

**Modulation der Wirtszell-Funktionen  
durch sekretierte *Yersinia enterocolitica*  
Proteine bei *in vitro* und *in vivo* Infektion.**

**DISSERTATION**

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

**2010**

vorgelegt von

**Martin Köberle**

Tag der mündlichen Prüfung:

14. Januar 2010

Dekan:

Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. I. B. Autenrieth

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

# INHALT

1	<b>Einleitung</b> .....	4
1.1	Die Gattung <i>Yersinia</i> .....	4
1.1.1	Allgemeines .....	4
1.1.2	Enteropathogene <i>Yersinia</i> Arten: <i>Y. enterocolitica</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i> .....	4
1.1.3	Der schwarze Tod: <i>Yersinia pestis</i> .....	6
1.1.4	Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren enteropathogener <i>Yersinia spp.</i> .....	7
1.1.5	pYV kodierte Pathogenitätsfaktoren enteropathogener <i>Yersinia spp.</i> .....	9
1.2	Reportersysteme für Typ III Translokation bakterieller Pathogenitätsfaktoren.....	14
1.2.1	Die Etablierung verschiedener Reportersysteme ermöglichte eine bessere Untersuchung von Yop Translokation <i>in vitro</i> .....	14
1.2.2	Ein $\beta$ -Laktamase basiertes Reportersystem ermöglichte erstmals die Untersuchung von Yop Translokation auf Einzelzellebene und <i>in vivo</i> .....	15
1.3	Interaktion von <i>Y. enterocolitica</i> mit Epithelzellen.....	18
1.3.1	Epithelzellen sind ein essentieller Bestandteil des Immunsystems im Darm.....	18
1.3.2	Proinflammatorische Zytokinexpression durch Epithelzellen nach Pathogenkontakt ....	18
1.3.3	Genexpressionsanalysen infizierter HeLa Zellen zeigen GILZ Expression als Reaktion auf <i>Y. enterocolitica</i> pYV <sup>+</sup> Yop-Virulon .....	19
1.4	GILZ vermittelte Immunevasion durch <i>Y. enterocolitica</i> .....	19
1.4.1	Allgemeines .....	19
1.4.2	Domänen und Proteinstruktur.....	20
1.4.3	GILZ Expression .....	21
1.4.4	Immunregulatorische Aktivität von GILZ.....	22
1.5	Rho GTPasen: Vermittler proinflammatorischer Signaltransduktion und Angriffspunkt bakterieller Toxine .....	23
1.5.1	G-Proteine.....	23
1.5.2	Regulatorische Kofaktoren .....	23
1.5.3	Proinflammatorische Signaltransduktion durch Rho GTPasen.....	24
1.5.4	Rho GTPasen als Ziel bakterieller Pathogenitätsfaktoren.....	25
1.6	Zielsetzungen dieser Arbeit.....	28
1.6.1	Aufklärung des Mechanismus der GILZ Induktion durch <i>Y. enterocolitica</i> und Klärung des Beitrags von GILZ zur Immunevasion .....	29
1.6.2	Etablierung eines Bla Reportersystems für <i>Y. enterocolitica</i> .....	29
2	<b>Material und Methoden</b> .....	31
2.1	Material.....	31
2.1.1	Geräte .....	31
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	32

2.1.3	Chemikalien .....	33
2.1.4	Nukleinsäuren.....	36
2.1.5	Proteine.....	39
2.1.6	Bakterienstämme .....	41
2.1.7	Zelllinien.....	43
2.1.8	Tiere.....	43
2.1.9	Software .....	43
2.1.10	Lösungen und Puffer .....	44
2.2	Methoden.....	47
2.2.1	Nukleinsäure Präparation .....	47
2.2.2	Proteinanalytik.....	50
2.2.3	Messung von Promotoraktivität anhand von Luziferaseaktivität.....	57
2.2.4	Durchflusszytometrie .....	59
2.2.5	Mikroskopische Analyse der Bla Aktivität in HeLa Zellen .....	60
2.2.6	Mikrobiologische Methoden .....	60
2.2.7	Zellkultur .....	64
2.2.8	Tierexperimente.....	69
3	<b>Ergebnisse</b> .....	71
3.1	Herstellung und Überprüfung neuer <i>Yersinia enterocolitica</i> WA-314 Mutanten .....	71
3.1.1	Herstellung der <i>Yersinia enterocolitica</i> WA-314 YopO (pTTSS- <i>yopO</i> ) und Ovalbumin (pTTSS- <i>ova</i> ) Monosekretionsmutanten .....	72
3.1.2	Sekretionsanalysen .....	73
3.2	Identifizierung der für die GILZ Induktion durch <i>Y. enterocolitica</i> notwendigen Pathogenitätsfaktoren .....	74
3.2.1	Nachweis der GILZ Proteinexpression in infizierten HeLa Zellen.....	74
3.2.2	YopT ist notwendig und hinreichend für die Induktion der GILZ Expression in HeLa Zellen.....	76
3.3	Induktion der GILZ Expression durch clostridiale Toxine und Inhibitoren von Rho Signalwegen .....	78
3.4	Einfluss der GILZ Induktion auf die NFκB Promotoraktivität in HeLa Zellen.....	82
3.5	Etablierung eines β-Laktamase Reportersystems für Typ III Effektortranslokation .....	71
3.6	Genese der Reporterstämme.....	89
3.6.1	Generierung eines metabolisch stabilisierten Systems.....	89
3.6.2	Herstellung der Plasmide.....	90
3.6.3	Herstellung der benötigten <i>Y. enterocolitica</i> Stämme .....	95
3.6.4	Überprüfung der Typ III Sekretion der Reporterstämme .....	97
3.7	Etablierung des Bla Reportersystems <i>in vitro</i> .....	98
3.7.1	Transfektion und Infektion von HeLa Zellen.....	98
3.7.2	Infektion von GD25 und GD25-β1A Fibroblasten .....	101
3.7.3	Infektion von Milzzellen aus der C57BL/6 Maus .....	102
3.8	Etablierung des Reportersystems <i>in vivo</i> .....	105
3.8.1	Yop Translokation in Milzzellen von i. v. infizierten C57BL/6 Mäusen.....	105
3.8.2	Yop Translokation in der infizierten Milz ohne YadA .....	110

3.8.3	Yop Translokation nach oraler Infektion in Darmepithelzellen.....	112
4	<b>Diskussion</b> .....	114
4.1	Bakterielle Infektionen induzieren proinflammatorische Genexpression .....	114
4.2	Das Typ III Virulon schützt <i>Yersinia spp.</i> vor der proinflammatorischen Immunantwort .....	114
4.3	<i>Yersinia enterocolitica</i> induziert die Expression von GILZ, einem Vermittler antiinflammatorischer Signaltransduktion.....	115
4.3.1	Ursache der GILZ Induktion in HeLa Zellen durch <i>Y. enterocolitica</i> .....	116
4.3.2	YopT induziertes GILZ hat keinen Einfluss auf die proinflammatorische Genexpression .....	119
4.4	Etablierung eines $\beta$ -Laktamase Reportersystems für Yop Translokation.....	122
4.4.1	Reporterkonstrukte und Färbung.....	123
4.4.2	Etablierung des Bla Reportersystems <i>in vitro</i> .....	124
4.4.3	Etablierung des Bla Reportersystems <i>in vivo</i> .....	127
4.4.4	Anwendbarkeit des Bla Reportersystems für weitere Untersuchungen .....	131
5	<b>Zusammenfassung</b> .....	122
6	<b>Abkürzungen</b> .....	136
7	<b>Literatur</b> .....	139
8	<b>Veröffentlichungen</b> .....	164
8.1	Zeitschriftenartikel .....	164
8.2	Kongressbeiträge .....	165
9	<b>Danksagung</b> .....	166
10	<b>Anhang</b> .....	168

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Gattung *Yersinia*

### 1.1.1 Allgemeines

Der Genus *Yersinia* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* (240). Es sind fakultativ anaerobe, gram-negative Stäbchenbakterien. Sie sind pleomorph, psychrophil, nicht sporenbildend und wachsen optimal bei 27-30 °C (76). Von den 11 beschriebenen *Yersinia* Arten sind drei humanpathogen: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*. Weitere Arten der Gattung sind *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, und *Y. ruckeri* (57). Yersinieninfektionen sind Zoonosen. Das Reservoir bei allen pathogenen Arten sind vor allem wildlebende Nager. Trotz teilweise unterschiedlicher Ansteckungswege und Krankheitsbilder zeigen alle drei humanpathogenen Stämme einen deutlichen Tropismus für lymphoides Gewebe und besitzen Mechanismen, sich der Immunantwort des Wirtes zu entziehen (120). Dazu besitzen alle humanpathogenen *Yersinia* Arten ein Virulenzplasmid, das für Pathogenitätsproteine und ein Typ III Sekretionssystem zu deren Translokation in Wirtszellen kodiert (77,144,215). Darüber hinaus besitzen hochpathogene Stämme eine im Chromosom integrierte Pathogenitätsinsel, die für Biosynthese- und Aufnahmemechanismen für das Eisen-Siderophor Yersiniabactin kodiert.

### 1.1.2 Enteropathogene *Yersinia* Arten: *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*

#### 1.1.2.1 Epidemiologie

*Y. enterocolitica* ist die am häufigsten isolierte humanpathogene *Yersinia* Spezies, während Infektionen mit *Y. pseudotuberculosis* seltener sind. Die beiden *Yersinia* spp. unterscheiden sich genomisch vor allem durch die Abwesenheit einiger großer metabolischer Operons bei *Y. pseudotuberculosis*. Phänotypisch zeigt sich dies vor allem durch das Fehlen der

Zellulosebiosynthese und der Tetrathionat-Atmung bei *Y. pseudotuberculosis* (280). Die beiden *Yersinia* Arten besitzen jedoch sehr große Ähnlichkeit bezüglich ihrer Pathogenitätsfaktoren. Beide Spezies sind enteropathogen und besiedeln den Darm befallener Säugetiere. Die Aufnahme erfolgt über den fäkal-oralen Weg, durch kontaminierte Nahrungsmittel wie Schlacht- und Milchprodukte, oder durch mit kontaminiertem Wasser zubereitete Lebensmittel, so wurden Endemien in den USA z.B. über Schulmilch und Tofu ausgelöst (Quelle: FDA).

Aufgrund der guten Kältetoleranz fördert ein kühles Klima die Infektionsausbreitung. Daher treten Infektionen vor allem in Nordamerika, Nordeuropa und Japan und bevorzugt während der Wintermonate auf. Es erkranken vor allem Kinder, alte oder immundefiziente Personen nach einer Inkubationszeit von 24-48 h.

#### **1.1.2.2 Klinik**

Benig Infizierte leiden unter akuter Gastroenteritis bzw. Enterokolitis und mesenterialer Lymphadenitis. Diese Erkrankungen sind in der Regel selbstlimitierend. Selten verläuft die Infektion septisch, mit Abszessen in Leber, Milz und anderen Organen. Dies kommt vor allem bei immundefizienten Patienten oder während einer Desferrioxamin-Behandlung und bei Patienten mit überhöhter Eisenspeicherung vor (52,53,219). Chronische Infektionen werden ebenfalls selten beobachtet (143). Als seltene, immunpathologische Folgeerkrankungen können eine reaktive Arthritis, ein Erythema nodosum oder eine Uveitis auftreten, besonders bei Trägern des HLA Allels B27 (7,8,84,281).

#### **1.1.2.3 Pathogenese**

Nach elektronenmikroskopischen und zellbiologischen Untersuchungen wurden enteropathogene *Yersinia spp.* primär als extrazelluläre Pathogene beschrieben (23,129), sie wurden aber auch teilweise intrazellulär nachgewiesen (166,259,260). Voraussetzung für die systemische Infektion, die beim septischen Krankheitsverlauf stattfindet, ist die Expression von Adhäsinen, welche die Bindung an Wirtszellen ermöglichen.

Sie schaffen die Voraussetzung für das Durchdringen der Darmbarriere durch die Bindung an und die Transmigration durch die M-Zellen der Peyer'schen Plaques in der Frühphase der



systemischen Infektion (115) und die spätere, wieder vom Darmlumen ausgehende Besiedlung von Milz, Leber und anderen inneren Organen (33,204).

Ebenso ist die Adhäsion an Wirtszellen die Voraussetzung für die Injektion von Effektorproteinen, den *Yersinia outer proteins* (Yops) in Wirtszellen. Die Yops sind wie das Typ III Sekretionssystem (TTSS) auf dem 70 kb großen, *plasmid of yersinia virulence* (pYV) Virulenzplasmid kodiert. Sie vermitteln wichtige Immunevasionsmechanismen und ermöglichen so die Persistenz von *Y. enterocolitica* im Wirtsorganismus. Das komplette Genom eines *Y. enterocolitica* Stamms (279), sowie des pYV Plasmids mehrerer *Y. enterocolitica* Stämme (101,148) und das gesamte Genom eines *Y. pseudotuberculosis* Stamms sind sequenziert (67).

### **1.1.3 Der schwarze Tod: *Yersinia pestis***

Die Pest ist seit der Antike bekannt. Zwischen der Mitte des 6. Jh. n. Chr. und dem Ende des 19 Jh. n. Chr. gab es drei Pandemien. Vor allem die zweite Pandemie (14.-17. Jh.) hatte verheerende Folgen für Europa („der schwarze Tod“) und kostete 30-40 % der damaligen Bevölkerung das Leben (266). Alexandre Yersin isolierte und identifizierte den Pesterreger in Menschen und Ratten 1894 in Hongkong. Heute kommen Pesterkrankungen vor allem endemisch in einigen Regionen Indiens und Afrikas vor.

Der Erreger vermehrt sich nach einem Biss durch Rattenflöhe in den lokalen Lymphknoten, die stark anschwellen („Beulenpest“), und breitet sich über Lymphe und Blut im Körper aus. Gelangt *Y. pestis* in die Lunge, kann eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgen. *Y. pestis* ist nicht enteropathogen.

Der abweichende Krankheitsverlauf ist die Folge einer veränderten genetischen Ausstattung. *Y. pestis* entwickelte sich von 1.500 – 20.000 Jahren aus einem *Y. pseudotuberculosis* Klon (1,265). In dieser Zeit wurden durch horizontalen Gentransfer von Säuger- und Insektenpathogenen zahlreiche neue Virulenzfaktoren erworben, welche die Säugerpathogenität steigerten und die Nutzung von Rattenflöhen als Vektor ermöglichten. So besitzt *Y. pestis* zusätzlich zum pYV Virulenzplasmid noch zwei weitere Virulenzplasmide (98). Die Sequenzierung eines *Y. pestis* Stamms zeigte außerdem den Erwerb neuer chromosomaler Pathogenitätsinseln (208).

Gleichzeitig degenerierten die bei den enteropathogenen *Y. spp.* bekannten Adhäsine durch Punktmutationen zu inaktiven Pseudogenen, was den Verlust der Enteropathogenität erklärt.

Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass die wenig immunogene Lipid A Variante im Lipopolysaccharid (LPS) von *Y. pestis* einen starken Immunevasionsmechanismus dieses Pathogens darstellen könnte (190).

#### 1.1.4 Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren enteropathogener *Yersinia spp.*

Die Besiedlung der Wirtsorganismen, insbesondere deren lymphatischer Organe durch enteropathogene Yersinien wird durch zahlreiche Virulenzfaktoren ermöglicht. Neben den hier aufgeführten, bekannten Virulenzfaktoren gibt es zahlreiche Weitere, die bisher nicht funktionell untersucht wurden (79,113).

Zu den bisher untersuchten chromosomal kodierten Pathogenitätsfaktoren gehören eine Reihe von Adhäsinen, Virulenzregulatoren, Antibiotikaresistenzen und Toxinen, die nicht Substrat des Ysc TTSS sind, sowie ein Eisenaufnahmesystem (Tabelle 1). Ferner wurden ein chromosomales Typ III Sekretionssystem und zwei Typ II Sekretionssysteme beschrieben (126,150).

<b>Faktor</b>	<b>Funktion</b>	<b>Literatur</b>
<b>Adhäsine</b>		
Ail	Vermittelt neben der Adhäsion an und der Invasion in Epithel-Zellen auch Komplement-Resistenz.	(39,47,187,216)
Fim-Pili	Wirtszelladhäsion	(70,200)
Inv	Adhäsion, Invasin. Induziert die Rekrutierung und Aktivierung von Rac1. Initiiert durch Bindung an $\beta$ 1 Integrine die Transzytose durch M-Zellen, die Internalisierung in Epithel-Zellen und die Sekretion von IL-8. Aktiviert B- und T-Lymphozyten zur Proliferation oder Zytokin-Sekretion. Induziert bei T-Lymphozyten die Bildung von Pseudopodien und vermittelt hapto- und chemotaktische Wirkung.	(18,58,92,117,157,173,179,199,212,246-248,305)
Myf	Fimbrien, die möglicherweise als intestinaler Kolonisierungsfaktor zusammen mit Yst Diarrhö auslösen.	(149)
<b>Sekretionssysteme</b>		
Ysa	Typ III Sekretionssystem für die Ysp Sekretion, vermittelt Virulenz bei oraler Infektion.	(126)

Yts	Typ II Sekretionssystem, vermittelt Virulenz in der Spätphase der Infektion.	(150)
<b>Regulatorische Faktoren</b>		
LPS-O-Antigen	An der Regulation der Typ III Sekretion beteiligt.	(213)
YplA	Phospholipase, erhöht Virulenz bei Mausinfektion	(242)
RovA/M, YmoA	Regulation der Expression von Inv und weiteren Virulenzfaktoren	(90,139,223)
<b>Sonstige</b>		
AmpC, BlaA/B	$\beta$ -Laktamasen, vermitteln Resistenz gegen Penicilline	(258)
HPI	<i>high pathogenicity island</i> , kodiert für das Siderophor Yersiniabactin und damit assoziierte Gene und vermittelt so die Aufnahme von Eisen. Hat möglicherweise immunsupprimierende Wirkung auf B- und T- Zellen, Makrophagen und PMNs.	(22,25,123)
SodA	Detoxifiziert die durch Kontakt mit polymorphonukleären Leukozyten gebildeten Sauerstoff-Radikale. Vermittelt Virulenz bei Besiedelung von Leber und Milz, aber nicht bei Kolonisierung der Peyer'schen Plaques.	(226)
Yst	Hitzestabiles Enterotoxin, das die Guanylat-Zyklase intestinaler Epithel-Zellen stimuliert und Diarrhö auslöst.	(82,221,224)

Tabelle 1: Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren

#### 1.1.4.1 Invasin

Das Aussenmembran-Protein Invasin ist in der frühen Phase der Infektion für die effiziente Adhäsion an M-Zellen und damit für die Kolonisierung der Peyer'schen Plaques wichtig (199,212,247). Es wird bei 27 °C maximal exprimiert und ist daher nur in der Frühphase der Infektion von Bedeutung. Die carboxy-terminalen 192 Aminosäuren sind notwendig und ausreichend für die Bindung an verschiedene  $\beta_1$  Integrine der Wirtszellen (173). Integrine sind Zellrezeptoren, die als Heterodimere aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit aufgebaut sind.

Die Bindung von Invasin an  $\beta_1$  Integrine induziert die Rekrutierung und Aktivierung von Rac1 und initiiert damit den Internalisierungsprozess (305). Gleichzeitig spielt die Bindung von Invasin an  $\beta_1$  Integrine eine entscheidende Rolle bei der *Yersinia*-induzierten proinflammatorischen Wirtsantwort. Durch die Aktivierung von p65p65 NF $\kappa$ B, p38 MAPK und JNK führt sie unter anderem zur IL-8 Ausschüttung (117,157,246).

### 1.1.5 pYV kodierte Pathogenitätsfaktoren enteropathogener *Yersinia spp.*

Das pYV Plasmid enthält die genetische Information für die Komponenten des TTSS, die Effektor Yops und deren Chaperone. Außerdem kodiert es für das Adhäsion Yada, welches die Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix ermöglicht und Serumresistenz vermittelt (Tabelle 2).

<b>Faktor</b>	<b>Funktion</b>	<b>Literatur</b>
<b>Adhäsine</b>		
YadA	Vermittelt Adhärenz an epitheliale Zellen und professionelle Phagozyten. Bindet an Kollagen, zelluläres Fibronectin und Laminin. Vermittelt Phagozytoseresistenz und Schutz gegen Komplement-vermittelte Lyse (durch Bindung der protektiven Komponenten C4BP und Faktor H) und Defensine. Nur <i>Y. pseudotuberculosis</i> YadA ermöglicht Zellinvasion.	(39,69,131,136,145,163,192,227,228,249,276,304)
<b>Ysc Sekretionsapparat</b>		
LcrG, TyeA, YopN (LcrE),	Verhindern Yop Sekretion ohne Wirtszellkontakt. Artifizielle Auslösung der Sekretion durch Calcium-Depletion möglich.	(50,95,273)
YscF	Formt die 58 nm lange Nadel des Sekretionsapparats außerhalb der inneren Bakterienmembran	(80,282)
YscN	ATPase, treibt den Sekretionsprozess an	(303)
YscP	Reguliert Nadellänge und Substratspezifität. Wird sekretiert.	(5,6,89)
YscU	Bestandteil des Sekretionskanals durch die innere Bakterienmembran, vermittelt Substratspezifität	(14,89)
YscC	Sekretin, bildet den Basalkörper des Sekretionsapparats in der äußeren Bakterienmembran	(60)
<b>Translokationssystem</b>		
LcrV	Bildet die Spitze des TTSS, möglicherweise für Yop Translokation essentiell. TLR-2 Ligand. Supprimiert die Expression von TNF $\alpha$ und IFN- $\gamma$ . Inhibiert die Chemotaxis von Neutrophilen. Induziert in Makrophagen die Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10.	(21,191,195,238,261,299)
YopB/D	Bilden zusammen eine Pore in der Wirtszellmembran, die Yop Translokation ermöglicht	(88,124,130,202)
<b>Effektor-Yops</b>		
YopE	GTPase aktivierendes Protein, führt durch Interaktion mit RhoA und Rac1 zur Zerstörung der Aktin-Filamente und verhindert so die Phagozytose. Inhibiert JNK, ERK und NF $\kappa$ B. Verhindert die Caspase-1 abhängige IL-1 $\beta$ Prozessierung. Wird in der Wirtszelle proteasomal abgebaut.	(3,10,45,209,229,231,234,243,294)
YopP (YopJ)	Cystein-Protease, welche die Caspase-Kaskade des Apoptose-Initiationsweges aktiviert, dadurch Induktion von Apoptose und nekroseartigem Zelltod in murinen Makrophagen.	(3,26,49,83,119,188,206,233)

	Reduktion der TNF $\alpha$ -Sekretion und der Clathrin vermittelten Endozytose in Makrophagen durch Blockierung von MAP-Kinase- und NF- $\kappa$ B-abhängigen Signaltransduktionswegen durch Acetylierung von MEK2 und IKK $\beta$ .	
YopT	Cystein-Protease, trennt den Isopren Rest von RhoA und Rac1, die dadurch aus der Membran entfernt oder aus der Bindung ihres GDI gelöst werden und im Zytosol akkumulieren. Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts, Phagozytosehemmung bei Makrophagen.	(3,4,147,267,268,294,305,312)
YopH	Protein-Tyrosin Phosphatase, welche die Proteine des fokalen Adhäsions-Komplexes dephosphoryliert. Verhindert durch Auflösung der fokalen Adhäsions-Komplexe die Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten. Suppression des "oxidative burst". In B- und T-Lymphozyten Inhibition der Antigen-Rezeptor assoziierten Signaltransduktionskaskaden.	(44,46,122,235,307)
YopO (YpkA)	Interagiert mit RhoA und Rac1 durch Rho-GDI Mimikry. Serin-/Threonin-Kinase, die durch G-Aktin aktiviert wird und die Phosphorylierung von Serin-Resten von G $\alpha$ q katalysiert. Phosphoryliert die Otubain Deubiquitinyase. Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts, Apoptoseinduktion.	(35,106,153,154,198,207,218,284)
YopM	Agglutination von Plasma. Homolog zum von Willebrand-Faktor. Wird in den Nukleus transportiert.	(175,176,262)

Tabelle 2: pYV kodierte Virulenzfaktoren

### 1.1.5.1 Das Typ III Yop Sekretionssystem (Ysc) von *Y. enterocolitica*

Das TTSS wird von vielen gram-negativen Bakterien verwendet, um Virulenzfaktoren zu sekretieren oder in das Zytosol eukaryotischer Zellen zu injizieren. Derzeit sind über 20 verschiedene Typ III-Sekretionssysteme in Tier- und Pflanzenpathogenen bekannt (105,146).

Die über 20 Gene des Sekretionssystems (Abbildung 1) sind in einigen großen Transkriptionseinheiten zusammengefasst. Dazu gehören *yscBCDEFGHIJKL* im *virC* Operon (185), *yscNOPQRSTU* (36) und *yopNtyeAsycNyscXYV* (81), sowie *yscW*. Außer *yscB* und *yscH* sind alle genannten Gene essentiell für die Yop Translokation (13,81).

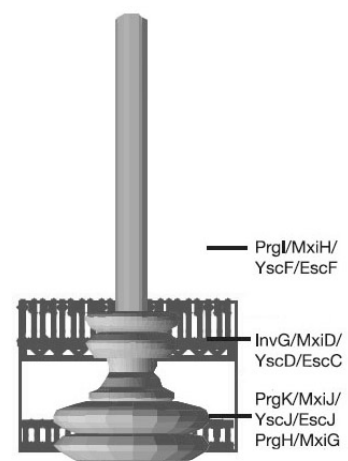


Abbildung 1: Typ III Sekretionsapparat (nach (308))

Die Basalkörper des Flagellenapparates und des TTSS sind evolutionär miteinander verwandt. Zehn der ca. 25 Proteine des TTSS Basalkörpers weisen eine signifikante Sequenzhomologie zu Proteinen des Flagellenapparates auf (309).

Dem Basalkörper, der die Peptidoglykanschicht und beide bakteriellen Membranen durchspannt, ist eine nadelförmige Struktur aufgesetzt. Beide Komponenten schließen einen Kanal von 20-30Å Innendurchmesser ein (169). Für die Injektion in die Zelle sind außerdem die Translokator-Yops YopB und YopD, sowie LcrV notwendig, welche durch einen an die Nadel des Sekretionssystems anschließenden Porenkomplex die Translokation der Effektor-Yops durch die eukaryotische Membran erlauben.

### 1.1.5.2 YopE

YopE besitzt die Aktivität eines GTPase *activating proteins* (GAP) (209), sowie eine C-terminale Membranlokalisationsdomäne (168). Für die Sekretion / Translokation wird ein spezifisches Chaperon benötigt, für die Erkennung als Substrat für das TTSS genügt ein N-terminales 50 AS Fragment (42,97,172,177,269,298). Serotyp abhängig kann ein proteasomaler Abbau des von *Y. enterocolitica* translozierten YopE in der Wirtszelle erfolgen (138,234).

Zelluläres Angriffsziel scheint vor allem Rac1 zu sein, möglicherweise über RhoG, obwohl *in vitro* Aktivität auch gegenüber RhoA und CDC42 gezeigt wurde (10,16,229,234,243,305). Eine strukturelle Verwandtschaft mit eukaryotischen GAPs besteht nicht (94). Es zerstört das Aktin-Zytoskelet der Wirtszellen und wirkt zytotoxisch (230,231). In Zellkulturexperimenten leistet YopE einen signifikanten Beitrag zur Hemmung der Phagozytose und anderer proinflammatorischer Prozesse (2,3,45,209,243).

Darüber hinaus scheint YopE eine wichtige Rolle bei der Regulation der Effektortranslokation und der Translokationsporenöffnung zu spielen (9,184,293,295).

Die Bedeutung von YopE für die Virulenz enteropathogener *Yersinia spp.* im Mausinfektionsmodell wird je nach Infektionsbedingungen unterschiedlich beurteilt und ist zumindest bei *Y. enterocolitica* wahrscheinlich eher gering (45,230,285,287,294).

### 1.1.5.3 YopT

YopT wurde ebenfalls zunächst als ein Zytotoxin beschrieben, welches durch Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts zur Abrundung von Wirtszellen führt (147) und Phagozytoseresistenz gegenüber Makrophagen und dendritischen Zellen vermittelt (3,4,120).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass YopT eine Cysteinproteaseaktivität besitzt, die analog auch bei Pathogenitätsfaktoren anderer Bakterienarten vorhanden ist und die Entfernung des Isoprenankers von Rho GTPasen ermöglicht (256). Rho GTPasen sind an einem C-terminalen Cysteinrest, der Bestandteil der CAAX Erkennungssequenz ist (C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: beliebige Aminosäure) entweder mit einem Geranylgeranyl-Rest oder einem Farnesylrest verestert. YopT erkennt die polybasische Aminosäuresequenz N-terminal der Prenylierungsstelle und trennt unabhängig von Aktivierungszustand sowohl aktive als auch inaktive Rho GTPasen von ihrem Geranylgeranyl- oder Farnesylanker (257). Allerdings ist für die YopT Aktivität notwendig, dass der AAX Teil der CAAX Domäne nach der Prenylierung proteolytisch entfernt wurde, nicht jedoch die Carboxymethylierung des prenylierten Cysteins (103).

Es ist nicht abschließend geklärt, welche Rho GTPasen neben *ras homolog gene family A* (RhoA) Ziel der YopT Aktivität sind. Während zumindest das *Y. pseudotuberculosis* YopT auch p21-Rac1 (Rac1) im Zellmodell erkennt, scheint die Proteolyse von *cell division cycle 42* (CDC42) zellfreien Systemen vorbehalten zu sein (4,257,305). Grund dafür könnte die Lokalisation von YopT in der Plasmamembran der Zielzellen sein.

Rho GTPasen, deren Isoprenrest entfernt wurde, verlieren die Fähigkeit zur Membranlokalisation und auch zur Dimerisierung mit ihrem *Rho GDP dissociation inhibitor* (Rho-GDI) Protein. Die YopT Aktivität reduziert zunächst die Menge membrangebundener Rho Proteine, führt dadurch aber auch zur Freisetzung und Membranlokalisation von Rho-Proteinen aus dem zytoplasmatischen Rho - Rho-GDI Bestand, der so reduziert wird. Dagegen reichern sich monomeres Rho und Rho-GDI im Zytoplasma an. Da sowohl Rho als auch Rho-GDI Einfluss auf die Genexpression nehmen können (272), wird der YopT Effekt möglicherweise also nicht nur durch die Abwesenheit bestimmter Rho GTPasen an der Zellmembran vermittelt.

Die Inaktivierung von Rho GTPasen durch YopT erfolgt synergistisch zusammen mit YopE und möglicherweise YopO (294). Jedes dieser drei Yops fügt sich durch eine Membranlokalisationsdomäne auf der Innenseite der Zellmembran ein (174). Während aber

YopT den Membrananker von Rho Proteinen abtrennt, bewirkt YopE als GAP eine Rho Inaktivierung durch GTP Hydrolyse. YopO bindet Rho GTPasen spezifisch durch Rho-GDI Mimikry und konserviert so den inaktiven Zustand der GDP Bindung (218). YopO besitzt zusätzlich noch eine Kinaseaktivität, allerdings wurde bisher nicht gezeigt, dass RhoGTPasen von YopO phosphoryliert werden, oder dass die Kinaseaktivität bei der Vermittlung des zytotoxischen Effekts von YopO eine Rolle spielt.

Obwohl die Ausschaltung von Rho GTPasen durch Yops in verschiedenen Zellkulturmodellen Immunevasionseffekte hervorrief, konnte bisher kein bedeutender Beitrag von YopE/T/O zur Virulenz im C57BL/6 Mausinfektionsmodell gezeigt werden (287).

#### **1.1.5.4 YadA**

YadA ist ein trimäres Autotransporter Adhäsion (TAA) der *oligomeric coiled coils adhesin* (OCA) Familie (32). Als Autotransporter werden sekretierte Proteine und äußere Membran-Proteine bezeichnet, die alle nötigen Informationen für ihren Transport zur äußeren Membran und die Translokation durch die Membran enthalten (137). YadA lässt sich in die Kopf, Hals, Stamm und Membrananker Domänen einteilen („Lollipop“ Struktur). Der N-Terminus formt einen globulären Kopf, der Stamm wird durch eine „coiled-coil“ Struktur gebildet und der C-Terminus ist in der äußeren Membran verankert. YadA bedeckt die komplette Oberfläche des Bakteriums und verleiht ihr hydrophobe Eigenschaften (274). Die Membrananker-Domäne, die nach Strukturvorhersagen aus einem kurzen *coiled-coil* Segment und vier Transmembran- $\beta$ -Faltblattstrukturen besteht, ist in dieser Klasse der nicht-fimbriellen Adhäsine konserviert (142). Durch eine Struktur-Funktionsanalyse und die Untersuchung der Kristallstruktur des Kopf- und Hals- Bereichs wurde gezeigt, dass YadA Trimere bildet (203,225). Desweiteren wurde ein konservierter Glycin-Rest in der Membrananker-Domäne identifiziert, der von entscheidender Bedeutung für die Stabilität und den Transport des Trimers ist (121)

YadA vermittelt Autoagglutination (159) und gilt als die Hauptadhäsion für die Anheftung von Yersinien an Wirtszellen bei einer Infektion. YadA kann an eine Reihe eukaryontischer Extrazelluläre-Matrix (ECM) Proteine und zelluläre Oberflächen Moleküle binden, wie z. B. Fibronectin, Kollagen und Laminin (91,100,250,277). Dabei aktiviert es allerdings auch die proinflammatorische Signaltransduktion der Wirtszellen und induziert Interleukin 8 (IL-8) Sekretion (241). Außerdem vermittelt es Serumresistenz und schützt die Bakterien vor dem Abtöten durch polymorphnukleären neutrophilen Granulozyten (40,182,296) durch die



Bindung von Faktor H und C4BP, welche zur Spaltung und Inaktivierung des Faktors C3b (Faktor H) bzw. zur Bindung von C4b (C4BP) des Komplementsystems und somit zur Reduktion von Opsonisierung und Komplementlyse der Bakterien führen (69,163,217).

Die Adhäsion an Wirtszellen durch YadA gilt als Voraussetzung zur Übertragung der Effektor-Yops bei *Y. enterocolitica* (54,131,158,270). YadA scheint essentiell für eine Etablierung einer Infektion zu sein, da *yadA* defiziente Stämme in Mäusen avirulent sind (85,211,227)

## **1.2 Reportersysteme für Typ III Translokation bakterieller Pathogenitätsfaktoren**

Um die Diskrepanz zwischen den *in vitro* gefundenen Aktivitäten von Virulenzfaktoren und *in vivo* beobachtetem Beitrag zur Virulenz von *Y. enterocolitica* zu überbrücken, ist es notwendig, molekularbiologische Untersuchungen des Infektionsgeschehens in strukturierten Systemen durchzuführen. Dies kann durch ein Mimikry von Gewebestrukturen *in vitro* geschehen (102), oder durch detailliertere *in vivo* Untersuchungen.

Um ein Verständnis der Pathogenitätsmechanismen von *Y. enterocolitica* in der Wechselwirkung mit einem Wirtsorganismus zu erreichen, ist die Verfügbarkeit von Methoden notwendig mit denen die Interaktion zwischen Wirtszellen und Pathogenen untersucht werden kann. Eine Art der Interaktion zwischen *Y. enterocolitica* und Wirtszellen ist die Typ III Translokation von Yops.

### **1.2.1 Die Etablierung verschiedener Reportersysteme ermöglichte eine bessere Untersuchung von Yop Translokation *in vitro***

Es sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden, mit denen Yop Translokation in eukaryotische Zellen analysiert werden kann. Ein direkter Nachweis von TTSS Effektoren gelang mikroskopisch durch Immunzytochemie oder im Immunoblot von Zelllysaten (11,125). Reporterproteine wurden durch Fusion von Effektoren mit dem grün fluoreszierenden Protein (151), Adenylatzyklase (CyaA) (269), Elk (81), FIAsh (62) oder *causes recombination* (Cre) Rekombinase (59) erhalten. Diese Methoden ermöglichten eine

Reihe neuer Erkenntnisse bei *in vitro* Untersuchungen, können aber nicht verwendet werden, um im Mausinfektionsmodell Yop Translokation in Einzelzellen nachzuweisen.

Ein zuverlässiger Nachweis von Effektoren nach Infektion gelang vor allem aus den Lysaten *in vitro* infizierter Zellen. Neue Erkenntnisse über den Mechanismus der Typ III Translokation konnten durch den Direktnachweis von Effektoren durch Immunoblot gewonnen werden. Die Fusion eines Effektors mit einer Elk Domäne schaffte durch die nur in der Wirtszelle mögliche Elk Phosphorylierung eine größere Sicherheit, dass die nachgewiesenen Phospho-Elk Effektoren tatsächlich transloziert worden waren. Durch CyaA Fusion wurde ebenfalls ein spezifischer Nachweis translozierter Effektoren ermöglicht, mit dem zusätzlichen Vorteil der Quantifizierbarkeit der translozierten Enzymaktivität.

Durch Phospho-Elk Detektion nach *Y. enterocolitica* Infektion wurde die Translokation von YopN nachgewiesen und der regulatorische Einfluss von TyeA, SycN, YscB und LcrG untersucht (81). Mit derselben Methode wurde die Notwendigkeit von Ail vermittelter Adhäsion für die Yop Translokation durch *Y. pestis* gezeigt.

Durch CyaA Fusion konnte YopM als Typ III Sekretionssubstrat identifiziert und die Notwendigkeit von YopB und YopD für die Effektortranslokation gezeigt werden (263,269,270).

Die Fusion von Effektoren mit einer Tetracystein-Domäne und Markierung mit dem FLAsH Fluorophor ist die mikroskopische Beobachtung von Yop Translokation bei *in vitro* Infektion möglich. Auf diese Weise konnte die Regulation der Effektorsekretion bei *Yersinia* durch SycH und YscM1/2 gezeigt werden (62).

Durch YopE GFP Fusion sollte erstmalig ein Reportersystem geschaffen werden, das den Nachweis von Effektoren auch *in vivo* ermöglicht (151). Jedoch erwies es sich wegen unzureichender Sekretion des Fusionsproteins und mangelnder Selektivität des Nachweises des translozierten Effektors nicht geeignet für detaillierte Untersuchungen.

### **1.2.2 Ein $\beta$ -Laktamase basiertes Reportersystem ermöglichte erstmals die Untersuchung von Yop Translokation auf Einzelzellebene und *in vivo***

Dagegen gelang ein detaillierter Nachweis von Yop Translokation im Mausmodell nach Infektion mit *Yersinia pestis* (181) und *Salmonella enterica* (108) durch Fusion von Effektoren mit der *E. coli* TEM-1 Laktamase (68). Zur Detektion der  $\beta$ -Laktamase Aktivität in den Wirtszellen wird dabei der  $\beta$ -Laktamase empfindliche Fluoreszenzfarbstoff CCF2-AM

(311) bzw. CCF4-AM verwendet. Dieser wird als zunächst nichtfluoreszentes, unpolares Substrat gut von den Wirtszellen aufgenommen. In den Zellen spalten unspezifische zytoplasmatische Esterasen die lipophilen Esterreste ab, so dass ein negativ geladenes, grünfluoreszentes Molekül entsteht. Die Emission bei 520nm ist dabei die Folge eines Fluoreszenz Energie Resonanz Transfers (FRET) des bei 409nm angeregten Donor-Fluorophors 7-Hydroxycoumarin zum Akzeptor-Fluorophor Fluoreszin. Spaltung des Laktam-Rings von CCF2/4 durch Laktamase Aktivität führt zur Eliminierung des Fluoreszinrests aus dem Molekül und zerrstört den FRET. Daher kann bei CCF2/4 gefärbten Zellen, durch mikroskopische oder durchflusszytometrische Analyse, Laktamase Aktivität (und damit Yop Translokation) durch vermehrte blaue Fluoreszenz bei 447nm nachgewiesen werden (Abbildung 2). Da die Bakterien keine Esterasen exprimieren, die in der Lage sind, die fluoreszenzquenchende Veresterung des Farbstoffs zu entfernen, ist der Laktamase nachweis spezifisch für die in die Wirtszellen translozierte Enzymaktivität (201).

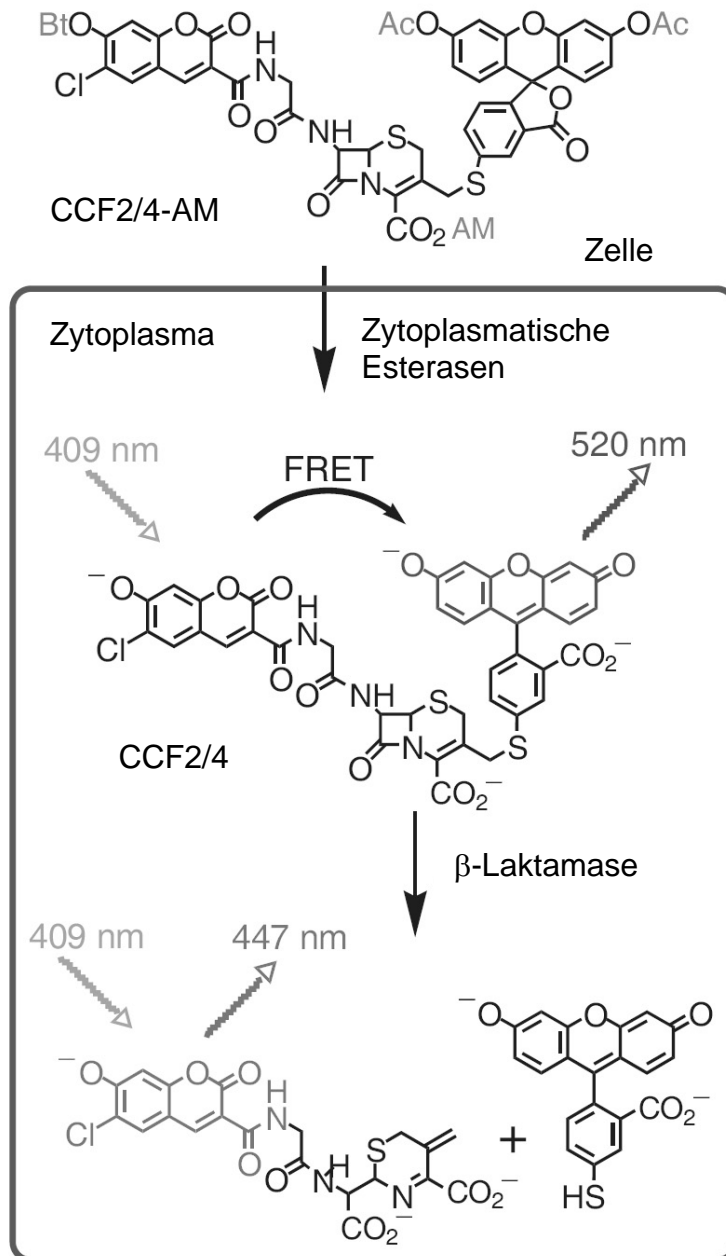


Abbildung 2: Schematische Darstellung der CCF2-AM Färbung (aus (311))

## **1.3 Interaktion von *Y. enterocolitica* mit Epithelzellen**

### **1.3.1 Epithelzellen sind ein essentieller Bestandteil des Immunsystems im Darm**

Die Schleimhautoberflächen der Atemwege, des Urogenital-Trakts und der Verdauungsorgane werden von vielen Krankheitserregern als Ausgangspunkt zur Etablierung einer lokalen oder systemischen Infektion genutzt (156). Die Epithelzellen dieser Schleimhäute bilden eine mechanische Barriere, die das interne Milieu des Wirts eingrenzt. Zudem besitzen Epithelzell-Subtypen spezialisierte Funktionen innerhalb des angeborenen Immunsystems.

Dies gilt im Besonderen für die Mucosa des unteren Gastrointestinaltrakts (GI). In diesem befindet sich ein mikrobielles Ökosystem mit sehr hoher Bakteriendichte, umgeben von einer ebenfalls sehr großen Epitheloberfläche. Eine Reihe lymphatischer Organe, wie der Appendix und die Peyerschen Plaques, bilden zusammen das *gut associated lymphoid tissue* (GALT). Sie sollen einerseits eine effektive Immunantwort im Infektionsfall ermöglichen, andererseits müssen die hier befindlichen Lymphozyten tolerant gegenüber Nahrungsbestandteilen und Kommensalen sein. Die M-Zellen des GI sind spezialisierte Epithelzellen, welche Proben aus dem Darmlumen zum GALT transportieren, um dessen Funktionsfähigkeit zu gewährleisten (186).

### **1.3.2 Proinflammatorische Zytokinexpression durch Epithelzellen nach Pathogenkontakt**

Untersuchungen der Genexpression verschiedener humaner Epithelzelllinien und primärer Epithelzellen nach Infektion mit invasiven Stämmen verschiedener Bakterienarten, zeigte ein durchgängiges Expressionsmuster der proinflammatorischen Zytokine IL-8, MCP-1, GM-CSF und TNF $\alpha$ , sowie von IL-6 bei den primären Epithelzellen (152). In HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass NF $\kappa$ B abhängige Genexpression und IL-8 Ausschüttung durch *Y. enterocolitica* Invasin vermittelte Aktivierung der Rho GTPase Rac induziert werden (117).

### **1.3.3 Genexpressionsanalysen infizierter HeLa Zellen zeigen GILZ Expression als Reaktion auf *Y. enterocolitica* pYV<sup>+</sup> Yop-Virulon**

Genexpressionsanalysen von HeLa Zellen, die mit dem Patientenisolat *Yersinia enterocolitica* O:8 WA-314 (pYV<sup>+</sup>) (24) oder dessen Derivat ohne Virulenzplasmid (pYV<sup>-</sup>) infiziert wurden zeigten, dass insgesamt 165 von 14239 Genen im Vergleich zu uninfizierten Zellen reguliert sind (135). Zu verstärkter Genexpression trägt vor allem die durch Invasin vermittelte Induktion proinflammatorischer Gene bei, welche durch pYV kodierte Faktoren effizient unterdrückt wird. Dagegen werden nur wenige Gene pYV-abhängig induziert. Einige dieser Gene kodieren für Proteine, die Genexpression unterdrücken (*RhoB*, *krüppel like factor 2*, *GILZ*) (48). Insbesondere GILZ wird als Hemmer proinflammatorischer Genexpression beschrieben (37,87).

## **1.4 GILZ vermittelte Immunevasion durch *Y. enterocolitica***

### **1.4.1 Allgemeines**

Das *glucocorticoid induced leucine zipper* (GILZ) Protein wurde unter diesem Namen ursprünglich aus einer cDNA Bibliothek isoliert die aus murinen Thymozyten nach Dexamethason Stimulation erhalten wurde. (78). Diese Bezeichnung ist jedoch nur in der Immunologie üblich; in der Neurologie wird dieses Protein dagegen als *delta sleep inducing peptide, immunoreactor* (DSIPI oder DIP) bezeichnet. Aufgrund seiner Einordnung in die TSC22 Familie (auch: TSC/DIP/BUN Familie) der Leucin Zipper Proteine mit niedrigem Molekulargewicht erhielt es die systematische Bezeichnung TSC22 *domain family 3* (TSC22D3). GILZ ist im Bereich der Eutheria hoch konserviert, zum prototypischen *transforming growth factor  $\beta$  stimulated clone 22* (TSC22) Protein existieren Homologe im ganzen Tierreich, z.B. Short sighted (Bunched) bei *Drosophila melanogaster*. Der humane GILZ Locus befindet sich auf Xq22.2 (63), es werden drei Isoformen exprimiert. Isoform 2 zeigt die höchste Homologie zum murinen GILZ (zu dem die meisten experimentellen Daten vorliegen), besteht aus 134 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 14,8 kD. Stimulusabhängig erfolgt eine Expression in vielen Zelltypen; GILZ kann in den meisten Organen nachgewiesen werden (297).

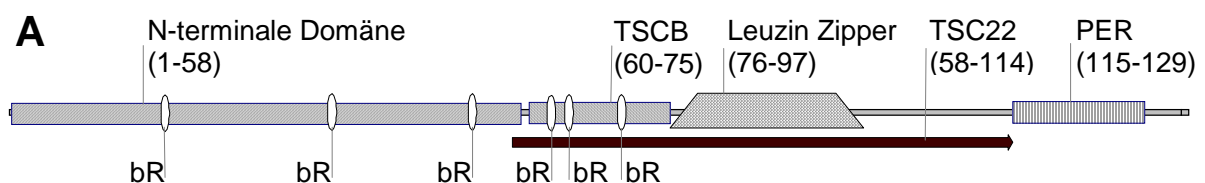
## 1.4.2 Domänen und Proteinstruktur

Die TSC22 Domäne ist der innerhalb der TSC22 Familie konservierte Sequenzbereich, sie stellt aber als Ganzes keine Funktionseinheit dar. Innerhalb dieser Domäne besitzen die Mitglieder der TSC22 Familie wie die Leuzin Zipper Proteine der *basic helix-loop-helix leucin zipper* (bHLH-Zip) und der *basic leucin zipper* (bZip) Familien die namensgebende Dimerisierungsdomäne, einen *coiled-coil* aus zwei amphipatischen  $\alpha$ -Helices mit vier konservierten Leuzinresten im Abstand von je 7 Aminosäuren. Bisher wurde GILZ nur als Monomer oder als Homodimer gefunden.

Ebenfalls innerhalb der TSC22 Domäne befindet sich die *tuberous sclerosis complex box* (TSCB) welche die Interaktion des GILZ Monomers mit Ras ermöglicht (29). Für die Raf Bindung des GILZ Monomers ist dagegen die N-terminale Domäne notwendig, welche auch hinreichend für die c-Fos und c-Jun Bindung ist (30,189).

Im Gegensatz zu anderen Leuzin Zipper Proteinen enthalten TSC22 Proteine kein konserviertes DNA Bindungsmotiv und es konnte bisher keine Transkriptionsaktivierung gezeigt werden (162). Allerdings existieren in der N-terminalen Hälfte des Proteins sechs basische Reste, die wie bei TCS22 DNA Bindung und Transkriptionsrepression ermöglichen könnten.

Die Prolin (P) und Glutaminsäure (E) reiche PER Region enthält 5 PxxP Motive, die Protein-Protein Interaktionen ermöglichen. Eines dieser PxxP Motive (121-124) ist essenziell für die Bindung des GILZ Homodimers an NF $\kappa$ B (Abb. 3) (86).



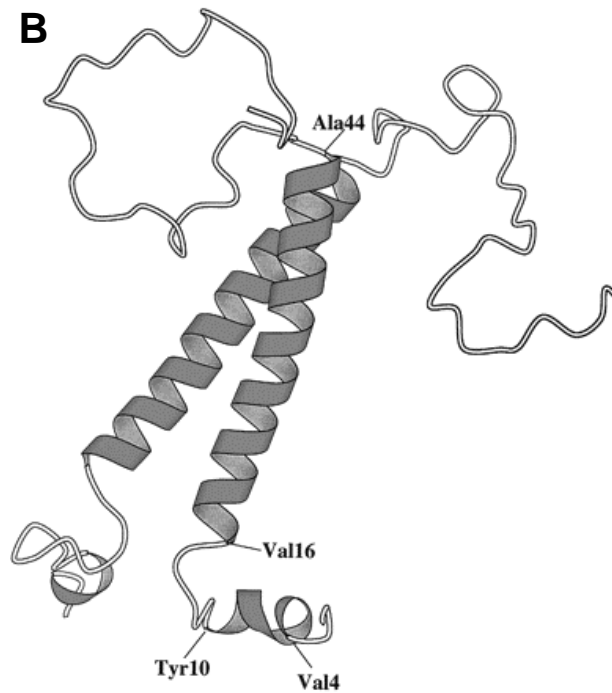


Abbildung 3: A) GILZ Sequenzmotive, bR: basischer Rest (nach (29,78,180)); B) Struktur des homologen pDIP (253))

### 1.4.3 GILZ Expression

Die GILZ Expression in Leukozyten wird außer von Glukokortikoiden maßgeblich von Interleukin 2/10 (IL-2/10), sowie *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) reguliert (71). IL-2 reprimiert, wahrscheinlich über den PI3K / Akt Signalweg, die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der Forkhead Familie. Dies führt dazu, dass auch weniger *forkhead box O3* (FoxO3) and die *forkhead responsive elements* (FHREs) in der GILZ Promoterregion bindet. Daher führt der Entzug von IL-2 zur GILZ Induktion, welche in aktivierten T-Zellen, die ebenfalls durch IL-2 Entzug ausgelöste Apoptose durch Hemmung der Bim Expression verzögert. Dies geschieht durch die Hemmung FHRE abhängiger Transkription, was gleichzeitig erklärt, warum die GILZ Expression nur transient erfolgt: GILZ hemmt seine eigene Promoteraktivität (20). Umgekehrt ist für die Glukokortikoid stimulierte GILZ Expression, welche primär durch die Bindung aktivierter Glukokortikoid-Rezeptoren an die *glucocorticoid response elements* (GREs) vermittelt wird, auf die Co-Aktivierung durch FoxO3 angewiesen und wird durch IL-2 Stimulation verhindert (19). In Epithelzellen wurde gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine die GILZ Expression verringern (87).



Die antiapoptotische Wirkung von GILZ beruht nicht nur auf der Hemmung der durch FoxO3 aktivierten Bim Transkription, sondern auch auf der Hemmung der von *early growth response protein 2/3* (EGR 2/3) initiierten CD95 / Fas Ligand (FasL) Expression (189).

#### **1.4.4 Immunregulatorische Aktivität von GILZ**

GILZ bindet Ras, Raf und das Ras-Raf Dimer, wobei die Bindung von aktiviertem Ras bevorzugt ist und GILZ gebundenes Ras eine erhöhte Raf Affinität besitzt (29). Dadurch verhindert GILZ die aktivierende Phosphorylierung von ERK, Akt und *retinoblastoma associated protein* (Rb) und Cyclin D1 Expression und wirkt so antiproliferativ und antiinflammatorisch durch Arretierung des Zellzyklus und Hemmung der MAPK Aktivität. Teilweise redundant dazu bindet GILZ in der nachgeschalteten Signaltransduktion auch die *activator protein 1* (AP-1) Komponenten c-Fos und c-Jun und senkt so die transkriptionelle Aktivität von AP-1 und damit auch einiger NFAT abhängiger Promotoren (189). Dagegen scheint Östrogen seine proliferative Wirkung durch Senkung der GILZ Promotoraktivität auszuüben (289).

Des weiteren bindet GILZ die NFκB Untereinheit p65 (27,37) und verhindert die Kerntranslokation von p65/p52. Die Unterbindung der NFκB aktivierten Transkription hemmt die Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen. Insbesondere wird in T-Zellen die IL-2 und die IL-2 Rezeptor Expression und die Aktivierbarkeit durch den T-Zell Rezeptor gesenkt. In Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) ist die CD80, CD86 und TLR-2 Expression und die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine CCL3/5 nach T-Zell Kontakt über den CD40 Liganden gehemmt. DCs die nach Dexamethason, IL-10 oder TGF-β Stimulation GILZ exprimieren, aktivieren keine T-Zellen (71). Zudem führt GILZ Expression in DCs zu einer verstärkten Ausschüttung von IL-10, so dass ein sich selbst verstärkender Kreislauf in Gang gesetzt wird.

GILZ dürfte der wichtigste Vermittler der von Glukokortikoiden induzierten Immunsuppression sein, wenngleich auch z.B. der Glukokortikoidrezeptor durch Bindung an c-Jun / AP-1 proinflammatorische Signaltransduktion unterbinden kann (244).

## **1.5 Rho GTPasen: Vermittler proinflammatorischer Signaltransduktion und Angriffspunkt bakterieller Toxine**

### **1.5.1 G-Proteine**

Als G-Proteine werden Proteine bezeichnet, die in der Lage sind, Guaninnukleotide zu binden und zu hydrolysieren. Kleine GTPasen sind monomere G-Proteine mit einer Molekülmasse von 20-40 kDa. Ihr Vorkommen ist auf das Reich der Eukaryoten beschränkt. Die Superfamilie der kleinen GTPasen besteht aus über 100 Mitgliedern, die nach strukturellen Gemeinsamkeiten in 5 Unterfamilien eingeteilt werden: Die Familie der Ras GTPasen (z.B. Ras, Rap und Ral), die Rho GTPasen (z.B. Rho, Rac und CDC42) und die Arf GTPasen Familie, sowie die Rab und Ran GTPasen Familien (38).

Während Ras GTPasen vor allem in Signalwege eingebunden sind, die der Transkriptionsregulation dienen, organisieren Rho GTPasen vor allem das Aktin-Zytoskelett, können aber ebenfalls die Transkription beeinflussen und spielen eine Rolle beim Vesikelverkehr zwischen der Zellmembran und dem Golgi-Apparat oder dem Endoplasmatischen Retikulum. Rab und Arf GTPasen kontrollieren den Vesikelverkehr zwischen den Zellkompartimenten, Ran GTPasen organisieren das Mikrotubulisystem und den nukleären Proteintransport.

Alle Rho GTPasen funktionieren als molekulare Schalter, die sich entweder im aktiven, GTP gebundenen Zustand oder aber im inaktiven GDP Bindungszustand befinden. Die Konformation der Effektorbindungsdomäne verändert sich in Abhängigkeit des gebundenen Liganden, so dass jeweils verschiedene Effektorproteine gebunden werden können, die verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren oder inaktiveren können.

### **1.5.2 Regulatorische Kofaktoren**

Die intrinsische Fähigkeit kleiner GTPasen sowohl zum Austausch von GDP gegen GTP, als auch zur Hydrolyse von GTP zu GDP ist sehr gering. Daher erfolgen diese Vorgänge in der Regel unter Beteiligung regulatorischer Proteine. Diese sind oft Effektoren höhergelegener Signaltransduktion, z. B. von membranständigen Rezeptoren und sind meistens spezifisch für eine bestimmte kleine GTPase, zumindest aber für eine Reihe von GTPasen der gleichen

Unterfamilie (275). *Guanin nucleotide exchange factors* (GEFs) aktivieren kleine GTPasen, indem sie das gebundene GDP freisetzen und so die Bindung von GTP ermöglichen. *GTPase activating proteins* (GAPs) deaktivieren dagegen kleine GTPasen, indem sie die Hydrolyse von GTP zu GDP beschleunigen. Rho und Rab Proteine können außerdem von *guanin nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs) gebunden werden, welche die Aktivität der GEFs blockieren und ihre Bindungspartner im Zytoplasma lokalisieren.

### 1.5.3 Proinflammatorische Signaltransduktion durch Rho GTPasen

Rho GTPasen sind wichtige Regulatoren der Gentranskription und Zytokinexpression bei Infektionen.

Am Anfang einer Infektion induzieren Bakterien die Aktivierung des Komplementsystems. Dabei bilden sich auch die Anaphylatoxine C3a und C5a, von denen zumindest C3a Signaltransduktion über Rho GTPasen aktiviert (12).

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Regulation sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunität ist *nuclear factor*  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Dieser besteht als Homo- oder Heterodimer aus p105/p50, p100/p52 oder p65 Proteinen, wobei die häufigste Form das p50p65 Heterodimer ist. Im inaktiven Zustand liegt NF $\kappa$ B gebunden an seinen Inhibitor I $\kappa$ B im Zytosol vor. Die Aktivierung von NF $\kappa$ B erfolgt durch verschiedene Membranrezeptoren, z.B. durch den Interleukin 1 Rezeptor, die *toll like receptors* (TLRs) 2, 4 und 5, welche bakterielle Komponenten wie Endotoxine, Lysophosphatidylsäure (LPA) und Flagellin erkennen, sowie durch bakterielle Adhäsion an Wirtszellen (117). Diese Faktoren führen zur Phosphorylierung und damit zum Abbau von I $\kappa$ B, was die Translokation von aktivem NF $\kappa$ B in den Zellkern zur Folge hat.

Rho GTPasen (unter Ausnahme von RhoB) sind Bestandteil einiger Signalketten, die vom aktivierten Rezeptor aus zur I $\kappa$ B Phosphorylierung führen. Für die volle Transkriptionsaktivität muss auch NF $\kappa$ B selbst phosphoryliert werden. Dies geschieht über zwei unabhängige Signalwege unter Beteiligung von RhoA über eine atypische Proteinkinase C (PKC $\zeta$ ) oder Rac über die Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K).

Des Weiteren führt Überexpression von aktivem Rac und CDC42 zur Aktivierung von *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und p38 *mitogen activated protein kinase* (MAPK) Signalwegen (43), welche ebenfalls die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine auslösen können.

Rho GTPasen sind also essentiell für die proinflammatorische Signaltransduktion und vermitteln einen TRAF / MyD88 / IRAK unabhängigen Weg der Umwandlung der Rezeptoraktivierung in einen intrazellulären Stimulus (Abb. 4).

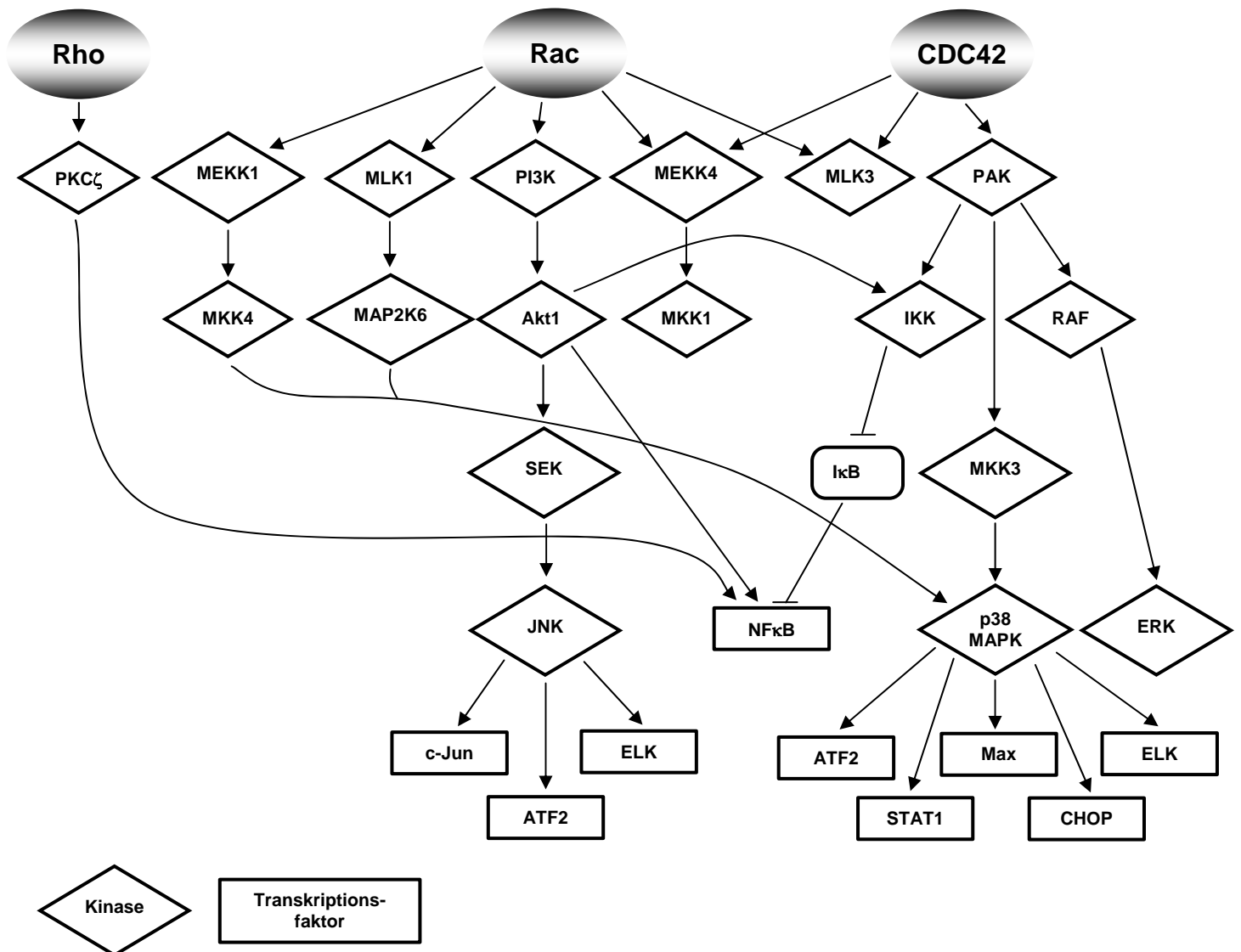


Abbildung 4: Proinflammatorische Signaltransduktion durch Rho GTPasen (nach (31,278))

#### 1.5.4 Rho GTPasen als Ziel bakterieller Pathogenitätsfaktoren

Neben der Steuerung proinflammatorischer Signaltransduktion spielen Rho GTPasen auch als Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts eine Rolle im Infektionsgeschehen. Sie sind in dieser

Funktion nicht nur für die Integrität der intestinalen Epithelbarriere von Bedeutung, sondern sind auch essentiell für die Phagozytose von Fremdorganismen. Auch die Leukozytenmigration bedarf der Aktivität von Rho GTPasen, sie sind entscheidend an der Entstehung der immunologischen Synapse beim Kontakt von T-Zellen mit professionellen *antigen presenting cells* (APCs) beteiligt (12,61).

Als wichtiger Bestandteil des Wirtsorganismus bei der Interaktion mit Pathogenen eignen sich Rho GTPasen auch als Angriffspunkt bakterieller Toxine. Rho spezifische Toxine sind unter den pathogenen Bakterien weit verbreitet und können bei gram positiven wie gram negativen, bei aeroben wie anaeroben Spezies gefunden werden. Auch ihre Wirkungsweisen sind äußerst vielfältig (Tabelle 3).

#### **1.5.4.1 Rho deaktivierende Toxine**

Einige Rho deaktivierende Toxine arretieren Rho GTPasen praktische irreversibel im inaktiven Zustand. Die clostridialen glycosylierenden Enzyme sind typische AB Toxine, bestehend aus einer Translokations- und einer Enzymdomäne. Letztere katalysiert die UDP-Glykosylierung eines Threonin-Rests in der Effektorbindungsdomäne von Rho GTPasen und verhindern so die Interaktion mit den stromabwärts gelegenen Gliedern der Signaltransduktion. Zudem hemmen sie die Wirkung von GAPs und GEFs. Glykosylierte Rho GTPasen sind ausschließlich membranlokalisiert (12,140).

Rho ADP-ribosylierende Toxine katalysieren die Ribosylierung eines Asparaginrests in der Effektorbindungsdomäne. Im Gegensatz zur Threonin Glykosylierung behindert dies aber die Effektorbindung nicht. Stattdessen hemmen ADP-ribosylierende Toxine die Rho Aktivierung durch GEFs und konservieren die Bindung des Rho-GDIs (252).

Ebenfalls irreversibel ist die Entfernung des C-terminalen Membranankers von Rho GTPasen durch YopT (siehe eigenes Kapitel)

Andere Rho inaktivierende Toxine bewirkten dagegen eine reversible Hemmung der Rho Aktivität durch Mimikry von GAPs (ExoS, ExoT, SptP, YopE) oder GDIs (YopO).

### 1.5.4.2 Rho aktivierende Toxine

Die CNF Toxine von *E. coli* und *Y. pseudotuberculosis* deamidieren einen Glutaminrest, das DNT Toxin von *Bordetella spp.* bindet Polyamine an diesen Rest. Beide Toxinfamilien bewirken primär eine Aktivierung von Rho GTPasen durch Hemmung der GTP Hydrolyse bzw. durch Arretieren der Effektorbindungsdomäne in einer aktivierenden Konformation, die unabhängig vom Nukleotidbindungsstatus ist (12).

Toxin	Wirkungsweise	Substrat
<b>Clostridiale glycosylierende Toxine</b>		
Toxin A and B ( <i>Clostridium difficile</i> ), Haemorrhagisches Toxin ( <i>Clostridium sordellii</i> )	Glycosylierung von Rho GTPasen	Deaktivierung von RhoA/B, Rac, CDC42
Toxin B 1470 ( <i>C. difficile</i> Stamm 1470)	Glycosylierung von Rho GTPasen	Deaktivierung von Rac, (Cdc42), Ras, Ral, Rap, nicht RhoA
Lethales Toxin ( <i>C. sordellii</i> )	Glycosylierung von Rho GTPasen	Deaktivierung von Rac, (Cdc42), Ras, Ral, Rap, nicht RhoA
$\alpha$ -Toxin ( <i>Clostridium novyi</i> )	N-Acetylglucosaminylierung von Rho GTPasen	Deaktivierung von RhoA, Rac, CDC42
<b>Rho ADP-ribosylierende Toxine</b>		
C3 Exoenzyme ( <i>Clostridium botulinum</i> ), ( <i>Clostridium limosum</i> ), ( <i>Bacillus cereus</i> ), ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	ADP-Ribosylierung von Rho an Asn41	Deaktivierung von RhoA/B/C
<b>Rho proteolysierende Enzyme</b>		
YopT ( <i>Yersinia enterocolitica</i> )	Entfernung des C-terminalen isoprenylierten Cys	RhoA, Rac, (CDC42)
<b>Rho deamidierende oder transglutaminierende Toxine</b>		
CNF1, CNF2 ( <i>Escherichia coli</i> ) CNFY ( <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> )	Deamidierung von Rho GTPasen	Aktivierung von Rho, Rac, CDC42
DNT ( <i>Bordetella spp.</i> )	Transglutaminierung von Rho GTPasen	Aktivierung von Rho, Rac, CDC42
<b>Toxine die den Guaninnukleotid Bindungsstatus verändern / konservieren</b>		
SopE, SopE2 ( <i>Salmonella</i> )	GEFs für Rho GTPasen	Aktivierung von Rho, Rac, CDC42
ExoS, ExoT ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	GAPs für Rho GTPasen und ADP-Ribosylierung	Deaktivierung von Rho, Rac, CDC42

SptP ( <i>Salmonella</i> )	GAP für Rho GTPasen	Deaktivierung von Rac und CDC42
YopE ( <i>Yersinia</i> spp.)	GAP für Rho GTPasen	Deaktivierung von Rho, Rac, CDC42
YopO ( <i>Yersinia</i> spp.)	GDI für Rho GTPasen	Deaktivierung von Rho und Rac
<b>Toxine die aktive Rho GTPasen mimikrieren</b>		
IpgB2 ( <i>Shigella</i> )	Mimikry von aktivem RhoA	-
IpgB1 ( <i>Shigella</i> )	Mimikry von aktivem Rac	-
MAP ( <i>Escherichia coli</i> )	Mimikry von aktivem CDC42	-

Tabelle 3: Rho spezifische bakterielle Toxine (nach (12,15,218))

## 1.6 Zielsetzungen dieser Arbeit

Immunevasion durch Typ III Effektortranslokation gilt als primäre Strategie von *Y. enterocolitica* zur Etablierung einer systemischen Infektion. Eine Vielzahl von *in vitro* Untersuchungen konnte die Hemmung proinflammatorischer Genexpression, Zerstörung des Zytoskeletts und Apoptoseinduktion durch einzelne Effektoren zeigen (74,255). Neue Genexpressionsanalysen infizierter Epithelzellen ließen jedoch vermuten, dass auch die Aktivierung antiinflammatorischer Genexpression ein Teil der Pathogenitätsstrategie von *Y. enterocolitica* darstellen könnte (48). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die Rolle der Effektor induzierten Expression von GILZ untersucht, einem Mediator antiinflammatorischer und immunsuppressiver Signale (27,29,37).

Weiterhin erwies es sich bisher als schwierig, die *in vitro* beobachteten Pathogenitätsmechanismen bestimmter Effektoren mit dem im Mausmodell beobachteten Beitrag zur Virulenz zu korrelieren. Aus diesem Grund sollte ein Reportersystem etabliert werden, durch das Effektortranslokation in Wirtszellen *in vivo* nachgewiesen werden kann, um durch die Identifizierung der Zielpopulationen der Effektortranslokation eine bessere Grundlage für zukünftige Untersuchungen von Virulenzmechanismen *in vivo* zu schaffen.

### **1.6.1 Aufklärung des Mechanismus der GILZ Induktion durch *Y. enterocolitica* und Klärung des Beitrags von GILZ zur Immunevasion**

Die in den Genexpressionsanalysen (24) beobachtete *GILZ* mRNA Expression nach Infektion von HeLa Zellen mit pYV<sup>+</sup> ließ sich mit Northern Blot und Real-time PCR Experimenten bestätigen. Die maximale Induktion der mRNA Expression (ca. dreifach) wurde nach zwei Stunden beobachtet. Dagegen konnte nach Infektion mit pYV<sup>-</sup> oder der *yopT* defizienten Mutante (312) keine *GILZ* Induktion festgestellt werden (104).

Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass pYV kodierte Virulenzfaktoren durch die Induktion von *GILZ* Expression proinflammatorische Genexpression hemmen könnten. Dies wäre ein bisher unbekannter Immunevasionsmechanismus bei *Yersinia* Infektionen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die für die *GILZ* Induktion verantwortlichen Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica* gefunden und darüber hinaus die dadurch ausgelösten Ereignisse in den infizierten Wirtszellen untersucht werden. Da die *GILZ* Induktion durch *Y. enterocolitica* auf den Angriff von Rho GTPasen zurückgeführt werden konnte, wurde die *GILZ* Induktion durch Hemmung von Rho GTPasen genauer untersucht. Einen weiteren Schwerpunkt sollte die Untersuchung der Wirkung der *Y. enterocolitica* induzierten *GILZ* Induktion auf die NFκB vermittelte Genexpression bilden.

### **1.6.2 Etablierung eines Bla Reportersystems für *Y. enterocolitica***

In einer kürzlich veröffentlichten Studie (181) wurden YopE- bzw. YopM- β-Laktamase (Bla) Fusionsproteine auf einem Plasmid in einem *Y. pestis* Stamm exprimiert. Dies ermöglichte *in vitro* und *in vivo* die Detektion von Bla Aktivität in infizierten Zellen. Die Fusionsproteine aus Bla und einem Effektor waren ein geeignetes Substrat für Typ III Sekretion und diese stellte ein notwendiges Mittel für den Nachweis der Bla Aktivität in den Zellen dar. Daher konnte mit dieser Methode der Nachweis von Bla Aktivität als Indikator für Yop Translokation in Wirtszellen verwendet werden. Die Infektion von Mäusen mit einem solchen Reporterstamm zeigte, dass Yop Injektion vor allem in Granulozyten und dendritische Zellen stattfand, während wenig Yop Injektion in T-Zellen und sehr wenig Yop Injektion in B-Zellen beobachtet wurde.



Analog wurde gezeigt (108), dass durch Fusionen von Bla mit SPI-1 und SPI-2 Effektoren die Translokation von *Salmonella typhimurium* Effektoren demonstriert werden kann. Es zeigte sich weiterhin, dass bei Mauseinfektion vor allem Granulozyten von SPI-2 Effektortranslokation betroffen waren.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Bla Reporter System entwickelt werden, um auch die Effektor Translokation durch *Y. enterocolitica* im Mauseinfektionsmodell untersuchen zu können und den zu erwartenden Zell-Tropismus charakterisieren zu können. Im Rahmen der *in vitro* Etablierung des Systems sollte zudem die Bedeutung der Integrin Expression durch die Wirtszellen und der YadA Expression durch die infizierenden Bakterien untersucht werden. Die hier präsentierten Ergebnisse bauen auf in der Arbeitsgruppe durchgeführten Vorarbeiten auf (165,167) und wurden in Zusammenarbeit mit Annegret Klein-Günther (164) durchgeführt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bakterien-Brutschrank	Heraeus B20, B6420	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer	CyAn ADP	DakoCytomation, Hamburg
Eismaschine	AF 20	Scotsman
Elektroporations Gerät	Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Elektroporations Zusatzgerät	Pulse Controller Plus	Bio-Rad, München
ELISA Messgerät	Sunrise	Tecan, Crailsheim
ELISA Waschgerät	Columbus plus	Tecan, Crailsheim
Feinwaage	L 2200 S	Sartorius, Göttingen
Foto-Entwicklungsmaschine	Curix 60	Agfa, Köln
Geldokumentation	BioDoc Analyse	Biometra, Göttingen
Handdispensierer	Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Heizschüttler für Mikrogefäße	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Magnetheizrührer	RCT basic	IKA Werk, Staufen
Mäusekäfig (IVC)	Sealsafe 1284 L	Techniplast, Hohenpeißenberg
Mäusekäfig Station	Sealsafe Rack	Techniplast, Hohenpeißenberg
Mikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop	TelaVal 31	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Digitalkamera	Axiocam Color	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Filtersätze für CCF4-		AHF Analysentechnik, Tübingen
Mikrowellenherd	Micromat	AEG, Frankfurt a. M.
Mini-Tisch-Zentrifuge	MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Assistent Neubauer improved	Karl Hecht, Sondheim
PCR-Thermocycler	T3	Biometra, Göttingen
pH-Meter	pH 535	WTW, Weilheim i. OB
Photometer	Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10µl, 100 µl, 1000 µl)	Reference, Research	Eppendorf, Hamburg

Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf, Hamburg
Pufferbad für Agarosegele	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Rollinkubator	Assistant RM 5	Karl Hecht, Sondheim
Rotoren f. Sorvall-Zentrifuge	SM 24, SS 34, SL1500	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Schüttelinkubator	HT	Infors, Bottmingen
Schüttler (Wippe)	WT 16	Biometra, Göttingen
SDS-PAGE-Kammern	Mini Protean II	Bio-Rad, München
Semi-Dry Transfer-Apparatur	Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Spannungsquellen für Elektrophorese	Power Pac 200, 300	Bio-Rad, München
Sterilbank	BDK-S 1200, 1500	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl
Tisch-Zentrifuge m. Kühlung	5417-R	Eppendorf, Hamburg
UV Transluminator	FLX-20 M	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe	CVC 2000	Vacuubrand, Wertheim
Wasserbad	WB 10	Memmert, Schwabach
Wirbelmischer	Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach
Zellkultur-Brutschrank	Heraeus BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge	Sorvall RC 5C Plus	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge	Heraeus Biofuge Stratos	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifugengefäße Sorvall	OR 250 ml, FL 25 ml, 50 ml	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

*Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Geräte*

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Autoradiographie-Filme (Kodak X-OMAT)	Kodak-Industrie, Cedex, Frankreich
Einmal Impfösen (1µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Handschuhe (Latex)	Derma Clean, Ansell
Handschuhe (Nitril)	Kimberly Clark, Roswell, USA
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Kanülen (27G x 3/4)	Braun, Melsungen
Kunststoffflaschen, steril	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Membranen für Blots (PVDF)	Millipore, Eschborn
Mikrotiter-Platten (96-Napf V oder F)	Greiner, Nürtingen

Mikrotiter-Platten (96-Napf weiß, OptiPlate)	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Mikrotiter-Platten (96-Napf Maxisorp)	Nunc, Langenselbold
Nylon-Zellsiebe 40µm	BD Biosciences, Heidelberg
Parafilm „M“	American National Can, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
PCR-Gefäß-Streifen, 200µl	Biozym, Hess. Oldenburg
pH Indikatorpapier (pH 1-14)	Merck, Darmstadt
Pipetten (5ml, 10ml)	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Pipettenspitzen (10µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (100µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000µl)	Greiner, Nürtingen
Plastik-Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße 1,5ml	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen für Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Röhrchen (Rundboden, 13ml)	Greiner, Nürtingen
Röhrchen (Spitzboden; 15ml, 50ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen
Spitzen für Handdispensierer (Combitips)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (1ml, 5ml)	Braun, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter (0,22µm, PVDF, Ø 13mm,)	Millipore, Eschborn
Whatman Papier	Munktell & Filtrak, Bärenstein
Zellkulturflaschen (80, 175 cm <sup>2</sup> )	Nunc, Langenselbold
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-Napf)	Nunc, Langenselbold
Zellschaber	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

## 2.1.3 Chemikalien

### 2.1.3.1 Allgemein

Produkt	Hersteller
<b>Anorganische Chemikalien</b>	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	E. Merck, Darmstadt
NaCl	E. Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	E. Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	E. Merck, Darmstadt

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	E. Merck, Darmstadt
NaOH	E. Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	E. Merck, Darmstadt
HCl 32%	E. Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	E. Merck, Darmstadt
<b>Organische Chemikalien</b>	
β-Mercaptoethanol	E. Merck, Darmstadt
Aceton p. A.	E. Merck, Darmstadt
Acrylamid / Bisacrylamid Mix (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Eurobio, Les Iles Ulies, F
Ammoniumpersulfat (APS)	E. Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desferrioxamin (Methylsulfonat Salz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
m-Diaminopimelinsäure (DAP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiotreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
DMSO	Roth, Karlsruhe
Ethanol	E. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,N'-Tetraacetat (EGTA, Tetranatriumsalz)	Serva, Heidelberg
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA, Tetranatriumsalz)	E. Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glyzerin	E. Merck, Darmstadt
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Methanol	E. Merck, Darmstadt
NH <sub>4</sub> Cl	E. Merck, Darmstadt
p-Nitrophenyl-Phosphat (Dinatriumsalz, PNPP)	ICN, USA
Probenecid ( <i>p</i> -(Dipropylsulfamoyl)benzoat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid	E. Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS) ultra pure	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TMRE Reagenz	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Trichloressigsäure (TCA)	E. Merck, Darmstadt
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	E. Merck, Darmstadt
<b>Inhibitoren</b>	
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Latrunculin B (aus <i>Latrunculia magnifica</i> )	E. Merck, Darmstadt
Lovastatin	E. Merck, Darmstadt
NSC23766 (RacI)	E. Merck, Darmstadt
Y-27632 (ROCKI)	E. Merck, Darmstadt

<b>Sonstige Chemikalien</b>	
Bacto-Agar	Difco, MI, USA
Bradford Reagenz (Bio-Rad Protein Assay)	Bio-Rad, München
Entwickler A, B	Agfa, Köln
Desoxyribonukleotide (dNTPs) für PCR	Roche Diagnostics, Mannheim
ExGen 500 (DNA Transfektionsreagenz)	Fermentas, St. Leon-Rot
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HiPerFect (RNA Transfektionsreagenz)	Qiagen, Hilden
Lösungen für BD Durchflusszytometer (FACS-Flow, -Rinse, -Clean)	BD Biosciences, Heidelberg
Hefeextrakt	ICN, CA, USA
Hirn-Herz Bouillon (BHI)	Difco, MI, USA
Magermilchpulver	J. M. Gabler Saliter, Obergünzburg
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S Lösung	Serva, Heidelberg
Proteasen-Inhibitor Tabletten	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rapid Fixer	Agfa, Köln
Sojamilch	Alpro, Düsseldorf
StreptABComplex/AP	DakoCytomation, Hamburg
Trypanblau (Vitalfärbelösung)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton	ICN, CA, USA
Westernblot-Detektionssystem (ECL)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Westernblot-Detektionssystem (FemtoGlow HRP substrate plus)	p.j.k., Kleinbittersfeld

*Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien. Alle weiteren Chemikalien wurden von E. Merck (Darmstadt) bezogen.*

### 2.1.3.2 Komplettreagenziensätze

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
CCF4-AM Loading Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity	Roche Diagnostics, Mannheim
Nucleobond PC500 / PC500 EF	Machery-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid	Machery-Nagel, Düren
Nucleospin Extract II	Machery-Nagel, Düren
TOPO TA / Blunt II Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

*Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Reagenziensätze. Alle Reagenziensätze wurden entsprechend der Herstellerprotokolle verwendet.*

### 2.1.3.3 Fertige Zellkultur-Formulierungen

Produkt	Hersteller
DMEM high Glucose	Gibco BRL, Eggenstein
EDTA (Versen) 1% (w/v)	Biochrom, Berlin
Instamed PBS Dulbecco ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin
L-Glutamin (200 mM)	Gibco BRL, Eggenstein
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
PBS Dulbecco	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (100µg/ml)	Biochrom, Berlin
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA Lösung	Gibco BRL, Eggenstein

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

### 2.1.3.4 Antibiotika

Produkt	Hersteller	Stammlösung
Ampicillin	ICN, CA, USA	100 mg/ml in <i>a. dest.</i>
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	50 mg/ml in Ethanol
Gentamycin	ICN, CA, USA	10 mg/ml in Wasser
Kanamycin	ICN, CA, USA	50 mg/ml in Wasser
Nalidixin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	10 mg/ml in Wasser
Natrium m-Arsenit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	400 µM in Wasser
Spectinomycin	ICN, CA, USA	50 mg/ml in Wasser

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika. Alle Antibiotika-Stammlösungen sind bei -20°C stabil und werden dem Medium 1:1000 zugesetzt.

## 2.1.4 Nukleinsäuren

### 2.1.4.1 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung
<b>Primer</b>		
<i>Bam</i> HI <i>bla</i> fwd	GGA TCC ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG	<i>bla</i> Amplifikation für das Reportersystem

<i>Sall</i> <i>bla</i> rev	<b>GTC GAC</b> AAC TTG GTC TGA CAG TTA CC	<i>bla</i> Amplifikation für das Reportersystem
<i>Bam</i> HI <i>yopO</i> 5' fwd	<b>GGA TCC</b> ATG AAA ATC ATG GGA ACT ATG TCA CC	<i>yopO</i> Amplifikation für Monosekretionsmutante
<i>yopO</i> 5' rev	GTG TCT GGT CCA GAT GCT TCT GAA TCC TCT GCA GTG AAG GTT CGA CG	<i>yopO</i> Amplifikation für Monosekretionsmutante
<i>Sall</i> <i>yopO</i> 3' fwd	<b>GTC GAC</b> TCA CAT CCA TTC CCG	<i>yopO</i> Amplifikation für Monosekretionsmutante
<i>yopO</i> 3' rev	ATC GTC GAA CCT TCA CTG CAG AGG ATT CAG AAG CAT CTG GAC CAG ACA CAC	<i>yopO</i> Amplifikation für Monosekretionsmutante
<i>Hind</i> III <i>sycO</i> fwd	<b>AAG CTT</b> GAC TGT GCG CCG ACA CG	<i>sycO</i> - <i>PyopO/sycO</i> Amplifikation für YopO Monosekretionsmutante
<i>Bam</i> HI <i>sycO</i> rev	<b>GGA TCC</b> GCT TTA CTC ATC CCC ATT TAA TAA	<i>sycO</i> - <i>PyopO/sycO</i> Amplifikation für YopO Monosekretionsmutante
<b>siRNA (Sequenz des codogenen Strangs)</b>		
AllStars negative control siRNA	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT	Kontroll-siRNA
siGILZ	CAC CCU GUU GAA GAC CCU G dTdT	GILZ Unterdrückung

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Primer DNA Oligonukleotide und siRNA Oligonukleotide

Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind hervorgehoben. Primer wurden von Thermo Fisher Scientific, Ulm nach den angegebenen Sequenzen gefertigt. siRNA Oligonukleotide wurden von Qiagen, Hilden der angegebenen Sequenz synthetisiert (siGILZ) oder vorgefertigt (AllStars negative control siRNA) erworben.

#### 2.1.4.2 Plasmide

Bezeichnung	Herkunft	Eigenschaften
<b>pACYC und Derivate</b>		
pACYC184	NEB, Frankfurt	4,2 kb, geringe Kopienzahl, Klonierungsvektor f. Enterobakterien, Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>
pBME53-Bla	Diese Arbeit	Aus pBME53-G1 mit <i>Bam</i> HI - <i>bla</i> – <i>Sall</i> aus pCR- <i>bla</i>
pBME53-Cre	(279)	Aus pBME53-G1 mit <i>Bam</i> HI - <i>nls</i> - <i>cre</i> - <i>Sall</i> aus pBKEF- <i>nlscre</i>
pBME53-G1	(15)	pACYC184 Derivat mit <i>Xba</i> I - <i>Hind</i> III - <i>sycE</i> - <i>PyopE/sycE</i> - <i>yopE53</i> - <i>Bam</i> HI - <i>gfp</i> - <i>Sall</i>



pBME53-Ova	Diese Arbeit	Plasmid für YopE53-Ova247-355 Monosekretion, aus pBME53-Bla durch <i>Bam</i> HI - <i>ova</i> 247-355 - <i>Sa</i> II aus pYopE <sub>1-138</sub> Ova <sub>247-355</sub>
pBME53-YopH	B. Manncke	Plasmid für YopE53-YopH Monosekretion
pBME53-YopT	B. Manncke	Plasmid für YopE53-YopT Monosekretion,
pBM-YopE	B. Manncke	Plasmid für YopE Monosekretion,
pBM-YopO	Diese Arbeit, B. Manncke	Plasmid für YopO Monosekretion, aus pACYC184 durch <i>Hind</i> III - <i>syc</i> O - <i>Pyop</i> O/ <i>syc</i> O - <i>Bam</i> HI gefolgt von <i>Bam</i> HI - <i>yop</i> OΔ <i>Bam</i> HI - <i>Sa</i> II amplifiziert aus pYV WA-314
pYopE <sub>1-138</sub> Ova <sub>247-355</sub>	(472)	pACYC184 Derivat mit <i>Hind</i> III - <i>syc</i> E - <i>Pyop</i> E/ <i>syc</i> E - <i>yop</i> E138 - <i>Bam</i> HI - <i>ova</i> 247-355 - <i>Sa</i> II
<b>pIV2 und Derivate</b>		
pIV2	(429)	3,5 kb, Derivat von p29807, geringe Kopienzahl, Klonierungsvektor f. Enterobakterien, Kan <sup>R</sup>
pIV2-SycE-YopE53-Cre	(277)	Cre Reporterplasmid, pIV2 Derivat mit <i>Xba</i> I - <i>Hind</i> III - <i>syc</i> E - <i>Pyop</i> E/ <i>syc</i> E - <i>yop</i> E53 - <i>Bam</i> HI - <i>nls</i> - <i>cre</i> - <i>Sa</i> II aus pBME53-Cre
pMK4	J. Mota, M. Kuhn	Metabolisch stabilisiertes Cre Reporterplamid, aus pIV2-SycE-YopE53-Cre mit <i>Apa</i> I - <i>asd</i> - <i>Xho</i> I Amplifikat aus dem E40 Chromosom
pMK-Bla	Diese Arbeit	Bla Reporterplasmid, aus pMK4 mit <i>Hind</i> III - <i>syc</i> E - <i>Pyop</i> E/ <i>syc</i> E - <i>yop</i> E53 - <i>Bam</i> HI - <i>bla</i> - <i>Sa</i> II
pMK-Ova	Diese Arbeit	Kontrollplasmid für das Reportersystem, aus pMK-Bla durch <i>Hind</i> III - <i>syc</i> E - <i>Pyop</i> E/ <i>syc</i> E - <i>yop</i> E53 - <i>Bam</i> HI - <i>ova</i> 147-355 - <i>Sa</i> II aus pBME53-Ova
<b>Plasmide für eukaryotische Expression</b>		
pBKEF- <i>nlscre</i>	GBF, Braunschweig	Eukaryotischer Expressionsvektor mit <i>cre</i> -Insert, Kan <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe	5,4 kb, Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>
pcDNA3-Bla	Diese Arbeit	Vektor für eukaryotische Bla Expression aus pcDNA3 mit <i>Bam</i> HI - <i>bla</i> - <i>Xho</i> I aus pCR- <i>bla</i>
pCMV-β-Gal	Clontech, Palo Alto, CA, USA	Vektor für konstitutive Expression von β-Galaktosidase in eukaryotischen Zellen
pHM6	Roche Diagnostics, Mannheim	5,5 kb, Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>
pHM6-GILZ	B. Manncke	Vektor zur GILZ Überexpression
pHM6-YopT	B. Manncke	Vektor zur YopT Überexpression
pHM6-YopTC139A	B. Manncke	Vektor zur YopTC139A Überexpression
pNFκB-Luc	Stratagene, La Jolla, CA, USA	Luziferase-Reporterplasmid für NFκB Aktivität
<b>Weitere Plasmide</b>		
pCR2.1	Invitrogen, Karlsruhe	TA Klonierungsvektor für PCR Produkte
pCR- <i>bla</i>	Diese Arbeit	pCR Blunt II mit <i>Bam</i> HI - <i>bla</i> - <i>Sa</i> II Amplifikat aus

		pCR2.1 (in Ableserichtung der <i>lacZα</i> Sequenz)
pCR Blunt II	Invitrogen, Karlsruhe	Klonierungvektor für PCR Produkte ohne Überhang
pIM279	B. Manncke (244,501)	pBC18R P <sub>lac</sub> <i>yopT</i> , <i>sycT</i>
pISO1	B. Manncke (423,502)	pBC18R P <sub>lac</sub> <i>yopTC139A</i> , <i>sycT</i>
pLJM 4029	(314)	E40 pYV Plasmid mit <i>yadA</i> Deletion
pMSL41	(478)	E40 pYV Plasmid mit funktionslosem <i>yscNΔ169-177</i>

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

## 2.1.5 Proteine

### 2.1.5.1 Antikörper

Antikörper (Konjugat)	Spezies (Typ)	Quelle
anti Aktin (unmarkiert)	Maus (polyklonal)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti CD29 (APC)	Arm. Hamster (IgG)	Biologend, San Diego, CA, USA
anti GST-GILZ (unmarkiert)	Kaninchen (polyklonal)	AG Authenrieth
anti GST-YopD (unmarkiert)	Kaninchen (polyklonal)	G. Cornelis, Basel
anti GST-YopE (unmarkiert)	Kaninchen (polyklonal)	AG Authenrieth
anti GST-YopH (unmarkiert)	Kaninchen (polyklonal)	AG Authenrieth
anti GST-YopP (unmarkiert)	Kaninchen (polyklonal)	AG Authenrieth
anti GST-YopT (unmarkiert)	Kaninchen (polyklonal)	K. Ruckdeschel, München
anti humanes IL-8 (unmarkiert)	Maus (IgG2b)	BD Biosciences, Heidelberg
anti humanes IL-8 (Biotin)	Maus (IgG2b)	BD Biosciences, Heidelberg
anti Kaninchen IgG (HRP)	Schwein	DakoCytomation, Glostrup, DK
anti Kaninchen IgG (unmarkiert)	Ziege (polyklonal)	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA
Anti Maus IgG	Kaninchen	DakoCytomation, Glostrup, DK
anti Ziege IgG (HRP)	Esel (polyklonal)	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA

Tabelle 13: In dieser Arbeit für Immunoblot, ELISA und durchflusszytometrische Analysen verwendete Antikörper

### 2.1.5.2 DNA modifizierende Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Bam</i> HI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Hind</i> III	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sal</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xba</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xho</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
High Fidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA

*Tabelle 14: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen und DNA-Polymerasen. Alle Enzyme wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet.*

### 2.1.5.3 Rho inaktivierende Toxine

Toxin	Quelle
C2IN-C3lim Fusionstoxin	H. Barth, Ulm
<i>C. botulinum</i> C2IIa	H. Barth, Ulm
<i>C. difficile</i> TcdB 10463	I. Just, Hannover

*Tabelle 15: In dieser Arbeit verwendete clostridiale Rho inaktivierende Toxine.*

### 2.1.5.4 Sonstige Proteine

Protein	Quelle
BSA	Biomol, Hamburg
IL-8 (human, recombinant)	BD Biosciences, Heidelberg
PAGERuler Unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

*Tabelle 16: Sonstige in dieser Arbeit verwendete Proteine*

## 2.1.6 Bakterienstämme

### 2.1.6.1 *E. coli* Stämme

Stamm	Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	endA1 hsdR17(r <sub>k-m<sub>k</sub>+</sub> ) supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 $\Delta$ (lacZYA-argFU169) ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15)	(224)
<i>E. coli</i> One Shot TOP10	Chemisch kompetenter Klonierungsstamm	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> pInv 1914	<i>E. coli</i> HB101 Stamm der IPTG induzierbar <i>Y. enterocolitica</i> Invasin exprimiert	(389)
<i>E. coli</i> HB101	supE44, $\Delta$ (mcrC-mrr), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi-1	(108)

Tabelle 17: In dieser Arbeit für Klonierungen und Infektionsversuche verwendete *E. coli* Stämme

### 2.1.6.2 *Y. enterocolitica* Stämme

Stamm	Beschreibung	Quelle
<b>Patientenisolate</b>		
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 (pYV <sup>+</sup> )	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8, Patientenisolat (C. Pai, Montreal) mit chromosomal integrierter Nalidixinsäure-Resistenzkassette WA-314, Nal <sup>R</sup>	(230,231)
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 (E40)	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:9 Patientenisolat E40 biochemisch identisch mit Isolat W22703, Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup>	(425)
<b>WA-314 Stämme mit Yop Deletion</b>		
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 $\Delta$ yopE::Kan ( $\Delta$ E)	pYV <sup>+</sup> , yopE deletiert durch Kanamycin-Kassette, Nal <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	B. Manncke
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 $\Delta$ yopH::Kan ( $\Delta$ H)	pYV <sup>+</sup> , yopH deletiert durch Kanamycin-Kassette, Nal <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	B. Manncke
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 $\Delta$ yopM::Kan ( $\Delta$ M)	pYV <sup>+</sup> , yopM deletiert durch Kanamycin-Kassette, Nal <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	B. Manncke
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 $\Delta$ yopP::Cm, ( $\Delta$ P)	pYV <sup>+</sup> , yopP deletiert durch Chloramphenicol-Kassette, Nal <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	(373)
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 $\Delta$ yopT::Cm ( $\Delta$ T)	pYV <sup>+</sup> , yopT deletiert durch Chloramphenicol-Kassette, Nal <sup>R</sup> ,	(499)

	Cm <sup>R</sup>	
<b>WA-314 Monosekretionsstämme</b>		
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 pYV <sup>-</sup> pTTSS pBME53-Ova <sub>247-355</sub> (pTTSS- <i>ova</i> )	pTTSS mit YopE53-YopA <sub>247-355</sub> Monosekretion	Diese Arbeit
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 pYV <sup>-</sup> pTTSS pBME53-YopT (pTTSS- <i>yopT</i> )	pTTSS mit YopE53-YopT Monosekretion	B. Manncke
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 pYV <sup>-</sup> pTTSS pBM-YopE (pTTSS- <i>yopE</i> )	pTTSS mit YopE Monosekretion	B. Manncke
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 pYV <sup>-</sup> pTTSS pBME53-YopH (pTTSS- <i>yopH</i> )	pTTSS mit YopE53-YopH Monosekretion	B. Manncke
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 pYV <sup>-</sup> pTTSS pBM-YopO (pTTSS- <i>yopO</i> )	pTTSS mit YopO Monosekretion	Diese Arbeit
<b>Weitere WA-314 Stämme</b>		
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 Δ <i>yopT</i> ::Cm pIM279 (Δ <i>pyopT</i> )	ΔT Stamm <i>in trans</i> mit <i>yopT</i> und <i>sycT</i> komplementiert (Expression IPTG abhängig)	B. Manncke
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 Δ <i>yopT</i> ::Cm pISO1 (Δ <i>pyopT</i> <sub>C139A</sub> )	ΔT Stamm <i>in trans</i> mit proteasedefizientem <i>yopT</i> <sub>C139A</sub> und <i>sycT</i> komplementiert (Expression IPTG abhängig)	B. Manncke
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 pTTSS (pTTSS)	pYV <sup>-</sup> mit Plasmid pTTSS, kodierend für das Ysc Typ III-Sekretionssystem und <i>YadA</i> Nal <sup>R</sup> , Spec <sup>R</sup>	(444)
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314 pYV <sup>-</sup> (pYV <sup>-</sup> )	<i>Y. enterocolitica</i> WA-314, Serotyp O:8, ohne Virulenzplasmid, Nal <sup>R</sup>	(230)
<b>E40 Stämme</b>		
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 Δ <i>asd</i> (E40 Δ <i>asd</i> )	E40 Stamm mit <i>asd</i> Gendeletion, keine L-Aspartatdehydrogenase Expression. Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup> , DAP <sup>aux</sup>	M. Kuhn, J. Mota
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 Δ <i>asd</i> pMK-Bla (E40-pBla)	E40 Δ <i>asd</i> Stamm transformiert mit dem Bla Reporterplasmid. Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 Δ <i>asd</i> pMK-Ova (E40-pOva)	E40 Δ <i>asd</i> transformiert mit dem Kontrollplasmid pMK-Ova. Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 pLJM 4029 Δ <i>asd</i> pMK-Bla (Δ <i>YadA</i> -pBla)	E40 pYV <sup>-</sup> Δ <i>asd</i> pMK-Bla Stamm transformiert mit pLJM 4029 ( <i>yadA</i> defizientes Virulenzplasmid) Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 pLJM 4029 Δ <i>asd</i> pMK-Ova (Δ <i>YadA</i> -pOva)	E40 pYV <sup>-</sup> Δ <i>asd</i> pMK-Ova Stamm transformiert mit pLJM 4029 ( <i>yadA</i> defizientes Virulenzplasmid) Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 pMSL41 Δ <i>asd</i> pMK-	E40 pYV <sup>-</sup> Δ <i>asd</i> pMK-Bla Stamm transformiert mit pMSL41 (mutiertes	Diese Arbeit

Bla ( $\Delta YscN$ -pBla)	Virulenzplasmid, vermittelt $\Delta YscN$ Phänotyp). Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 pYV <sup>-</sup> $\Delta asd$ pMK-Bla (E40 pYV <sup>-</sup> $\Delta asd$ pBla)	E40 $\Delta asd$ pMK-Bla Stamm ohne Virulenzplasmid. Nal <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(268)
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 E40 pYV <sup>-</sup> $\Delta asd$ pMK-Ova (E40 pYV <sup>-</sup> $\Delta asd$ pOva)	E40 $\Delta asd$ pMK-Ova Stamm ohne Virulenzplasmid. Nal <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(268)

Tabelle 18: In dieser Arbeit verwendete *Y. enterocolitica* O:8 WA-314 und O:9 E40 Stämme

### 2.1.7 Zelllinien

HeLa Zellen wurden von der American Type Culture Collection (MD, USA) bezogen. GD25 und GD25  $\beta_{1A}$  Fibroblasten wurden uns freundlicherweise von R. Fässler zur Verfügung gestellt.

### 2.1.8 Tiere

C57BL/6 Mäuse frei von spezifischen Pathogenen im Alter von 6-8 Wochen wurden von Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen. Die Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen durchgeführt.

### 2.1.9 Software

Programm	Hersteller
Adobe Acrobat 7.0 Professional	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Adobe Photoshop 6	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Axiovision 4.4	Carl Zeiss, Jena
Cellquest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
Microsoft Office 2000	Microsoft, Redmont, WA, USA
Prism 4	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Reference Manager Professional Edition 11	Thomson Reuters, New York, NY, USA
Summit 4.3	DakoCytomation, Hamburg
VectorNTI	Informax/Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 19: Während dieser Arbeit verwendete Software

## 2.1.10 Lösungen und Puffer

### 2.1.10.1 Puffer und Lösungen für die Nukleinsäureanalytik

#### Fünffach Laufpuffer für Agarosegele (TBE-Puffer)

54g	Tris-Base
27,5g	Borsäure
20ml	0.5 M EDTA
pH 8,3	eingestellt mit Essigsäure
<i>ad 1l</i>	<i>a. dest.</i>

#### Orange-G-Farbmarker

43,5ml	Glyzerin
200mg	Orange G
<i>ad 100ml</i>	<i>a. dest.</i>

#### FACS-Puffer

5%	FKS
500ml	PBS Dulbecco

### 2.1.10.2 Lösungen und Puffer für die Proteinanalytik

#### Proteaseinhibitor Stammlösung

1 Tablette	Complete Proteaseinhibitor
20µl	1M DTT
<i>ad 1ml</i>	<i>a. bidest.</i>
Lagerung bei -20°C	

#### Gesättigte TCA Lösung

244%	TCA
	<i>a. bidest.</i>

#### Fünffach Probenpuffer (Laemmli)

1ml	0.5 M Tris pH 6.8
0,8ml	Glyzerin
1,6ml	10% SDS
0,8g	Dithiotreitol
0,05% (w/v)	Bromphenolblau
<i>ad 8ml</i>	<i>a. bidest.</i>

### **Elektrophoresepuffer**

50mM	Tris
384mM	Glyzin
0,1% (w/v)	SDS
10% (v/v)	Methanol

### **Western-Blot Transferpuffer**

48mM	Tris
39mM	Glyzin
0,038% (w/v)	SDS

### **Western-Blot Waschpuffer**

0,9%	NaCl
10mM	Tris/HCl pH 7,4
0,5% (w/v)	Tween 20

### **Puffer für den IL-8 ELISA**

#### **Beschichtungspuffer**

0,1 M	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 9,0) <i>a. bidest.</i>
-------	---

#### **Waschpuffer**

0,05%	Tween20
ad 10l	PBS (Biochrom)

#### **Blockierungspuffer**

10%	FKS
ad 1l	PBS (Biochrom)

### **Substratpuffer (pH 9,8)**

0,05M	NaHCO <sub>3</sub> (pH 8,1)
0,05M	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pH 11,3)
mischen bis der pH stimmt	
1mM	MgCl <sub>2</sub>



### 2.1.10.3 Puffer für die Messung der Luziferaseaktivität

#### Zweifach Galaktosidase Reaktionspuffer

0,5M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1M	MgCL <sub>2</sub>
750mM	D-Galaktose
10% (w/v)	Triton-X 100
ad 50ml	Wasser

ONPG (Zugabe unmittelbar vor Gebrauch): 1ml Stammlösung (4 mg/ml) für 5ml Puffer

β-Mercaptoethanol (Zugabe unmittelbar vor Gebrauch): 18µl für 5ml Puffer

### 2.1.10.4 Bakterienmedien

Bakterienmedien wurden aus der institutseigenen Nährbodenküche bezogen. Die Medien wurden im Autoklaven 20 min. bei 121°C sterilisiert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert nachträglich dazu gegeben.

#### LB-Agar

15g	Bacto Agar
ad 1l	LB-Medium

#### LB-Medium (pH 7,5)

10g/l	Trypton
5g/l	Hefeextrakt
5g/l	NaCl
ad 1l	a. dest.

#### Hirn-Herz-Medium (BHI, pH 7,4)

37 g/l	BHI-Pulver
ad 1l	a. bidest.

#### GYT

10% (v/v)	Glyzerin
0,125% (w/v)	Hefeextrakt
0,25% (w/v)	Trypton
ad 0,25l	a. bidest.

### 2.1.10.5 Puffer und Medien für die Zellkultur

#### Puffer für die Separation von Darmepithelzellen

##### Puffer A (für 1. Separationsdurchgang Dickdarm)

1mM	DTT
1mM	EDTA
1%	FKS
<i>ad</i> 25ml	PBS (Biochrom) ohne Kalzium und Magnesium

##### Puffer B (für 1. und 2. Separationsdurchgang Dünndarm und 2. Separationsdurchgang Dickdarm)

1mM	EDTA
1%	FKS
<i>ad</i> 75ml	PBS (Biochrom) ohne Kalzium und Magnesium

#### Medien für die Kultivierung von Zellen

##### HeLa Medium

500ml	RPMI 1640
10%	FKS
1%	Glutamin
100µg/ml	Penicillin/Streptomycin (in Medium mit Antibiotika)

##### GD25 Medium

500ml	DMEM
10%	FKS
1%	Glutamin
100µg/ml	Penicillin/Streptomycin (in Medium mit Antibiotika)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Nukleinsäure Präparation

#### 2.2.1.1 DNA Konzentrationsbestimmung

Die DNA Konzentration einer Lösung wurde durch die Messung der Absorption bei 260nm bestimmt. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich (290). Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger

DNA. Der Quotient aus den Extinktionen bei 260nm und 280nm gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA Präparation und ist 1,8 für reine DNA. Bei 280nm absorbieren die aromatischen Aminosäurereste der Proteine. Daher werden Absorptionsquotienten unter 1,8 durch Proteinverunreinigungen verursacht. Absorptionsquotienten über 1,8 werden durch Rückstände von RNA erklärt.

#### **2.2.1.2 Isolierung von endotoxinfreier DNA**

Um endotoxinfreie Plasmid-DNA für Transfektionen zu erhalten, wurde das Nucleobond PC 500 EF Kit von Macherey-Nagel verwendet. Es wurden 250 ml ÜN-Kultur zentrifugiert (6.000·g, 15 min), die sedimentierten Zellen entsprechend der Anleitung des Herstellers lysiert und die Plasmid-DNA in endotoxinfreien Behältern präpariert. Hierbei wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (86) mit anschließender Anionenaustausch-Chromatographie verfahren.

#### **2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA**

Um Plasmid-DNA aufzureinigen, wurden die Plasmidpräparationssets Nucleobond PC100 bzw. Nucleospin Plasmid (für kleine Präparationen) der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Plasmid-DNA wird dabei nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (86) mit anschließender Anionenaustauschchromatographie isoliert. Es wurde nach den entsprechenden Arbeitsanweisungen des jeweiligen Herstellers gearbeitet. Für die Präparation von *pACYC184* und *pIV2* Derivaten wurden die Protokolle für Plasmide mit geringer Kopienzahl verwendet. Es wurde immer die maximale empfohlene Menge an Bakterienkultur eingesetzt. Die Elution der DNA erfolgte stets mit *a. bidest.*

#### **2.2.1.4 DNA Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in einer Gelmatrix bei angelegter Spannung mit einer Geschwindigkeit, die dem Logarithmus ihres Molekulargewichts entspricht. Deshalb kann das Molekulargewicht eines DNA-Fragmentes aus der elektrophoretischen Mobilität im Vergleich zu der Mobilität von DNA-Fragmenten bekannter Größe bestimmt werden.

Zur Herstellung der Gele wurde eine 1% (w/v) Agaroselösung in 0,5% TBE aufgeköcht, unter Rühren abgekühlt und in einen Schlitten mit Kamm gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine mit in 0,5% TBE befüllte Elektrophoresewanne eingesetzt. Die DNA-Lösungen wurden mit 1/5 Volumen Farbmaler gemischt in die Taschen des Gels pipettiert. Die angelegte Feldstärke betrug  $2,5\text{V}/\text{cm}^2$ .

Zur Detektion der DNA Banden wurden die Gele ca. 10min. in einer  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromidlösung in *a. bidest.* gefärbt und anschließend ca. 10min. in *a. dest.* gewaschen. Fotografiert wurde die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bei Durchleuchtung mit 254nm UV-Licht.

Die DNA Agarose-Gelelektrophorese wurde analytisch und präparativ genutzt.

### **2.2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Präparative Agarosegele wurden auf dem Transluminator bei 366nm betrachtet und die benötigten Banden rasch mit einem Skalpell ausgeschnitten, um die Entstehung von Brüchen in der DNA zu minimieren.

Extrahiert wurde mit dem Nucleospin Extract II Set. Dabei wurde die DNA in einem Puffer gelöst, der durch eine hohe Salzkonzentration und einen niedrigen pH-Wert die Bindung der DNA an die Silicamembran des Zentrifugensäulchens ermöglicht. Nach dem Waschen wurde die DNA mit  $50\mu\text{l}$  *a. bidest.* eluiert.

### **2.2.1.6 Polymersasekettenreaktion**

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird ein definiertes, zwischen zwei an Strang und Gegenstrang der Matrize (Template-DNA) hybridisierten Oligonukleotiden (Primer) gelegenes DNA-Fragment exponentiell vervielfältigt (316).

Die Reaktionsfolge besteht aus wiederholtem Schmelzen des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge (Denaturierung), Primer-Hybridisierung (Annealing) und zuletzt der DNA-Polymerisierung (Elongation). Durch die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase kann dieser Zyklus mehrmals durchlaufen werden (378).

Die PCR Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert und gegebenenfalls für die Weiterverwendung extrahiert. Die mit *Thermus aquaticus* (Taq) Polymerase, allein

oder gemischt mit anderen Polymerasen, hergestellten PCR Produkte wiesen Desoxythymidin Überhänge auf und konnten daher in Vektoren mit Desoxyadenosinüberhänge ligiert werden.

#### **2.2.1.7 TA Klonierung**

Wurden PCR Produkte zur Herstellung rekombinanter Plasmide verwendet, erfolgte in den meisten Fällen eine Subklonierung in den pCR2.1 TA Vektor, da sie in diesem einfach sequenziert und weiterkloniert werden konnten

Die Ligation des PCR Produkts in den pCR2.1 TA Vektor und die anschließende Transformation in *E. coli* One Shot TOP10 wurde nach Anleitung des Herstellers mit 1µl PCR-Produkt durchgeführt. Nach der Transformation wurden die Bakterien 1h in 250µl SOC Medium geschüttelt und 50µl bzw. 100µl davon auf LB Medium mit 25µg/ml Kanamycin plattiert.

#### **2.2.1.8 DNA Verdau mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsnukleasen können spezifische, oft palindromische Zielsequenzen erkennen und so DNA planmäßig zerschneiden.

Bei den präparativen Verdauen in dieser Arbeit wurde max. 1µg DNA eingesetzt. Der Verdau wurde im vom Hersteller empfohlenen Puffer mit der empfohlenen Enzymmenge in 50µl Ansätzen über Nacht bei 37°C durchgeführt.

#### **2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden können mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft werden. Für die Ligation zweier DNA-Fragmente wurden jeweils max. 200ng Vektor und die 5-fache molare Menge an Insert eingesetzt.

Die Ligation erfolgte im vom Hersteller empfohlenen Puffer mit der empfohlenen Enzymmenge in 50µl Ansätzen über Nacht bei 16°C.

### **2.2.2 Proteinanalytik**

### 2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Zelllysate wurden durch Frier-Tau Lyse der nach dem Versuch geernteten Zellen gewonnen. Nach Ende des Versuchszeitraums wurden die Zellen (in der 85cm<sup>2</sup> Flasche) mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2ml Trypsin abgelöst. Der Trypsinverdau wurde mit 10ml 2% FKS (in PBS) gestoppt. Die Zellsuspension wurde in einem 15ml Zentrifugenröhrcehn 5min bei 400 · g zentrifugiert. Das in 1ml PBS resuspendierte Pellet wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 150µl PBS mit 12µl Proteaseinhibitor-Stammlösung aufgenommen. Für die Frier-Tau Lyse wurde die Zellsuspension je drei Mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei 37°C im Heizblock wieder aufgetaut und gründlich gemischt. Nach dem dritten Auftauen wurde die Zellfragmente durch 5min Zentrifugation bei 12.000rpm (4°C) sedimentiert. Der so erhaltene Überstand wurde wie nachfolgend beschrieben für die Analyse der GILZ Proteinexpression verwendet.

### 2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten

Die Bradford-Methode (109) ist eine schnelle und sensitive Methode zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen. Sie beruht auf der pH-Abhängigkeit des Absorptionsmaximums ( $A_{\max}$ ) des Triphenylmethyl-Farbstoffs *Coomassie brilliant blue G-250* sowie dessen Fähigkeit zur Bindung an einige Aminosäurereste (stark an Arginin, schwächer an Histidin und aromatische Seitenketten) von Proteinen. In saurer Lösung befindet sich der Farbstoff hauptsächlich in seiner doppelt protonierten kationischen Form mit  $A_{\max} = 470\text{nm}$  (rotbraun). Durch Proteinbindung wird die unprotonierte blaue Form ( $A_{\max} = 595\text{nm}$ ) stabilisiert (132). Daher lässt sich die Proteinkonzentration einer Lösung durch Zugabe des Bradford-Reagenzes gefolgt von der Absorptionsmessung bei 595nm bestimmen.

Die Bestimmung wurde in 96-Napf Flachbodenplatten durchgeführt. Pro Napf wurden je 100µl Standard oder Probe vorgelegt und vor der Absorptionsmessung gründlich mit 100µl 40% Bradford-Reagenz (in *a. bidest.*) gemischt. Zur Kalibrierung des Tests wurde eine Standardreihe (in Duplikaten) mit Rinderserum-Albumin in den Konzentration 80 / 40 / 20, 10 / 5 / 2,5 / 1,25 / 0 µg/ml hergestellt. Die Lysate wurden als 1:500 Verdünnungen (in *a.*

*bidest.*) als Probe eingesetzt. Zur Analyse der GILZ Expression wurden 100µg Protein eingesetzt, bei der Analyse anderer Proteine wurden 50µg Protein verwendet.

### **2.2.2.3 Reduzierende diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Durch die SDS-PAGE (282) lassen sich Proteine nach ihrer Masse auftrennen. Durch Erhitzen in Laemmli-Puffer werden die Proteine durch Assoziation mit SDS denaturiert und mit einer der Masse proportionalen negativen Ladungsmenge versehen, ergänzende Strukturdenaturierung wird durch die Reduktion von Disulfidbrücken durch Dithiothreitol erreicht.

Nach dem Laden in die Taschen des Sammelgels werden zu Beginn der Elektrophorese die aufgetragenen Proteine zu einer dünnen Bande fokussiert. Dies wird durch die weitmaschige Struktur des Sammelgels sowie durch ein fast neutrales (pH 6,8) Milieu bei vergleichsweise geringer Ionenstärke erreicht. Dies führt dazu, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der gelösten Moleküle nicht von deren Größe, sondern zunächst von deren Ladung / Masse Verhältnis abhängig ist. Dies hat eine schnelle Vorauswanderung der Chlorid-Ionen des Sammelgel-Puffers (Leitton) zur Folge, gefolgt vom Bromphenolblau des Laemmli-Puffer und den Proteinen. Am langsamsten wandert das Glyzin des Elektrophoresepuffers, da dieses bei pH 6,8 hauptsächlich als Zwitterion ohne Nettoladung vorliegt (Folgeion). Fortgesetzt würde dies zu einer kathodenseitigen Ladungsträgerverarmung des Sammelgels und zu einem Erliegen des elektrischen Flusses führen (da alle geladenen Teilchen sich in der Nähe der Anode befänden). Tatsächlich entsteht aber ein elektrischer Feldstärkegradient, der die Wanderung der Chlorid Ionen bremst (niedrige Feldstärke) und die Glyzin Ionen beschleunigt (hohe Feldstärke) so dass alle Ionen nach Ladung / Masse Verhältnis „gestapelt“ mit der gleichen Geschwindigkeit wandern (Isotachyphorese). Da alle SDS assoziierten Proteine die selbe Ladung pro Masse besitzen, akkumulieren sie bei der gleichen Feldstärke und werden so zu einer dünnen Bande fokussiert. Bei Erreichen des Trenngels mit alkalischem pH liegt das Glycin bevorzugt als Anion vor und überholt die Proteinbande, der Feldstärkegradient wird egalisiert. Durch die engere Vernetzung des Sammelgels werden die Proteine nun nach ihrer Masse aufgetrennt, da ihre Wanderungsgeschwindigkeit hier umgekehrt proportional zum natürlichen Logarithmus ihrer Massen ist (133).

Für die Elektrophorese wurde das Bio-Rad Mini Protean II System verwendet (Trennstrecke 4cm) und 1mm dicke Gele gegossen um ein Probenvolumen bis 30µl je Tasche zu

ermöglichen. Es wurden 15% Trenngele eingesetzt, um eine gute Auftrennung im Bereich von 10-60kDa zu erreichen. Die Polymerisation der Gellösungen (s.u.) wurden mit APS und TEMED gestartet und die fertige Lösung in die vertikale Gelkammer gegossen. Um eine glatte Oberkante des Trenngels zu erhalten, wurden die Gele mit 70% Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren (nach ca. 20min) wurde das Isopropanol dekantiert, die Sammelgellösung aufgetragen und die Kämme eingesetzt. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels (ca. 20min) erfolgte der Probenauftrag.

Die Zellysate wurden mit 5x- Laemmli-Puffer versetzt, 5min. bei 95°C erhitzt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Neben den Proteinproben wurde ein Molekulargewichts-Standard (PAGE Ruler) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x SDS-Elektrophorese-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 25mA pro Gel durchgeführt (für ca. 40min).

<b>Stammlösung</b>	<b>Trenngel (15%) [ml]</b>	<b>Sammelgel (5%) [ml]</b>
<i>a. bidest.</i>	2,3	1,4
30% AA/BA	5,0	0,33
1,5 M TRIS-HCl (pH 8.6)	2,5	-
0,5 M TRIS-HCl (pH 6.8)	-	0,25
10% SDS	0,1	0,02
10% APS	0,1	0,02
TEMED	0,004	0,002

*Tabelle 20: Zusammensetzung der 15% Trenngele und 5% Sammelgele*

#### **2.2.2.4 Western-Blot mit Immundetektion**

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine können aufgrund der negativen Ladung des gebundenen SDS elektrophoretisch weiter auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen werden (Western Blot), wobei das SDS im Laufe des Transfers abgetrennt wird. Anschließend können die Proteine auf der Membran durch Immunreaktionen nachgewiesen werden (441).



## **Membrantransfer**

Der Blot wurde in einer „semi-dry“-Transfer-Apparatur durchgeführt. Aus zwei in WB-Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren, der Membran, dem Proteingel und wiederum zwei in Puffer getränkten Whatman-Filterpapieren wurde ein Blot-Sandwich aufgebaut. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von etwa 70mA für 1h. Der Erfolg wurde durch die reversible Färbung der Membran mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S Rouge (379) überprüft und die Banden der Markerproteine mit Kugelschreiber nachgezeichnet.

## **Immundetektion Yop Blots**

Zur Detektion sekretierter Yops wurden ca. 15µg sekretiertes Protein auf ein 0,75mm dickes 12% Gel mit 10 Taschen aufgetragen. Die Membran wurde zur Blockierung unspezifischer Proteinbindung für 1h bei RT in WB-Waschpuffer mit 5% Magermilchpulver auf dem Rotationsschüttler inkubiert um Antikörperbindung an die Membran zu vermeiden.

Danach wurden die Primärantikörper zugegeben, bei denen es sich stets um polyklonale Kaninchenantisera handelte. Das affinitätsgereinigtes Antiserum anti GST-YopE wurde 1 : 10.000 in WB-Waschpuffer verdünnt, Antiserum gegen YopP/H/D wurden 1 : 5000, anti YopT 1:2000 eingesetzt. Es folgte

- Inkubation für 1h oder über Nacht
- 3 x 5min. Waschen mit WB-Waschpuffer zur Entfernung von nicht oder unspezifisch gebundenem Antikörper
- Inkubation mit Sekundärantikörper-Peroxidase-Konjugat (1:1000, Schwein anti Kaninchen) in WB-Waschpuffer 1h bei RT
- 3 x 5min. Waschen mit WB-Waschpuffer zur Entfernung von nicht gebundenem Sekundärantikörper

Die Substratinkubation mit dem ECL Westernblot Detektionssystem erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers. Die Meerrettichperoxidase oxidiert dabei das im Substrat enthaltene Luminol zu einem endogenen Peroxid, das unter Abgabe von Lichtquanten in den Grundzustand zurückfällt.

Durch das Auflegen eines Röntgenfilmes (10s bis 15min.) wurde die von der Peroxidase katalysierte Lichtreaktion nachgewiesen. Zwischen Membran und Röntgenfilm wurde eine Klarsichtfolie gelegt, damit der Film nicht mit Substrat verschmutzt wurde.

### **Immundetektion GILZ Blot**

Für den GILZ Nachweis in zytosolischen Zelllysaten wurden mindestens 80µg Protein auf ein 1mm dickes 15% Gel mit 10 Taschen aufgetragen. Die transferierten Protein wurden durch kurzes Einlegen in Methanol und anschließendes Trocknen auf der Membran fixiert. Da die verwendeten Antikörper mit dem zunächst zum Blocken eingesetzten Milchpulver reagierten, wurde 1h mit 50% Sojamilch (in Waschpuffer) geblockt. Für eine effiziente Reduktion unspezifischer Antikörperbindung wurden die Antikörperinkubationen in 25% Sojamilch durchgeführt.

Der Primärantikörper anti GST-GILZ (polyklonales affinitätsgereinigtes Kaninchenserum) wurde 1:1000 eingesetzt, (Inkubation über Nacht). Nach dem Waschen (analog Yop Blot) folgte:

- 3 x 5min. Waschen mit WB-Waschpuffer
- Inkubation mit unmarkiertem Ziege anti Kaninchen Sekundärantikörper (1 : 20.000) für eine Stunde
- 3 x 5min. Waschen mit WB-Waschpuffer
- Inkubation mit Peroxidase konjugiertem Tertiärantikörper (1 : 20.000) für eine Stunde
- 3 x 5min. Waschen mit WB-Waschpuffer
- Substratinkubation analog Yop Blot, bei schwachem Signal mit FemtoGlow Substrat statt ECL

#### **2.2.2.5 IL-8 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, bei dem üblicherweise gelöste Antigene durch eine Farbreaktion quantifiziert werden.

Der IL-8 ELISA wurde als *sandwich* ELISA durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Näpfe der Mikrotiterplatte mit einem Bindungsantikörper gegen das nachzuweisende Antigen beschichtet. Nach Inkubation mit der Probe wird ein weiterer gegen das Antigen gerichteter

Detektionsantikörper aufgetragen, der mit einem Enzym gekoppelt ist das eine Farbnachweisreaktion katalysiert.

In einer 96-Napf Maxisorp Platte wurden je Napf 50µl anti IL-8 Bindungsantikörper (Endkonzentration 3µg/ml in Beschichtungspuffer) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde danach wie vor jedem neuen Schritt vier Mal mit 300µl Waschpuffer pro Napf gewaschen. Zur Absättigung der freien Bindestellen auf der Plastikoberfläche mit FKS wurde für zwei Stunden mit 200µl Blockierungspuffer je Napf inkubiert (RT). Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100µl der Zellkulturüberstände in die beschichteten Nöpfe gegeben. Als Standard diente serielle 1:1 verdünntes rekombinantes IL-8 in HeLa Medium (Endkonzentration 800pg/ml - 12,5 pg/ml und 0pg/ml). Die Platte wurde mit Proben und Standard über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde gewaschen und die Platte je Napf mit 100µl biotinyliertem Detektionsantikörper (Endkonzentration 0,5µg/ml) gegen humanes IL-8 in Blockierungspuffer für 1h inkubiert. In der Zwischenzeit wurden je 4,5µl der Lösungen A (Streptavidin) und B (biotinylierte alkalische Phosphatase) des StreptABCComplex/AP Reagenzes mit 491µl PBS vermischt und nach 30min Inkubation mit PBS auf 25ml aufgefüllt. Hiervon wurden je 50µl pro Napf auf die gewaschene Platte aufgetragen und für 1h bei 37°C inkubiert, um den biotinylierten Detektionsantikörper mit dem Konjugat aus Streptavidin und biotinylierter alkalischer Phosphatase zu versehen und so die Farbnachweisreaktion zu ermöglichen.

Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die ELISA-Platte mit 50µl Substratlösung (1mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer) pro Napf für ca. 20min bei 37°C inkubiert. Das durch die enzymatische Dephosphorylierung entstandene gelbe p-Nitrophenol konnte anschließend mit dem ELISA Messgerät bei 405nm und einer Referenzwellenlänge von 490nm gemessen werden. Anhand des Standards konnte die IL-8 Konzentration in den Proben durch eine Kalibrationskurve bestimmt werden.

#### **2.2.2.6 Trichloressigsäure-Fällung sekretierter Proteine**

Der Überstand aus der Induktion der Proteinsekretion wurde mit einer gesättigten Trichloressigsäurelösung im Verhältnis 1 : 10 versetzt. Nach 1h auf Eis wurde die Suspension 15min. bei 13.000rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Das Präzipitat wurde mit 1ml Aceton (-20°C) von der Wand des Röhrchens gekratzt und in ein 2ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 20min. Inkubation auf Eis wurde 10min. bei 13.000rpm, 4°C zentrifugiert. Die gefällten Proteine wurden noch zweimal auf diese Weise

gewaschen, wobei die zweite Inkubation oft bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht stattfand. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Proteine in  $30\mu\text{l}$  *a. bidest.* aufgenommen und mit 1M NaOH neutralisiert.

### **2.2.3 Messung von Promotoraktivität anhand von Luziferaseaktivität**

Die Messung von Luziferaseaktivität ist eine häufig verwendete Methode um *in vitro* und *in vivo* neue Promotoren zu finden, die Aktivität von Promotoren zu messen oder Genexpression lokalisieren zu können (208). Die Luziferase von *Photinus pyralis* oxidiert D-Luziferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen zu Oxoluziferin, AMP,  $\text{PP}_i$  und  $\text{CO}_2$ , wobei Licht emittiert wird, dessen Menge mit der Aktivität der Luziferase korreliert. Daher ermöglicht die Transfektion von Zelle mit einem Konstrukt bei dem sich das *P. pyralis* Luziferase Gen unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promoters befindet eine quantitative Untersuchung dessen Aktivität unter den gewählten experimentellen Bedingungen.

#### **2.2.3.1 Versuchsdurchführung und Auswertung**

$5 \cdot 10^4$  HeLa Zellen wurden im 24-Napf Format transient mit einem Luziferase Reporterplasmid für die Aktivität des NF $\kappa$ B Promoters (pNF- $\kappa$ B-luc), dem Galaktosidase Expressionsplasmid pCMV- $\beta$ -Gal, sowie den angegebenen weiteren Expressionsplasmiden transfiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass bei allen parallel durchgeführten Versuchsansätzen die gleiche DNA Menge in die Transfektion eingesetzt wurde, gegebenenfalls wurden Unterschiede durch Zugabe von pHM6 Leervektor ausgeglichen. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

Aus den für die Messung der Luziferaseaktivität hergestellten Zelllysaten wurden außerdem die Galaktosidaseaktivität und die Proteinkonzentration (nach Bradford) bestimmt. Zur Standardisierung wurde der Quotient aus der erhaltenen Luziferaseaktivität durch die Galaktoseaktivität und die Proteinkonzentration gebildet und auf den uninfizierten bzw. mit Leervektor transformierten Ansatz normiert, so dass sich die angegebenen Werte als Vielfaches der standardisierten Luziferaseaktivität im Vergleich zum Uninfiziert / Transfektionskontrolle verstehen.

### 2.2.3.2 Messung der Luziferaseaktivität in Zelllysaten

Durch die Transfektion mit pNF- $\kappa$ B-luc kam es zu NF- $\kappa$ B abhängiger Luziferaseexpression in den Zellen. Zur Herstellung von Zelllysaten und der Bestimmung der Luziferaseaktivität wurde der *Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity* von Roche Diagnostics verwendet. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und mit 100 $\mu$ l Luziferase-Lysispuffer lysiert. Die Lysate wurden in eine 96-Napf V-Platte überführt und 5min. bei 400 · g zentrifugiert um die Zelltrümmer zu pelletieren. In eine weiße 96-Napf Platte (Optiplate) wurden 25 $\mu$ l Lysat gegeben und unmittelbar vor der Messung mit 50  $\mu$ l Luziferase Substrat (in Substratpuffer) gemischt. Die Luziferaseaktivität wurde als emittierte Lichtmenge (Ereignisse in 10 Sekunden) mit einem Szintillationsmessgerät bestimmt

### 2.2.3.3 Messung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

Zusammen mit dem Luziferase Reporterplasmid wurde die gleiche Menge pCMV- $\beta$ -Gal kotransfiziert, ein Plasmid das konstitutive  $\beta$ -Galaktosidase Expression in transfizierten Zellen ermöglicht.  $\beta$ -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse der  $\beta$ -glycosidischen Bindung von Galactopyranosiden. Eine quantitative Aktivitätsbestimmung ist durch die Umsetzung des farblosen Substrats ortho-nitro-phenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG) zu gelbem ortho-Nitrophenol möglich. Daher wurde die Messung der konstitutiv exprimierten Galaktosidaseaktivität dazu verwendet, um die Messung des Luziferaseaktivität zu standardisieren, so dass Schwankungen in der Zellzahl oder Transfektionseffizienz berücksichtigt werden konnten.

Zur Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden 50 $\mu$ l *a. bidest.* je Napf in einer 96-Napf Platte vorgelegt, denen 5 $\mu$ l Zelllysate (außer dem Leerwert in Napf A1) und 50 $\mu$ l zweifach Galaktosidase Reaktionspuffer hinzugefügt wurden. Es wurde auf dem Plattenschüttler gemischt und 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden am ELISA Reader die ortho-Nitrophenol Absorption bei 420nm bestimmt.

## 2.2.4 Durchflusszytometrie

### 2.2.4.1 Analyse von Einzelzellsuspensionen mit dem Durchflußzytometer

Bei der durchflusszytometrischen Analyse wird die Zellsuspension durch eine Stahlkapillare angesaugt, durch einen Mantel aus Pufferflüssigkeit weiter fokussiert und beschleunigt und in der Messküvette an einer oder mehreren Laser - Detektor Einheiten vorbeigeführt um die parallele Messung von zahlreichen Streuungs- und Fluoreszenzparametern zu ermöglichen. Nach der Signalverstärkung werden die Messdaten digitalisiert und können so am Rechner ausgewertet werden.

Unabhängig von der Lichtwellenlänge des Lasers kann die Größe der Zellen durch die Beugung des Lichts im flachen Winkel an der Zelloberfläche als Vorwärtsstreulicht (FSC) bestimmt werden welches von Detektoren gegenüber des Anregungslasers gemessen wird. Oberflächenstruktur und intrazelluläre Bestandteile (Granularität) der Zellen beeinflussen das Seitwärtsstreulicht (SSC) welches von Detektoren gemessen wird, die um 90° zur Richtung des Anregungslichts versetzt sind.

Die verschiedenen Laser regen aber auch Fluoreszenzfarbstoffe an, deren Emission dann ebenfalls von den Detektoren gemessen wird. Dabei handelt es sich meist entweder um lösliche Farbstoffe, die sich in den Zellen anreichern (in dieser Arbeit CCF4-AM, PI, TMRE), oder um mit Antikörpern konjugierte Fluorophore. In dieser Arbeit wurden ausschließlich bei Allophycocyanin (APC) Konjugate mit einem Emissionsmaximum bei 660nm verwendet.

Die Messungen in dieser Arbeit wurden an einem BD Biotec FACSCalibur (Zellviabilität) oder einem Beckman-Coulter CyAn ADP (Bla Färbung) Durchflusszytometer durchgeführt.

### 2.2.4.2 Nachweis der Bla Translokation in eukaryotische Zellen durch CCF4-AM Färbung

Bla Aktivität in eukaryotische Zellen wurde Umsatz des TEM-1  $\beta$ -Laktamase empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs CCF4-AM gemessen. Die verwendete sechsfach Färbelösung wurde mit dem CCF4-AM *loading kit* nach Herstellerangaben zubereitet und mit HeLa Medium zur einfach Färbelösung verdünnt. Pro 100 $\mu$ l Endvolumen wurden der sechsfach Färbelösung 10 $\mu$ l der vorgeschlagen Lösung des Anionentransport Inhibitors Probenecid zugesetzt. Für die Durchflusszytometrische Analyse wurden die sedimentiert und gründlich in der einfach

Färbelösung resuspendiert (bis zu  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 100 $\mu$ l Färbelösung). Nach 20-30 min (RT) wurden die Zellen mit 900 $\mu$ l FACS-Puffer verdünnt und am Durchflusszytometer vermessen.

## **2.2.5 Mikroskopische Analyse der Bla Aktivität in HeLa Zellen**

Zur Mikroskopischen Analyse von translozierter Bla Aktivität wurden  $1 \cdot 10^5$  HeLa in 12-Napf Platten ausgesät und am nächsten Tag mit einer MOI von 100 mit den angegebenen Stämmen infiziert. Nach einer Stunde Infektionsdauer wurden die Zellen gewaschen und mit 200 $\mu$ l einfach CCF4-AM Färbelösung überschichtet. Nach einer halben Stunde (RT, dunkel, 100rpm schütteln) wurden die Zellen am Mikroskop betrachtet. Die Aufnahme der beiden CCF4 Emissionswellenlängen erfolgte getrennt (analog zur (295)). Während die Anregung stets durch eine HBO (Quecksilberdampf) Lampe über einen 400nm Tiefpassfilter geschah wurde zur Beobachtung der grünen Fluoreszenz ein 500nm-550nm Filter eingesetzt, während die blaue Fluoreszenz durch einen 420nm-500nm Filter aufgenommen wurde. Aufnahmen beider Fluoreszenzen wurden in Adobe Photoshop 6 im Modus „Aufhellen“ miteinander kombiniert um Überlagerungsbilder zu erhalten.

## **2.2.6 Mikrobiologische Methoden**

### **2.2.6.1 Kultivierung der *E. coli* und *Y. enterocolitica* Stämme**

Die Anzucht der *E. coli*-Kulturen erfolgte bei 37°C in Luria Bertani (LB) Medium entweder durch Animpfen aus einer Glycerinkultur oder aus einer Einzelkolonie von der Agarplatte. *Y. enterocolitica* wurde standardmäßig bei 27°C in LB kultiviert.

Für *in vitro* Infektionsexperimente und die Gewinnung sekretierter Proteine wurden aus Glycerinkulturen Übernachtskulturen angeimpft, aus denen dann 3h vor der Infektion die Hauptkulturen 1 : 20 angeimpft wurden. Zur Induktion der auf dem Virulenzplasmid kodierten Pathogenitätsfaktoren wurden *Y. enterocolitica* Hauptkulturen bei 37°C kultiviert, zur Gewinnung sekretierter Proteine wurde statt LB Medium Hirn-Herz Bouillon (HH) verwendet. Zur Induktion der Invasion Expression durch *E. coli* pInv1914 wurde 20 $\mu$ M (Endkonzentration) IPTG zugegeben.

Flüssigkulturen der Bakterien wurden stets bei 200rpm geschüttelt.

### **2.2.6.2 Transformation nach der CaCl<sub>2</sub>-Hitzeschock-Methode**

Die Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde nach einer modifizierten Anleitung von Hanahan (223) durchgeführt.

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 50 $\mu$ l Bakteriensuspension mit 100ng der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt. Nach 30 min. Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45s. Der Ansatz wurde auf Eis für 2 min. abgekühlt und nach Zugabe von 1ml LB-Medium (RT) ca. eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden verschiedene Zellmengen, meist 100 $\mu$ l / 900 $\mu$ l (nach sedimentieren / resuspendieren in Restmedium) auf geeignete Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### **2.2.6.3 Herstellung elektrokompetenter *Y. enterocolitica***

Für die Transformation durch Elektroporation müssen die Bakterien in einer möglichst salzarmen Suspension vorliegen, damit kein Strom fließt, wenn die hohe Feldstärke angelegt wird. Sehr kleine Mengen an Nährstoffen verbessern aber das Ergebnis.

Aus Übernachtskulturen wurde LB-Bouillon mit den entsprechenden Antibiotika 1 : 100 angeimpft (mind. 100ml). Die Kultur wurde so lange geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 erreicht war, dann wurde sie in Zentrifugengefäße umgefüllt und 10min. auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden 25min. bei 4000·g und 4°C abzentrifugiert.

Waschen (zweimal): Das Pellet wurde in einem Milliliter 10% Glycerin (in *a. bidest.*), resuspendiert und dann auf das Kulturvolumen aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte für 20min. bei 4000·g und 4°C.

Das Pellet wurde in 1/200 Kulturvolumen GYT resuspendiert und in Aliquots zu 50 $\mu$ l bei -80°C eingefroren.

### **2.2.6.4 Elektroporation von *Y. enterocolitica***

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode zum Transfer von DNA in Bakterienzellen. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass kurze Hochspannungspulse "Löcher" in der



Zellhülle verursachen, durch welche dann exogene DNA, die sich aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in Richtung Anode bewegt, in die Zelle aufgenommen werden kann.

Die elektrokompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit max. 100ng DNA gemischt. Nach 1-5min. Inkubation auf Eis wurde die Bakterien-DNA-Mischung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Küvette wurde mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen und in den Schlitten des Elektroporationsgeräts eingesetzt. Einstellungen am Gerät: Spannung: 2,5 kV, Kapazität: 25µF, *low range* 200 oder 400, *high range* 600.

Nach erfolgtem Puls wurde sofort 1ml LB-Medium (RT) zugegeben. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß dekantiert und 1 h bei 27 °C geschüttelt. Danach wurden 50µl dieser Suspension auf Platten mit dem benötigten Selektionsmedium ausgestrichen. Der Rest wurde abzentrifugiert (8000·g, 5min.), das Medium zum Großteil dekantiert und das im Mediumrest resuspendierte Pellet ebenfalls ausplattiert. Kolonien wurden nach Inkubation von 1-2 Tagen erhalten.

#### **2.2.6.5 Induktion der Proteinsekretion bei *Yersinia*-Kulturen**

Bei dieser Methode wird die Proteinsekretion der *Yersinia*-Kulturen durch Inkubation bei 37°C unter Kalziumentzug stimuliert. Die sezernierten Proteine können dann aus dem Kulturüberstand gefällt werden (229).

Mit *Y. enterocolitica* Material von der Agarplatte wurde 1ml Übernachtskultur in BHI mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 27°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension in einer Verdünnung von 1:20 in 5ml frisches BHI-Medium mit Antibiotika überimpft und 2h (E40 Stämme: 3h) bei 37°C in einem Rundbodenröhrchen inkubiert.

Induktion: Es wurden MgCl<sub>2</sub>, EGTA und Glukose in Endkonzentrationen von 10mM, 5mM bzw. 0,2% zugegeben. Danach wurde für 2-3h weiterinkubiert. Schließlich wurden die Bakterien abzentrifugiert (2000rpm, 10min.) und der Überstand für die Trichloressigsäure-Fällung in eisgekühlte 16ml Sorvall Zentrifugenröhrchen dekantiert.

### 2.2.6.6 Bakterien Gefrierkulturen

Zur Konservierung von Bakterienstämmen wurde eine Glycerinkultur angelegt. Glycerin verhindert die Schädigung der Zellen durch Kristallbildung beim Einfrieren, ist aber auch toxisch für die Bakterien, so dass die Glycerinkulturen möglichst schnell eingefroren werden müssen.

Über Nacht angezogene Bakterien von einem einzelnen Klon auf einer Agarplatte wurden 10min bei 4000-g abzentrifugiert und das Pellet in einem zwanzigstel des Kulturvolumens in LB-Medium mit 20% Glycerin aufgenommen. Die Kulturen wurden in 250µl Aliquots in Eppendorf-Gefäßen bei -80°C eingefroren und gelagert.

### 2.2.6.7 Spektrometrische Keimzahlbestimmung einer Bakterienkultur

Die Keimzahl einer Bakteriensuspension kann durch deren Streuung des Lichts bei 600nm im Photometer bestimmt werden, da bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 eine lineare Abhängigkeit zwischen der Bakterienzahl in der Suspension und der optischen Dichte besteht. Dies wurde ausgenutzt, um bei *in vitro* Infektionen die benötigte Bakterienzahl einsetzen zu können

Es wurden 50 µl Bakteriensuspension mit 950 µl Medium in einer Einwegküvette gemischt, so dass eine zwanzigfache Verdünnung in der Küvette vorlag. Dann wurde die OD<sub>600</sub> im Vergleich zu einem Medium-Leerwert gemessen. Eine OD<sub>600</sub> von 1 entspricht  $5 \cdot 10^8$  CFU/ml x Verdünnungsfaktor, also war unter diesen Bedingungen  $OD_{600} 1 \cong 1 \cdot 10^{10}$  CFU/ml.

### 2.2.6.8 Bakterien Gefrierkulturen für i.v. Infektion

Zur Herstellung von Bakterien-Gefrierkulturen für die i.v. Infektion wurden 200ml LB Medium mit den benötigten Antibiotika mit 10ml Übernachtskultur überimpft und bei 37°C geschüttelt. Nach 5 Stunden wurde die Kultur sedimentiert und in 20ml LB-Medium mit 20% Glycerin gründlich resuspendiert. 500µl Aliquots wurden in 1,5ml Eppendorfgefäßen bei -80°C eingefroren.

Zur Keimzahlbestimmung wurden zwei Aliquots der Gefrierkultur in der Hand aufgetaut und zweimal gewaschen, indem der Überstand der bei 8000-g sedimentierten Bakteriensuspension abgekippt und das Pellet in 500µl sterilem PBS resuspendiert wurde.

### **2.2.6.9 Verdünnungsreihen von Bakteriensuspensionen**

Verdünnungsreihen von Bakteriensuspensionen wurden hergestellt, um die Keimzahl in den Aliquots der Gefrierkulturen für i.v. Infektion zu bestimmen, die Bakterienmenge in der Infektionssuspension zu verifizieren oder die Bakterienlast in der Milz von infizierten Mäusen zu bestimmen

Von der gewaschenen Gefrierkultur oder der Einzelzellsuspension der infizierten Milz (direkt nach dem Homogenisieren) wurde eine Verdünnungsreihe mit 1 : 10 Schritten hergestellt, indem 100µl Bakteriensuspension mit einer sterilen Pipettenspitze in 900µl steriles PBS verdünnt wurden. Von den interessierenden Verdünnungen wurden je 100µl auf LB-Platten ausplattiert.

Während bei der Bestimmung der CFU von Gefrierkulturen die Verdünnungen 1 : 10<sup>-7</sup> bis 1 : 10<sup>-10</sup> analysiert wurden (da die Keimzahl eines Aliquots üblicherweise zwischen  $x \cdot 10^9$  und  $x \cdot 10^{10}$  betrug) waren für die Bestimmung der Keimzahl in der Milz je nach Infektionsdosis maximal Verdünnungen bis 1 : 10<sup>7</sup> von Interesse.

Sollte die Keimzahl in der zur Infektion verwendeten Bakteriensuspension verifiziert werden, wurden aus dieser zunächst 200µl in 800µl PBS verdünnt, und dann weitere 1:10 Verdünnung angefertigt und ausplattiert, um eine dekadische Korrelation der Kolonienzahl mit der Infektionsdosis zu erhalten.

Nach 2 Tagen Inkubation wurde die Kolonienzahl auf den gut auszählbaren Platten bestimmt und daraus die CFU pro Aliquot, Organ oder Milliliter Infektionssuspension berechnet. Es wurde besonders darauf geachtet, dass kein zusätzliches Flüssigkeitsvolumen mit der Außenseite der Pipettenspitze überführt wurde. Die neue Verdünnung wurde gründlich gemischt, bevor mit einer neuen Spitze ein weiterer Verdünnungsschritt hergestellt wurde.

### **2.2.7 Zellkultur**

#### **2.2.7.1 Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypan-Blau**

Trypan-Blau ist ein Vitalfarbstoff und kann selektiv nur in nekrotische Zellen mit nicht mehr intakter Membran eindringen und diese somit blau anfärben. Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen pro Milliliter Medium wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit der

zehnfachen Menge an Trypan-Blau verdünnt. Die Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer (0,0025mm x 0,002 mm x 0,1mm) gegeben und ausgezählt. Die Multiplikation der gemittelten Anzahl der nicht angefärbten Zellen in einem Großquadrat mit dem Kammerfaktor ( $1 \cdot 10^4$  Zellen/ml) und dem Verdünnungsfaktor ergab dann die Konzentration der Zellen in der ursprünglichen Zellsuspension.

### **2.2.7.2 Kultivierung von HeLa Zellen**

HeLa Zellen sind durch den humanen Papillomvirus 18 transformierte humane Epithelzellen (102), die aus einem stark proliferierendem Zervix-Karzinom stammen (381). Die Kultur erfolgte in Zellkulturflaschen mit HeLa Medium in einem Brutschrank mit 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Zur Weiterführung der Kultur oder um Zellen für Versuche zu ernten, wurden alle zwei bis drei Tage die zu 80-90% konfluenten Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend durch 5 Minuten Inkubation mit Trypsin-EDTA Lösung vom Flaschenboden abgelöst. Der Trypsin-Verdau wurde durch Zugabe eines äquivalenten Volumens HeLa Medium beendet, wobei das im FKS enthaltene Antitrypsin das vorhandene Trypsin inaktivierte, welches bei längerem Kontakt die Zellen schädigen könnte. Die Zellsuspension wurde in einem 15ml Zentrifugengefäß bei 400 · g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml des für die weitere Verwendung notwendigen Mediums aufgenommen und die Zellen gezählt. Für die Weiterführung der Kultur wurden die Zellen 25% konfluent ausgesät.

### **2.2.7.3 Kultivierung von GD25 bzw. GD25 $\beta_{1A}$ Fibroblasten**

Die aus Mausstammzellen durch Inaktivierung des  $\beta_1$  Integrin Gens gewonnenen GD25 Fibroblasten und die daraus hervorgegangene, stabil mit  $\beta_1$  Integrin transfizierte GD25  $\beta_{1A}$  Linie (171,469) wurden wie HeLa Zellen kultiviert. Allerdings wurde ein Nährmedium auf DMEM Basis verwendet. Zum Ablösen der stark adärenten Zellen wurde vor der Trypsin Behandlung einmal mit EDTA Lösung gespült.

#### **2.2.7.4 Infektion von Zellen**

Für Infektionsexperimente wurden primäre Darmepithelzellen und Milzzellen in Antibiotika freiem Nährmedium aufgenommen und ausgesät, bzw. am Vortag ausgesäte Zellen von Dauerzelllinien einmal mit PBS gewaschen und mit Medium ohne Antibiotika überschichtet. Die benötigten Bakterienkulturen wurden in 5ml Medium in 13ml Rundbodengefäßen angezüchtet. Für die Infektion wurden sie 5min bei 400·g sedimentiert, in 1ml PBS aufgenommen und die Keimzahl durch Messung der OD<sub>600</sub> bestimmt. Nach Zugabe der für die gewünschte MOI notwendigen Bakterienzahl wurde die Bakteriensuspension gründliche über den Zellen verteilt und durch 5min bei 400·g auf die Zellen zentrifugiert. Nach weiterer Inkubation im Zellkulturbrutschrank wurde die Infektion durch Gentamycinzugabe beendet.

#### **2.2.7.5 Transiente Transfektion von HeLa Zellen**

Unter transienter Transfektion versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle, wobei die eingeschleuste DNA aber nicht ins Genom integriert und dauerhaft an die folgenden Zellgenerationen weitergegeben wird. Diese Methode wurde verwendet um Proteine in HeLa Zelle überexprimieren zu können oder um Reporterkonstrukte in die Zellen einzubringen.

Die benötigten Expressions- oder Reporterplasmide wurden mit dem Transfektionsreagenz ExGene 500 in die HeLa Zellen gebracht. Das Prinzip dieses Reagenzes beruht auf der Transfektion mit Hilfe kationischer Polymere. Polyethylenimin, ein Makromolekül mit hoher kationischer Ladungsdichte, interagiert mit den negativ geladenen DNA-Phosphatbrücken und bewirkt dabei eine Kondensation der DNA. Dieser Komplex wird von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. ExGene bewirkt dann im Endosom eine massive Protonenanreicherung und einen passiven Chloridioneninflux, der zur osmotisch bedingten Schwellung führt, gefolgt von der Ruptur des Endosoms. Die freigesetzte Plasmid-DNA wird transloziert dann in den Zellkern und wird transkribiert. Für Transfektionen wurden stets endotoxinfreie Plasmid-DNA Präparationen verwendet.

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf die Transfektion in einer 24-Napf Platte. Bei der Durchführung der Transfektion in einer 6-Napf Platte wurde die doppelte Menge der jeweiligen Komponenten verwendet.

Am Tag vor der Transfektion wurden  $5 \cdot 10^4$  Zellen in 500µl HeLa Medium je Ansatz in einer 24-Napf Platte ausgesät, bzw.  $5 \cdot 10^5$  Zellen je Ansatz in eine 6-Napf Platte. Die Zellen wurden im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 500µl OptiMEM für ca. 30min im Brutschrank vorinkubiert. Zur Transfektion wurden pro Napf wie folgt zusammengesetzte Lösungen hergestellt:

#### Lösung A

0,33µl	ExGene pro µg Plasmid DNA
25µl	NaCl (150mM)

#### Lösung B

Plasmid DNA	(je nach benötigter DNA Menge)
ad 25 µl	NaCl (150mM in <i>a. bideest.</i> )

Es wurde darauf geachtet, dass in allen Ansätzen die die Menge an transfizierter Plasmid DNA gleich war. Die Lösungen wurden angesetzt, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 50 µl Ansatz auf die Zellen gegeben und 2min bei 400·g und RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen für 4h im Brutschrank aufbewahrt, bevor das OptiMEM abgenommen und durch HeLa Medium ersetzt wurde. Nach 24h wurden die Zellen entweder zu lysiert oder es wurde mit Infektion oder Stimulation fortgefahren.

#### 2.2.7.6 Transfektion mit siRNA

Die verschiedenen Methoden der Ribonukleinsäure (RNA) Interferenz (RNAi) ermöglichen die selektive Unterdrückung eines mRNA Transkripts. Ursprünglich als „Cosuppression“ nach der missglückten Überexpression der Dihydroflavonol-Reduktase in *Petunia* entdeckt (318) versteht man darunter die spezifische Unterdrückung von Genexpression durch doppelsträngige RNA (175). Dabei wird ein Mechanismus ausgenutzt, der sich in eukaryotischen Organismen mutmaßlich als Abwehr gegen RNA Viren entwickelt hat.

Als *small interfering* RNA (siRNA) werden 21bp lange synthetisch hergestellte RNA-Oligonucleotide bezeichnet, welche ein Sequenzfragment des zu unterdrückenden Transkripts enthalten und als Dimer, z.B. mit Hilfe liposomaler Transfektionsreagenzien, in die zu

manipulierenden Zellen eingebracht werden. Sie entsprechen den Fragmenten, welche intrazellulär aus längerer doppelsträngiger RNA als Produkte der RNase III Dicer entstehen. Die siRNA wird vom RNA *induced silencing complex* (RISC) gebunden und aktiviert diesen, was den Verdau von mRNA, welche das Sequenzfragment der siRNA enthält, zur Folge hat.

### **Hybridisierung der RNA-Oligonukleotide**

Die Hybridisierung der RNA-Oligonukleotide erfolgte gemäß der Empfehlung des Herstellers (Qiagen). Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden im mitgelieferten siRNA Suspensionspuffer gelöst, so dass eine 20µM Stammlösung erhalten wurde. Anschließend wurde die Lösung für eine Minute auf 90°C erhitzt und danach 1h bei 37°C inkubiert.

### **siRNA Transfektion**

Die Transfektionsversuche mit siRNA wurden mit dem HiPerFect Reagenz in 24-Napf oder 6-Napf Platten nach dem Schnellprotokoll des Herstellers durchgeführt, wobei die Zellen dem bereits vorgelegtem HeLa Medium mit dem Transfektionsansatz hinzugefügt wurden. Je Transfektionsansatz wurde in 100µl HeLa Medium ohne FKS mit 3µl HiPerFect siRNA auf eine Endkonzentration von 100nm für eine weitgehende Unterdrückung der Genexpression auf Proteinebene zugegeben. Als Kontrolle wurde die „AllStars Negative Control“ siRNA verwendet. Entgegen der Herstellerempfehlung wurde 4h nach der Transfektion das Medium gewechselt, da auf diese Weise die Zellviabilität gesteigert werden konnte ohne die Unterdrückung der Genexpression abzuschwächen. 48h nach der siRNA Transfektion wurden die Zellen entweder lysiert oder es wurde mit DNA-Transfektion, Infektion oder Stimulation fortgefahren.

#### **2.2.7.7 Stimulation von HeLa Zellen**

In dieser Arbeit wurden neben *Yersinia* Pathogenitätsfaktoren auch verschiedene weitere Agentien unterschiedlichster Stoffklasse und Genese auf ihre Fähigkeit zur GILZ Induktion überprüft bzw. als Positivkontrolle genutzt.

### **Endkonzentrationen**

200ng/ml *Clostridium difficile* Toxin B (TcdB 10463)    aus 2mg/ml in H<sub>2</sub>O

100µM	Dexamethason (Dex)	aus 10mM in H <sub>2</sub> O
1,4µM	Y-27632 (ROCKI)	aus 5mM in H <sub>2</sub> O
100µM	NSC23766 (RacI)	aus 10mM in H <sub>2</sub> O
50µM	Lovastatin (Lova)	aus 50mM in H <sub>2</sub> O
5µg/ml	Cytochalasin D (CytD)	aus 2mg/ml in DMSO
35µM	Latrunculin B (LatB)	aus 35mM in DMSO

## 2.2.8 Tierexperimente

### 2.2.8.1 Töten der Mäuse

Die Mäuse wurden zuerst mit einer geringen Menge CO<sub>2</sub> betäubt und anschließend durch Erhöhung der CO<sub>2</sub> Menge getötet. Danach wurde bei den mutmaßlich toten Tieren noch ein Genickbruch durchgeführt.

### 2.2.8.2 Gewinnung von primären Darmepithelzellen

C57BL/6 Mäusen wurden getötet, der gesamte Dünn- und Dickdarm präpariert, und die Därme in eine Petrischale mit auf 37°C vorgewärmtem PBS gegeben. Die Därme wurden in etwa 5cm lange Stücke zerteilt, der Länge nach aufgeschnitten und die Fäkalien ausgewaschen. Dünn- und Dickdarm wurden in getrennte 100ml Glasflaschen überführt. Mit je 25ml des für den ersten Separationsdurchgang benötigten Puffers wurden die Epithelzellen unter Rühren bei 37°C im Wasserbad vom übrigen Darm abgelöst. Für Dünn- und Dickdarm wurden dabei unterschiedliche Puffer verwendet. Dabei wurden Epithelzellen von der *lamina propria* abgelöst.

Der zweite Separationsdurchgang wurde in gleicher Weise durchgeführt, allerdings wurde hierfür für beide Darmteile Puffer B verwendet. Die erhaltenen Suspensionen wurden in 50ml Zentrifugengefäße abgeseiht und für 10min bei 500rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 5ml PBS resuspendiert und die Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau bestimmt. Die auf diese Weise isolierten Epithelzellen konnten dann für die Infektionsversuche verwendet werden.



### **2.2.8.3 Gewinnung von Milzzellen**

Nach dieser Methode wurden Einzelzellsuspension aus der Milz hergestellt, die Erythrozyten lysiert und die verbleibenden Zellen gewaschen.

Die Mäuse wurden getötet und die Milz präpariert. Die Milz wurde in 5ml PBS aufgenommen und mit dem Stempel einer 5ml Spritze durch ein Nylonsieb mit 40µm Maschenweite passiert. Die Suspension wurde 5 min bei 1400 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zur Erythrozytenlyse in 1ml 0,15M NH<sub>4</sub>Cl (pH 7,2) aufgenommen und unter leichtem Schütteln 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4ml PBS wurde zentrifugiert (5min bei 1400rpm, 4°C) und das Pellet in 5ml HeLa Medium ohne Antibiotika aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden für *ex vivo* Infektionen 3·10<sup>6</sup> Zellen je Napf im 6-Napf Format vorgelegt.

### **2.2.8.4 Intravenöse Injektion**

Für die Herstellung der DFO Injektionslösung wurde ein Aliquot der 50mg / ml Stammlösung aufgetaut und 1 : 4 mit sterilem PBS verdünnt, so dass die benötigten 2,5mg in 200µl Volumen injiziert werden konnten.

Für i.v. Infektionen wurde ein Aliquot mit der benötigten Bakterien-Gefrierkultur zunächst wie bei der Keimzahlbestimmung aufgetaut und gewaschen. Daraufhin wurde mit einer Verdünnungsreihe in PBS eine Bakteriensuspension mit der fünffachen CFU /ml der benötigten Dosis hergestellt, so dass pro Maus 200µl Bakteriensuspension i.v. verabreicht werden konnten.

Für die Injektion wurden die Tiere mindestens 5min unter einer Rotlichtlampe (150 W) erwärmt um dilatierte Schwanzvenen zu erhalten. Die Bakteriensuspension (oder die DFO Lösung) wurde dann mit einer 1ml Tuberkulin-Spritze mit 27G x 3/4 Kanüle in eine Schwanzvene injiziert.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Herstellung und Überprüfung neuer *Yersinia enterocolitica* WA-314 Mutanten

Genexpressionsanalysen von HeLa Zellen nach Infektion mit dem *Y. enterocolitica* Patientenisolat WA-314 (pYV<sup>+</sup>), sowie einigen Yop Monodeletionsmutanten haben gezeigt, dass für die antiinflammatorische GILZ Induktion pYV kodierte Faktoren notwendig sind (48). Weitere Experimente wiesen auf eine Beteiligung von YopT hin (104). Darauf aufbauend, sollte die Notwendigkeit der einzelnen Yops für die GILZ Induktion durch Monodeletionsmutanten möglichst aller sechs Effektor-Yops und Monosekretionsmutanten der drei an Rho GTPasen angreifenden Yops auf Proteinebene untersucht werden.

Für ein bestimmtes Yop defiziente *Y. enterocolitica* WA-314 Mutanten wurden durch gerichtete Mutagenese durch Robert Zumbühl ( $\Delta yopT$  ( $\Delta T$ ), (312)) und Birgit Manncke ( $\Delta yopP$  ( $\Delta P$ ),  $\Delta yopE$  ( $\Delta E$ ),  $\Delta yopH$  ( $\Delta H$ ) und  $\Delta yopM$  ( $\Delta M$ )) hergestellt. Die Darstellung einer  $\Delta yopO$  Mutante war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich. Ferner standen die von Birgit Manncke hergestellten Yop Monosekretionsmutanten (pTTSS-*yopE*, pTTSS-*yopH* und pTTSS-*yopT*) zur Verfügung. Zur Herstellung dieser Mutanten wurde der *Y. enterocolitica* Stamm pTTSS (286) mit Plasmiden transformiert, die für SycE und YopE (pTTSS-*yopE*) bzw. eine translationale Fusion von YopE53 mit YopT (pTTSS-*yopT*), YopH (pTTSS-*yopH*) oder YopP (pTTSS *yopP*) (3) kodierten. Dies wurden durch die in dieser Arbeit geschaffenen Stämme pTTSS-ova und später durch pTTSS-*yopO* ergänzt.

Alle verwendeten Deletionsmutanten wurden durch Sekretionsanalysen überprüft.

### **3.1.1 Herstellung der *Yersinia enterocolitica* WA-314 YopO (pTTSS-yopO) und Ovalbumin (pTTSS-ova) Monosekretionsmutanten**

#### **3.1.1.1 Herstellung pTTSS-yopO**

Der Stamm pTTSS wurde hierzu durch das pACYC184 Derivat pBM-YopO, das für SycO und YopO kodiert, transformiert, da das analog zu den anderen Monosekretionsmutanten klonierte YopE53-YopO Fusionsprotein nicht sekretiert wurde.

Für pBM-YopO wurde das *yopO* Gen aus dem *Yersinia enterocolitica* WA-314 pYV Plasmid amplifiziert. Um *yopO* als *Bam*HI / *Sal*I Fragment in pACYC184 einfügen zu können, musste eine interne *Bam*HI Schnittstelle durch translationsneutralen Basenaustausch deletiert werden. Dies wurde durch getrennte Amplifikation eines 5' *yopO* Fragments mit *Bam*HI *yopO* 5' fwd und dem mutagenen Primer *yopO* 5' rev sowie des 3' Fragments mit *Sal*I *yopO* 3' fwd und dem mutagenen Primer *yopO* 3' rev. Durch Einsatz der so erhaltenen Amplifikate als Template in eine PCR mit den Primern *Bam*HI *yopO* 5' fwd und *Sal*I *yopO* 3' fwd wurde ein *Bam*HI - *yopO* - *Sal*I Fragment ohne interne *Bam*HI Erkennungssequenz erhalten. Ein *Hind*III - *PyopO/sycO* - *sycO* - *Bam*HI Fragment wurde aus dem pYV Plasmid mit den Primern *Hind*III *sycO* fwd und *Bam*HI *sycO* rev amplifiziert. Nach Subklonierung beider Fragmente in pCR2.1 und Sequenzierung wurde zunächst das für SycO und die Promotorregion kodierende Fragment und dann das für YopO kodierende Fragment in pACYC184 eingefügt, so dass ein Derivat mit *Hind*III - *PyopO/sycO* - *sycO* - *Bam*HI - *yopO* - *Sal*I Insert erhalten wurde (pBM-YopO). Durch Transformation von pTTSS mit pBM-YopO wurde pTTSS-*yopO* erhalten.

#### **3.1.1.2 Herstellung von pTTSS-ova**

Das Plasmid pBME53-Ova, ein pACYC184 Derivat mit *Hind*III - *sycE* - *PyopE/sycE* - *yopE53* - *Bam*HI - *ova247-355* - *Sal*I Insert war als Zwischenprodukt bei der Klonierung von pMK-Ova erhalten worden. Durch Transformation von pTTSS mit pBME53-Ova wurde die Ovalbumin<sub>247-355</sub> Monosekretionsmutante pTTSS-*ova* erhalten.

### 3.1.2 Sekretionsanalysen

Durch Immunoblot-Analysen konnte bei den Effektor-Yop Deletionsmutanten die Abwesenheit des jeweiligen Effektors auf Proteinebene verifiziert werden (Abb. 5). Es wurde ferner gezeigt, dass die Deletion eines Yops möglicherweise die Mengen beeinflusst, in denen die verbliebenen Yops sekretiert werden. Auch die Yop Monosekretion wurde durch Immunoblot-Analysen überprüft (Abb. 6).

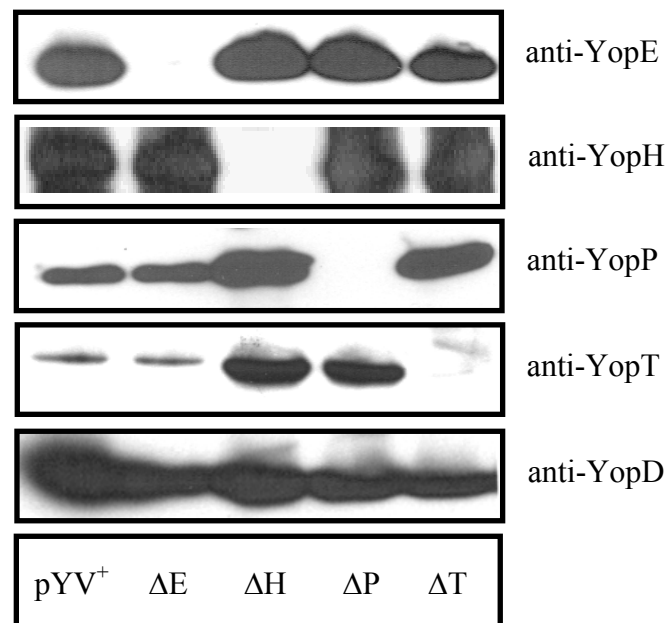


Abbildung 5: Analyse der Proteinsekretion der Effektor-Yops YopE, YopH, YopP und YopT, sowie des Translokator-Yops YopD durch das Patientenisolat pYV<sup>+</sup> und die Yop-Deletionsmutanten ΔE, ΔH, ΔP und ΔT.

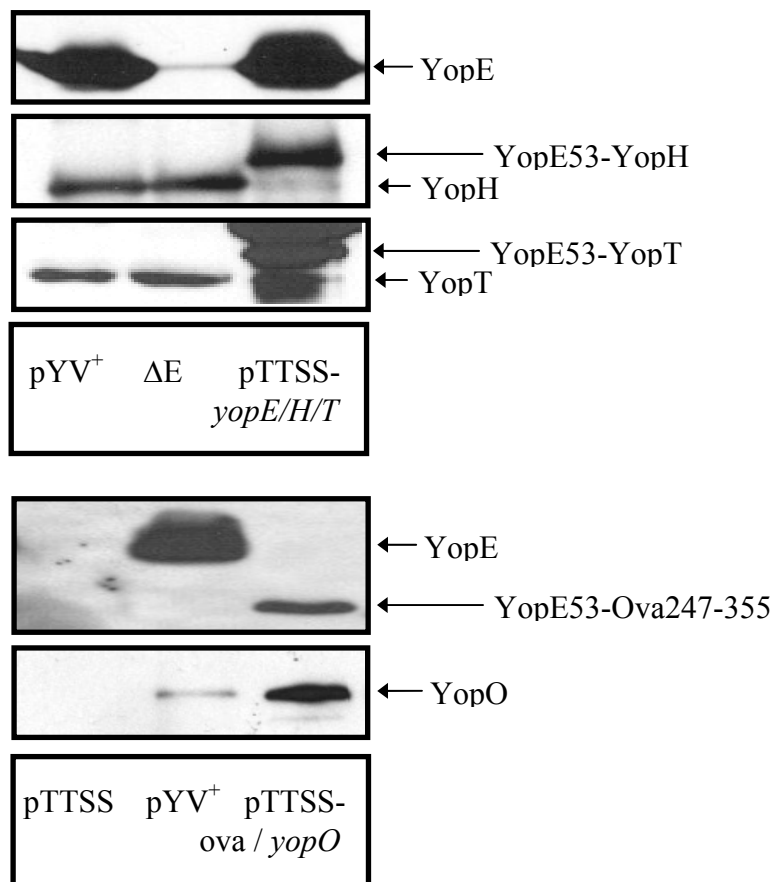


Abbildung 6: Analyse der Proteinsekretion der Monosekretionsmutanten *pTTSS-yopE*, *pTTSS-yopH*, *pTTSS-yopT* und *pTTSS-ova* durch Immunoblot gegen YopE und der Monosekretionsmutanten *pTTSS-yopO* durch Immunoblot gegen YopO. Zum Vergleich wurde sekretiertes Protein der Stämme *pYV<sup>+</sup>* und  $\Delta E$  bzw. *pYV<sup>+</sup>* und *pTTSS* aufgetragen.

## 3.2 Identifizierung der für die GILZ Induktion durch *Y. enterocolitica* notwendigen Pathogenitätsfaktoren

### 3.2.1 Nachweis der GILZ Proteinexpression in infizierten HeLa Zellen

Nachdem es gelungen war, die *GILZ* mRNA Expression in HeLa Zellen nach *pYV<sup>+</sup>* Infektion zu bestätigen, sollte die darauf folgende Proteinexpression mittels Western Blot Analyse untersucht werden. Zu diesem Zeitpunkt war die in der Arbeitsgruppe etablierte Methodik nicht ausreichend empfindlich, um *GILZ* Protein aus den Lysaten infizierter HeLa Zellen nachzuweisen ohne das Protein vorher durch Immunpräzipitation anzureichern. Durch einige

Modifikationen des Protokolls gelang dies jedoch, hauptsächlich durch Herstellung konzentrierter Lysate durch Frier-Tau Lyse und durch Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit durch Verwendung eines unmarkierten Sekundärantikörpers und eines Peroxidase-markierten Tertiärantikörpers. Infolgedessen konnte auch eine Induktion der GILZ Proteinexpression nach pYV<sup>+</sup> Infektion, nicht jedoch nach pYV<sup>-</sup> Infektion gezeigt werden. Das Maximum der Proteinexpression lag bei vier bis acht Stunden (Abb. 7). Als Positivkontrolle diente das synthetische Glukokortikoid Dexamethason (Dex).

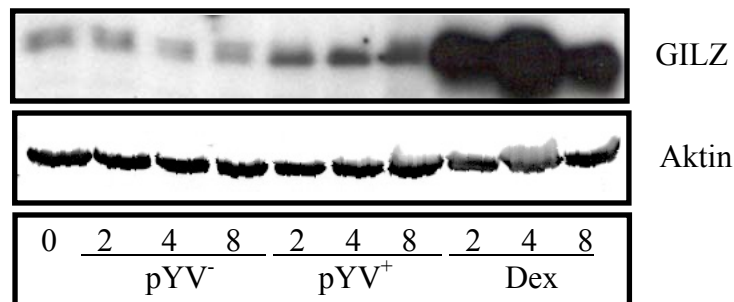


Abbildung 7: Western Blot Analyse der GILZ Proteinexpression. HeLa Zellen wurden mit pYV<sup>-</sup> oder pYV<sup>+</sup> infiziert oder als Positivkontrolle mit Dex stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion / Stimulation lysiert.

Um zu klären, ob die GILZ Expression nach pYV<sup>+</sup> Infektion ein Phänomen ist, das sich auf die HeLa Zelllinie beschränkt oder ob dieses Phänomen z.B. auch im Mausinfektionsmodell relevant ist, wurden primäre Darmepithelzellen aus der C57BL/6 Maus infiziert. Es zeigte sich, dass auch in diesen Zellen vier Stunden nach pYV<sup>+</sup> Infektion GILZ Protein exprimiert wird. Für dieses Infektionsmodell gelang der GILZ Proteinnachweis allerdings nur nach vorheriger GILZ Immunpräzipitation (Abb. 8).

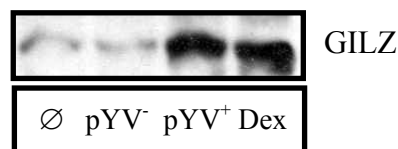


Abbildung 8: GILZ Expression in Darmepithelzellen aus der C57BL/6 Maus vier Stunden nach Infektion mit pYV<sup>-</sup> oder pYV<sup>+</sup> beziehungsweise nach Stimulation mit Dexamethason.

### 3.2.2 YopT ist notwendig und hinreichend für die Induktion der GILZ Expression in HeLa Zellen

Nachdem sich bei den dieser Arbeit vorangegangenen Analysen bereits die Notwendigkeit von YopT für die *GILZ* mRNA Expression bereits herausgestellt hatte, sollte nun auf Proteinebene geklärt werden, ob ein kooperativen Effekt vorliegt, für den die Wirkung weiterer Effektor Yops notwendig ist oder ob auch andere Yops allein diesen Effekt verursachen können. Insbesondere bei YopE und YopO legt sich diese Vermutung nahe, da deren Enzymaktivitäten ebenfalls (zumindest unter anderem) zur Inaktivierung von Rho GTPasen führen (209,218).

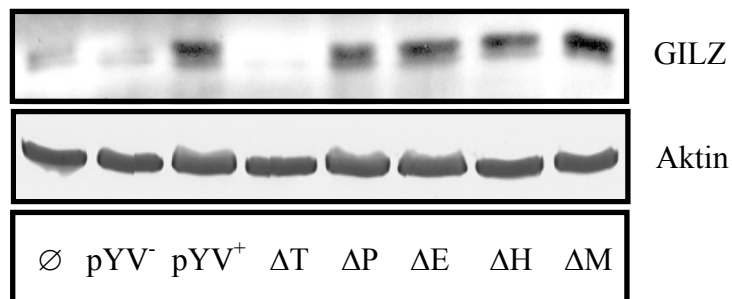


Abbildung 9: *GILZ* Proteinexpression in HeLa Zellen vier Stunden nach Infektion mit den *Y. enterocolitica* Stämmen pYV<sup>-</sup> und pYV<sup>+</sup> sowie Deletionsmutanten ohne YopT, YopP, YopE, YopH oder YopM Expression.

Infektionen von HeLa Zellen mit den Stämmen pYV<sup>-</sup> und pYV<sup>+</sup> sowie den fünf Yop Deletionsmutanten ΔT, ΔP, ΔE, ΔH und ΔM zeigten, dass nur die Stämme pYV<sup>-</sup> und ΔT keine *GILZ* Proteinexpression induzieren. Eine Beteiligung von YopP, YopE, YopH oder YopM an der *GILZ* Induktion scheint daher nicht erforderlich zu sein (Abb. 9).

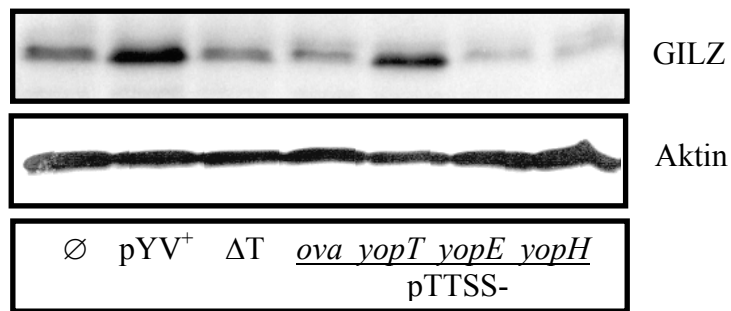


Abbildung 10: GILZ Proteinexpression in HeLa Zellen vier Stunden nach Infektion mit pYV<sup>+</sup>, der yopT Deletionsmutante, der YopT Monosekretionsmutante, sowie den YopE und YopH und Ova Monosekretionsstämmen.

Um zu klären, ob YopT oder auch andere Effektor-Yops alleine in der Lage sind, GILZ zu induzieren, wurden Infektionsexperimente mit Effektor-Yop Monosekretionsmutanten pTTSS-yopT, pTTSS-yopE, pTTSS-yopH zusammen mit den Kontrollen pTTSS-ova, pYV<sup>+</sup> und ΔT durchgeführt. Es zeigte sich, dass nur die YopT Monosekretionsmutante in der Lage ist, GILZ zu induzieren, während die Monosekretion von Ovalbumin, YopE oder YopH keinen Effekt hatte (Abb. 10).

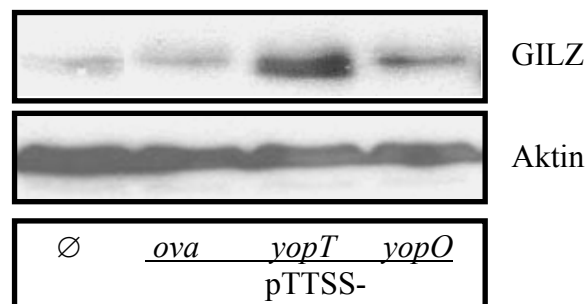


Abb. 11: GILZ Proteinexpression in HeLa Zellen vier Stunden nach Infektion mit dem yopO Monosekretionsstamm.

Leider waren zum Zeitpunkt dieser Experimente weder eine YopO Deletionsmutante noch eine YopO Monosekretionsmutante verfügbar. Eine YopO Monosekretionsmutante konnte



aber im Verlauf dieser Arbeit hergestellt werden (pTTSS-*yopO*). GILZ Induktion durch die YopO Monosekretionsmutante wurde aber nicht beobachtet (Abb.11).

Bei Untersuchungen von YopT wurde bisher eine Cysteinproteaseaktivität als einzige Enzymaktivität gefunden (256,257). Nichtsdestotrotz besteht die Möglichkeit, dass YopT weitere, bisher unbekannte Aktivitäten besitzt, und dass die GILZ Induktion nicht von der Proteaseaktivität vermittelt wird. Um zu testen ob die Cysteinproteaseaktivität von YopT die Ursache der GILZ Induktion ist, wurde der  $\Delta T$  Stamm sowohl mit plasmidkodiertem YopT ( $\Delta T$  *pyopT*) komplementiert (147) als auch mit YopTC139A ( $\Delta T$  *pyopTC139A*), das keine Proteaseaktivität mehr aufweist (268). Infektionsexperimente mit diesen Stämmen zeigten, dass die Cysteinproteaseaktivität von YopT notwendig für die GILZ Induktion ist (Abb. 12).

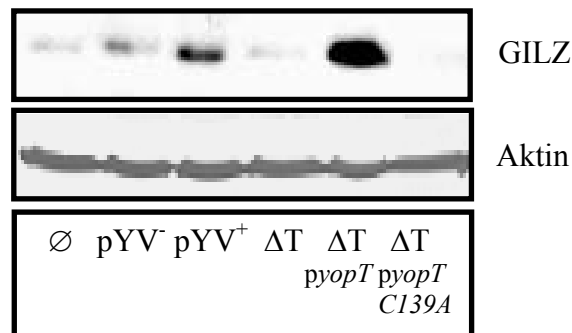


Abbildung 12: GILZ Expression in HeLa Zellen nach Infektion mit *pYV*, *pYV*<sup>+</sup>, der *yopT* defizienten Mutante und der *yopT* defizienten Mutante komplementiert mit funktionellem oder proteasedefizienten *yopT*.

### 3.3 Induktion der GILZ Expression durch clostridiale Toxine und Inhibitoren von Rho Signalwegen

Die Modifikation von Rho GTPasen durch bakterielle Toxine ist ein verbreiteter Pathogenitätsmechanismus. Insbesondere bei clostridialen Toxinen findet man Rho GTPasen modifizierende Aktivitäten (12). Dabei kann zwischen den C3 ähnlichen ADP-Ribosyltransferasen und den Glukosyltransferasen unterschieden werden. Das prototypische C3 Exoenzym von *Clostridium botulinum* modifiziert RhoA/B/C durch ADP-Ribosylierung an Asn41 (254). Die Folge ist keine direkte Funktionseinschränkung (z.B. der Nukleotidbindungsfähigkeit), die beobachtete Rho Inaktivierung ist eine Folge der

stabilisierten Rho-GDI Bindung (109). Glucosyltransferasen, wie das *Clostridium difficile* Toxin B, übertragen einen Glukose Rest auf Thr35 oder Thr37, was zu einer Modifikation der Effektorbindungsdomäne führt (155). Toxin B 10463 modifiziert RhoA, Rac und CDC42. Behandlung von HeLa Zellen mit diesen Toxinen sollte zeigen, ob GILZ Induktion auch bei Infektionen mit anderen Bakterien auftreten kann, und Hinweise auf den Induktionsmechanismus geben.

Da C3 Toxine im Gegensatz zu den binären Clostridien-Toxinen nur sehr schlecht von Zellen aufgenommen werden, wurde ein Fusionsprotein aus der katalytischen Domäne des C3 Exoenzyms von *Clostridium limosum* mit dem N-terminalen Teil der C2I Komponente des *C. botulinum* C2 Toxins verwendet, die keine Enzymaktivität aufweist (C2IN-C3lim). Das C2IN-C3lim Fusionsprotein wurde mit der aktivierten C2IIa Komponente des *C. botulinum* C2 Toxins auf die Zellen gegeben, was eine effiziente rezeptorvermittelte Endozytose ermöglicht (34).

Intoxikation von HeLa Zellen mit Toxin B führte zu einer starken GILZ Expression vier und sechs Stunden nach Behandlung, während nach Vergiftung mit C2IN-C3lim das C3 Toxin fast keinen Effekt hatte (Abb 13).

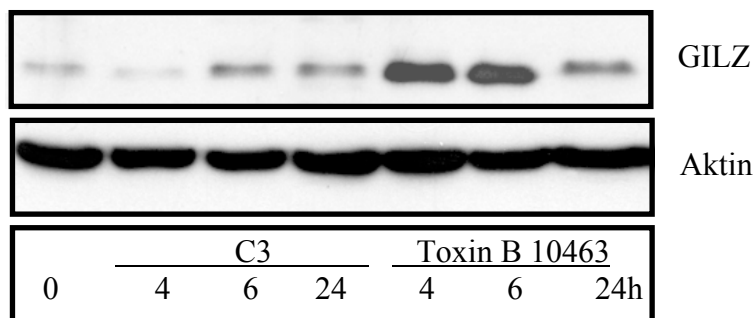


Abbildung 13: GILZ Proteinexpression in HeLa Zellen nach Behandlung mit 50 ng/ml Toxin B 10463 oder 100 ng/ml C2IN-C3lim zusammen mit 200 ng/ml C2IIA zu den angegebenen Zeitpunkten.

Dies zeigt, die Induktion von GILZ in Epithelzellen findet auch bei *C. difficile* Infektionen statt. Da Vergiftung mit dem C3 Exoenzym praktisch keine GILZ Induktion zur Folge hat, scheint RhoA Inaktivierung bei diesem Vorgang keine Rolle zu spielen.

Um eine detailliertere Vorstellung vom Mechanismus der GILZ Induktion zu erhalten, wurden synthetische Inhibitoren eingesetzt. Ein wichtiger Effektor von RhoA ist die C-terminale Rho Kinase (p160ROCK). Diese wurde mit dem Pyrimidinderivat Y-27632 (ROCKI) kompetitiv inhibiert (290) um zu untersuchen, ob die Hemmung p160ROCK abhängiger Signalwege bei der GILZ Induktion eine Rolle spielt. NSC23766 (RacI), ebenfalls ein Pyrimidinderivat, hemmt den GEF vermittelten GDP/GTP Austausch bei Rac (107) und wurde deshalb zur Untersuchung der Rolle von dieser Rho GTPase bei der GILZ Induktion eingesetzt. Lovastatin (Lova) hemmt die Aktivität der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA (HMG-CoA) Reduktase und stört damit die Mevalonat Biosynthese. Mevalonat ist Ausgangsprodukt für die Isopentenyl-Pyrophosphat und Dimethylallyl-Pyrophosphat Synthesen, welche die Isopreneinheiten für die Terpenbiosynthese liefern. Lovastatin stört daher die Biosynthese von Geranyl-Geranyl- und Farnesyl Pyrophosphat und verhindert damit die Veresterung von Rho, Rac und Cdc42 mit diesen Terpenen. Unprenylierte Rho Proteine verlieren ihre Fähigkeit zur Membranlokalisierung und zur Rho-GDI Bindung und finden sich als GTP bindende Monomere im Zytoplasma und im Zellkern. (288). Damit ist das Resultat fast identisch mit der proteolytischen Spaltung von Rho GTPasen durch YopT (257,305).

Außerdem sollte untersucht werden, ob die Zerstörung des Aktin Zytoskeletts ein Glied in der Signalkette zur Induktion der GILZ Transkription sein könnte, da monomeres Aktin, das bei diesem Vorgang entsteht, in den Zellkern translozieren und dort Gentranskription aktivieren kann (111). Als Inhibitoren der Aktin Polymerisation wurden das Mykotoxin Cytochalasin D (CytD) (aus *Zygosporum mansonii*) und das marine Toxin Latrunculin B (LatB) (aus *Latrunculia magnifica*) verwendet.

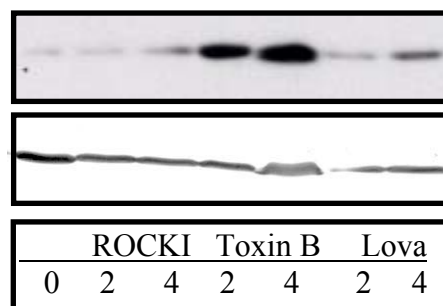


Abbildung 14: GILZ Proteinexpression in HeLa Zellen zwei und vier Stunden nach Behandlung mit ROCKI (1,4 $\mu$ M), Toxin B (50 ng/ml) und Lovastatin (50 $\mu$ M).

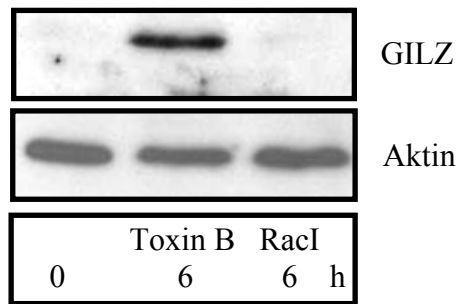


Abbildung 15: GILZ Proteinexpression in HeLa Zellen sechs Stunden nach Behandlung mit Toxin B 10463 (50 ng/ml) oder RacI (100 $\mu$ M).

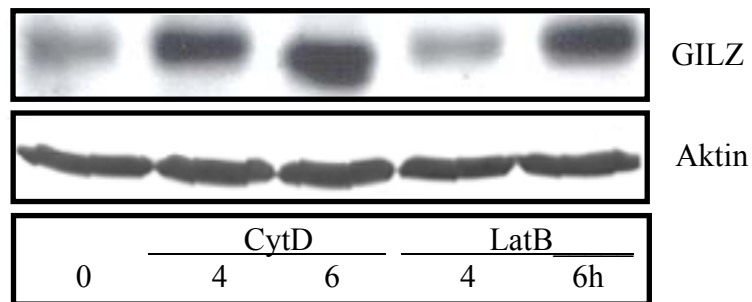


Abbildung 16: GILZ Proteinexpression in HeLa Zellen vier und sechs Stunden nach Behandlung mit Cytochalasin D (5 $\mu$ g/ml) oder Latrunculin B (35 $\mu$ M).

Es zeigte sich, dass weder die Hemmung der C-terminalen Rho Kinase mit ROCKI noch die Hemmung der Prenylierung aller Rho GTPasen durch Lovastatin zu einer vermehrten GILZ Proteinexpression führte (Abb. 14). Auch die Inaktivierung von Rac mit einem spezifischen Inhibitor hatte keinen Einfluss auf die GILZ Expression (Abb. 15).

Dagegen führen Substanzen, die mit der Aktinpolymerisation interferieren, zu einer größeren Menge an GILZ Protein, wobei Cytochalasin D einen größeren Effekt hatte als Latrunculin B (Abb. 16). Der Mechanismus der GILZ Induktion durch Inhibitoren der Aktinpolymerisation wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht, da anderweitig gezeigt werden konnte, dass der Mechanismus der GILZ Induktion durch diese Substanzen vom Mechanismus der GILZ Induktion durch YopT und Toxin B verschieden sein muss. Inkubation einer DNA-Sonde, welche die Sequenz um die kanonische E-Box des GILZ

Promotors enthielt, mit Kernextrakten aus ToxinB behandelten Zellen führte zur Bindung dieser Sonde durch die Transkriptionsfaktoren *upstream stimulatory factor* (USF) 1 und 2, während keine Bindung dieser Sonde durch Proteine aus Kernextrakten von Zellen erfolgte, die mit Cytochalasin D behandelt wurden (Tanja Grandl, unveröffentlicht).

Abschließend wurde mit spezifischen siRNAs die Proteinexpression von Rho, Rac und Cdc42 gehemmt. Allerdings wurde weder durch einzelne Senkung der Rho, Rac oder CDC42 Expression eine Induktion der GILZ Proteinexpression erreicht, noch konnte dies durch die Kombinationen von zwei oder allen drei dieser siRNAs erreicht werden (nicht gezeigt).

### **3.4 Einfluss der GILZ Induktion auf die NFκB Promotoraktivität in HeLa Zellen**

Untersuchungen mit T-Zellen und Makrophagen haben gezeigt, dass GILZ seine antiinflammatorische Wirkung unter anderem durch die Hemmung NFκB abhängiger Transkription entfaltet (27,37). Um zu untersuchen, ob GILZ die Aktivität des NFκB Promotors auch in HeLa Zellen senkt, wurden die Zellen transient mit einem Reporterplasmid transfiziert, bei dem sich ein Luziferasegen unter der Kontrolle eines 5x NFκB Promotors befindet (pNFκB-Luc; Stratagene). GILZ Überexpression wurde durch Ko-Transfektion mit pHM6-GILZ ermöglicht. Dieser Vektor war durch das Einfügen eines Amplifikats des reifen GILZ Transkripts aus der cDNA Dexamethason stimulierter HeLa Zellen erhalten worden, das über die *HindIII* und die *EcoRI* Schnittstelle in den pHM6 Vektor (Roche Diagnostics) inseriert wurde (222). Außerdem erfolgte stets Kotransfektion mit pCMV-*β-galactosidase* (Clontech), um eine Standardisierung der NFκB abhängigen Luziferaseaktivität auf eine konstitutiv exprimierte *β*-Galaktosidase-Aktivität zu ermöglichen.

Um die NFκB Aktivierung bei einer Yersinieninfektion zu simulieren ohne die möglichen Effekte chromosomal kodierter Pathogenitätsfaktoren berücksichtigen zu müssen, wurde zudem mit einem *Y. enterocolitica* Invasin exprimierenden *E. coli* Stamm infiziert (*E. coli* HB101 pInv1914). Es zeigte sich, dass durch GILZ Überexpression sowohl die basale als auch die Invasin stimulierte NFκB Aktivität um ungefähr die Hälfte reduziert werden kann (Abb. 17).

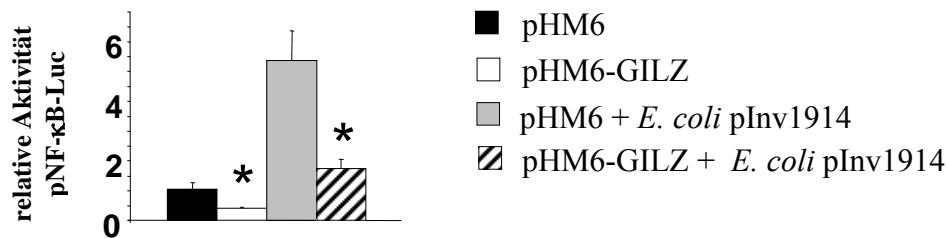


Abbildung 17: Vergleich der relativen Luciferaseaktivitäten in HeLa Zelllysaten. Die Zellen wurden 30h vor der Lyse mit pNFκB-Luc, pCMV-β-galactosidase und pHM6 bzw. pHM6-GILZ transfiziert. Sechs Stunden vor der Lyse erfolgte gegebenenfalls die Infektion mit *E. coli* pInv1914.

Um zu sehen, ob die Deletion von *yopT* sich auf die NFκB Aktivität bei einer Yersinieninfektion auswirkt, wurde die NFκB induzierte Luziferaseaktivität 4, 6 und 8 Stunden nach Infektionsbeginn in HeLa Zellen gemessen. Da bekannt war, dass YopP durch die Inhibition von p38 MAPK (205) zu einer starken Senkung der NFκB Aktivität führt, sollten die Versuche möglichst mit einer  $\Delta yopP \Delta yopT$  ( $\Delta PT$ ) Mutante durchgeführt werden. Da diese für den WA-314 Stamm nicht verfügbar war, wurde mit einem anderen Patientenisolat, *Y. enterocolitica* und dessen Mutanten gearbeitet. Es konnte nur nach 8h eine im Vergleich zum Patientenisolat leicht erhöhte NFκB Aktivität nach Infektion mit der YopT defizienten Mutante festgestellt werden (Abb. 18). Zwar zeigten mit der  $\Delta PT$  Mutante infizierte Zellen zu allen Zeitpunkten eine sowohl im Vergleich zur  $\Delta P$  Mutante als auch zur *yopT* supplementierten  $\Delta PT$  Mutante ( $\Delta PT$  pBM1) erhöhte NFκB Aktivität. Doch ist auch in diesem Fall der Unterschied nicht groß (maximal ca. zweifach, nach 8h). Signifikante Unterschiede wurden nur zwischen der NFκB Aktivität von E40 pYV<sup>+</sup> und E40  $\Delta P$  infizierten Zellen gefunden ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ )

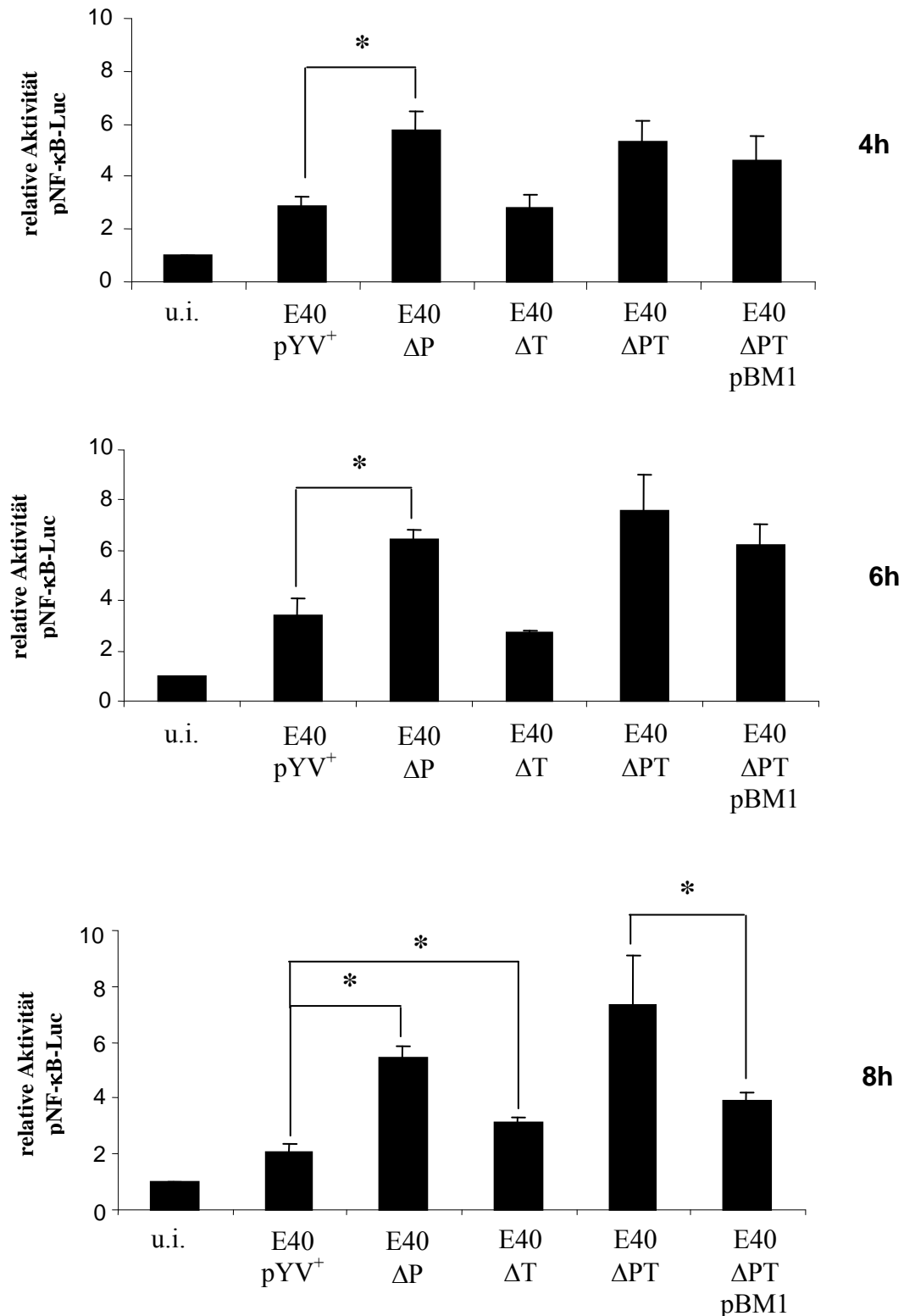


Abbildung 18: NFκB abhängige Luziferaseaktivität 4h, 6h und 8h nach Infektion mit dem *Y. enterocolitica* E40 Patientenisolat bzw. *YopP* oder *YopT* defizienten Stämmen.

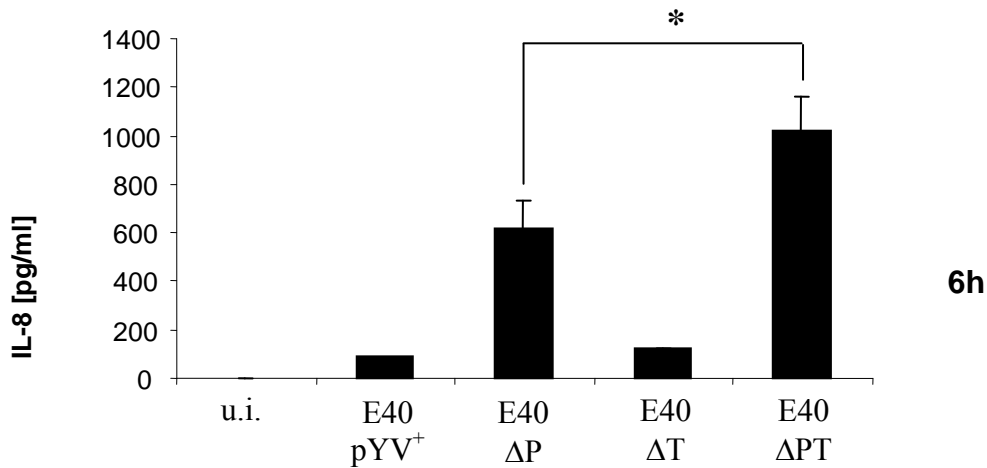


Abbildung 19: IL-8 Ausschüttung von HeLa Zellen sechs Stunden nach Infektion mit den angegebenen *Y. enterocolitica* E40 Stämmen. ELISA mit Überständen von HeLa Zellen sechs Stunden nach Infektionsbeginn.

Eines der Gene, deren Transkription NFκB abhängig aktiviert wird, ist IL-8. Die Bestimmung der sekretierten IL-8 Menge in Überständen von HeLa Zellen zeigt sechs Stunden nach Infektion ein sehr ähnliches Bild wie die NFκB Luziferase-Experimente (Abb. 19).

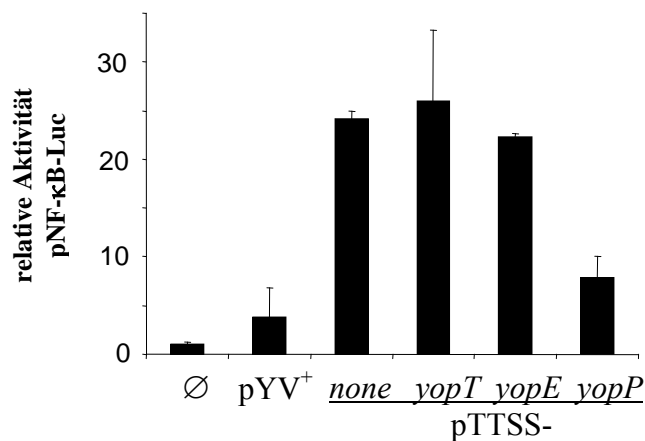


Abbildung 20: NFκB abhängige Luziferaseaktivität 6h nach Infektion mit pYV<sup>+</sup> und der YopT Monosekretionsmutante, sowie als Vergleich den YopE und YopP Monosekretionsstämmen.

Nach Infektion von HeLa Zellen mit dem WA-314 Patientenisolat und den YopT, YopE und YopP Monosekretionsmutanten konnte zwar eine im Vergleich zum zur pTTSS Stamm



Mutante gesenkte Luziferaseaktivität in den Lysaten der pYV<sup>+</sup> und pTTSS-*yopP* infizierten Zellen gemessen werden. Jedoch konnte bei pTTSS-*yopT* oder pTTSS-*yopE* Infektion keine NFκB Hemmung festgestellt werden (Abb.20).

Offensichtlich reicht also die YopT induzierte GILZ Expression allein nicht aus, um die NFκB Aktivität in der Zielzelle zu beeinflussen. Ein möglicher Grund hierfür könnte die translozierte YopT Menge sein. YopT steht bei der Typ III Sekretion in Konkurrenz zu mindestens 5 weiteren Effektor-Yops und den beiden Translokator-Yops YopB und YopD. Möglicherweise ist daher die translozierte YopT Aktivität nicht ausreichend für eine quantitative Umsetzung der zellulären Zielproteine, so dass der prinzipiell mögliche Effekt nicht beobachtet werden kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Effekt der Überexpression von YopT untersucht.

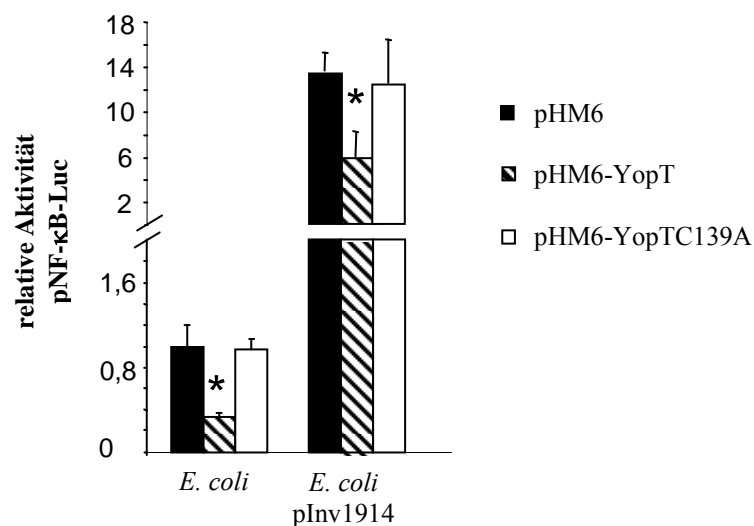


Abbildung 21: NFκB abhängige Luziferaseaktivität 30h nach Transfektion mit dem Leervektor (pHM6), dem Vektor für YopT Überexpression (pHM6-YopT) oder für YopTC139A Überexpression (proteasedefizient; pHM6-YopTC139A) und dem NFκB Reporterplasmid pNF-κB-Luc und pCMV-β-galactosidase. Die Lysate wurden sechs Stunden nach Infektion mit *E. coli* oder *E. coli* pInv1914 hergestellt.

Überexpression von funktionellem YopT, nicht aber von proteasedefizientem YopT (YopTC139A), führte zu einer signifikanten Reduktion sowohl der basalen- (nach Infektion mit *E. coli*) als auch der Invasin stimulierten NFκB Aktivität (nach Infektion mit *E. coli* pInv1994, Abb. 21).

Es konnte also gezeigt werden, dass GILZ Überexpression in HeLa Zellen basale- wie Invasin stimulierte NFκB Aktivität senken kann und dass das gleiche auch für YopT Überexpression gilt. Fraglich blieb allerdings, ob die niedrigere NFκB Aktivität eine Folge der YopT induzierten GILZ Expression ist oder ob ein anderer Effekt von YopT dafür verantwortlich ist. Daher wurde untersucht, ob die YopT abhängige Senkung der NFκB Aktivität sich durch GILZ spezifische siRNA (104) aufheben lässt. Dazu wurden zunächst eine siRNA Konzentration und Transfektionsbedingungen gesucht, die zu einer erheblichen Reduktion der GILZ Proteinexpression führen, gleichzeitig aber auch eine robuste Ermittlung der NFκB Aktivität ermöglichen. Abbildung 22 zeigt, dass die letztendlich ausgewählten Bedingungen für die siRNA Anwendung geeignet sind, um GILZ Expression nach Überexpression von YopT zu blockieren.

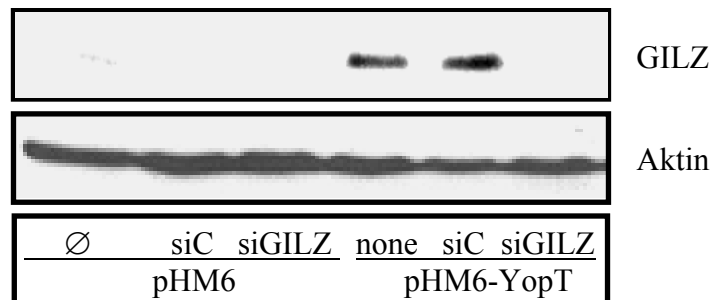


Abbildung 22: Transfektion von HeLa Zellen mit Kontroll siRNA und GILZ spezifischer siRNA gefolgt von pHM6 bzw. pHM6-YopT Plasmidtransfektion

Darauffolgend wurde die NFκB Aktivität in Experimenten untersucht, bei denen DNA-Transfektionskontrollen und YopT überexprimierende HeLa Zellen, die zuvor mit Kontroll-siRNA oder siGILZ behandelt worden waren, mit *E. coli* oder *E. coli* pInv1914 infiziert wurden. Dabei zeigt sich, dass die Hemmung der GILZ Proteinexpression durch siGILZ unabhängig von der Anwesenheit von YopT und verstärkend zu dieser, zu einer gesenkten NFκB Aktivität führt (Abb. 23). Die von YopT verursachte NFκB Hemmung kann daher nicht GILZ vermittelt sein.

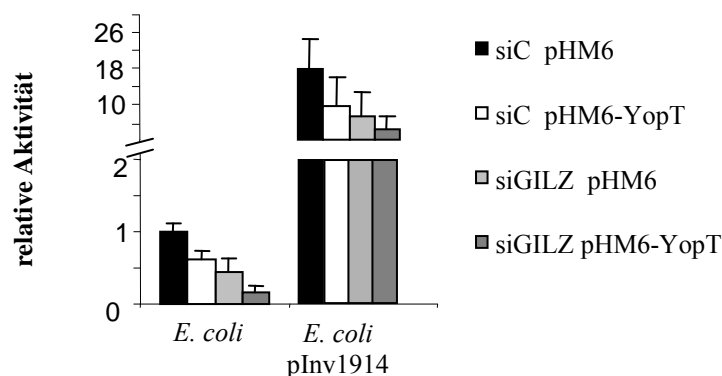


Abbildung 23: NFκB abhängige Luziferaseaktivität 54h nach siRNA Transfektion und 30h nach Transfektion des GILZ Überexpressionsvektors oder des Kontrollvektors und des NFκB Reporterplasmids pNF-κB-Luc und pCMV-β-galactosidase. Die Luziferaseaktivität wurde in Lysaten, die 6h nach Infektion mit *E. coli* oder *E. coli pInv1914* hergestellt wurden, gemessen.

Zusammenfassend konnte also die Induktion der GILZ Proteinexpression durch die Proteaseaktivität von *Y. enterocolitica* YopT sowie das *C. difficile* Toxin B gezeigt werden, eine spezifische Beschreibung eines die GILZ Expression vermittelnden Signalwegs gelang jedoch nicht. Durch Überexpression von GILZ konnte, wie bereits beschrieben (27,37), basale und Invasin induzierte NFκB Aktivität gehemmt werden. Ebenfalls konnte, in geringerem Ausmaß, NFκB Aktivität durch YopT Überexpression gehemmt werden. Es konnte eine verstärkte NFκB Aktivierung bei Infektion mit YopP/T und YopT Deletionsmutanten gezeigt werden. Jedoch wurde keine Senkung der NFκB Aktivität durch eine YopT Monosekretionsmutante beobachtet und Unterdrückung der GILZ Expression durch spezifische siRNA beeinträchtigte die der NFκB Aktivität durch YopT Überexpression nicht. Daher liegt wohl keine Abhängigkeit der YopT verursachten Senkung NFκB abhängiger proinflammatorischer Genexpression von der YopT induzierten GILZ Expression vor.

### 3.5 Etablierung eines β-Laktamase Reportersystems für Typ III Effektortranslokation

Der Nachweis translozierter Effektoren ist unabdingbar für die Untersuchung der Pathogenesestrategien von Pathogenen mit Typ III Effektortranslokation. Daher wurden

bereits verschiedene Methoden zum direkten oder indirektem Nachweis dieser Effektoren in den infizierten Wirtszellen etabliert (11,62,81,125,151,269).

Auch in eigenen Vorarbeiten wurde ein Reportersystem für *Y. enterocolitica* entwickelt, bei dem ein YopE53-Cre Fusionsprotein als Reporter für den Nachweis von Typ III Translokation auf Einzelzellebene diente. Trotz guter Resultate bei der Infektion von CV1-5B Fibroblasten (161,306), die nach Infektion mit dem Reporterstamm Cre-Aktivität durch  $\beta$ -Galaktosidase Expression anzeigten (165), konnte mit diesem System keine Yop Translokation in verschiedenen Mausmodellen mit Cre aktivierbarer Reporterexpression gezeigt werden (eigene, unveröffentlichte Ergebnisse).

## **3.6 Genese der Reporterstämme**

Aufgrund positiver Erfahrungen beim Versuch der Etablierung eines Reportersystems auf Basis der Aktivierung eines rekombinanten Reporters in der Wirtszelle durch Cre-loxP abhängige Manipulation dessen Promotors (165), wurde das klinische Isolat *Y. enterocolitica* Serotyp O:9 E40 (269) als Reporterstamm ausgewählt.

### **3.6.1 Generierung eines metabolisch stabilisierten Systems**

Untersuchungen, die zur Etablierung des Cre-loxP Reportersystems durchgeführt wurden zeigten, dass es unregelmäßig zu einer starken Expansion von Bakterien kommen kann, welche das für das Reportersystem notwendige Expressionsplasmid verloren haben (165). Daher sollte durch Ausschaltung eines essentiellen Genes auf dem Bakterienchromosom und dessen Supplementation *in trans* auf dem Reporterplasmid dessen Retention erzwungen werden.

Das *asd* Gen kodiert für die Aspartatdehydrogenase, ein Enzym, das meso-Diaminopimelinsäure für die Transpeptidierung des Mureins bereitstellt. Es ist daher essentiell für die Synthese der Bakterienzellwand und damit für das Überleben der Bakterien. Das *asd* Gen von *Y. enterocolitica* Serotyp E40 wurde im Rahmen einer Kooperation von Jaime Mota und Marina Kuhn durch homologe Rekombination ausgeschaltet, so dass der Stamm E40  $\Delta$ *asd* erhalten wurde. Zusammen mit der Insertion des *asd* Gens auf dem

Reporterplasmid konnte so die metabolische Stabilisation des Reporterplasmids verwirklicht werden (Abb. 24).

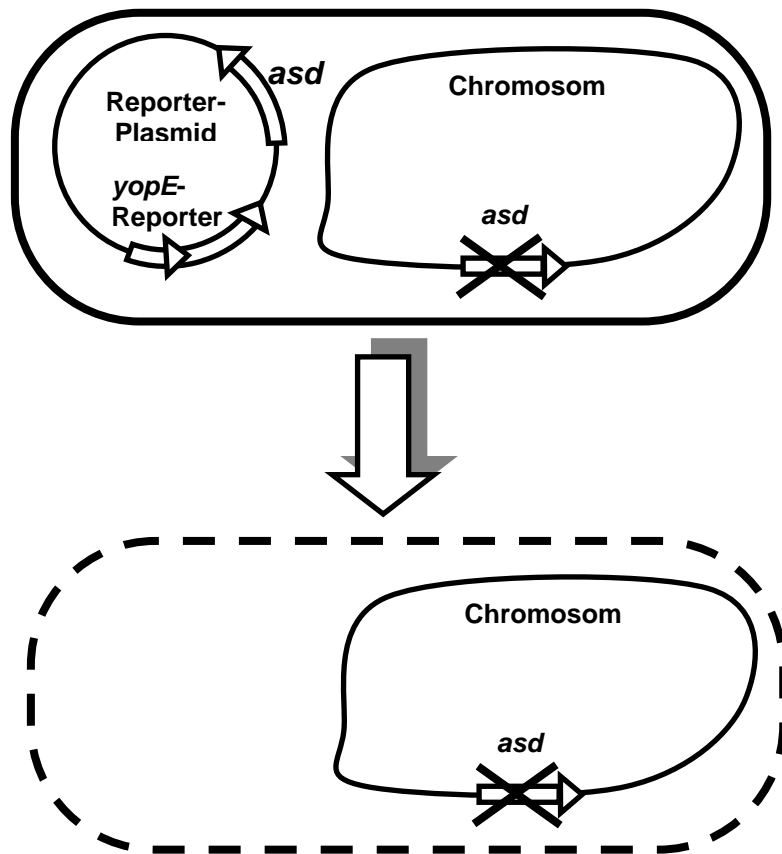


Abbildung 24: Schematische Darstellung der metabolischen Stabilisierung des Reporterplasmids

## 3.6.2 Herstellung der Plasmide

### 3.6.2.1 Klonierung des Reporterplasmids pMK-Bla

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung des Bla Reporterplasmids diente das Cre-loxP Reporterplasmid pMK4. Da in der Arbeitsgruppe gute Ergebnisse mit der Sekretion von Fusionen an die N-terminalen 53 Aminosäuren von YopE gemacht wurden (2,3,165,167), wurde auch als Cre Reporter letztendlich ein YopE53 Fusionsprotein verwendet.

### **Herstellung des Cre-loxP Reporterplasmids pMK4**

Um ein YopE53 Fusionsprotein zu erhalten, wurde der Vektor pBME53-G1 (3) herangezogen, ein pACYC184 Derivat welches ein *XbaI* - *HindIII* - *sycE* - *PyopE/sycE* - *yopE53* - *BamHI* - *gfp* - *SalI* Fragment enthält. *BamHI* - *gfp* - *SalI* wurde durch ein Fragment aus pBKEF-*nlscre* ersetzt das eine Fusion des Affenvirus 40 (SV40) Kernlokalisierungssignals (nls) mit der Cre Rekombinase des Bakteriophagen P1 enthält (*BamHI* - *nls* - *cre* - *SalI*) so dass das Plasmid pBME53-Cre erhalten wurde (167). Der Vektor pIV2 wurde aus einem kleinen kryptischen Plasmid (p29807) eines apathogenen *Y. enterocolitica* Stamms durch Hinzufügen einer Kanamycin Resistenzkassette und einer multiplen Klonierungsstelle (MCS) erhalten (271). Dieser erhielt das *XbaI* - *HindIII* - *sycE* - *PyopE/sycE* - *yopE53* - *BamHI* - *nls* - *cre* - *SalI* Fragment aus pBME53-Cre (pIV2-SycE-YopE53-Cre) (165). Durch Einfügen von *ApaI* - *asd* - *XhoI* (Jaime Mota, Marina Kuhn) wurde das Plasmid pMK4 erhalten und so die Möglichkeit zur metabolischen Stabilisierung des Reporterplasmids durch Komplementierung der DAP Auxotrophie von E40  $\Delta$ *asd* geschaffen (Abb. 27).

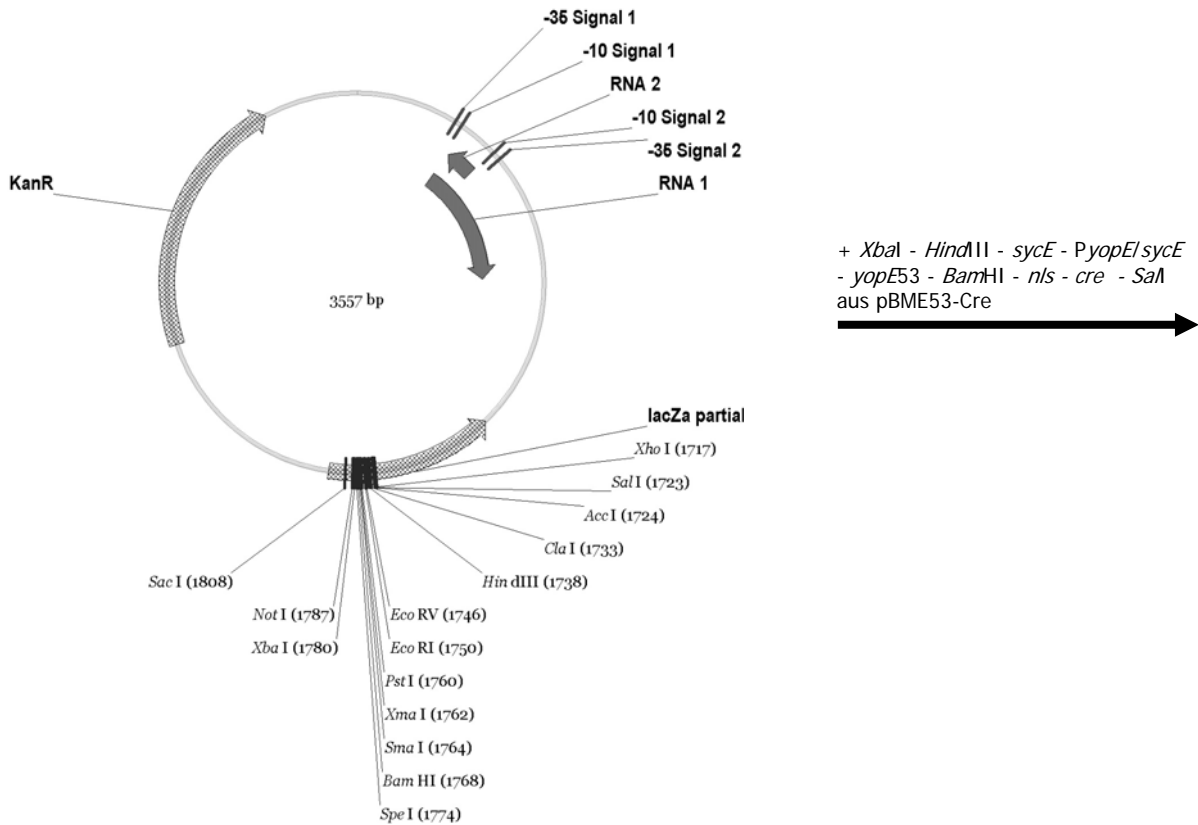
### **Herstellung des Reporterplasmids pMK-Bla**

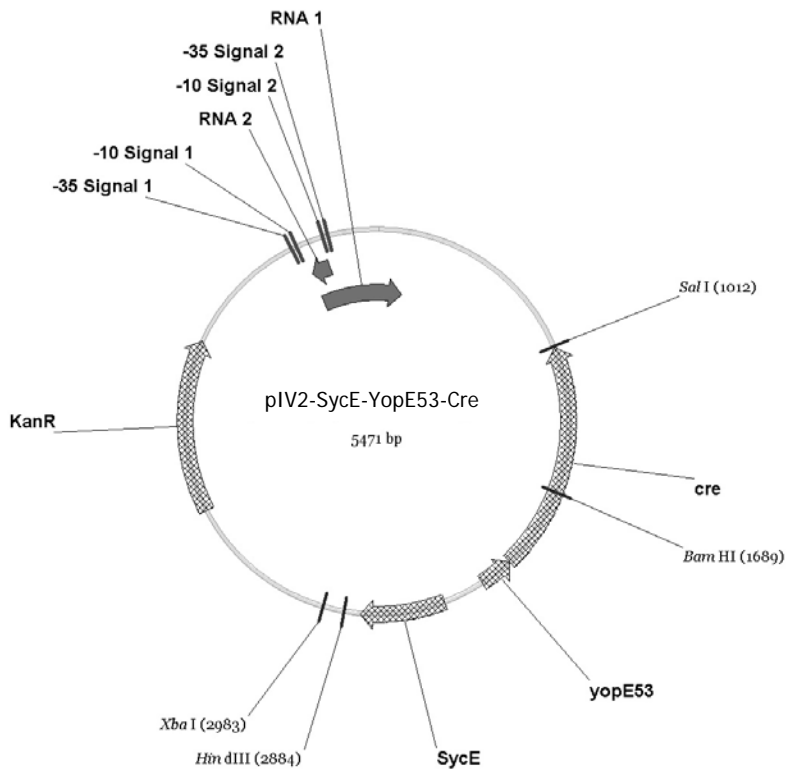
Zur Herstellung eines  $\beta$ -Laktamase Reporters wurde das Bla Gen aus pCR2.1 mit den Primern *BamHI* bla fwd und *SalI* bla rev amplifiziert. Das PCR Produkt wurde in pCR-Blunt II zwischenkloniert und sequenziert. Das Gen ersetzte als *BamHI/SalI* Fragment die für GFP kodierende Sequenz in pBME53-G1, so dass ein pACYC184 Derivat mit der Sequenz *XbaI* - *HindIII* - *sycE* - *PyopE/sycE* - *yopE53* - *BamHI* - *bla* - *SalI* erhalten wurde (pBME53-Bla). Durch diese Sequenz wurde das bisherige *HindIII/SalI* Fragment in pMK4 ersetzt, so dass pMK-Bla erhalten wurde (Abb. 27).

#### **3.6.2.2 Klonierung des Kontrollplasmids pMK-Ova**

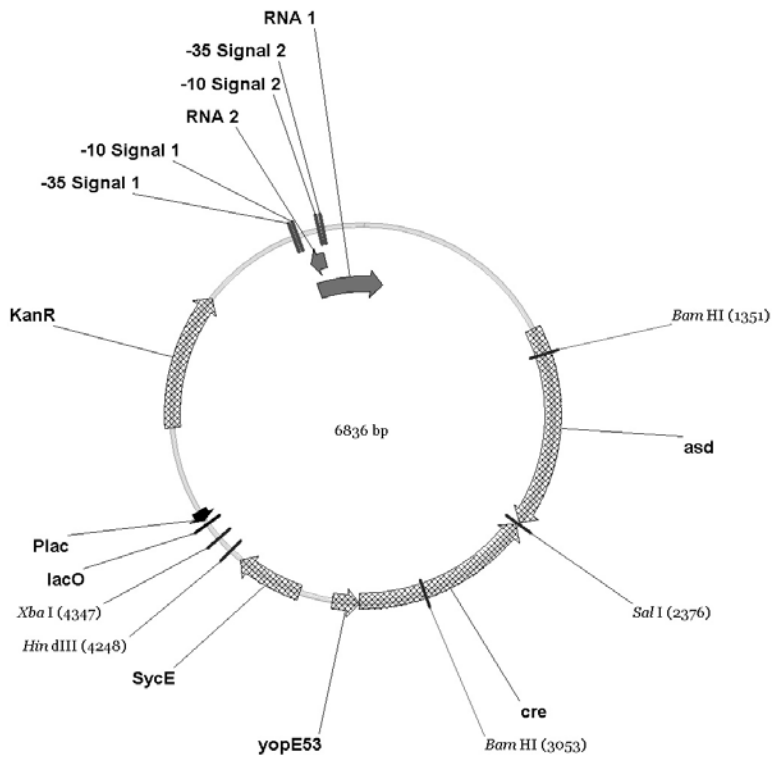
Um zu verifizieren, dass die beobachtete Fluoreszenzänderung tatsächlich auf die  $\beta$ -Laktamase Aktivität des YopE53-Bla Fusionsproteins zurückzuführen ist, sollte eine Negativkontrolle generiert werden, welche ein inaktives Fusionsprotein transloziert. Als enzymatisch inaktive Proteindomänen eignen sich zum Beispiel Ovalbuminfragmente. Daher wurde das für Bla kodierende *BamHI/SalI* Fragment in pBME53-Bla durch das für Ovalbumin (Ova) AS 247-355 kodierende *BamHI/SalI* Fragment aus pYopE<sub>1-138</sub>Ova<sub>247-355</sub>

(301) ersetzt, so dass pBME53-Ova erhalten wurde. Ein *HindIII* - *sycE* - *PyopE/sycE* - *yopE53* - *BamHI* - *ova147-355* - *SalI* Fragment aus diesem Plasmid ersetzte die zwischen *HindIII* und *SalI* befindliche Sequenz in pMK-Bla so dass pMK-Ova erhalten wurde (Abb. 25) (vgl. auch (164)).



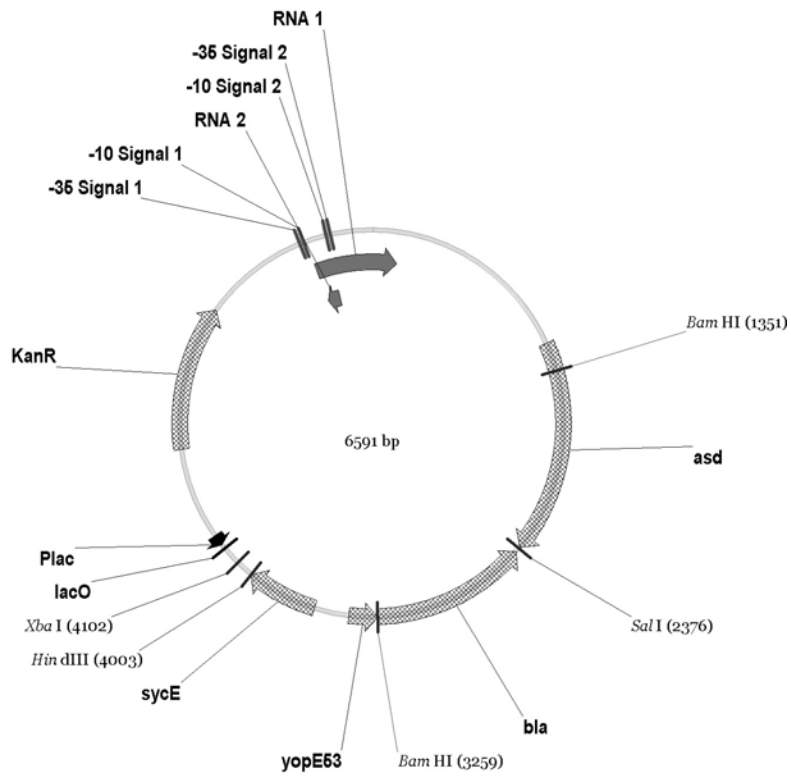


+ *Apal - asd - XhoI*



+ *HindIII - sycE - PyopE/sycE - yopE53 - BamHI - bla - SalI* aus pBME53-Bla





+ *Hind*III - *sycE* - *P<sub>yopE</sub>* *sycE* - *yopE53* - *Bam*HI - *ova247-355* - *Sal*I aus pBME53-Ova

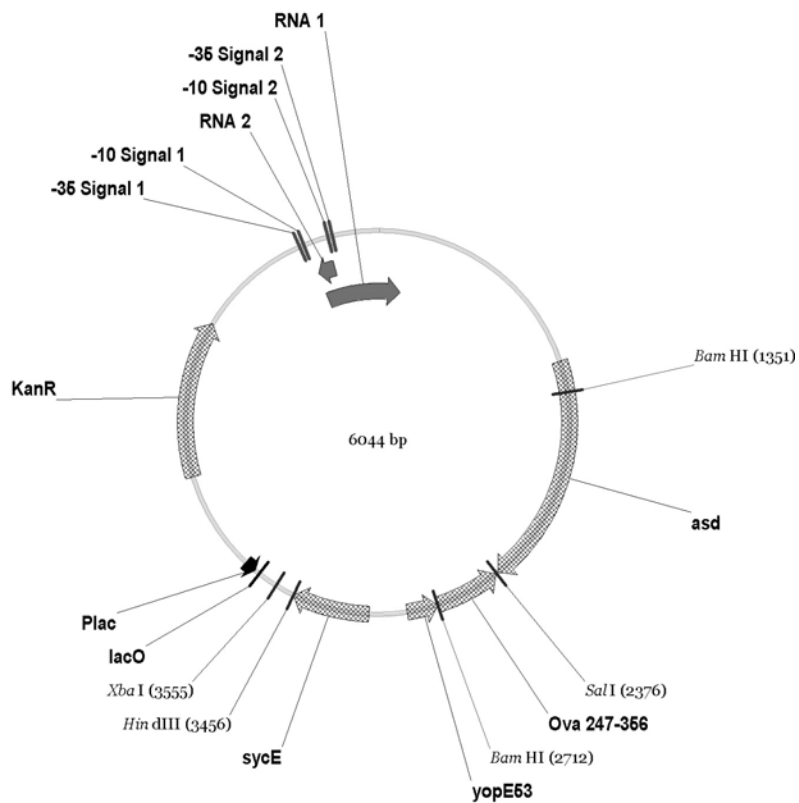


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Konstruktion der Reporterplasmide

### **3.6.2.3 Klonierung eines Plasmids für eukaryotische Bla Expression**

Da nicht sicher davon ausgegangen werden konnte, dass die Translokation des YopE53-Bla Fusionsprotein zu einer messbaren Bla Aktivität in den infizierten Zellen führt, wurde als Positivkontrolle für die ersten Versuche ein Vektor für die Bla Überexpression in eukaryotischen Zellen hergestellt. Da die Sequenzierung des Bla PCR Produkts in pCR-Blunt II gezeigt hatte, dass dieses in der Ableserichtung der *lacZ $\alpha$*  Sequenz in den Vektor integriert war, konnte ein *Bam*HI - *bla* - *Xho*I Fragment gewonnen und in pCDNA3 gebracht werden (pCDNA3-Bla). Transfektion von eukaryotischen Zellen mit pCDNA3-Bla ermöglichte die Laktamase-Expression unter der Kontrolle eines CMV Promoters (164).

### **3.6.3 Herstellung der benötigten *Y. enterocolitica* Stämme**

#### **3.6.3.1 Herstellung von E40-pBla und E40-pOva**

Um den Reporterstamm E40  $\Delta$ *asd* pMK-Bla (E40-pBla) und den Kontrollstamm E40  $\Delta$ *asd* pMK-Ova (E40-pOva) zu erhalten, wurde der Stamm E40  $\Delta$ *asd* mit den Plasmiden pMK-Bla bzw. pMK-Ova transformiert. Die gewünschten Klone wurden als Arsenit und Kanamycin resistente sowie DAP prototrophe Kolonien erhalten (vgl. auch (164)).

#### **3.6.3.2 Herstellung von $\Delta$ YscN-pBla**

Als zusätzliche Kontrolle sollte ein Stamm geschaffen werden, der das YopE53-Bla Reporterprotein zwar exprimiert, jedoch kein funktionelles Sekretionssystem besitzt. Ein solcher sekretionsdefizienter Stamm war notwendig, um zu klären, ob die Aufnahme von Yops (und des Bla Reporters) ausschließlich durch Typ III Translokation erfolgte, oder ob auch Phagozytose von Bakterien eine Rolle spielte.

Es konnte gezeigt werden, dass die ATPase YscN für den Antrieb der Yop Sekretion notwendig ist (303). Weiterhin führte die Deletion einer Nukleotidbindungssequenz (AS 169-177) zur Inaktivierung von YscN und verhinderte die Yop Sekretion. Da dieses mutierte E40 Virulenzplasmid (pMSL41) uns von der Arbeitsgruppe Cornelis zur Verfügung gestellt wurde, konnte es in den Reporterstamm gebracht werden.

Voraussetzung für den Transfer mutierter E40 pYV Plasmide in die Reporterstämme war die Gewinnung eines Reporterstamms bzw. Kontrollstamms ohne Virulenzplasmid. Solche Stämme wurden gewonnen, indem eine E40-pBla bzw. E40-pOva Kultur über eine Woche bei 37 °C durchgeführt wurde (132). Durch Replika-Plattierung wurden Arsenit sensitive Kolonien gefunden, die durch die Stämme E40  $\Delta asd$  pYV pMK-Bla bzw. E40  $\Delta asd$  pYV pMK-Ova (pYV  $\Delta asd$  pOva) gebildet wurden.

Durch Elektroporation von pMSL41 (269,303) in E40 pYV<sup>-</sup>  $\Delta asd$  pBla wurde E40  $\Delta asd$  *yscN* $\Delta$ 169-177 pMK-Bla ( $\Delta$ YscN-pBla) erhalten (vgl. auch (164)).

### 3.6.3.3 Herstellung von $\Delta$ YadA-pBla und $\Delta$ YadA-pOva

Analog zu  $\Delta$ YscN-pBla wurden die Stämme E40  $\Delta asd$   $\Delta yadA$  pMK-bla ( $\Delta$ YadA-pBla) und E40  $\Delta asd$   $\Delta yadA$  pMK-Ova ( $\Delta$ YadA-pOva) durch Transformation von E40 pYV<sup>-</sup>  $\Delta asd$  pBla bzw. pYV<sup>-</sup>  $\Delta asd$  pOva mit pLJM 4029 (192) hergestellt.

### 3.6.3.4 Eigene Mutageneseversuche

Da ein pYV40 Plasmid mit inaktiviertem *yscN* Gen zunächst nicht verfügbar war und auch das Translokator Yop YopB deletiert werden sollte, wurden eigene Mutageneseversuche unternommen. Allerdings gelang es nicht, die kodierenden Sequenzen durch Homologe Rekombination (Methodik nach (141)) zu entfernen. Das Mutageneseplasmid konnte zwar erfolgreich in das pYV Plasmid integriert werden. Jedoch gelang es nicht, Klone zu identifizieren, welche das Mutageneseplasmid mitsamt der von den Homologiebereichen flankierten Sequenz verloren hatten. Auch der Versuch, die Translation dieser Gene durch gerichtete Transposonmutagenese (160) zu unterbrechen, gelang nicht. Es wurden zwar zahlreiche Klone mit integriertem Intron erhalten, jedoch wurde keine Integration in den gewünschten Locus beobachtet.

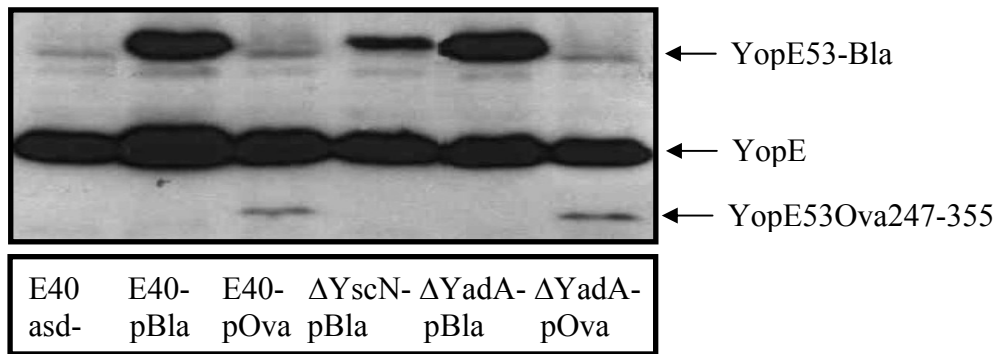
### 3.6.3.5 Herstellung von Reporterstämmen aus anderen Patientenisolaten

Neben den aus dem Patientenisolat *Y. enterocolitica* O:9 E40 und den daraus hervorgegangenen Stämmen mit inaktivierten Virulenzgenen (*yscN* $\Delta$ 169-177 und  $\Delta yadA$ )

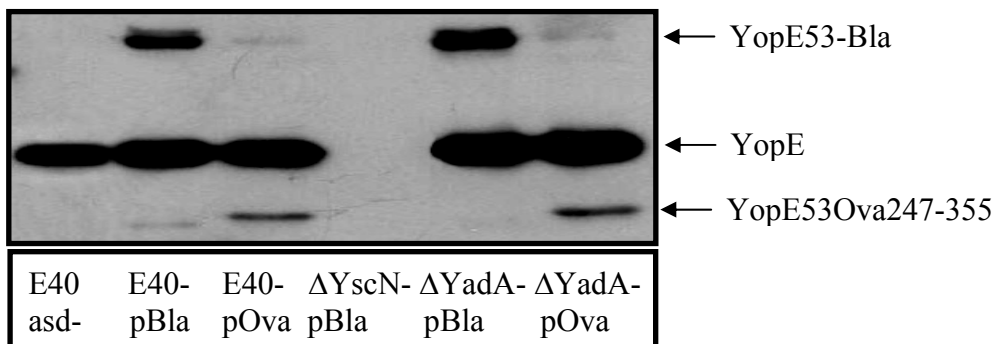
wurden auch die Patientenisolat *Y. enterocolitica* O:8 WA-314 (135), 6471/76 O:3 (264) und Ruokola O:9 (193) mit pMK-Bla transformiert. Trotz in allen Fällen guter Sekretion des Fusionsproteins zeigten *in vitro* Infektionsexperimente mit WA-314 nur ein Zehntel der Bla positiven Zellen die bei gleichen Infektionsbedingungen mit E40-pBla erhalten wurden. Die Transformation der Stämme 6471/76 und Ruokola führte zu keiner erkennbaren Laktamaseaktivität in infizierten Zellen. Daher wurden diese Stämme für keine weiteren Experimente verwendet.

### **3.6.4 Überprüfung der Typ III Sekretion der Reporterstämme**

Zur Überprüfung, ob die plasmidkodierte YopE53 Fusionsproteine auch tatsächlich exprimiert und sekretiert werden und ob es eine Beeinträchtigung der Sekretion von YopE gibt, wurden Überstände aus Kulturen dieser Stämme, die bei 37°C und Kalziumentzug durchgeführt wurden (133), durch Immunoblot gegen YopE untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Fusionsprotein von allen mit den Plasmiden pMK-Bla bzw. pMK-Ova transformierten Stämmen exprimiert und von allen Stämmen außer der sekretionsdefizienten Mutante  $\Delta YscN$ -pBla sekretiert werden. Eine Beeinträchtigung der Expression oder Sekretion von YopE wurde nicht festgestellt (Abb. 26).



### Pellet



### Überstand

Abbildung 26: Proteinexpression (Pellet) und Sekretion (Überstand) der Reporterstämme.

## 3.7 Etablierung des Bla Reportersystems *in vitro*

### 3.7.1 Transfektion und Infektion von HeLa Zellen

Um eine Positivkontrolle für die Messung der Bla abhängigen Umwandlung der CCF4 Fluoreszenz zu etablieren, wurden HeLa Zellen transient mit pcDNA3-Bla bzw. dem Leervektor pcDNA3 transfiziert. Wie erwartet, konnte durch Transfektion mit pcDNA3-Bla ein Kollektiv blau fluoreszierender Zellen erzeugt werden (Abb. 27) (164).

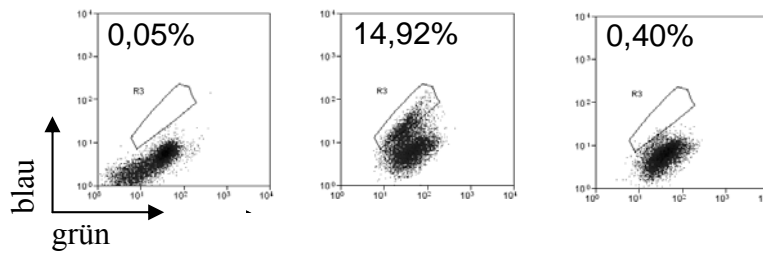


Abbildung 27:  $\beta$ -Laktamase Expression in HeLa Zellen. Die Zellen wurden mit dem  $\beta$ -Laktamase Expressionsvektor pCDNA3bla bzw. mit pCDNA3 (Leervektor) transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit CCF4-AM gefärbt und die CCF4 Fluoreszenzen im Durchflusszytometer gemessen ( $n=2$ ).

Um zu klären, ob durch die Translokation des YopE53-Bla Reporterproteins durch *Y. enterocolitica* in CCF4-AM gefärbten eukaryotischen Zellen tatsächlich ein durchflusszytometrisch messbarer bzw. am Mikroskop beobachtbarer Anstieg blauer Fluoreszenz verursacht wird, wurden ebenfalls initiale Untersuchungen mit HeLa Zellen durchgeführt. Zunächst erfolgten durchflusszytometrische Untersuchungen von uninfizierten Zellen und Zellen, die mit einer MOI von 50 mit den Stämmen E40-pBla, E40-pOva,  $\Delta$ YscN-pBla sowie  $\Delta$ YadA-pBla und  $\Delta$ YadA-pOva infiziert wurden. Nach der Infektion wurden die Zellen durch Trypsin-EDTA Behandlung von der Zellkulturplatte gelöst und mit CCF4-AM in antibiotikahaltigem Medium gefärbt. Es zeigte sich, dass bei uninfizierten oder mit den Kontrollstämmen E40-pOva (keine Bla Aktivität),  $\Delta$ YscN-pBla (keine Sekretion) und  $\Delta$ YadA-pOva (keine Bla Aktivität) infizierten Zellen maximal 2,5% blaue Fluoreszenz messbar waren. Bei Infektion mit E40-pBla wurden dagegen 28% blaue Zellen erhalten, mit  $\Delta$ YadA-pBla 56% ( $n = 5$ , Abb. 28).

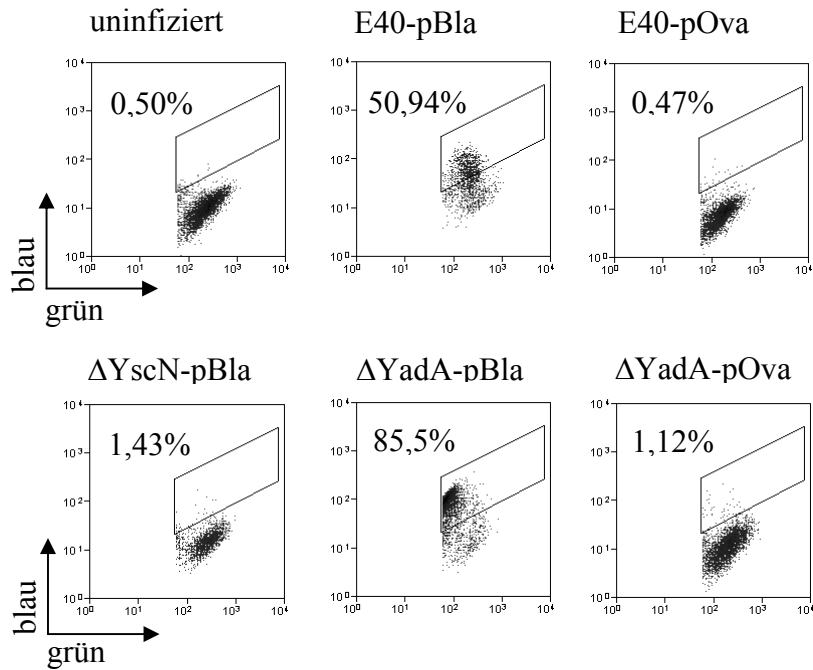
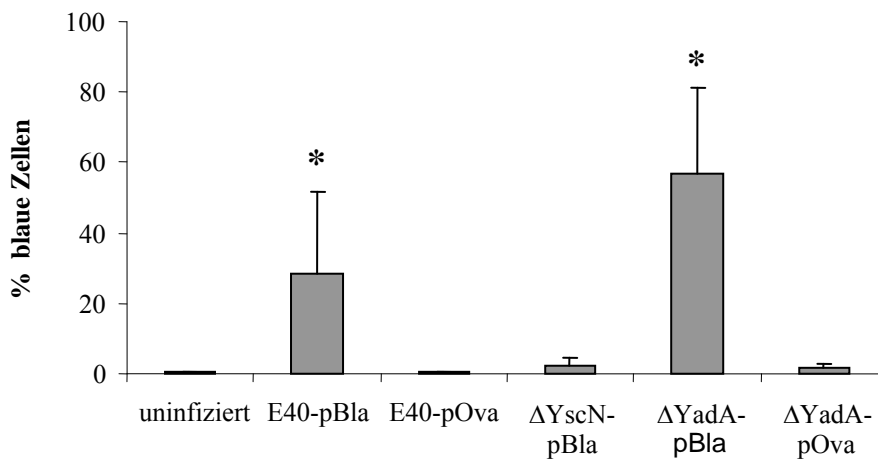
**A****B**

Abbildung 28: HeLa Zellen wurden mit den angegebenen *Y. enterocolitica* E40 Stämmen infiziert und der Prozentsatz blauer Zellen nach CCF4-AM Färbung am Durchflusszytometer bestimmt. A: Auftrag der grünen Fluoreszenz des ungespaltenen Farbstoffs gegen die blaue Fluoreszenz des umgesetzten Farbstoffs eines repräsentativen Experiments. B: Zusammenfassung aller Experimente. Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied zu E40-pOva an ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

Die Entstehung blauer Fluoreszenz in Zellen, die mit den YopE53-Bla sekretierenden Stämmen E40-pBla und  $\Delta$ YadA-pBla infiziert wurden, konnte auch durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Hierzu wurden getrennte Aufnahmen der grünen und der blauen Fluoreszenz überlagert. Dabei wurde erhöhte blaue Fluoreszenz vor allem nach Infektion mit E40-pBla und  $\Delta$ YadA-pBla beobachtet (mit MOI 100 für eine Stunde) (164).

Das in dieser Arbeit geschaffene  $\beta$ -Laktamase Reportersystem erwies sich also als geeignet für die durchflusszytometrische und mikroskopische Untersuchung der Effektortranslokation durch die Reporterstämme E40-pBla und  $\Delta$ YadA-pBla.

### **3.7.2 Infektion von GD25 und GD25- $\beta$ 1A Fibroblasten**

Für das Zustandekommen der Yop Translokation in Wirtszellen ist offensichtlich nicht nur die Expression der Effektor-Yops, der Porenbildner YopB und YopD und des Typ III Sekretionssystems erforderlich, sondern auch die Expression von Adhäsinen, denn nur durch das Anhaften der Bakterien an den Wirtszellen kann die Verbindung zwischen der Nadel des Sekretionssystems und der Pore in der Wirtszellmembran stabilisiert werden. Es wird allgemein angenommen, dass eine *Y. enterocolitica* Invasin – Wirtszell  $\beta$ 1 Integrin Bindung notwendig ist, damit Yop Translokation zustande kommt, jedoch wurde die Notwendigkeit der  $\beta$ 1 Integrin Expression durch Wirtszellen bisher nicht durch direkte experimentelle Untersuchungen gezeigt. Auch wäre es durchaus möglich, dass statt Invasin auch YadA, Ail, LcrV oder das Produkt eines putativen Adhäsingens eine Schlüsselrolle bei der Stabilisierung des Kontakts zwischen Bakterium und Wirtszelle spielen könnten und so die eigentliche Voraussetzung für die Effektortranslokation darstellten.

GD25 Fibroblasten wurden durch Inaktivierung des  $\beta$ 1 Integrin Gens in Maus Stammzellen gewonnen (96,300). GD25- $\beta$ 1A Fibroblasten wurden durch stabile Transfektion mit  $\beta$ 1 Integrin cDNA aus GD25 Fibroblasten gewonnen. Infektionsversuche mit E40-pBla und E40-pOva zeigten ausschließlich blaue Fluoreszenz bei GD25- $\beta$ 1A Zellen, die mit E40-pBla infiziert wurden. Allerdings erfolgte die  $\beta$ 1 Integrin Färbung mit einem anti-CD29 Antikörper nicht im gleichen Ansatz (da dieser nicht mit einem zusammen mit CCF4 verwendbaren Fluorophor markiert war) und zeigte nur ca. 20%  $\beta$ 1 Integrin positive Zellen in der



verwendeten GD25- $\beta$ 1A Kultur (164). Daher wurde der Versuch mit einem Allophycocyanin (APC) markierten anti-CD29 Antikörper anderer Herkunft wiederholt. Unter diesen Bedingungen konnten 90% der GD25- $\beta$ 1A Fibroblasten mit anti-CD29 angefärbt werden. Gleichzeitig waren 27% dieser Zellen Bla positiv, wenn mit E40-pBla bei einer MOI von 50 infiziert wurde. Bei Infektion von GD25 Fibroblasten mit E40-pBla wurden dagegen nur 0,72% blaue Zellen erhalten. Diese Zahl liegt deutlich über dem Hintergrund der bei uninfizierten bzw. E40-pOva infizierten GD25 Zellen erhalten wurde ( $<0,05\%$ ), jedoch zeigt dieses Ergebnis klar, dass ohne die Wechselwirkung des *Yersinia* Invasins mit  $\beta$ 1 Integrinen auf den Zielzellen kaum Yop Translokation stattfindet (Abb. 29).

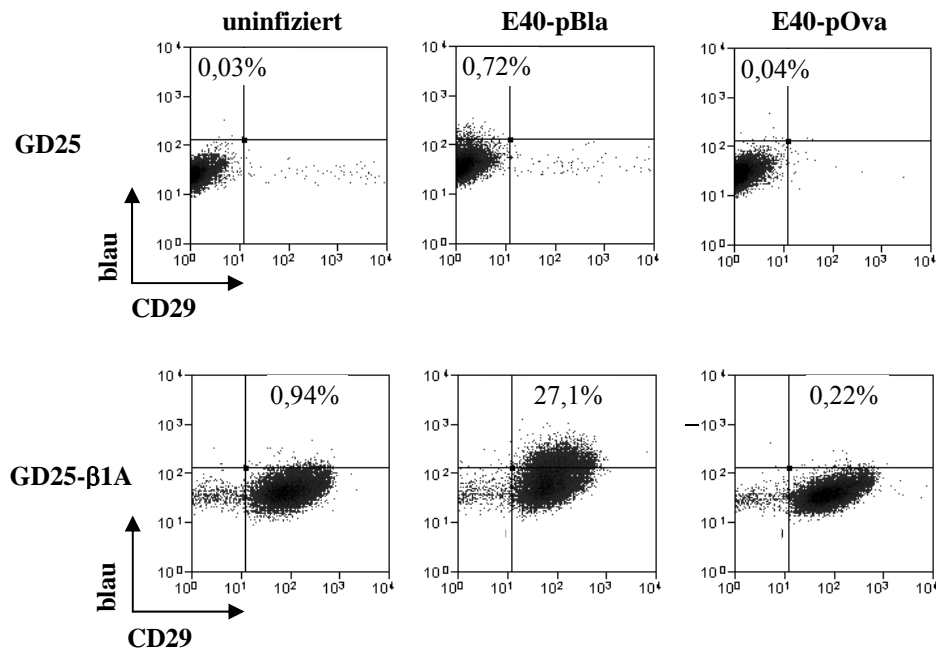


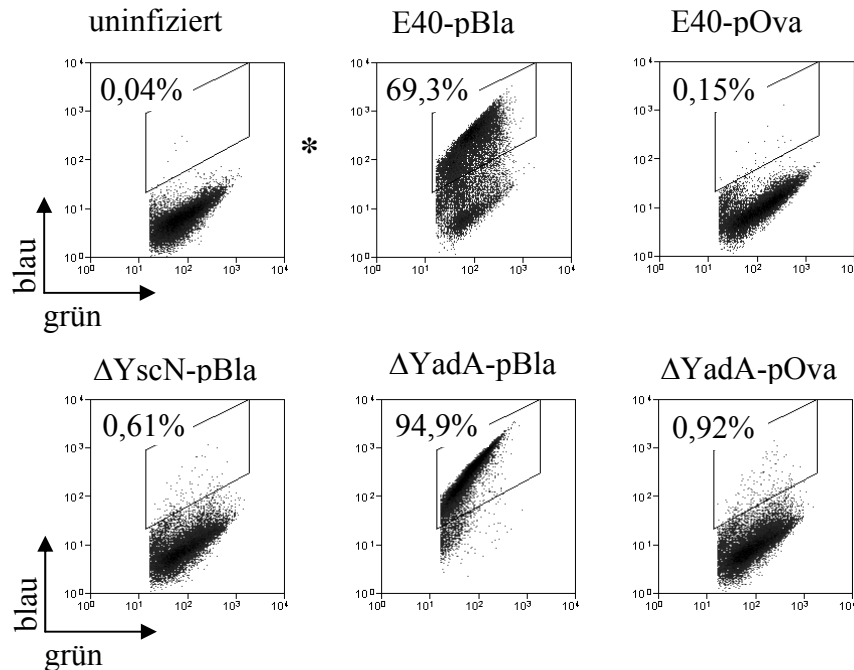
Abbildung 29: Infektion von GD25 und GD25- $\beta$ 1A Fibroblasten mit E40-pBla und E40-pOva (MOI 50, 1h). Durchflusszytometrische Analyse der CCF4-AM und anti-CD29 (APC) gefärbten Zellen.

### 3.7.3 Infektion von Milzzellen aus der C57BL/6 Maus

Das Bla Reportersystem wurde erfolgreich zur Detektion von Yop Translokation bei der Infektion immortalisierter Zelllinien verwendet. Als nächster Schritt wurde die Eignung bei der Infektion primärer Leukozyten untersucht. Neben der prinzipiellen Machbarkeit der

Untersuchung der Yop Translokation sollte auch geklärt werden, welche Mindest-MOI erforderlich ist, um Yop Translokation beobachten zu können und ob *ex vivo* Yop Translokation bevorzugt in bestimmte Zelltypen stattfindet.

**A**



**B**

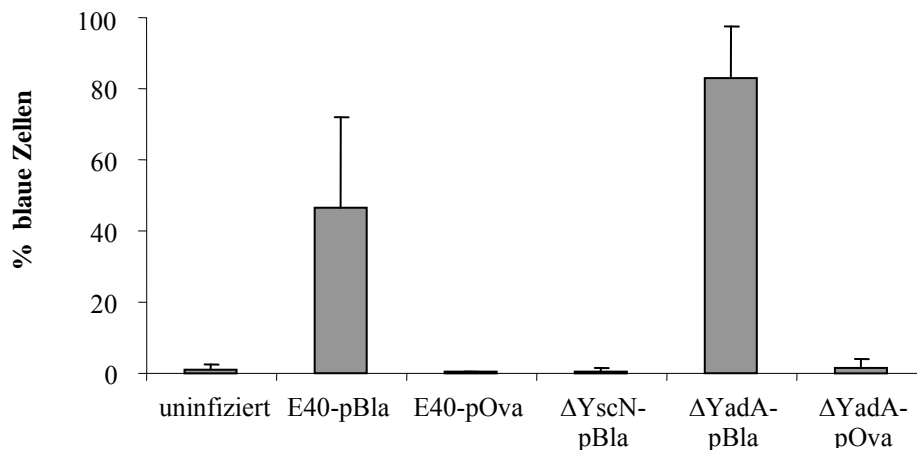


Abbildung 30: Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils blauer Zellen nach Infektion primärer C57BL/6 Milzzellen mit einer MOI von 50 für eine Stunde mit den angegebenen *Y. enterocolitica* E40 Stämmen. A: Auftrag der grünen Fluoreszenz des ungespaltenen Farbstoffs gegen die blaue Fluoreszenz des umgesetzten Farbstoffs eines repräsentativen Experiments. B: Zusammenfassung aller Experimente. Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied zu E40-pOva an ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

Die Milzzellen wurden für eine Stunde mit einer MOI von 50 mit den Stämmen E40-pBla, E40-pOva,  $\Delta$ YscN-pBla,  $\Delta$ YadA-pBla und  $\Delta$ YadA-pOva infiziert. Analog zum Ergebnis der Infektion von HeLa Zellen wurden unter 2,5% blaue Milzzellen bei uninfizierten oder mit den Kontrollstämmen E40-pOva,  $\Delta$ YscN-pBla oder  $\Delta$ YadA-pOva infizierten Zellen gemessen. Dagegen führte E40-pBla Infektion zu 31% und  $\Delta$ YadA-pBla zu 69% Zellen mit nachweisbarer Bla Aktivität (Abb. 30).

### 3.7.3.1 Einfluss der MOI auf die Anzahl der Bla positiven Zellen

Durch *in vitro* Infektion von Milzzellen mit Bakterien im Verhältnis 0,5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 oder 100 für eine Stunde wurde für die Stämme E40-pBla und  $\Delta$ YadA-pBla die minimale Bakterienzahl pro Zelle ermittelt, bei der noch Laktamaseaktivität über dem Hintergrund (Prozent blaue Zellen nach Infektion mit E40-pOva plus dreifache Standardabweichung) von 0,9% blauen Zellen feststellbar war. Es stellte sich heraus, dass bei Infektion mit E40-pBla ab einer MOI von 5 Laktamase-Aktivität in den infizierten Zellen gemessen werden konnte, während bei Infektion mit  $\Delta$ YadA-pBla schon bei 0,5 Bakterien pro Zelle 10% blaue Zellen erhalten wurden (Abb. 31, vgl. (164)).

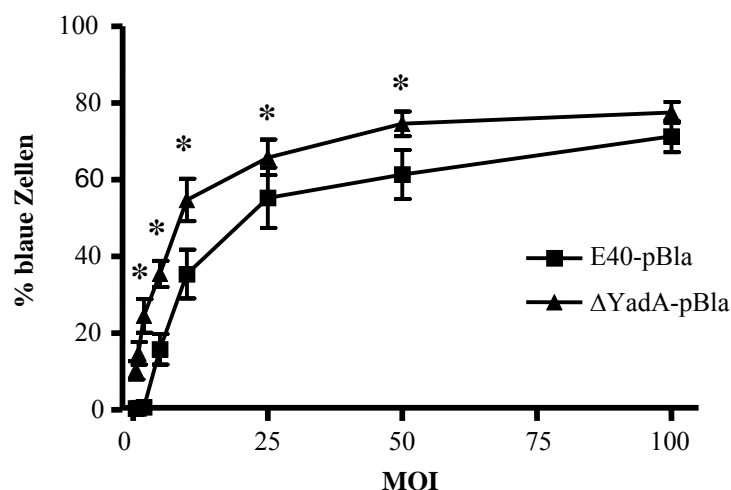


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils blauer Zellen nach Infektion primärer C57BL/6 Milzzellen mit MOIs von 0,5 bis 100 mit E40-pBla und  $\Delta$ YadA-pBla. Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied der Zahl blauer Zellen nach E40-pBla bzw.  $\Delta$ YadA-pBla Infektion an ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ).

### **3.7.3.2 Yop Translokation in verschiedene Milzzellpopulationen *in vitro***

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Yop Translokation in die verschiedenen Zellpopulationen der Milz wurden die infizierten Milzzellen vor der CCF4-AM Färbung mit APC gekoppelten Antikörpern gegen Leukozyten Oberflächenantigene markiert. Im Einzelnen erfolgte die Färbung der Phagozyten mit anti-CD11b, Makrophagen wurden mit anti-F4/80 markiert, Granulozyten mit anti-Gr1 und dendritische Zellen mit anti-CD11c. Gesamt T-Zellen wurden als CD3 positive Zellen gemessen, zusätzlich erfolgte die Analyse von CD4 positiven T-Helferzellen und CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen. B-Zellen wurden durch anti-CD19 markiert, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden als CD49b positive Zellen gemessen. Zwar wurden je nach Population zwischen 58% (CD3<sup>+</sup>) und 82% (CD19<sup>+</sup>) β-Laktamase positive Zellen gefunden (n=3), ein signifikanter Unterschied ergab sich jedoch nicht (164).

## **3.8 Etablierung des Reportersystems *in vivo***

*Y. enterocolitica* E40 besitzt eine sehr geringe Virulenz im Mausmodell, da dieser Stamm das für die Eisenaufnahme benötigte Siderophor Yersiniabactin nicht synthetisieren kann. Grund dafür ist das Fehlen der Hochpathogenitätsinsel (HPI), welche unter anderem die Gene für die Yersiniabactinsynthese enthält (64,65,210). Daher mussten die C57BL/6 Mäuse vor der Infektion mit dem Siderophor Desferrioxamin vorbehandelt werden (25).

### **3.8.1 Yop Translokation in Milzzellen von i. v. infizierten C57BL/6 Mäusen**

#### **3.8.1.1 Abhängigkeit der Zahl der Bla positiven Zellen von der Infektionsdosis**

Eine Stunde nach i. v. Verabreichung von 2,5mg Desferrioxamin wurden C57BL/6 Mäuse mit  $5 \cdot 10^1$  -  $5 \cdot 10^6$  CFU E40-pBla durch Injektion in die Schwanzvene infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die Tiere getötet und die Milzen entfernt. Die Organe wurden durch 90µm Nygonsiebe gedrückt um Einzelzellsuspensionen zu erhalten, aus denen die Keimzahl (durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen) und die Zahl der Bla positiven Zellen durch Färbung in CCF4-AM und anschließende durchflusszytometrische Analyse bestimmt wurde (Abb. 32).

Es stellte sich heraus, dass ab einer Infektionsdosis von  $5 \cdot 10^3$  Bakterien eine Keimzahl von ca.  $\log_{10} 6,5$  CFU erhalten wurde, die sich durch Erhöhung der Infektionsdosis nicht mehr steigern ließ. Das Bla Reportersystem zeigte sich als geeignetes Mittel, um auch *in vivo* Yop Translokation zu untersuchen (164). Eine Infektionsdosis von  $5 \cdot 10^3$  CFU reichte aus, damit die Zahl der blauen Zellen die Hintergrundaktivität überstieg. Im Gegensatz zur CFU in der Milz erreichte die Zahl der Bla positiven Zellen erst ab einer Dosis von  $5 \cdot 10^5$  E40-pBla ein Plateau bei ca. 3% blauen Zellen (Abb. 33).

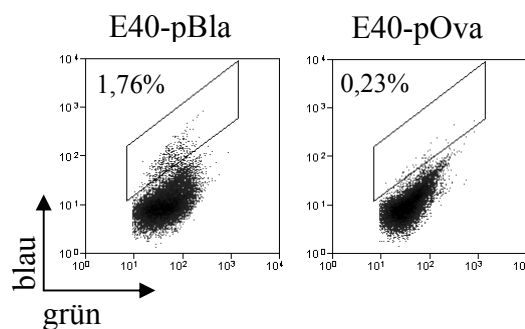


Abbildung 32: Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils blauer Zellen zwei Tage nach *i. v.* Infektion von C57BL/6 Mäusen mit  $5 \cdot 10^5$  CFU E40-pBla bzw. E40-pOva. Repräsentatives Experiment.

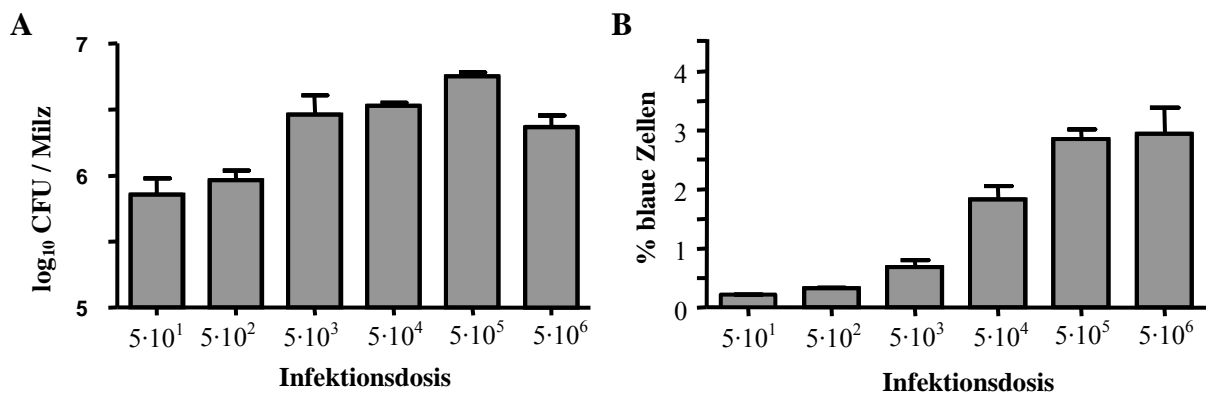


Abbildung 33: C57BL/6 Mäuse zwei Tage nach *i. v.* Infektion mit  $5 \cdot 10^5$  CFU E40-pBla mit den angegebenen Dosen ( $n = 8$ ). A: CFU in der Milz B: Bla positive Zellen in der Milz.

### 3.8.1.2 Abhängigkeit der Zahl der Bla positiven Zellen von der Infektionsdauer

Um die Keimzahl in der Milz und die Zahl der für Yop Translokation positiven Zellen in Abhängigkeit von der Infektionsdauer zu untersuchen, wurden Mäuse mit einer Dosis von  $5 \cdot 10^5$  CFU i. v. für infiziert. Die Untersuchung der Keimzahl in den nach Ende einer Infektionsdauer von sechs Stunden, einem, zwei, oder drei Tagen gewonnen Milzhomogenaten zeigte, dass einen oder zwei Tage nach Infektion eine Keimzahl von ungefähr  $\log_{10} 6,5$  in der Milz vorgefunden wird, während die Bakterienlast nach sechs Stunden oder drei Tagen deutlich niedriger ausfällt. Die Zahl der Zellen, in denen der Farbstoff umgesetzt wurde, stieg dagegen kontinuierlich bis zu einer Infektionsdauer von zwei Tagen an. Es wurden dann analog zu den Dosisuntersuchungen ca. 3% blaue Zellen erhalten. Trotz der gesunkenen Keimzahl in der Milz wurden nach drei Tagen ebenfalls ca. 3% blaue Zellen beobachtet (Abb. 34).

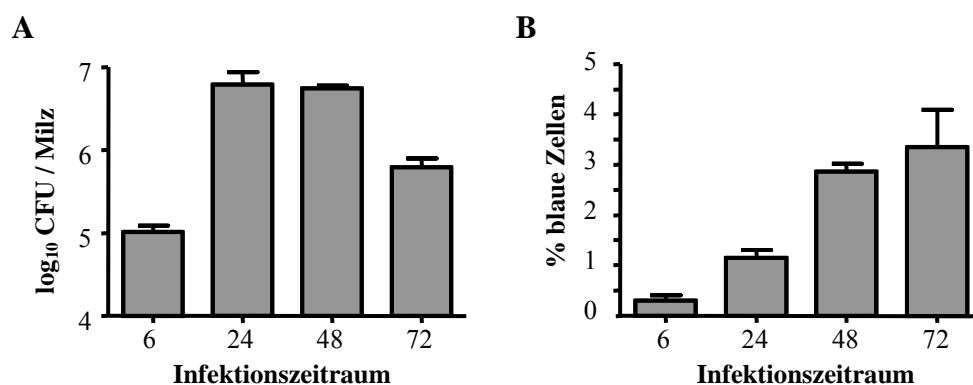


Abbildung 34: I. v. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit E40-pBla mit den angegebenen Dosen ( $n = 8$ ). A: CFU in der Milz B: Bla positive Zellen in der Milz.

Die in der infizierten Milz beobachteten Keimzahlen und Anteile blauer Zellen lassen sich durch eine sigmoidale Regression zu beschreiben. Demnach ist:  $\log_{10} \text{CFU} = 5 + 2 / (1 + e^{(1 - \% \text{ blaue Zellen}) / 0,55})$  ( $r^2 = 0,64$ ; Abb. 35).

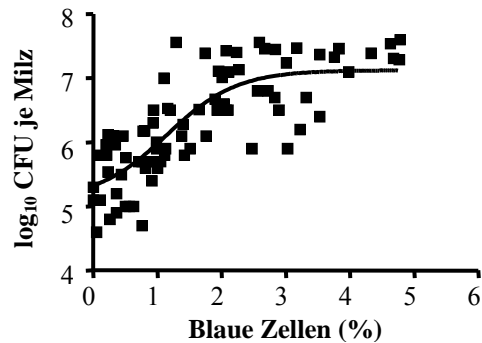


Abbildung 35: Auftrag des Anteils blauer Zellen in der Milz gegen den dekadischen Logarithmus der Keimzahl aus allen Mausinfektionen. Die Kurve zeigt eine sigmoidale Regression der Daten.

Bei den folgenden Versuchen wurde bei einer Infektionsdauer von zwei Tagen eine Infektionsdosis von  $5 \cdot 10^5$  CFU verwendet, da sich diese Vorgehensweise als optimal für den Erhalt möglichst vieler Bla positiver Zellen herausgestellt hatte.

### 3.8.1.3 Häufigkeit der Yop Translokation in die verschiedenen Zellpopulationen der Milz

Analog zur Vorgehensweise *in vitro* wurden auch Milzzellen aus infizierten C57BL/6 Mäusen mit Antikörpern gegen typische Oberflächenantigene der häufigsten Milzzellpopulationen gefärbt und danach durch CCF4-AM Färbung Yop Translokation sichtbar gemacht.

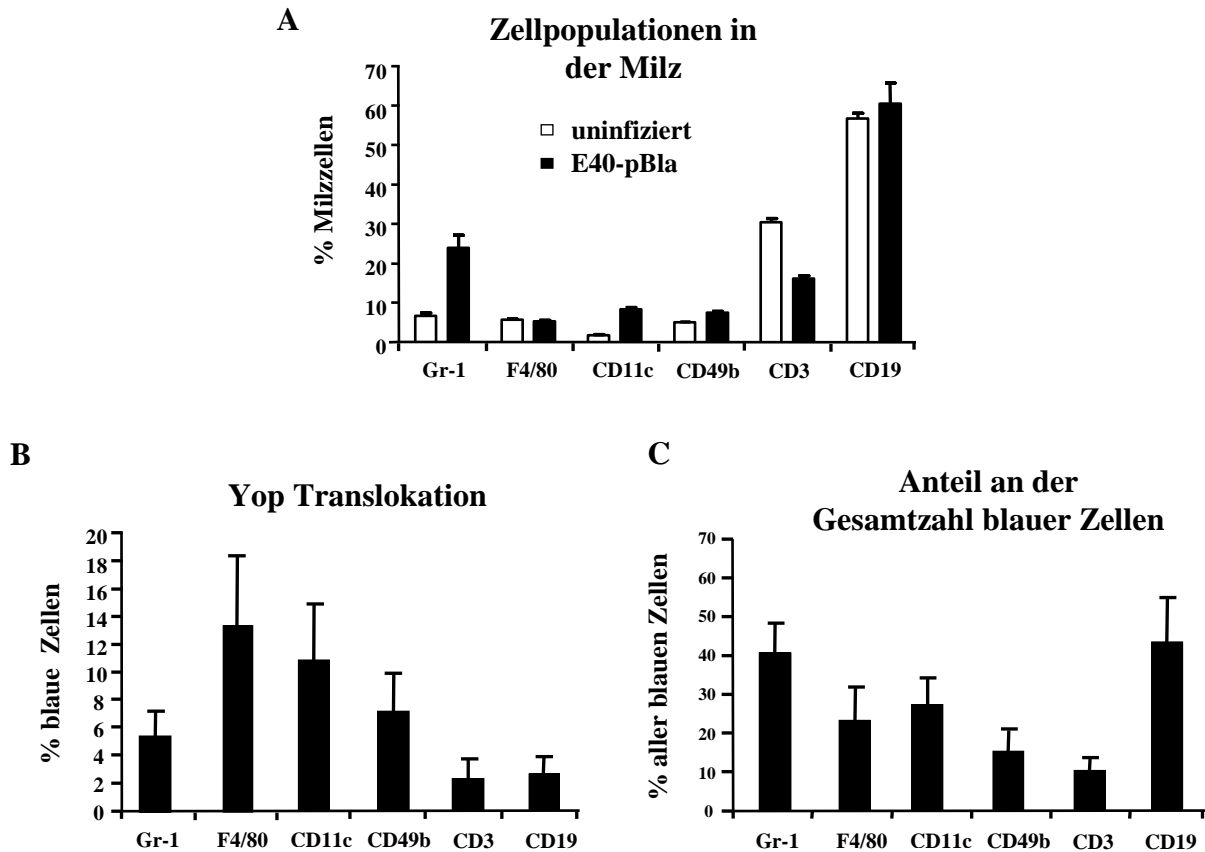


Abbildung 36: I. v. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit  $5 \cdot 10^5$  E40-pBla für zwei Tage ( $n=3$ ). A: Zellpopulationen in der infizierten Milz, B: Yop Translokation (blaue Zellen) in die einzelnen Milzzellpopulationen, C: Anteil der Milzzellpopulationen an der Gesamtzahl blauer Zellen.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass sich *in vivo* die Zahl der blauen Zellen in den verschiedenen Leukozytenpopulationen zum Teil stark unterscheidet. In der infizierten Maus fand Yop Translokation vor allem in phagozytische Zellen und NK-Zellen statt. Fünf Prozent der Granulozyten ( $Gr1^+$ ) und über 10% der Makrophagen ( $F4/80^+$ ) und dendritischen Zellen ( $CD11c^+$ ) waren Bla positiv. Dagegen fanden sich bei den T-Zellen ( $CD3^+$ ) und B-Zellen ( $CD19^+$ ) unter 2,5% blaue Zellen. Da die B-Zellen aber ungefähr die Hälfte aller Milzzellen darstellen, stellten sie zusammen mit den  $Gr1^+$  Zellen mit über 40% den größten Anteil an der Gesamtzahl der blauen Zellen (Abb. 36) (164).



### **3.8.2 Yop Translokation in der infizierten Milz ohne YadA**

Nachdem YadA bei der *in vitro* Infektion von HeLa und Milzzellen nicht notwendig war bzw. die Zahl positiver Zellen zum Teil verringerte, sollte untersucht werden, ob die Expression von YadA auch im Mausinfektionsmodell keine Notwendigkeit für die Yop Translokation besitzt.

#### **3.8.2.1 Infektion von C57BL/6 Mäusen mit $\Delta$ YadA-pBla**

Die Deletion von *YadA* bei *Y. enterocolitica* pYV<sup>+</sup> geht mit einer stark eingeschränkten Virulenz in der C57BL/6 Maus und insbesondere mit dem Verlust der Fähigkeit zur Besiedlung der Milz einher (85,227). Die E40 Mutante  $\Delta$ YadA-pBla zeigte dagegen eine im Vergleich zum Wildtyp nur mäßig verringerte Virulenz in der Maus. Durchschnittlich wurden nach Infektion mit  $5 \cdot 10^5$  CFU nach zwei Tagen  $\log_{10}$  5,2 CFU in der Milz gefunden (n = 10). Bei drei Mäusen wurde sogar eine  $\log_{10}$  CFU von 6,2 – 6,8 festgestellt und lag damit über der Mindestkeimzahl, die bei Infektion mit E40-pBla für die Messung von Bla Aktivität in Milzzellen notwendig war. Allerdings wurden bei keiner mit  $\Delta$ YadA-pBla infizierten Maus blaue Zellen in der Milz beobachtet (Abb. 37).

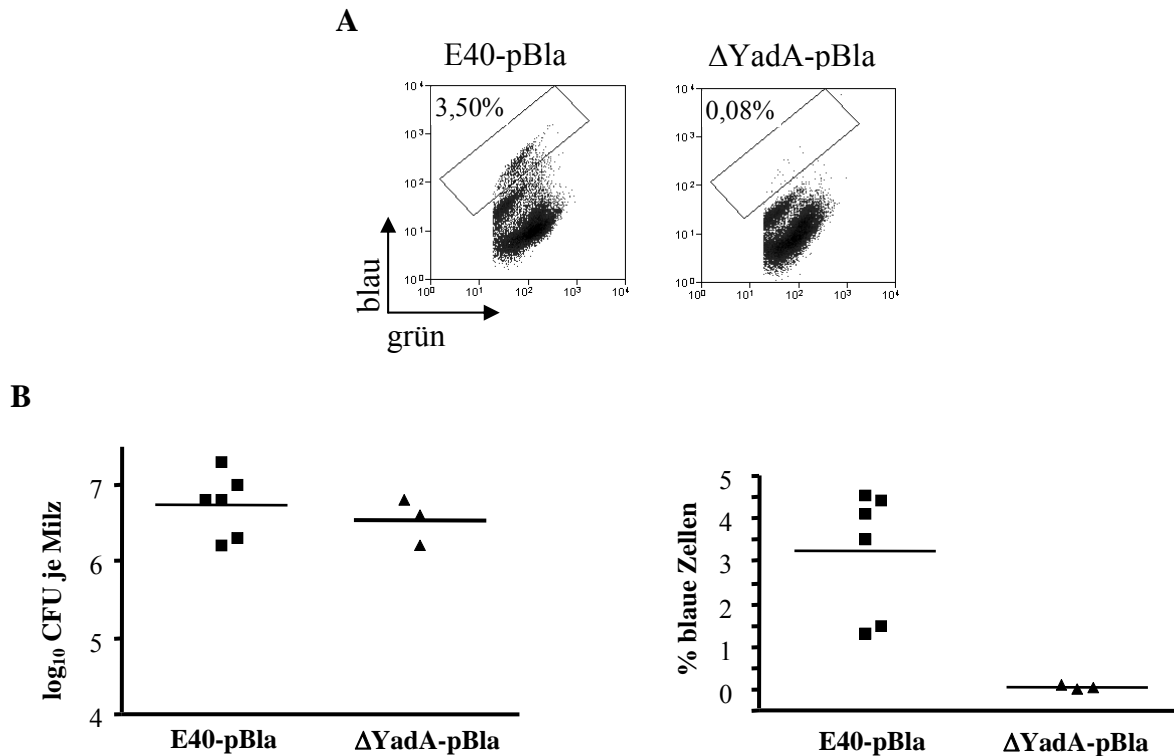


Abbildung 37: Log<sub>10</sub> CFU und Anteil blauer Zellen in der Milz zwei Tage nach i. v. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit  $5 \cdot 10^5$  CFU E40-pBla oder  $\Delta YadA$ -pBla. A: Repräsentatives Experiment. B: Übersicht ( $n = 6$ ). Aus der  $\Delta YadA$ -pBla Infektion sind ausschließlich Tiere mit zur E40-pBla vergleichbarer Keimzahl dargestellt.

### 3.8.2.2 Infektion von TLR2 und TLR4 defizienten Mäusen mit $\Delta YadA$ -pBla

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine für TLR2 und TLR4 defiziente Mauslinie mit 129Sv x C57BL/6 Hintergrund (TLR2/4<sup>-/-</sup>) ein gutes Modell für die Infektion mit pYV<sup>+</sup>  $\Delta yadA$  darstellt (Michaela Fritz, unveröffentlicht). Infektion von TLR2/4<sup>-/-</sup> Mäusen mit  $5 \cdot 10^5$  CFU E40-pBla oder  $\Delta YadA$ -pBla führte kontinuierlich zu vergleichbaren Keimzahlen über log<sub>10</sub> 6. Während mit E40-pBla bei TLR2/4<sup>-/-</sup> Infektion durchschnittlich 2% blaue Zellen erhalten wurden, konnte auch in diesem Modell keine Yop Translokation durch  $\Delta YadA$ -pBla festgestellt werden (Abb. 38).

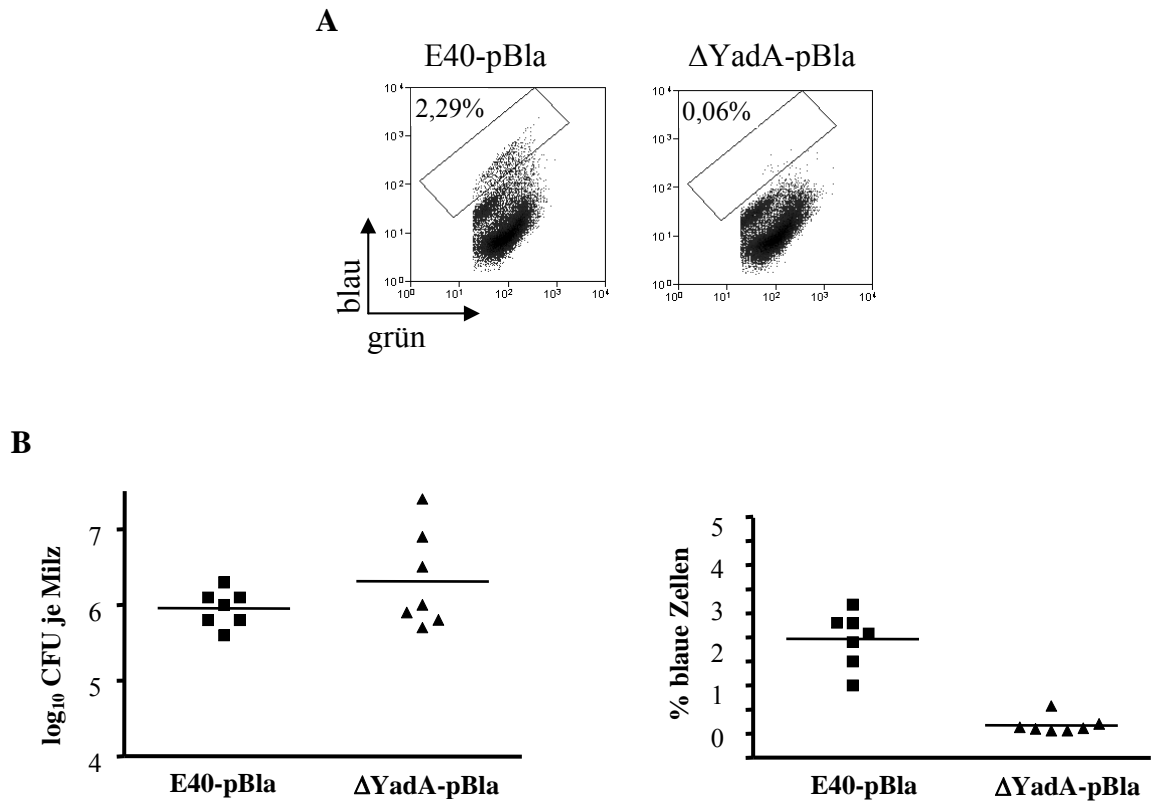


Abbildung 38: Log<sub>10</sub> CFU und Anteil blauer Zellen in der Milz zwei Tage nach i. v. Infektion von TLR2/4<sup>-/-</sup> Mäusen mit  $5 \cdot 10^5$  CFU E40-pBla oder ΔYadA-pBla. A: Repräsentatives Experiment. B: Übersicht (n = 6).

### 3.8.3 Yop Translokation nach oraler Infektion in Darmepithelzellen

Um Yop Translokation in Darmepithelzellen zu untersuchen, wurden Mäuse mit  $5 \cdot 10^8$  CFU E40-pBla oral infiziert. In den nach 2 Tagen Infektionsdauer hergestellten Epithelzellpräparationen aus dem Darm konnten aber durch durchflusszytometrische Analysen keine Zellen mit Laktamaseaktivität entdeckt werden (Abb. 39).

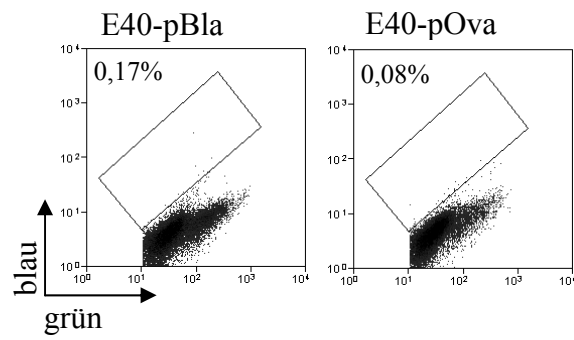


Abbildung 39: Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils blauer Darmepithelzellen zwei Tage nach oraler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit  $5 \cdot 10^8$  CFU E40-pBla bzw. E40-pOva.

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Bakterielle Infektionen induzieren proinflammatorische Genexpression**

Die Anwesenheit pathogener Bakterien im Wirtsorganismus löst auf verschiedenen Wegen proinflammatorische Antworten dessen Immunsystems aus. Pathogen assoziierte Molekülmuster (PAMP) werden von Pathogen Erkennungsrezeptoren (PRR) erkannt, welche über die nachfolgenden Signalwege Zytokinausschüttung, Chemotaxis, Phagozytose, Apoptose und andere Abwehrmechanismen in Gang setzen. Während Toll artige Rezeptoren (TLR) extrazelluläre PAMPs erkennen, detektieren Proteine mit Nukleotide bindender Oligomerisierungsdomäne (NOD) intrazellulär Pathogene (93,183). Bei einer *Y. enterocolitica* Infektion werden diese Signalwege außerdem durch Interaktion der Adhäsine YadA und Invasin (115) mit der extrazellulären Matrix bzw. durch direkte Interaktion ausgelöst.

### **4.2 Das Typ III Virulon schützt *Yersinia spp.* vor der proinflammatorischen Immunantwort**

Das Typ III Virulon von *Y. enterocolitica* transloziert mindestens sechs Effektor Yops in die Zellen der befallenen Wirte. Durch zahlreiche Einzeluntersuchungen zu den Wirkmechanismen der einzelnen Effektoren (74,292) sowie durch Erstellung des Genexpressionsprofils infizierter HeLa Zellen (48) konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität und Viabilität von Zellen des Immunsystems durch die Aktivitäten der einzelnen Yops stark beeinträchtigt wird, proinflammatorische Genexpression wird effizient unterdrückt.

### 4.3 *Yersinia enterocolitica* induziert die Expression von GILZ, einem Vermittler antiinflammatorischer Signaltransduktion

In den Genexpressionsanalysen infizierter HeLa Zellen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Expression einiger weniger Gene hochreguliert wird, darunter die Transkriptionsregulatoren *rhoB*, *krüppel like factor 2* und *GILZ* (48). Insbesondere *GILZ* wurde als entzündungshemmender und antiapoptotischer Modulator beschrieben (Abb. 40) (28). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Induktion von *GILZ* die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch Epithelzellen hemmen und so einen Immunevasionsmechanismus darstellen könnte. Daher wurde die *GILZ* Induktion durch *Y. enterocolitica* in HeLa Zellen genaueren Untersuchungen unterzogen.

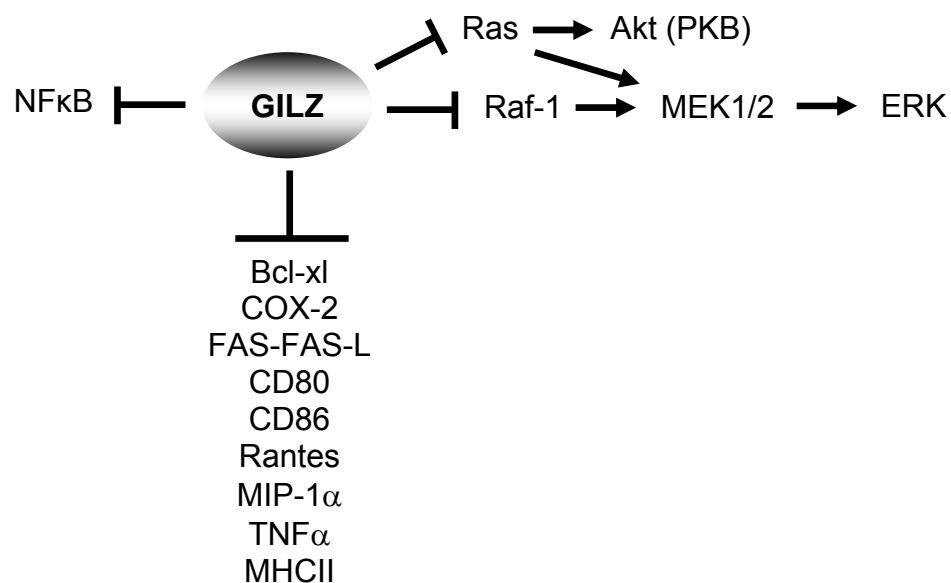


Abbildung 40: Schematische Darstellung der *GILZ* vermittelten immunsuppressiv-antiinflammatorischen und antiapoptotischen Effekte. Direkte Interaktion konnte mit Ras, Raf und NFκB gezeigt werden (nach (28))

### 4.3.1 Ursache der GILZ Induktion in HeLa Zellen durch *Y. enterocolitica*

#### 4.3.1.1 Die GILZ Induktion erfolgt durch die Cysteinprotease-Aktivität von YopT

In weiteren Vorarbeiten konnte die gesteigerte *GILZ* mRNA Expression durch Infektion mit dem Patientenisolat pYV<sup>+</sup> durch quantitative RT-PCR bestätigt werden. Auch konnte durch Immunoblot von immunpräzipitiertem GILZ aus den Lysaten infizierter HeLa Zellen gezeigt werden, dass analog die GILZ Proteinexpression zunahm (104). In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Ergebnis durch den Nachweis von GILZ Protein direkt aus den Zelllysaten durch Immunoblot bestätigt werden. Da Infektion mit pYV<sup>-</sup> nicht zu GILZ Expression führte, wurde angenommen, dass GILZ durch die Aktivität eines Effektor-Yops induziert wird.

Daraufhin wurden Infektionen mit pYV<sup>+</sup> Mutanten durchgeführt, denen jeweils ein Effektor Yop fehlte. Es standen Deletionsmutanten für alle bekannten Effektor Yops außer YopO zur Verfügung. Die Infektion von HeLa Zellen mit den Stämmen  $\Delta T$ ,  $\Delta P$ ,  $\Delta E$ ,  $\Delta H$  und  $\Delta M$  (3,302,312) zeigte, dass nur YopT für die GILZ Induktion notwendig ist. Allerdings konnte durch dieses Experiment nicht ausgeschlossen werden, dass die GILZ Induktion durch YopT die Kooperation weiterer Pathogenitätsfaktoren benötigt. Es konnte aber gezeigt werden, dass zumindest kein anderes Effektor-Yop beteiligt war. Die Infektion mit pTTSS-*yopT*, einem pYV<sup>-</sup> Stamm, der mit einem Plasmid transformiert wurde welches für das Typ III Sekretionssystem und YadA kodiert (286), sowie einem weiteren Plasmid, das die YopE53-YopT und SycE Expression ermöglichte (so dass eine YopT Monosekretionsmutante erhalten wurde), war ausreichend, um GILZ Expression in HeLa Zellen zu induzieren. Dagegen waren Monosekretionsmutanten von YopE und YopO, den beiden anderen an Rho GTPasen angreifenden Effektoren (209,218) und von YopH, nicht in der Lage, GILZ zu induzieren. Da außerdem GILZ Proteinexpression durch die Überexpression von YopT nach Transfektion mit pHM6-YopT hervorgerufen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass andere Pathogenitätsfaktoren wahrscheinlich keine Rolle spielen.

YopT wurde als Cysteinprotease beschrieben (256), welche nach Translokation in die Wirtszelle die Rho GTPasen RhoA und wahrscheinlich auch Rac1 von deren Membrananker trennt, wogegen CDC42 wahrscheinlich nur in zellfreien Systemen Substrat von YopT ist (4,257). Allerdings sind von manchen Pathogenitätsfaktoren mehrere unabhängige Enzymaktivitäten bekannt. Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, ob die Cysteinprotease-Aktivität von YopT für die GILZ Induktion verantwortlich ist. Es konnte

gezeigt werden, dass Komplementierung von  $\Delta T$  mit plasmidkodiertem *yopT* die Fähigkeit zur GILZ Induktion dieses Stamms wiederherstellte. Dies war nicht der Fall, wenn stattdessen mit dem proteasedefizienten *yopTC139A* komplementiert wurde. Daraus kann gefolgert werden, dass die GILZ Induktion allein durch die Cysteinprotease-Aktivität von YopT erfolgt. Damit wurde ein neuer Effekt des *Y. enterocolitica* Pathogenitätsfaktors YopT gezeigt, der bisher nur als Phagozytose-hemmender Faktor beschrieben wurde (3,4,120). Darüber hinaus wurde hier zum ersten Mal im Detail ein möglicher Immunevasionsmechanismus untersucht, der durch die Aktivierung von Genexpression vermittelt wird.

#### **4.3.1.2 Auch das *C. difficile* Toxin B induziert GILZ**

Eine Beeinflussung der GILZ Expression durch bakterielle Pathogenitätsfaktoren wurde bisher noch nicht beschrieben. Neben den *Y. enterocolitica* Pathogenitätsfaktoren YopE, YopO und YopT sind jedoch noch weitere bakterielle Toxine bekannt, die auf verschiedene Weise Rho GTPasen inaktivieren (12). In dieser Arbeit wurden daher auch noch zwei clostridiale Toxine auf ihre Fähigkeit zur GILZ Induktion getestet. Während das C3 Toxin von *Clostridium botulinum* durch ADP-Ribosylierung die Rho-RhoGDI Bindung von RhoA/B/C stabilisiert, inaktiviert das Toxin B von *Clostridium difficile* RhoA, Rac und CDC42 durch ADP-Ribosylierung. Behandlung von HeLa Zellen mit einer endozytierbaren Form des C3 Toxins (34) und mit Toxin B zeigte, dass die Behandlung mit C3 Toxin nur eine minimale GILZ Induktion nach frühestens sechs Stunden zur Folge hatte, während Toxin B bereits nach 4 Stunden eine starke GILZ Expression hervorrief. Somit konnte gezeigt werden, dass zwei völlig unterschiedliche bakterielle Toxine mit Rho GTPasen inaktivierender Aktivität GILZ Expression induzieren können, so dass die GILZ Induktion in Epithelzellen wahrscheinlich nicht auf die *Yersinia* Infektion beschränkt ist und noch weitere bakterielle Toxine die GILZ induzieren, identifiziert werden könnten.

Es wurde jedoch auch gezeigt, dass nicht alle Toxine, die Rho GTPasen hemmen, GILZ Expression hervorrufen (YopE und YopO, C3 Toxin nur sehr schwach). Dies ließe sich zum Beispiel durch unterschiedliche Substratspezifitäten dieser Toxine innerhalb der Rho GTPasen Familie erklären. Da ein Zusammenhang zwischen der GILZ Induktion und der Aktivität bestimmter Rho GTPasen bisher nicht bekannt ist, wurden weitere Untersuchungen mit selektiven Inhibitoren durchgeführt.



#### 4.3.1.3 Untersuchung der GILZ Induktion mit Rho Inhibitoren und siRNA

Die Behandlung mit Lovastatin sollte ein gutes Mimikry der YopT Aktivität darstellen, da es ebenfalls die Isoprenylierung der Rho GTPasen verhindert, zwar nicht durch proteolytische Entfernung des Isoprenrests, aber durch Störung der Isoprenbiosynthese. Allerdings hatte die Behandlung von Zellen mit Lovastatin nicht den gleichen Effekt wie die YopT Translokation, denn sie löste keine GILZ Expression aus. Dabei konnte explizit gezeigt werden, dass Lovastatin zur Wanderung von unprenylierten Rho GTPasen in den Zellkern führt, wo sie Gentranskription beeinflussen (288), genau wie dies für YopT und Rac1 gezeigt wurde (305). Ebenfalls wurde die Induktion von RhoB durch Lovastatin gezeigt (288), wie sie auch durch das *C. difficile* Toxin A hervorgerufen wird, das nach bisherigem Kenntnisstand eine mit Toxin B identische Enzymaktivität besitzt (110).

Durch siRNA konnte Proteinexpression von RhoA, Rac1 und CDC42 spezifisch unterdrückt werden. Die fehlende Expression dieser Rho GTPasen hatte allerdings auch bei kombinierter Unterdrückung aller drei Proteine keinen Effekt. Ebenso wenig hatte die Behandlung der Zellen mit Rac Inhibitor einen GILZ induzierenden Effekt.

Da Rho GTPasen wichtige Modulatoren der Organisation des Aktin-Zytoskeletts sind (197), beeinträchtigt die Hemmung einzelner Rho GTPasen auch stets die Organisation des Zytoskeletts bzw. führt zu dessen völliger Zerstörung. Die Rho C-terminale Kinase ist ein wichtiger Effektor von RhoA und ein Vermittler des Einflusses von RhoA auf das Zytoskelett. Die Inhibition von ROCK mit Y-27632 (290) zeigte jedoch keinen Einfluss auf die GILZ Induktion. Die Nachahmung dieses Effekts durch Hemmung der Aktinpolymerisation durch Cytochalasin B oder Latrunculin B führte jedoch in beiden Fällen zu einer gesteigerten GILZ Induktion. Allerdings konnte anderweitig gezeigt werden, dass die Zerstörung des Zytoskeletts durch Cytochalasin D den GILZ Promotor nicht auf dem gleichen Weg wie Toxin B aktiviert. Es konnte auch nicht gezeigt werden, dass YopT und Toxin B den GILZ Promoter auf die gleiche Weise aktivieren (Tanja Grandl, unveröffentlicht). Dies liegt möglicherweise aber daran, dass die GILZ Induktion durch YopT wesentlich schwächer als durch Toxin B ist.

Insgesamt konnten diese Untersuchungen also keinerlei Hinweise auf zelluläre Signalwege, die zur GILZ Induktion durch YopT führen, erbringen. Sicher ist nur, dass die Inaktivierung der Rho GTPasen RhoA, Rac1 und CDC42 an sich keine GILZ induzierende Wirkung hat. Möglicherweise besitzen Toxin B und YopT ein gemeinsames Zielprotein, das bisher noch nicht als Substrat dieser Pathogenitätsfaktoren beschrieben wurde, wobei es sich dabei nicht

zwangsläufig um eine Rho GTPase handeln muss. Allerdings eröffnen die vielfältigen Möglichkeiten der Interaktion von Rho GTPasen mit Effektoren der nachgeschalteten Signalwege (251,291) und die daher ebenfalls vielfältigen Möglichkeiten der hemmenden Einflussnahme auch die Möglichkeit, dass ein bestimmter, von RhoA, Rac1 oder CDC42 abgehender, zur GILZ Induktion führender Signalweg nicht gefunden wurde.

Auch die Untersuchung der für die GILZ Induktion durch Toxin B notwendigen transaktivierenden Elemente des *GILZ* Promotors leistet in dieser Frage keine Hilfestellung. Zwar konnte gezeigt werden, dass eine kanonische E-Box essentiell für die Aktivierung des *GILZ* Promotors durch Toxin B ist und dass die Bindung dieser E-Box durch die Transkriptionsfaktoren USF-1 und USF-2 notwendig für die GILZ Expression ist. Allerdings ist die Bindung von USF-1 und USF-2 an den GILZ Promotor nicht hinreichend für dessen Aktivierung, offensichtlich sind eine Modifikation der USF Proteine oder weitere Kofaktoren dafür notwendig (112,114). Eine Induktion USF vermittelter Genaktivität durch die Hemmung von Rho GTPasen wurde bisher ebenfalls nicht beschrieben, wohl aber die Hemmung der Rekrutierung von USF-1 an den Promotor des Klasse II Transaktivators (CIITA) durch *C. difficile* Toxin A und Simvastatin (171). Daher konnten auch die vom *GILZ* Promotor ausgehenden Untersuchungen keinen Hinweis auf einen möglichen Signalweg geben, der die GILZ Induktion durch YopT oder Toxin B vermittelt.

Obwohl die Suche nach dem zellulären Aktivator der GILZ Expression vorerst erfolglos blieb, wurde so ein weiterer Weg der GILZ Induktion gefunden. Außerdem legen diese Untersuchungen zusammen mit anderen Arbeiten (110,305) nahe, dass die bloße Beschreibung von YopT und Toxin B als Rho GTPasen Inhibitoren unzureichend ist.

#### **4.3.2 YopT induziertes GILZ hat keinen Einfluss auf die proinflammatorische Genexpression**

GILZ ist ein wichtiger Modulator des antiinflammatorischen Effekts von Glukokortikoiden. Eine Hemmung der NFκB Aktivität durch GILZ wurde in T-Zellen, Makrophagen und Epithelzellen gezeigt (27,37,87). Dies geschieht direkt durch Bindung von GILZ an NFκB, was die Kerntranslokation von NFκB verhindert. Aber auch Interaktion von GILZ mit Ras und AP-1 wirkt antiinflammatorisch durch Hemmung der proinflammatorischen MAPK Signalkaskade (29,189). Daher wurde vermutet, dass auch die Induktion von GILZ durch YopT die NFκB Aktivität in infizierten Zellen senkt.

Zunächst konnte verifiziert werden, dass die Überexpression von GILZ in HeLa Zellen sowohl die basale als auch die Invasin induzierte NFκB Aktivität senkt. Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss die Deletion von YopT auf die NFκB Aktivierung durch *Y. enterocolitica* hat. Da der Einfluss durch YopP, welches die NFκB Aktivierung durch Hemmung der MAPK Aktivität (205) senkt, ausgeschaltet werden sollte, wurde für diese Experimente auf das *Y. enterocolitica* Patientenisolat E40 (269) zurückgegriffen, von dem nicht nur eine  $\Delta yopT$ , sondern auch eine  $\Delta yopP \Delta yopT$  Mutante verfügbar war. Die NFκB Aktivität (gemessen als Luziferaseaktivität des zuvor transfizierten NFκB Reporterplasmids) nach vier, sechs und acht Stunden wurde analysiert. Tatsächlich wurde zwischen der  $\Delta P$  Mutante und der  $\Delta PT$  Mutante ein größerer Unterschied in der NFκB Aktivierung beobachtet als zwischen dem E40 Wildtyp und der  $\Delta T$  Mutante. Doch die Deletion von YopT führte maximal zu einer doppelt so hohen NFκB Aktivität im Vergleich zu einem ansonsten isogenen Stamm (nach acht Stunden). Die Untersuchung von noch späteren Zeitpunkten (12h, 24h) zeigte keinen YopT Effekt auf die GILZ Expression oder auf die NFκB Aktivität (Daten nicht gezeigt). Daher muss, im Einklang mit anderen Arbeiten (294), der Einfluss von YopT auf die NFκB Aktivität in Epithelzellen, als gering angesehen werden

IL-8 ist ein durch NFκB Aktivität induziertes proinflammatorisches Zytokin, dessen Sekretion durch Interaktion von Wirtszellen mit *Y. enterocolitica* induziert wird, sofern diese Reaktion nicht durch das Yop Virulon unterdrückt wird (116,246). Wie erwartet, spiegelte die Messung der IL-8 Sekretion die beobachteten NFκB Aktivitäten wieder.

Weiterhin konnte kein Einfluss von YopT auf die NFκB Aktivität beim Vergleich des pTTSS Parentalstamms mit der YopT Monosekretionsmutanten pTTSS-*yopT* festgestellt werden. Dagegen konnte durch YopT Überexpression sowohl die basale als auch die Invasin induzierte NFκB Aktivität reduziert werden. Die zusätzliche Behandlung mit GILZ spezifischer siRNA führte jedoch nicht zu einer Wiederherstellung der NFκB Aktivität trotz YopT Präsenz, sondern senkte sowohl die basale als auch die Invasin induzierte NFκB Aktivität in YopT exprimierenden Zellen noch weiter (auch die NFκB Aktivität in Zellen, die kein YopT exprimierten, wurde gesenkt).

Zusammenfassend senkt also GILZ Überexpression die NFκB Aktivität in HeLa Zellen deutlich, während sie von YopT kaum reduziert wird und die YopT abhängige GILZ Expression keinen Beitrag dazu leistet, sondern die NFκB Aktivität im Gegenteil zu steigern scheint.

Bisher wurde bei gesteigerter GILZ Expression stets eine gesenkte NFκB Aktivität beobachtet (27,37,87). Allerdings wurden quantitative Untersuchungen stets mit GILZ überexprimierenden Zellen durchgeführt. Zwar wurde die Steigerung der GILZ Expression nicht in allen Arbeiten quantifiziert, jedoch dürfte sie ein Vielfaches über der Steigerung durch *Y. enterocolitica* gelegen haben, wo weniger als eine Verdopplung der *GILZ* mRNA Menge beobachtet wurde (104) und auch die Proteinmenge nicht in wesentlich größerem Umfang zugenommen hatte. Desweiteren entstand so der Zustand, dass die größere GILZ Proteinmenge bereits vorlag, bevor der NFκB aktivierende Stimulus einsetzte. Dies könnte von Bedeutung sein, da gezeigt wurde, dass der Invasin bzw. *Y. pseudotuberculosis* induzierte IκB Abbau spätestens eine Stunde nach Beginn der Stimulation abgeschlossen ist (246,310). In ruhenden Zellen wird NFκB durch IκB im Zytoplasma gehalten, so dass die Kerntranslokation und Transkriptionsfaktor-Aktivität gehemmt ist. Da die pYV<sup>+</sup> induzierte GILZ Expression beginnend bei zwei Stunden nach Infektion ihr Maximum vier Stunden nach Infektion erreicht, ist dies wahrscheinlich zu spät, um die Kerntranslokation von NFκB zu verhindern, egal ob dies durch direkte Interaktion (als Ersatz für IκB) geschieht oder indirekt durch die Beeinflussung der MAPK Aktivität über Ras oder AP-1. Während sich so die fehlende Hemmung der NFκB Aktivität durch YopT induziertes GILZ aufgrund des geringen Ausmaßes und des späten Zeitpunkts der Proteinexpression erklären lässt, ist völlig unklar, warum deren Unterdrückung die NFκB Aktivität sogar etwas senkt.

Es bleibt die Frage, warum das Fehlen von YopT unter bestimmten Umständen (vor allem beim Vergleich der Stämme ΔP und ΔPT) zu einer größeren NFκB Aktivität führte, obwohl das von YopT induzierte GILZ diese eher steigert. Es konnte aber gezeigt werden, dass RhoA, Rac1 und CDC42 Aktivität die Phosphorylierung und den Abbau von IκB verursachen kann, und dass TLRs Rac1 abhängig NFκB durch Phosphorylierung aktivieren (17,214). Möglicherweise werden diese Signalwege also durch den Angriff von YopT an RhoA und Rac1 beeinträchtigt. Umgekehrt wurde ebenfalls kürzlich gezeigt, dass durch die Toxin A vermittelte Hemmung von RhoB, das seinen eigenen Promotor reguliert, die Menge an aktivem RhoB letztendlich erhöht wird (110). Die so hervorgerufene Aktivierung der MAPK Kaskade dürfte sich auch in einer verstärkten NFκB Aktivität äußern.

Zusammenfassend muss also festgestellt werden, dass die YopT induzierte GILZ Expression keinerlei Verringerung der NFκB Aktivität in infizierten HeLa Zellen zur Folge hat. Dagegen konnte infektionsbedingte NFκB Aktivität sehr effizient durch GILZ Überexpression gesenkt werden. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob die auch in anderen Arbeiten nur durch GILZ

Überexpression zeigte Hemmung der NF $\kappa$ B Aktivität (27,37,87) nicht von begrenzter biologischer Relevanz ist. Zudem wird am Beispiel von YopT deutlich, dass der (zum Beispiel anti-inflammatorische) Effekt eines bakteriellen Pathogenitätsfaktors aus der Summe verschiedener und auch gegensätzlicher Wirkungen bestehen kann. Folglich kann auch vermutet werden, dass der Nettoeffekt unter anderen Bedingungen (z.B. anderer Zelltyp, Zytokinpräsenz) sehr unterschiedlich ausfallen kann. Dies liefert einen weiteren Grund, warum die Charakterisierung zellulärer Reaktionen auf eine *Y. enterocolitica* Infektion möglichst im Rahmen der Infektion eines ganzen Organismus untersucht werden sollte, wofür durch die Etablierung des Bla Reportersystems die methodischen Voraussetzungen verbessert wurden.

#### **4.4 Etablierung eines $\beta$ -Laktamase Reportersystems für Yop Translokation**

Die Translokation von Effektor-Yops durch *Y. enterocolitica* in Wirtszellen reduziert deren Fähigkeit zur Klärung der Infektion durch Phagozytosehemmung und Apoptoseinduktion, sowie durch Hemmung proinflammatorischen Signaltransduktion und Genexpression (48,75,292). Jedoch ist der direkte Nachweis von Yops in den Zielzellen (11,125) selbst bei *in vitro* Experimenten schwierig. Es wurden daher verschiedene Reportersysteme entwickelt, die einen einfacheren oder spezifischeren Nachweis translozierter Yops erlaubten (59,81,151,165,269). Diese Reportersysteme waren nützlich für bestimmte *in vitro* Versuche, vor allem für die funktionelle Untersuchung von Komponenten des Sekretions- und Translokationsapparats. Allerdings sind sie nicht geeignet, um Yop Translokation in Einzelzellen bei einer *in vivo* Infektion nachzuweisen.

Da sich aber klar gezeigt hat, dass zelluläre Vorgänge, die nach *in vitro* Infektion mit *Y. enterocolitica* beobachtet wurden, nicht unbedingt von hoher Relevanz für das Infektionsgeschehen in einem Gesamtorganismus sind (287), werden sich zukünftige Untersuchungen verstärkt mit der Wirkung von Yops in Zellen bei einer *in vivo* Infektion befassen müssen. Da aber bei der Organinfektion viele Zellen keinen Kontakt zu den Bakterien haben, ist eine Färbung notwendig, mit der sich Zellen identifizieren lassen, die Ziel von Effektor-Yops wurden. Die Möglichkeit einer solchen Färbung nach Infektion von Mäusen mit einem rekombinanten Reporterstamm, der ein Typ III sekretierbares Bla Fusionsprotein exprimiert, wurde von Marketon et al. für *Y. pestis* demonstriert (181). Dabei

wurde eine Adaption der von Charpentier et al. etablierten Methode verwendet (68), bei der die Translokation eines mit der *E. coli* TEM Laktamase gekoppelten Effektors durch CCF2-AM Färbung der infizierten Zellen nachgewiesen wird. Analog wurde auch die Effektortranslokation von *Salmonella typhimurium* untersucht (108). In dieser Arbeit wird nun eine Adaption des Reportersystems für *Y. enterocolitica* vorgestellt.

#### 4.4.1 Reporterkonstrukte und Färbung

Anders als bei bisherigen Bla Reporterstudien wurden nicht verschiedene komplette Effektoren C-terminal mit der für  $\beta$ -Laktamase kodierenden Sequenz fusioniert. Als Erkennungsdomäne für die Typ III Sekretion dienten statt dessen die N-terminalen 53 Aminosäuren von YopE O:8. Mit dieser Vorgehensweise waren in der Vergangenheit gute Erfahrungen gemacht worden sowohl mit WA-314 als auch mit E40 Stämmen (2,3,165,167). Zudem war gezeigt worden, dass YopE53 Fusionsproteine erheblich besser sekretiert werden als YopE18 oder YopE138 Fusionen (167,301). Dies liegt vermutlich daran, dass YopE53 vollkommen ausreichend für die Erkennung des Fusionsproteins als Typ III Substrat ist und andererseits die Reduktion der Größe des Gesamtproteins die Passage durch den Sekretionsapparat erleichtert. Ergänzt wurde das Konstrukt durch die für SycE kodierende Sequenz. SycE ist ein für YopE spezifisches und für dessen Sekretion notwendiges Chaperonartiges Protein (97,298). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Untersuchungen, die mittels eines YopE-CyaA Reporters durchgeführt wurden und bei denen maximale YopE-Fragment-CyaA Translokation von YopE47- bis YopE113 Fusionsproteinen festgestellt wurde (269).

Durch die Unterbringung von *sycE* auf dem Reporterplasmid sollte sichergestellt werden, dass keine Konkurrenz zwischen YopE und YopE53-Bla um SycE entsteht. Sowohl *yopE53-bla* als auch *sycE* stehen in diesem Konstrukt unter der Kontrolle ihres eigenen Promotors, so dass eine den Effektor-Yops gleiche Expression angenommen werden kann.

Das *yopE53-bla* - *sycE* Konstrukt wurde in ein pIV2 Derivat (271), das zuvor noch eine Sequenz zur Expression der L-Aspartatdehydrogenase erhalten hatte, kloniert. Das so erhaltene Reporterplasmid vermittelt *asd* defizienten *Yersinia* Stämmen die Möglichkeit zur DAP prototrophen Transaminierung der Mureinhülle, seine Retention ist daher für das Überleben der transformierten Bakterien essentiell. Damit ist sichergestellt, dass nicht ein

seltener Verlust des Reporterplasmids zu einer möglicherweise starken Expansion plasmidloser Bakterien im Mausmodell führt.

Als Kontrolle wurde ein Plasmid verwandt, welches die Expression einer YopE53-Ovalbumin247-355 Fusion ermöglichte (vgl. (164)). Alle mit dem Reporter- oder dem Kontrollplasmid transformierten Stämme wurden auf die Sekretion von YopE und der Fusionsproteine getestet. Eine Beeinträchtigung der YopE Sekretion durch die Transformation konnte nicht festgestellt werden. Es wurde allerdings eine deutlich schwächere Expression und Sekretion der Fusionsproteine beobachtet.

Zur Färbung der infizierten Zellen mit einem Bla empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff wurde statt des in den anderen Arbeiten verwendeten CCF2-AM (311) das leicht modifizierte Derivat CCF4-AM verwendet, da dieses nach Herstellerangaben einen effizienteren FRET zeigt und somit ein verbessertes Signal zu Hintergrund Verhältnis bietet. Um eine möglichst starke Färbung zur weitreichenden Erfassung von Yop-Translokation zu erhalten, wurden im Unterschied zu anderen Arbeiten auch keine reduzierten Farbstoffkonzentrationen für die durchflusszytometrische Analyse der Zellen verwendet.

## **4.4.2 Etablierung des Bla Reportersystems *in vitro***

### **4.4.2.1 Bla Aktivität nach *in vitro* Infektion in verschiedenen Zelltypen**

Infektion von HeLa- und Milzzellen, sowie von GD25- $\beta$ 1A Fibroblasten mit E40-pBla mit einer MOI von 50 für eine Stunde führte im Mittel zu ungefähr 30% blauen Zellen, während der Hintergrund, definiert durch die Anzahl der blauen Zellen in uninfizierten oder mit E40-pOva bzw. mit  $\Delta$ YscN-pBla infizierten Proben unter 2,5% blieb. Die Untersuchung der Yop Translokation in Zellen der verschiedenen Milzzellpopulationen anhand der gleichzeitigen Markierung mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker zeigte keine nennenswerten Abweichungen der Prozentsätze an blauen Zellen zwischen den verschiedenen Populationen (164). Da Yop Translokation auch in ähnlichem Maße in HeLa Zellen und Fibroblasten stattfindet, scheint das Ausmaß der Yop Translokation unabhängig vom Zelltyp zu sein. Es scheint also keine präferenzielle Translokation in bestimmte Zellen aufgrund der Expression von Oberflächenproteinen oder der extrazellulären Matrix zu geben. Umgekehrt lässt sich daher folgern, dass *in vivo* beobachtete Yop Translokation Aufschluss über die

Häufigkeit des Kontakts zwischen den infizierenden Bakterien und bestimmten Leukozytentypen gibt.

#### **4.4.2.2 Typ III Sekretion ist Bedingung für den Bla Nachweis in infizierten Zellen**

Das Typ III Translokationssystem von *Y. enterocolitica* ist Voraussetzung für den effektiven Transport von Effektor-Yops in die infizierten Zellen. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass insbesondere bei Phagozyten Yops auch auf anderen Wegen in die Zelle gelangen. Möglich wäre dies durch Phagozytose und anschließende Lyse der aufgenommenen Bakterien. Aus diesem Grund wurde bei Infektionsexperimenten *in vitro* stets auch eine sekretionsdefiziente Mutante mitgeführt, welche aber das Reporterprotein exprimiert ( $\Delta$ YscN-pBla). Die Zahl der blauen Zellen nach Infektion mit dieser Mutante hob sich nicht signifikant von der bei uninfizierten oder E40-pOva infizierten Proben ab. Es kann daher gefolgert werden, dass die Aufnahme von Yops ohne Sekretion zumindest vernachlässigbar ist. Theoretisch wäre auch die Aufnahme von eventuell ins Medium sekretierten Yops durch Pinozytose möglich. Allerdings wurde bei früheren Untersuchungen gezeigt, dass in RPMI Medium, das als Kulturmedium für *Y. enterocolitica* bei 37°C verwendet wurde, keine Yops nachgewiesen werden können (270), sondern der Kontakt zwischen Bakterien und Zellen für die Aktivierung der Typ III Sekretion notwendig ist (232).

#### **4.4.2.3 Der Anteil blauer Zellen steigt mit der MOI**

Um die Entwicklung des Anteils blauer Zellen bei Infektion mit unterschiedlichen Bakterienanzahlen zu untersuchen und eine minimale MOI bestimmen zu können, ab der die Translokation der Laktamase-Aktivität den Anteil blauer Zellen über den bei den Negativkontrollen erhaltenen Hintergrund anhebt, wurden Milzzellen mit verschiedenen MOIs (0,5 bis 100) mit E40-pBla infiziert. Dabei wurde ab einer MOI von 5 ein über dem Hintergrund liegender Anteil blauer Zellen gemessen (15%), während bei einer MOI von 100 über 70% der Zellen blau waren. Interessant ist, dass bei höheren MOIs ein „Sättigungsverhalten“ beobachtet wird, und die Zahl der blauen Zellen nur noch wenig ansteigt. Das Verhältnis von MOI zum Anteil blauer Zellen lässt sich daher gut durch eine hyperbolische Regression mit der Gleichung % blaue Zellen =  $84 \cdot \text{MOI} / (17 + \text{MOI})$  annähern ( $r^2 = 0,98$ ). Ein 50% Anteil blauer Zellen würde demnach durch eine MOI von 17



erhalten werden. Durch die Infektion mit einer MOI in diesem Sättigungsbereich (meist MOI 50 in dieser Arbeit), kann daher sichergestellt werden, dass die Anteile blauer Zellen in den verschiedenen Ansätzen nicht allzu stark durch geringfügige Schwankungen der tatsächlichen Bakterienzahl pro Zelle beeinflusst werden (vgl. (164)).

#### 4.4.2.4 Einfluss von YadA und $\beta 1$ Integrin auf die Yop Translokation

Sowohl die Bindung des *Yersinia* YadA an die ECM der Zielzellen als auch die Interaktion des Adhäsins Invasin mit deren  $\beta 1$  Integrinen gilt als notwendig für das Zustandekommen von Yop Translokation. Eine Notwendigkeit von  $\beta 1$  Integrinen für die Yop Translokation wurde aber bisher nicht experimentell belegt.

Untersuchungen mit dem CyaA Reportersystem ergaben, dass YadA für die Yop Translokation zumindest in nicht-phagozytische Zellen, wie z.B. HeLa Zellen, notwendig ist (54,270). Unsere Untersuchungen mit dem Bla Reportersystem zeigten jedoch Yop Translokation durch den Stamm  $\Delta$ YadA-pBla sowohl in HeLa als auch in Milzzellen. Insbesondere bei Infektion mit niedrigeren MOIs konnte sogar ein größerer Anteil blauer Zellen als bei Infektion mit E40-pBla festgestellt werden. Die hyperbolische Regression für Korrelation des Anteils blauer Zellen mit der MOI bei Infektion von Milzzellen mit  $\Delta$ YadA-pBla hat die Formel  $\% \text{ blaue Zellen} = 81 \cdot \text{MOI} / (5 + \text{MOI})$  annähern ( $r^2 = 0,98$ ), d.h. 50% blaue Zellen werden bereits mit einer MOI von 5 erreicht. Ferner konnten schon bei einer MOI von 0,5 ein Anteil von 10% blauen Zellen beobachtet werden.

Die Diskrepanz zwischen unseren und den z.B. mit dem CyaA Reportersystem gemachten Beobachtungen kann durch die Verwendung verschiedener *Y. enterocolitica* Stämme (E40 bzw. W22703) verursacht worden sein. Alternativ könnten die unterschiedlichen Ergebnisse auch durch die verschiedene Nachweismethodik bedingt sein, mit der letztendlich andere Messgrößen analysiert werden. Mit dem Bla Reportersystem wird die Zahl der betroffenen Zellen quantifiziert, in denen sich das Reporterenzym nachweisen lässt, während mit dem CyaA Reportersystem die Aktivität des Reporterenzym in den Lysaten der infizierten Zellen bestimmt wird. Daher kann mit diesem keine Aussage über die Zahl der betroffenen Zellen gemacht werden, dagegen aber die Menge des insgesamt translozierten Reporters bestimmt werden. Die Hypothese, dass die Menge des translozierten Reporters bei *in vitro* Infektion mit einer  $\Delta$ yadA Mutante geringer sein könnte als bei Infektion mit dem entsprechenden Wildtyp, während die Zahl der betroffenen Zellen größer ist, wird durch eigene unveröffentlichte

Ergebnisse unterstützt: Immunoblots von HeLa Zellen infiziert mit pYV<sup>+</sup> bzw. dem daraus hervorgegangenen  $\Delta yadA$  Stamm (pYV-A-0, (220)) zeigten eine größere Menge YopE in Lysaten von pYV<sup>+</sup> Zellen als in Lysaten von Zellen nach pYV-A-0 Infektion.

Die Untersuchungen mit dem YopE-CyaA Reporter zeigten auch eine deutlich reduzierte Reporteraktivität bei Infektion mit einer Invasin defizienten Mutante (270). Sowohl die Invasin- als auch die YadA vermittelte Adhäsion an Wirtszellen ist direkt (Invasin) bzw. indirekt (YadA) von der Expression von  $\beta_1$  Integrin abhängig. Daher sollte die Abhängigkeit der Yop Translokation von der  $\beta_1$  Integrin Expression direkt untersucht werden.

Infektion der  $\beta_1$  Integrin defizienten GD25 Fibroblasten bzw. der daraus hervorgegangenen, stabil mit  $\beta_1$  Integrin transfizierten GD25- $\beta_{1A}$  Zellen zeigte, dass die Expression von  $\beta_1$  Integrin durch die infizierten Zellen von entscheidender Bedeutung für die Zahl der Zellen mit nachweisbarer Bla Aktivität ist. Bei E40-pBla infizierten GD25 Fibroblasten wurden unter den gleichen Infektionsbedingungen 98% weniger blaue Zellen beobachtet als bei der GD25- $\beta_{1A}$  Zelllinie.

### **4.4.3 Etablierung des Bla Reportersystems *in vivo***

#### **4.4.3.1 Das Bla Reportersystem zeigt Yop Translokation durch *Y. enterocolitica* im Mausinfektionsmodell**

Aufgrund der geringen Virulenz von *Y. enterocolitica* E40 im Mausinfektionsmodell, hauptsächlich verursacht durch das Fehlen der Fähigkeit zur Synthese des zur Eisenaufnahme wichtigen Siderophors Yersiniabactin (64,65,210), mussten die Tiere vor der Infektion mit dem Siderophor Desferrioxamin vorbehandelt werden (25). Desferrioxamin ermöglicht aber nicht nur die Eisenversorgung der Bakterien, sondern vermindert auch die Sekretion zahlreicher Zytokine durch Makrophagen (25). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass es gewisse Abweichungen zum Infektionsgeschehen von Yersiniabactin produzierenden Stämmen gibt. Langfristig könnte Abhilfe durch Transfer der für die Yersiniabactin Synthese notwendigen Genregion in den E40 Reporterstamm geschaffen werden (210).

#### **4.4.3.2 Keimzahl und blaue Zellen bei verschiedenen Infektionsdosen und -dauern**

Nachdem erste Infektionsexperimente mit  $5 \cdot 10^5$  E40-pBla bzw.  $5 \cdot 10^5$  E40-pOva i. v. gezeigt hatten, dass sich bei Infektion mit E40-pBla eine Bla positive Milzzellpopulation darstellen lässt, wurde systematisch nach Infektionsbedingungen gesucht, bei denen Yop Translokation in möglichst viele Wirtszellen beobachtbar war.

Nach intravenöser Infektion von C57BL/6 Mäusen mit  $5 \cdot 10^1$  -  $5 \cdot 10^6$  CFU E40-pBla wurde in Einzelzellsuspensionen aus der Milz der Anteil der blauen Zellen und die Keimzahl bestimmt. Dabei wurden ab einer Dosis von  $5 \cdot 10^3$  E40-pBla eine Keimzahl von ca.  $\log_{10}$  6,5 CFU erhalten und blaue Zellen beobachtet, bei Dosen  $5 \cdot 10^5$  und  $5 \cdot 10^6$  E40-pBla wurden jeweils ca. 3% blaue Zellen erhalten. Dies zeigt, dass eine Infektionsdosis von mindestens 5000 Bakterien notwendig ist, um blaue Zellen zu erhalten, und die Betrachtung aller Infektionsversuche zeigt, dass ca.  $\log_{10}$  6 Bakterien in der Milz vorhanden sein müssen. Dennoch ist eine Korrelation zwischen der Keimzahl in der Milz und der Zahl der blauen Zellen schwierig, da je nach den gewählten Infektionsbedingungen die gleiche Zahl blauer Zellen bei um den Faktor 100 schwankenden Keimzahlen gefunden wurde oder umgekehrt, bei der gleichen Keimzahl um den Faktor 4 schwankende Anteile blauer Zellen.

Zur Bestimmung der optimalen Infektionsdauer wurde mit  $5 \cdot 10^5$  Bakterien infiziert. Während sechs Stunden nach Infektion nur  $\log_{10}$  5 CFU bestimmt und keine blauen Zellen beobachtet wurden, führten nach einem bzw. zwei Tagen  $\log_{10}$  6,5 Bakterien zu 1% bzw. 3% blauen Zellen. Am Tag drei sank die Keimzahl wieder ab, während die Zahl blauer Zellen konstant blieb. Auch bei den verschiedenen Infektionsdauern ist daher eine genaue Korrelation zwischen Bakterienlast in der Milz und der beobachteten Yop Translokation nicht möglich.

#### **4.4.3.3 Phagozyten in der Milz sind nach i.v. Infektion überproportional stark von Yop Translokation betroffen**

Für die Bestimmung der Yop Translokation in die verschiedenen Zellpopulationen der Milz wurde aufgrund dieser Ergebnisse die Infektion mit  $5 \cdot 10^5$  E40-pBla für zwei Tage beibehalten. Erwartungsgemäß wurde in der Milz nach Infektion eine Einwanderung von GR1<sup>+</sup> Granulozyten, CD11c<sup>+</sup> dendritischen Zellen und CD49b<sup>+</sup> natürlichen Killerzellen beobachtet, während der Anteil der CD3<sup>+</sup> T-Zellen an der Gesamtzellzahl zurückging. Diese eingewanderten Zellen und F4/80<sup>+</sup> Makrophagen waren auch das Hauptziel der Yop

Translokation durch E40-pBla, während CD19<sup>+</sup> B-Zellen und T-Zellen verhältnismäßig wenig betroffen waren. Betrachtet man die Beiträge der verschiedenen Milzzellpopulationen zur Gesamtzahl blauer Zellen, so stellen Gr1<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen die größten Anteile (letztere vor allem aufgrund ihrer großen Zahl in der Milz) während die anderen Phagozyten im Mittelfeld liegen und CD3<sup>+</sup> Zellen das Schlusslicht bilden, da sie sowohl in kleiner Zahl vorliegen als auch seltener das Ziel von Yop Translokation werden als andere Zellen (164).

Dass Yop Translokation im Mausmodell bevorzugt in Phagozyten stattfindet zeigt, dass diese Zellen auch den häufigsten Kontakt zu den infizierten Yersinien haben, da wie in den *in vitro* Versuchen gezeigt werden konnte, Yop Translokation nicht bevorzugt in bestimmte Zellen stattfindet. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die bei systemischer *Y. enterocolitica* Infektion entstehenden Abszesse vor allem durch einwandernde neutrophile Granulozyten gebildet werden (66).

Die Yop Translokation in B-Zellen ist möglicherweise durch die Abszessbildung in B-Zell-Arealen der Milz bedingt. Es ist allerdings auffällig, dass bei der Untersuchung der Yop Translokation in die verschiedenen Milzzellpopulationen durch *Y. pestis* keine Yop Translokation in B-Zellen gefunden wurde, obwohl *in vitro* Translokation in einem zu anderen Zelltypen vergleichbaren Ausmaß stattfand (181). Dies muss nicht zwangsläufig bedeuten, dass bei einer *Y. pestis* Infektion in der Milz keine Yop Translokation in B-Zellen stattfindet. Es ist ebenso möglich, dass aufgrund einer höheren Zytotoxizität der Effektoren (möglicherweise auch wegen der Verwendung einer anderen Mauslinie) keine vitalen B-Zellen, die Ziel von Yop Translokation waren, analysiert werden konnten. Auch könnten unterschiedliche Auswertungen der durchflusszytometrischen Analyse den Vergleich der beiden Untersuchungen erschweren. Andererseits wurde bei Untersuchung der Effektor-Translokation von *S. typhimurium* in Milzzellen infizierter Mäuse keine Bla Aktivität in F4/80<sup>+</sup> Makrophagen gefunden (108), ebenfalls ohne dass Präferenzen bei der Effektor-Translokation in isolierte Milzzellen auftraten. Allerdings muss auch bei diesem Vergleich berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Analysemethoden ein Grund für die beobachteten Unterschiede sein könnten. Auch dendritische Zellen mit Effektortranslokation stellen bei *S. typhimurium* Infektion einen vergleichsweise geringen Anteil an der Gesamtzahl blauer Zellen (ca. 2%, *Y. enterocolitica* / *pestis* : über 15%). Sehr stark von der *S. typhimurium* Effektortranslokation waren hingegen Gr-1<sup>+</sup> Zellen betroffen (über 70%, *Y. enterocolitica* / *pestis* : ca. 12% / 40% Anteil an der Gesamtzahl positiver Zellen) welche am wenigsten Effektortranslokation durch *Y. pestis* erlitten, während der Anteil der B-Zellen mit

9% zwischen den bei *Y. enterocolitica* und *Y. pestis* gefundenen Werten liegt. Der Anteil der T-Zellen an den Zellen mit Bla Aktivität war bei allen Untersuchungen gering.

#### **4.4.3.4 YadA ist notwendig für die Beobachtung von Yop Translokation im Mausmodell**

Das TAA Adhäsion YadA ist wichtig für die Virulenz von *Y. enterocolitica* im Mausinfektionsmodell (85,211,227). Bisher wurde angenommen, dass der Beitrag von YadA zur Virulenz zum Teil in der Förderung oder sogar Ermöglichung der Yop Translokation besteht (54,131,158,270). Jedoch zeigten die *in vitro* Versuche mit dem Bla Reportersystem keine Notwendigkeit der YadA Expression für die Effektor-Translokation in HeLa oder Milzzellen. Daher sollte durch Mausinfektionen mit  $\Delta$ YadA-pBla geklärt werden, ob YadA auch *in vivo* für die Yop Translokation entbehrlich ist.

Wahrscheinlich aufgrund der Desferrioxamin Konditionierung wurden bei Infektion von C57BL/6 Mäusen mit  $5 \cdot 10^5$   $\Delta$ YadA-pBla i.v. relativ hohe Keimzahlen in der Milz nach zwei Tagen erreicht (durchschnittlich  $\log_{10}$  5,2 CFU). Bei drei Tieren wurden sogar über  $\log_{10}$  6,2 CFU erreicht. Damit war eine Bakterienlast erreicht, die bei Infektion mit E40-pBla zu messbarer Bla Aktivität in den Milzzellen führte. Allerdings konnten in keinem Fall nach  $\Delta$ YadA-pBla Infektion blaue Zellen aus der Milz erhalten werden. Auch eine wesentliche Erhöhung der Infektionsdosis war nicht möglich, da diese zum Tod der Tiere einen Tag nach Infektion führte. Deshalb wurden zusätzliche Infektionen im TLR2/4<sup>-/-</sup> Mausmodell durchgeführt. In diesem konnten bei gleicher Infektionsdosis sowohl mit E40-pBla als auch mit  $\Delta$ YadA-pBla stabil über  $\log_{10}$  6 erhalten werden. Während die Infektion mit E40-pBla auch in diesem Modell zur Detektion von Bla Aktivität in Milzzellen führt, konnten bei Infektion mit  $\Delta$ YadA-pBla keine blauen Zellen nachgewiesen werden. Demnach war YadA *in vivo* für Yop Translokation in die verschiedenen Milzzellpopulationen essentiell.

Eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen könnte der Beitrag von YadA zur Autoagglutination von *Y. enterocolitica* sein (121,158). Bei *in vitro* Infektion von Einzelschichten liegen die Bakterien unabhängig von der Expression von Adhäsinen lose auf den Zellen verteilt vor. Bei systemischer Mausinfektion mit Patientenisolaten werden dagegen in Abszessen lokalisierte, dichtgepackte Bakterienansammlungen gefunden. Untersuchungen mit dreidimensionalen Kollagengelen zeigten, dass pYV<sup>+</sup> Yersinien im Gel ihre Mobilität verlieren und dichtgepackte

Mikrokolonien bilden. Dagegen bleiben pYV<sup>-</sup> oder *yadA* defiziente Bakterien mobil und bilden lose, weiträumig verteilte Bakterienansammlungen (102). Jedoch konnte Autoagglutination von pYV-A-0 gezeigt werden, und histologische Untersuchungen von Milzpräparaten nach  $\Delta$ YadA-pBla Infektion zeigten analog zur Wildtypinfektion eine räumliche Konzentration des Bakterienauftretens, allerdings mit stark unterschiedlicher Morphologie (Michaela Fritz, Monika Schütz unveröffentlichte Ergebnisse).

Bei Infektion mit einem Wildtypstamm wird eine verhältnismäßig kleine Zahl von Zellen mit sehr vielen Bakterien konfrontiert. Diese werden daher Ziel vielfacher Effektor-Translokation. Dies wiederum könnte dazu führen, dass genügend  $\beta$ -Laktamase Aktivität in diese Zellen gelangt, um einen späteren Nachweis zu ermöglichen. Dagegen würde eine zumindest lockerere Packung der  $\Delta$ YadA-pBla Yersinien dazu führen, dass eine größere Anzahl an Zellen mit etwas weniger Bakterien konfrontiert wäre, so dass die translozierte Bla Aktivität auf Einzelzellebene unter der Nachweisgrenze bliebe. Unklar wäre aber zunächst weiterhin, ob die Translokation der für die Immunevasion nötigen Effektormenge mit der nachweisbaren Bla Aktivität korreliert.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass durch die Zentrifugation der Bakterien auf die Zellen *in vitro*, Yop Translokation auch bei geringerer Bindungsfähigkeit der Bakterien möglich ist, während *in vivo* ohne diese Hilfestellung und durch die vermutlich bessere dreidimensionale Mobilität der Zellen, getrieben durch chemotaktische Reize, die Adhäsionsfähigkeit von Bakterien ohne YadA nicht mehr ausreichend ist.

#### **4.4.4 Anwendbarkeit des Bla Reportersystems für weitere Untersuchungen**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit dem Bla Reportersystem eine nützliche Methodik zum Nachweis von Yop Translokation durch *Y. enterocolitica in vitro* und *in vivo* etabliert wurde so wie es kürzlich auch von *Y. pestis*, *S. typhimurium* und *E. coli* (nur *in vitro*) berichtet wurde (68,108,181). Damit war es zum ersten Mal möglich, Yop Translokation bei einer Yersiniose im Mausmodell auf Einzelzellebene zu untersuchen. Auch künftig kann dieses Reportersystem bei vielen Fragestellungen eingesetzt werden, die der Untersuchung des Einflusses von Virulenzfaktoren auf die Yop Translokation oder der detaillierteren Bestimmung der unter verschiedenen Bedingungen betroffenen Zelltypen dienen.

Nachteilig ist, dass Yop Translokation *in vivo* nur bei einer sehr hohen Bakterienlast beobachtet werden kann und die Tiere zuvor mit Desferrioxamin konditioniert werden müssen. Da bisher nur Einzelzellschichten vitaler Zellen angefärbt werden konnten und in Gewebeschnitten schwerlich zwischen in den Bakterien und in den Wirtszellen präserter Bla Aktivität unterschieden werden kann, ist eine Anwendung zur histologischen Untersuchung bisher nicht möglich.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

*Yersinia enterocolitica* ist durch die Expression zahlreicher Pathogenitätsfaktoren in der Lage, systemische Infektionen zu verursachen. Von zentraler Bedeutung scheint dabei insbesondere das auf dem Virulenzplasmid (pYV) kodierte Yop Virulon zu sein, das aus einem Typ III Sekretionssystem und *yersinia outer proteins* (Yops) besteht. Bisher sind sechs Effektor Yops bekannt, die zahlreiche Immunevasionsmechanismen vermitteln.

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie die Expression des *glucocorticoid induced leucine zipper* (GILZ) Proteins in Epithelzellen durch *Y. enterocolitica* induziert wird und ob dies einen möglichen neuen Immunevasionsmechanismus darstellen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteaseaktivität von YopT, welche zur Abspaltung des Isoprenrestes von Rho GTPasen führt, notwendig und hinreichend für die GILZ Induktion in infizierten HeLa Zellen war. Eine Identifikation des verantwortlichen YopT Substrats und des weiterführenden Signalwegs gelang nicht, da verschiedene Inhibitoren von Rho GTPasen oder die Unterdrückung der Proteinexpression von RhoA, Rac1 und Cdc42 nicht zu GILZ Expression führten. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch das *C. difficile* Toxin B, welches Rho GTPasen UDP-glykosyliert, die Expression von GILZ auslöste. Auch die Behandlung von HeLa Zellen mit Inhibitoren der Aktin-Polymerisation hatte diesen Effekt.

Im Einklang mit anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von GILZ zu einer deutlichen Hemmung konstitutiver und Invasin stimulierter Genexpressionsaktivität führte, die durch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor*  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) vermittelt wird. Allerdings konnte kaum ein Beitrag von YopT an der Hemmung der NF $\kappa$ B Aktivität und der daraus resultierenden Interleukin-8 Sekretion festgestellt werden. Insbesondere wurde bei Infektion mit einem Stamm, der YopT als einzigen Typ III Effektor exprimierte, keine reduzierte NF $\kappa$ B Aktivität im Vergleich zu einem Stamm ohne Typ III Effektoren beobachtet. Zudem führte die Unterdrückung der GILZ Expression nicht zu einer Aufhebung des YopT Effekts, sondern zu einer verstärkten Hemmung der NF $\kappa$ B Aktivität. YopT induzierte GILZ Induktion führt also nicht zur Hemmung proinflammatorischer Genexpression durch Senkung der NF $\kappa$ B Aktivität.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals am Beispiel von *Y. enterocolitica* YopT und *C. difficile* Toxin B die Induktion der GILZ Expression durch bakterielle Pathogenitätsfaktoren die Rho GTPasen inaktivieren, gezeigt werden. Ferner wurde



demonstriert, dass starke GILZ Expression in Epithelzellen die NF $\kappa$ B abhängige proinflammatorische Gentranskription senkt. Diese Effekte wurden jedoch nicht durch die weniger starke GILZ Expression hervorgerufen, die von den bakteriellen Toxinen induziert wurde.

Um ein besseres Verständnis der Yop Translokation im Mausmodell zu erhalten, wurde analog zu entsprechenden Arbeiten mit anderen Pathogenen ein  $\beta$ -Laktamase (Bla) Reportersystem für *Y. enterocolitica* entwickelt. Dazu wurde ein modifiziertes Patientenisolat mit einem für ein YopE53-Bla Fusionsprotein kodierenden Plasmid transformiert, so dass ein Reporterstamm erhalten wurde. Nach Infektion von HeLa Zellen, Fibroblasten und Milzzellen zeigten Färbungen mit dem Bla sensiblen Farbstoff CCF4-AM Bla Aktivität in Zellen, die mit dem Reporterstamm infiziert wurden. Dagegen wurde die Färbung nicht oder kaum durch Infektion mit Stämmen beeinflusst, die statt dessen ein YopE53-Ovalbuminfragment translozierten oder YopE53-Bla exprimierten aber sekretionsdefizient waren. Die Zahl der Bla positiven (blauen) Zellen stieg an, wenn mit höherer Bakterienzahl (MOI) infiziert wurde. Der Zusammenhang zwischen MOI und der Zahl blauer Zellen konnte durch eine hyperbolische Regression beschrieben werden. Die Infektion mit einem  $\Delta$ YadA Reporterstamm, bei dem das pYV kodierte Adhäsin YadA deletiert wurde, zeigte, dass YadA nicht notwendig ist, um *in vitro* Yop Translokation auf Einzelzellebene zu beobachten. Vor allen bei geringen MOIs wurde sogar eine höhere Zahl positiver Zellen beobachtet. Dagegen zeigte die Infektion von GD25 bzw. GD25 $\beta_{1A}$  Fibroblasten, dass die Expression von  $\beta_1$ -Integrin beinahe essentiell für den Nachweis blauer Zellen war. Bei Infektion von Milzzellen konnte keine präferenzielle Yop Injektion in eine der untersuchten Leukozytenpopulationen festgestellt werden.

Auch im C57BL/6 Mausmodell konnte nach *i. v.* Infektion Yop Translokation durch *Y. enterocolitica* mit dem Bla Reportersystem beobachtet werden. Der Anteil blauer Zellen in der Milz variierte je nach Infektionsdosis und Infektionsdauer. Der Zusammenhang zwischen der Keimzahl des Reporterstamms in der Milz und der Zahl blauer Zellen kann durch eine sigmoidale Regression beschrieben werden. Nach *i. v.* Infektion wurde bei den Phagozytenpopulationen ein deutlich höherer Anteil blauer Zellen gefunden als bei CD19<sup>+</sup> B-Zellen und CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Die Analyse der Beiträge der einzelnen Zellpopulationen zur Gesamtzahl blauer Zellen zeigte, dass die meisten blauen Zellen CD19<sup>+</sup> B-Zellen oder Gr1<sup>+</sup> Granulozyten waren. Im Gegensatz zur *in vitro* Infektion konnte keine Yop Translokation nach Infektion mit dem  $\Delta$ YadA Reporterstamm beobachtet werden.

Zusammengefasst wurde mit diesem Projekt ein Bla Reportersystem etabliert, das geeignet ist um Yop Translokation durch *Y. enterocolitica* *in vitro* und *in vivo* nachzuweisen. Die Zahl der positiven Zellen korrelierte stets mit der MOI bzw. der Keimzahl in der Milz wobei sich die Zahl positiver Zellen bei hohen MOIs bzw. Keimzahlen kaum noch erhöhte, so dass der Zusammenhang näherungsweise durch eine durch eine hyperbolische oder sigmoidale Regression beschrieben werden konnte. Während *in vitro* Yop Translokation in gleichem Ausmaß in alle untersuchten Milzzelltypen stattfand und zwar die Expression von  $\beta_1$ -Integrin durch die infizierten Zellen aber nicht von YadA durch die Bakterien zur Voraussetzung hatte, fand *in vivo* Yop Translokation präferenziell in Phagozyten statt und konnte nicht bei Infektion mit einer *yadA* Deletionsmutante beobachtet werden.

## 6 ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
AA	Acrylamid
<i>a. bidest.</i>	<i>aqua bidestillata</i>
<i>a. dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BA	Bisacrylamid
BHI	<i>brain heart infusion</i>
Bla	β-Laktamase
C	Cytosin
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
CCF4	FRET Laktamase Substrat
CCF4-AM	FRET Laktamase Substrat, veresterte Form
CD	<i>cluster of differenciation</i>
CDC42	<i>cell division cycle 42</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
Cre	<i>causes recombination</i> (Bakteriophage P1 Rekombinase)
CyaA	<i>Bordetella pertussis</i> Adenylatcyclase
CytD	Cytochalasin D
DAP	m-Diaminopimelinsäure
DC	Dendritische Zelle
Dex	Dexamethason
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles medium</i>
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	<i>desoxy nucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol, Threo 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
ECL	<i>enhanced chemo luminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,N'-Tetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FHRE	<i>forkhead responsive element</i>
FKS	fötales Kälberserum
FoxO3	<i>forkhead box O3</i>
FRET	Fluoreszenz Energie Resonanz Transfers
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAP	GTPase aktivierendes Protein

GEF	<i>Guanin nucleotide exchange factors</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GILZ	<i>glucocorticoid induced leucine zipper</i>
GPCR	G Protein gekoppelter Rezeptor
GRE	<i>glucocorticoid response element</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
IVC	<i>individually ventilated cage</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
LatB	Latrunculin B
LB	Luria Bertani (Medium)
log <sub>10</sub>	dekadischer Logarithmus
Lova	Lovastatin
LPA	Lysophosphatidylsäure
MAPK	<i>p38 mitogen activated protein kinase</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
M-Zelle	<i>microfold-Zelle</i>
Nal <sup>R</sup>	Nalidixin-Resistenz
Neo <sup>R</sup>	Neomycin-Resistenz
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
OCA	<i>oligomeric coiled coils adhesin</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
ori	<i>origin of replication</i>
PI	Propidiumiodid
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
PAGE	<i>polyacrylamid gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>pYV</i>	<i>plasmid Yersinia virulence</i>
RacI	NSC23766
RhoA	<i>ras homolog gene family A</i>
Rho-GDI	<i>Rho GDP dissociation inhibitor</i>
ROCKI	Y-27632
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium-dodecylsulfate</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
Spec <sup>R</sup>	Spectinomycin-Resistenz
Syc	<i>specific yop chaperone</i>
T	Thymidin
T4	<i>T4 Bacteriophage</i>
TAA	trimäres Autotransporter Adhäsion
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

TCA	<i>Tri-Chlorine acidic Acid</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>toll like receptor</i>
TTSS	Typ III Sekretionssystem
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTSS	<i>type three secretion system</i>
UV	UltraViolet
v/v	Volumen pro Volumen
Vis	<i>visible</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
Y.	<i>Yersinia</i>
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
Ysc	Yop Sekretionssystem

### Einheiten und Größenordnungen

Å	Angström
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
g	Gram
h	Stunden
kb	Basenpaare x 1000
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	milli
μ	mikro
M	Mol/l <sup>-1</sup> , molar
min	Minuten
n	nano
p	pico
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunden
U	<i>units</i>

## 7 LITERATUR

1. **Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, and E. Carniel.** 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:14043-14048.
2. **Adkins, I., M. Koberle, S. Grobner, S. E. Autenrieth, E. Bohn, S. Borgmann, and I. B. Autenrieth.** 2008. *Y. enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells. *Microbes. Infect.* **10**:798-806.
3. **Adkins, I., M. Koberle, S. Grobner, E. Bohn, I. B. Autenrieth, and S. Borgmann.** 2007. *Yersinia* outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. *Int. J. Med. Microbiol.* ..
4. **Aepfelbacher, M., C. Trasak, G. Wilharm, A. Wiedemann, K. Trulzsch, K. Krauss, P. Gierschik, and J. Heesemann.** 2003. Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J. Biol. Chem.* **278**:33217-33223.
5. **Agrain, C., I. Callebaut, L. Journet, I. Sorg, C. Paroz, L. J. Mota, and G. R. Cornelis.** 2005. Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **56**:54-67.
6. **Agrain, C., I. Sorg, C. Paroz, and G. R. Cornelis.** 2005. Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. *Mol. Microbiol.* **57**:1415-1427.
7. **Aho, K., P. Ahvonen, A. Lassus, K. Sievers, and A. Tiilikainen.** 1974. HL-A 27 in reactive arthritis. A study of *Yersinia* arthritis and Reiter's disease. *Arthritis Rheum.* **17**:521-526.
8. **Ahvonen, P., K. Sievers, and K. Aho.** 1969. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *Acta Rheumatol. Scand.* **15**:232-253.
9. **Aili, M., E. L. Isaksson, S. E. Carlsson, H. Wolf-Watz, R. Rosqvist, and M. S. Francis.** 2008. Regulation of *Yersinia* Yop-effector delivery by translocated YopE. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**:183-192.
10. **Aili, M., E. L. Isaksson, B. Hallberg, H. Wolf-Watz, and R. Rosqvist.** 2006. Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Cell Microbiol.* **8**:1020-1033.
11. **Aili, M., M. Telepnev, B. Hallberg, H. Wolf-Watz, and R. Rosqvist.** 2003. In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity. *Microb. Pathog.* **34**:297-308.
12. **Aktorries, K. and J. T. Barbieri.** 2005. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:397-410.

13. **Allaoui, A., R. Schulte, and G. R. Cornelis.** 1995. Mutational analysis of the *Yersinia enterocolitica* virC operon: characterization of yscE, F, G, I, J, K required for Yop secretion and yscH encoding YopR. *Mol. Microbiol.* **18**:343-355.
14. **Allaoui, A., S. Woestyn, C. Sluiter, and G. R. Cornelis.** 1994. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J. Bacteriol.* **176**:4534-4542.
15. **Alto, N. M., F. Shao, C. S. Lazar, R. L. Brost, G. Chua, S. Mattoo, S. A. McMahon, P. Ghosh, T. R. Hughes, C. Boone, and J. E. Dixon.** 2006. Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell.* **124**:133-145.
16. **Andor, A., K. Trulzsch, M. Essler, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, J. Heesemann, and M. Aepfelbacher.** 2001. YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol.* **3**:301-310.
17. **Arbibe, L., J. P. Mira, N. Teusch, L. Kline, M. Guha, N. Mackman, P. J. Godowski, R. J. Ulevitch, and U. G. Knaus.** 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* **1**:533-540.
18. **Arencibia, I., N. C. Suarez, H. Wolf-Watz, and K. G. Sundqvist.** 1997. *Yersinia* invasin, a bacterial beta1-integrin ligand, is a potent inducer of lymphocyte motility and migration to collagen type IV and fibronectin. *J. Immunol.* **159**:1853-1859.
19. **Asselin-Labat, M. L., A. Biola-Vidamment, S. Kerbrat, M. Lombes, J. Bertoglio, and M. Pallardy.** 2005. FoxO3 mediates antagonistic effects of Glucocorticoids and Interleukin-2 on GILZ expression. *Mol. Endocrinol.*
20. **Asselin-Labat, M. L., M. David, A. Biola-Vidamment, D. Lecoeuche, M. C. Zennaro, J. Bertoglio, and M. Pallardy.** 2004. GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* **104**:215-223.
21. **Auerbuch, V. and R. R. Isberg.** 2007. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice occurs independently of Toll-like receptor 2 expression and induction of interleukin 10. *Infect. Immun.* ..
22. **Autenrieth, I. B., E. Bohn, J. H. Ewald, and J. Heesemann.** 1995. Deferoxamine B but not deferoxamine G1 inhibits cytokine production in murine bone marrow macrophages. *J Infect Dis* **172**:490-496.
23. **Autenrieth, I. B. and R. Firsching.** 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol* **44**:285-294.
24. **Autenrieth, I. B. and J. Heesemann.** 1992. In vivo neutralization of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma abrogates resistance to *Yersinia enterocolitica* in mice. *Med Microbiol Immunol* **181**:333-338.
25. **Autenrieth, I. B., R. Reissbrodt, E. Saken, R. Berner, U. Vogel, W. Rabsch, and J. Heesemann.** 1994. Desferrioxamine-promoted virulence of *Yersinia enterocolitica* in

- mice depends on both desferrioxamine type and mouse strain. *J Infect Dis* **169**:562-567.
26. **Autenrieth, S. E., I. Soldanova, R. Rosemann, D. Gunst, N. Zahir, M. Kracht, K. Ruckdeschel, H. Wagner, S. Borgmann, and I. B. Autenrieth.** 2007. *Yersinia enterocolitica* YopP inhibits MAP kinase-mediated antigen uptake in dendritic cells. *Cell Microbiol.* **9**:425-437.
  27. **Ayroldi, E., G. Migliorati, S. Bruscoli, C. Marchetti, O. Zollo, L. Cannarile, F. D'Adamio, and C. Riccardi.** 2001. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* **98**:743-753.
  28. **Ayroldi, E. and C. Riccardi.** 2009. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J.*
  29. **Ayroldi, E., O. Zollo, A. Bastianelli, C. Marchetti, M. Agostini, V. R. Di, and C. Riccardi.** 2007. GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J. Clin. Invest.* **117**:1605-1615.
  30. **Ayroldi, E., O. Zollo, A. Macchiarulo, B. Di Marco, C. Marchetti, and C. Riccardi.** 2002. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol. Cell Biol.* **22**:7929-7941.
  31. **Aznar, S. and J. C. Lacal.** 2001. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett.* **165**:1-10.
  32. **Barenkamp, S. J. and G. J. St, III.** 1996. Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* **19**:1215-1223.
  33. **Barnes, P. D., M. A. Bergman, J. Meccas, and R. R. Isberg.** 2006. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *J. Exp. Med.* **203**:1591-1601.
  34. **Barth, H., F. Hofmann, C. Olenik, I. Just, and K. Aktories.** 1998. The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect. Immun.* **66**:1364-1369.
  35. **Barz, C., T. N. Abahji, K. Trulzsch, and J. Heesemann.** 2000. The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* **482**:139-143.
  36. **Bergman, T., K. Erickson, E. Galyov, C. Persson, and H. Wolf-Watz.** 1994. The *lcrB* (*yscN/U*) gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in Yop secretion and shows high homology to the *spa* gene clusters of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**:2619-2626.
  37. **Berrebi, D., S. Bruscoli, N. Cohen, A. Foussat, G. Migliorati, L. Bouchet-Delbos, M. C. Maillot, A. Portier, J. Couderc, P. Galanaud, M. Peuchmaur, C. Riccardi, and D. Emilie.** 2003. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by



macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* **101**:729-738.

38. **Bhattacharya, M., A. V. Babwah, and S. S. Ferguson.** 2004. Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **32**:1040-1044.
39. **Biedzka-Sarek, M., R. Venho, and M. Skurnik.** 2005. Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect. Immun.* **73**:2232-2244.
40. **Biedzka-Sarek, M., R. Venho, and M. Skurnik.** 2005. Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect. Immun.* **73**:2232-2244.
41. **Birnboim, H. C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* **7**:1513-1523.
42. **Birtalan, S. and P. Ghosh.** 2001. Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nat. Struct. Biol.* **8**:974-978.
43. **Bishop, A. L. and A. Hall.** 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348 Pt 2**:241-55.:241-255.
44. **Black, D. S. and J. B. Bliska.** 1997. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J.* **16**:2730-2744.
45. **Black, D. S. and J. B. Bliska.** 2000. The RhoGAP activity of the *Yersinia* pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol. Microbiol.* **37**:515-527.
46. **Bliska, J. B. and D. S. Black.** 1995. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia* pseudotuberculosis tyrosine phosphatase. *Infect. Immun.* **63**:681-685.
47. **Bliska, J. B. and S. Falkow.** 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:3561-3565.
48. **Bohn, E., S. Muller, J. Lauber, R. Geffers, N. Speer, C. Spieth, J. Krejci, B. Manncke, J. Buer, A. Zell, and I. B. Autenrieth.** 2004. Gene expression patterns of epithelial cells modulated by pathogenicity factors of *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol.* **6**:129-141.
49. **Boland, A. and G. R. Cornelis.** 1998. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect Immun.* **66**:1878-1884.
50. **Boland, A., M. P. Sory, M. Iriarte, C. Kerbouch, P. Wattiau, and G. R. Cornelis.** 1996. Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J.* **15**:5191-5201.

51. **Boshart, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen, and H. H. zur.** 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* **3**:1151-1157.
52. **Bottone, E. J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:257-276.
53. **Bouza, E., A. Dominguez, M. Meseguer, L. Buzon, D. Boixeda, M. J. Reville, L. de Rafael, and J. Martinez Beltran.** 1980. *Yersinia enterocolitica* Septicemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **74**:404-409.
54. **Boyd, A. P., N. Grosdent, S. Totemeyer, C. Geuijen, S. Bleves, M. Iriarte, I. Lambermont, J. N. Octave, and G. R. Cornelis.** 2000. *Yersinia enterocolitica* can deliver Yop proteins into a wide range of cell types: development of a delivery system for heterologous proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **79**:659-671.
55. **Boyer, H. W. and D. Roulland Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol. Biol.* **41**:459-472.
56. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
57. **Brenner, D. J.** 1979. Speciation in *Yersinia*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **5**:33-43.
58. **Brett, S. J., A. V. Mazurov, I. G. Charles, and J. P. Tite.** 1993. The invasin protein of *Yersinia* spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins. *Eur. J. Immunol.* **23**:1608-1614.
59. **Briones, G., D. Hofreuter, and J. E. Galan.** 2006. Cre reporter system to monitor the translocation of type III secreted proteins into host cells. *Infect. Immun.* **74**:1084-1090.
60. **Burghout, P., B. R. van, G. P. Van, P. Ringler, S. A. Muller, J. Tommassen, and M. Koster.** 2004. Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **186**:4645-4654.
61. **Bustelo, X. R., V. Sauzeau, and I. M. Berenjano.** 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays.* **29**:356-370.
62. **Cambronne, E. D., J. A. Sorg, and O. Schneewind.** 2004. Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector yop expression in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **186**:829-841.
63. **Cannarile, L., O. Zollo, F. D'Adamio, E. Ayroldi, C. Marchetti, A. Tabilio, S. Bruscoli, and C. Riccardi.** 2001. Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell Death. Differ.* **8**:201-203.
64. **Carniel, E.** 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes. Infect.* **3**:561-569.

65. **Carniel, E., O. Mercereau Puijalon, and S. Bonnefoy.** 1989. The gene coding for the 190,000-dalton iron-regulated protein of *Yersinia* species is present only in the highly pathogenic strains. *Infect Immun* **57**:1211-1217.
66. **Carter, P. B.** 1975. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect. Immun.* **11**:164-170.
67. **Chain, P. S., E. Carniel, F. W. Larimer, J. Lamerdin, P. O. Stoutland, W. M. Regala, A. M. Georgescu, L. M. Vergez, M. L. Land, V. L. Motin, R. R. Brubaker, J. Fowler, J. Hinnebusch, M. Marceau, C. Medigue, M. Simonet, V. Chenal-Francois, B. Souza, D. Dacheux, J. M. Elliott, A. Derbise, L. J. Hauser, and E. Garcia.** 2004. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:13826-13831.
68. **Charpentier, X. and E. Oswald.** 2004. 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.* **186**:5486-5495.
69. **China, B., M. P. Sory, B. T. N'Guyen, M. de Bruyere, and G. R. Cornelis.** 1993. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect. Immun.* **61**:3129-3136.
70. **Choudhury, D., A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, and S. D. Knight.** 1999. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* **285**:1061-1066.
71. **Cohen, N., E. Mouly, H. Hamdi, M. C. Maillot, M. Pallardy, V. Godot, F. Capel, A. Balian, S. Naveau, P. Galanaud, F. M. Lemoine, and D. Emilie.** 2006. GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood.* **107**:2037-2044.
72. **Compton, S. J. and C. G. Jones.** 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151**:369-374.
73. **Cooper, T. G.** 1981. *Biochemische Arbeitsmethoden.*
74. **Cornelis, G. R.** 2002. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* **158**:401-408.
75. **Cornelis, G. R.** 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:742-752.
76. **Cornelis, G. R.** 1998. The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.* **180**:5495-5504.
77. **Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory, and I. Stainier.** 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol Biol. Rev* **62**:1315-1352.
78. **D'Adamio, F., O. Zollo, R. Moraca, E. Ayroldi, S. Bruscoli, A. Bartoli, L. Cannarile, G. Migliorati, and C. Riccardi.** 1997. A new dexamethasone-induced

gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity*. **7**:803-812.

79. **Darwin, A. J. and V. L. Miller.** 1999. Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **32**:51-62.
80. **Davis, A. J. and J. Mecsas.** 2007. Mutations in the *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion system needle protein, YscF, that specifically abrogate effector translocation into host cells. *J. Bacteriol.* **189**:83-97.
81. **Day, J. B., F. Ferracci, and G. V. Plano.** 2003. 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.* **47**:807-823.
82. **Delor, I. and G. R. Cornelis.** 1992. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* **60**:4269-4277.
83. **Denecker, G., W. Declercq, C. A. Geuijen, A. Boland, R. Benabdillah, M. van Gorp, M. P. Sory, P. Vandenabeele, and G. R. Cornelis.** 2001. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J. Biol. Chem.* **276**:19706-19714.
84. **Dequeker, J., R. Jamar, and M. Walravens.** 1980. HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Rheumatol.* **7**:706-710.
85. **Di Genaro, M. S., M. Waidmann, U. Kramer, N. Hitziger, E. Bohn, and I. B. Autenrieth.** 2003. Attenuated *Yersinia enterocolitica* mutant strains exhibit differential virulence in cytokine-deficient mice: implications for the development of novel live carrier vaccines. *Infect. Immun.* **71**:1804-1812.
86. **Di, M. B., M. Massetti, S. Bruscoli, A. Macchiarulo, V. R. Di, E. Velardi, V. Donato, G. Migliorati, and C. Riccardi.** 2007. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* **35**:517-528.
87. **Eddleston, J., J. Herschbach, A. L. Wagelie-Steffen, S. C. Christiansen, and B. L. Zuraw.** 2007. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**:115-122.
88. **Edqvist, P. J., M. Aili, J. Liu, and M. S. Francis.** 2007. Minimal YopB and YopD translocator secretion by *Yersinia* is sufficient for Yop-effector delivery into target cells. *Microbes. Infect.* **9**:224-233.
89. **Edqvist, P. J., J. Olsson, M. Lavander, L. Sundberg, A. Forsberg, H. Wolf-Watz, and S. A. Lloyd.** 2003. YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J. Bacteriol.* **185**:2259-2266.
90. **Ellison, D. W., B. Young, K. Nelson, and V. L. Miller.** 2003. YmoA negatively regulates expression of invasin from *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **185**:7153-7159.

91. **Emody, L., J. Heesemann, H. Wolf Watz, M. Skurnik, G. Kapperud, P. O'Toole, and T. Wadstrom.** 1989. Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol.* **171**:6674-6679.
92. **Ennis, E., R. R. Isberg, and Y. Shimizu.** 1993. Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial beta 1 integrin ligand invasin. *J. Exp. Med.* **177**:207-212.
93. **Espinosa, A. and J. R. Alfano.** 2004. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell Microbiol.* **6**:1027-1040.
94. **Evdokimov, A. G., J. E. Tropea, K. M. Routzahn, and D. S. Waugh.** 2002. Crystal structure of the *Yersinia pestis* GTPase activator YopE. *Protein Sci.* **11**:401-408.
95. **Falker, S., M. A. Schmidt, and G. Heusipp.** 2006. Altered Ca(2+) regulation of Yop secretion in *Yersinia enterocolitica* after DNA adenine methyltransferase overproduction is mediated by Clp-dependent degradation of LcrG. *J. Bacteriol.* **188**:7072-7081.
96. **Fassler, R., M. Pfaff, J. Murphy, A. A. Noegel, S. Johansson, R. Timpl, and R. Albrecht.** 1995. 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.* **128**:979-988.
97. **Feldman, M. F., S. Muller, E. Wuest, and G. R. Cornelis.** 2002. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol. Microbiol.* **46**:1183-1197.
98. **Ferber, D. M. and R. R. Brubaker.** 1981. Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **31**:839-841.
99. **Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **391**:806-811.
100. **Flügel, A., H. Schulze-Koops, J. Heesemann, K. Kühn, H. Sorokin, K. Burkhardt, A. von der Mark, and F. Emmrich.** 1994. Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, Laminin-1 and -2, and Nidogen/Entactin. *J. Biol. Chem.* **269**:29732-29738.
101. **Foultier, B. and G. R. Cornelis.** 2003. DNA sequence and analysis of the pYVa127/90 virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* strain A127/90. *Res. Microbiol.* **154**:553-557.
102. **Freund, S., B. Czech, K. Trulzsch, N. Ackermann, and J. Heesemann.** 2008. Unusual, virulence plasmid-dependent growth behavior of *Yersinia enterocolitica* in three-dimensional collagen gels. *J. Bacteriol.* **190**:4111-4120.

103. **Fueller, F., M. O. Bergo, S. G. Young, K. Aktories, and G. Schmidt.** 2006. Endoproteolytic processing of RhoA by Rce1 is required for the cleavage of RhoA by *Yersinia enterocolitica* outer protein T. *Infect. Immun.* **74**:1712-1717.
104. **Gaentzsch, P. C.** 2003. Die Inhibition von NF- $\kappa$ B durch *Yersinia enterocolitica* YopT - ein neuer Virulenzmechanismus dieses Erregers? Diplomarbeit Universitätsklinikum Tübingen .
105. **Galan, J. E. and A. Collmer.** 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**:1322-1328.
106. **Galyov, E. E., S. Hakansson, A. Forsberg, and H. Wolf-Watz.** 1993. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**:730-732.
107. **Gao, Y., J. B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng, and Y. Zheng.** 2004. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:7618-7623.
108. **Geddes, K., F. Cruz, and F. Heffron.** 2007. Analysis of cells targeted by *Salmonella* type III secretion in vivo. *PLoS. Pathog.* **3**:e196.
109. **Genth, H., R. Gerhard, A. Maeda, M. Amano, K. Kaibuchi, K. Aktories, and I. Just.** 2003. Entrapment of Rho ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J. Biol. Chem.* **278**:28523-28527.
110. **Gerhard, R., H. Tatge, H. Genth, T. Thum, J. Borlak, G. Fritz, and I. Just.** 2005. *Clostridium difficile* toxin A induces expression of the stress-induced early gene product RhoB. *J. Biol. Chem.* **280**:1499-1505.
111. **Gettemans, J., I. K. Van, V. Delanote, T. Hubert, J. Vandekerckhove, and C. De, V.** 2005. Nuclear actin-binding proteins as modulators of gene transcription. *Traffic.* **6**:847-857.
112. **Göppel, D.** 2008. Regulation des humanen GILZ-Promotors durch *Clostridium difficile* Toxin B. Dissertation Universitätsklinikum Tübingens .
113. **Gort, A. S. and V. L. Miller.** 2000. Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* genes induced during systemic infection. *Infect. Immun.* **68**:6633-6642.
114. **Grandl, T. J.** 2006. Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation von GILZ durch *Clostridium difficile* Toxin B, *In* .
115. **Grassl, G. A., E. Bohn, Y. Muller, O. T. Buhler, and I. B. Autenrieth.** 2003. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**:41-54.
116. **Grassl, G. A., M. Kracht, A. Wiedemann, E. Hoffmann, M. Aepfelbacher, C. Eichel-Streiber, E. Bohn, and I. B. Autenrieth.** 2003. Activation of NF-kappaB and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell Microbiol.* **5**:957-971.

117. **Grassl, G. A., M. Kracht, A. Wiedemann, E. Hoffmann, M. Aepfelbacher, C. v.Eichel-Streiber, E. Bohn, and I. B. Autenrieth.** 2003. Activation of NF- $\kappa$ B and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell Microbiol* **5**:957-971.
118. **Greer, L. F., III and A. A. Szalay.** 2002. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence*. **17**:43-74.
119. **Grobner, S., S. E. Autenrieth, I. Soldanova, D. S. Gunst, M. Schaller, E. Bohn, S. Muller, M. Leverkus, S. Wesselborg, I. B. Autenrieth, and S. Borgmann.** 2006. *Yersinia* YopP-induced apoptotic cell death in murine dendritic cells is partially independent from action of caspases and exhibits necrosis-like features. *Apoptosis*. **11**:1959-1968.
120. **Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M. P. Sory, and G. R. Cornelis.** 2002. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect. Immun.* **70**:4165-4176.
121. **Grosskinsky, U., M. Schutz, M. Fritz, Y. Schmid, M. C. Lamparter, P. Szczesny, A. N. Lupas, I. B. Autenrieth, and D. Linke.** 2007. A conserved glycine residue of trimeric autotransporter domains plays a key role in *Yersinia* adhesin A autotransport. *J. Bacteriol.* **189**:9011-9019.
122. **Guan, K. L. and J. E. Dixon.** 1990. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* **249**:553-556.
123. **Haag, H., K. Hantke, H. Drechsel, I. Stojiljkovic, G. Jung, and H. Zähler.** 1993. Purification of Yersiniabactin: a siderophore and a possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol* **139**:2159-2165.
124. **Hakansson, S., T. Bergman, J. C. Vanooteghem, G. Cornelis, and H. Wolf Watz.** 1993. YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. . *Infect. Immun.* **61**:71-80.
125. **Hakansson, S., K. Schesser, C. Persson, E. E. Galyov, R. Rosqvist, F. Homble, and H. Wolf-Watz.** 1996. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J.* **15**:5812-5823.
126. **Haller, J. C., S. Carlson, K. J. Pederson, and D. E. Pierson.** 2000. A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol. Microbiol.* **36**:1436-1446.
127. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
128. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
129. **Hanski, C., U. Kutschka, H. P. Schmoranzler, M. Naumann, A. Stallmach, H. Hahn, H. Menge, and E. O. Riecken.** 1989. Immunohistochemical and electron

- microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect Immun.* **57**:673-678.
130. **Hartland, E. L., S. P. Green, W. A. Phillips, and R. M. Robins Browne.** 1994. Essential role of YopD in inhibition of the respiratory burst of macrophages by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **62**:4445-4453.
  131. **Heesemann J. and Grüter L.** 1987. Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **40**:37-41.
  132. **Heesemann, J.** 1987. Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microbiol Lett* **48**:229-233.
  133. **Heesemann, J., U. Gross, N. Schmidt, and R. Laufs.** 1986. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect Immun* **54**:561-567.
  134. **Heesemann, J., C. Keller, R. Morawa, N. Schmidt, H. J. Siemens, and R. Laufs.** 1983. Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* **147**:107-115.
  135. **Heesemann, J. and R. Laufs.** 1983. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J Bacteriol* **155**:761-767.
  136. **Heise, T. and P. Dersch.** 2006. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:3375-3380.
  137. **Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, and J. P. Nataro.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **6**:370-378.
  138. **Hentschke, M., K. Trulzsch, J. Heesemann, M. Aepfelbacher, and K. Ruckdeschel.** 2007. Serogroup-related escape of *Yersinia enterocolitica* YopE from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Infect. Immun.* **75**:4423-4431.
  139. **Heroven, A. K. and P. Dersch.** 2006. RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **62**:1469-1483.
  140. **Herrmann, C., M. R. Ahmadian, F. Hofmann, and I. Just.** 1998. Functional consequences of monoglucosylation of Ha-Ras at effector domain amino acid threonine 35. *J. Biol. Chem.* **273**:16134-16139.
  141. **Heusipp, G., K. Spekker, S. Brast, S. Falker, and M. A. Schmidt.** 2006. YopM of *Yersinia enterocolitica* specifically interacts with alpha1-antitrypsin without affecting the anti-protease activity. *Microbiology.* **152**:1327-1335.
  142. **Hoicznyk, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann.** 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**:5989-5999.



143. **Hoogkamp Korstanje, J. A., J. de Koning, and J. Heesemann.** 1988. Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man. *Infection* **16**:81-85.
144. **Hu, P., J. Elliott, P. McCready, E. Skowronski, J. Garnes, A. Kobayashi, R. R. Brubaker, and E. Garcia.** 1998. Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **180**:5192-5202.
145. **Hudson, K. J. and A. H. Bouton.** 2006. *Yersinia pseudotuberculosis* adhesins regulate tissue-specific colonization and immune cell localization in a mouse model of systemic infection. *Infect. Immun.* **74**:6487-6490.
146. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:379-433.
147. **Iriarte, M. and G. R. Cornelis.** 1998. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol. Microbiol.* **29**:915-929.
148. **Iriarte, M., M. P. Sory, A. Boland, A. P. Boyd, S. D. Mills, I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 1998. TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.* **17**:1907-1918.
149. **Iriarte, M., J. C. Vanooteghem, I. Delor, R. Diaz, S. Knutton, and G. R. Cornelis.** 1993. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **9**:507-520.
150. **Iwobi, A., J. Heesemann, E. Garcia, E. Igwe, C. Noelting, and A. Rakin.** 2003. Novel virulence-associated type II secretion system unique to high-pathogenicity *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **71**:1872-1879.
151. **Jacobi, C. A., A. Roggenkamp, A. Rakin, R. Zumbihl, L. Leitritz, and J. Heesemann.** 1998. In vitro and in vivo expression studies of *yopE* from *Yersinia enterocolitica* using the *gfp* reporter gene. *Mol. Microbiol.* **30**:865-882.
152. **Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff.** 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest* **95**:55-65.
153. **Juris, S. J., A. E. Rudolph, D. Huddler, K. Orth, and J. E. Dixon.** 2000. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:9431-9436.
154. **Juris, S. J., K. Shah, K. Shokat, J. E. Dixon, and P. O. Vacratsis.** 2006. Identification of otubain 1 as a novel substrate for the *Yersinia* protein kinase using chemical genetics and mass spectrometry. *FEBS Lett.* **580**:179-183.
155. **Just, I., J. Selzer, M. Wilm, C. Eichel-Streiber, M. Mann, and K. Aktories.** 1995. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **375**:500-503.
156. **Kagnoff, M. F. and L. Eckmann.** 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest.* **100**:6-10.
157. **Kampik, D., R. Schulte, and I. B. Autenrieth.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte

- chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections. *Infect Immun.* 2000. May. ;68. (5. ):2484. - 92. **68**:2484-2492.
158. **Kapperud, G. and E. Namork.** 1987. Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. Correlation with outer membrane protein YOP1, autoagglutination, and hemagglutination. *Contrib. Microbiol Immunol.* **9**:165-172.
  159. **Kapperud, G., E. Namork, M. Skurnik, and T. Nesbakken.** 1987. Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. *Infect. Immun.* **55**:2247-2254.
  160. **Karberg, M., H. Guo, J. Zhong, R. Coon, J. Perutka, and A. M. Lambowitz.** 2001. Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria. *Nat. Biotechnol.* **19**:1162-1167.
  161. **Kellendonk, C., F. Tronche, A. P. Monaghan, P. O. Angrand, F. Stewart, and G. Schutz.** 1996. Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res.* **24**:1404-1411.
  162. **Kester, H. A., C. Blanchetot, H. J. den, P. T. van der Saag, and B. B. van der.** 1999. Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity. *J. Biol. Chem.* **274**:27439-27447.
  163. **Kirjavainen, V., H. Jarva, M. Biedzka-Sarek, A. M. Blom, M. Skurnik, and S. Meri.** 2008. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS. Pathog.* **4**:e1000140.
  164. **Klein-Günther, A.** 2009. Etablierung eines beta-Laktamase Reportersystems für Yop Translokation durch *Yersinia enterocolitica*. Dissertation Universitätsklinikum Tübingen .
  165. **Köberle, M.** 2004. Etablierung eines Reportersystems zum Nachweis der Translokation von *Yersinia* outer proteins von *Y. enterocolitica* *in vitro* und *in vivo* . Diplomarbeit Universitätsklinikum Tübingen .
  166. **Koornhof, H. J., R. A. Smego, Jr., and M. Nicol.** 1999. Yersiniosis. II: The pathogenesis of *Yersinia* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:87-112.
  167. **Kovacevic, S.** 2003. Unveröffentlicht. Dissertation Universitätsklinikum Tübingen .
  168. **Krall, R., Y. Zhang, and J. T. Barbieri.** 2004. Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and *Yersinia* YopE in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279**:2747-2753.
  169. **Kubori, T., A. Sukhan, S. I. Aizawa, and J. E. Galan.** 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:10225-10230.

170. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
171. **Lee, S. J., H. Qin, and E. N. Benveniste.** 2008. The IFN-gamma-induced transcriptional program of the CIITA gene is inhibited by statins. *Eur. J. Immunol.* **38**:2325-2336.
172. **Lee, V. T., D. M. Anderson, and O. Schneewind.** 1998. Targeting of Yersinia Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol. Microbiol.* **28**:593-601.
173. **Leong, J. M., R. S. Fournier, and R. R. Isberg.** 1990. Identification of the integrin binding domain of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein. *EMBO J* **9**:1979-1989.
174. **Letzelter, M., I. Sorg, L. J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, M. Feldman, M. Kuhn, I. Callebaut, and G. R. Cornelis.** 2006. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J.* **25**:3223-3233.
175. **Leung, K. Y., B. S. Reisner, and S. C. Straley.** 1990. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of Yersinia pestis in mice. *Infect Immun* **58**:3262-3271.
176. **Leung, K. Y. and S. C. Straley.** 1989. The yopM gene of Yersinia pestis encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J. Bacteriol.* **171**:4623-4632.
177. **Lloyd, S. A., M. Norman, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz.** 2001. Yersinia YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol.* **39**:520-531.
178. **Lottspeich F and Zorbas H.** 1998. Bioanalytik, *In* . Spektrum Akademischer Verlag.
179. **Lundgren, E., N. Carballeira, R. Vazquez, E. Dubinina, H. Branden, H. Persson, and H. Wolf-Watz.** 1996. Invasin of Yersinia pseudotuberculosis activates human peripheral B cells. *Infect. Immun.* **64**:829-835.
180. **Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, P. F. Cherukuri, C. Weese-Scott, L. Y. Geer, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, R. A. Yamashita, J. J. Yin, D. Zhang, and S. H. Bryant.** 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.* **33**:D192-D196.
181. **Marketon, M. M., R. W. DePaolo, K. L. DeBord, B. Jabri, and O. Schneewind.** 2005. Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* **309**:1739-1741.
182. **Martinez, R. J.** 1989. Thermoregulation-dependent expression of Yersinia enterocolitica protein 1 imparts serum resistance to Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* **171**:3732-3739.

183. **Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr.** 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. **91**:295-298.
184. **Mejia, E., J. B. Bliska, and G. I. Viboud.** 2008. Yersinia controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity. *PLoS. Pathog.* **4**:e3.
185. **Michiels, T., J. C. Vanooteghem, R. C. Lambert de, B. China, A. Gustin, P. Boudry, and G. R. Cornelis.** 1991. Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **173**:4994-5009.
186. **Miller, H., J. Zhang, R. Kuolee, G. B. Patel, and W. Chen.** 2007. Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J. Gastroenterol.* **13**:1477-1486.
187. **Miller, V. L. and S. Falkow.** 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **56**:1242-1248.
188. **Mittal, R., S. Y. Peak-Chew, and H. T. McMahon.** 2006. Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:18574-18579.
189. **Mittelstadt, P. R. and J. D. Ashwell.** 2001. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J. Biol. Chem.* **276**:29603-29610.
190. **Montminy, S. W., N. Khan, S. McGrath, M. J. Walkowicz, F. Sharp, J. E. Conlon, K. Fukase, S. Kusumoto, C. Sweet, K. Miyake, S. Akira, R. J. Cotter, J. D. Goguen, and E. Lien.** 2006. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol.* **7**:1066-1073.
191. **Mota, L. J.** 2006. Type III secretion gets an LcrV tip. *Trends Microbiol.* **14**:197-200.
192. **Mota, L. J., L. Journet, I. Sorg, C. Agrain, and G. R. Cornelis.** 2005. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science.* **307**:1278.
193. **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.
194. **Mullis, K. B. and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.
195. **Nakajima, R., V. L. Motin, and R. R. Brubaker.** 1995. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect. Immun.* **63**:3021-3029.
196. **Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen.** 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell.* **2**:279-289.
197. **Narumiya, S., T. Ishizaki, and N. Watanabe.** 1997. Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* **410**:68-72.

198. **Navarro, L., A. Koller, R. Nordfelth, H. Wolf-Watz, S. Taylor, and J. E. Dixon.** 2007. Identification of a molecular target for the Yersinia protein kinase A. *Mol. Cell.* **26**:465-477.
199. **Nelson, K. M., G. M. Young, and V. L. Miller.** 2001. Identification of a locus involved in systemic dissemination of Yersinia enterocolitica. *Infect. Immun.* **69**:6201-6208.
200. **Nikolaus Konrad Maria Ackermann.** 2005. Das Yersinia-Adhäsın YadA, ein oligomerer Autotransporter als Prototyp der Oca-Familie - eine molekulare Struktur- und Funktionsanalyse -, *In* .
201. **Nord, O., A. Gustrin, and P. A. Nygren.** 2005. Fluorescent detection of beta-lactamase activity in living Escherichia coli cells via esterase supplementation. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**:73-79.
202. **Nordfelth, R. and H. Wolf-Watz.** 2001. YopB of Yersinia enterocolitica is essential for YopE translocation. *Infect. Immun.* **69**:3516-3518.
203. **Nummelin, H., M. C. Merckel, J. C. Leo, H. Lankinen, M. Skurnik, and A. Goldman.** 2004. The Yersinia adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J.*
204. **Oellerich, M. F., C. A. Jacobi, S. Freund, K. Niedung, A. Bach, J. Heesemann, and K. Trulzsch.** 2007. Yersinia enterocolitica Infection of Mice Reveals Clonal Invasion and Abscess Formation. *Infect. Immun.* **75**:3802-3811.
205. **Orth, K., L. E. Palmer, Z. Q. Bao, S. Stewart, A. E. Rudolph, J. B. Bliska, and J. E. Dixon.** 1999. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* **285**:1920-1923.
206. **Orth, K., Z. Xu, M. B. Mudgett, Z. Q. Bao, L. E. Palmer, J. B. Bliska, W. F. Mangel, B. Staskawicz, and J. E. Dixon.** 2000. Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* **290**:1594-1597.
207. **Park, H., K. Teja, J. J. O'shea, and R. M. Siegel.** 2007. The Yersinia Effector Protein YpkA Induces Apoptosis Independently of Actin Depolymerization. *J. Immunol.* **178**:6426-6434.
208. **Parkhill, J., B. W. Wren, N. R. Thomson, R. W. Titball, M. T. Holden, M. B. Prentice, M. Sebahia, K. D. James, C. Churcher, K. L. Mungall, S. Baker, D. Basham, S. D. Bentley, K. Brooks, A. M. Cerdeno-Tarraga, T. Chillingworth, A. Cronin, R. M. Davies, P. Davis, G. Dougan, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, A. V. Karlyshev, S. Leather, S. Moule, P. C. Oyston, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 2001. Genome sequence of Yersinia pestis, the causative agent of plague. *Nature* **413**:523-527.
209. **Pawel-Rammingen, U., M. V. Telepnev, G. Schmidt, K. Aktories, H. Wolf-Watz, and R. Rosqvist.** 2000. GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol. Microbiol.* **36**:737-748.

210. **Pelludat, C., M. Hogardt, and J. Heesemann.** 2002. Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect. Immun.* **70**:1832-1841.
211. **Pepe J.C., M.R.Wachtel, E.Wagar, and V.L.Miller.** 1995. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun* **63**:4837-4848.
212. **Pepe, J. C. and V. L. Miller.** 1993. *Yersinia enterocolitica* invasins: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:6473-6477.
213. **Perez-Gutierrez, C., C. M. Llompart, M. Skurnik, and J. A. Bengoechea.** 2007. Expression of the *Yersinia enterocolitica* pYV-encoded type III secretion system is modulated by lipopolysaccharide O-antigen status. *Infect. Immun.* **75**:1512-1516.
214. **Perona, R., S. Montaner, L. Saniger, I. Sanchez-Perez, R. Bravo, and J. C. Lical.** 1997. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* **11**:463-475.
215. **Perry, R. D., S. C. Straley, J. D. Fetherston, D. J. Rose, J. Gregor, and F. R. Blattner.** 1998. DNA sequencing and analysis of the low-Ca<sup>2+</sup>-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5. *Infect. Immun.* **66**:4611-4623.
216. **Pierson, D. E. and S. Falkow.** 1990. Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences. *Infect Immun* **58**:1059-1064.
217. **Pilz, D., T. Vocke, J. Heesemann, and V. Brade.** 1992. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. *Infect Immun* **60**:189-195.
218. **Prehna, G., M. I. Ivanov, J. B. Bliska, and C. E. Stebbins.** 2006. *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell.* **126**:869-880.
219. **Rabson, A. R., A. F. Hallett, and H. J. Koornhof.** 1975. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Infect. Dis.* **131**:447-451.
220. **Rakin, A., E. Saken, D. Harmsen, and J. Heesemann.** 1994. The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. *Mol Microbiol* **13**:253-263.
221. **Ramamurthy, T., K. Yoshino, X. Huang, N. G. Balakrish, E. Carniel, T. Maruyama, H. Fukushima, and T. Takeda.** 1997. The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. *Microb. Pathog.* **23**:189-200.
222. **Reineke, K.** 2002. *In vitro* Untersuchungen zur Modulation der GILZ-Expression in Epithelzellen durch Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica*, *In* .

223. **Revell, P. A. and V. L. Miller.** 2000. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol. Microbiol.* **35**:677-685.
224. **Robins-Browne, R. M., C. S. Still, M. D. Miliotis, and H. J. Koornhof.** 1979. Mechanism of action of *Yersinia enterocolitica* enterotoxin. *Infect. Immun.* **25**:680-684.
225. **Roggenkamp, A., N. Ackermann, C. A. Jacobi, K. Truelzsch, H. Hoffmann, and J. Heesemann.** 2003. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J. Bacteriol.* **185**:3735-3744.
226. **Roggenkamp, A., T. Bittner, L. Leitritz, A. Sing, and J. Heesemann.** 1997. Contribution of the Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O8. *Infect. Immun.* **65**:4705-4710.
227. **Roggenkamp, A., H. R. Neuberger, A. Flugel, T. Schmoll, and J. Heesemann.** 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol. Microbiol.* **16**:1207-1219.
228. **Roggenkamp, A., K. Ruckdeschel, L. Leitritz, R. Schmitt, and J. Heesemann.** 1996. 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.* **64**:2506-2514.
229. **Roppenser, B., A. Roder, M. Hentschke, K. Ruckdeschel, and M. Aepfelbacher.** 2009. *Yersinia enterocolitica* differentially modulates RhoG activity in host cells. *J. Cell Sci.* **122**:696-705.
230. **Rosqvist, R., A. Forsberg, M. Rimpilainen, T. Bergman, and H. Wolf Watz.** 1990. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* **4**:657-667.
231. **Rosqvist, R., A. Forsberg, and H. Wolf Watz.** 1991. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* **59**:4562-4569.
232. **Rosqvist, R., K. E. Magnusson, and H. Wolf Watz.** 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* **13**:964-972.
233. **Ruckdeschel, K., O. Mannel, K. Richter, C. A. Jacobi, K. Trulzsch, B. Rouot, and J. Heesemann.** 2001. *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.* **166**:1823-1831.
234. **Ruckdeschel, K., G. Pfaffinger, K. Trulzsch, G. Zenner, K. Richter, J. Heesemann, and M. Aepfelbacher.** 2006. The proteasome pathway destabilizes *Yersinia* outer protein E and represses its antihost cell activities. *J. Immunol.* **176**:6093-6102.

235. **Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, S. Schubert, and J. Heesemann.** 1996. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun.* **64**:724-733.
236. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
237. **Salinovich, O. and R. C. Montelaro.** 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**:341-347.
238. **Sarker, M. R., C. Neyt, I. Stainier, and G. R. Cornelis.** 1998. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J. Bacteriol.* **180**:1207-1214.
239. **SCHERER, W. F., J. T. SYVERTON, and G. O. GEY.** 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97**:695-710.
240. **Schleifstein, J. I. and M. B. Coleman.** 1939. An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Pasteurella pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *NY State J Med* **39**:1749-1753.
241. **Schmid, Y., G. A. Grassl, O. T. Buhler, M. Skurnik, I. B. Autenrieth, and E. Bohn.** 2004. *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. *Infect. Immun.* **72**:6780-6789.
242. **Schmiel, D. H., E. Wagar, L. Karamanou, D. Weeks, and V. L. Miller.** 1998. Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect. Immun.* **66**:3941-3951.
243. **Schotte, P., G. Denecker, B. A. Van Den, P. Vandenabeele, G. R. Cornelis, and R. Beyaert.** 2004. Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* **279**:25134-25142.
244. **Schule, R., P. Rangarajan, S. Kliewer, L. J. Ransone, J. Bolado, N. Yang, I. M. Verma, and R. M. Evans.** 1990. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell.* **62**:1217-1226.
245. **Schulte, R. and I. B. Autenrieth.** 1998. *Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation. *Infect. Immun.* **66**:1216-1224.
246. **Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson, and I. B. Autenrieth.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* 2000. Aug. ;14. (11. ):1471. -84. **14**:1471-1484.
247. **Schulte, R., S. Kerneis, S. Klinke, H. Bartels, S. Preger, J. P. Kraehenbuhl, E. Pringault, and I. B. Autenrieth.** 2000. 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.* **2**:173-185.
248. **Schulte, R., R. Zumbihl, D. Kampik, A. Fauconnier, and I. B. Autenrieth.** 1998. Wortmannin blocks Yersinia invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **187**:53-60.
  249. **Schulze Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, T. Kirsch, B. Swoboda, C. Bull, S. Goodman, and F. Emmrich.** 1993. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect. Immun.* **61**:2513-2519.
  250. **Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, T. Kirsch, B. Swoboda, C. Bull, S. Goodman, and F. Emmrich.** 1993. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect. Immun.* **61**:2513-2519.
  251. **Scita, G., P. Tenca, E. Frittoli, A. Tocchetti, M. Innocenti, G. Giardina, and P. P. Di Fiore.** 2000. Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J.* **19**:2393-2398.
  252. **Sehr, P., G. Joseph, H. Genth, I. Just, E. Pick, and K. Aktories.** 1998. Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* **37**:5296-5304.
  253. **Seidel, G., K. Adermann, T. Schindler, A. Ejchart, R. Jaenicke, W. G. Forssmann, and P. Rosch.** 1997. Solution structure of porcine delta sleep-inducing peptide immunoreactive peptide A homolog of the shortsighted gene product. *J. Biol. Chem.* **272**:30918-30927.
  254. **Sekine, A., M. Fujiwara, and S. Narumiya.** 1989. Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **264**:8602-8605.
  255. **Shao, F.** 2008. Biochemical functions of Yersinia type III effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**:21-29.
  256. **Shao, F., P. M. Merritt, Z. Bao, R. W. Innes, and J. E. Dixon.** 2002. A Yersinia effector and a Pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Immunity.* **109**:575-588.
  257. **Shao, F., P. O. Vacratsis, Z. Bao, K. E. Bowers, C. A. Fierke, and J. E. Dixon.** 2003. Biochemical characterization of the Yersinia YopT protease: Cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:904-909.
  258. **Sharma, S., S. Mittal, S. Mallik, and J. S. Viridi.** 2006. Molecular characterization of beta-lactamase genes blaA and blaB of Yersinia enterocolitica biovar 1A. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**:319-327.
  259. **Shepel, M., J. Boyd, J. Luider, and A. P. Gibb.** 2001. Interaction of Yersinia enterocolitica and Y. pseudotuberculosis with platelets. *J. Med. Microbiol.* **50**:1030-1038.

260. **Simonet, M., S. Richard, and P. Berche.** 1990. Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect Immun* **58**:841-845.
261. **Sing, A., A. Roggenkamp, A. M. Geiger, and J. Heesemann.** 2002. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* **168**:1315-1321.
262. **Skrzypek, E., C. Cowan, and S. C. Straley.** 1998. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol. Microbiol.* **30**:1051-1065.
263. **Skrzypek, E., T. Myers-Morales, S. W. Whiteheart, and S. C. Straley.** 2003. Application of a *Saccharomyces cerevisiae* Model To Study Requirements for Trafficking of *Yersinia pestis* YopM in Eucaryotic Cells. *Infect. Immun.* **71**:937-947.
264. **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.
265. **Skurnik, M., A. Peippo, and E. Ervela.** 2000. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol. Microbiol.* **37**:316-330.
266. **Smego, R. A., J. Frean, and H. J. Koornhof.** 1999. Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague *Yersinia* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:1-15.
267. **Sorg, I., U. M. Goehring, K. Aktories, and G. Schmidt.** 2001. Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infect. Immun.* **69**:7535-7543.
268. **Sorg, I., C. Hoffmann, J. Dumbach, K. Aktories, and G. Schmidt.** 2003. The C terminus of YopT is crucial for activity and the N terminus is crucial for substrate binding. *Infect. Immun.* **71**:4623-4632.
269. **Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:11998-12002.
270. **Sory, M. P. and G. R. Cornelis.** 1994. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol.* **14**:583-594.
271. **Strauch, E., I. Voigt, H. Broll, and B. Appel.** 2000. Use of a plasmid of a *Yersinia enterocolitica* biogroup 1A strain for the construction of cloning vectors. *J. Biotechnol.* **79**:63-72.
272. **Su, L. F., Z. Wang, and M. J. Garabedian.** 2002. Regulation of GRIP1 and CBP Coactivator activity by Rho GDI modulates estrogen receptor transcriptional enhancement. *J. Biol. Chem.* **277**:37037-37044.

273. **Sundberg, L. and A. Forsberg.** 2003. TyeA of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in regulation of Yop expression and is required for polarized translocation of Yop effectors. *Cell Microbiol.* **5**:187-202.
274. **Tahir, Y. E., P. Kuusela, and M. Skurnik.** 2000. Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification Of eight NSV. *Mol. Microbiol.* **37**:192-206.
275. **Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki.** 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**:153-208.
276. **Tamm, A., A.-M. Tarkkanen, P. K. Korhonen, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1993. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **10**:995-1011.
277. **Tertti, R., M. Skurnik, T. Vartio, and P. Kuusela.** 1992. Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect. Immun.* **60**:3021-3024.
278. **Teusch, N., E. Lombardo, J. Eddleston, and U. G. Knaus.** 2004. The low molecular weight GTPase RhoA and atypical protein kinase Czeta are required for TLR2-mediated gene transcription. *J. Immunol.* **173**:507-514.
279. **Thomson, N. R., S. Howard, B. W. Wren, M. T. Holden, L. Crossman, G. L. Challis, C. Churcher, K. Mungall, K. Brooks, T. Chillingworth, T. Feltwell, Z. Abdellah, H. Hauser, K. Jagels, M. Maddison, S. Moule, M. Sanders, S. Whitehead, M. A. Quail, G. Dougan, J. Parkhill, and M. B. Prentice.** 2006. The Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of the High Pathogenicity *Yersinia enterocolitica* Strain 8081. *PLoS. Genet.* **2**:e206.
280. **Thomson, N. R., S. Howard, B. W. Wren, M. T. Holden, L. Crossman, G. L. Challis, C. Churcher, K. Mungall, K. Brooks, T. Chillingworth, T. Feltwell, Z. Abdellah, H. Hauser, K. Jagels, M. Maddison, S. Moule, M. Sanders, S. Whitehead, M. A. Quail, G. Dougan, J. Parkhill, and M. B. Prentice.** 2006. The Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of the High Pathogenicity *Yersinia enterocolitica* Strain 8081. *PLoS. Genet.* **2**:e206.
281. **Toivanen, A., K. Granfors, R. Lahesmaa Rantala, R. Leino, T. Stahlberg, and R. Vuento.** 1985. Pathogenesis of *Yersinia*-triggered reactive arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects. *Immunol Rev.* **86**:47-70.
282. **Torruellas, J., M. W. Jackson, J. W. Pennock, and G. V. Plano.** 2005. The *Yersinia pestis* type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion. *Mol. Microbiol.* **57**:1719-1733.
283. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:4350-4354.
284. **Trasak, C., G. Zenner, A. Vogel, G. Yuksekdog, R. Rost, I. Haase, M. Fischer, L. Israel, A. Imhof, S. Linder, M. Schleicher, and M. Aepfelbacher.** 2007. *Yersinia*

- protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process. *J. Biol. Chem.* **282**:2268-2277.
285. **Trosky, J. E., A. D. Liverman, and K. Orth.** 2008. Yersinia outer proteins: Yops. *Cell Microbiol.* **10**:557-565.
  286. **Trulzsch, K., A. Roggenkamp, M. Aepfelbacher, G. Wilharm, K. Ruckdeschel, and J. Heesemann.** 2003. Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**:167-177.
  287. **Trulzsch, K., T. Sporleder, E. I. Igwe, H. Russmann, and J. Heesemann.** 2004. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect. Immun.* **72**:5227-5234.
  288. **Turner, S. J., S. Zhuang, T. Zhang, G. R. Boss, and R. B. Pilz.** 2008. Effects of lovastatin on Rho isoform expression, activity, and association with guanine nucleotide dissociation inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **75**:405-413.
  289. **Tynan, S. H., S. G. Lundeen, and G. F. Allan.** 2004. Cell type-specific bidirectional regulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene by estrogen. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **91**:225-239.
  290. **Uehata, M., T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa, and S. Narumiya.** 1997. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* **389**:990-994.
  291. **Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey.** 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**:2295-2322.
  292. **Viboud, G. I. and J. B. Bliska.** 2005. Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:69-89.
  293. **Viboud, G. I. and J. B. Bliska.** 2001. A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *EMBO J.* **20**:5373-5382.
  294. **Viboud, G. I., E. Mejia, and J. B. Bliska.** 2006. Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Cell Microbiol.* **8**:1504-1515.
  295. **Viboud, G. I., S. S. So, M. B. Ryndak, and J. B. Bliska.** 2003. Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **47**:1305-1315.
  296. **Visser, L. G., P. S. Hiemstra, M. T. van den Barselaar, P. A. Ballieux, and R. van Furth.** 1996. Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect. Immun.* **64**:1653-1658.
  297. **Vogel, P., H. J. Magert, A. Cieslak, K. Adermann, and W. G. Forssmann.** 1996. hDIP--a potential transcriptional regulator related to murine TSC-22 and *Drosophila*

- shortsighted (shs)--is expressed in a large number of human tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* **1309**:200-204.
298. **Wattiau, P. and G. R. Cornelis.** 1993. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol. Microbiol.* **8**:123-131.
  299. **Welkos, S., A. Friedlander, D. McDowell, J. Weeks, and S. Tobery.** 1998. V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. *Microb. Pathog.* **24**:185-196.
  300. **Wennerberg, K., L. Lohikangas, D. Gullberg, M. Pfaff, S. Johansson, and R. Fassler.** 1996. Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin. *J. Cell Biol.* **132**:227-238.
  301. **Wiedig, C. A., U. Kramer, S. Garbom, H. Wolf-Watz, and I. B. Autenrieth.** 2005. Induction of CD8+ T cell responses by *Yersinia* vaccine carrier strains. *Vaccine* **23**:4984-4998.
  302. **Wiedmaier, N., S. Muller, M. Koberle, B. Manncke, J. Krejci, I. B. Autenrieth, and E. Bohn.** 2008. Bacteria induce CTGF and CYR61 expression in epithelial cells in a lysophosphatidic acid receptor-dependent manner. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**:231-243.
  303. **Woestyn, S., A. Allaoui, P. Wattiau, and G. R. Cornelis.** 1994. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J. Bacteriol.* **176**:1561-1569.
  304. **Wollmann, P., K. Zeth, A. N. Lupas, and D. Linke.** 2006. Purification of the YadA membrane anchor for secondary structure analysis and crystallization. *Int. J. Biol. Macromol.* **39**:3-9.
  305. **Wong, K. W. and R. R. Isberg.** 2005. *Yersinia pseudotuberculosis* Spatially Controls Activation and Misregulation of Host Cell Rac1. *PLoS. Pathog.* **1**:e16.
  306. **Wunderlich, F. T., H. Wildner, K. Rajewsky, and F. Edenhofer.** 2001. New variants of inducible Cre recombinase: a novel mutant of Cre-PR fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility. *Nucleic Acids Res.* **29**:E47.
  307. **Yao, T., J. Meccas, J. I. Healy, S. Falkow, and Y. Chien.** 1999. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J. Exp. Med.* **190**:1343-1350.
  308. **Yip, C. K., T. G. Kimbrough, H. B. Felise, M. Vuckovic, N. A. Thomas, R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, B. B. Finlay, S. I. Miller, and N. C. Strynadka.** 2005. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature.* **435**:702-707.
  309. **Young, G. M., D. H. Schmiel, and V. L. Miller.** 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:6456-6461.
  310. **Zhou, H., D. M. Monack, N. Kayagaki, I. Wertz, J. Yin, B. Wolf, and V. M. Dixit.** 2005. *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. *J. Exp. Med.* **202**:1327-1332.

311. **Zlokarnik, G., P. A. Negulescu, T. E. Knapp, L. Mere, N. Burren, L. Feng, M. Whitney, K. Roemer, and R. Y. Tsien.** 1998. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science*. **279**:84-88.
312. **Zumbihl, R., M. Aepfelbacher, A. Andor, C. A. Jacobi, K. Ruckdeschel, B. Rouot, and J. Heesemann.** 1999. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* **274**:29289-29293.

## 8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Arbeit wurden vor dem Einreichen der Dissertation als Zeitschriftenartikel oder Poster veröffentlicht:

### 8.1 Zeitschriftenartikel

**Köberle,M., Klein-Günther.A., Schütz,M., Fritz,M., Berchtold,S., Tolosa.E., Autenrieth,I.B. and Bohn,E.** (2009)

*Yersinia enterocolitica* targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model.

PLoS Pathog. 8, e1000551.

**Braun,V., Pramanik,A., Gwinner,T., Köberle,M. and Bohn,E.** (2009).

Sideromycins: tools and antibiotics.

Biometals. 22(1), 3-13.

**Adkins,I., Köberle,M., Gröbner,S., Autenrieth,S.E., Bohn,E., Borgmann,S., and Autenrieth,I.B.** (2008).

*Y. enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells.

Microbes. Infect. 10, 798-806.

**Vogel,M., Hartmann,T., Köberle,M., Treiber,M., Autenrieth,I.B., and Schumacher,U.K.** (2008). Rifampicin induces MDR1 expression in *Candida albicans*.

J. Antimicrob. Chemother. 61, 541-547.

**Wiedmaier,N., Müller,S., Köberle,M., Manncke,B., Krejci,J., Autenrieth,I.B., and Bohn,E.** (2008).

Bacteria induce CTGF and CYR61 expression in epithelial cells in a lysophosphatidic acid receptor-dependent manner.

Int. J. Med. Microbiol. 298, 231-243.

**Adkins,I., Köberle,M., Gröbner,S., Bohn,E., Autenrieth,I.B., and Borgmann,S.** (2007).

*Yersinia* outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells.

Int. J. Med. Microbiol. 97(4), 235-44

**Frick,J.S., Schenk,K., Quitadamo,M., Kahl,F., Köberle,M., Bohn,E., Aepfelbacher,M., and Autenrieth,I.B.** (2007).

*Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells.

Inflamm. Bowel. Dis. 13, 83-90.

## 8.2 Kongressbeiträge

**Köberle M., Klein-Günther A., Berchtold S., Fritz M., Schütz M., Autenrieth I. B., and Bohn E. (2009).**

Yop translocation into host cells requires  $\beta 1$  integrins and RhoGTPases and can be detected during mouse infection predominantly in follicular B cells and cells of the myeloid lineage. 61th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 2009 Göttingen. Int. J. Med. Microbiol. 299: 67-67. Suppl. 46.

**Köberle M., Göppel D., Grandl T., Berchtold S., Lüscher B., Asselin-Labat M.L., Sorg I., Pallardy M., Barth H., Autenrieth I. B., Bohn E. (2008).**

The transcription factors USF-1 and USF-2 are essential for *Y. enterocolitica* YopT and *C. difficile* toxin B induced GILZ expression. 60th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 2008 Dresden. Int. J. Med. Microbiol. 298: 63-63. Suppl. 45.

**Klein-Günther A., Köberle M., Autenrieth I. B., and Bohn E. (2007).**

Detection of Yop translocation of *Y. enterocolitica* in mice by using a lactamase reporter system - Indication that the immune system may modulate Yop translocation *in vivo*. 59th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 2007 Göttingen. Int. J. Med. Microbiol. 297: 103-103 Suppl. 43.



## 9 DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Prof. Ingo B. Autenrieth und Dr. Erwin Bohn und in der Abteilung Immunologie des Interfakultären Instituts für Zellbiologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Hans-Georg Rammensee.

Herrn Prof. Ingo B. Autenrieth und Dr. Erwin Bohn danke ich herzlich für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, die hervorragende Betreuung, die umfassende Unterstützung des Forschungsprojekts, die ständige Bereitschaft zur Diskussion und die zügige und sorgfältige Durchsicht der vorliegenden Arbeit, sowie die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Bei Herrn Prof. Hans-Georg Rammensee bedanke ich mich sehr herzlich für das Vertreten dieser Doktorarbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen, sowie für sein reges Interesse und die wertvollen Diskussionen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit sehr geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen der AG Bohn, allen voran Birgit Manncke und Juliane Klenk für ihre exzellente experimentelle Unterstützung, Annegret Klein-Günther für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Yop Translokation, Susanne Berchtold für zahllose hilfreiche Labordiskussionen und ihre ständige Hilfsbereitschaft, sowie David Göppel, Nina Wiedmaier, Gianluca Matteoli, Alexandra Siegfried, Tanja Grandl und Tanja Griesinger für die angenehme Zusammenarbeit und das sehr freundschaftliche Arbeitsklima.

Gleiches gilt für meine Kolleginnen und Kollegen von der AG Autenrieth, hier bin ich Bettina Hackl, Phillip Warnke, Stella Autenrieth, Monika Schütz, Ulrike Großkinsky, Magnus Schindler, Philipp Oberhettinger, Tanja Rebecca Linzer, Eva-Maria Weiss und Tarun Mehra zu großem Dank für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit verpflichtet.

Mit Freude denke ich an eine Reihe fruchtbare gruppenübergreifende Kooperationen zurück und bin in diesem Zusammenhang Julia Frick, Frauke Effinger, Berit Schulte, Irena Adkins, Stefan Borgmann, Avijit Pramanik, Miriam Vogel und Ulrike Schumacher, sowie Andreas

Peschel, Timo Birkenstock, Dorothee Kretschmer und Cordula Gekeler für die interessante und angenehme Zusammenarbeit.

Ich danke allen für ungezählte weitere, nicht ganz so wissenschaftliche Diskussionen, die gemeinsame Entwicklung atemberaubender (wenn auch unrealisierbarer) Geschäftsideen, aber auch für die Hilfe beim alljährlichen Vernichten meiner Feuerzangenbowle und Beistand beim Lauftraining, Badminton spielen und Kaffee trinken. Neben meinen Arbeitsgruppen-Kollegen und Kooperationspartnern waren dies insbesondere Helmut Rausch, Udo Weizenmann, Nadine Werth, Christian Eberhardt, Patrick Kaiser, Christiane Beerlage, Andrea Schäfer, Alexandra Wittmann, Martina Müller, Nadine Göhring, Anne-Katrin Gleske, Hanna Hartmann, Yvonne Schmidt, Naima Zahir, Wallid Rayan, Anurag Singh, Sabine Gröbner und Patrick Weißgerber.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und Michaela Fritz für ihre liebevolle Unterstützung und Geduld.

## **10 ANHANG**

### **Meine akademischen Lehrer waren:**

K. Albert, E. Bayer, H. Bisswanger, K.W. Bock, P. Bohley, U. Breyer-Pfaff, M. Duszenko, H. Einsele, K. Eisele, A. Engels, K.U. Fröhlich, A. Gartner, G. Gauglitz, P. Grabmayr, H. Günzl, G. Häfelinger, B. Hamprecht, M. Hanack, W. Jäger, G. Jung, H. Kalbacher, A. Kapurniotu, D. Mecke, W. Nakel, W. Neubert, W. Neupert, H. Ninnemann, H. Oberhammer, W. Pfeiffer, H. Pommer, H. Probst, H.-G. Rammensee, H.J. Reinecke, K. Reutter, H. Schott, M. Schwarz, S. Stoeva, J. Strähle, W. Voelter, U. Weser