimzahl aufgetragen (Abb. 36). Berechnungen mit Hilfe der Software GraphpadPrism ergaben, dass sich die Korrelation zwischen Prozent blauer Zellen und logCFU pro Milz am besten durch eine sigmoidale Kurve mit der Formel: $y = 5,103 + 2,021 / (1 + \exp((1146 - x)/0 5471))$ und einer Anpassungsgüte von $r^2 = 0,64$ bei 79 Freiheitsgraden darstellen lässt. Die Nachweisgrenze für Yop Injektion kann anhand der Infektion mit E40-pOva, welche in $0,2\% \pm 0,2$ blauer Zellen resultiert durch die Kalkulation Nachweisgrenze = $0,2\% \pm 3$ -fache Standardabweichung als $0,8\%$ blaue Zellen, festgelegt werden. Nach der oben beschriebenen Formel korrelieren $0,8\%$ blaue Zellen mit einer Keimzahl von $6,4 \times 10^5$ E40-pBla in der Milz. Dies bedeutet, dass eine Keimzahl von circa $6,4 \times 10^5$ Bakterien Voraussetzung für den zweifelsfreien Nachweis von Yop Injektion in Milzzellen ist.

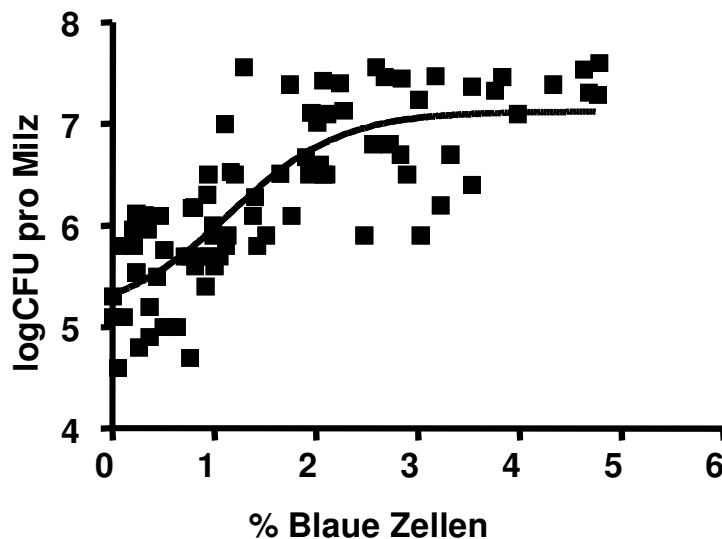


Abb. 36 Korrelation zwischen Prozent blauer Zellen und Keimzahl in der Milz. Es wurden die Ergebnisse aus verschiedenen Versuchen bei denen C57BL/6-Mäuse (n=83) mit E40-pBla infiziert mit unterschiedliche Infektionsdosen und Infektionsdauer zusammengefasst. Dargestellt wurde die prozentuale Anzahl blauer Zellen in Korrelation mit der Keimzahl in der Milz. Die Linie stellt eine sigmoidale Regressionskurve dar mit einer Anpassungsgüte von $r^2 = 0,64$ (Martin Köberle unveröffentlicht).

3.7 In welche Zellen werden Yops während einer Infektion von Mäusen transloziert ?

Eine der zentralen Frage dieser Arbeit war, in welche Zellpopulationen Yops im Mausinfektionsmodell injiziert werden. Hierfür wurden Mäuse mit 5×10^5 Bakterien des Stammes E40-pBla und E40-pOva für zwei Tage infiziert (2.2.3.1). Anschließend wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gerichtet gegen bestimmte Zellpopulationen gefärbt (2.2.3.5). Es wurden Antikörper zur Erkennung von Granulozyten (Gr1), Makrophagen (F4/80), dendritische Zellen (CD11c), NK-Zellen (CD49), T-Zellen (CD3) und B-Zellen (CD19) verwendet. Anschließend wurden die Zellen CCF4-AM gefärbt und durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

3.7.1 Quantitative Bestimmung der Zellpopulationen in der Milz vor und nach Infektion

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Zellzusammensetzung in der Milz nach der Infektion mit E40-pBla bzw. E40-pOva ändert. Hierbei ergab die Bestimmung der Zellzahl vor Infektion $3,7 \times 10^7 + 1,0 \times 10^7$ Zellen (n = 4). Zwei Tage nach Infektion mit E40-pOva bzw. E40-pBla stieg die Zellzahl, tendenziell aber unsignifikant auf $4,7 \times 10^7 + 1,8 \times 10^7$ (n=14) bzw. $6,1 \times 10^7 + 2,3 \times 10^7$ (n= 32), an.

Nichtinfizierte Milzzellsuspensionen bestehen zu $56\% \pm 5,4$ aus $CD19^+$ -Zellen, $20\% \pm 3,1$ aus $CD3^+$ -Zellen, $10\% \pm 3,2$ aus $F4/80^+$ -Zellen und $21\% \pm 6,8$ $Gr1^+$ -Zellen, $4\% \pm 1,7$ aus $CD11c^+$ -Zellen und $5\% \pm 1,5$ aus $CD49^+$ -Zellen.

Nach Infektion mit E40-pBla oder E40-pOva kommt es unter den gewählten Versuchsbedingungen zu einer signifikanten Zunahme der Zellen die den Marker F4/80 tragen ($7,4\% \pm 4,1$), der Zellen die den Marker Gr1 tragen ($22,7\% \pm 8,9$) und der Zellen die den

Marker CD11c tragen ($3,3\% \pm 1,9$). Zu einer Abnahme kommt es bei den Zellen die den Marker CD3 tragen ($15,4\% \pm 3,8$). Die Keimzahl nach Infektion lag bei $\log \text{CFU } 7,35 \pm 0,2$.

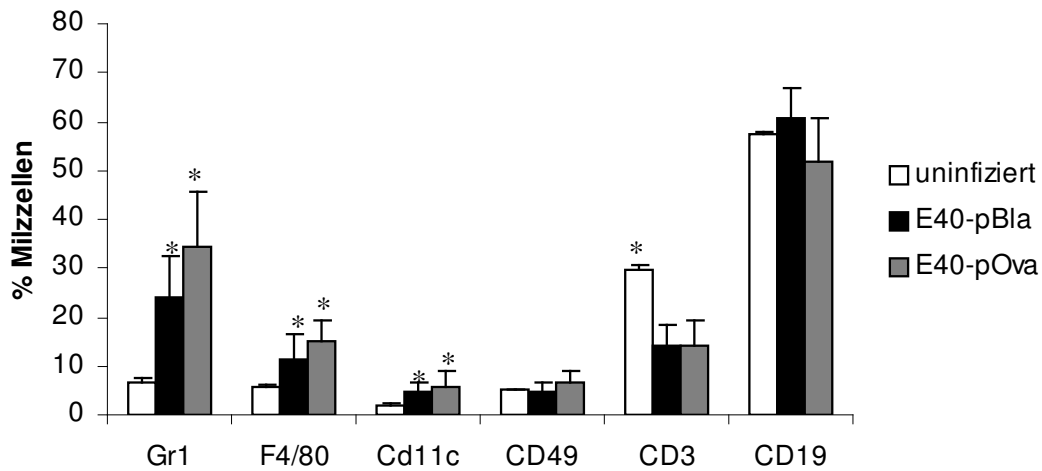


Abb. 37: Zusammensetzung der Zellpopulationen in der Milz vor und nach Infektion. C57BL/6-Mäuse wurden mit 5×10^5 Bakterien der Stämme E40-pBla oder E40-pOva für zwei Tage infiziert. Die Milz wurde entnommen und die einzelnen Zellen wurden mit Antikörperfärbung gefärbt. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert und der prozentuale Anteil verschiedener Zellpopulationen ermittelt. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zellpopulationen in der Milz uninfizierter und infizierter Mäuse ($p < 0.05$ einfache Varianzanalyse mit Dunnett Test). Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte von 13 Tieren mit Standardabweichung.

Die Auswertung des prozentualen Anteils aller blauen Zellen nach Infektion mit E40-pBla ergab $3,1\% \pm 0,9\%$ blaue Zellen. Die Hintergrundfärbung wurde durch Infektion mit E40-pOva ermittelt und betrug $0,15\% \pm 0,13\%$.

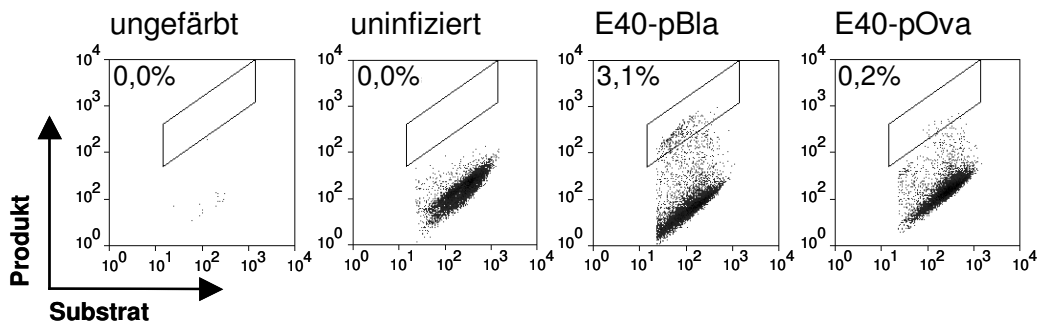


Abb. 38: Nachweis von β -Lactamase positiven Zellen nach Yersinieninfektion Es wurden C57BL/6-Mäuse mit E40-pBla (n=13) und E40-pOva zwei Tage infiziert. In der Punktvolkendarstellung Produkt gegen Substrat wurden nur lebende und grün gefärbte Zellen berücksichtigt. Die Prozentzahlen zeigen an, wie viele Zellen sich in der Auswahl befinden.

Weiterführend wurde untersucht wie viele von den Zellen, die einen bestimmten Oberflächenantikörper tragen, β -Lactamase positiv (blau) sind. Es konnte gezeigt werden, dass $13,4\% \pm 5,1$ von allen F4/80⁺-Zellen, $10,9\% \pm 3,8$ von allen CD11c⁺-Zellen, $7,2\% \pm 2,7$ von allen CD49⁺-Zellen, und $5,5\% \pm 1,8$ von allen Gr-1⁺-Zellen blau gefärbt waren, was darauf hinweist, dass YopE-Bla in diese Zellen von *Yersinien* injiziert wurde. Im Gegensatz dazu konnte blaue Fluoreszenz in nur $2,3\% \pm 1,4$ von allen CD3⁺-Zellen und $2,6\% \pm 1,1$ von allen CD19⁺-Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass sich Yop Translokation hauptsächlich auf Zellen des angeborenen Immunsystems konzentriert.

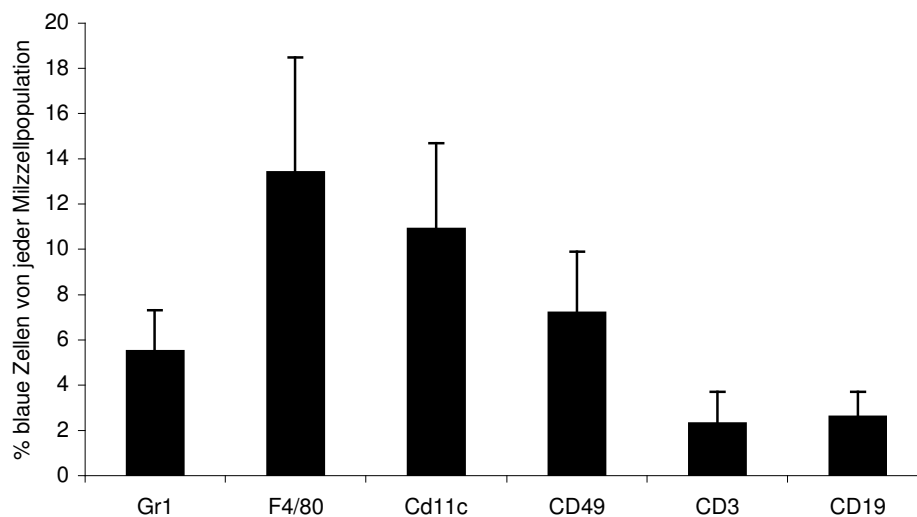


Abb. 39: Anteil der β -Lactamase positiven (blauen) Zellen an der Gesamtzahl der Zellen die den Oberflächenmarker tragen. Es wurden C57BL/6-Mäuse mit E40-pBla zwei Tage infiziert. Die Maus wurde getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen mit APC gekoppelten Oberflächenantikörpern markiert und anschließend mit CCF4-AM gefärbt. Die Fluoreszenzen der Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Man sieht den prozentualen Anteil an blauen Zellen bezogen auf die gesamte Population, die den Oberflächenantikörper trägt.

Als nächstes wurde untersucht wie groß der Anteil dieser Zellen an der Gesamtverteilung der blauen Zellen ist. Der Hauptanteil aller blauen Zellen umfasst hauptsächlich Zellen die den Oberflächenmarker Gr-1⁺ (27,2% ± 8,8), CD19⁺ (44% ± 8,1) und F4/80⁺ (30,8% ± 13,2) tragen. Zu geringeren Anteilen findet man Yop Translokation in CD11c⁺-Zellen (13,5% ± 6,1), CD49⁺-Zellen (8,8% ± 2,9) und CD3⁺-Zellen (8,3 % ± 4).

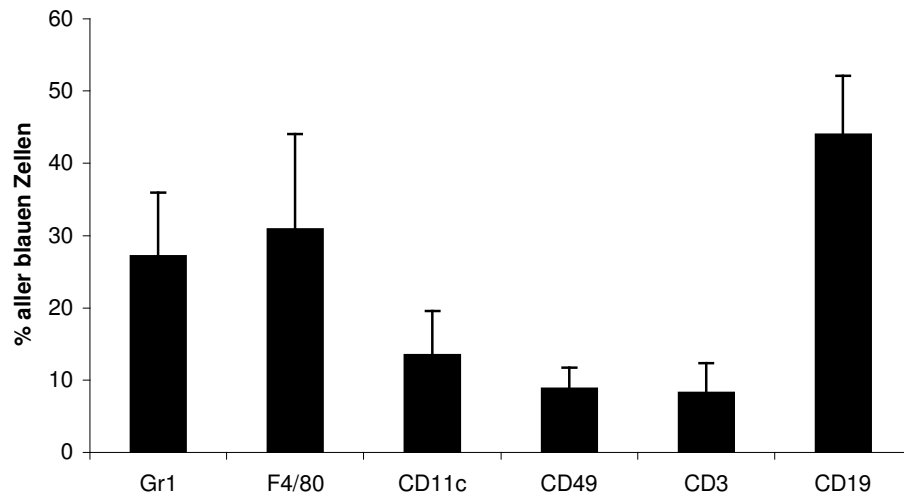


Abb. 40: Anteil der einzelnen Zellpopulationen an der Gesamtheit der β -Lactamase positiven (blauen) Zellen. Es wurden C57BL/6-Mäuse mit E40-pBla zwei Tage infiziert. Die Maus wurde getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen mit APC gekoppelten Oberflächenantikörpern markiert und anschließend mit CCF4-AM gefärbt. Die Fluoreszenzen der Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Man sieht die prozentualen Anteile einzelner Zellpopulationen an der Gesamtheit aller β -Lactamase positiven Zellen.

3.8. Einfluss von definierten Immundefekten auf die Yop Injektion

Es wurde gezeigt, dass gendefiziente Mäuse, die sich nur durch das Fehlen bestimmter Zytokine, Adaptermoleküle oder Rezeptoren wie zum Beispiel TNF-Rezeptor, MyD88 oder IFN- γ Rezeptor vom Wildtyp unterscheiden, eine erhöhte Suszeptibilität bei einer Yersinien Infektion zeigen (23, 26, 25). Da die Auswirkungen der Defizienz der beschriebenen Faktoren aufgrund ihrer pleiotropen Wirkungsmechanismen funktionell nur teilweise geklärt sind, sollte untersucht werden, ob diese Faktoren einen Einfluss auf den Zelltropismus von Yersinien haben.

Defiziente Mäuse, die weniger oder keine Bakterien durch aktivierte Makrophagen/DCs eliminieren können, sind vielleicht deshalb auch verstärkt von der Yop Translokation betroffen. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sollen ein detailliertes Verständnis des Wechselspiels zwischen proinflammatorischen Stimuli (LPS, Adhäsine), der darauf erfolgenden Wirtsantwort und den Yop-Virulenz ermöglichen.

Für diesen Zweck wurden verschiedene defiziente Mäuse (TNFR^{-/-}; Myd88^{-/-}; IFN γ R^{-/-}) und Wildtypmäuse (C57BL/6) nach Gabe von Desferal intravenös in die Schwanzvene mit 5×10^5 Bakterien der Stämme E40-pBla oder E40-pOva infiziert (2.2.3.1). Nach zwei Tagen Infektionszeit wurde die Milz entnommen und die Zellen vereinzelt (2.2.3.2).

Ein Teil der Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Bakterienanzahl pro Milz verwendet. Mäuse, bei denen eine Defizienz im Gen MyD88 vorlag, hatten eine signifikant höhere CFU als die Wildtypmäuse. Die Keimzahl in der Milz nach Infektion von TNFR^{-/-} und IFN γ R^{-/-} Mäusen war dagegen nicht signifikant unterschiedlich.

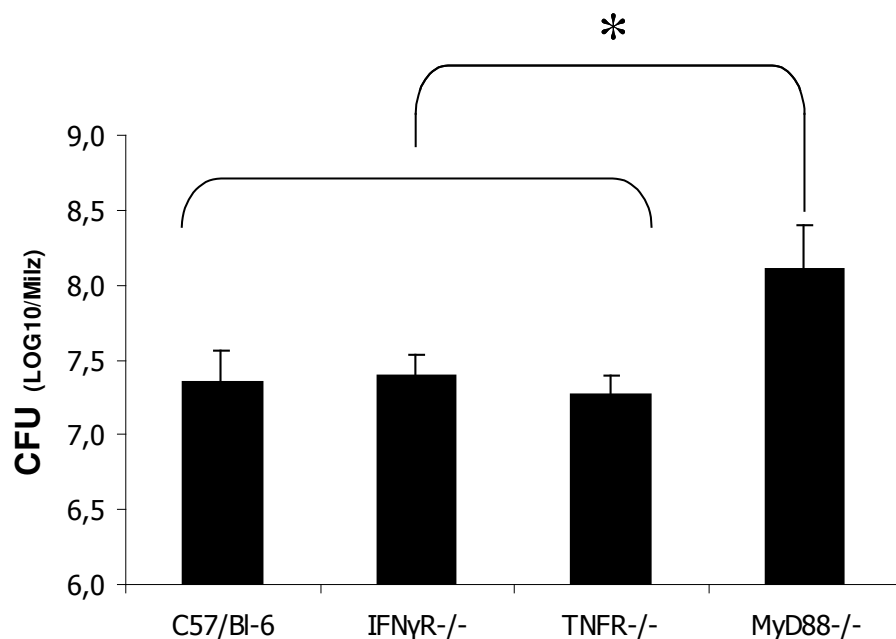


Abb. 41: Keimzahl in der Milz nach Infektion von verschiedenen Knock-out-Mäusen und dem Wildtypstamm. Es wurden Mäuse mit E40-pBla und E40-pOva zwei Tage infiziert. Die Mäuse wurden getötet und die Milz entnommen. Ein Teil der Milzsuspension wurde ausplattiert und so die CFU (log10) bestimmt. Das Säulendiagramm zeigt den Durchschnitt aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Der Stern kennzeichnet den signifikanten Unterschied zwischen der CFU von C57BL/6 Mäusen, den IFN γ R^{-/-}, und den TNFR^{-/-} zu den Myd88^{-/-} defizienten Mäusen ($T < 0,05$).

Die vereinzelt Zellen wurden einer Antikörperfärbung (2.2.3.5) unterzogen und anschließend mit CCF4-AM gefärbt. Die Untersuchungen ergaben, dass der prozentuale Anteil blau fluoreszierender Zellen nach Infektion von IFN γ R $^{-/-}$ und TNFR $^{-/-}$ Mäusen signifikant höher war ($5,97\% \pm 0,91$ bzw. $7,6\% \pm 1,15$) als der nach Infektion von C57BL/6- Kontrollmäusen ($3,15\% \pm 1,10$). Die Anzahl blauer Zellen nach Infektion von Myd88 $^{-/-}$ Mäusen war dagegen nicht signifikant unterschiedlich ($4,72\% \pm 2,29$) im Vergleich zu infizierten Wildtypmäusen.

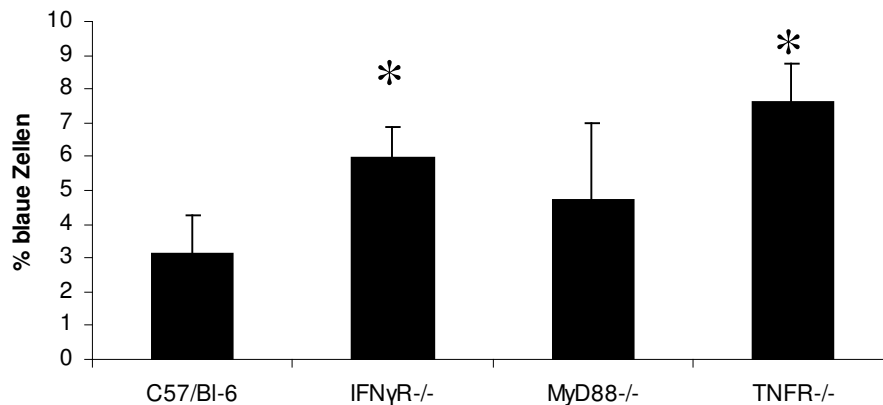


Abb. 42: Prozentualer Anteil der β -Lactamase positiven Zellen nach Infektion von verschiedenen Knock-out-Mausstämmen und dem Wildtypstamm. Es wurden Mäuse mit E40-pBla für zwei Tage infiziert. Die Mäuse wurden getötet und die Milzen entnommen. Die Zellen wurden mit CCF4-AM gefärbt und am Durchflusszytometer vermessen. Das Säulendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der β -Lactamase positiven (blauen Zellen) Zellen im Vergleich zu allen Milzzellen der verschiedenen Mauslinien. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen dem Prozentsatz β -Lactamase positiver Milzzellen von Knock-out-Stämmen (n=3) und dem der Kontrollmäuse (n=9) (C57BL/6) (Einfache Varianzanalyse mit Dunnett-Test $p < 0,05$).

3.8.1 Untersuchung der Milzzell-Subpopulationen von *in vivo* infizierten IFN γ R $^{-/-}$ im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen.

Es wurde festgestellt, dass gendefiziente Mäuse mehr β -Lactamase positive Zellen in der Milz aufweisen als die Wildtypmäuse (Abb. 42). Als nächstes sollte die Verteilung der Zell-Subpopulationen in der Milz von infizierten gendefizienten Mäusen mit der in Wildtypmäusen verglichen werden.

Um dies zu untersuchen wurden $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ -Mäuse und C57BL/6-Mäuse nach Gabe von Desferal intravenös in die Schwanzvene mit 5×10^5 Bakterien der Stämme E40-pBla oder E40-pOva infiziert (2.2.3.1). Nach zwei Tagen wurde die Milz entnommen und die Zellen vereinzelt (2.2.3.2). Die Zellsuspension wurde mit spezifischen Antikörper gefärbt (2.2.3.5). Es wurden Antikörper zur Erkennung von Granulozyten (Gr1), Makrophagen (F4/80), dendritische Zellen(CD11c), NK-Zellen (CD49), T-Zellen (CD3) und B-Zellen (CD19) verwendet. Anschließend wurden die gefärbten Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert.

Nichtinfizierte Milzzellsuspensionen von $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ defizienten Mäusen bestehen zu $60\% \pm 3,2$ aus $\text{CD}19^+$ -Zellen, $20\% \pm 1,4$ aus $\text{CD}3^+$ -Zellen, ca. $19\% \pm 5,8$ aus $\text{F}4/80^+$ - und $\text{Gr}1^+$ -Zellen, $12\% \pm 1,2$ aus $\text{CD}11\text{c}^+$ -Zellen und $5\% \pm 2,1$ aus $\text{CD}49^+$ -Zellen.

Nach Infektion mit E40-pBla oder E40-pOva kommt es unter den gewählten Versuchsbedingungen zu einer Zunahme der $\text{F}4/80^+$ -Zellen ($31,0\% \pm 5,7$) und der $\text{Gr}1^+$ -Zellen ($21,8\% \pm 5,4$). Zu einer signifikanten Abnahme kommt es bei den $\text{CD}3^+$ -Zellen ($11,5\% \pm 1,4$) und den $\text{CD}11\text{c}^+$ -Zellen ($4,6\% \pm 0,7$). Die Anzahl der $\text{CD}19^+$ -Zellen ($63,1\% \pm 4,3$) sowie die der $\text{CD}49^+$ -Zellen ($3,7\% \pm 0,9$) ändern sich im Verlaufe bei einer Infektion einer $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ defizienten Maus nicht.

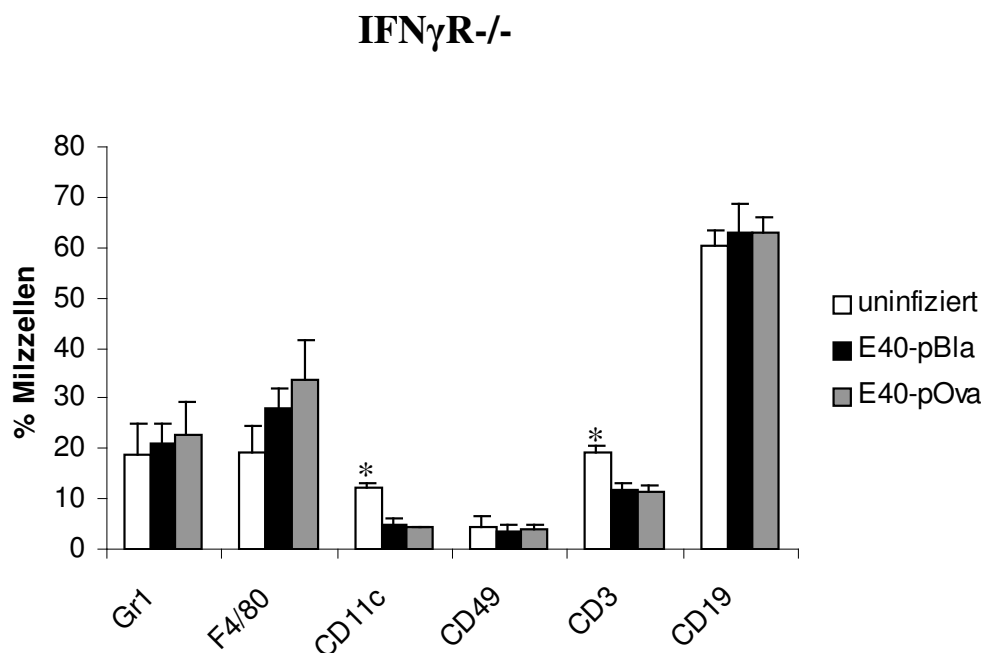


Abb. 43: Subpopulationen von Milzzellen von *in vivo* infizierten $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ defizienten Mäusen. Es wurden $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ Mäuse mit E40-pBla und E40-pOva zwei Tage infiziert. Die

Maus wurde getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen mit APC gekoppelten Oberflächenantikörpern markiert und anschließend mit CCF4-AM gefärbt. Die Fluoreszenzen der Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Als Kontrolle wurde eine uninfizierte Maus genommen. Das Säulendiagramm zeigt den Durchschnitt aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Man sieht die prozentuale Aufteilung von verschiedenen Oberflächenantigenen, die für verschiedene Zelltypen in der Milz stehen. (Einfache Varianzanalyse mit Dunnett Test $p < 0,05$).

Weiterführend wurde untersucht wie viele von den Zellen, die einen bestimmten Oberflächenantikörper tragen, β -Lactamase positiv (blau) sind. Es konnte gezeigt werden, dass bei $\text{IFN}\gamma\text{R}^-$ Mäusen in der Milz $26,4\% \pm 8,2$ von allen F4/80^+ -Zellen, $18,5\% \pm 3,2$ von allen CD11c^+ -Zellen, $11,6\% \pm 2,3$ von allen CD49^+ -Zellen, und $9,5\% \pm 1,3$ von allen Gr-1^+ -Zellen blau gefärbt waren. Im Gegensatz dazu konnte nur geringe blaue Fluoreszenz in nur $4\% \pm 1,1$ von allen CD3^+ -Zellen und $4,6\% \pm 0,9$ von allen CD19^+ -Zellen nachgewiesen werden (vergleiche C57BL/6 Abb. 39). Die Anzahl blauer Zellen von jeder Milzzellpopulation ist bei den $\text{IFN}\gamma\text{R}^-$ Mäusen signifikant höher als bei den Wildtypmäusen.

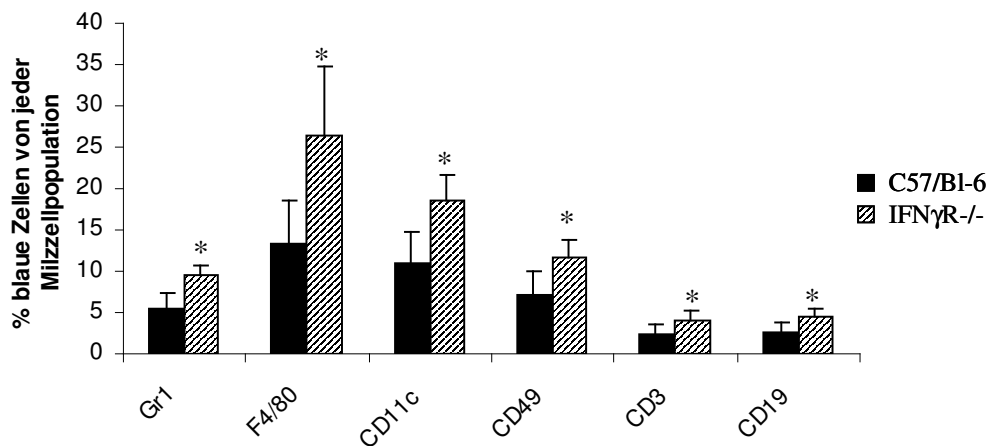


Abb. 44: Anteil der β -Lactamase positiven (blauen) Zellen an der Gesamtzahl der Zellen die den Oberflächenmarker tragen. Es wurden C57BL/6- und $\text{IFN}\gamma\text{R}^-$ Mäuse mit E40-pBla zwei Tage infiziert. Die Maus wurde getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen mit APC Oberflächenantikörpern markiert und anschließend mit CCF4-AM gefärbt. Die Fluoreszenzen der Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Das Säulendiagramm zeigt den Durchschnitt aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Man sieht den prozentualen Anteil blauer Zellen bezogen auf die gesamte Population, die den Oberflächenantikörper trägt. (Einfache Varianzanalyse mit Dunnett Test $p < 0,05$).

Als nächstes wurde untersucht wie groß der Anteil dieser Zellen an der Gesamtverteilung der blauen Zellen ist. Der Hauptanteil aller blauen Zellen umfasst bei $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ Mäusen in der Milz hauptsächlich Zellen die das Oberflächenantigen Gr1^+ ($33,4\% \pm 7,5$), CD19^+ ($46,4\% \pm 11,3$) und F4/80^+ ($17,3\% \pm 8,2$) tragen. Zu geringeren Anteilen findet man Yop Translokation in CD11c^+ -Zellen ($20,3\% \pm 7$), CD49^+ -Zellen ($9,6\% \pm 5,3$) und CD3^+ -Zellen ($8\% \pm 3,3$).

Nur in wenigen Zellpopulationen in der Milz unterscheiden sich die $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ Knock-out-Maus und die Wildtypmaus (Abb. 45) in der Verteilung aller blauen Zellen. Bei der Verteilung aller blauen Zellen in der Milz haben die Granulozyten, die Makrophagen und die NK-Zellen einen signifikant größeren Anteil bei der Wildtypmaus (C57BL/6) in Bezug auf die $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ defizienten Mäuse. Wobei die $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ Mäuse bei der Verteilung aller blauen Zellen mehr B-Zellen haben, dieser Unterschied ist aber nicht signifikant.

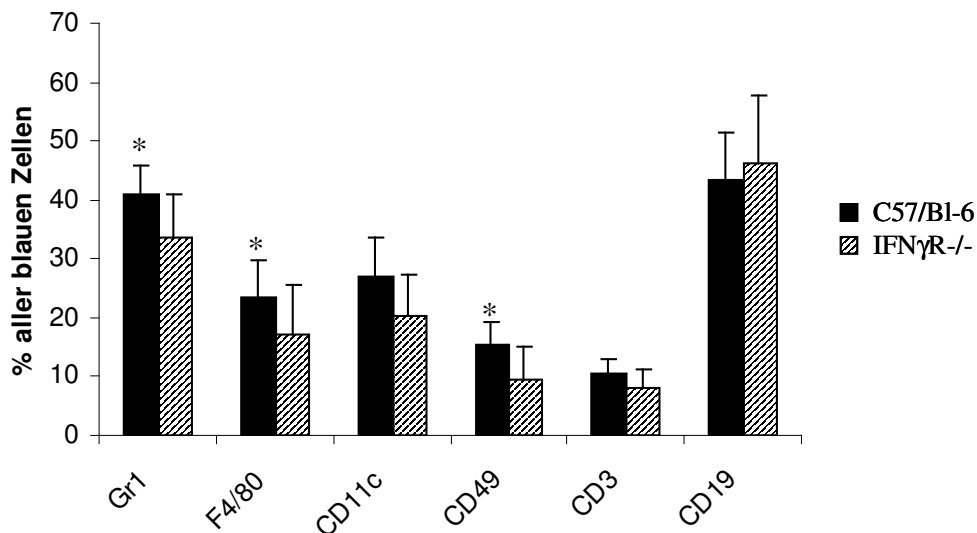


Abb. 45: Anteil der einzelnen Zellpopulation an der Gesamtheit der β -Lactamase positiven (blauen) Zellen. Es wurden C57BL/6 - und $\text{IFN}\gamma\text{R}^{-/-}$ Mäuse mit E40-pBla zwei Tage infiziert. Die Maus wurde getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen mit APC gekoppelten Oberflächenantikörpern markiert und anschließend mit CCF4-AM gefärbt. Die Fluoreszenzen der Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Das Säulendiagramm zeigt den Durchschnitt aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Man sieht den prozentualen Anteil einzelner Zellpopulationen an der Gesamtheit aller β -Lactamase positiven Zellen. (Einfache Varianzanalyse mit Dunnett Test $p < 0,05$).

3.8.2 Untersuchung der Milzzell-Subpopulationen von *in vivo* infizierten Myd88^{-/-} Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen.

Der myeloide Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) ist ein universelles Adaptermolekül. Alle Toll-*like* Rezeptoren (TLRs, außer TLR3) regulieren über das Adaptermolekül MyD88 proinflammatorische intrazelluläre Signalwege.

MyD88 wird z.B. benötigt, um die Transkription von NFκ-B zu aktivieren. Fällt MyD88 aus, kommt es zu einer Beeinträchtigung der Aktivierung der adaptiven Immunantwort und der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Das Immunsystem kann Infektionen deshalb sehr viel schlechter bewältigen (137, 135, 136).

Es sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss diese Defizienz auf die Yop Translokation in verschiedenen Zellpopulationen der Milz nimmt, um daraus Rückschlüsse auf eine eventuell veränderte Interaktionshäufigkeit bestimmter Zelltypen mit *Yersinia enterocolitica* ziehen zu können.

Für diesen Zweck wurden Myd88^{-/-} und C57BL/6-Mäuse nach Gabe von Desferal intravenös in die Schwanzvene mit $5 \cdot 10^5$ Bakterien der Stämme E40-pBla oder E40-pOva infiziert (2.2.3.1). Nach zwei Tagen wurde die Milz entnommen und die Zellen vereinzelt (2.2.3.2). Die Zellsuspension wurde mit spezifischen Antikörper gefärbt (2.2.3.5). Es wurden Antikörper zur Erkennung von Granulozyten (Gr1), Makrophagen (F4/80), dendritische Zellen (CD11c), NK-Zellen (CD49), T-Zellen (CD3) und B-Zellen (CD19) verwendet. Anschließend wurden die gefärbten Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert.

Nichtinfizierte Milzzellsuspensionen von einer MyD88-defizienten Maus bestehen zu $60\% \pm 1,0$ aus CD19⁺-Zellen, $32\% \pm 0,8$ aus CD3⁺-Zellen, ca. $9\% \pm 0,1$ aus F4/80⁺-Zellen und Gr-1⁺-Zellen, $4\% \pm 0,4$ aus Cd11c⁺-Zellen und $10\% \pm 0,7$ aus CD49⁺-Zellen.

Nach Infektion mit E40-pBla oder E40-pOva kommt es unter den gewählten Versuchsbedingungen zu einer signifikanten Zunahme der F4/80⁺-Zellen ($18,9\% \pm 3,2$) und der Gr1⁺-Zellen ($43,9\% \pm 16,5$). Zu einer signifikanten Abnahme kommt es bei den CD3⁺-Zellen ($15,4\% \pm 5,5$) und den CD19⁺-Zellen ($26,6\% \pm 12,9$). Die Anzahl der CD11c⁺-Zellen ($7,0\% \pm 2,6$) sowie die der CD49⁺-Zellen (CD49) ($7,8\% \pm 2,8$) ändern sich im Verlaufe bei einer Infektion einer Myd88-defizienten Maus nicht.

Myd88^{-/-}

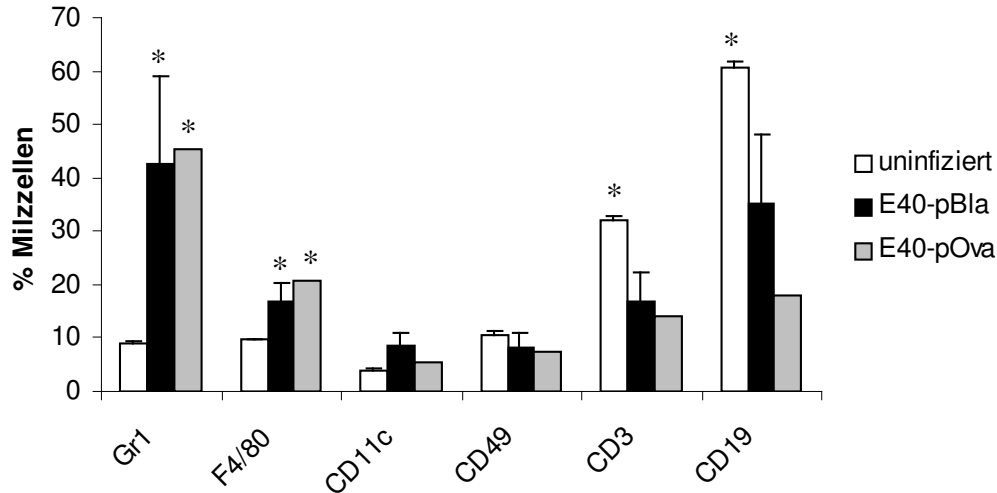


Abb. 46: Subpopulationen von Milzzellen von *in vivo* infizierten Myd88^{-/-} defizienten Mäusen. Es wurden Myd88^{-/-} und CD57/B1-6-Mäuse mit E40-pBla und E40-pOva zwei Tage infiziert. Die Maus wurde getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen mit APC gekoppelten Oberflächenantikörpern markiert und anschließend mit CCF4-AM gefärbt. Die Fluoreszenzen der Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Es wurden zusätzlich jeweils zwei uninfizierte Mäuse untersucht. Das Säulendiagramm zeigt den Durchschnitt aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Man sieht die prozentuale Aufteilung von verschiedenen Oberflächenantigenen, die für verschiedene Zelltypen spezifisch sind in der Milz. ($p < 0,05$).

Weiterführend wurde untersucht wie viele von den Zellen, die einen bestimmten Oberflächenantikörper tragen, β -Lactamase positiv (blau) sind. Es konnte gezeigt werden, dass bei Myd88^{-/-} Mäusen in der Milz 27,6% \pm 15 von allen F4/80⁺-Zellen, 16,4% \pm 9,3 von allen CD11c⁺-Zellen, 8,6% \pm 5,4 von allen CD49⁺-Zellen, und 9,8 \pm 4,1 von allen Gr-1⁺-Zellen blau gefärbt waren. Im Gegensatz dazu konnte blaue Fluoreszenz in nur 4,6% \pm 3,1 von allen CD3⁺-Zellen und 3,8 % \pm 2,5 von allen CD19⁺-Zellen nachgewiesen werden.

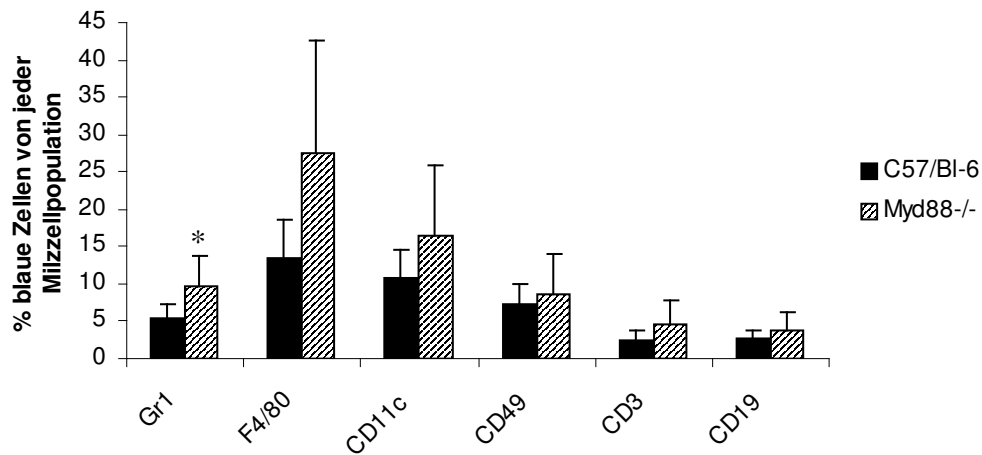


Abb. 47: Anteil der β -Lactamase positiven (blauen) Zellen an der Gesamtzahl der Zellen die den Oberflächenmarker tragen. Es wurden C57BL/6-Mäuse und Myd88-defiziente Mäuse mit E40-pBla zwei Tage infiziert. Die Maus wurde getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen mit APC gekoppelten Oberflächenantikörpern markiert und anschließend mit CCF4-AM gefärbt. Die Fluoreszenzen der Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Das Säulendiagramm zeigt den Durchschnitt aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Man sieht den prozentualen Anteil blauer Zellen bezogen auf die gesamte Population die den Oberflächenantikörper trägt. (Einfache Varianzanalyse mit Dunnett Test $p < 0,05$).

Als nächstes wurde untersucht wie groß der Anteil dieser Zellen an der Gesamtverteilung der blauen Zellen ist. Der Hauptanteil aller blauen Zellen umfasst bei Myd88-/- Mäusen in der Milz hauptsächlich Zellen die das Oberflächenantigen Gr1 ($64,8\% \pm 10,6$) und CD19 ($32,3\% \pm 8,2$) tragen. Zellen, die das Oberflächenantigen CD11c ($28,9\% \pm 2,9$) und F4/80 ($29,3\% \pm 3,9$) tragen, sind fast zu gleichen Teilen vertreten. Zu geringeren Anteilen findet man Yop Translokation in CD49⁺-Zellen ($15,7\% \pm 6,5$) und CD3⁺-Zellen ($13,1\% \pm 4,6$).

Nur in wenigen Zellpopulationen in der Milz unterscheiden sich die Myd88 Knock-out-Maus und die Wildtypmaus (Abb. 48) in der Verteilung von allen blauen Zellen.

Bei der Verteilung aller blauen Zellen in der Milz haben Granulozyten und Makrophagen einen signifikant größeren Anteil bei den Myd88-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Dagegen ist bei den Wildtypmäusen bei der Verteilung aller blauen Zellen der Anteil der B-Zellen signifikant größer.

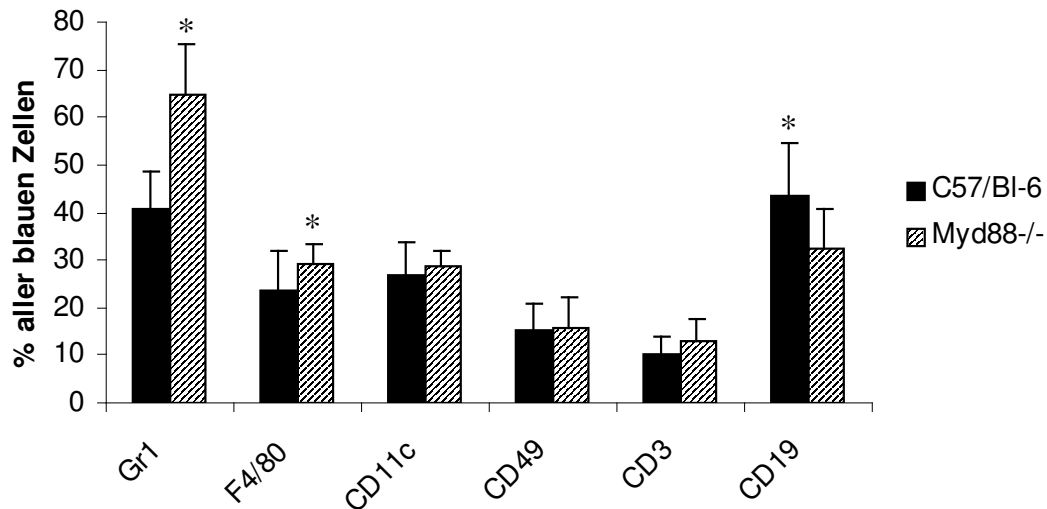


Abb. 48: Anteil der einzelnen Zellpopulation an der Gesamtheit der β -Lactamase positiven (blauen) Zellen. Es wurden C57BL/6- und Myd88^{-/-} Mäuse mit E40-pBla zwei Tage infiziert. Die Milz wurde entnommen und die einzelnen Zellen gefärbt. Das Säulendiagramm zeigt den Durchschnitt aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Man sieht den prozentualen Anteil einzelner Zellpopulationen an der Gesamtheit aller β -Lactamase positiven Zellen. (Einfache Varianzanalyse mit Dunnett Test $p < 0,05$).

3.8.3 Untersuchung der Milzzell-Subpopulationen von *in vivo* infizierten TNFRp55^{-/-} Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen.

Der Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) ist ein multifunktionelles Zytokin, welches hauptsächlich von aktivierten Makrophagen, T-Zellen, Mastzellen und manchen Epithelzellen produziert wird. TNF α spielt eine Rolle bei vielen biologischen Vorgängen, z.B. bei der Proliferation von Zellen sowie bei Entzündungsreaktionen, bei der Immunregulation und beim programmierten Zelltod infizierter Zellen. Der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor p55 (TNFRp55) ist der wichtigste Rezeptor für die Vermittlung des proinflammatorischen Effekts von TNF α . Obwohl TNF α als protektives Zytokin bei einer Yersinieninfektion gilt, sind Mäuse bei denen der Rezeptor TNFRp55 ausgeschaltet ist, in der akuten Phase einer Yersinieninfektion, resistenter als die C57BL/6 Kontrollmäuse. Sie zeigen weniger Gewebsschädigung und die Bakterien werden effektiver beseitigt (26, 151).

Es wurde herausgefunden, dass bei den Kontrollmäusen, aufgrund einer erheblich höheren Zelltodrate im Vergleich mit den TNFRp55^{-/-} Mäusen, es zu einem starken Abfall der CD4⁺-T-Zellen in der Milz kommt. Des Weiteren kommt es zu einem Anstieg der IFN- γ und zu

einem Abfall der IL-10 Produktion (151). TNF α beeinflusst also die Immunreaktion in der Milz auf eine *Yersinia enterocolitica* Infektion. Es sollte daher untersucht werden, ob auch die Yop Translokation in den verschiedenen Zellpopulationen der Milz beeinflusst wird .

Für diesen Zweck wurden TNFRp55 $^{-/-}$ und C57BL/6-Mäuse nach Gabe von Desferal intravenös in die Schwanzvene mit $5 \cdot 10^5$ Bakterien der Stämme E40-pBla oder E40-pOva infiziert (2.2.3.1). Nach zwei Tagen wurde die Milz entnommen und die Zellen vereinzelt (2.2.3.2). Die Zellsuspension wurde mit spezifischen Antikörper gefärbt (2.2.3.5). Es wurden Antikörper zur Erkennung von Granulozyten (Gr1), Makrophagen (F4/80), dendritische Zellen (CD11c), NK-Zellen (CD49), T-Zellen (CD3) und B-Zellen (CD19) verwendet.

Anschließend wurden die gefärbten Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert. Nichtinfizierte Milzzellsuspensionen von einer TNFRp55-defizienten Maus bestehen zu $70,8\% \pm 1,1$ aus CD19 $^{+}$ -Zellen, $21,8\% \pm 5,8$ aus CD3 $^{+}$ -Zellen, $24,3\% \pm 0,5$ aus F4/80 $^{+}$ -Zellen (F4/80) und $10,6\% \pm 1,8$ aus Gr1 $^{+}$ -Zellen, $8\% \pm 4,5$ aus Cd11c $^{+}$ -Zellen und $11,2\% \pm 7,0$ aus CD49 $^{+}$ -Zellen.

Nach Infektion mit E40-pBla oder E40-pOva kommt es unter den gewählten Versuchsbedingungen im Vergleich zu einer uninfizierten TNFRp55 $^{-/-}$ -Maus zu einer signifikanten Zunahme der Zellen die das Oberflächenantigen Gr1 ($33,6\% \pm 2,6$) tragen. Zu einer signifikanten Abnahme kommt es bei den Zellen die das Oberflächenantigen F4/80 ($16,8\% \pm 3,4$), CD49 ($6,2\% \pm 0,5$), CD3 ($11,2\% \pm 1,1$) und CD19 ($50,3\% \pm 3,1$) tragen. Die Anzahl der CD11c $^{+}$ -Zellen ($4,5\% \pm 1,0$) ändert sich im Verlauf der Infektion bei TNFRp55 defizienten Mäusen nicht.

TNFRp55^{-/-}

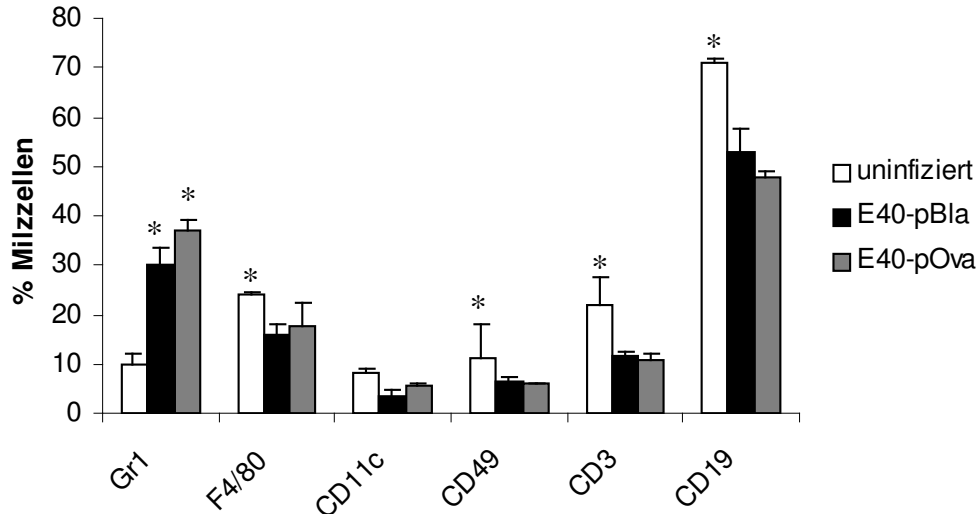


Abb. 49: Subpopulationen von Milzzellen von *in vivo* infizierten TNFRp55^{-/-} defizienten Mäusen. Es wurden TNFRp55^{-/-} Mäuse mit E40-pBla und E40-pOva zwei Tage infiziert. Die Maus wurde getötet die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Die einzelnen Zellen wurden einer Antikörperfärbung unterzogen. Die gefärbten Zellen wurden am Durchflusszytometer untersucht. Es wurden außerdem jeweils zwei uninfizierte Mäuse untersucht. Das Säulendiagramm zeigt den Durchschnitt aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Man sieht die prozentuale Aufteilung von verschiedenen Oberflächenantigenen, die für verschiedene Zelltypen in der Milz spezifisch sind ($p < 0,05$).

Weiterführend wurde untersucht, wie viele von den Zellen, die einen bestimmten Oberflächenantikörper tragen, β -Lactamase positiv (blau) sind. Es konnte gezeigt werden, dass bei TNFRp55^{-/-} Mäusen in der Milz 29,4% \pm 7,7 von allen F4/80⁺-Zellen, 19,9% \pm 5 von allen CD11c⁺-Zellen, 11,4% \pm 3,6 von allen CD49⁺-Zellen, und 11,1% \pm 2,2 von allen Gr-1⁺-Zellen blau gefärbt waren. Im Gegensatz waren von den CD3⁺-Zellen (6,4 % \pm 2,8) und den CD19⁺-Zellen (7 % \pm 1,5) nur wenige Zellen blau gefärbt.

Die Anzahl blauer Zellen von jeder Milzzellpopulation ist bei den TNFRp55^{-/-} Mäusen signifikant höher als bei den Wildtypmäusen (Abb.50).

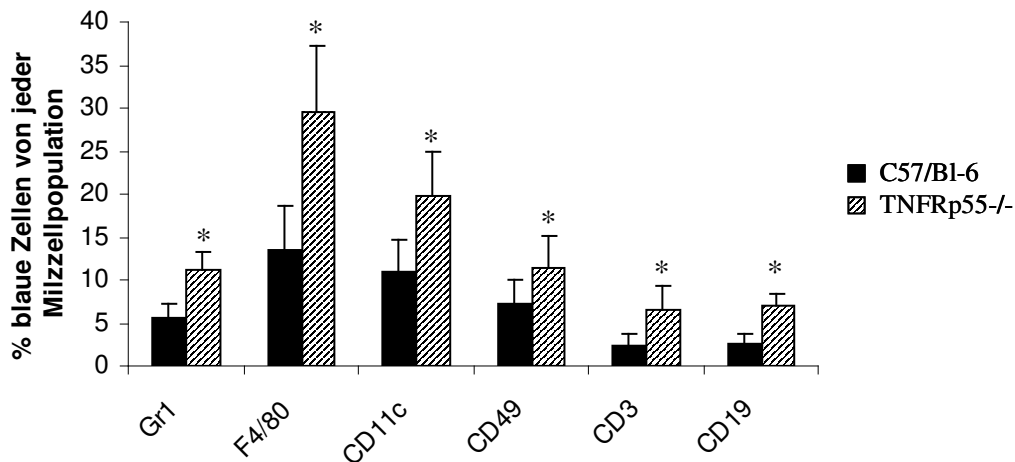


Abb. 50: Anteil der β -Lactamase positiven (blauen) Zellen an der Gesamtzahl der Zellen die den Oberflächenmarker tragen. Es wurden C57BL/6-Mäuse und TNFRp55-/- defiziente Mäuse mit E40-pBla zwei Tage infiziert. Die Maus wurde getötet, die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Die einzelnen Zellen wurden einer Antikörperfärbung unterzogen und anschließend CCF4-AM gefärbt. Die Fluoreszenzen der Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Das Säulendiagramm zeigt den Durchschnitt aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Man sieht den prozentualen Anteil blauer Zellen bezogen auf die gesamte Population die den Oberflächenantikörper trägt.

Als nächstes wurde untersucht wie groß der Anteil dieser Zellen an der Gesamtverteilung der blauen Zellen ist. Der Hauptanteil aller blauen Zellen umfasst bei TNFRp55-/- Mäusen in der Milz hauptsächlich Zellen die das Oberflächenantigen Gr1 ($50,1\% \pm 4,8$), CD19 ($46,2\% \pm 11,3$) und F4/80 ($35,2\% \pm 4,8$) tragen. CD11c⁺-Zellen ($26,8\% \pm 6,2$) sind zu ungefähr 30% vertreten. Zu geringeren Anteilen findet man Yop Translokation in CD49⁺-Zellen ($11,2\% \pm 3,3$) und CD3⁺-Zellen ($9,1\% \pm 2,2$).

Einige Zellpopulationen der Milz sind bei TNFRp55-gendefizienten Mäusen in der Verteilung aller blauen Zellen nicht in den gleichen Anteilen vertreten wie bei den Wildtypmäusen (Abb.51).

Bei der Verteilung aller blauen Zellen in der Milz haben Granulozyten und Makrophagen einen signifikant größeren Anteil bei den TNFRp55-/- Mäusen als bei den Wildtypmäusen. Die restlichen Populationen unterscheiden sich nicht.

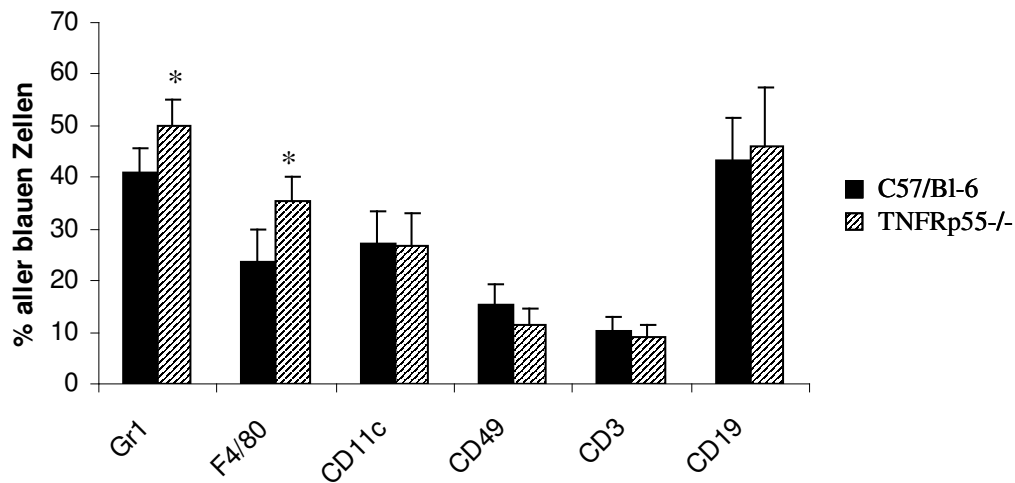


Abb. 51: Anteil der einzelnen Zellpopulation an der Gesamtheit der β -Lactamase positiven (blauen) Zellen. Es wurden C57BL/6- und TNFR^{-/-} Mäuse mit E40-pBla zwei Tage infiziert. Die Maus wurde getötet, die Milz entfernt und die Zellen vereinzelt. Die einzelnen Zellen wurden einer Antikörperfärbung unterzogen und anschließend CCF4-AM gefärbt. Die Fluoreszenzen der Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Man sieht die prozentualen Anteile einzelner Zellpopulationen an der Gesamtheit aller β -Lactamase positiven Zellen.

Abschließend ist zu sagen, dass das beschriebene Reportersystem *in vitro* wie *in vivo* die Detektion von Yop Translokation in Wirtszellen ermöglicht.

Es wurden verschiedene *Yersinia enterocolitica* Stämme verschiedener Serotypen auf ihre Eignung als Reporterstämme getestet. Nur der Stamm E40-pBla zeigte gute Reportereigenschaften *in vivo* wie *in vitro*. *In vitro* wurden verschiedene primäre und stabile Zelllinien getestet wie z.B. HeLa, Milzzellen und Knochenmarksmakrophagen. In allen Zellen konnte β -Lactamase-Aktivität nach E40-pBla Infektion detektiert werden, welche in diesem System als Indikator für Yop Translokation dient. Es zeigte sich auch, dass bei der Infektion einer Milzzellsuspension die Häufigkeit der Yop Translokation nicht vom Zelltyp beeinflusst wird.

Durch Infektion von GD25 bzw. GD25 β_1 -Integrin Fibroblasten konnte die Abhängigkeit der Yop Translokation von der Expression von β_1 -Integrinen auf den Wirtszellen gezeigt werden.

In vivo wurden nach Infektion einer C57BL/6-Maus mit dem Reporterstamm E40-pBla ungefähr 3% blaue (β -Lactamase positive) Zellen in der Milz beobachtet. Es wurden außerdem

die Anteile β -Lactamase positiver Zellen in verschiedenen Milzzell-Subpopulationen untersucht.

Des Weiteren wurde die Yop Translokation in Milzzellen nach Infektion verschiedener gendefizienter-Mauslinien untersucht, um Aufschluss über ein möglicherweise verändertes Interaktionsmuster zwischen Bakterien und Zellen des Immunsystems zu erhalten.

4. Diskussion

4.1. Etablierung eines Reportersystems

Eine wichtige Strategie von *Yersinia enterocolitica* ist die Injektion von Effektor-Molekülen über das Typ III Sekretionssystem in die Zielzelle, um dort die Wirtsantwort zu unterdrücken. Verschiedene Gruppen beschäftigten sich mit der Detektion der Injektion von bakteriellen Proteinen in der Zielzelle, aber die Nützlichkeit der etablierten Reportersysteme war limitiert und meist auf *in vitro* Modelle beschränkt (3, 31, 46, 65, 75, 131, 149).

So wurde von der Gruppe von Galan ein Cre-Rekombinase-Reportersystem zur Detektion von sekretierten Proteinen durch *Salmonella typhimurium* beschrieben (31). Mit diesem System konnte in Zellkulturexperimenten Yop Injektion nachgewiesen werden. Es wurden auch *in vivo* Untersuchungen gemacht, allerdings nur mit ROSA 26 Mäusen, da nur diese Mäuse sich für die Untersuchungen eignen. Die Möglichkeiten dieses Systems *in vivo* waren sehr begrenzt (31).

In ähnlicher Weise konnte zur Detektion von Yops durch *Yersinia enterocolitica* ein System etabliert werden (Martin Köberle, Diplomarbeit), welches jedoch auch nicht zum Nachweis von Yop Injektion im Mausinfektionsmodell geeignet war (unveröffentlichte Daten). Es gibt verschiedene Möglichkeiten warum das Cre-Reportersystem *in vivo* nicht funktionierte. Eine Möglichkeit ist, dass die translozierte Menge an Cre Fusionsprotein *in vivo* nicht ausreichend war, damit es in den infizierten Zellen zur Rekombination des Promoters des Reportergens kam. Eine andere Möglichkeit ist, dass der Promoter des Reportergens zwar durch das translozierte Cre Fusionsprotein aktiviert wurde, aber die Zellen starben bevor das Reporterprotein ausreichend exprimiert wurde. Eine andere Gruppe etablierte ein Reportersystem bei dem *Yersinia enterocolitica* YopE mit GFP fusioniert war. Es konnten Untersuchungen in Zellkulturen und in der Maus durchgeführt werden. Aber nur wenn GFP partiell ungefalted ist kommt es durch die Nadel von *Yersinia enterocolitica* (75), aus diesem Grund konnten andere Gruppen dieses Ergebnis nicht bestätigen.

Vor kurzem wurde von Marketon et al. gezeigt, dass Yop Translokation mit Hilfe eines Yop- β -Lactamase Fusionsproteins nach Infektion von Mäusen mit *Y. pestis* untersucht werden kann (90). In der vorliegenden Arbeit wurde auf Basis der Vorarbeiten von Marketon et al. ein β -Lactamase Reportersystem zum Nachweis der Yop Translokation nach *Yersinia*

enterocolitica Infektion etabliert und Analysen der Interaktion von *Yersinia enterocolitica* mit Wirtszellen *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

Das Reporterplasmid kodiert für das Chaperon SycE, und ein YopE Fragment fusioniert mit β -Lactamase. SycE ist ein Chaperon, was für die Sekretion und die Translokation von YopE essentiell ist (28, 52).

Ein YopE- β -Lactamase Fusionsprotein wurde als Reporter gewählt, weil YopE sehr stark sekretiert und transloziert wird. Um ein möglichst kleines Fusionsprotein verwenden zu können, wurde nur ein N-terminales Fragment der ersten 53 Aminosäuren verwendet. Aufgrund von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Sandra Kovacevic, unveröffentlicht; Martin Köberle, Diplomarbeit) wurde dieses Fragment als optimal für den verwendeten Zweck erachtet. Die ersten 15 Aminosäuren von YopE sind für die Sekretion notwendig, aber nicht ausreichend für Yop Injektion (52), während ein YopE Fragment mit den ersten 53 Aminosäuren für Sekretion und Translokation als optimal beschrieben wurde (71, 114). Zur Optimierung der späteren Reporterstämme wurde auf dem Reporterplasmid noch eine für L-Aspartat-Dehydrogenase kodierende (*asd*)-Kassette eingeführt.

E40 ist ein Stamm, der biochemisch identisch mit dem Patientenisolat W22703 ist (119). Der Stamm hat eine niedrigere Virulenz als das Patientenisolat WA-314 (99). Zusätzlich wurde bei dem Stamm E40 auf dem Chromosom das *asd*-Gen ausgeschaltet. Schaltet man die Expression der L-Aspartat-Dehydrogenase aus, kommt es zu einer fehlerhaften Zellwandsynthese. Dies führt zum Tod des Bakteriums (98). Durch Einfügen des *asd*-Gens auf dem Reporter- sowie Kontrollplasmid wurde das Plasmid metabolisch stabilisiert und konnte nicht mehr verloren gehen. So wurde garantiert, dass speziell bei Mausinfektionsversuchen das Plasmid in den Bakterien bleiben musste. Aus diesem Grund eignete sich der Stamm *Yersinia enterocolitica* E40 Δ *asd* am besten für die Untersuchungen *in vivo*.

Die durch Transformation von E40 Δ *asd* mit den Plasmiden yopE53bla und yopE53ova erhaltenen Bakterienstämme wurden als E40-pBla oder E40-pOva bezeichnet.

Das Kontrollplasmid E40-pOva hat anstatt dem YopE53-Bla-Fragment ein YopE53-Ovalbuminfragment. Mit dem Kontrollplasmid yopE53-Ova sollte ausgeschlossen werden, dass nach Infektion der Farbstoff CCF4 spontan zerfällt. Als eine weitere Kontrolle wurde das Reporterplasmid YopE53bla in eine sekretionsdefiziente YscN- Mutante transformiert. Am proximalen Ende des Basalkörpers des Sekretionsapparates befindet sich eine Proteinpumpe, an deren Antrieb maßgeblich eine als YscN bezeichnete ATPase beteiligt ist (98). Schaltet

man YscN aus, können keine Effektoren mehr sekretiert werden (Abb.11), somit konnte ausgeschlossen werden, dass β -Lactamase-Aktivität auch ohne Sekretion nachweisbar ist.

Das Plasmid wurde auch in andere Yersinien Stämme mit anderen Serotypen transformiert z.B. in das Patientenisolat WA-314, einen *Yersinia enterocolitica* Stamm des Serotyps O:8. Der Reporterstamm WA-314-pBla zeigte *in vitro* deutlich schlechtere Reportereigenschaften als der Stamm E40-pBla.

Wurden HeLa (Abb.11,13), Milzzellen (Abb.17) oder Knochenmarksmakrophagen (Abb.14,15) mit dem Stamm WA-314-pBla infiziert, konnte man weniger positive Zellen nachweisen als bei Infektionen mit dem Stamm E40-pBla (HeLa Abb. 13; 15, Milzzellen Abb. 16, Knochenmarksmakropagen Abb.14;15).

Die Sekretion der Stämme (Abb.7) zeigte Unterschiede zwischen den Stämmen WA-314-pBla und E40-pBla. Auch hier zeigte der Stamm WA-314-pBla schlechtere Sekretionseigenschaften als der Stamm E40-pBla. Die Stämme E40-pBla, E40-pOva und Δ YscN-pBla sezernieren YopE und YopE Fusionsproteine ähnlich stark. Somit konnte man die Kontrollstämme mit dem Reporterstamm vergleichen.

Ein Grund warum der Stamm E40-pBla bessere *in vivo* Reportereigenschaften hatte, könnte sein, dass er metabolisch stabilisiert war. Wobei diese Annahme unseren Untersuchungen, bei denen wir nach der Infektion einer Maus mit dem Stamm WA-314-pBla die Milzsuspension auf Agrarplatten mit Kanamycinresistenz ausplattiert hatten und es zu Bakterienwuchs kam, widerspricht. Es könnte nur sein, dass zwar die Kanamycinresistenz vorhanden war, die β -Lactamase aber nicht mehr vorhanden oder nicht mehr funktionell war. Es ist auch ausgeschlossen, dass die Zellen zwar infiziert werden, aber anschließend sterben, da die Anzahl der lebenden Zellen bei Infektionen mit dem Stamm E40-pBla und WA-314-pBla fast gleich ist (Daten nicht gezeigt).

Es gibt noch die Möglichkeit, dass die β -Lactamase aus irgendwelchen Gründen gefaltet wird, so dass sie nicht mehr sekretiert werden kann. Es gibt verschiedene Untersuchungen die zeigen, dass gefaltete Proteine nicht mehr sekretiert werden (84)), wobei neuere Untersuchungen dies auch wieder in Frage stellen (149).

Unumstritten ist, dass die beiden Stämme eine unterschiedliche Virulenz haben. Dies ist vor allem auf Unterschiede bei den Siderophoren und LPS zurück zu führen (37, 129).

Es wurde keine Reporter-Aktivität festgestellt, wenn die *Yersinia enterocolitica* Stämme 6471/76 (128) oder Rukola (97) verwendet wurden. Bei diesen Stämmen konnte man keine Sekretion von β -Lactamase-Fusions-Protein beobachten. Möglicherweise ist das Reporterplasmid nicht mit diesen Stämmen kompatibel.

Bei Infektionen von verschiedenen Zellen (HeLa, Knochenmarksmakrophagen, Milzzellen) konnte maximal 3 Stunden die E40-pBla Translokation detektiert werden (Abb.13; 15). Untersuchungen von anderen Gruppen zeigten, dass YopE von *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:8 an Lysin-62 und Lysin 75 ubiquitinyliert und degradiert wird. In dem YopE53 Rest ist das Lysin-62/75 nicht mehr vorhanden (8, 71, 114). Möglicherweise geschieht der Abbau Ubiquitin unabhängig. Ein anderer Grund für die relativ kurze Detektionszeit könnte auch der Abbau über den Ubiquitin-Proteasom Weg durch Ubiquitinylierung von Lysinresten der β -Lactamase sein (133).

4.2 Ist Nachweis der β -Lactamase-Aktivität mit Yop Injektion assoziiert?

Um zu definieren, dass der Nachweis der β -Lactamase-Aktivität spezifisch mit Yop Injektion assoziiert ist, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Nach Infektion mit E40-pOva von Zellen *in vitro* konnte nur bei ganz wenigen Zellen β -Lactamase-Aktivität als blaue Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Infektion mit einem Stamm, der ein irrelevantes Kontrollprotein transloziert, nur zu einer geringfügigen Hintergrundfluoreszenz führt. Ebenfalls konnte nur bei ganz wenigen Zellen β -Lactamase-Aktivität als blaue Fluoreszenz nach Infektion mit dem Stamm YscN-pBla nachgewiesen werden. Da dieser Stamm Yops nicht sekretieren kann, wäre die einzige Möglichkeit nach Infektion mit YscN-pBla β -Lactamase-Aktivität nachweisen zu können, wenn nach Phagozytose durch Wirtszellen intrazellulär Yops freigesetzt werden könnten. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Ebenso führt die Hemmung von Phagozytose von Bakterien durch Milzzellen mit Hilfe von Cytochalasin D nur zu einer geringfügigen Reduktion der Anzahl blauer Zellen. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Nachweis der β -Lactamase-Aktivität als blaue Fluoreszenz tatsächlich mit Yop Injektion assoziiert ist.

4.3 Einfluss von β_1 -Integrin und YadA auf die Yop Translokation

Die Integrine sind eine große Familie von heterodimeren Transmembran-Rezeptoren, die Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion vermitteln. Sie sind für die Invasion sowie für die Adhäsion sehr wichtig. Sie leiten die Internalisierung eines Bakteriums ein. Invasin, ein Protein von *Yersinia enterocolitica*, bindet an β_1 -Integrin. *Yersinia* Stämme können aber aktiv

die Aufnahme blocken, indem sie antiphagozytierende Faktoren in die Zielzelle injizieren(64).

GD25 Zellen besitzen kein β_1 -Integrin. Bei den GD25 β_1 -Integrin Zellen wurde β_1 -Integrin stabil transfiziert.

Wenn man GD25 und GD25 β_1 -Integrin Zellen mit *Yersinia enterocolitica* E40-pBla infiziert, kann man einen Unterschied nach CCF4-Färbung in der β -Lactamase-Aktivität (Blaufärbung) nachweisen. Bei GD25 Zellen war der prozentuale Anteil blauer Zellen unwesentlich höher als derjenige nach Infektion mit dem als Negativkontrolle verwendeten Stamm E40-pOva (Abb.25). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass β_1 -Integrine für die Translokation von Yops benötigt werden. Die Gruppe von Fällmann zeigte, dass bei GD25 Zellen die Anzahl an adhätierenden Bakterien im Vergleich zu GD25 β_1 -Integrin Zellen auf ein Drittel reduziert ist, was möglicherweise die reduzierte Nachweisbarkeit von Yop Injektion bewirken könnte (22). Das plasmid-kodierte Adhäsın *YadA* vermittelt Adhärenz z.B. an Epithelzellen und Phagozyten durch Bindung an zelluläres Fibronektin und Laminin. *YadA* ist weiterhin ein wichtiger Faktor für die Komplementresistenz und kann eine proinflammatorische Wirtsantwort auslösen (102, 109).

Bei einer Infektion von Milzzellen mit E40-pBla bzw. $\Delta YadA$ -pBla nimmt die Anzahl der blauen Zellen abhängig von der Infektionsdosis sowohl nach Infektion mit E40-pBla als auch mit $\Delta YadA$ -pBla zu. Allerdings ist nach Infektion mit $\Delta YadA$ -pBla Yop Translokation schon mit einer MOI 5 in ca. 70% aller Zellen nachweisbar, während nach Infektion mit E40-pBla hierfür eine MOI 50 benötigt wird. (Abb.26). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Ergebnissen, die zeigen, dass *YadA* für die Yop Injektion von Bedeutung ist. Für diese Untersuchungen wurde allerdings ein ganz anderes Reportersystem verwendet. Es wurde ein Fusionsprotein bestehend aus YopE und Calmodulin-abhängiger Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* verwendet und anschließend in Gesamtzelllysaten die Enzymaktivität der Adenylatcyclase nachgewiesen (131). Die geringere Adenylatcyclaseaktivität nach Infektion mit einer *YadA* Mutante deutet daraufhin, dass *YadA* für eine effektive Yop Injektion von Bedeutung ist. Mit dem Adenylatcyclasereportersystem lässt sich Yop Injektion indirekt durch Nachweis der Adenylatcyclase quantitativ nachweisen. Es lässt sich jedoch nicht feststellen, in welche Zellen Yops injiziert wurden. Dies leistet das YopE-Bla Reportersystem. Die Limitation des YopE-Bla Reportersystems besteht darin, dass Yop Injektion nicht quantifiziert werden kann. Wie diese unterschiedlichen Ergebnisse in Einklang zu bringen sind ist momentan unklar.

4.4 Etablierung des Reportersystems *in vivo*

Yersinia enterocolitica kann in Nagern eine Yersiniose auslösen (36). Die Yersiniose bei Labortieren zeigt auffallende Ähnlichkeiten mit der beim Menschen. Das Tiermodell (Maus) eignet sich um die Pathogenitätsmechanismen der Yersiniose genauer zu untersuchen (35). Um die Pathogenitätsmechanismen klären zu können, muss vorher bekannt sein, welche Zellen Effektor-Yops bekommen haben und sollte daher als erstes untersucht werden.

Eine wichtige Voraussetzung zur Interpretation von späteren *in vivo* Untersuchungen war die Frage, ob Yop Injektion in bestimmten Subpopulationen bevorzugt stattfindet oder nicht. Daher wurde nach Infektion von Milzzellen Yop Injektion in verschiedene Zellpopulationen in Zellkultur untersucht. Diese Untersuchungen ergaben keine signifikanten Unterschiede (Abb.23), die darauf schließen ließen, dass Yop Injektion präferentiell in B-Zellen, Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten oder dendritische Zellen stattfindet. Dies hat für die spätere Interpretation der *in vivo* Ergebnisse die Konsequenz, dass der Nachweis von β -Lactamase-Aktivität tatsächlich die Interaktion von Bakterien mit einer bestimmten Zellpopulation widerspiegelt und nicht durch unterschiedliche Nachweisbarkeit der Yop Injektion für verschiedene Zellpopulationen verzerrt wird.

In Zellkulturexperimenten wurden wie beschrieben mehrere *Y. enterocolitica* Stämme auf die Tauglichkeit als Reporterstämme zum Nachweis der Yop Translokation getestet. Die einzigen beiden Stämme, die aufgrund der *in vitro* Versuche für *in vivo* Versuche in Frage kamen, waren der *Y. enterocolitica* Stamm WA-314, Serotyp O:8 und E40, Serotyp O:9. Hierbei zeigte sich bereits in den Zellkulturexperimenten, dass mit dem Stamm WA-314 Yop Injektion relativ schlecht nachweisbar ist. In Vorexperimenten mit diesem Stamm *in vivo* konnte nach intravenöser Infektion keine Yop Translokation nachgewiesen werden.

Der Stamm E40 Serotyp O:9 ist jedoch nicht so virulent wie ein Stamm des Serotyps O:8 (29, 68, 115, 143). Die niedrige Virulenz des Stammes E40 hängt damit zusammen, dass der Stamm das Yersiniabactin nicht synthetisieren kann. Das Yersiniabactin ist ein Siderophor, welches für die Eisenaufnahme notwendig ist. Daraus ergibt sich die Schwierigkeit Keimzahlen zu erreichen, bei denen möglicherweise Yop Translokation nachweisbar wäre.

Als Kunstgriff, um dennoch hohe Keimzahlen mit diesem Stamm zu erzielen, musste den Tieren vor der Infektion Desferrioxamin (DFO, Desferal) injiziert werden. DFO ist ebenso ein Siderophor. Es bindet Eisen und ermöglicht den Bakterien dieses aufzunehmen. Als

unerwünschten Seiteneffekt hat die Gabe von DFO eine immunsupprimierende Wirkung auf die mit Yersinien infizierte Maus (122).

Durch DFO steigt die Anzahl an Bakterien in den Organen an (85, 108). Die hohe Infektionsdosis und der Einfluss von DFO beeinflussen die verschiedenen Zellpopulationen in der Milz. Es kommt zu einer Einwanderung von Zellen, die für die Bekämpfung einer Infektion da sind (Makrophagen, Granulozyten). Zur Etablierung des Systems wurden die Infektionsdosen 5×10^5 und 2×10^6 sowie die Zeitpunkte zwei und drei Tage gewählt. Es zeigte sich, dass mit diesen Infektionsdosen mittels Durchflusszytometrie Zellen mit erhöhter blauer Fluoreszenz nachweisbar waren (Abb.30).

Durch anschließende Fraktionierung von Zellen, die im Durchflusszytometer als blau oder grün detektiert wurden, konnte dies auch durch Immunfluoreszenz optisch bestätigt werden (Abb.32).

In den Fraktionen der sortierten Zellen konnte nur eine geringe Anzahl an Bakterien nachgewiesen werden (etwa 500 bis 3000 Bakterien/ 10^5 Milzzellen). Innerhalb jeder zweihundertsten Milzzelle konnte ein Bakterium nachgewiesen werden.

Die geringe Anzahl an Bakterien, die mit den Zellen assoziiert sind, spricht daher gegen die Möglichkeit, dass der Nachweis der β -Lactamase-Aktivität bedingt ist durch eine hohe Anzahl von Bakterien, die nach der Milzellisolierung entweder außen an den Milzzellen adhären oder internalisiert worden sind (Abb. 33).

Um eine optimale Infektionsdauer für die Durchführung weiterer Experimente zu bestimmen wurden C57BL/6 Mäuse zunächst für 6-, 24-, 48- und 72-Stunden mit 5×10^5 E40-pBla infiziert.

Die Anzahl der Bakterien in der Milz nahm im zeitlichen Verlauf zu und erreichte ein Maximum im Bereich zwischen 24- und 48-Stunden. 72-Stunden nach Infektion nahm die Anzahl an Bakterien in der Milz tendenziell ab (Abb.34). In ähnlicher Weise stieg die prozentuale Anzahl an Zellen, bei denen Yop Injektion detektierbar war (blaue Zellen) im zeitlichen Verlauf an und zeigte einen maximalen Wert zwei bis drei Tage nach Infektion (Abb.34). Aus diesem Experiment ergab sich als optimaler Zeitpunkt für weitere Experimente eine Infektionsdauer von zwei Tagen. Die verringerte Bakterienanzahl am Tag 3 nach Infektion in der Milz lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Wirkung von DFO abnahm.

Da bei allen Experimenten neben der Anzahl blauer Zellen auch die Keimzahlen in der Milz bestimmt wurden, konnte auch untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen Keimzahl

in der Milz und Yop Injektion gab. Hierfür wurden alle Experimente zusammengefasst, bei denen C57BL/6 Mäuse für 24-Stunden infiziert wurden. Eine Korrelation zwischen Keimzahl in der Milz und dem prozentualen Anteil blauer Zellen konnte am besten mit einer sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve angenähert werden: $y = 5,103 + 2,021 / (1 + \exp((1146 - x) / 5471))$ und einer Anpassungsgüte von $r^2 = 0,64$ bei 79 Freiheitsgraden. Mit Hilfe dieser Korrelation konnte man theoretisch die minimale Keimzahl als Voraussetzung für die Detektion von Yop Injektion mit diesem Reportersystem nachweisen (Abb. 36). Als cut-off wurde hierbei anhand der Infektion mit dem Kontrollstamm E40-pOva, welche in $0,2\% \pm 0,2$ blauer Zellen resultiert durch die Kalkulation Nachweisgrenze = $0,2\% \pm 3$ -fache Standardabweichung als $0,8\%$ blaue Zellen festgelegt. Nach der Formel : $y = 5,103 + 2,021 / (1 + \exp((1146 - x) / 5471))$ und einer Anpassungsgüte von $r^2 = 0,64$ bei 79 Freiheitsgraden korrelieren $0,8\%$ blaue Zellen mit einer Keimzahl von $6,4 \times 10^5$ E40-pBla in der Milz. Dies bedeutet, dass eine Keimzahl von circa $6,4 \times 10^5$ Bakterien minimal in der Milz vorhanden sein muss, um Yop Injektion in Milzzellen mit dem hier vorgestellten Reportersystem zweifelsfrei nachweisen zu können.

4.5 Welche Zellen sind von der Yop Translokation betroffen?

Während einer Yersinieninfektion *in vivo* kommt es in der Milz zur Ausbildung von Abszessen, die in manchen Bereichen nekrotisch werden. Die Abszesse sind deutlich abgegrenzt durch mononukleare Phagozyten und Lymphozyten. Makrophagen, Monozyten, NK-Zellen und Granulozyten wandern während der Infektion in die Milz ein (13, 88, 100, 106).

Ähnliche Beobachtungen konnten wir auch machen. Nach einer Infektionszeit von zwei Tagen untersuchten wir die Milz. Zur Identifikation verschiedener Zelltypen verwendeten wir spezifische Antikörper, die Oberflächenantigene von Zellen anfärben. Das Oberflächenantigen Gr1 ist ein spezifischer Marker, der vor allem auf neutrophilen Granulozyten sowie auf Makrophagen zu finden ist. In der Milz einer Maus gibt es zwei Populationen, eine die Gr1 stark exprimiert es sind die Gr1 hoch positiven Zellen, die neutrophilen Granulozyten. Die andere Population sind die Zellen, die Gr1 nur schwach exprimieren und auch CD11b positiv sind, das sind die Makrophagen (61). Wir untersuchten nur die Zellen, die Gr1 sehr stark exprimierten.

F4/80 kommt nur auf Makrophagen vor (73). CD11c⁺-Zellen sind hauptsächlich dendritische Zellen (32). Den Marker CD3 findet man überwiegend auf T-Zellen. Mit dem Marker CD19 werden B-Zellen identifiziert, mit CD49b NK-Zellen.

Die Zellverteilung änderte sich durch die Infektion. Es kam zu einem Anstieg des prozentualen Anteils der Zellen, welche die Oberflächenantigene F4/80, Gr1 und CD11c tragen. Zu einer Abnahme des prozentualen Anteils kam es bei den CD3⁺-Zellen (Abb. 37).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine andere Gruppe, die BALB/C Mäuse oral mit *Yersinia enterocolitica* Serotyp O:9 infiziert hatte. Es kam ebenso zu einem Anstieg der Zellzahl. Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten sowie der Makrophagen stieg an (115).

Bei einer Infektion von Mäusen mit *Yersinia pestis* wird Yop Translokation hauptsächlich in CD11c, CD11b und Gr1 positive Zellen detektiert (90). Bei einer Infektion mit Salmonellen findet man β -Lactamase-Sekretion in allen Zellpopulationen außer in den heranreifenden Makrophagen. Monozyten (Gr1⁺/CD11b⁺) sowie die Neutrophilen sind am stärksten betroffen (21). Bei unseren Untersuchungen mit *Yersinia enterocolitica* gliederte sich die Verteilung der Zellen, die β -Lactamase erhalten hatten, etwas anders auf.

Wenn man die einzelnen Zellpopulationen betrachtet, dann lässt sich Yop Injektion überproportional stark in F4/80⁺, CD11c⁺ und CD49b⁺-Zellen und nur relativ selten in CD19⁺ B-Zellen oder CD3⁺ T-Zellen nachweisen. Berücksichtigt man jedoch den prozentualen Anteil der einzelnen Subpopulationen an der Gesamtzahl der Milzzellen, wurde Yop Translokation primär in Gr1⁺-Zellen und CD19⁺-Zellen detektiert. So findet man nur in einem geringen Anteil der CD19⁺-Zellen Yop Injektion, da B-Zellen (CD19⁺) aber in einer großen Anzahl in der Milz vorhanden sind, ist der Anteil an CD19⁺-Zellen an der Gesamtpopulation blauer Zellen recht groß. Histologische Untersuchungen, die über die hier durchgeführten Untersuchungen hinausgingen, zeigten, dass nach Infektion mit E40-pBla Yersinien primär am Rand von Lymphfollikeln lokalisiert sind. Diese bestehen zu einem großen Anteil aus B-Zellen. Granulozyten (Gr1⁺), F4/80⁺ und CD11c⁺-Zellen wandern während einer Infektion aktiv in die Milz ein, um die Infektion zu bekämpfen. Es ist daher wenig überraschend, dass diese Zellpopulationen neben B-Zellen in der Milz von der Yop-Translokation am stärksten betroffen sind (13, 106).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Yop Translokation nach Infektion mit *Y. enterocolitica* sowohl in Zellen des angeborenen (Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten) als auch des adaptiven Immunsystems (B-Zellen) nachweisbar ist.

Ein gravierender Unterschied zu dem *Y. pestis* Modell ist hierbei, dass nach Infektion mit *Y. pestis* keine Yop Injektion in B-Zellen nachgewiesen werden konnte. Yop Translokation konnte also nur in Zellen des angeborenen Immunsystems nachgewiesen werden. Dies könnte ein charakteristisches Merkmal sein, wie sich *Y. enterocolitica* und *Y. pestis* Infektion unterscheiden. Für die Analyse der Yop Translokation verwendeten Marketon et al. nur eine kleine Zellpopulation der offensichtlich lebendigen Zellen (90). Der größte Teil der Milzzellen war offensichtlich unter den gewählten experimentellen Bedingungen bereits tot. Es könnte also sein, dass die meisten der B-Zellen in die Yops transloziert wurden, zu dem Zeitpunkt als Bla Aktivität gemessen wurde, bereits tot waren. Der Anteil toter Zellen war nach Infektion mit E40-pBla wesentlich geringer.

Bei einer Salmonelleninfektion scheinen sich die primären Zielzellen für Yop Translokation ebenfalls deutlich von denen nach einer *Y. enterocolitica* Infektion zu unterscheiden. Yop Injektion scheint nach einer Salmonelleninfektion primär auf neutrophile Granulozyten beschränkt zu sein. Im Gegensatz zu einer *Y. enterocolitica* Infektion ist der Anteil an CD11c⁺-Zellen (dendritischen Zellen), F4/80⁺-Zellen (Makrophagen) und CD19⁺-Zellen (B-Zellen), in die Translokation von Salmonellenproteinen nachweisbar ist, extrem klein.

Ein Unterschied zu den eigenen Untersuchungen bestand darin, dass die einzelnen Subpopulationen durch gleichzeitige Messung mehrerer Oberflächenmarker genauer bestimmt werden konnten.

Zählt man bei den eigenen Messungen die einzelnen Subpopulationen zusammen, kommt man auf über 100% Zellen in der Milz. Die Färbungen der Milzzellen mit nur einem Farbstoff sind ungenauer als Doppelfärbungen und erfassen die verschiedenen Zellsubpopulationen nur in grober Annäherung bzw. teilweise doppelt, da es einige Subpopulationen gibt, die durch Färbung mit mehreren Oberflächenmarkern besser eingegrenzt werden können. So sind als Beispiel auch manche Gr1⁺-Zellen auch CD11c⁻ (Monozyten) und manche F4/80⁺-Zellen sind ebenfalls Gr1⁺ (polymorphnuclear myeloid derived suppressor cells MDSC). Diese grobe Annäherung bzw. Ungenauigkeit der eigenen Messung musste aufgrund technischer Limitationen seitens des Durchflusszytometers in Kauf genommen werden. Trotz dieser Unschärfe der eigenen Messungen, die bei den Untersuchungen von *Y. pestis* durch Marketon et al. in ähnlicher Weise auftreten, lassen sich deutliche Unterschiede für die Translokation von Proteinen zwischen *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* und *Salmonella* feststellen (59, 90).

Dies unterstreicht die Bedeutung solcher Untersuchungen.

Im *Yersinia pestis* Modell von Marketon et al. wurde keine Translokation in B-Zellen beschrieben. Bei dem *Yersinia enterocolitica* Reportersystem wird in B-Zellen viel β -

Lactamase detektiert (90). Ein Grund dafür, dass man bei *Yersinia pestis* keine Translokation in B-Zellen gefunden hat, könnte sein, dass alle B-Zellen bereits tot waren. Um dies genauer zu untersuchen müssten die Versuche von Marketon et al. zu einem früheren Zeitpunkt enden. In zusätzlichen Untersuchungen versuchten wir die Yop Translokation in Peyer´schen Plaques nach einer oralen Infektion zu detektieren. Es war nicht möglich, blaue Zellen unter den gewählten Konditionen zu detektieren (Daten werden nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Menge an Bakterien in den Peyer´schen Plaques zu niedrig war (23) und die Yop Translokation unter dem Detektionslimit des Reportersystems lag.

Das bedeutet, dass das Bla-Reportersystem, so wie es etabliert wurde, seine Grenzen hat.

4.6 Einfluss von Zytokinen, Adaptermolekülen und Rezeptoren auf die Translokation von Yops

Es wurde gezeigt, dass Knock-out Mäuse, die sich nur durch die fehlende Expression bestimmter Zytokine, Rezeptoren oder Adaptermoleküle wie zum Beispiel MyD88, IFN- γ – Rezeptor und TNF-Rezeptor von den Wildtypmäusen unterscheiden, eine erhöhte Suszeptibilität bei einer *Yersinien*-Infektion zeigen (23, 25, 26, 135) . Mit Hilfe des Reportersystems sollte untersucht werden, ob diese Moleküle, die für die Abwehr einer *Yersinien*-Infektion eine große Bedeutung haben, ebenfalls Yop Translokation beeinflussen oder der Zelltropismus verändert wird.

Der Myeloide Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) ist ein universelles Adaptermolekül. Alle Toll-like Rezeptoren (TLRs) außer TLR3 regulieren über das Adaptermolekül MyD88 proinflammatorische intrazelluläre Signalwege.

MyD88 wird z.B. benötigt, um durch Aktivierung des I κ B Kinase Komplexes den Abbau von I κ B und damit die Kerntranslokation von NF κ B zu aktivieren. Fällt MyD88 aus, kommt es zu einer Beeinträchtigung der Aktivierung der proinflammatorischen Gentranskription, der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Das Immunsystem kann manche Infektionen deshalb schlechter bewältigen (137, 142).

Schaltet man MyD88 aus, kommt es zu einer reduzierten Immunantwort besonders in der frühen Phase der Infektion.

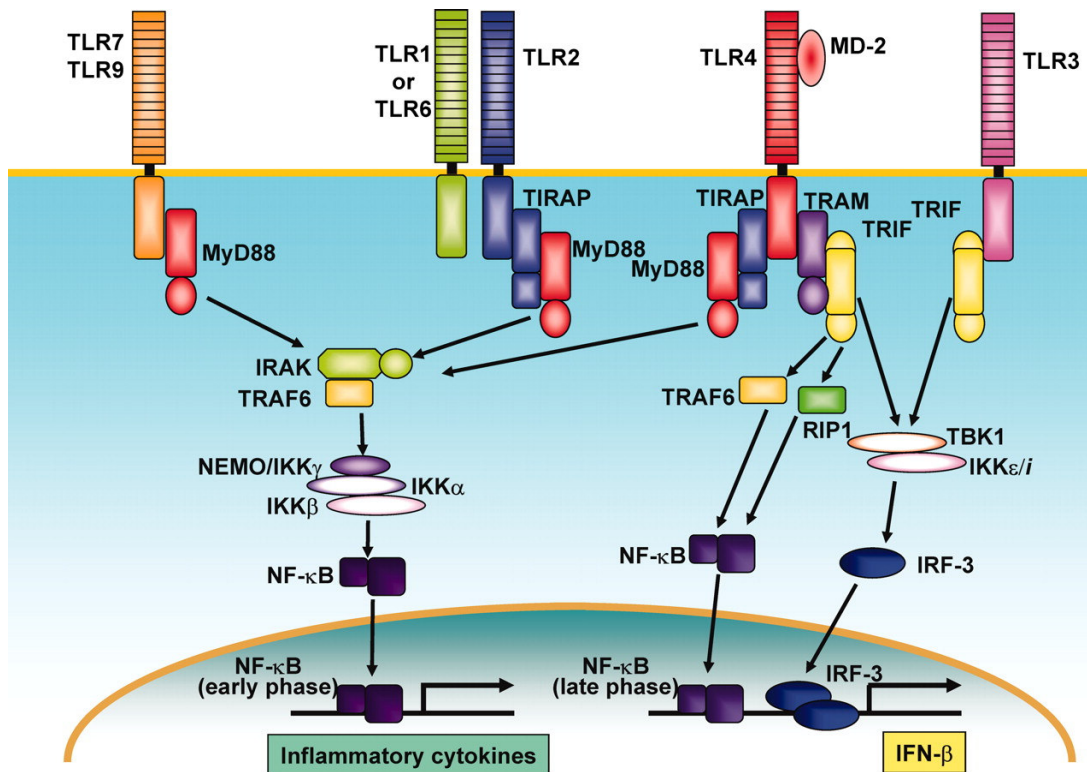


Abb. 52: TLR Signalweg nach (136).

Wie in den Vorarbeiten gezeigt wurde, gilt für das hier verwendete Bla-Reportersystem, dass die Keimzahl in der Milz mit der Anzahl an Zellen, bei denen Yop Injektion detektiert werden kann, korreliert. Als Voraussetzung für die Untersuchung einer veränderten Yop Translokation muss die Keimzahl in den zu vergleichenden Mäusen ebenfalls vergleichbar sein. In diesem Fall ist die DFO Gabe von Vorteil. Es konnten durch DFO Vorbehandlung Bedingungen etabliert werden, bei denen die Infektionsdosis und die Keimzahl in der Milz sowohl bei TNFRp55^{-/-}, IFN γ R^{-/-} Mäusen und kongenen C57/BL6 Mäusen nach Infektion mit E40-pBla vergleichbar waren. Ein Vergleich der Yop Injektion in Milzzellen von Myd88^{-/-} und C57BL/6 Mäusen ist nur eingeschränkt möglich, da die Keimzahl bei Myd88^{-/-} Mäusen höher war als bei den Kontrollmäusen (Abb.41). Die Anzahl an Myd88^{-/-} Milzzellen, bei denen Yop Translokation nachgewiesen werden konnte, war nicht höher als bei Milzzellen von Kontrollmäusen mit niedriger Keimzahl. MyD88-Defizienz scheint also keinen Einfluss auf die Nachweisbarkeit von Yop Injektion zu haben. Allerdings ist festzuhalten, dass nach Infektion von MyD88^{-/-} Mäusen eine Vielzahl der Zellen nekrotisch waren, was möglicherweise einen Grund darstellen könnte, warum der Anteil an blauen Zellen nicht höher ist als bei Wildtyp-Mäusen. Die Zellzahl war niedriger als bei den anderen Mäusen. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der blauen Zellen bei IFN γ R^{-/-} Mäusen und bei

TNFRp55^{-/-}-Mäusen signifikant erhöht. Der Grund hierfür ist soweit unklar. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu klären wie diese Zytokine möglicherweise Yop Translokation beeinflussen. Es ist ebenso unklar, ob es sich um einen indirekten oder direkten Effekt handelt. Nichtinfizierte Milzzellsuspensionen von einer Myd88 defizienten Maus bestehen zur Hälfte aus CD19⁺-Zellen (B-Zellen). Die CD3⁺-Zellen (T-Zellen) nehmen ein Drittel der Milz ein. In geringeren Zahlen sind F4/80⁺-Zellen (Makrophagen), Gr1⁺-Zellen (Granulozyten), CD11c⁺-Zellen (dendritische Zellen) und CD49⁺-Zellen (NK-Zellen) in der Milz vertreten.

Nach Infektion mit E40-pBla oder E40-pOva kommt es zu einer Zunahme der F4/80⁺-Zellen (Makrophagen) und der GR1⁺-Zellen (Granulozyten) sowie zu einer Abnahme der CD3⁺- (T-) und CD19⁺-Zellen (B-Zellen). Die Anzahl der CD11c⁺-Zellen (dendritischen Zellen) sowie die der CD49⁺-Zellen (NK-Zellen) in der Milz ändert sich im Verlauf bei einer Infektion einer Myd88 defizienten Maus nicht (Abb. 46).

Es konnte gezeigt werden, dass bei Myd88^{-/-} Mäusen in der Milz ein Drittel aller F4/80⁺-Zellen (Makrophagen), 15% aller CD11c⁺-Zellen (dendritischen Zellen), 10% aller CD49⁺-Zellen (NK-Zellen), und 10% aller Gr1⁺-Zellen (Granulozyten) blau gefärbt sind, im Gegensatz dazu konnte geringe blaue Fluoreszenz in den CD3⁺-Zellen (T-Zellen) und in den CD19⁺-Zellen (B-Zellen) nachgewiesen werden.

Daraus schließen wir, dass durch das Fehlen des Adaptermoleküls Myd88 die Granulozyten sich mehr an der aktiven Bekämpfung der Infektion beteiligen als andere Zellsubpopulationen. Dies sieht man auch bei der Gesamtverteilung der blauen Zellen. Die Gr1⁺-Zellen (Granulozyten) und die F4/80⁺-Zellen (Makrophagen) sind bei einer Myd88^{-/-}-Maus zu größeren Teilen an der Gesamtverteilung der blauen Zellen beteiligt als bei einer Wildtypmaus. Bei einer Wildtypmaus ist der Anteil der CD19⁺-Zellen (B-Zellen) dafür größer als bei den Myd88^{-/-} Mäusen (Abb. 47).

IFN- γ (Interferon- γ) ist ein Zytokin, welches hauptsächlich von NK-Zellen, T_H1 CD4⁺-Zellen und CD8⁺-Zellen sekretiert wird.

IFN- γ bewirkt, dass MHCI und MHCII stärker exprimiert werden, außerdem aktiviert es Makrophagen und NK-Zellen.

Nachdem an den IFN- γ -Rezeptor der Ligand gebunden wurde, kommt es zur Phosphorylierung von STAT1 durch JAK1 und JAK2. Es kommt zur Dimerisierung von STAT1 anschließend zur Translokation in den Zellkern. Dort induziert STAT1 die Transkription von verschiedenen IFN- γ induzierten Genen (40).

Nichtinfizierte Milzzellsuspensionen von einer IFN γ R $^{-/-}$ defizienten Maus bestehen zu 60% aus B-Zellen, 20% aus T-Zellen, ca. 20% aus Makrophagen und Granulozyten, 12% aus dendritischen Zellen und 5% aus NK-Zellen (CD49).

Nach Infektion mit E40-pBla oder E40-pOva kommt es zu einer Zunahme der F4/80 $^{+}$ -Zellen (Makrophagen) und der Gr1 $^{+}$ -Zellen (Granulozyten). Der prozentuale Anteil von CD3 $^{+}$ -Zellen (T-Zellen) und CD11c $^{+}$ -Zellen (dendritischen Zellen) nimmt in der Milz ab. Der prozentuale Anteil der CD19 $^{+}$ -Zellen (B-Zellen) sowie der CD49 $^{+}$ -Zellen (NK-Zellen) ändert sich im Verlaufe einer Infektion einer IFN γ R-defizienten Maus in der Milz nicht.

Die Anzahl an blauen Zellen jeder Milzzellpopulation ist bei den IFN γ R $^{-/-}$ Mäusen in jeder Zellsubpopulation höher als bei den Wildtypmäusen. Dies bedeutet, dass in der Milz von IFN γ R $^{-/-}$ Mäusen insgesamt mehr Zellen von Yop Injektion betroffen sind. Vergleicht man die Zusammensetzung der Milzpopulationen zwischen Wildtyp und IFN γ R $^{-/-}$ Mäusen nach Infektion, so findet man keine signifikante Änderung der Zusammensetzung der Zellpopulationen. In ähnlicher Weise bleibt die Zusammensetzung aller blauen Zellen unverändert. Daraus kann gefolgert werden, dass sich einfach nur die Gesamtanzahl der Zellen, in die Yop Injektion stattfindet, erhöht. Die Wirtszellen, mit denen die Bakterien primär interagieren, bleiben die gleichen. Warum in IFN γ R-defizienten Mäusen Yop Injektion in einer größeren Population von Zellen stattfindet, ist noch unklar. Hier sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Bei der Gesamtverteilung der blauen Zellen unterscheiden sich die IFN γ R $^{-/-}$ Knock-out-Maus und die Wildtypmaus in wenigen Zellpopulationen. Bei der Wildtypmaus haben die Gr1 $^{+}$ -Zellen (Granulozyten), die F4/80 $^{+}$ -Zellen (Makrophagen) und die CD49 $^{+}$ -Zellen (NK-Zellen) einen größeren Anteil bei der Gesamtverteilung der blauen Zellen. Bei der Verteilung aller blauen Zellen bei einer IFN γ R $^{-/-}$ Maus sind die CD19 $^{+}$ -Zellen (B-Zellen) und die CD3 $^{+}$ -Zellen (T-Zellen) in einer größeren Anzahl vorhanden als bei der Wildtypmaus (Abb. 43).

Durch das Fehlen von IFN- γ können Makrophagen und NK-Zellen nur in geringerem Maße aktiviert werden. Die CFU in der Milz ist bei der defizienten IFN- γ -Maus gegenüber dem Wildtyp nicht erhöht (Abb. 41). Trotzdem gibt es Unterschiede bei der Gesamtverteilung der blauen Zellen. Bei der Verteilung aller blauen Zellen in der Milz haben die Gr1 $^{+}$ -Zellen (Granulozyten), die F4/80 $^{+}$ -Zellen (Makrophagen) und die CD49 $^{+}$ -Zellen (NK-Zellen) einen größeren Anteil bei der Wildtypmaus (C57BL/6) in Bezug auf die IFN γ R-defizienten Mäuse.

Die Unterschiede könnten daher rühren, dass zwei immunsuppressive Effekte aufeinander treffen, einmal die Defizienz von IFN- γ und dann noch die Gabe von Desferal. Diese zwei Effekte könnten bewirken, dass einerseits die CFU sich zum Wildtyp nicht unterscheidet und

auf der anderen Seite, aber die Gesamtverteilung der blauen Zellen sich unterscheidet. Um konkrete Schlüsse ziehen zu können, müssten noch weitere Versuche durchgeführt werden.

Der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) ist ein multifunktionelles Zytokin, welches hauptsächlich von aktivierten Makrophagen, T-Zellen, Mastzellen und manchen Epithelzellen produziert wird. TNF spielt eine Rolle bei vielen biologischen Vorgängen, z.B. bei der Proliferation von Zellen, bei Entzündungsreaktionen, bei der Immunregulation und beim programmierten Zelltod infizierter Zellen z.B. bei der Eliminierung einer *Yersinia enterocolitica* Infektion. Der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor p55 (TNFRp55) ist der wichtigste Rezeptor für die Vermittlung des proinflammatorischen Effekts von TNF α . Obwohl TNF α als protektives Zytokin bei einer Yersinieninfektion gilt, sind TNFRp55 $^{-/-}$ Mäuse in der akuten Phase einer Yersinieninfektion resistenter als die C57BL/6 Kontrollmäuse, da sie weniger Gewebsschädigung zeigen und die Bakterien effektiver beseitigen (26, 132, 139, 151).

Bei den Kontrollmäusen kommt es aufgrund einer erheblich höheren Zelltodrate im Vergleich mit den TNFRp55 $^{-/-}$ Mäusen zu einem Abfall der CD4 $^{+}$ -T-Zellen in der Milz. Es kommt zu einem Anstieg der IFN- γ und zu einem Abfall der IL-10 Produktion (17, 22, 24, 25). TNF α beeinflusst die Immunreaktion in der Milz, die auf eine Infektion mit *Yersinia enterocolitica* folgt. Es sollte daher untersucht werden, ob auch die Yop Translokation in den verschiedenen Zellpopulationen der Milz beeinflusst wird. Nichtinfizierte Milzzellsuspensionen von einer TNFRp55-defizienten Maus bestehen zu mehr als der Hälfte aus CD19 $^{+}$ -Zellen, einen großen Anteil haben noch die CD3 $^{+}$ -Zellen, F4/80 $^{+}$ -Zellen und die Gr1 $^{+}$ -Zellen. CD11c $^{+}$ -Zellen und CD49 $^{+}$ -Zellen kommen nur noch zu geringen Prozentzahlen in der Milz vor.

Nach Infektion mit E40-pBla oder E40-pOva kommt es zu einer Vermehrung der Gr1 $^{+}$ -Zellen (Granulozyten) und zu einer Abnahme der Anzahl an F4/80 $^{+}$ -Zellen (Makrophagen), CD49 $^{+}$ -Zellen (NK-Zellen), CD3 $^{+}$ -Zellen (T-Zellen) und CD19 $^{+}$ -Zellen (B-Zellen). Die Anzahl der CD11c $^{+}$ -Zellen (dendritischen Zellen) ändert sich im Verlaufe der Infektion bei einer TNFRp55-defizienten Maus nicht.

Ähnlich wie bei der IFN γ R $^{-/-}$ Maus ist die Anzahl an blauen Zellen jeder Milzzellpopulation bei den TNFRp55 $^{-/-}$ Mäusen höher als bei den Wildtypmäusen. Vergleicht man die Zusammensetzung der Zellpopulationen nach Infektion von C57BL/6- und TNFR $^{-/-}$ Mäusen, so findet man einen signifikant erhöhten prozentualen Anteil von F4/80 $^{+}$ -, CD11c $^{+}$ - und Gr1 $^{+}$ -Zellen und einen signifikant erniedrigten Anteil an CD19 $^{+}$ -Zellen in der Milz der

TNFRp55^{-/-} Mäusen. In ähnlicher Weise verändert sich auch die Zusammensetzung aller blauen Zellen (Zellen, in denen Yop Injektion nachgewiesen wurde). Der Anteil blauer Gr1⁺- und F4/80⁺-Zellen ist erhöht gegenüber der Wildtypmaus. Die Veränderung der Zusammensetzung aller

TNFRp55^{-/-} Milzzellen in die Yop Injektion erfolgt, scheinen also primär durch die veränderte Zusammensetzung der Milzpopulation zustande zu kommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das hier vorgestellte Reportersystem für die Untersuchung von Yop Translokation in der Zellkultur und auch in Mausinfektionsmodellen geeignet ist. Es konnte mikroskopisch und am Durchflusszytometer gezeigt werden, dass die Infektion mit E40-pBla zu blauen Zellen führte. Infizierte man HeLa, Milzzellen oder Knochenmarksmakrophagen konnte man bei bis zu 3 Stunden nach Infektion Bla in den Zellen nachweisen.

Die Wichtigkeit von verschiedenen Faktoren wie YadA und Integrine für die Yop Translokation bei einer Yersinia Infektion konnten gezeigt werden.

Bei der Infektion von Mäusen *in vivo* musste eine hohe Infektionsdosis verwendet werden, um Bakterien nachweisen zu können. Die Infektionsdosis von 5×10^5 und die Dauer von zwei Tagen erwies sich als optimal. *In vivo* konnten verschiedene Subpopulationen der Milz auf Yop Translokation untersucht werden.

Es wurden noch verschiedene Knock-out-Mäuse untersucht, um herauszufinden, welche Rolle die fehlende Expression bestimmter Zytokine, Rezeptoren oder Adaptermoleküle spielt.

Es gibt aber auch Limitationen dieses Systems. Nicht alle *Yersinia enterocolitica* Stämme können mit diesem Reportersystem verwendet werden. Ebenso ist mit dem soweit etablierten Reportersystem der Nachweis der Yop Translokation nach orogastraler Infektion nicht möglich.

Dennoch stellt dieses System die Basis für weitere Untersuchungen dar, die aufklären sollen, welche bakteriellen Faktoren für Yop Translokation von Bedeutung sind und wie Wirtsfaktoren eventuell Yop Translokation beeinflussen können.

5. Zusammenfassung

Bei einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* kommt es über das Typ III Sekretionssystem zur Translokation der Yops in eukaryontische Zellen. Zum besseren Verständnis der Yersinien Infektion ist es wichtig die Zielzellen der Translokation zu kennen.

In dieser Studie wurde ein Reportersystem etabliert, mit dem man Yop Translokation *in vitro* und *in vivo* nachweisen kann. Es wurde in *Yersinia enterocolitica* E40 und WA-314 ein zusätzliches Plasmid gebracht. Dieses Plasmid kodiert für ein N-terminales YopE Fragment, (53 Aminosäuren), fusioniert mit einer β -Lactamase bzw. statt der β -Lactamase zur Kontrolle einer Ovalbumin-Domäne. Mit Hilfe dieses Reporterplasmids kann man nachweisen, in welche Zellen die Effektoren transloziert werden, da bei der Sekretion der Effektoren in die Zielzelle das YopE- β -Lactamase Fusionsprotein ebenso in die Zielzelle gebracht wird.

Die infizierten Zellen werden mit einem zellmembrangängigen Farbstoff CCF4-AM gefärbt. Regt man den Farbstoff CCF4-AM bei 409nm an, emittiert er im ungespaltenen Zustand bei 520nm über ein FRET („Fluorescence Resonance Energy Transfer“). β -Lactamase spaltet den Farbstoff CCF4-AM. Durch die Spaltung emittiert er dann im blauen Bereich bei 447nm.

Bei einem Bakterienstamm wurde YscN ausgeschaltet. Schaltet man YscN aus, können keine Effektoren mehr sekretiert werden. In diesen Bakterienstamm wurde das Plasmid YopE53- β -Lactamase gebracht. Dieser Stamm diente zur Spezifitätskontrolle.

Bei Zellen, die mit E40-pBla bzw. WA-314-pBla infiziert sind, sieht man im Mikroskop eine Blaufärbung. Die Zellen, die mit E40-pOva bzw. WA-314-pBla oder Δ YscN-pBla infiziert sind, sind grün gefärbt. In HeLa-, Milz oder Knochenmarksmakrophagen kann man bis zu drei Stunden Infektionszeit β -Lactamase detektieren. Bei Infektionen von Knochenmarksmakrophagen mit dem Stamm E40-pBla können doppelt soviel blaue Zellen nachgewiesen werden wie bei Infektionen mit dem Stamm WA-314-pBla. Der Anteil an unspezifischer Färbung ist 1,5%. Nach Infektion mit dem Stamm Δ YscN-pBla wurden maximal 6 % an blauen Zellen detektiert.

Wenn man GD25 und GD25 β 1-Integrin Zellen mit *Yersinia enterocolitica* E40-pBla infiziert, kann man einen Unterschied nach CCF4-Färbung in der β -Lactamase-Aktivität (Blaufärbung) nachweisen. Bei den GD25 β 1-Integrin Zellen war der prozentuale Anteil blauer Zellen 15%. Bei GD25-Zellen war der prozentuale Anteil blauer Zellen 1%. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass β 1-Integrine für die Translokation von Yops benötigt werden. Bei einer Infektion von Milzzellen mit E40-pBla bzw. Δ YadA-pBla nimmt die

Anzahl der blauen Zellen abhängig von der Infektionsdosis sowohl nach Infektion mit E40-pBLA als auch mit Δ YadA-pBla zu. Allerdings ist nach Infektion mit Δ YadA-pBla Yop Translokation schon mit einer MOI 5 in ca. 70% aller Zellen nachweisbar, während nach Infektion mit E40-pBla hierfür eine MOI 50 benötigt wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass YadA für die Yop Injektion nicht essentiell ist.

In vitro erfolgt die Infektion von *Yersinia enterocolitica* in verschiedenen Zellpopulationen der Milz mit gleicher Effektivität.

Die Infektionsdosis bei einer *intravenösen* Infektion mit dem Stamm E40-pBla lag bei 5×10^5 Bakterien bei einer Infektionszeit von zwei Tagen. Die Zellverteilung in der Milz von einer Maus änderte sich während der Infektion. Es kam zu einem Anstieg des prozentualen Anteils an F4/80⁺-Zellen (Makrophagen), Gr1⁺-Zellen (Granulozyten) und CD11c⁺-Zellen (dendritischen Zellen). Es kam zu einer Abnahme des prozentualen Anteils an CD3⁺-Zellen (T-Zellen). Wenn man die einzelnen Zellpopulationen betrachtet, dann lässt sich Yop Injektion überproportional stark in F4/80⁺-, CD11c⁺- und CD49⁺-Zellen und nur relativ selten in CD19⁺-Zellen oder CD3⁺-Zellen nachweisen.

Berücksichtigt man jedoch den prozentualen Anteil der einzelnen Subpopulationen an der Gesamtverteilung aller blauen Zellen, wurde Yop Translokation primär in Gr1⁺-Zellen und CD19⁺-Zellen detektiert.

Des Weiteren wurden noch untersucht, wie Knock-out-Mäuse, die sich nur durch die fehlende Expression bestimmter Zytokine, Rezeptoren oder Adaptermoleküle wie zum Beispiel MyD88, IFN- γ -Rezeptor und TNF-Rezeptor, von den Wildtypmäusen unterscheiden.

Mäuse, bei denen eine Defizienz im Gen MyD88 vorlag, hatten eine signifikant höhere Keimzahl in der Milz als die Wildtypmäuse. Der Anteil an Yop-translozierten Zellen nach Infektion war bei IFN γ R^{-/-} und TNFR^{-/-} Mäusen höher als bei infizierten Wildtypmäusen. Die Anzahl an Yop-translozierten Zellen nach Infektion von Myd88^{-/-} Mäusen war nicht unterschiedlich.

Die Gr1⁺-Zellen und die F4/80⁺-Zellen sind bei einer Myd88^{-/-} Maus zu größeren Teilen an der Gesamtverteilung der Zellen, in die β -Lactamase transloziert wird, beteiligt als bei einer Wildtypmaus.

Durch das Fehlen des Adaptermoleküls Myd88 beteiligen sich die Granulozyten mehr an der aktiven Bekämpfung der Infektion als andere Zellsubpopulationen.

Durch das Fehlen von IFN- γ können Makrophagen und NK-Zellen nur in geringerem Maße aktiviert werden. Bei der Gesamtverteilung aller β -Lactamase positiven Zellen haben die F4/80⁺-Zellen und die CD49⁺-Zellen einen größeren Anteil bei der Wildtypmaus (C57BL/6)

in Bezug auf die IFN γ R-defizienten Mäuse. Vergleicht man die Zusammensetzung der Zellpopulationen nach Infektion von C57BL/6- und TNFR $^{-/-}$ Mäusen, so findet man einen erhöhten prozentualen Anteil der Gr1 $^{+}$ -Zellen und der F4/80 $^{+}$ -Zellen bei der Verteilung der Zellen, die β -Lactamase positiv sind. Dies scheint primär durch die veränderte Zusammensetzung der Milzpopulation zustande zu kommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das hier vorgestellte Reportersystem für die Untersuchung von Yop Translokation in der Zellkultur und auch in Mausinfektionsmodellen geeignet ist. Es gibt Limitationen dieses Systems. Mit dem soweit etablierten Reportersystem ist der Nachweis der Yop Translokation nach *orogastraler* Infektion nicht möglich. Dieses System stellt die Basis für weitere Untersuchungen dar, die aufklären sollen, welche bakteriellen Faktoren für Yop Translokation von Bedeutung sind und wie Wirtsfaktoren eventuell Yop Translokation beeinflussen können.

6 Abkürzungen

Einheiten:

| | |
|-------------------------|-------------------|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µL | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| bp | Basenpaare |
| cm | Zentimeter |
| d | Tag |
| g (beim Zentrifugieren) | Erdbeschleunigung |
| g | Gramm |
| h | Stunde(n) |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilo Dalton |
| M | Molar |
| mg | Milligramm |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| pmol | Pikomol |
| U | Units |
| V | Volt |

Chemikalien:

| | |
|-------------|--|
| Aqua.dest | einfach destilliertes Wasser |
| Aqua.bidest | zweifach destilliertes Wasser |
| Amp | Ampicilin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| bla | β-Lactamase |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin) |
| Cm | Chloramphenicol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| ECL | <i>enhanced chemoluminescence</i> |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure |
| EGTA | Ethylen-Glycol-Bis-Aminoethylether-N,N,N',N'-Tetraessigsäure |
| FCS | fötale Kälberserum |
| GM-CSF | <i>granulocyte-monocyte colony stimulating factor</i> |
| HBSS | <i>Hank's balanced salt solution</i> |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| Inv | Invasin |
| Kan | Kanamycin |
| LB | Luria Bertani |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| Mg | Magnesium |

| | |
|-------|---|
| Nal | Nalidixin |
| Ova | Ovalbumin |
| PAA | Polyacrylamid |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung) |
| PFA | Paraformaldehyd |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> Natriumdodecylsulfat |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |

| | |
|------------------|---|
| ad | auffüllen |
| Abb. | Abbildung |
| APC | Allophycocyanin |
| CFU | <i>colony forming unit</i> (Kolonie bildende Einheit) |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> Desoxyribnukleinsäure |
| <i>et al.</i> | und andere |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorter</i> |
| ICAM | <i>intercellular adhesion molecule</i> |
| i.p. | <i>intraperitoneal</i> |
| i.v. | <i>intravenös</i> |
| KanR | Kanamycin -Resistenz |
| lacZa | beta -Galactosidase Gen |
| LD ₅₀ | mittlere letale Dosis |
| MAP | <i>mitogen activated protein</i> |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> |
| M-Zelle | <i>membraneous</i> oder <i>microfold</i> -Zelle |
| NF-κB | Nukleärer Faktor-κB |
| NK | <i>natural killer</i> |
| OD | <i>optical density</i> (optische Dichte) |
| ori | <i>origin of replication</i> |
| PAGE | Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion) |
| pYV | <i>Yersinia</i> -Virulenzplasmid |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| Syc | <i>specific Yop chaperone</i> |
| Tab. | Tabelle |
| IKK | inducible IκB-kinase |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| UV | ultraviolett |
| YadA | <i>Yersinia adhesin A</i> |
| Yop | <i>Yersinia outer protein</i> |

7 Literaturverzeichnis

1. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 1998 Jul;9(1):143-50.
2. Aepfelbacher M, Trasak C, Wilharm G, et al. Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J Biol Chem* 2003 Aug 29;278(35):33217-23.
3. Aili M, Telepnev M, Hallberg B, Wolf-Watz H, Rosqvist R. In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity. *Microb Pathog* 2003 Jun;34(6):297-308.
4. Aktories K, S. G., Just I. 2000. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem*. May-Jun;381(5-6):421-6.
5. Aleksic S, Rohde R, Mihajlovic L. Diagnosis of infections by *Yersinia enterocolitica*. Bacteriology and clinical manifestations observed in nine cases of infection, Hamburg 1973. *Infection* 1974;2(1):40-5.
6. Amer AO, Swanson MS. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr Opin Microbiol* 2002 Feb;5(1):56-61.
7. Andor A, T. K., Essler M, Roggenkamp A, Wiedemann A, Heesemann J, Aepfelbacher M. 2001. YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol*. May;3(5):301-10.
8. Angot A, V. A., Genin S, Peeters N. 2007. Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems. *PLoS Pathog* . Jan;3(1).
9. Arts J, van BR, Filloux A, Tommassen J, Koster M. Export of the pseudopilin XcpT of the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion system via the signal recognition particle-Sec pathway. *J Bacteriol* 2007 Mar;189(5):2069-76.
10. Autenrieth IB, Beer M, Bohn E, Kaufmann SHE, Heesemann J. Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. *Infect Immun* 1994;62:2590-9.
11. Autenrieth IB, Firsching R. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol* 1996;44:285-94.
12. Autenrieth IB, Heesemann J. In vivo neutralization of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma abrogates resistance to *Yersinia enterocolitica* in mice. *Med Microbiol Immunol* 1992;181:333-8.

13. Autenrieth IB, Hantschmann P, Heymer B, Heesemann J. Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiol* 1993;187:1-16.
14. Autenrieth IB, Kempf V, Sprinz T, Preger S, Schnell A. Defence mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. *Infect Immun* 1996;64:1357-68.
15. Autenrieth IB, Tingle A, Reske Kunz A, Heesemann J. T lymphocytes mediate protection against *Yersinia enterocolitica* in mice: characterization of murine T-cell clones specific for *Y. enterocolitica*. *Infect Immun* 1992;60:1140-9.
16. Autenrieth IB, Vogel U, Preger S, Heymer B, Heesemann J. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T- cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect Immun* 1993;61:2585-95.
17. Bemelmans MH, van Tits LJ, Buurman WA. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol* 1996;16(1):1-11.
18. Benabdillah R, Mota LJ, Lutzelschwab S, Demoinet E, Cornelis GR. Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. *Microb Pathog* 2004 May;36(5):247-61.
19. Black DS, Bliska JB. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J* 1997 May 15;16(10):2730-44.
20. Black DS, Montagna LG, Zitsmann S, Bliska JB. Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. *Mol Microbiol* 1998 Sep;29(5):1263-74.
21. Black RE, Jackson RJ, Tsai T, et al. Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N Engl J Med* 1978;298:76-9.
22. Bliska JB, Guan KL, Dixon JE, Falkow S. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1187-91.
23. Bohn E, Autenrieth IB. IL-12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN-gamma production in NK cells and CD4+ T cells. *J Immunol* 1996;156:1458-68.
24. Bohn E, Heesemann J, Ehlers S, Autenrieth IB. Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1994;62:3027-32.
25. Bohn E, Sing A, Zumbihl R, et al. IL-18 (IFN-g-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J Immunol* 1998;160:299-307.

26. Bohn E, Schmitt E, Bielfeldt C, Noll A, Schulte R, Autenrieth IB. Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. *Infect Immun* 1998 May;66(5):2213-20.
27. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* 1997 Apr;10(2):257-76.
28. Boyd AP, Lambermont I, Cornelis GR. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* 2000 Sep;182(17):4811-21.
29. Braun V, Hancock RE, Hantke K, Hartmann A. Functional organization of the outer membrane of *Escherichia coli*: phage and colicin receptors as components of iron uptake systems. *J Supramol Struct* 1976;5:37-58.
30. Brenner DJ. Speciation in *Yersinia*. *Contrib Microbiol Immunol* 1979;5:33-43
31. Briones G, Hofreuter D, Galan JE. Cre reporter system to monitor the translocation of type III secreted proteins into host cells. *Infect Immun* 2006 Feb;74(2):1084-90.
32. Browne E. P., Littman D. R., Myd88 Is Required for an Antibody Response to Retroviral Infection. *PLoS Pathog*. 2009 February; 5(2): e1000298. Published online 2009 February 13
33. Carter PB. Animal model of human disease. *Yersinia enterocolitica*. Animal model: oral *Yersinia enterocolitica* infection of mice. *Am J Pathol* 1975;81:703-6.
34. Carter PB. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect Immun* 1975;11:164-70.
35. Carter PB, Collins FM. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in mice: kinetics of growth. *Infect Immun* 1974;9:851-7.
36. Carter PB, Varga CF, Keet EE. New strain of *Yersinia enterocolitica* pathogenic for rodents. *Appl Microbiol* 1973;26:1016-8.
37. Chambers CE, Sokol PA. Comparison of siderophore production and utilization in pathogenic and environmental isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 1994 Jan;32(1):32-9.
38. Chang AC, Cohen SN. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 1978 Jun;134(3):1141-56.
39. Charpentier X, Oswald E. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J Bacteriol* 2004 Aug;186(16):5486-95.
40. Chesler DA, Reiss CS. The role of IFN-gamma in immune responses to viral infections of the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002 Dec;13(6):441-54.

41. Chester B, Stotzky G, Bottone EJ, Malowany MS, Allerhand J. *Yersinia enterocolitica*: biochemical, serological, and gas-liquid chromatographic characterization of rhamnose-, raffinose-, melibiose-, and citrate-utilizing strains. *J Clin Microbiol* 1977 Nov;6(5):461-8.
42. Chimini G, Chavrier P. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol* 2000 Oct;2(10):E191-E196
43. Cornelis GR, Biot T, Lambert de Rouvroit C, et al. The *Yersinia yop* regulon. *Mol Microbiol* 1989;3:1455-9.
44. Cornelis GR, Van GF. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:735-74.:735-74.
45. Craig L, Volkmann N, Arvai AS, et al. Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell* 2006 Sep 1;23(5):651-62.
46. Day JB, Ferracci F, Plano GV. Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by *Yersinia pestis* yopN, tyeA, sycN, yscB and lcrG deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies. *Mol Microbiol* 2003 Feb;47(3):807-23.
47. Denecker G, Totemeyer S, Mota LJ, et al. Effect of Low- and High-Virulence *Yersinia enterocolitica* Strains on the Inflammatory Response of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Infect Immun* 2002 Jul;70(7):3510-20.
48. Dersch, P. and R. R. Isberg. An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors." *Infect.Immun.* 68.5 (2000): 2930-38.
49. Dersch, P. and R. R. Isberg. "A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association." *EMBO J.* 18.5 (1999): 1199-213.
50. Dodd DC, Bassford PJ, Jr., Eisenstein BI. Dependence of secretion and assembly of type 1 fimbrial subunits of *Escherichia coli* on normal protein export. *J Bacteriol* 1984 Sep;159(3):1077-9.
51. Fassler R, Pfaff M, Murphy J, et al. Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *J Cell Biol* 1995 Mar;128(5):979-88.
52. Feldman MF, Muller S, Wuest E, Cornelis GR. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol* 2002 Nov;46(4):1183-97.
53. Forsberg A, Wolf-Watz H. Genetic analysis of the yopE region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression. *J Bacteriol* 1990 Mar;172(3):1547-55.

54. Francetic O, Buddelmeijer N, Lewenza S, Kumamoto CA, Pugsley AP. Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG Pseudopilin component of a type II secretion system. *J Bacteriol* 2007 Mar;189(5):1783-93.
55. Francetic O, Pugsley AP. Towards the identification of type II secretion signals in a nonacylated variant of pullulanase from *Klebsiella oxytoca*. *J Bacteriol* 2005 Oct;187(20):7045-55.
56. Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 1999 May 21;284(5418):1322-8.
57. Galyov EE, Hakansson S, Forsberg A, Wolf-Watz H. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 1993;361:730-2.
58. Galyov EE, Hakansson S, Wolf-Watz H. Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 1994 Aug;176(15):4543-8.
59. Geddes K, Cruz F, Heffron F. Analysis of cells targeted by *Salmonella* type III secretion in vivo. *PLoS Pathog.* 2007 Dec;3(12):e196.
60. Gemski P, Lazere JR, Casey T. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1980;27:682-5.
61. Goni O, Alcaide P, Fresno M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *Int Immunol* 2002 Oct;14(10):1125-34.
62. Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP, Cornelis GR. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* 2002 Aug;70(8):4165-76
63. Grutzkau A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 1990;31:1011-5
64. Gustavsson A, Armulik A, Brakebusch C, Fassler R, Johansson S, Fallman M. Role of the beta1-integrin cytoplasmic tail in mediating invasin-promoted internalization of *Yersinia*. *J Cell Sci* 2002 Jul 1;115(Pt 13):2669-78.
65. Hakansson S, Galyov EE, Rosqvist R, Wolf-Watz H. The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol* 1996 May;20(3):593-603.
66. Hakansson S, Schesser K, Persson C, et al. 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* 1996 Nov 1;15(21):5812-23.

67. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557-80.
68. Hancock GE, Schaedler RW, MacDonald TT. *Yersinia enterocolitica* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect Immun* 1986;53:26-31.
69. Heesemann J. Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microbiol Lett* 1987;48:229-33.
70. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, a'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004 Dec;68(4):692-744.
71. Hentschke M, Trulzsch K, Heesemann J, Aepfelbacher M, Ruckdeschel K. Serogroup-related escape of *Yersinia enterocolitica* YopE from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Infect Immun* 2007 Sep;75(9):4423-31.
72. Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259:1742-1745.
73. Hume, D.A., Gordon, S., Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex, *J Exp Med*. 1983 May 1; 157(5): 1704–1709.
74. Isberg, R. R. and J. M. Leong. "Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells." *Cell* 60.5 (1990): 861-71.
75. Jacobi CA, Roggenkamp A, Rakin A, Zumbihl R, Leitritz L, Heesemann J. In vitro and in vivo expression studies of yopE from *Yersinia enterocolitica* using the gfp reporter gene. *Mol Microbiol* 1998 Nov;30(4):865-82.
76. Jarchau T, Chakraborty T, Garcia F, Goebel W. Selection for transport competence of C-terminal polypeptides derived from *Escherichia coli* hemolysin: the shortest peptide capable of autonomous HlyB/HlyD-dependent secretion comprises the C-terminal 62 amino acids of HlyA. *Mol Gen Genet* 1994 Oct 17;245(1):53-60.
77. Journet L, Agrain C, Broz P, Cornelis GR. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* 2003 Dec 5;302(5651):1757-60.
78. Juris SJ, Shao F, Dixon JE. *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol* 2002 Apr;4(4):201-11.
79. Keet EE. *Yersinia enterocolitica* septicemia. Source of infection and incubation period identified. *N Y State J Med* 1974;74:2226-30.
80. Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 1994 Oct;19(10):415-21.

81. Kobe B, Deisenhofer J. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol* 1995 Jun;5(3):409-16.
82. Koornhof HJ, S. R., Jr., Nicol M. 1999. Yersiniosis. II: The pathogenesis of *Yersinia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Feb;18(2):87-112.
83. Kubori T, M. Y., Nakamura D, et al. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* Apr 24;280(5363):602-5.
84. Lee V.T., Schneewind O, Yop Fusions to Tightly Folded Protein Domains and Their Effects on *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion. *J Bacteriol*. 2002 July; 184(13): 3740–3745. doi: 10.1128/JB.184.13.3740-3745.2002.
85. Lesic B, Foulon J, Carniel E. Comparison of the effects of deferiprone versus deferoxamine on growth and virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jun;46(6):1741-5.
86. Li R, Y. L., Lindholm K, Konishi Y, Yue X, Hampel H, Zhang D, Shen Y. 2004 Feb 18. Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. *J Neurosci*. 24:1760-71.
87. Liu H, Sidiropoulos P, Song G, et al. TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *J Immunol* 2000 Apr 15;164(8):4277-85.
88. Lukaszewski RA, Kenny DJ, Taylor R, Rees DG, Hartley MG, Oyston PC. Pathogenesis of *Yersinia pestis* infection in BALB/c mice: effects on host macrophages and neutrophils. *Infect Immun* 2005 Nov;73(11):7142-50.
89. Lundgren E, Carballeira N, Vazquez R, et al. Invasin of *Yersinia pseudotuberculosis* activates human peripheral B cells. *Infect Immun* 1996 Mar;64(3):829-35.
90. Marketon MM, DePaolo RW, DeBord KL, Jabri B, Schneewind O. Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* 2005 Sep 9;309(5741):1739-41.
91. Martin T, Kasian GF, Stead S. Family outbreak of yersiniosis. *J Clin Microbiol* 1982 Oct;16(4):622-6.
92. May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2001 Mar;114(Pt 6):1061-77.
93. Michiels T, Vanooteghem JC, Lambert de RC, et al. Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 1991 Aug;173(16):4994-5009.
94. Monack DM, Meccas J, Ghori N, Falkow S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Sep 16;94(19):10385-90.
95. Mori H, Ito K. The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol* 2001 Oct;9(10):494-500.

96. Mueller CA, Broz P, Muller SA, et al. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* 2005 Oct 28;310(5748):674-6.
97. Muller-Loennies, S., S. Rund, E. Ervela, M. Skurnik, and O. Holst. 1999. The structure of the carbohydrate backbone of the core-lipid A region of the lipopolysaccharide from a clinical isolate of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Eur. J. Biochem.* 261:19-24.
98. Narayanan K, Warburton PE. DNA modification and functional delivery into human cells using *Escherichia coli* DH10B. *Nucleic Acids Res* 2003 May 1;31(9):e51.
99. Neyt C, Iriarte M, Thi VH, Cornelis GR. Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*. *J Bacteriol* **1997 Feb**;179(3):612-9.
100. Oellerich MF, Jacobi CA, Freund S, et al. *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect Immun* 2007 Aug;75(8):3802-11.
101. Orth K, Palmer LE, Bao ZQ, et al. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* 1999 Sep 17;285(5435):1920-3.
102. Paerregaard A, Espersen F, Jensen OM, Skurnik M. Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect Immun* 1991;59:253-60.
103. Palmer LE, Pancetti AR, Greenberg S, Bliska JB. YopJ of *Yersinia* spp. is sufficient to cause downregulation of multiple mitogen-activated protein kinases in eukaryotic cells. *Infect Immun* 1999 Feb;67(2):708-16.
104. Pfeffer, K., T. Matsuyama, T. M. Kundig, A. Wakeham, K. Kishihara, A. Shahinian, K. Wiegmann, P. S. Ohashi, M. Kronke, and T. W. Mak. 1993. Mice deficient for the 55 Kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73:457-467.
105. Portnoy DA, Moseley SL, Falkow S. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect Immun* 1981;31:775-82.
106. Pujol C, Bliska JB. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin Immunol* 2005 Mar;114(3):216-26.
107. Ramamurthi KS, Schneewind O. Type iii protein secretion in yersinia species. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002;18:107-33. Epub;2002 Apr 2.:107-33.
108. Robins-Browne RM, P. J. 1985. Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* 47:774-9.
109. Roggenkamp A, Ruckdeschel K, Leitritz L, Schmitt R, Heesemann J. Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8

- results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* 1996 Jul;64(7):2506-14.
110. Rosqvist R, Forsberg A, Wolf Watz H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* 1991;59(12):4562-9.
 111. Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf Watz H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* 1994;13:964-72.
 112. Ruckdeschel K, Mannel O, Richter K, et al. *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* 2001 Feb 1;166(3):1823-31.
 113. Ruckdeschel K, M. O., Schrottner P. Divergence of apoptosis-inducing and preventing signals in bacteria-faced macrophages through myeloid differentiation factor 88 and IL-1 receptor-associated kinase members. *J Immunol* 2002 May 1;168(9):4601-11.
 114. Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Trulzsch K, et al. The proteasome pathway destabilizes *Yersinia* outer protein E and represses its antihost cell activities. *J Immunol* 2006 May 15;176(10):6093-102.
 115. Ruiz-Bravo A, Moreno E, Jimenez-Valera M. Intestinal infection of BALB/c mice with *Yersinia enterocolitica* O9 causes major modifications in phenotype and functions of spleen cells. *Microbiology* 2001 Nov;147(Pt 11):3165-9
 116. Russmann H, Ruckdeschel K, Heesemann J. Translocation of *Yersinia enterocolitica* through an endothelial monolayer by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1996 Mar;64(3):1016-9.
 117. Salinovich O, Montelaro RC. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1986 Aug 1;156(2):341-7.
 118. Sandkvist M. Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 2001 Apr;40(2):271-83.
 119. Sarker MR, Neyt C, Stainier I, Cornelis GR. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* 1998 Mar;180(5):1207-14.
 120. Schiemann DA, Toma S. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw milk. *Appl Environ Microbiol* 1978 Jan;35(1):54-8.
 121. Schoppet M, Bubert A, Huppertz HI. Dendritic cell function is perturbed by *Yersinia enterocolitica* infection in vitro. *Clin Exp Immunol* 2000 Dec;122(3):316-23.
 122. Schubert S, Autenrieth IB. Conjugation of hydroxyethyl starch to desferrioxamine (DFO) modulates the dual role of DFO in *Yersinia enterocolitica* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000 May;7(3):457-62.

123. Schulte R, Kerneis S, Klinke S, et al. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol* 2000 Apr;2(2):173-85.
124. Shao F, Merritt PM, Bao Z, Innes RW, Dixon JE. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Immunity* 2002 May 31;109(5):575-88.
125. Shao F, Vacratsis PO, Bao Z, Bowers KE, Fierke CA, Dixon JE. Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: Cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Feb 4;100(3):904-9.
126. Shayegani M, Morse D, DeForge I, Root T, Parsons LM, Maupin PS. Microbiology of a major foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8. *J Clin Microbiol* 1983;17:35-40.
127. Sievers K, Ahvonen P, Aho K. Epidemiological aspects of *Yersinia* arthritis. *Int J Epidemiol* 1972;1(1):45-6.
128. Skurnik, M. 1984. Lack of correlation between the presence of plasmids and fimbriae in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 355-363.
129. Skurnik M, Biedzka-Sarek M, Lubeck PS, et al. Characterization and biological role of the O-polysaccharide gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *J Bacteriol* 2007 Oct;189(20):7244-53.
130. Smego RA, Freaun J, Koornhof HJ. Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague *Yersinia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999 Jan;18(1):1-15.
131. Sory MP, Boland A, Lambermont I, Cornelis GR. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11998-2002.
132. Spriggs DR, Imamura K, Rodriguez C, Sariban E, Kufe DW. Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. *J Clin Invest* 1988 Feb;81(2):455-60.
133. Stack JH, Whitney M, Rodems SM, Pollok BA. A ubiquitin-based tagging system for controlled modulation of protein stability. *Nat Biotechnol* 2000 Dec;18(12):1298-302.
134. Strauch E, Voigt I, Broll H, Appel B. Use of a plasmid of a *Yersinia enterocolitica* biogroup 1A strain for the construction of cloning vectors. *J Biotechnol* 2000 Apr 14;79(1):63-72.
135. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Takeda K, Akira S. Mycobacterial infection in MyD88-deficient mice. *Microbiol Immunol* 2003;47(11):841-7.

136. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005 Jan;17(1):1-14.
137. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000 Nov 15;165(10):5392-6.
138. Tamano K, Aizawa S, Katayama E, et al. Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J* 2000 Aug 1;19(15):3876-87.
139. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Jr., Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Oct 15;88(20):9292-6.
140. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4.
141. Viboud GI, Mejia E, Bliska JB. Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Cell Microbiol* 2006 Sep;8(9):1504-15.
142. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv* 2003 Dec;3(8):466-77.
143. Vogel U, Autenrieth IB, Berner R, Heesemann J. Role of plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* in humoral immunity against secondary *Y. enterocolitica* infection in mice. *Microb Pathogen* 1993;15:23-36.
144. Wattiau P, Bernier B, Deslee P, Michiels T, Cornelis GR. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(22):10493-7.
145. Wattiau P, Cornelis GR. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol Microbiol* 1993;8(1):123-31.
146. Wennerberg K, Lohikangas L, Gullberg D, Pfaff M, Johansson S, Fassler R. Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin. *J Cell Biol* 1996 Jan;132(1-2):227-38.
147. Wiedemann A, L. 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*. Oct;3(10):693-702.
148. Wiedig CA, Kramer U, Garbom S, Wolf-Watz H, Autenrieth IB. Induction of CD8+ T cell responses by *Yersinia* vaccine carrier strains. *Vaccine* 2005 Oct 10;23(42):4984-98.

149. Wilharm G, Lehmann V, Neumayer W, Trcek J, Heesemann J. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: evidence for the ability to transport proteins that are folded prior to secretion. *BMC Microbiol* 2004 Jul 12;4:27.:27.
150. Yao T, Meccas J, Healy JI, Falkow S, Chien Y. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J Exp Med* 1999 Nov 1;190(9):1343-50.
151. Zhao YX, Lajoie G, Zhang H, Chiu B, Payne U, Inman RD. Tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice respond to acute *Yersinia enterocolitica* infection with less apoptosis and more effective host resistance. *Infect Immun* 2000 Mar;68(3):1243-51.

8. Publikationen

Köberle M., **Klein-Günther A.**, Schütz M., Fritz M., Berchtold S., Tolosa E., Autenrieth I.B., and Bohn E.

Yersinia enterocolitica Targets Cells of the Innate and Adaptive Immune System by Injection of Yops in a Mouse Infection Model

PLoS Pathog. 2009 August; 5(8)

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsklinik Tübingen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. I. B. Autenrieth für die interessante Themenstellung sowie für die Bereitschaft zur Diskussion und Beratung.

Mein besonderer Dank gilt Martins Hilfe bei technischen und sonstigen Schwierigkeiten. Vor allem bedanke ich mich bei Martin für die netten Unterhaltung beim zweiten Frühstück, dem Mittagessen und dem zweiten Mittagessen.

Danke an Ulli für die mentale Unterstützung.

Danke an Herrn Dr. Erwin Bohn für die Betreuung.

Danke an Dr. Susanne Berchtold, Birgit Manncke und Juliane Klenk für die viele Unterstützung bei meinen Versuchen!

Allen anderen Mitgliedern des Instituts für medizinische Mikrobiologie ein herzliches Danke für die schöne Zeit.

Im Besonderen denke ich an: Ulli, Martin, Miri (und Nora), Hanna, Diana, Frauke, Julia, Tanja, Nadine, Juliane, Birgit, Susanne und Anne.

Danke an Daniel, der das Facs immer wieder repariert hat, wenn es kaputt war und immer sofort kam, wenn etwas nicht funktioniert hat!

Danke an meinen Freund Markus, der meine Launen ertragen musste, die ich des öfteren durch den ganzen Stress hatte!

Danke an meine liebe Mama, Werner und meine Schwester Kathrin, die mich immer unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Annegret Verena Klein-Günther
geboren am 09.11.1980 in Bad Soden

Schulbildung:

| | |
|-------------------|--|
| 06/1987 - 06/1991 | Grundschule Drei-Linden-Schule Neuenhain |
| 06/1991 - 06/1997 | Realschule der Sankt Angela-Schule in Königstein |
| 06/1997 - 06/2000 | Gymnasium der Sankt Angela-Schule in Königstein |
| | Abitur |

Studium:

| | |
|-------------------|--|
| 04/2001 - 11/2004 | Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim mit Vertiefungsrichtung Nutztierbiologie |
| 10/2008 | Lehramtsstudium für Gymnasium mit der Fächerkombination Biologie und Chemie |

Promotion:

| | |
|-------------------|--|
| 12/2004 - 12/2007 | Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum der Eberhard Karls Universität Tübingen, Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth; betreut durch Dr. Erwin Bohn Thema: Etablierung eines β -Lactamase Reportersystems für Yop Translokation durch <i>Yersinia enterocolitica</i> |
|-------------------|--|