

**Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Einfluss der Expression punktmutierter Varianten des
Yersinia Adhäsins A (YadA) auf die Expression der
periplasmatischen Chaperon-Protease DegP**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Tarun Mehra
aus Reading, Großbritannien
2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Die Gattung <i>Yersinia</i>	6
1.2	Medizinische Relevanz enteropathogener <i>Yersinia spp.</i>	7
1.3	Die Spezies <i>Yersinia enterocolitica</i>	8
1.4	Autotransporter	12
1.5	Das äußere Membranprotein <i>Yersinia</i> Adhäsın A	13
1.6	Das periplasmatische <i>stress-response</i> System von <i>E.coli</i>	17
1.7	Das periplasmatische Enzym DegP	22
1.8	Zielsetzung	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3	Chemikalien	27
2.1.4	Puffer und Lösungen	28
2.1.5	Antikörper	32
2.1.6	Antibiotika	33
2.1.7	Enzyme	33
2.1.8	Primer	33
2.1.9	Kommerzielle Kits	34
2.1.10	Bakterienstämme und Vektoren	35
2.2	Methoden	37
2.2.1	Bakterienkultur	37
2.2.2	RNA-Extraktion	38
2.2.3	Reverse Transkription der mRNA	39
2.2.4	Konventionelle PCR	40
2.2.5	Quantitative Real-Time PCR	41
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.7	SDS-Page	43
2.2.8	Western-Blot	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Qualitativer Vergleich der DegP-Expression im Western-Blot	45
3.1.1	Vergleich der DegP-Expression 1h nach Induktion der YadA-Expression	46
3.1.2	Vergleich der DegP-Expression im Zeitverlauf	47
3.2	Qualitativer Vergleich der DegP-Transkription mittels konventioneller PCR	50
3.2.1	Etablierung der konventionellen PCR	50
3.2.2	Überprüfung der qualitativen DegP-Expression durch konventionelle PCR	57
3.3	Quantitativer Vergleich der DegP-Transkription mittels Real Time PCR	62
3.3.1	Überprüfung der cDNA-Qualität	62
3.3.2	Untersuchung mittels Real Time PCR	64

<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>75</u>
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>83</u>
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>84</u>
<u>7</u>	<u>Abkürzungen</u>	<u>101</u>
<u>8</u>	<u>Danksagung</u>	<u>102</u>
<u>9</u>	<u>Lebenslauf</u>	<u>104</u>

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Im Jahre 1894 gelang dem Schweizer Alexandre Yersin (1863-1943) in Hongkong die Isolation des Erregers der Beulenpest, dem nach ihm benannten Bakterium *Yersinia pestis*.

Zusammen mit zehn weiteren Spezies bildet *Yersinia pestis* den Genus *Yersinia spp.*, welcher zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehört. Somit sind *Yersinia spp.* gramnegative, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende, Katalase-positive, Oxidase-negative Stäbchen (Bercovier & Molleret, Bergey's Manual of Sytematic Bacteriology, 1984).

Bisher sind drei Spezies als zweifelsfrei humanpathogen anzusehen, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, wobei diese primär als Zoonosen zu betrachten sind (Gray, Manual of Clinical Microbiology, 6th ed., 1995).

Tabelle 1: die Gattung *Yersinia spp.*

<i>Yersinia spp.</i>	Pathogenität	Klassifizierung
<i>Y. pestis</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>	humanpathogen	Van Loghem, 1944 Schleifstein & Coleman, 1939 Pfeiffer, 1989
<i>Y. frederiksenii</i> <i>Y. intermedia</i> <i>Y. kristensii</i> <i>Y. aldovae</i> <i>Y. bercovieri</i> <i>Y. mollaretti</i> <i>Y. rhodei</i> <i>Y. ruckeri</i>	Bisher als apathogen für Menschen geltend, obwohl die Möglichkeit einer Beteiligung bei humanen Pathologien bei Weitem nicht ausgeschlossen werden sollte (Sulakvelidze, 2000).	Ursing et al., 1981 Brenner et al., 1980 Bercovier et al., 1980 Bercovier et al., 1984 Wauters et al., 1988 Wauters et al., 1988 Aleksic et al., 1987 Ewing et al., 1978

1.2 Medizinische Relevanz enteropathogener *Yersinia spp.*

Das klinische Bild einer Yersiniose wird von den beiden Erregern *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* hervorgerufen (Smego et al., 1999). Die Hauptreservoirs für die beiden Keime sind Nutztiere wie Schweine und Rinder, Nagetiere und Haustiere wie Hunde und Katzen (Bottone et al., 1997). Manche Vogelarten sind zusätzliche Wirte von *Y. pseudotuberculosis* (Butler 1979, 1994). Die Infektion erfolgt meistens fäkal-oral, durch die Aufnahme von kontaminiertem Trinkwasser oder Speisen wie Schweinefleisch und Milchprodukte, sowie durch Übertragung von Mensch zu Mensch oder von Tier zu Mensch mit einem Mindestinoculum von 10^9 Keimen (Bottone, 1977, 1997). Infektionen durch kontaminierte Blutkonserven sind ebenfalls beschrieben worden (Bottone 1997; CDC 1991, 1997; Kuehnert et al., 1997).

Die Yersiniosen können sich auf vielfältige Art und Weise manifestieren, als Gastroenteritis bzw. Gastroenterokolitis mit akuter mesenterialen Adenitis, reaktiver Polyarthrit, Erythema Nodosum, Erythema Multiforme und als Sepsis, um die häufigsten zu nennen (Bottone ,1997; Smego et al., 1999).

Eine akute Gastroenteritis ist die häufigste Form einer klinisch manifesten Infektion mit *Y. enterocolitica*, die am häufigsten Kinder betrifft (Bottone ,1997). Die Symptome werden durch eine Invasion der M-Zellen über die Peyerschen Plaques der Darm-Mukosa und die darauf folgende Schädigung der Darm-Mukosa verursacht (Autenrieth & Firsching, 1996) und umfassen schleimig-blutige Durchfälle, Fieber und abdominelle Beschwerden (Smego et al. 1999). Die Symptome können zu einer Verwechslung des Casus mit einer akuten Appendizitis führen, welche sich mit einem ähnlichen Bild präsentieren kann (Butler & Dennis in Mandell, Douglas Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 2005). Bei schweren, septischen Verläufen treten gehäuft septische Absiedelungen in Form von Abzessen in multiplen Organen wie Leber und Milz (Beeching et al., 1985), weiter in Lunge, Knochen, ZNS und Endokard auf (Sebes et al., 1976; Appelbaum et al., 1983). Schwere Verläufe

treten gehäuft bei Patienten mit erhöhtem Eisenblutspiegel wie es bei Thalassämien, aplastischer Anämie, Drepanozytose oder Hämochromatose, sowie bei Patienten unter Desoxiferramin-Therapie auf (Bouza et al., 1980; Stoddard et al., 1994; Chiu et al., 1986; Gallant et al., 1986; Hewstone, 1972; Piroth et al., 1997; Capron et al., 1984). Die Letalität einer behandelten *Y. enterocolitica* Sepsis beträgt 50% (Butler & Denis in Mandell, Douglas Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 2005).

Die häufigste Form einer von *Y. pseudotuberculosis* verursachten Yersiniose ist eine mesenteriale Adenitis. Die Letalität einer behandelten *Y. pseudotuberculosis* Sepsis beträgt 75% (Butler & Denis in Mandell, Douglas Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 2005).

Zum Nachweis können im gegebenen Fall Blutkulturen sowie Kulturen aus Zerebrospinalflüssigkeit oder mesenterialen Lymphknoten gewonnen werden. Die Gewinnung von Kulturen aus Stuhlproben gestaltet sich deutlich schwieriger (Butler & Denis in Mandell, Douglas Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 2005).

Bei unkomplizierten Verläufen erübrigt sich eine Antibiotika-Therapie, da die Krankheit selbstlimitierend verläuft. Bei schweren Verläufen wird eine antibiotische Behandlung durchgeführt. Serotypen von *Y. enterocolitica* besitzen eine induzierbare β -Lactamase-Aktivität, die verschiedene Penicilline und Cephalosporine der 1. und 2. Generation inaktivieren (Cornelis, 1975; Cornelis & Abraham, 1975). Zur Behandlung eignen sich bestimmte Aminoglykoside oder Ceftriaxon, bei einer ZNS-Beteiligung ein Cephalosporin der dritten Generation (Smego et al., 1999).

1.3 Die Spezies *Yersinia enterocolitica*

Die Spezies *Yersinia enterocolitica* kann in 6 Biotypen, welche wiederum in ungefähr 60 Serotypen eingeteilt werden, unterschieden werden. Die Biotypen

1B, 2, 3, 4, 5 und 6 sind humanpathogen, der Biotyp 1A hingegen nicht (Bottone 1997, et al., 1999).

Tabelle 2: Ordnung von Biotyp, Serotyp und Pathogenität von *Y. enterocolitica* (nach Bottone 1997)

Biotyp	Serotyp	Humanpathogenität
1A	O:5 ; O:6,30 ; O:7,8 ; O:18 ; O:46	nein
1B	O:8 ; O ; O:13 ; O:18 ; O:46	ja
2	O:9 ; O:5,27	ja
3	O:1,2,3 O:,27	ja
4	O:3	ja
5	O:2,3	ja

Auf Grund elektronmikroskopischer Aufnahmen gilt *Y. enterocolitica* als extrazelluläres Pathogen (Autenrieth & Firsching, 1996), welches aber auch intrazellulär auftreten kann (Koornhof et al., 1999).

Um die Kolonisierung des Darms zu ermöglichen, muss *Y. enterocolitica* an die Darmwand binden. Versuche von Mantle et al. (1983) haben gezeigt, dass virulente *Y. enterocolitica* Stämme besser an die Membranen des intestinalen Bürstensaums von Kaninchen binden als avirulente. Dabei spielt das äußere Membranprotein YadA eine wichtige Rolle, da es die Bindung des Bakteriums an Hep-2 Zellen (Heesemann & Grüter, 1987) sowie an intestinale Bürstensaummembranen ermöglicht (Mantle et al. 1989; Paerregaard et al., 1991).

YadA wird auf dem 64-75kb großen Virulenzplasmid pYV (plasmid of *Yersinia* virulence) kodiert (Portnoy et al., 1981; El-Tahir & Skurnik, 2001), welches in avirulenten Stämmen nicht vorkommt (Gemski et al., 1980; Portnoy & Falkow, 1981). Stämme mit diesem Plasmid exprimieren einige Virulenzfaktoren bei 37°C, aber nicht bei 25°C (Bottone, 1997), so dass man die Expression von

diesen Virulenzfaktoren auch als Adaptation an den Wirtsorganismus interpretieren kann. Die pYV-Plasmide der verschiedenen *Y. enterocolitica* Spezies sind stark konserviert (Cornelis et al., 1998).

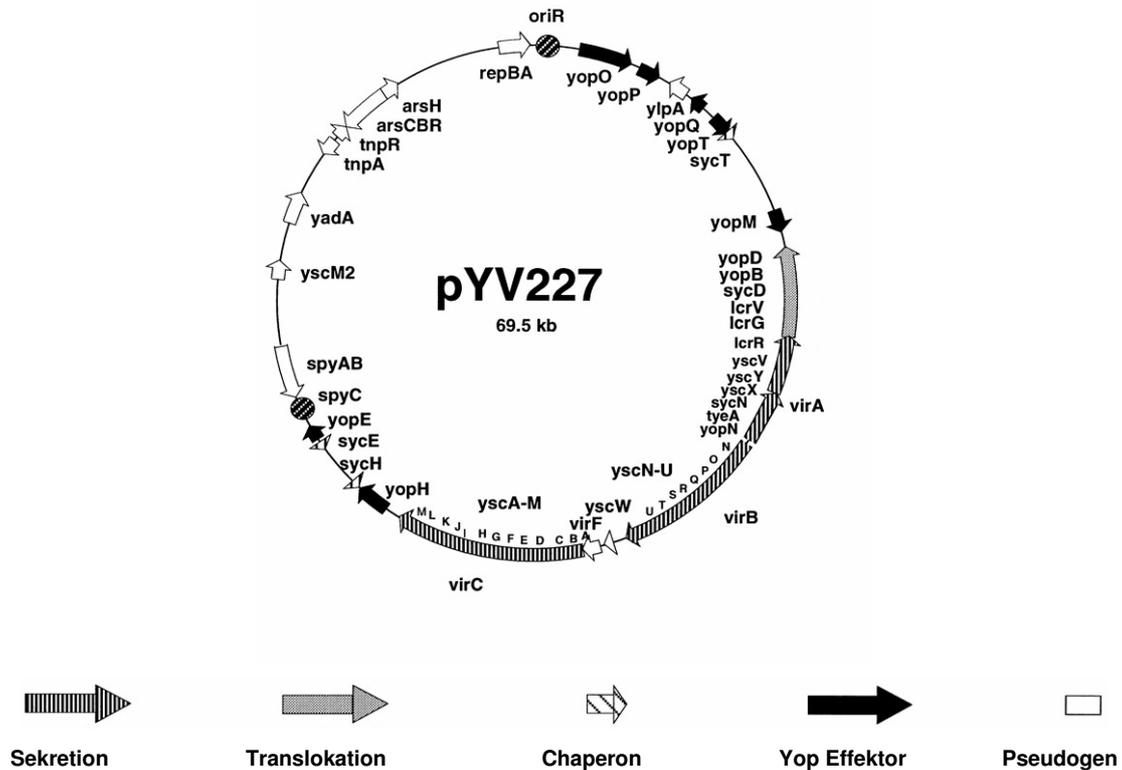


Abbildung 1: Karte des Virulenzplasmids pYV227 des *Y. enterocolitica* Serotyps O:9
 Modifiziert nach Cornelis et al. 1998

Außer dem Membranprotein YadA kodiert das pYV-Plasmid noch für viele weitere Pathogenitätsfaktoren, wobei besonders das Typ III Sekretionssystem mit seinen vielfältigen Effektorproteinen, den *Yersinia* outer proteins, kurz Yops (, zu erwähnen ist (Cornelis et al., 1998). Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht. *Y. enterocolitica* besitzt neben den Plasmid-kodierten Pathogenitätsfaktoren noch solche, die chromosomal lokalisiert sind (Cornelis, 1994).

Tabelle 3: einige pYV-Plasmid kodierte Pathogenitätsfaktoren

Pathogenitätsfaktor	Bekannte Funktionen	Referenzen
<u>YopT</u>	Zerstörung der Aktinfilamente und Veränderungen des Zytoskeletts.	Iriarte & Cornelis, 1998; Zumbihl et al., 1999
<u>YopH</u>	Protein- Tyrosin Phosphatase. Verhindert Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten. Inhibition von Signaltransduktionskaskaden in B- und T- Lymphozyten. Hemmt Proliferation von T- Zellen.	Guan and Dixon, 1990; Black and Bliska, 1997; Black and Bliska, 1995; Yao et al., 1999
<u>YopE</u>	Zytotoxin. Hemmt Phagozytose und zerstört Aktin-Filamente.	Rosqvist et al., 1991 ; Black and Bliska, 2000;
<u>YopM</u>	Plasmaagglutination. Interagiert mit und aktiviert eukaryontische Kinasen.	Leung et al., 1990, Leung and Straley, 1989; Skrzypek et al., 1998
<u>YopO</u>	Zerstörung des Aktinzytoskeletts. Proteinkinase.	Juris et al., 2000, Galyov et al., 1993 ; Barz et al., 2000
<u>YopP</u>	Induziert Apoptose in murinen Makrophagen. Reduziert die TNF α -Sekretion in Makrophagen. Blockiert die MAP Kinase- und NF- κ B-abhängigen Signaltransduktionswege. Hemmt Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 und TNF- α sowie die Expression eukaryotischer, inflammatorischer, zellulärer Adhäsionsmoleküle.	Denecker et al., 2001; Boland and Cornelis, 1998; Orth et al., 2000; Ruckdeschel et al., 2001
<u>LcrV</u>	Supprimiert die Expression von TNF α und IFN- γ . Inhibiert Chemotaxis von Neutrophilen. Induziert IL-10 Produktion in Makrophagen.	Nakajima et al., 1995; Welkos et al., 1998 ; Sing et al., 2002
<u>YadA</u>	Vermittelt zelluläre Adhäsion durch Bindung an Kollagen, zelluläres Fibronectin und Laminin. Verleiht Phagozytoseresistenz und Schutz gegen das Wirken des Komplementsystems.	Heesemann and Grüter, 1987; Roggenkamp et al., 1996; Roggenkamp et al., 1995; Schulze-Koops et al., 1993; Tamm et al., 1993; China et al., 1993

1.4 Autotransporter

Die zwei Membranen gramnegativer Bakterien erschweren die Sekretion bakterieller Proteine in das extrazelluläre Milieu, sowie die Biogenese äußerer Membranproteine, da gleich zwei Membranbarrieren, die äußere und die innere Bakterienmembran, sowie der periplasmatische Raum, welcher kein ATP enthält (Wüfling & Plückthun, 1994), passiert werden müssen. Bakterien haben zu diesem Zweck verschiedene Sekretionsmechanismen entwickelt, welche man in sieben verschiedene Typen unterteilen kann. Das Protein kann in zwei Schritten in die äußere Membran durch die beiden Membranen geschleust oder direkt in den Extrazellulärraum transportiert werden (Dautin & Bernstein, 2007). Das Typ V Sekretionssystem ist jedoch von allen übrigen sechs das am weitesten verbreitete und es wurde lange Zeit angenommen, es sei auch das einfachste. Das Typ V Sekretionssystem beschreibt eine heterogene Gruppe von Proteinen, die Autotransporter. Sie besitzen alle eine abspaltbare Signalsequenz, eine N-terminale Passenger-Domäne zwischen unter 20 und über 400 kDa, sowie einen C-terminalen Translokator- oder β -Domäne von ungefähr 30 kDa (Dautin & Bernstein, 2007). Die Autotransporter können wiederum in klassische und in trimere Autotransporter unterteilt werden (Cotter et al., 2005). Die Signalsequenz markiert das Protein für das Sec Sekretionssystem der inneren Membran und initiiert deren Passage (Peterson et al., 2006; Sijbrandi et al., 2003). Ohne β -Domäne gelangt das Protein nicht in den Extrazellulärraum (Pohlner et al., 1987). Dies führte zur These, dass die β -Domäne eine Pore aus transmembranalen β -Faltblättern bildet, welche in die äußere Membran integriert wird und durch die die Passengerdomäne, das eigentliche, zu sekretierende Protein, hindurchtritt (Henderson et al., 1998). Mittlerweile wird angenommen, dass die sogenannten β -barrell assembly machinery, auch BAM-Komplex genannt, bei der Insertion von äußeren Membranproteinen eine Schlüsselrolle zukommt. Nach Eintritt ins Periplasma wird die leader Sequenz von einer Signalpeptidase erkannt und prozessiert, worauf sich die äußeren Membranproteine mit periplasmatischen Chaperon-Proteinen wie Skp, DegP und SurA assoziieren. Diese halten die OMPs in

ungefalteten Zustand und transportieren die Membranproteine an den BAM-Komplex. Wie der BAM-Komplex jedoch genau an der Faltung und Insertion von äußeren Membranproteinen in die äußere Bakterienmembran beteiligt ist, konnte noch nicht endgültig geklärt werden. (Zusammengefasst in Knowles et al., 2009)

1.5 Das äußere Membranprotein *Yersinia* Adhäsins A

Yersinia Adhäsins A wird von dem gleichnamigen Gen, welches sich auf dem pYV-Virulenzplasmid befindet, kodiert (Skurnik & Wolf-Watz, 1989) und wird bei 37°C aber nicht unter 30°C exprimiert (Skurnik & Toivanen, 1992). Die Expression von YadA ist von dem VirF/LcrF Aktivator abhängig (Lambert de Rouvroit et al., 1992; Skurnik & Toivanen, 1992), ist bei Anzucht in Mangelmedium am größten (Kapperud et al., 1985) und ist nicht Ca²⁺-abhängig (Skurnik, 1985).

YadA bestehend aus drei homologen Untereinheiten und gilt als der Prototyp der trimeren Autotransporter (Roggenkamp et al., 2003; Cotter et al., 2005).

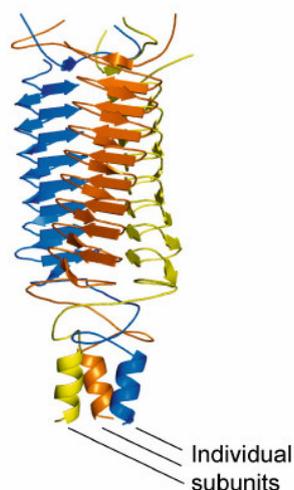


Abbildung 2: Kopfdomäne und Teil vom Stiel von YadA mit Darstellung der drei verschiedenen Untereinheiten. Nach Dautin und Bernstein, 2007

Jedes Monomer besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, einer Head-Domäne, einer Neck-Domäne, einer Stalk-Domäne, einer Linking-Region, deren C-terminales Ende einen Hairpin-Loop bildet, sowie einer C-terminalen Transmembrandomäne, bestehend aus vier β -Faltblattstrukturen. Die drei Stalk-Domänen bilden miteinander coiled-coil Strukturen (Roggenkamp et al., 1996). Es gibt vier gängige Modelle zur Erklärung der Biogenese trimerer Autotransporter, welche die Passage des Monomers an die Bakterienoberfläche erklären. Entweder werden die drei Head-, Neck- und Stalk-Domänen durch die aus Transmembrandomäne und Linking-Region gebildete und in der äußeren Membran verankerten Translokator-Domäne direkt oder als hairpin-loop an die Bakterienoberfläche geschleust (Roggenkamp et al., 2003; Ackermann et al., 2008). Weitere Modelle schlagen den Transport als Multimer von verschiedenen Monomeren durch eine gemeinsame Pore (Veiga et al., 2002) oder die Insertion der Autotransporter in die äußere Bakterienmembran durch den BAM-Komplex (Oomen et al., 2004). Die ersten drei Modelle werden in Abbildung 3 erläutert. Das Multimermodell und das Threading-Modell sind jetzt jedoch vom Modell des BAM-Komplex weitgehend widerlegt worden (Knowles et al., 2009).

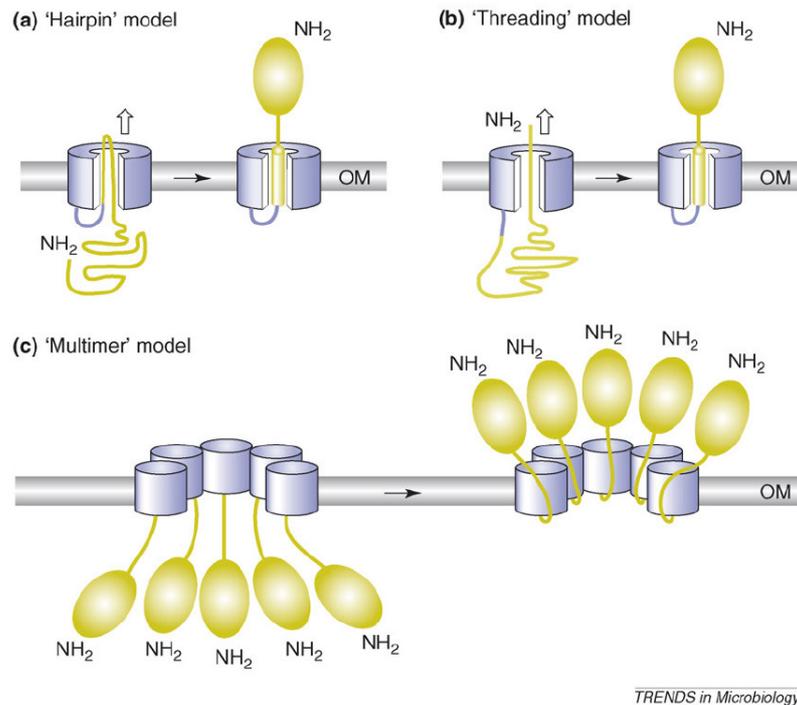


Abbildung 3: Modelle der Insertion von Autotransporter-Proteinen in die äußere Membran Gram negativer Bakterien (Bernstein, 2007)

Im „Hairpin Modell“ faltet sich das Monomer zuerst und tritt als doppelter Strang durch die Pore hindurch. Im Threading Modell tritt das N-terminale Ende zuerst durch die Pore hindurch und das Monomer wird als Strang an die Oberfläche gefädelt. Im Multimer Modell bilden mehrere Transportuntereinheiten eine gemeinsame, große Pore, durch die die Monomere hindurchtreten.

Das molekulare Modell des gesamten YadA-Proteins wurde 2006 von Koretke et al. erstellt (Koretke et al., 2006).

Grosskinsky et al. haben 2007 gezeigt, dass die Größe der Pore des Membranankers wesentlichen Einfluss auf die Stabilität, sowie auf die Passage-Rate von YadA ausübt (Grosskinsky et al., 2007). Dafür wurde das G389, eine Aminosäure der in das Lumen hineinragenden Seitenkette durch andere Aminosäuren mit längeren Seitenketten (A, S, T, N, H) ersetzt. Je größer die Seitenkette der eingebrachten Aminosäuren war, desto weniger YadA konnte auf der Bakterienoberfläche nachgewiesen werden.

An der Oberfläche bildet das Protein eine so genannte Lollipop-Struktur und bedeckt die gesamte Bakterienoberfläche, was dem Bakterium hydrophobe Eigenschaften verleiht (Hoiczky et al., 2000).

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verschiedenen Funktionen von YadA.

Tabelle 4: die Funktionen von YadA, modifiziert nach El-Tahir & Skurnik, 2001

Eigenschaften	Beschreibung	Referenzen
<u>Virulenz</u>	Voraussetzung für die Virulenz von <i>Y. enterocolitica</i> -Stämmen im Mausmodell	Pepe et al., 1995; Tamm et al., 1993
<u>Autoagglutination</u>	Aggregation von Bakterien durch YadA-vermittelte hydrophobe Wechselwirkungen	Balligand et al., 1985; Skurnik et al., 1984
<u>Hämagglutination</u>	YadA ⁺ <i>Yersiniae</i> führen zur Agglutination von Meerschweinchen-Erythrozyten	Kapperud and Lassen, 1983; Kapperud et al., 1985
<u>Hydrophobizität</u>	YadA ⁺ Bakterienhaufen lösen sich in organischen Lösungsmitteln und binden an Polystyren.	Lachica and Zink, 1984; Lachica et al., 1984; Paerregaard et al., 1991a; Paerregaard et al., 1991b
<u>Kollagenbindung</u>	YadA ⁺ Bakterien oder aufgereinigtes YadA binden an α_1 -Ketten von Kollagen, vermittelt von den NVSA/GXXS-Motiven der Kopf-Domäne	El Tahir et al., 2000; Emödy et al., 1989; Tamm et al., 1993
<u>Fibronectinbindung</u>	YadA ⁺ Bakterien oder aufgereinigtes YadA binden an immobilisiertem jedoch nicht löslichem zellulärem Fibronectin mit niedrigerer Affinität als Plasma-Fibronectin	Schulze-Koops et al., 1993; Tertti et al., 1992
<u>Lamininbindung</u>	YadA ⁺ Bakterien oder aufgereinigtes YadA binden Laminin Fragment E1	Flügel et al., 1994; Tamm et al., 1993
<u>Serumresistenz</u>	YadA verhindert die Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems. Bindet an Faktor H und C4bp.	Balligand et al., 1985; China et al., 1993; Pilz et al., 1992; Roggenkamp et al., 1996; Kirjavainen et al., 2008
<u>Zellinvasion</u>	YadA vermittelt die Invasion von Zellkulturen	Bliska et al., 1993; Yang and Isberg, 1993

<u>Verursachung von Arthritis</u>	YadA und dessen kollagenbindendes Potential ist eine Voraussetzung für die Entstehung einer reaktiven Arthritis im Tiermodell (Ratte)	Gripenberg-Lerche et al., 1995; Gripenberg-Lerche et al., 1994;
<u>Bindung an Bürstensaummembranen und Muzin</u>	YadA ⁺ Bakterien binden an Bürstensaummembranevesikeln, aufgereinigtes Muzin, sowie an Dünndarmgewebe des Kaninchens.	Mantle et al., 1989; Paerregaard et al., 1991a; Paerregaard et al., 1991b
<u>Bindung an der Submukosa</u>	YadA ⁺ Bakterien binden an intestinale Submukosa. Diese Bindung wird durch Kollagen/Laminin-Behandlung aufgehoben.	Skurnik et al., 1994
<u>Epithelzellenadhäsion</u>	YadA ⁺ Bakterien binden an Epithelzellmembranen und verhindern Rezeptor-vermittelte Phagozytose.	Bukholm et al., 1990; Heesemann and Grüter, 1987
<u>Bindung an neutrophile Granulozyten</u>	YadA ⁺ Bakterien binden an neutrophile Granulozyten. Hierbei kommt der N-terminalen Domäne der Kopf-Region eine Schlüsselrolle zu.	Roggenkamp et al., 1996; Ruckdeschel et al., 1996
<u>Inhibition Interferon-vermittelter Eigenschaften</u>	Interferon-behandelte Zellkulturen können nicht von Salmonella und Shigella, aber doch von YadA ⁺ <i>Y.pseudotuberculosis</i> Stämmen invadiert werden.	Bukholm et al., 1990
<u>Induktion von Interleukin-Produktion</u>	YadA Induziert die IL-8 Produktion in Epithelzellen.	Schmid et al., 2004

1.6 Das periplasmatische *stress-response* System von *E. coli*

Analog zu den zytoplasmatischen Mechanismen, die *E. coli* zur Bewältigung von metabolischem, physikalischem und chemischem Stress entwickelt hat, besitzt das Bakterium ebenfalls ein *stress-response* System im

periplasmatischen Raum (Raivo & Silhavy, 2001), welches gegen Störungen im Periplasma und in der äußeren Bakterienmembran gerichtet ist.

Dieses besteht aus verschiedenen, im Periplasma vorkommenden Proteinen, deren Expression über Stress-sensitive Mechanismen reguliert werden.

Unter anderem gehören zu diesen Proteinen Transkriptionsfaktoren, die das stress-response System positiv oder negativ verstärken, sowie Enzyme mit proteolytischer und/oder Faltungsfunktion (Rowley et al., 2006).

Bisher sind vier stress-response Systeme identifiziert worden: das extracytoplasmatic function (ECF) sigma factor System, das Cpx-System, das BaeRS-System, und das Phage-shock-response System, wovon die beiden erstgenannten die am besten untersuchten sind (Rowley et al., 2006).

Durch Stressoren wie Hitze, Ethanol und Akkumulation von äußeren Membranproteinen, also Vorgänge welche die korrekte Passage von äußeren Membranproteinen vom Periplasma an die Bakterienoberfläche stören können, wird das ECF σ -System aktiviert (Rowley et al., 2006). Dabei kommt dem Sigma Faktor E (σ^E) eine Schlüsselrolle zu (Erickson et al., 1987). An das RNA polymerase core enzyme (E) gebunden, transkribiert E σ^E stress-response Gene, die zur Expression von periplasmatischen Enzymen wie Chaperonen und Proteasen führen (Rouvière et al., 1995; Rhodius et al., 2006). Im inaktiven Zustand wird der Transkriptionsfaktor an der Innenseite der inneren Bakterienmembran durch die cytoplasmatische Domäne des transmembranösen anti- σ Faktors RseA gebunden (Hasselblatt et al., 2007). Fallen falsch gefaltete Proteine im Periplasma an, aktivieren diese die dem Periplasma zugewandte, an der inneren Bakterienmembran gebundene Protease DegS, welche RseA an der periplasmatischen Seite schneidet (Walsh et al., 2003). Dadurch wird der RseP-Inhibitor RseB von RseA abgespalten, was zu Aktivierung der membran-gebundenen Protease RseP führt (De Las Penas et al., 1997; Cezairliyan & Sauer, 2007; Kim et al., 2007). Dies führt zur Abspaltung vom zytoplasmatischen RseA mit dem gebundenen σ^E (Ades et al., 1999; Kanehara et al., 2002), welches nun mit der RNA Polymerase interagiert und die Transkription von σ^E -abhängigen stress-response Genen hochreguliert (Flynn et al., 2004; Levchenko et al., 2005; Chaba et al., 2007). Zu den σ^E -

regulierten Genen gehören u. a. *degP*, eine Chaperon-Protease, *skp*, ein Chaperon, *fkpA* und *surA*, Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, letztere zusätzlich mit Chaperon-Funktion, das eigene Gen *rpoE*, sowie *rseA*, *rseB*, *rseC* und *rseP*, Gene der gleichnamigen Proteine in der σ^E -assoziierten Signaltransduktionskette (Rowley et al., 2006).

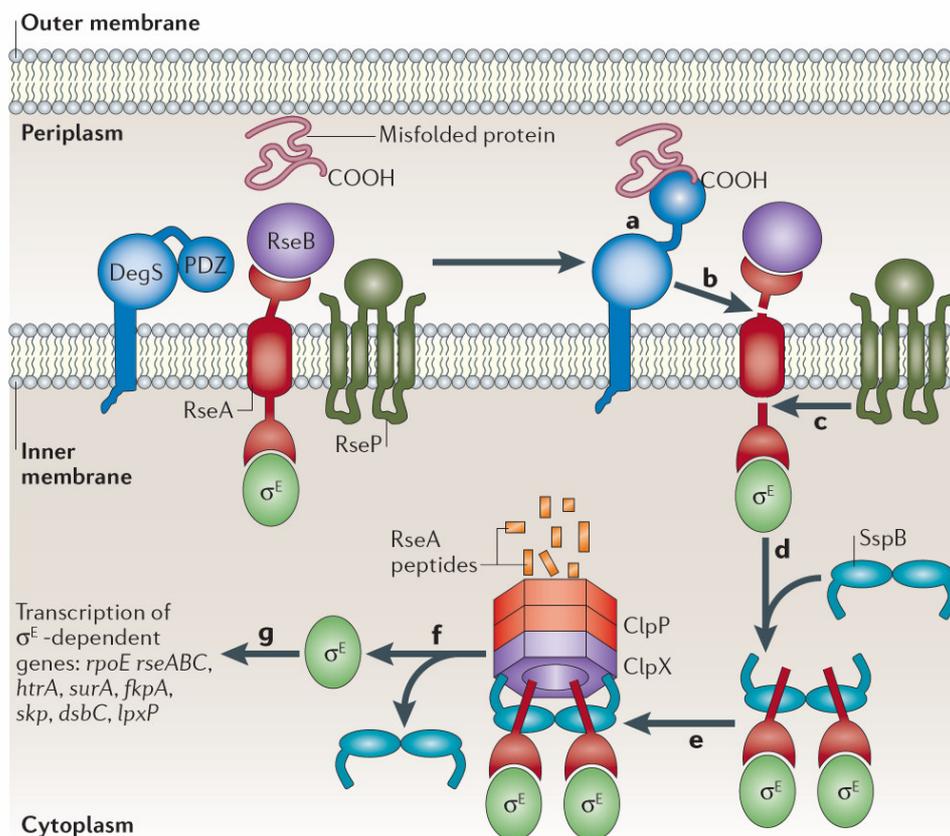


Abbildung 4: Modell der Regulierung der σ^E -Signalkaskade, aus Rowley et al., 2006

Der Hauptmechanismus für die σ^E -Aktivierung ist die proteolytische Spaltung von RseA. In der Abwesenheit von fehlgefalteten Proteinen wird diese Spaltung durch die Interaktion der PDZ-Domäne mit dem katalytischen Zentrum von DegS verhindert. In Anwesenheit von fehlerhaft gefalteten äußeren Membranproteinen interagieren diese mit der PDZ-Domäne (a). Dies führt zur Aktivierung der Proteasefunktion von DegS, welche RseA an einer periplasmatisch lokalisierten Stelle spaltet (b). Daraufhin spaltet RseP RseA an einer cytoplasmatischen Stelle, welches den gebundenen σ^E -Faktor ins Zytoplasma freisetzt (c). Dort bindet der gebundene σ^E -Faktor an SspB (d), welches den Komplex zu ClpXP hin leitet (e). ClpXP degradiert spezifisch das RseA-Fragment, und setzt so den σ^E -Faktor frei. Dadurch kann σ^E an eine RNA Polymerase binden und die Transkription σ^E -abhängiger Gene initiieren. Nach Rowley et al., 2006

Ein weiterer extrazytoplasmatischer stress-response Signalweg in *E. coli* ist die zweiteilige CpxRA-Signaltransduktionskaskade, bestehend aus der Transmembran-Sensor-Kinase CpxA und dem zytoplasmatischen response-Regulators CpxR (Raivio & Silhavy, 1997, 1999; DiGiuseppe & Silhavy, 2003; Pogliano et al., 1997). Diese Signalkaskade reguliert die Expression vieler stress-response Proteine, bei einigen, wie z.B. DegP, in Überlappung mit der σ^E -Regulation. Weitere Bestandteile sind die Disulfidisomerase DsbA, die periplasmatische Peptidyl-Prolyl-Isomerase PpiD, sowie CpxR, CpxA und CpxP. Die Cpx-Signaltransduktionskaskade wird durch Stress der äußeren Bakterienmembran aktiviert. Stressoren können z.B. alkalischer pH (Danese & Silhavy, 1998) und gestörte Zusammensetzung der äußeren Membran durch erhöhte Expression von Lipoproteinen wie NlpE oder P Pili sein (Mileykovskaya & Dowhan, 1997; Rowley et al., 2006). Dies führt zur Dissoziation des negativen Regulators CpxP von CpxA, worauf die Kinase-Funktion von CpxA aktiviert und CpxR von CpxA phosphoryliert wird (Raivio et al., 1999; Raivio et Silhavy, 1997; DiGiuseppe & Silhavy, 2003; De Wulf et al., 2000). Das phosphorylierte CpxR reguliert die Expression der Zielgene durch Bindung an spezifische Erkennungsstellen (De Wulf et al., 1999).

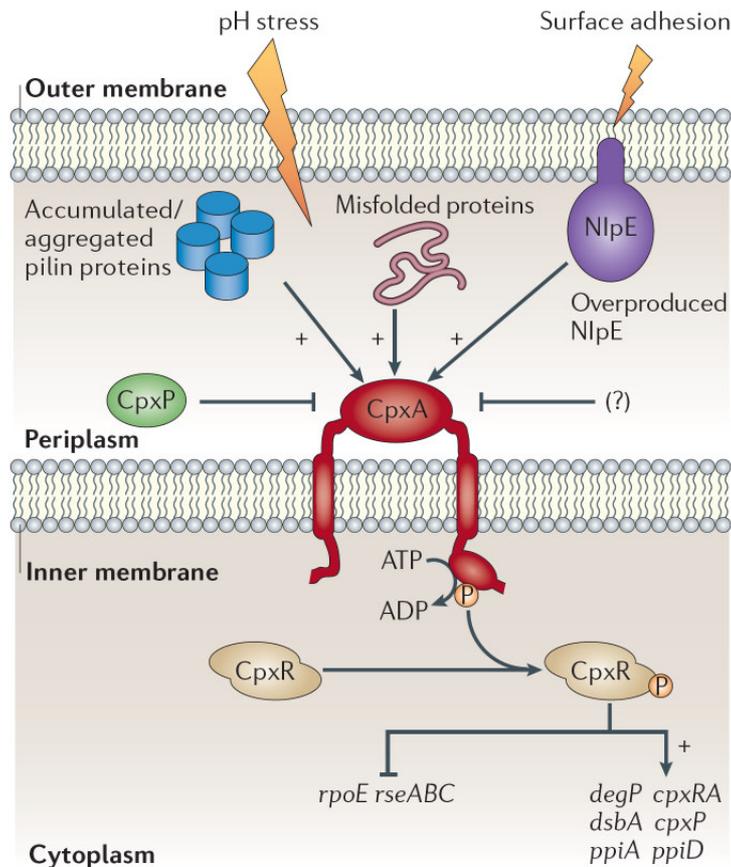


Abbildung 5: Modell der Regulation der CpxRA Signalkaskade, nach Rowley et al., 2006

Verschiedene Stressfaktoren, die äußere Bakterienmembran betreffend, führen durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus zu einer Autophosphorylierung eines cytoplasmatisch gelegenen Histidins von CpxA. CpxA transferiert dann die Phosphatgruppe auf CpxR. Das phosphorylierte CpxR kann dann an spezifischen Stellen der DNA binden und dadurch die Transkription der Zielgene aktivieren, oder positiv oder negativ regulieren.

Für manche periplasmatische stress-response Proteine gibt es also eine Überlappung der Regulierung, durch CpxRA und σ^E . Eines dieser Proteine ist das periplasmatische Enzym DegP, auch unter dem Namen HtrA bekannt, welches eine doppelte Funktion einnimmt, nämlich die einer Protease und die eines Chaperons zugleich.

1.7 Das periplasmatische Enzym DegP

Das periplasmatische Enzym DegP, auch HtrA genannt (Lipinska et al. 1988), gehört zur Familie der Serinproteasen (Skórko-Glonek et al. 1995), d.h. das katalytische Zentrum des Enzyms enthält die Aminosäure Serin.

Das DegP-Monomer besitzt zwei verschiedene, konservierte Schlüsseldomänen, nämlich eine Proteasedomäne und zwei C-terminale PDZ-Domänen (Kim & Kim, 2005).

Die proteolytische Domäne wird von zwei β -Barrels gebildet, welche mit einer flexiblen Linker-Domäne, Q-Linker benannt, verbunden werden (Kim & Kim, 2005). Die katalytische Triade von DegP, welche für die Proteolyse verantwortlich ist, besteht aus den Aminosäuren Serin210, Aspartat135 und Histidin105 (Rawlings & Barret, 1994).

Die PDZ-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen (Saras & Heldin, 1996).

Zunächst wurde DegP als periplasmatische Protease in *E. coli* identifiziert, die irreversibel falsch gefaltete Proteine im bakteriellen Periplasma abbaut und notwendig für das Überleben bei hohen Temperaturen ist. (Lipinska et al., 1988; Strauch & Beckwith, 1988). Die proteolytische Aktivität von DegP ist ATP-unabhängig (Laskowska et al., 1996). Regelrecht gefaltete Proteine wie das native MalS (Spiess et al., 1999) werden hingegen nicht abgebaut. Grosskinsky et al. (2007) haben gezeigt, dass G389 punktmutierte YadA Moleküle deutlich stärker auf der Bakterienoberfläche von DegP-defizienten *E. coli* Stämmen exprimiert werden als in DegP-kompetenten, was den proteolytischen Abbau von punktmutierten YadA Molekülen durch DegP nahe legt.

Des Weiteren ist eine Chaperon-Aktivität von DegP bekannt. Diese Funktion nimmt DegP aber nur bei niedrigen Temperaturen wahr (Spiess et al., 1999).

Die proteolytische Aktivität von DegP nimmt hingegen bei steigenden Temperaturen erheblich zu, am schnellsten zwischen 32°C und 42°C (Skórko-Glonek et al. 1995; Spiess et al. 1999). Daher wurde ein temperaturabhängiger, funktioneller „switch“ von Chaperon zu Protease und umgekehrt vorgeschlagen. Hierbei könnte den PDZ-Domänen eine Schlüsselfunktion

zukommen, da Krojer et al. (2002) ihnen eine regulatorische Funktion der proteolytischen Aktivität zuschrieb.

Drei DegP Monomere bilden durch Interaktion der proteolytischen Zentren Trimere, wovon zwei sich durch Interaktion der Q-Linker zu Hexameren anlagern (Krojer et al., 2002). Die letzte Publikation von Krojer et al. (2008) legt nahe, dass das DegP-Hexamer wahrscheinlich die Konfiguration des ruhenden Enzyms darstellt. Im aktiven Zustand lagere sich dann DegP zu großen sphärischen Dodecameren oder 24-meren an. Die zentrale Kavität dieser sehr großen 24-meren ist groß genug, um ein ca. 300 kDa großes Protein fassen zu können und hiermit alle bekannten äußeren Membranproteine (Huber & Bukau, 2008). Darüber hinaus zeigten Krojer et al., dass durch Zugabe physiologischer Substrate sich DegP eben zu diesen Multimeren zusammenlagert und dadurch dessen proteolytische Aktivität um das 15-fache steigt. DegP lagert sich also um seine Substrate herum an und kapselt diese dann ab, um diese dann proteolytisch abzubauen. Eine Einkapselung der Substrate zum Zwecke der Faltung im Rahmen der Chaperon-Aktivität von DegP wird ebenfalls vorgeschlagen (Krojer et al., 2008).

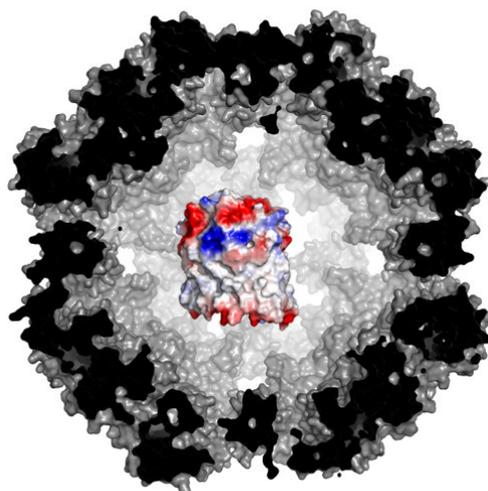


Abbildung 6: DegP₂₄ mit eingefangenem OmpC, Pressephoto des IMPs, Wien

(Quelle: <http://www.imp.ac.at/pressefoto-degp>)

1.8 Zielsetzung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass YadA, das Punktmutationen an einem stark konservierten Glycin innerhalb des C-terminalen Membranankers enthält, je nach Größe der inserierten Aminosäure (A<S<T<N<H) in einem *E. coli* Stamm, der die periplasmatische Chaperone-Protease DegP exprimiert, DegP-abhängig degradiert wird (Grosskinsky et al., 2007). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die YadA-Mutanten, die in signifikant geringerem Maße in die äußere Membran inseriert werden (YadA G389T, N, H) als wildtypisches YadA oder die Mutanten YadA G389S und G389A, die Expression von DegP aktivieren. Die zugrundeliegende Hypothese dafür war, dass ein äußeres Membranprotein (OMP), das in der Integrationsgeschwindigkeit bzw. -effizienz beeinträchtigt ist, im Periplasma akkumuliert. Diese Akkumulation oder auch die Akkumulation fehlgefalteter OMPs wirkt toxisch für die Bakterien und induziert daher eine Stressantwort, die unter anderem zur Expression von DegP führt. Um die periplasmatische Akkumulation unserer YadA-Mutanten indirekt zu quantifizieren, sollte in dieser Arbeit die DegP mRNA- und Proteinexpression nach Induktion der Expression der verschiedenen YadA-Mutanten gemessen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarose-Gel-Elektrophoresekammern	BioRad, München
Analysewaagen (R160P, PT 1200)	Sartorius, Göttingen
Bakterien-Brutschrank (B20)	Heraeus, Hanau
Brutschrank Function Line	Heraeus, Hanau
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA, Köln
Eppendorf-Zentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschränke	Kirsch, Offenburg
Gelelektrophoreseapperratur PowerPac 1000	BioRad, München
Heizblock (TR-L-288)	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Kühlschränke	Liebherr, Biberach
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen
Mikrowelle Micromat	AEG, Stockholm, Schweden
PCR Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Photometer Ultrospec 3000 pro	AmershamPharmacia Freiburg
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttelgerät, Unimax 2010	Heidolph, Kelheim
SDS-PAGE-Kammern (Protean III; Mini Protean)	BioRad, München
Sicherheitswerkbank (BDK-S 1800)	BDK Luft- und Reinraumtechnik
Real-Time PCR Thermocycler	Applied Biosystems,

Roller-Mixer

Thermomixer comfort

UV-Transluminator BioDoc Analyse

Vortexer mixer 7-2020

Wasserbad

Zentrifuge Eppendorf 5412 R, Minispin plus

Zentrifuge Multifuge 3S-R

Zentrifuge Rotilabo®

Foster City, USA

Greiner,

Frickenhausen

Eppendorf, Hamburg

Biometra, Göttingen

neoLab, Heidelberg

Memmert, Schwabach

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Hanau

Carl Roth, Karlsruhe

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Autoradiographie-Filme (Kodak X-OMAT)

Einmalküvetten

Eppendorf-Gefäße

Glaskolben und Flaschen

Membranen für Immunoblots (Cellulosenitrat)

Parafilm „M“

PCR-Gefäße

Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)

Pipettenspitzen (10 µl)

Pipettenspitzen (200 µl)

Pipettenspitzen (1000 µl)

RT-PCR 96-Well Platten

RT-PCR Adhesive Covers

Sigma-Aldrich,

Deisenhofen

Sarstedt, Berlin

Eppendorf, Hamburg

Schott Duran, Mainz

Schleicher & Schuell,

Dassel

American National

Can, USA

Fisher Scientific,

Schwerte

Becton Dickinson,

Heidelberg

Gilson, USA

Brand, Wertheim

Sarstedt, Berlin

PeqLab, Erlangen

Applied Biosystems,

Rundboden-Röhrchen (13 ml)
Spitzboden-Röhrchen (15 ml, 50 ml)

Foster City, USA
Greiner, Nürtingen
Becton Dickinson,
Heidelberg
Millipore, Eschborn

Whatman Filterpapier

Weitere Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Eppendorf, Hamburg; Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg; Greiner, Nürtingen; Sartorius, Göttingen.

2.1.3 Chemikalien

β -Mercaptoethanol

Merck, Darmstadt

Acrylamid Mix

Roth, Karlsruhe

Agarose

Tebu-Bio, Offenbach

Anhydrotetrazyklin

Ammoniumpersulfat

Merck, Darmstadt

Aqua ad injectabilia

Braun, Melsungen

Bacto Trypton

ICN, USA

Bacto Hefeextrakt

ICN, USA

Bromphenolblau

Sigma-Aldrich,
Taufkirchen

dNTPs

ECL-Reagenz

Roth, Karlsruhe

EDTA

Serva, Heidelberg

Essigsäure p.a.

Roth, Karlsruhe

Ethanol p.a.

Merck, Darmstadt

Glycin

Roth, Karlsruhe

Isopropanol

Merck, Darmstadt

Loading Buffer

Magermilchpulver

Saliter, Obergünzburg

PCR-Puffer 10x	
Ponceau S	Serva, Heidelberg
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
RNAse-Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween	Merck, Darmstadt

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

2.1.4 Puffer und Lösungen

Bakterienkultur

Folgende Medien wurden für Bakterienkulturen verwendet:

Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertani Medium	5 g NaCl 5 g Bacto Hefeextrakt 10 g Bacto Trypton in 1 l H ₂ O bidest. gelöst, pH 7,4-7,6
Einfriermedium für Bakterienkulturen "Gly-Stocks"	20 % Glycerin-haltiges LB-Medium
LB-Ampicillin Medium	Verdünnung 1:1000, Endkonzentration 100 mg/l

LB-Agarplatten	Herstellung im Hause
LB-Agarplatten mit Ampicillin	Ampicillinkonzentration 100 µg/ml

RNA-Extraktion

Folgende Puffer wurden für die Extraktion verwendet:

Puffer	Zusammensetzung
TE-Lysozym Puffer	10 mM Tris CL 1 mM EDTA pH 8,0 Lysozym Konzentration 400 µg/ml
RLT-Mercaptoethanol Puffer	RLT-Puffer von der Firma Qiagen bezogen Zugabe von 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml RLT-Puffer
RPE-Puffer	RPE-Puffer von der Firma Qiagen bezogen. 1:5 mit Ethanol p.a. verdünnt

Agarosegel-Elektrophorese

Folgende Puffer wurden zur Agarosegel-Elektrophorese verwendet:

Puffer	Zusammensetzung
TBE-Puffer	1:5 Verdünnung von der 5-fach konzentrierten Stammlösung. Zusammensetzung der Stammlösung wie folgt: 54 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH-Wert 8,3 (eingestellt mit Essigsäure) Aqua bidest. ad 1l

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Im Rahmen der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden verwendet:

Lösung	Zusammensetzung
Tris Puffer 1,5 M	181,71 g Tris Base ad 1l Aqua bidest. mit HCL auf pH 8,8 titriert
Tris Puffer 0,5 M	60,57 g Tris Base ad 1l Aqua bidest. Mit HCL auf pH 6,8 titriert

<p>Trenngel, 10 % Acrylamid Mix</p>	<p>Pro Gel: 1,9 ml H₂O Millipore 1,7 ml 30 % Acrylamid Mix 1,3 ml 1,5 M Tris Puffer, pH 8,8 50 µl 10 % SDS 50 µl 10 % Ammoniumpersulfat 2µl TEMED</p>
<p>Sammegel, 10 % Acrylamid Mix</p>	<p>1,4 ml H₂O Millipore 335 µl 30 % Acrylamid Mix 250 µl 0,5 M Tris Puffer, pH 6,8 20 µl 10 % SDS 20 µl 10 % Ammoniumpersulfat 2 µl TEMED</p>
<p>SDS-Laufpuffer</p>	<p>Verwendete Lösung durch 1:5 Verdünnung der Stammlösung hergestellt. Zusammensetzung der Stammlösung wie folgt: 60,55 g Tris Base 288,15 g Glycerin 100 ml 10 % SDS ad 2 l H₂O bidest.</p>
<p>Lämmli-Puffer, 5x konzentriert</p>	<p>314 mM Tris/HCl (pH 6,8) 50 % (v/v) Glycerin 5 % (w/v) SDS 5 % β-Mercaptoethanol 0,0025 % Bromphenolblau</p>

Western-Blot

Für Western-Blots wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung	Zusammensetzung
Blot-Puffer	3 g Tris Base 14,44 g Glycin ad 1 l H ₂ O bidest.
Wasch-Puffer	18 g NaCl 20 ml 1 M Tris pH 7,4 4 ml Tween 20 ad 2 l H ₂ O bidest.
Block-Puffer	5 g Magermilchpulver der Firma Silter in 100 ml Wasch-Puffer (5%-Lösung)
Ponceau Rouge, 10x konzentriert	10 g Ponceau S 150 ml TCA 150 g Sulfosalicylsäure Aqua bidest.

2.1.5 Antikörper

Im Rahmen des Immunoblots verwendeten Antikörper:

Primärantikörper:

Anti-DegP Rabbit IgG Antikörper

Geschenk des Department of
Biochemistry, University of Gdansk,
Polen (Skórko-Glonek et al. 2006)

Sekundärantikörper

Peroxidase-konjugierter Goat Anti-Rabbit IgG Fragment- spezifischer Antikörper	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
--	---

2.1.6 Antibiotika

Im Rahmen der Bakterienkulturen verwendete Antibiotika:

Ampicillin	ICN, USA
------------	----------

2.1.7 Enzyme

Verwendete Enzyme:

Taq Polymerase	Fermentas
Lysozym	Applichem

2.1.8 Primer

Im Rahmen der PCR und qRT-PCR verwendete Primer:

Oligonukleotid	Sequenz	Schmelz- temperatur	Annealing Temperatur
YadA_5	5'-atgactaaagattttaagatcagtgtc-3'	49 °C	47 °C
YadArev_400bp'	5'-cagcgacaccagtatctgaag-3'	50 °C	47 °C
YadA_100_5'	5'-agaaagcaatccgtgaatcg-3'	52 °C	47 °C
YadA_100_3'	5'-gctgtttaagcgggctgaac-3'	52 °C	47 °C

Oligonukleotid	Sequenz	Schmelztemperatur	Annealing Temperatur
degP_fwd	5'-ccacattagcactgag-3'	34 °C	53 °C
degP_rev	5'-ttaaagaccgtcgc-3'	38 °C	53 °C
degP_fwd 2	5'-gctgatccaaatccagaacc-3'	51 °C	50 °C
degP_rev 2	5'-tgttgacaccgatcagttcg-3'	52 °C	50 °C
DegP_100_5'	5'-caggttgattccagctccat-3'	51 °C	48 °C
Degp_100_3'	5-acctttcttcaggccgatct-3'	52 °C	48 °C

Alle Primer wurden von der Firma Biomers, Ulm, bezogen.

2.1.9 Marker und kommerzielle Kits

DNA-Ladder :	GeneRuler 100bp DNA-Ladder Plus, Fermentas
Protein-Ladder:	PageRuler, Fermentas
RNA-Extraktion:	RNeasy, Qiagen
RT-PCR:	QuantiTect RT-PCR, Qiagen
qRT-PCR :	QuantiTect SYBR-Green PCR-Mix, 2x konzentriert, Qiagen
	SYBR-Green I qPCR Master Mix Plus, 2x konzentriert, Eurogentec

2.1.10 Bakterienstämme und Vektoren

In dieser Arbeit verwendeter Bakterienstamm:

Stämme	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)omp8	F ⁻ , ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) ; ΔlamB ompF::Tn5ΔompAΔompC	(Prilipov et al., 1998)

In dieser Arbeit verwendeten Plasmide:

Plasmid	Beschreibung	Referenz
<u>pASK IBA2 YadAO:8</u>	YadAO:8 von <i>Y. enterocolitica</i> aus pYadA ^{O:8} über Restriktionsschnittstellen XbaI und SalI in pASK-IBA2 eingeführt; Ampicillin-Resistenz	(Schmid et al., 2004)
pASK IBA2 YadAwt	Keine Mutation, Expression von YadA Wildtyp, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)
pASK IBA2 G389A	Durch gerichtete Punktmutation hervorgerufener Aminosäureaustausch G398A im Membrananker von YadA, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)
pASK IBA2 G389S	Durch gerichtete Punktmutation hervorgerufener Aminosäureaustausch G398S im Membrananker von YadA, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pASK IBA2 G389T	Durch gerichtete Punktmutation hervorgerufener Aminosäureaustausch G398T im Membrananker von YadA, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)
pASK IBA2 G389N	Durch gerichtete Punktmutation hervorgerufener Aminosäureaustausch G398N im Membrananker von YadA, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)
pASK IBA2 G389H	Durch gerichtete Punktmutation hervorgerufener Aminosäureaustausch G398H im Membrananker von YadA, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)
pASK-IBA2 LV	Leervektor ohne Insert	(Grosskinsky et al., 2007)
pJS13	Enthält das htrA (DegP) Gen unter Kontrolle eines konstitutiven pT7 Promoters	(Skórko-Glonek et al., 1995)

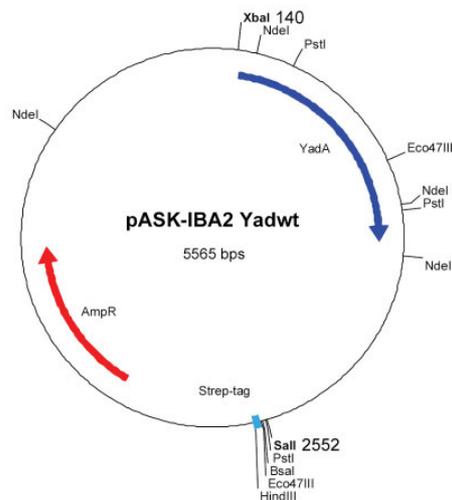


Abbildung 7: Vektor pASK IBA2 YadAwt
(Grosskinsky et al., 2007)

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkultur

Für sämtliche Experimente wurden *E.coli* Kulturen von BL21(DE3)omp8 verwendet. Die Stammkulturen wurden als Aliquots bei -20 °C in 20% Glycerol-LB Medium gelagert.

Zur Herstellung kompetenter Bakterien für die Isolation von mRNA wurden Proben aus den gefrorenen Aliquots in 10 ml LB-Ampicillin Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank geschüttelt. Nach Anwachsen der Bakterien wurde eine Kolonie auf eine neue LB-Ampicillin Agarplatte ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Platten wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 4 °C gelagert. Bei Bedarf wurde eine Kolonie in 6 ml LB-Ampicillin Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C bei 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Übernachtskulturen 5min bei 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 2ml frischem LB-Ampicillin Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Extinktion von 1 ml 1:20 verdünnter Probe bei 600 nm Wellenlänge gegen den

Leerwert der LB-Ampicillin Lösung gemessen. Die nun herzustellenden Bakterienkulturen im Flüssigmedium wurden auf einen Extinktionswert von 0,1 bei 600 nm eingestellt. Das hierfür benötigte Volumen der frischen Bakteriensuspension wurde nach folgender Gleichung errechnet:

$$V_{\text{Bakteriensuspension}} = 1 / (\text{OD}_{600} / 5 \cdot 10^{-3}) \cdot V_{\text{total neue Proben}}$$

wobei OD600 die gemessene Extinktion der 1:20 verdünnten Bakterienprobe bei 600 nm darstellt. Das errechnete Volumen (V) wurde dem Volumen der nun herzustellenden Bakterienkulturen, üblicherweise 4 ml, hinzugegeben und bei 37° C bei 200 rpm 2 h geschüttelt. Im Anschluss wurden die Proben mit 40 ng/ml Anhydrotetrazyklin (Endkonzentration), später mit 100 ng/ml Anhydrotetrazyklin (Endkonzentration) versetzt, um die Transkription der pASK IBA2 Plasmide zu induzieren, dann wieder bei 37° C geschüttelt und die Proben nach der gewünschten Zeit während der Phase exponentiellen Wachstums entnommen.

2.2.2 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das Kit RNeasy von Qiagen verwendet. 800 µl der induzierten Proben wurden entnommen und in Eppendorf Gefäße gegeben. Diese wurden 5 min bei 5000 g bei 4° C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Lysozym-TE Puffer durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350 µl mit β-Mercaptoethanol versetztem RLT Puffer zugegeben, durch Vortexen gemischt und 250 µl Ethanol p.a. hinzugefügt. Das gesamte Volumen wurde auf eine 2 ml Trennsäule gegeben und 15 s bei 8000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Auf dieselbe Säule wurden 700 µl RW1-Puffer gegeben und wieder 15 s bei 8000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchlauf samt Auffangbehälter wurde verworfen. Die Säule kam in einen neuen Auffangbehälter und wurde mit 500 µl RPE Puffer durch 15 s Zentrifugieren bei 8000 g gewaschen. Der Durchlauf

wurde verworfen. Die Säule wurde ein weiteres Mal mit 500 µl RPE Puffer, diesmal aber durch 2 min Zentrifugieren bei 8000 g gewaschen und der Durchlauf wurde verworfen. Zum Trocknen wurde die Säule nochmals 1 min bei 13000 g zentrifugiert. Die Säule wurde einem verschließbaren 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgesetzt, 50 µl RNase-freies Wasser wurde auf die Membran pipettiert und die RNA durch 1 min Zentrifugieren bei 8000 g eluiert.

Im Anschluss wurde 1 µl der RNA Lösung mit 60 µl Millipore Wasser verdünnt und die RNA-Konzentration gegen den Leerwert gemessen.

Nach dem Entnehmen von 1 µl wurden die RNA-Aliquots sofort bei -20°C eingefroren.

Im Verlauf der Arbeit wurde das Extraktionsprotokoll folgendermaßen modifiziert (17.08.2007), auf Grund einer sehr kurzen Halbwertszeit der mRNA von DegP:

Die Eppendorf Gefäße mit 800 µl Bakteriensuspension wurden fortan nicht mehr 5 min, sondern 2 min abzentrifugiert.

Auf den Lysozymverdau wurde verzichtet, dafür wurden aber die Aliquots in Flüssigstickstoff schockgefroren, um die Bakterienwand aufzubrechen. Vor der Zugabe des RLT-Puffers wurden die Proben kurz, d.h. unter einer Minute bei Raumtemperatur angetaut. Nach Beendigung des RNA-Extraktionsprotokolls wurde pro RNA-Aliquot 1 µl RNase-Inhibitor zugegeben.

2.2.3 Reverse Transkription der mRNA

Für diesen Schritt wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die RNA-Proben sowie die Reverse Transkriptase wurden auf Eis aufgetaut. Der gDNA Wipeout Puffer, der RT-Puffer, der Primer Mix sowie das RNase-freie Wasser wurden bei Raumtemperatur aufgetaut.

An Hand der gemessenen RNA-Konzentrationen (c) wurde das Volumen (v) der RNA-Lösung berechnet, welches genau 1 µg RNA enthält: $V_{1\mu\text{g RNA}} = 1/C_{\text{RNA}}$.

Jeweils 2 µl gDNA Wipeout Puffer, $V_{1\mu\text{g RNA}}$, und RNase-freies Wasser ad 14 µl wurden zusammenpipettiert, kurz (3 s) zentrifugiert und für 2 min bei 42° C im Heizblock inkubiert, dann sofort auf Eis gelagert. Der Reverse-Transkriptions-Mastermix wurde wie folgt hergestellt: pro RNA-Probe 1 µl der Reversen Transkriptase, 4 µl des RT-Puffers und 1 µl des Primer Mixes plus ca. 10 % extra Volumen um den Verlust beim Pipettieren zu kompensieren. So wurde z.B. bei 10 vorhandenen Proben 11x Mastermix hergestellt. Der Mastermix, 6 µl, wurde auf entsprechend viele PCR-Gefäße verteilt und die jeweilige Template-RNA hinzupipettiert. Die Proben wurden in einem Thermocycler bei 42° C 30 min, dann 3 min bei 95° C lang inkubiert und im Anschluss bei 4° C gelagert.

2.2.4 Konventionelle Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die durch die Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mittels PCR, als semi-quantitative Messmethode, untersucht, um etwaige eindeutige Unterschiede in der Expression von der mRNA von DegP in den verschiedenen Bakterienstämmen nachzuweisen. Dabei werden die DNA-Stränge durch Hitze getrennt, durch gezielte Wahl der Annealing-Temperatur die spezifische Anlagerung der Primer ermöglicht und durch Temperatur-Einstellung die Bindung und Aktivierung der Taq-Polymerase bewirkt, die Elongation der cDNA Stränge startend. Durch Wiederholung der Zyklen wurden die gewünschten Abschnitte exponentiell vervielfältigt. Pro Ansatz wurden verwendet:

- 5 µl 10x konzentrierter Puffer
- 1 µl 5' Primer 1:10 verdünnt (10 pmol/µl)
- 1 µl 3' Primer 1:10 verdünnt (10pmol/µl)
- 1 µl dNTPs (10mM)
- 1µl Taq Polymerase (10 U/ µl)
- 40 µl Aqua ad injectabilia
- sowie 1 µl cDNA Template

Die verwendeten PCR-Programme waren:

- 1) 2 min 94° C
- 2) 1 min 94° C
- 3) 30 sec Annealing-Temperatur des jeweiligen Primer-Paares
- 4) 30 sec 72° C
- 5) 5 min 72° C
- 6) ∞ 4° C

Die Anzahl der Wiederholungen der Zyklen (Schritte 2, 3 und 4) betrug für DegP cDNA 39 x, für YadA cDNA 29 x.

2.2.5 Quantitative Real-Time PCR

Diese Methode basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, erlaubt aber eine Quantifizierung des PCR-Produktes. Dafür verwendet man einen Farbstoff, in diesem Fall den fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green I, welcher durch Interkalation in doppelsträngige Nukleinsäuren an Fluoreszenz zunimmt. Diese Fluoreszenz nimmt proportional zum entstandenen PCR-Produkt zu, so dass man durch Fluoreszenzmessungen auf die Menge an entstandenem Produkt schließen kann.

Für unsere Versuchsreihen wurde ein RT-PCR Gerät Applied Biosystems GeneAmp 5700 verwendet.

Zuerst wurde ein Pipettierplan für die 96-Well Platten erstellt. Es wurde immer mit Duplikaten gearbeitet, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

Sämtliche cDNA-Proben wurden 1:4 verdünnt. Dabei wurden 6 µl Probe mit 18 µl Aqua ad injectabilia vermengt. Zur Herstellung der für die Standardkurven notwendigen cDNA-Pools wurden 3 µl von sämtlichen cDNA-Verdünnungen entnommen und miteinander vermengt. Diese wurden 1:3 mit Aqua ad injectabilia verdünnt und dadurch erhielt man den Pool 1. Der Pool -1 entstand

aus 5 µl Pool 1 und 45 µl Aqua ad injectabilia, der Pool -2 aus 5 µl Pool -1 und 45 µl Aqua ad injectabilia und der Pool -3 aus 5 µl Pool -2 und 45 µl Aqua ad injectabilia.

Pro Reaktionsansatz (25 µl) wurden pipettiert:

12,5 µl	qRT-PCR SYBR Green PCR-Mix 2x konzentriert
2 µl	5' Primer 1:4 verdünnt
2 µl	3' Primer 1:4 verdünnt
2 µl	cDNA, 1:4 verdünnt
6,5 µl	Aqua ad injectabilia

Die cDNA wurde in 96-Well Platten vorgelegt. Die übrigen Reagenzien wurden als Mastermix zusammenpipettiert, wobei immer ca. 10 % Überschuss hergestellt wurde, um Pipettierverluste auszugleichen. Der 2 x PCR-Mix wurde auf Eis aufgetaut und gelagert. Der fertige Mastermix wurde ebenfalls auf Eis gelagert. Dann wurden je Ansatz 23 µl Mastermix zu der vorgelegten cDNA pipettiert. Die fertigen Platten wurden 1 min bei 1000 g zentrifugiert.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

- 1) 2 min 50 °C
- 2) 10 min 95 °C
- 3) 15 sec 95 °C
- 4) 30 sec 48 °C
- 5) 30 sec 72 °C

Die Schritte 3), 4) und 5) wurden 44 x wiederholt.

Die erhaltenen Daten sowie die errechneten Kurven wurden elektronisch abgespeichert.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegele bestanden aus 1 % Agarose in TBE-Puffer.

Die Proben wurden mit 10 % Loading Buffer vermischt. Die Taschen wurden mit

15 µl Probe-Puffer Gemisch beladen. Als Größenstandard wurde eine Tasche stets mit einer DNA Ladder beladen. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Gele bei einer kontinuierlichen Spannung von 100 V bis 120 V laufen gelassen. Zur Färbung wurden die Gele für 30 min in eine EtBr-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/l gelegt und im Anschluss 30 min in einem Wasserbad entfärbt.

Die gefärbten Gele wurden unter UV-Licht fotografiert und das Foto elektronisch abgespeichert.

2.2.7 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Proteinproben denaturiert und in einem Spannungsfeld Ihrer Größe nach aufgetrennt. In unserem Falle wurden die entsprechenden Bakterienkulturen gemäß 2.2.1 angesetzt, mit AHTC induziert und nach entsprechender Induktionsdauer 1 ml in einem Eppendorf-Gefäß geerntet. Die Probe wurde bei 4000 g 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Währenddessen wurde die Extinktion der 1:20 verdünnten Bakterienkultur bei 600 nm gemessen. Das Bakterienpellet wurde in einer Menge Aqua ad injectabilia gelöst, die dem gemessenen Extinktionswert entspricht, d.h. wenn der gemessene Wert 0,028 betrug, so wurde das Pellet in 28 µl Aqua ad iniectionabilia gelöst. Im Anschluss wurde das gelöste Pellet mit einem identischen Volumen SDS-haltigem, denaturierendem, 5 x konzentriertem Puffer (modifiziert nach Lämmli, 1970) versetzt. Die Proteinprobe wurde nun 10 min bei 95° C in einem Heizblock aufgeköcht, dann bei -20° C eingefroren oder auf Eis abgekühlt und direkt weiterverwendet.

Für die Gelelektrophorese wurden 10 % SDS-Polyacrylamid-Gele in den Gelkammern nach Anleitung des Herstellers befestigt und die Kammer mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die Kämmen wurden entfernt und 10 µl der fertigen Proteinproben in die Gelkammern pipettiert. Eine Tasche pro Gel wurde immer mit 7 µl eines Proteinstandards beladen.

Die Gele wurden bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel laufen gelassen, bis sich die Proben am Ende des Sammelgels konzentriert hatten. Dann wurde die Stärke auf 30 mA pro Gel erhöht.

2.2.8 Western-Blot

Beim Western-Blot werden durch SDS-Page aufgetrennte Proteinproben auf eine Nitrosezellulosemembran übertragen. Die Membran wird abgesättigt und dann mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser wird durch einen an eine Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper detektiert. In Anwesenheit eines geeigneten Substrates katalysiert die Peroxidase eine lumineszierende Reaktion, die Autoradiographie-Filme schwärzen kann. So kann das Vorhandensein spezifischer Proteine durch den Nachweis von schwarzen Banden auf diesen Filmen bewiesen werden.

Dazu werden die Nitrozellulose-Membranen, das Whatman-Papier und die Schwämme in Blot-Puffer eingeweicht. Die Gele aus der SDS-Gelelektrophorese werden entnommen und die Glasplatten vorsichtig voneinander gelöst. Mit einem Schaber wird das Sammelgel entfernt. Der Gelhalter wird in folgender Reihenfolge geschichtet: schwarze Seite Gelhalter → Schwamm → Whatman Papier → Gel → Membran → Whatman Papier → Schwamm → weiße Seite Gelhalter. Dabei wird beachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran befinden. Der/die Gelhalter werden in die vorgesehene Kammer mit einem Kühlakku gegeben, die Kammer wird mit Blot-Puffer aufgefüllt und 1 h bei 300 mA geblottet. Dann wird die Membran entnommen, mit Ponceau Rouge gefärbt, kurz mit VE-Wasser abgespült, die Banden der Proteinleiter mit Kugelschreiber markiert und die gefärbte Membran zur Dokumentation fotokopiert. Im Anschluss werden die Membranen 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4° C übernacht in einem Blockpuffer geblockt, um unspezifische Anlagerungen des Primärantikörpers zu vermeiden.

In unserem Fall haben wir daraufhin den Primärantikörper Anti-DegP (Rabbit) 1:10 000 mit dem Blockpuffer verdünnt. In dem ersten Versuch wurde mit einer Konzentration von 1:2000 gearbeitet, auf Grund der starken Markierung wurde nach sukzessiver Optimierung die Konzentration von 1:10 000 als optimal festgelegt. Die Membran wurde dann über Nacht mit dem verdünnten Primärantikörper bei 4° C auf einem Rollator inkubiert, am nächsten morgen 3 x 10 min mit Western-Wash Puffer gewaschen und daraufhin 1 h bei Raumtemperatur mit dem 1:10 000 Peroxidase-konjugiertem Goat Anti-Rabbit IgG spezifischen Sekundärantikörper auf einem Rollator inkubiert. Nach 3-maligem 10-minütigem Waschen mit Western-Wash Puffer wurde die Membran mit ECL-Reagenz gespült, um die Peroxidase-Reaktion zu starten. Dann wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien mit einem Film in eine Fotoplatte gelegt, je nach Intensität der Reaktion 5 s, 10 s, 20 s, 30 s, 45s, 1 min oder 2 min bis zum Erhalten verwertbarer Banden belichtet und der Film entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Qualitativer Vergleich der DegP-Expression im Western-Blot

Nach Übernachtskultur der sieben verschiedenen *E. coli* Stämme, nämlich *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 G389A, *E. coli* pASK-IBA2 G389S, *E. coli* pASK-IBA2 G389T, *E. coli* pASK-IBA2 G389N, *E. coli* pASK-IBA2 G389H sowie *E. coli* pASK-IBA2 LV (LV steht für Leervektor; enthält im Gegensatz zu den anderen Plasmiden keine für YadA kodierende Sequenz), wurden sie durch Zugabe von 40 ng/ml bzw. 100 ng/ml Anhydrotetracyclin induziert. Nach o.g. Protokoll wurden die Proteinproben hergestellt und an Hand von SDS-PAGE und Western-Blot untersucht.

Da die Aminosäurenaustausche unterschiedlich stark die Barrel-Stabilität von YadA beeinflussen und somit die Passage von YadA an die bakterielle Oberfläche beeinträchtigen könnten, wurde vermutet, dass die akkumulierte Menge von YadA im periplasmatischen Raum in den verschiedenen Stämmen unterschiedlich sei, welches wiederum eine stärker oder schwächer ausgeprägte Expression der Chaperon-Protease DegP zur Folge hätte. Daraufhin formulierten wir folgende Hypothese: Die Expression punktmutierter Versionen von YadA führt zur gesteigerten Akkumulation von YadA im Periplasma, welches im Rahmen einer Stress-Response wiederum zu einer vermehrten Expression von DegP führt.

Diese Hypothese wollten wir mittels Western-Blot verifizieren: stärkere Banden auf DegP bei den aus Stämmen mit mutiertem *yadA* gewonnenen Proben sind ein semi-quantitativer Beweis für eine stärkere Expression von DegP in diesen Stämmen. Als Referenzwerte dienten *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt und *E. coli* pASK-IBA2 LV, letzterer mit einer Grundexpression von DegP ohne YadA-Expression, ersterer mit einer DegP-Expression bei einer Expression des wildtypischen YadA-Proteins.

Das DegP-Protein befindet sich nach Abschluss der SDS-PAGE auf Höhe der 50 kDa Markerbande und stellt die erste Bande im Western Blot da (Lipinska et al., 1990).

3.1.1 Vergleich der DegP-Expression 1h nach Induktion der YadA Expression

In der ersten Versuchsreihe wurde die Expression von DegP der sieben verschiedenen *E. coli* Stämme nach einer einstündigen Induktion mit einer Anhydrotetrazyklinkonzentration von 100 ng/ml miteinander verglichen. Es wurde pro Spur eine identische Anzahl von Bakterien aufgetragen.

Der Versuch wurde dreifach wiederholt, die ersten beiden Male wurde der 1. Antikörper 1:5000 verdünnt, beim dritten Mal erfolgte eine Optimierung auf eine 1:10 000 Verdünnung, auf Grund der hohen Signalstärke der Banden und der

hieraus resultierenden Intensität der DegP Proteinbanden durch den Primärantikörper.

Stellvertretend werden die Ergebnisse des zweiten Versuchs abgebildet.

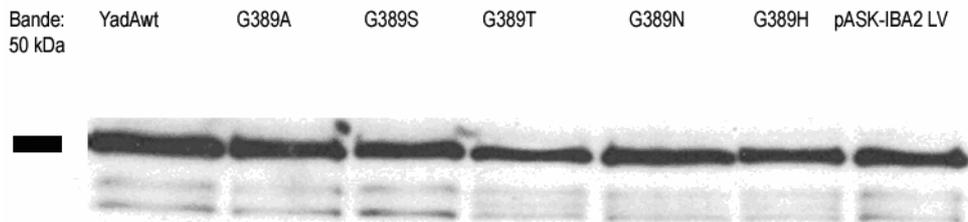


Abbildung 8: Western-Blot mit Primärantikörper gegen DegP, 1h Inkubation

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Konzentration des 1. Antikörpers 1:5000. In den 8 Taschen des Gels liefen, von links nach rechts: 7 μ l Proteinleiter, 10 μ l Proteinproben aufbereitet nach Lämmler, 1970, aus Kulturen von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Banden sichtbar. Es kann kein Unterschied in der Menge von DegP festgestellt werden.

Wesentliche Unterschiede in der Intensität der Banden waren nicht erkennbar, weder im Vergleich von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt mit den mutierten Stämmen, weder im Vergleich der mutierten Stämme mit *E. coli* pASK-IBA2 LV, noch im Vergleich von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt mit *E. coli* pASK-IBA2 LV.

Ein wesentlicher Unterschied der Quantität des Proteins DegP 1 h nach Induktion war in den verschiedenen Stämmen nicht erkennbar.

3.1.2 Vergleich der DegP-Expression Im Zeitverlauf

Es gab zwei verschiedene Erklärungen, wieso keine Unterschiede in den Banden sichtbar waren: entweder es gab überhaupt keinen Unterschied in der Expression von DegP oder nach 1 h Induktionsdauer war die Expression von DegP schon so stark, dass nun kein Unterschied in der Analyse im Western-Blot mehr erkennbar war. Zur weiteren Untersuchung wurden nun Proben nach

verschiedenen Induktionsdauern von YadA entnommen und im Western-Blot analysiert, um die DegP-Expression im Verlauf der Induktion von YadA semi-quantitativ zu bestimmen und gegebenenfalls geeignetere Zeitpunkte zum Vergleich der DegP Expression auswählen zu können. Stellvertretend sind die Ergebnisse des 2. Versuchs abgebildet.

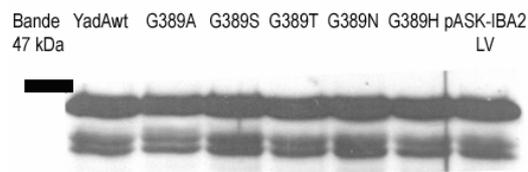


Abbildung 9: Western-Blot mit Primärantikörper gegen DegP, vor Induktion mit AHTC

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Konzentration des 1. Antikörpers 1:20 000. In den 8 Taschen des Gels liefen, von links nach rechts: 7 μ l Proteinleiter, 10 μ l Proteinproben aufbereitet nach Lämml, 1970, aus Kulturen von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Banden sichtbar. Es kann kein Unterschied in der Menge von DegP festgestellt werden, aber eine sehr hohe basale Expression von DegP.

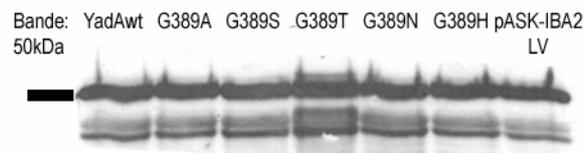


Abbildung 10: Western-Blot mit Primärantikörper gegen DegP, Inkubation mit AHTC 15'

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Konzentration des 1. Antikörpers 1:20 000. In den 8 Taschen des Gels liefen, von links nach rechts: 7 μ l Proteinleiter, 10 μ l Proteinproben aufbereitet nach Lämml, 1970, aus Kulturen von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Banden sichtbar. Es kann kein Unterschied in der Menge von DegP festgestellt werden.

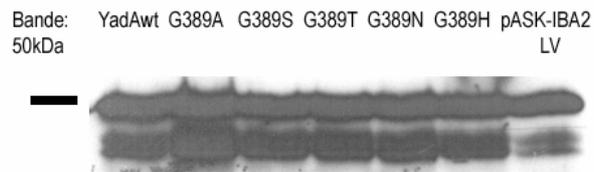


Abbildung 11: Western-Blot mit Primärantikörper gegen DegP, Inkubation mit AHTC 60'

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Konzentration des 1. Antikörpers 1:20 000. In den 8 Taschen des Gels liefen, von links nach rechts: 7 µl Proteinleiter, 10 µl Proteinproben aufbereitet nach Lämml, 1970, aus Kulturen von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Banden sichtbar. Es kann kein Unterschied in der Menge von DegP festgestellt werden.

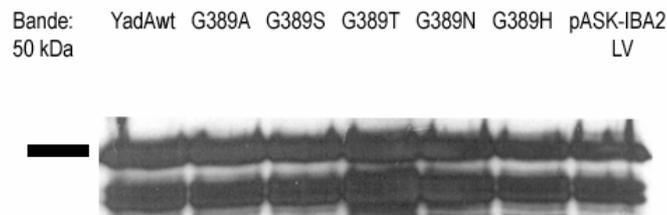


Abbildung 12: Western-Blot mit Primärantikörper gegen DegP, Inkubation Mit AHTC 90'

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Konzentration des 1. Antikörpers 1:20 000. In den 8 Taschen des Gels liefen, von links nach rechts: 7 µl Proteinleiter, 10 µl Proteinproben aufbereitet nach Lämml, 1970, aus Kulturen von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Banden sichtbar. Es kann kein Unterschied in der Menge von DegP festgestellt werden.

Auch in dieser Versuchsreihe waren keine Intensitätsunterschiede der verschiedenen Banden erkennbar, so dass eine unterschiedliche DegP-Expression bei der Expression verschieden stark mutierter YadA-Moleküle auf Proteinebene zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nicht bewiesen werden konnte.

3.2 Qualitativer Vergleich der DegP-Transkription mittels konventioneller PCR

Nachdem auf der Proteinebene keine Unterschiede sichtbar waren, sollte nun die Transkription des Gens des Enzyms DegP untersucht werden. Wir formulierten folgende Hypothese: die Transkription mutierter *yadA* Sequenzen führt zur gesteigerten Akkumulation von periplasmatischem YadA, welches wiederum zu einer vermehrten Expression von DegP führt. Diese sind auf Proteinebene mittels Analyse nach Western-Blot nicht sichtbar. Jedoch könnte eine Veränderung der Homöostase von DegP auf der Ebene der Transkription des entsprechenden Gens nachweisbar sein.

Hierzu sollte zunächst der Nachweis von *yadA*- und *degP*-Transkription durch konventionelle RT-PCR etabliert werden. Zu diesem Zweck führten wir die Extraktion und reverse Transkription der mRNA durch, bevor wir sie mittels PCR amplifizierten. Zur Kontrolle der erfolgreichen reversen Transkription führten wir die konventionelle PCR vor den angestrebten quantitativen Messungen durch. Die konventionelle PCR diene als Kontrolle der erfolgreichen DNA-Synthese und kann auch als semi-quantitative Nachweismethode dienen, wenn konsistent relative Unterschiede in der Bandenintensität nachgewiesen werden können. Unterschiedlich starke DegP Banden in den Ergebnissen der konventionellen PCR wären also ein Nachweis unterschiedlich starker *degP* Transkription gewesen.

Eine Optimierung der RNA-Extraktion, reversen Transkription und konventionellen PCR war erforderlich.

3.2.1 Etablierung der konventionellen PCR

Nach Anzucht der Bakterienstämme in Übernachtskulturen gemäß erwähntem Protokoll und Induktion für 1 h mit 40 ng/ml Anhydrotetracyclin, wurde die RNA nach einem vom Herstellerprotokoll leicht modifizierten Protokoll mit dem Kit RNeasy extrahiert (siehe Abschnitt *Material und Methoden*). Nach reverser

Transkription der gewonnenen mRNA in cDNA wurde diese mittels konventioneller PCR nachgewiesen. Hierbei wurden die Primer YadA_5', YadArev_400bp, degP_fwd und degP_rev verwendet. Die verwendeten PCR Programme waren für DegP: 2' bei 94°C, (1' bei 94°C, 30'' bei 53°C, 30'' bei 72°C) * 30x, 5' 72°C, 4°C ∞ ; und für YadA: 2' bei 94°C, (1' bei 94°C, 30'' bei 47°C, 30'' bei 72°C) * 30x, 5' 72°C, 4°C ∞. Nach Auftrennen mittels Gelelektrophorese und Färben in Ethidiumbromid wurde folgendes Bild erhalten:

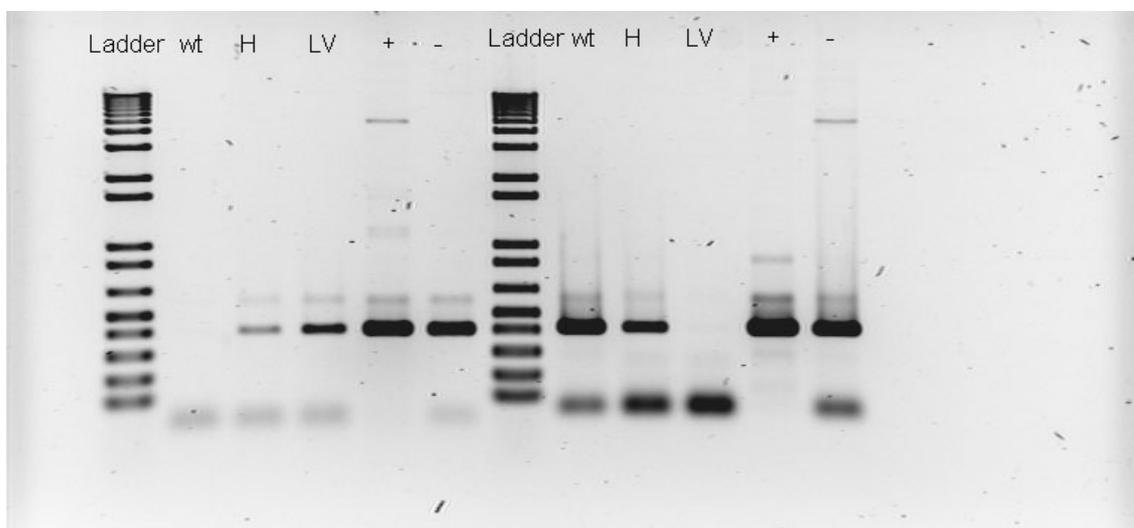


Abbildung 13: PCR mit DegP- und YadA-Primern, 1. Testlauf

DegP I YadA

WTi, Hi und LV sind die Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, YadA G389H und LV, die mit Anhydrotetracyclin 40ng/ml 1h lang induziert wurden. Die positive Negativkontrolle war durch eine Verunreinigung zu erklären.

Es fielen eine nicht vorhandene Bande von DegP im YadAwt im Vergleich zum YadA G389H auf, sowie eine starke Bande in der Bahn der YadA Negativkontrolle (Millipor Wasser). Deswegen wiederholten wir den Versuch. Nach identischem Vorgehen waren aber in der nächsten PCR auf DegP, außer in der Bahn der Positivkontrolle, keine Banden mehr sichtbar.

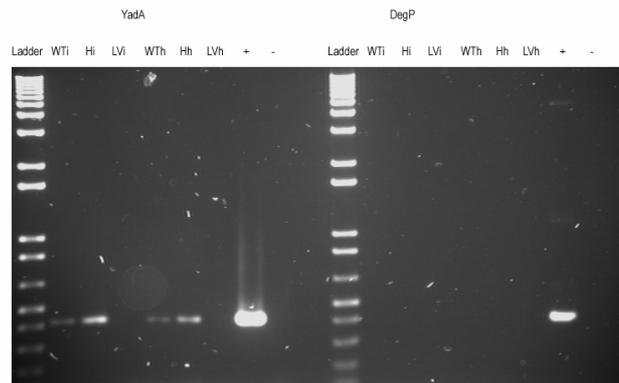


Abbildung 14: PCR mit DegP- und YadA-Primern, 2. Testlauf

YadA | DegP

WTi, Hi und LVi sind die Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV, die mit Anhydrotetrazyklin 40ng/ml 1h lang induziert wurden, WTh, Hh und LVh die selben *E. coli*-Stämme, jedoch erfolgte die *degP*-Transkription durch einen 1-minütigen Hitzeschock bei 50°C. DegP-cDNA war in den Proben aus den Bakterienkulturen nicht nachweisbar.

Daraufhin folgte eine extensive Fehlersuche, wobei sämtliche Parameter überprüft wurden:

- Die Bakterienkulturen wurden nunmehr mit 100 ng/ml Anhydroterazyklin induziert. Dies führte allein nicht zum Erfolg, die Induktion mit erhöhter Anhydrotetrazyklinkonzentration wurde jedoch beibehalten.
- Das PCR Protokoll wurde modifiziert, so dass der zweite, dritte und vierte Schritt 34 Mal anstelle von 29 Mal wiederholt und die Annealing Temperatur auf 50°C gesenkt wurden. Die DegP-banden bleiben trotzdem nur sehr schlecht oder gar unsichtbar.
- Die gesamten Reagenzien der PCR wurden überprüft, indem bei einem Versuch jeweils eines gegen ein aus einem anderen Laborraum stammendes, frisches Reagenz ausgetauscht wurde. Dies führte nicht zum Erfolg, die Banden auf DegP waren weiterhin nicht nachweisbar. Eine DNase-Kontamination eines Reagenz war nicht nachweisbar.

- Es wurden die Bakterienkulturen zu mehreren Zeitpunkten geerntet, um etwaige günstigere Induktionsdauern ausfindig zu machen: zu den verschiedenen Zeitpunkten waren keine nennenswerten Unterschiede sichtbar.
- Es wurden neue Primer für DegP mit einem kleineren Amplikon bestellt, degP_fwd 2 und degP_rev 2, welche überzeugend funktionierten.

Folgend werden die PCRs mit neuen Primern der Zeitreihen aller Stämme abgebildet:

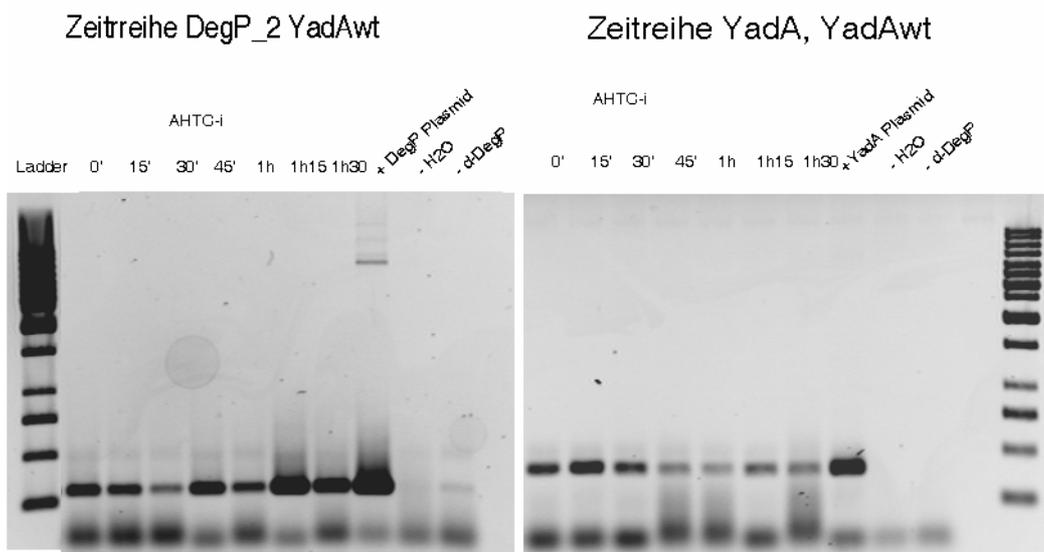
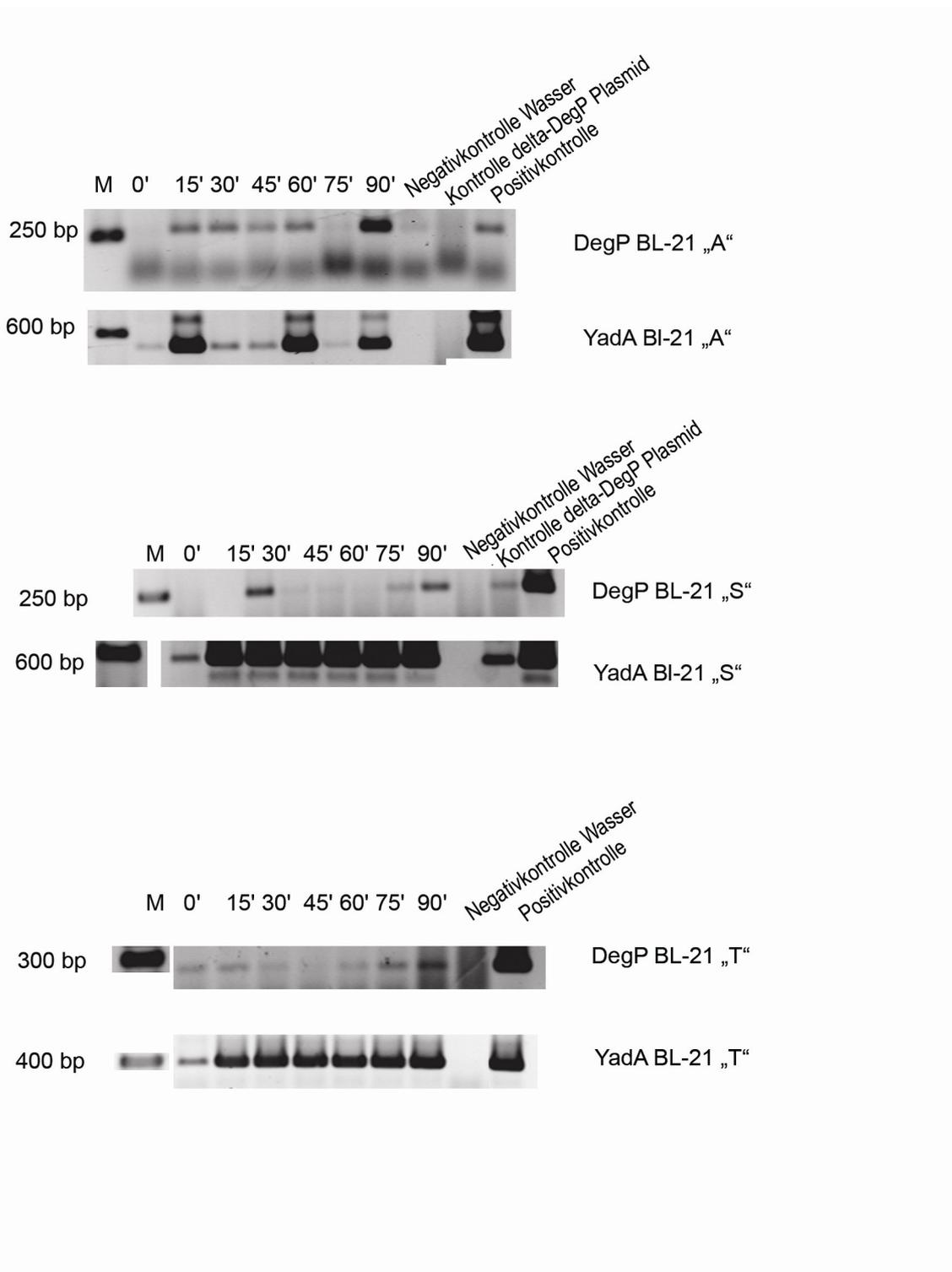


Abbildung 15a: PCR mit DegP- und YadA-Primern, Zeitreihen, Stamm *E. coli* pASK-IBA2

YadAwt

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Wiederholung des PCR-Zyklus bei DegP 34x, Annealingtemperatur bei DegP 50°C, frische Reagenzien, neue Primer auf DegP degp_fwd2 und degp_rev2. Banden v.l.n.r. DNA-Leiter, Proben gewonnen vor AHTC Induktion, Proben jeweils 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min und 90 min mit AHTC induziert, Positivkontrolle mit DegP-Plasmid, Negativkontrollen Milipor Wasser und Plasmid ohne Insert. Es lagen inhomogene Bandenstärken von DegP und YadA vor, d.h. es waren schwankende Mengen von DegP- und YadA c-DNA vorhanden.



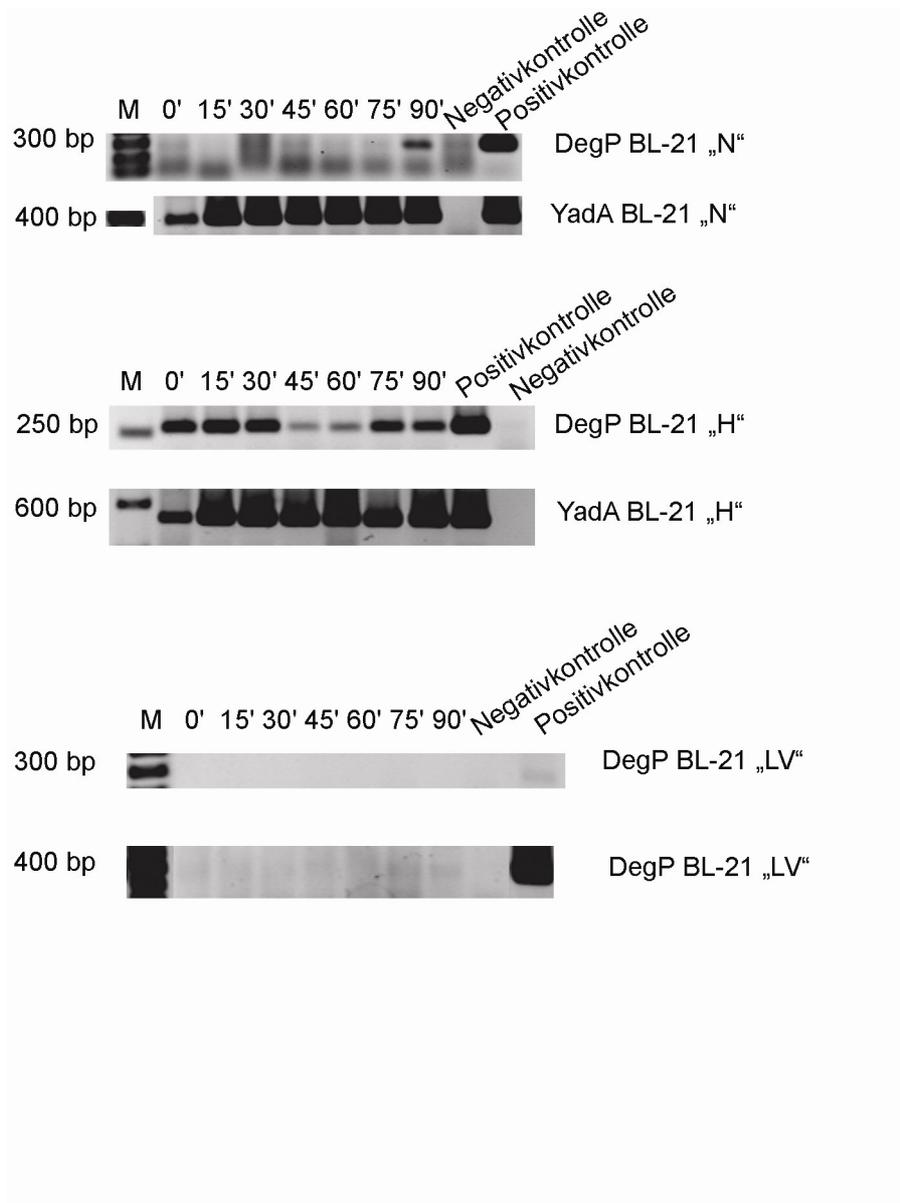


Abbildung 15b: PCR mit DegP- und YadA-Primern, Zeitreihen, Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, *E. coli* pASK-IBA2 LV

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Wiederholung des PCR-Zyklus bei DegP 34x, Annealingtemperatur bei DegP 50°C, frische Reagenzien, neue Primer auf DegP degp_fwd2 und degp_rev2. Banden v.l.n.r. DNA-Leiter, Proben gewonnen vor AHTC Induktion, Proben jeweils 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min und 90 min mit AHTC induziert, Positivkontrolle mit DegP-Plasmid, Negativkontrollen Millipore Wasser und Plasmid ohne Insert. Es lagen inhomogene Bandenstärken von DegP und YadA vor, d.h. es waren schwankende Mengen von DegP- und YadA c-DNA vorhanden.

Die PCR schien etabliert, doch in der folgenden PCR erschien in sämtlichen DegP-Bahnen Schmier und ließ keine oder nur sehr schwache Banden erkennen:

Zeitreihe DegP BL-21 "WT"

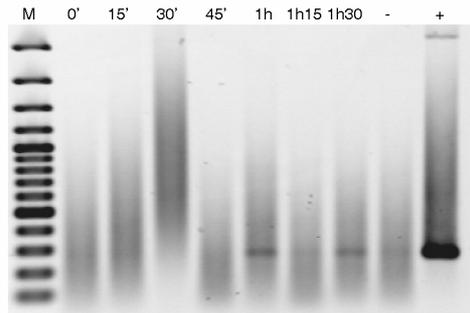


Abbildung 16: PCR mit DegP-Primern, unspezifische Amplifikation

Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt. AHTC Konzentration 100 ng/ml, Primer auf DegP *degp_fwd2* und *degp_rev2*. Banden v.l.n.r. DNA-Leiter, Proben gewonnen vor AHTC Induktion, Proben jeweils 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min und 90 min mit AHTC induziert, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Milipor Wasser. Verschmierte Bahnen: Banden von DegP z.T. nicht, z.T. nur sehr schwach erkennbar. Erklärbar u.a. durch Verunreinigungen, schlecht funktionierende Primer oder unsaubere RNA-Extraktion.

Daraufhin erfolgte eine weitere Fehlersuche, die erfolglos blieb. Es wurden dann neue Primer bestellt, *YadA_100_5'*, *YadA_100_3'*, *DegP_100_5'* und *Degp_100_3'*, bei denen die zu erwartende Größe des Amplikons 100 bp betrug. Das PCR Programm auf DegP wurde auch soweit modifiziert, dass fortan der zweite, dritte und vierte Schritt 39 statt 34 Mal wiederholt wurden, sowie jetzt 2 µl cDNA-Template für eine PCR verwendet wurden.

Des Weiteren wurde als mögliche Fehlerquelle die Halbwertszeit der DegP-mRNA identifiziert: in einer Publikation von Selinger et al. wurde eine durchschnittliche Halbwertszeit der gesamten untersuchten mRNA von 6,8 min angegeben, wobei Halbwertszeiten von unter 1,5 min vorkamen (Selinger et al., 2003). Mit Hinblick auf das relativ lange Protokoll zur mRNA-Gewinnung, alleine bei dem Abzentrifugieren und dem Lysozymverdau dauern bereits 10 min,

wurde das Protokoll wie im Abschnitt *Material und Methoden* (siehe Kapitel 2.2.2 RNA-Extraktion, S. 38) beschrieben geändert.

3.2.2 Überprüfung der qualitativen DegP-Expression durch konventionelle PCR

Nach Modifikation des Protokolls erhielten wir methodisch befriedigende Ergebnisse: sowohl die spezifischen Banden auf DegP als auch die auf YadA waren in allen weiteren PCRs deutlich und ohne Schmier sichtbar:

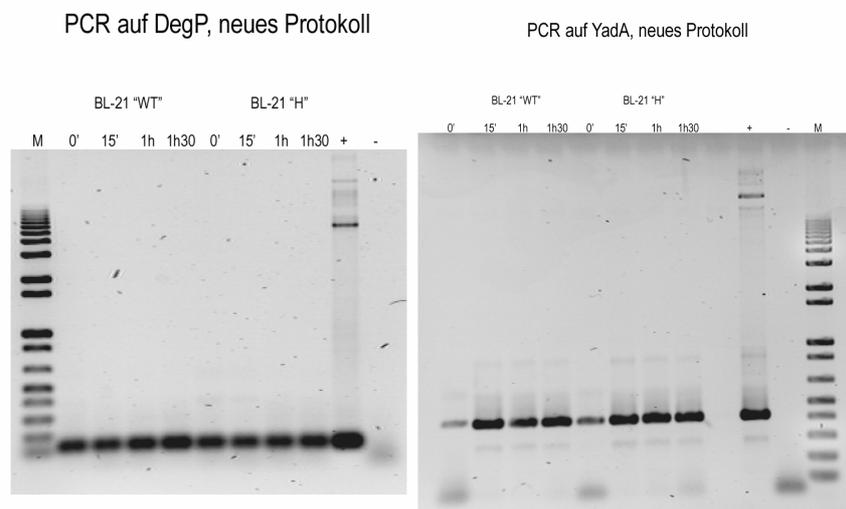


Abbildung 17a: Ergebnisse der PCR mit DegP- und YadA-Primern, endgültiges Protokoll, Zeitreihen der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt und *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H
 AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von DegP mit DegP_100_5' und DegP_100_3', Amplifikation von YadA mit YadA_100_3' und YadA100_5'. PCR auf DegP: Banden v.l.n.r.: DNA-Leiter, dann Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt und *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser. PCR auf YadA: : Banden v.l.n.r.: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt und *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser, DNA-Leiter. Homogen starke Banden von DegP, also keine signifikanten Unterschiede in der Menge DegP-cDNA nachweisbar. Schwache Banden von YadA vor Induktion, homogen starke Banden von YadA nach Induktion, konsistent mit einer Erhöhung der vorhandenen Menge von YadA cDNA nach AHTC-Induktion.

PCR auf DegP, neues Protokoll

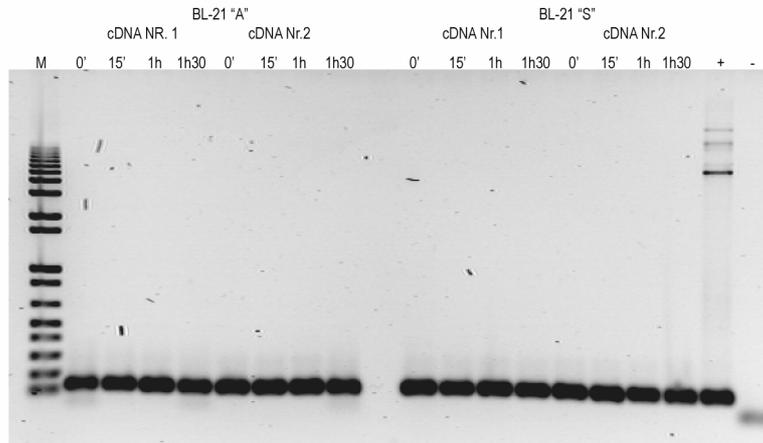


Abbildung 17b: Ergebnisse der PCR mit DegP- und YadA-Primern, endgültiges Protokoll, Zeitreihen der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A und *E. coli* pASK-IBA2 YadA G38S, jeweils 2 verschiedene cDNA Proben

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von DegP mit DegP_100_5' und DegP_100_3' Banden v.l.n.r.: DNA-Leiter, PCR *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für jede cDNA-Reihe,

PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für jede cDNA-Reihe, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser.

Homogen starke Banden von DegP, d.h. keinen signifikanten Unterschied in der Menge von DegP-cDNA nachweisbar.

PCR auf YadA, neues Protokoll

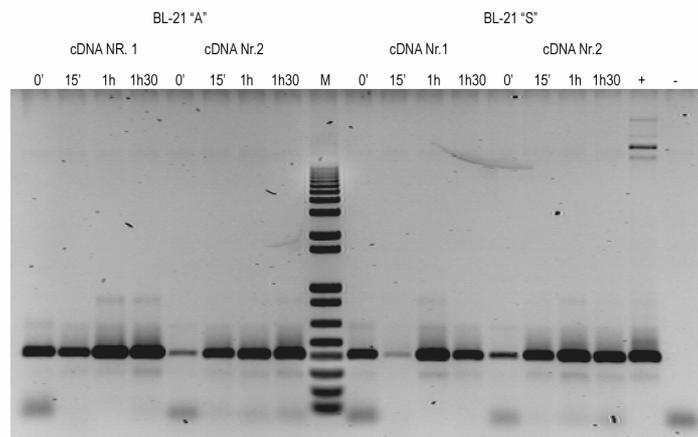


Abbildung 17c: Ergebnisse der PCR mit YadA-Primern, endgültiges Protokoll, Zeitreihen der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A und *E. coli* pASK-IBA2 G389S, jeweils 2 verschiedene cDNA Proben

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von YadA mit YadA_100_3' und YadA100_5' PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 G389A: Banden v.l.n.r.: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für jede cDNA-Reihe, dann DNA-Marker, es folgt die PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 G389S: Banden v.l.n.r.: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für jede cDNA-Reihe, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser. DNA-Leiter. Schwache Banden von YadA vor Induktion, homogen starke Banden von YadA nach Induktion, vereinbar mit Beginn der *yadA*-Transkription nach AHTC-Induktion.

PCR auf DegP, neues Protokoll

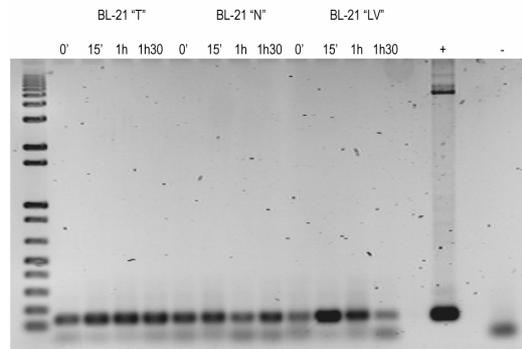


Abbildung 17d: Ergebnisse der PCR mit DegP-Primern, endgültiges Protokoll, Zeitreihen der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 G389T, *E. coli* pASK-IBA2 G389N und *E. coli* pASK-IBA2 LV

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von DegP mit DegP_100_5' und DegP_100_3'
Banden v.l.n.r.: DNA-Marker, PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 G389T: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 G389N: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 LV: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser. DNA-Leiter. Homogen starke Banden von DegP, keine signifikanten Unterschiede in der Menge von DegP-cDNA nachweisbar.

PCR auf YadA, neues Protokoll

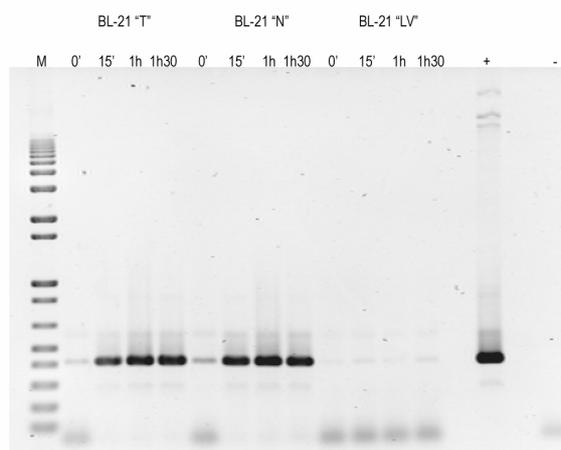


Abbildung 17e: Ergebnisse der PCRs mit YadA-Primern, endgültiges Protokoll, Zeitreihen der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 G389T, *E. coli* pASK-IBA2 G389N und *E. coli* pASK-IBA2 LV

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von YadA mit YadA_100_3' und YadA100_5' Banden v.l.n.r.: DNA-Marker, PCR *E. coli* pASK-IBA2 G389T: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 G389N: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 LV: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. Positivkontrolle mit YadA-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser. DNA-Leiter. Schwache Banden von YadA vor Induktion, homogen starke Bande von YadA nach Induktion.

Beim qualitativen Nachweis der DegP mRNA Expression durch rtPCR konnten keine Unterschiede im DegP-mRNA Level nach Expression von YadAwt, YadA G389A, YadA G389S, YadA G389T, YadA G389N, YadA G389H und dem Leervektor detektiert werden. Beim Nachweis der YadA mRNA lag erwartungsgemäß nach Induktion der YadA Expression die mRNA in höherer Kopiezahl vor als vor Induktion, ein weiterer Anstieg während des Beobachtungszeitraumes konnte in dieser qualitativen PCR dagegen nicht beobachtet werden.

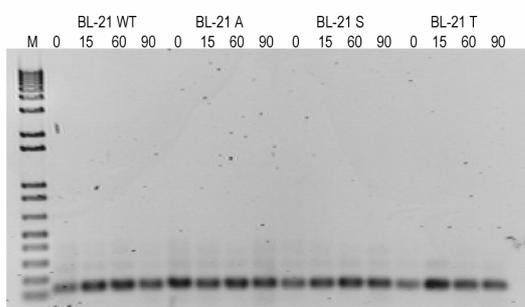
3.3 Quantitativer Vergleich der DegP-Transkription mittels Real Time PCR

3.3.1 Überprüfung der Proben auf Integrität der cDNA

Aus Bakterienkulturen sämtlicher Stämme, geerntet zu sämtlichen Zeitpunkten vor und nach Induktion, wurde nach gleichem Procedere wie im Abschnitt *Material und Methoden* (ab Kapitel 2.2.2 RNA Extraktion, Seite 38) beschrieben die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Um sich der Verwertbarkeit der cDNA Proben für die Analyse mittels Real Time PCR zu vergewissern, wurden vorab diese Proben mittels konventioneller PCR auf das Vorhandensein der nachzuweisenden Genprodukte untersucht. Es wurde die gleiche Methodik angewandt wie in *Material und Methoden* beschrieben, mit den Primerpaaren YadA_100_5' und YadA_100_3', sowie DegP_100_5' und Degp_100_3, mit den jeweiligen Annealing Temperaturen von 47°C und 50°C.

Die erwarteten Banden waren deutlich sichtbar und die Proben wurden als verwendbar gewertet. Hier sind stellvertretend die Ergebnisse der 2. Versuchsreihe gezeigt.

Kontrolle der cDNA, PCR auf DegP



Kontrolle der cDNA, PCR auf DegP

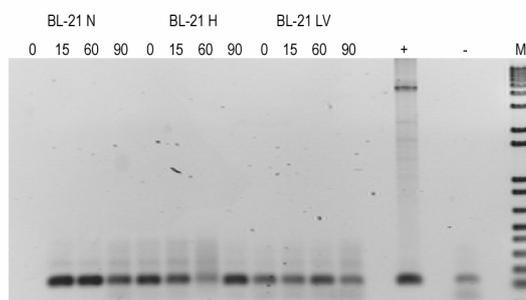


Abbildung 18a: Kontrolle der cDNA, konventionelle PCR auf DegP

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von DegP mit DegP_100_5' und DegP_100_3' Banden v.l.n.r.: DNA-Marker, Proben der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, *E. coli* pASK-IBA2 LV, jeweils die Zeitreihen mit den Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15', 60' und 90' mit AHTC induziert, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle mit Millipore Wasser, DNA-Marker. Unterschiedlich starke Banden auf DegP sichtbar, was auf eine unterschiedliche große, aber stets vorhandene Menge an DegP mRNA nach Extraktion schließen lässt. Eine sehr schwache Bande ist in der Negativkontrolle erkennbar, was jedoch die Güte der Proben nicht in Frage stellte.

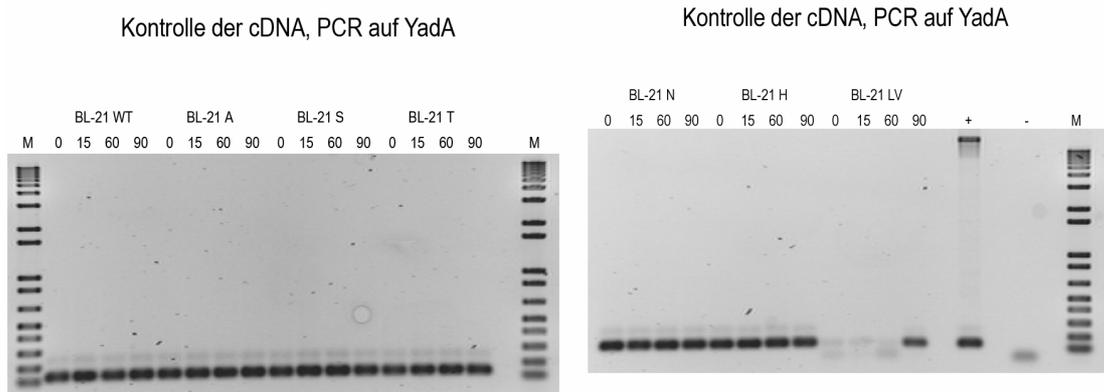


Abbildung 18b: Kontrolle der cDNA, konventionelle PCR auf YadA

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von YadA mit YadA_100_3' und YadA100_5' Banden v.l.n.r.: DNA-Marker, Proben der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, *E. coli* pASK-IBA2 LV, jeweils die Zeitreihen mit den Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15', 60' und 90' mit AHTC induziert, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle mit Millipore Wasser, DNA-Marker. Unterschiedlich starke Banden auf YadA sichtbar, was auf eine unterschiedlich große, aber stets vorhandene Menge an YadA mRNA nach Extraktion schließen lässt. Außer im Stamm *E. coli* pASK-IBA2 LV: zu den Zeitpunkten 0', 15' 60' ist keine YadA-cDNA nachweisbar und zu dem Zeitpunkt 90' ist eine schwache Bande erkennbar, erklärbar durch z.B. eine Kontamination bei der PCR-Amplifikation.

3.3.2 Untersuchung mittels Real Time PCR

Es wurden zwei Real Time PCRs pro Versuch durchgeführt, jeweils eine zum Nachweis von YadA mRNA und DegP mRNA. Pro PCR wurden sämtliche cDNA Proben in Duplikaten analysiert, so dass wir pro Bakterienstamm und Erntezeitpunkt jeweils zwei Messwerte in Quantity (Qty) (relativer Zuwachs der Fluoreszenz, proportional zur amplifizierten Menge template cDNA) erhielten, zwei für DegP und zwei für YadA. Aus diesen beiden Werten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet. Hier sind die Ergebnisse von zwei Versuchen gegenübergestellt.

Zuerst sind hier die gemessenen Werte der beiden Versuche tabellarisch wiedergegeben.

Tabelle 5: Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten 0', 15', 60' und 90', in Qty

Ergebnisse in Qty		0'			
		DegP		YadA	
		Mittelwert	Standardabw	Mittelwert	Standardabw
YadAwt	Versuch 1	1,81E+00	8,70E-01	5,08E-03	7,99E-04
	Versuch 2	2,08E+00	8,06E-01	1,06E-03	0,00E+00
G389 A	Versuch 1	4,91E-01	7,28E-02	9,43E-05	1,94E-05
	Versuch 2	2,41E+00	2,55E-01	5,81E-04	3,14E-04
G389 S	Versuch 1	1,60E+00	6,86E-01	1,94E-05	7,78E-06
	Versuch 2	1,13E+00	1,27E-01	3,72E-04	1,24E-04
G389 T	Versuch 1	1,35E-01	3,46E-02	1,64E-03	5,59E-04
	Versuch 2	2,18E-01	1,24E-01	1,34E-03	1,98E-04
G389 N	Versuch 1	3,20E+00	2,55E-01	9,43E-04	4,31E-05
	Versuch 2	1,94E-02	1,48E-03	6,60E-03	1,77E-04
G389 H	Versuch 1	6,09E-02	1,27E-02	8,00E-04	1,92E-04
	Versuch 2	1,63E-02	8,77E-03	1,77E-03	5,44E-04
G389 LV	Versuch 1	1,85E-01	6,51E-02	6,83E-04	1,70E-05
	Versuch 2	4,32E+01	3,43E+01	1,30E-03	6,36E-05
Ergebnisse in Qty		15'			
		DegP		YadA	
		Mittelwert	Standardabw	Mittelwert	Standardabw
YadA wt	Versuch 1	4,11E-01	3,68E-02	8,81E-01	2,96E-01
	Versuch 2	2,03E+01	1,25E+01	1,83E+00	7,07E-02
G389 A	Versuch 1	4,40E-01	1,62E-01	2,40E-02	8,27E-03
	Versuch 2	9,44E+00	1,65E+00	1,21E-01	7,63E-02
G389 S	Versuch 1	1,52E+00	1,33E+00	2,57E-02	3,27E-02
	Versuch 2	4,17E+01	3,28E+01	9,78E-01	5,98E-01
G389 T	Versuch 1	2,67E+00	5,66E-01	3,50E+00	2,76E-01
	Versuch 2	5,15E+00	5,59E-01	4,35E-01	7,07E-02
G389 N	Versuch 1	2,69E-01	1,05E-01	1,00E-01	4,36E-02
	Versuch 2	2,06E-01	1,09E-01	4,25E+00	4,99E+00
G389 H	Versuch 1	2,69E-01	9,90E-03	3,13E-01	1,23E-01
	Versuch 2	2,90E-01	1,29E-01	1,32E-01	2,83E-03
G389 LV	Versuch 1	9,21E-01	3,53E-01	5,67E-04	4,67E-05
	Versuch 2	1,03E+01	1,23E+00	1,18E-03	1,98E-04

Ergebnisse in Qty		60'			
		DegP		YadA	
		Mittelwert	Standardabw	Mittelwert	Standardabw
YadAwt	Versuch 1	6,79E-01	7,07E-04	2,06E+02	6,69E+01
	Versuch 2	2,06E+02	6,69E+01	1,38E+00	1,91E-01
G389 A	Versuch 1	3,91E-01	1,43E-01	4,42E+01	8,63E-01
	Versuch 2	4,42E+01	8,63E-01	1,37E+00	5,23E-01
G389 S	Versuch 1	4,86E-01	1,54E-01	2,32E+01	7,43E+00
	Versuch 2	2,32E+01	7,43E+00	7,89E-01	3,75E-02
G389 T	Versuch 1	1,49E+00	1,84E-01	2,50E+01	4,01E+00
	Versuch 2	2,50E+01	4,01E+00	7,22E-01	2,50E-01
G389 N	Versuch 1	6,40E-01	7,00E-02	5,19E+01	2,77E+01
	Versuch 2	5,19E+01	2,72E+01	1,49E+00	2,83E-01
G389 H	Versuch 1	1,73E-01	8,98E-02	7,06E-02	1,86E-02
	Versuch 2	7,06E-02	1,86E-02	3,91E-01	4,03E-02
G389 LV	Versuch 1	5,65E-01	5,94E-02	4,69E+00	1,61E+00
	Versuch 2	4,69E+00	1,61E+00	1,18E-03	1,34E-04
Ergebnisse in Qty		90'			
		DegP		YadA	
		Mittelwert	Standardabw	Mittelwert	Standardabw
YadAwt	Versuch 1	5,43E-01	1,83E-01	4,09E-01	2,16E-01
	Versuch 2	9,02E+01	3,04E+01	1,14E+00	5,23E-01
G389 A	Versuch 1	9,01E+00	1,26E+00	4,31E-03	3,53E-03
	Versuch 2	3,67E+01	3,23E+01	1,01E+00	4,31E-01
G389 S	Versuch 1	1,58E-01	1,14E-01	2,36E-02	1,27E-03
	Versuch 2	1,66E+00	3,61E-01	1,21E+00	9,51E-01
G389 T	Versuch 1	9,02E-01	8,49E-02	4,91E-01	3,75E-01
	Versuch 2	1,46E+01	4,33E+00	4,92E-01	3,59E-01
G389 N	Versuch 1	3,69E-01	1,37E-01	3,16E-01	1,92E-01
	Versuch 2	1,10E+00	5,03E-01	1,45E+00	1,34E-01
G389 H	Versuch 1	2,54E-01	4,88E-02	3,82E-01	8,84E-02
	Versuch 2	9,86E-02	5,57E-02	4,60E-01	6,72E-02
G389 LV	Versuch 1	3,82E-01	1,16E-01	6,52E-04	1,38E-04
	Versuch 2	2,81E+01	8,85E+00	1,37E-03	9,90E-05

Im Folgenden werden die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Man sieht die Mittelwerte der Duplikate der real time PCRs auf YadA und DegP zu den jeweiligen Zeitpunkten gegenübergestellt. Die Ergebnisse werden in relativer Zunahme der Fluoreszenz (Qty) gemessen. Es werden nacheinander jeweils der erste und der zweite Versuch pro *E. coli* Stamm gezeigt.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt.

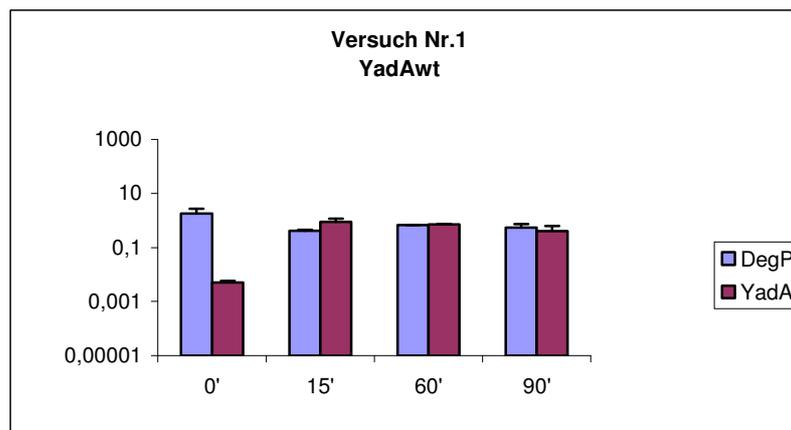


Abbildung 19a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

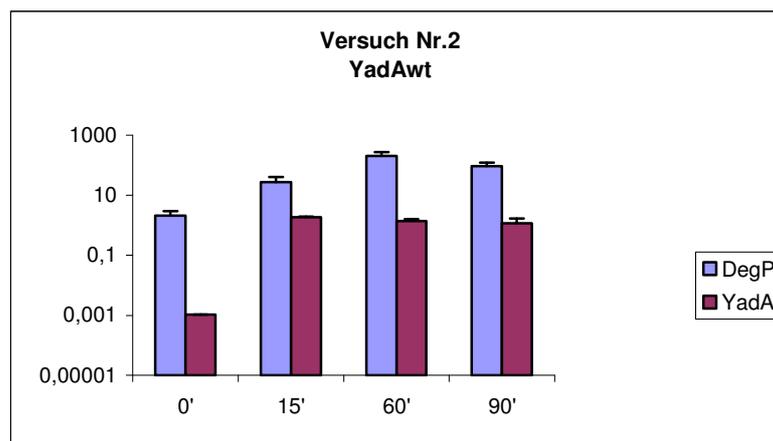


Abbildung 19b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A.

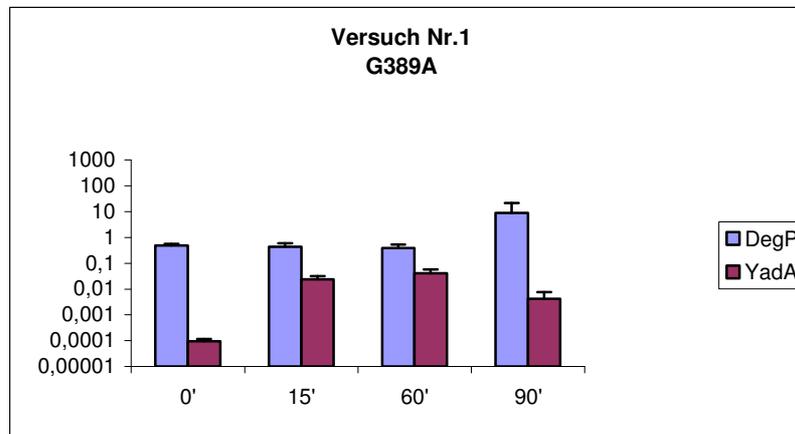


Abbildung 20a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

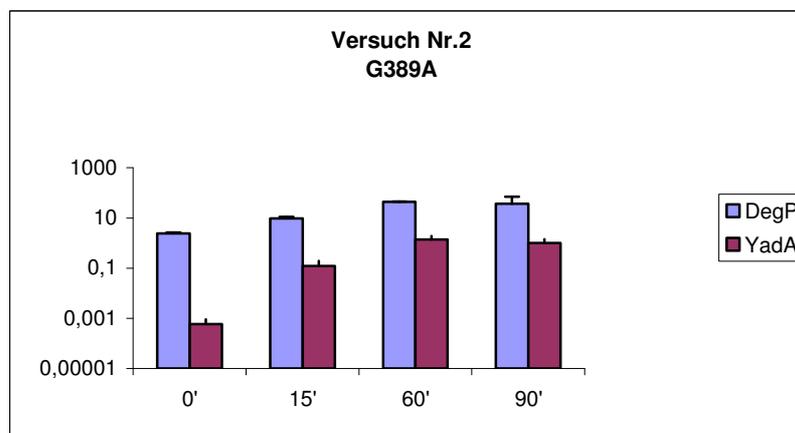


Abbildung 20b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S.

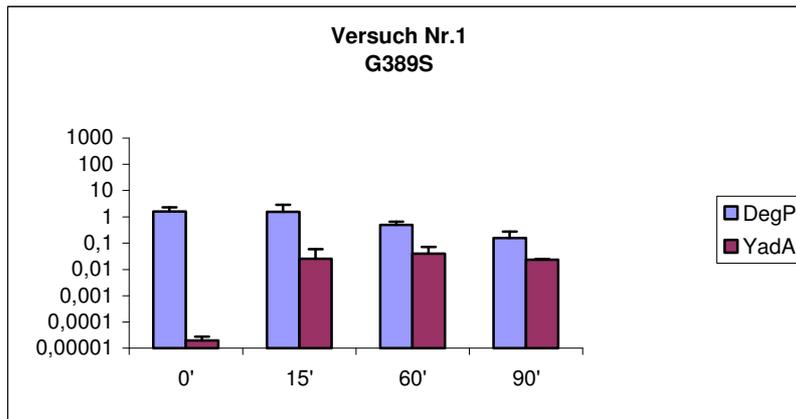


Abbildung 21a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 3 Größenordnungen vor und nach Induktion.

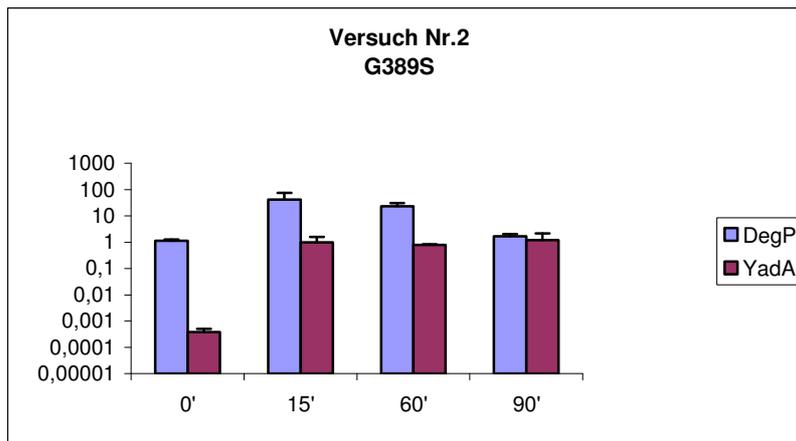


Abbildung 21b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T.

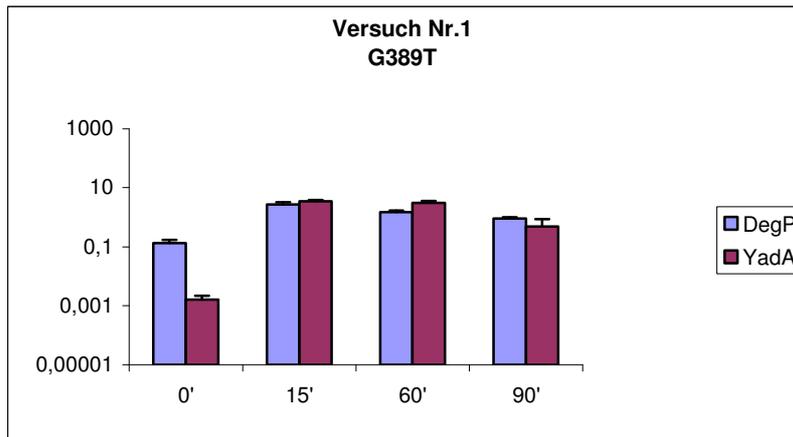


Abbildung 22a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 4 Größenordnungen vor und nach Induktion.

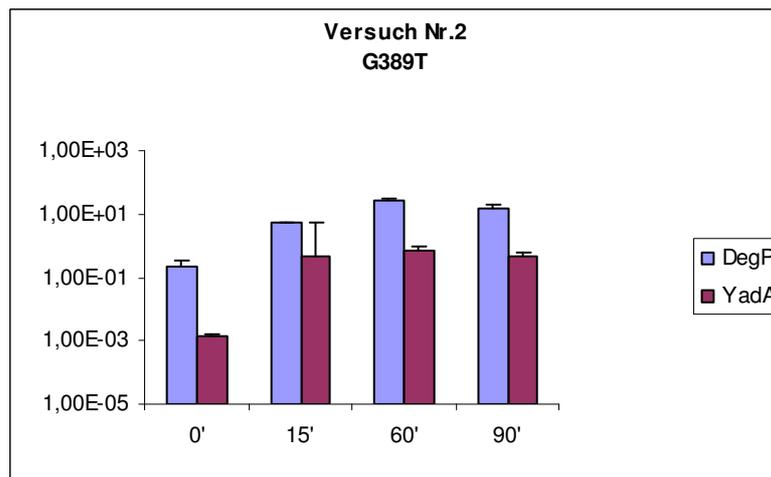


Abbildung 22b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N.

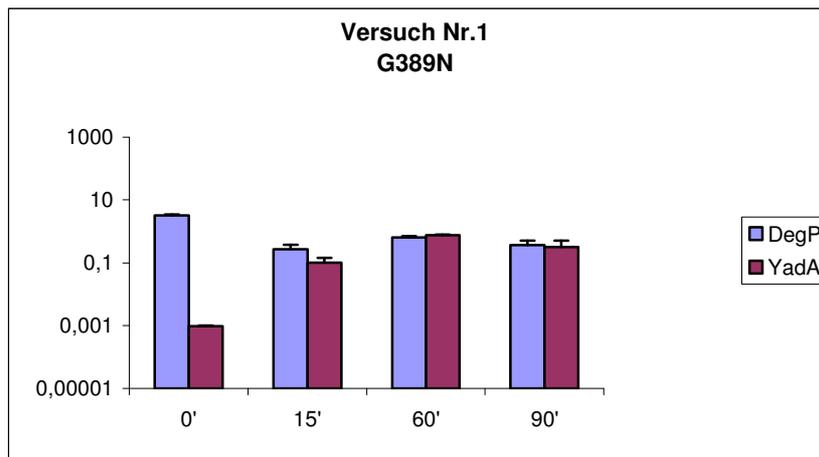


Abbildung 23a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min', in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

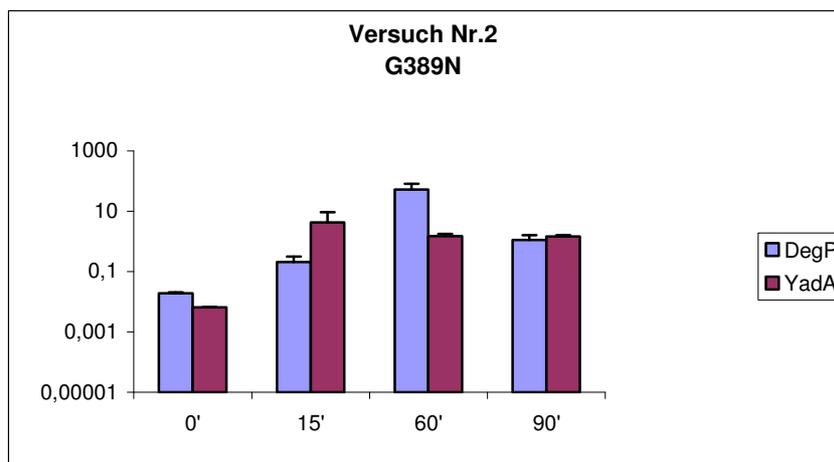


Abbildung 23b: Realtive Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 3 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H.

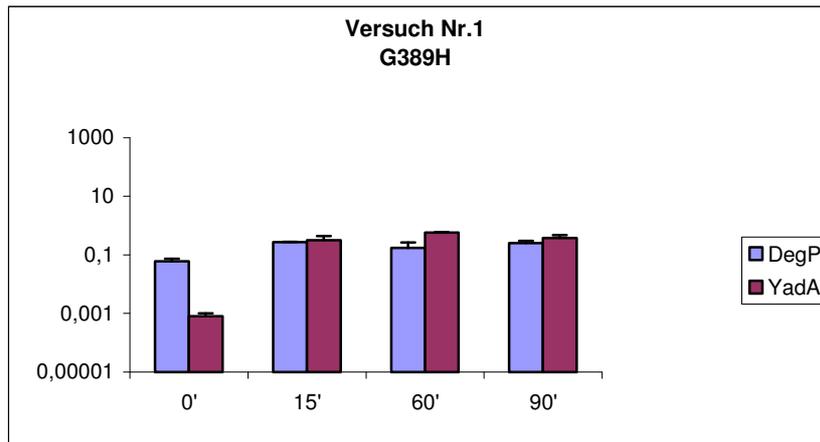


Abbildung 24a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

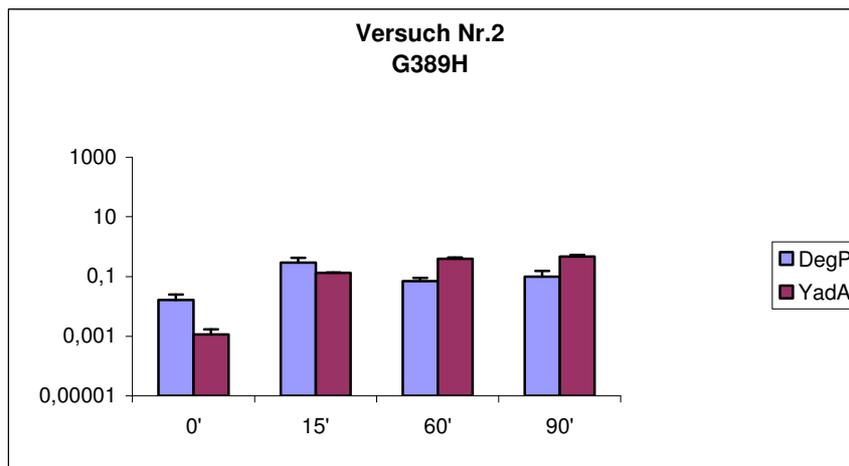


Abbildung 24b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 LV.

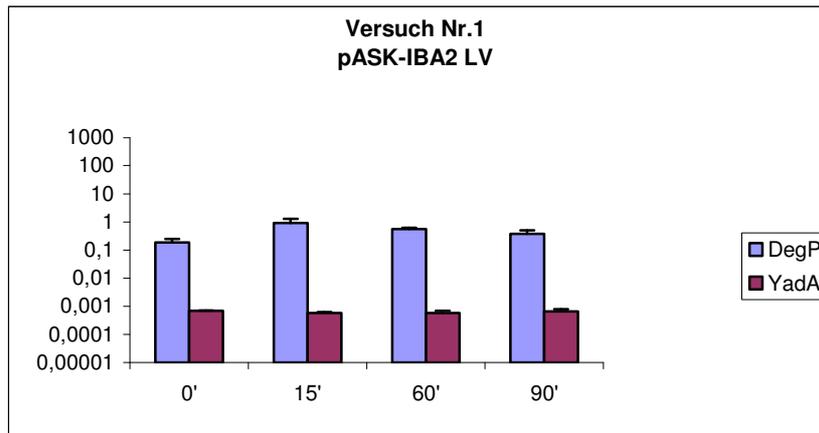


Abbildung 25a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 LV, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, kein Anstieg der YadA-mRNA Menge vor und nach Induktion.

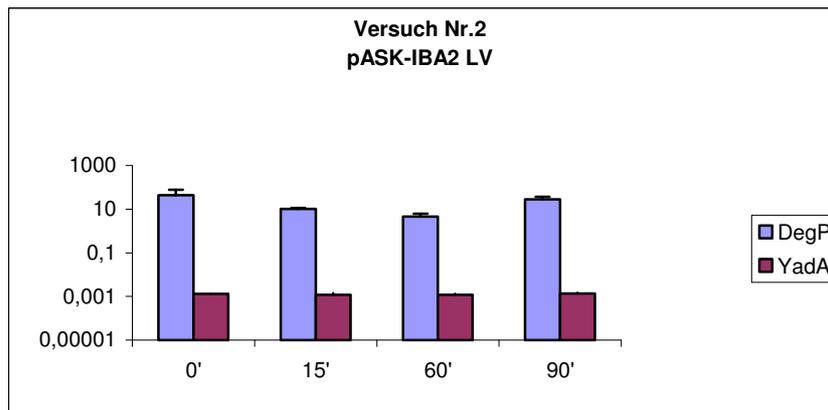


Abbildung 25b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 LV, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, kein Anstieg der YadA-mRNA Menge vor und nach Induktion.

Es wurde eine logarithmische Darstellung der Ergebnisse gewählt, da sonst die Abbildung der Ergebnisse nicht möglich gewesen wäre.

Die Menge an gemessener cDNA von YadA war zum Zeitpunkt 0' bei jedem Versuch um mindestens eine Größenordnung von 10^2 geringer als zu den

Zeitpunkten 15', 60' und 90', außer bei dem Stamm pASK-IBA2 LV, also dem Stamm, der kein YadA exprimieren sollte. Dort war kein Anstieg von YadA-cDNA zu verzeichnen, die Menge an gemessener YadA-cDNA bleibt bei einer Größenordnung von 10^{-3} Qty konstant, was wie erwartet mit einer nicht vorhandenen Expression von YadA vereinbar war.

Wenn man aber berücksichtigt, dass die Ergebnisse auf einer logarithmischen Skala abgebildet wurden, muss auf die erhebliche Streuung der gemessenen Mengen an YadA hingewiesen werden; abgebildet sind jeweils die Mittelwerte zweier Messungen. Zwischen den Messungen zu einem Zeitpunkt und eines bestimmten Stammes bestehen zum Teil große Abweichungen. Ähnliches kann auch für die Transkription von DegP gesagt werden. Zwischen den Messungen zweier Versuche bestehen z. T. große Unterschiede und auch im Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Stämme miteinander gibt es eine z.T. starke Streuung, die Unterschiede sind nicht signifikant.

4 Diskussion

Die Expression des periplasmatischen Enzyms mit Chaperon- und Proteasefunktion DegP (Spiess et al., 1999, Lipinska et al., 1988) wird durch die Akkumulation von äußeren Membranproteinen im periplasmatischen Raum über die Aktivierung des ECF σ -Systems durch Steigerung der Transkription von *degP* verstärkt (Rowley et al., 2006). Nun stellte sich die Frage, ob die Akkumulation des äußeren Membranproteins YadA zu einer verstärkten Expression von DegP führt. Eine verminderte Expression von fehlerhaftem YadA an der bakteriellen Oberfläche und die im Vergleich erhöhte Expression von fehlerhaftem YadA an der Oberfläche DegP-defizienter *E. coli* Stämme, lässt eine Beteiligung von DegP am Abbau fehlerhafter YadA-Moleküle vermuten (Grosskinsky et al. 2007). Dies ist vereinbar mit dem Modell, dass äußere Membranproteine in das Periplasma sezerniert und an die äußere Membran geführt werden, bevor sie in die äußere Bakterienmembran integriert und gegebenenfalls bei Akkumulation, bedingt z.B. durch Fehlfaltung, durch Proteasen wie DegP abgebaut werden (Danese & Silhavy 1998, de Cock et al., 1996; Duguay & Silhavy 2004). Sklar et al. schlagen vor, dass DegP eine Auffangrolle in der Faltung von äußeren Membranproteinen im periplasmatischen Raum wahrnimmt, zusammen mit dem Chaperon Skp, dass aber die Hauptaufgabe dem Peptidyl-Prolyl-Isomerase Enzym mit allgemeiner Chaperonfunktion SurA zukommt (Sklar et al., 2007). Des Weiteren könnte DegP bei der Insertion von äußeren Membranproteinen in der äußeren Bakterienmembran beteiligt sein (Krojer et al., 2008), vielleicht also dann auch bei der Insertion von YadA. Nun wird der Transport von YadA-Molekülen, die durch den Austausch von einem konservierten Glycin-Rest verändert worden sind, gestört (Grosskinsky et al. 2007). Das fehlerhafte YadA könnte demzufolge im Periplasma akkumulieren. Wie oben erwähnt ist DegP an den verschiedenen Stellen der Protein-Homöostase im Periplasma beteiligt und höchstwahrscheinlich fordert die Expression mutierter YadA-Proteine eine gesteigerte Aktivität dieses Enzyms. Signaltransduktionskaskaden, die bei

veränderten Rahmenbedingungen die Transkription von *degP* verstärken, sind bekannt (Raivio & Silhavy 2001).

In Hinblick dessen wurde die Arbeitshypothese formuliert, dass die Expression fehlerhafter YadA-Moleküle die Expression von DegP verstärkt.

Die Veränderung der Expression auf Proteinebene sollte mittels Western-Blot, eine Veränderung der Transkription mittels PCR und RT-PCR nachgewiesen werden.

Nun war in den Western-Blot Analysen kein Unterschied erkennbar, weder im Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte, noch im Vergleich der unterschiedlichen Stämme. Die Hypothese, dass die Menge an DegP mit zunehmender Dauer des durch die Expression des fehlerhaften YadAs verursachten Stresses sichtbar ansteigt, konnte nicht verifiziert, aber auch nicht verworfen werden. Eine mögliche Abnahme der DegP-Menge im Verlauf, vereinbar durch die Bewältigung des Stresses, war ebenfalls nicht erkennbar. Die Banden waren im zeitlichen Verlauf alle gleich stark sichtbar. Eine zweite Hypothese, die mit dieser Versuchsreihe untersucht werden sollte, nämlich dass DegP in den mutierten Stämmen stärker exprimiert wird im Vergleich zu dem YadAwt und dem Bakterienstamm, welcher kein YadA exprimiert, konnte ebenfalls nicht bestätigt werden. Auch hier war kein Unterschied in der DegP-Menge erkennbar. Unsere Hypothese, nämlich dass ein gesteigerter Stress durch Anfallen fehlerhafter YadA Moleküle eine gesteigerte DegP Expression zur Folge hat, hätte jedoch eine verstärkte Expression von DegP nach Induktion der YadA-Expression der mutierten Stämme im Vergleich zu den Proben vor Induktion, als auch im Vergleich zu dem Wildtyp- und Leervektor-Stamm verlangt. DegP ist ein Protein des Periplasmas, welches konstitutiv, als housekeeping Gen, exprimiert wird (Lipinska et al. 1989; Strauch et al. 1989) und die Expression von fehlerhaftem YadA ist nicht die einzige Stressquelle, auf die DegP antworten soll (Pallen & Wren 1997). Deshalb können die Ergebnisse der Western-Blots Reihe mit der These erklärt werden, dass das DegP in allen untersuchten Bakterienreihen konstitutiv auf einem hohen Niveau exprimiert

war und so die Unterschiede in der Western-Blot Analyse nicht detektierbar waren. War nun der Ansatz von vornherein als falsch zu beurteilen? Dem widersprechen Loosmore et al. aus dem Jahr 1997, die einen komparativen Immunoblot auf HtrA, bzw. DegP in *Haemophilus influenzae* spp. unter Standardbedingungen und nach Stressinduktion durchgeführt haben. Sie fanden heraus, dass DegP konstitutiv auf niedrigem Niveau unter allen Bedingungen exprimiert wird, im Verlauf aber unter Stress zunahm, so dass *H. influenzae* HtrA bzw. DegP ebenfalls als stress-response Protein gelten kann (Loosmore et al., 1997). In einer 2008 erschienenen Publikation von Huston et al. wird ebenfalls eine Zunahme der Bandenstärke im Western Blot auf DegP nach Kultur von *C. trachomatis*L2 unter Hitzeschock nachgewiesen (Huston et al., 2008). Skorko-Glonek et al. wiesen einen Unterschied in der Expression von DegP in verschiedenen Stämmen nach (Skorko-Glonek et al., 2008). Unsere Arbeit hatte einen ähnlichen methodologischen Ansatz, konnte aber keinen Anstieg von *E. coli* DegP nach Expression von punktmutiertem YadA zeigen, durch eine konstitutiv hohe Expression von DegP in diesen Bakterienstämmen erklärbar. Um einen Anstieg von DegP nach Expression von mutiertem YadA erfassen zu können, müsste daher entweder eine Methodik ausgewählt werden, die auch Zuwächse von Proteinen im hohen Bereich erfassen kann, oder das Ausgangsniveau von DegP müsste gesenkt werden. Dies könnte womöglich durch eine Optimierung der Wachstums- und Induktionsbedingungen oder durch die Wahl anderer Bakterienstämme, wie z.B. *E. coli* JM109, wie er von Loosmore et al. verwendet wurde, erreicht werden (Loosmore et al. 1997). Als alternative Erfassungsmethoden für das DegP Protein wären als weitere semi-quantitative Methode mit aber höherer Differenzierungskapazität ein 2D-Immunoblot denkbar oder auch ein ELISA, was eine noch genauere Quantifizierung ermöglichen würde. Eine Erwähnung dieser beiden Methoden zur komparativen Messung von DegP ist zu diesem Zeitpunkt in der gängigen Literatur nicht gefunden worden.

Des Weiteren muss erwähnt werden, dass die absolute Menge an DegP nicht notwendigerweise mit dem Stress des Bakteriums korrelieren muss. DegP ist nicht das einzige periplasmatische stress-response Protein von *E. coli*, FkpA,

Skp und SurA sind nur drei weitere (Rowley et al. 2006). Darüber hinaus kann *E. coli* über posttranslationale Modifikationen die Funktion von Enzymen steuern, z.B. über Acetylierung und Phosphorylierung von Hsp90 (Wandinger et al., 2008).

Es ist daher durchaus sinnvoll, die Stressantwort auf Transkriptionsebene zu untersuchen. Periplasmatischer Stress, wie er durch die Akkumulation von Proteinen im Periplasma verursacht wird, führt bei *E. coli* über eine Aktivierung der σ^E -Signaltransduktionskaskade zu einer vermehrten Transkription von *degP* (Raivio & Silhavy, 2001; Rowley et al., 2006). Auch wenn sich daher die Proteinmenge nicht kurzfristig verändert, eine Veränderung über die regulatorischen envelope stress response Mechanismen wäre wahrscheinlich. Daher war die Hypothese berechtigt, dass eine Expression von mutiertem YadA eine messbare Zunahme von DegP-mRNA zur Folge hat.

Die Messung von DegP-mRNA sowie YadA-mRNA erfolgte semi-quantitativ, d.h. es wurde auf die Messung eines house-keeping Gens verzichtet, da nur Unterschiede von DegP- und YadA-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten und im Vergleich der verschiedenen Stämme von Interesse war, da ausschließlich ein stärkerer Anstieg von DegP nach Induktion der YadA Expression bei den Stämmen, die das mutierte YadA exprimierten, im Vergleich zu den Stämmen, die entweder den Wildtyp oder überhaupt kein YadA exprimierten, nachgewiesen werden sollte.

Nun stellte sich heraus, dass die Transkription von *degP* in sämtlichen *E. coli* Stämmen keinem Muster folgt. Im Vergleich zur Transkription von *yadA*, welches konstant einen deutlichen Sprung um eine Größenordnung von 10^2 Qty nach entsprechender Induktion machte, mit Ausnahme des Leervektor-Stammes, verhielt sich die *degP* Transkription erratisch, sowohl im zeitlichen Verlauf, als auch im Vergleich der verschiedenen Stämme untereinander. So konnte keine signifikante Zunahme der *degP*-Transkription nach Induktion von YadA verzeichnet werden und auch die *degP*-Transkription ist in den Stämmen mit fehlerhaftem YadA nicht signifikant höher als in den *E. coli* Stämmen, die entweder kein YadA oder den Wildtyp exprimieren; die Zu- und Abnahme der *degP*-Transkription scheint im gewählten experimentellen Setup nicht mit dem

Grad an Stress, der durch die Expression der verschiedenen YadA Moleküle zu vermuten war, zu korrelieren. Die Menge an *degP* cDNA in *E.coli* G389H war beispielsweise im 2. Versuch, im Vergleich zu *E.coli* pASK-IBA2 LV oder auch YadAwt konstant um ca. zwei Größenordnungen niedriger, obwohl der Stamm mit der Expression der G389H Mutation ein YadA exprimiert, welches *in vitro* in nur sehr geringen Mengen an die bakterielle Oberfläche gelang (Grosskinsky et al., 2007), im Gegenteil zu den beiden Stämmen, die entweder kein YadA oder strukturell intaktes YadA exprimierten. Die Expression von G386H mutiertem YadA sollte nach unserer Hypothese stärkeren Stress für das Bakterium bedeuten, als die Expression von YadA vom Wildtyp oder das Fehlen von YadA. Zumindest theoretisch bedeutet dies eine deutlich geringere Aktivierung der ECF-Signaltransduktionskaskade in letzteren beiden Stämmen, welches sich in einer im Vergleich zu den Stämmen mit mutierten *yadA* Sequenzen in einem geringeren Anstieg der Transkriptionssteigerung von *degP* nach Induktion durch AHTC widerspiegeln sollte.

Wie ist dies zu erklären? Rauter et al. suchten sich das Gen *degP* aus, da es ein großes Induktionsratio, ca. 100fach, nach Hitzeschock hatte (Gill et al., 2000; Rauters et al., 2003). Sie fanden eine höchste DegP-RNA Expression nach 40 min, mit einer Steigerung um das 110fache. Des Weiteren konnten sie eine *degP*-Expression durch Co-Stimulation durch UV-Licht oder 4% Ethanol ausschließen, Nährstoffmangel steigerte aber die *degP*-Expression (Rauter et al., 2002). Ist die *degP*-Expression also wirklich so stabil? Sie isolierten die bakterielle mRNA mit dem gleichen Kit wie wir verwendeten, die real time PCR und die reverse Transkription wurden jedoch nach einem One-Step Protokoll im Light-Cycler durchgeführt. Des Weiteren setzten sie *E. coli* zur Stressinduktion einem Hitzeschock aus und induzierten nicht die Expression mutierter äußerer Membranproteine. Die *degP*-Expression unterlag in unseren Versuchen starken, eher erratischen Schwankungen, mit einem z. T. hohen Grundniveau an *degP*-cDNA. Darüber hinaus musste das RNA-Extraktionsprotokoll deutlich verkürzt werden, da offensichtlich die *degP*-mRNA in sämtlichen *E. coli* BL21 Stämmen eine sehr kurze Halbwertszeit hat.

Grundsätzlich ist mRNA sehr instabil (Bernstein et al., 2002) und unsere Schwankungen in der *degP*-Expression durch diese Instabilität erklärt werden. Des Weiteren trifft die Instabilität des Transkriptoms nicht auf alle mRNAs in gleicher Weise zu, da manche mRNA schneller abgebaut wird als andere (Selinger et al., 2003). In der konventionellen PCR-Kontrolle der cDNA wurde auch eine größere Stabilität der *yadA*-mRNA im Vergleich zur *degP*-RNA festgestellt. Dies ist dadurch erklärbar, dass die bakterielle mRNA der Proteine, die für eine schnelle Anpassung an das äußere Milieu notwendig sind, eine kürzere Halbwertszeit besitzen um dem Organismus eine schnellere Adaptation an Schwankungen zu ermöglichen. Selinger et al. fanden heraus, dass unter der mRNA mit einer Halbwertszeit unter 5 min, mögliche bakterielle Enzyme überrepräsentiert waren (Selinger et al., 2003). Daher überrascht es nicht, wenn *degP*-mRNA im Vergleich zur *yadA*-mRNA deutlich schneller abgebaut wird. Und es ist wichtig sich zu vergegenwärtigen, dass die RNA-Messung trotzdem nur eine Momentaufnahme der Homöostase der mRNA Transkription ist, dessen Gleichgewicht durch Synthese und Abbau bestimmt wird.

Unsere Ergebnisse können dann durch die Hypothese einer hohen base-line Transkriptionsrate von *degP* mit einer sehr kurzen Halbwertszeit der *degP*-mRNA in den *E.coli* BL21 Stämmen erklärt werden. Ein Anstieg der Transkriptionsrate von *degP* durch die Expression von sich im Periplasma akkumulierenden äußeren Membranproteinen wäre dann auch nicht einfach erfassbar.

Damit kann man auch unsere Ergebnisse der Immunoblots auf DegP erklären, da eine hohe base-line Transkriptionsrate von DegP-mRNA mit einer hohen Grundmenge an DegP im Periplasma vereinbar ist. Die Unterschiede in der Menge an DegP sind dann nicht durch eine Analyse nach Western-Blot erfassbar, da sich das Protein im Überschuss befindet. Ein stress response kann auch vorrangig über die Regulation der Expression anderer periplasmatischer Enzyme, wie z.B. SurA oder Skp erfolgen. Des Weiteren passen sich Bakterien an veränderte metabolische oder ökologische Bedingungen nur zum Teil über die Regulation der mRNA Transkription an (Schulze & Downward, 2001). Die Abbaugeschwindigkeit prokaryotischer

mRNA ist auch bei weitem nicht konstant und kann durch eine Reihe von Umständen beeinflusst werden (Carrier & Keasling, 1997). Neben der Sekundärstruktur der mRNA wie z.B. 3' Hairpins (Braun et al., 1996), 5' Hairpins (Boot et al., 1996) oder der allgemeinen Translationsgeschwindigkeit (Carrier & Keasling, 1997), sowie der allgemeinen Transkriptionsgeschwindigkeit (Chevrier-Miller et al., 1990) spielen auch bakterielle Wachstumsbedingungen, wie die Bedingungen der Bakterienkultur (Albertson & Nystrom, 1994) und die Expressionsgeschwindigkeit bakterieller Proteine (Dong et al., 1995) eine wichtige Rolle, da eine geringe Wachstumsrate, sowie eine Protein-Überexpression die mRNA-Stabilität negativ beeinflussen. Postranslationale Modifizierung von Enzymen (Wandinger et al., 2008) und Bindung von sRNA an mRNA (Massé et al., 2003; Vogel & Pappenfort, 2006) spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Bindung von sRNA an mRNA reguliert auch die Transkription von *rpoS*, das in der ECF σ -Signaltransduktionskaskade eine wichtige Rolle spielt (Hengge-Aronis, 2002). Auch die Organisation der 5'-untranslated regions, 5'UTRs genannt (Brantl, 2004; Coppins et al., 2007), ist ein wichtiger Regulationsmechanismus prokaryotischer Organismen. Damit kann auch nicht alleine von der erhöhten Menge an Transkriptionsprodukten eines Gens auf die endgültige, biologisch aktive Menge eines bakteriellen Proteins geschlossen werden. Die Ergebnisse sowie die Literatur lassen daher eine hohe Grundmenge an DegP im Periplasma vermuten, die sich nur geringfügig durch die Akkumulation von mutiertem YadA erhöht. Beweisen aber können die Ergebnisse es nicht.

Um Ansatzpunkte zur Veränderung der periplasmatischen Enzymexpression in *E.coli* BL21 nach Stressinduktion zu finden, könnten DIGE-Analysen, oder differential two-dimensional gel electrophoresis zu verschiedenen Zeitpunkten der Induktion der YadA-Expression durchgeführt werden, um einen Vergleich des kompletten Proteoms des Periplasmas zu zwei verschiedenen Zeitpunkten zu ermöglichen (Riederer, 2008). Dabei würde nicht nur DegP, sondern auch sämtliche weiteren Proteasen und Chaperone des Periplasmas erfasst werden, was eine genauere Erfassung der bakteriellen Antwort auf Akkumulation von äußeren Membranproteinen im Periplasma ermöglichen würde. Daraufhin

könnten die Mengen dieser Enzyme gezielt mit quantitativen Methoden wie z.B. ELISA bestimmt werden.

Ziel dieser Arbeit war ein größeres Verständnis der Interaktion zwischen periplasmatischen stress-response Enzymen wie DegP und äußeren Membranproteinen pathogener Keime, die zu einem größeren Verständnis möglicher Angriffspunkte für antibakterielle Substanzen führen sollen.

Die Erforschung des Enzyms DegP öffnet viele klinische Perspektiven, vor allem im Bereich der Infektiologie und der Onkologie. So waren DegP-defiziente Stämme von *Salmonella typhi* als lebendige, in ihrer Pathogenität attenuierten Vakzine in Entwicklung (Tacket et al., 2007). Des Weiteren könnte DegP ein möglicher Angriffspunkt der Tumorthherapie werden, da humane Varianten von DegP womöglich als Tumorsuppressoren fungieren, da humanes HtrA1 und HtrA3 in Endometrium-Carcinom mit zunehmenden Schweregrad der Erkrankung herabreguliert werden (Bowden et al., 2006). Auch im malignen Melanom ist HtrA1 mit zunehmender Progression der Erkrankung herabreguliert und kann im umgekehrten Fall das Wachstum von Metastasen unterdrücken (Baldi et al., 2002).

5 Zusammenfassung

Das klinische Bild einer manifesten Infektion mit dem humanpathogenen, Gram-negativen Stäbchenbakterium *Yersinia enterocolitica* ist sehr vielfältig und reicht von einer selbstlimitierenden Gastroenteritis bis hin zu einer schweren Sepsis. Ein Pathogenitätsfaktor dieses Bakteriums ist das äußere Membranprotein YadA, ein trimere Autotransporter. Das Enzym DegP, welches in der periplasmatischen Stressantwort von *E. coli* eine doppelte Funktion als Chaperon und Protease wahrnimmt, ist auch an der Antwort auf den durch die Expression mutierter YadA Moleküle verursachten Stress beteiligt.

Die Untersuchung des Einflusses dieses von YadA verursachten Stresses auf die Expression von DegP ist Gegenstand der Dissertation.

Hierzu wurden mittels Western-Blot mögliche Unterschiede der Proteinexpression von DegP sowohl vor und nach Expression von YadA als auch von verschiedenen Bakterienstämmen, die unterschiedliche YadA Proteine exprimierten, untersucht. Erkennbare Unterschiede waren nicht feststellbar, die basale Expression von DegP war im Vergleich stets hoch.

Zur Untersuchung der DegP mRNA-Produktion wurde die mRNA von DegP als auch von YadA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Bei Versuchen, die Produkte mittels konventioneller PCR nachzuweisen, wurde ein sehr schneller Abbau der DegP-mRNA festgestellt, so dass das Isolationsprotokoll optimiert werden musste.

Im semiquantitativen Vergleich der Transkriptionsrate mittels RT-PCR konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von DegP in Abhängigkeit von der Expression punktmutierter Varianten von YadA festgestellt werden. Zusammengefasst konnten wir hier zeigen, dass eine hohe basale Expression der DegP-mRNA mit schnellem Abbau vorliegt, sowie eine hohe basale Expression des DegP-Enzyms, die nicht wesentlich durch eine Akkumulation äußerer Membranproteine wie YadA im Periplasma gesteigert wird.

6 Literaturverzeichnis

1. **Ackermann, N., Tiller, M., Anding, G., Roggenkamp, A., Heesemann, J.** 2008. Contribution of Trimeric Autotransporter C-Terminal Domains of Oligomeric Coiled-Coil Adhesin (Oca) Family Members YadA, UspA1, EibA, and Hia to Translocation of the YadA Passenger Domain and Virulence of *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. **190**: 5031-5043
2. **Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M., Gross, C.A.** 1999. The *Escherichia coli* σ^E -dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. Genes Dev. **13**:2449–2461.
3. **Albertson, N.H., Nyström, T.** 1994 Effects of starvation for exogenous carbon on functional mRNA stability and rate of peptide chain elongation in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **117**:181–187.
4. **Aleksic, S., Steigerwalt, A.G., Bockemühl, J., Huntley-Carter, G.P., Brenner, D.J.** 1987. *Yersinia rohdei* sp. nov. isolated from Human and Dog Feces and Surface Water. Int J Syst Bacteriol **37**(4): 327-332.
5. **Appelbaum, J.S., Wilding, G., Morse, L.J.** 1983. *Yersinia enterocolitica* endocarditis. Arch Intern Med. **143**(11):2150–2151.
6. **Autenrieth, I.B. & Firsching, R.** 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. J Med Microbiol **44**: 285-294.
7. **Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricalà, C., Amantea, A., Noonan, DM., Albini, A., Natali, PG., Lombardi, D., Paggi, MG.** (2002) The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. Oncogene 21:6684-6688
8. **Balligand, G., Laroche, Y., Cornelis, G.** 1985. Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. Infect. Immun. **48**(3): 782-786.
9. **Barz, C., Abahji, T.N., Trülzsch K, Heesemann J.** 2000. The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. FEBS Letters **482**(1-2): 139-143.

10. **Beeching, N.J., Hart, H.H., Synek, B.J., Bremner, D.A.** 1985 A patient with hemosiderosis and multiple liver abscesses due to *Yersinia enterocolitica*. Pathology **17**: 530
11. **Bercovier, H., Ursing, J., Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Carter, G.P., Mollaret, H.H.** 1980. *Yersinia kristensenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of sucrose-negative strains (formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol. **4**, 219-224.
12. **Bercovier, H., Steigerwalt, A.G., Guiyoule, A., Huntley-Carter, G., Brenner, D.J.** 1984. *Yersinia aldovae* (Formerly *Yersinia enterocolitica*-Like Group X2): a New Species of *Enterobacteriaceae* Isolated from Aquatic Ecosystems." Int J Syst Bacteriol **34**(2): 166-172.
13. **Bercovier & Molleret**, 1984, Bergey's Manual of Sytematic Bacteriology
14. **Bernstein HD.** Are bacterial "autotransporters" really transporters? 2007. Trends in Microbiology. **15**(10): 441-447
15. **Bernstein, J. A., A. B. Khodursky, P. H. Lin, S. Lin-Chao, and S. N. Cohen.** 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **99**:9697-9702.
16. **Bliska, J., Black, D.** 1995. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. Infect. Immun. **63**(2): 681-685.
17. **Black, D. S., Bliska, J.B.** 1997. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. EMBO J. **16**:2730-2744.
18. **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.
19. **Bliska, J.B., Copass, M.C., Falkow, S,** 1993. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. Infect Immun. **61**(9):3914–3921
20. **Boland, A., Cornelis G.R.** 1998. Role of YopP in Suppression of Tumor Necrosis Factor Alpha Release by Macrophages during *Yersinia* Infection. Infect. Immun. **66**(5): 1878-1884.

21. **Boot, H.J., Pouwels, H.P.** 1996. Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. Molecular Microbiology **21**(6): 1117-1123.
22. **Bottonne, E.J.** 1977. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic organism. Crit. Rev. Microbiol. **5**:211–241.
23. **Bottonne, E.J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin.Microbiol.Rev. **10**:257-276.
24. **Bottonne, E.J.** 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microbes and Infection **1**(4): 323-333.
25. **Bouza, E., Dominguez, M., Buzon, L., Boixeoda, D., Revillo, M.J., de Rafael, L., Martinez-Beltran, J.** 2006. *Yersinia enterocolitica* septicemia. Am J Clin Pathol **74**:404–409, 1980
26. **Bowden, M. A., Di Nezza-Cossens, L.A., Jobling, T., Salamonsen, L.A., Nie, G.** 2006. Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer. Gynecologic Oncology **103**(1): 253-260.
27. **Brantl, S.** 2004. Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. Trends in Microbiology **12**(11): 473-475.
28. **Braun, F., Hajnsdorf, E., Regnier, P.** 1996. Polynucleotide phosphorylase is required for the rapid degradation of the RNase E processed *rpsO* mRNA of *Escherichia coli* devoid of its 3' hairpin, Mol. Microbiol. **19** (1996), pp. 997–1005.
29. **Brenner, D.J., Bercovier, H., Ursing, J., Alonso, J.M., Steigerwalt A.G., Fanning, G.R., Carter, G.P., Mollaret, H.H.**1980. *Yersinia intermedia*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains (formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol. **4**, 207-212.
30. **Bukholm, G., Kapperud, G., Skurnik, M.** 1990. Genetic evidence that the *yopA* gene-encoded *Yersinia* outer membrane protein Yop1 mediates inhibition of the anti-invasive effect of interferon. Infect. Immun. **58**, 2245–2251.
31. **Butler, T.** 1979. *Yersinia* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Douglas RG (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases. pp 1797–1800
32. **Butler, T.** 1994. *Yersinia* infections: centennial of the discovery of the plague bacillus. Clinical Infectious Diseases **19**:655–663

33. **Butler, T., Dennis, D.T.** 2005. *Yersinia species*, including plague. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed., vol. 2.:2691-2701
34. **Capron, J.P., Capron-Chivrac, D., Tossou, H., Delamarre, J., Eb, F.** 1984. Spontaneous *Yersinia enterocolitica* peritonitis in idiopathic hemochromatosis. Gastroenterology **87**(6):1372-5.
35. **Carrier T.A., Keasling J.D.** 1997. Controlling Messenger RNA Stability in Bacteria: Strategies for Engineering Gene Expression. Biotechnology Progress **13**(6): 699-708.
36. **CDC.** 1991. *Yersinia enterocolitica* bacteremia and endotoxin shock associated with red blood cell transfusion. MMWR **40**:176-8.
37. **CDC.** 1997. Red Blood Cell Transfusions Contaminated with *Yersinia enterocolitica* -- United States, 1991-1996, and Initiation of a National Study to Detect Bacteria-Associated Transfusion Reactions. MMWR. **46**(24);553-5
38. **Chevrier-Miller, M., Jacques, M., Raibaud, O., Dreyfus, M.** 1990. Transcription of single-copy hybrid lacZ genes by T7 RNA polymerase in *Escherichia coli*: mRNA synthesis and degradation can be uncoupled from translation. Nucl. Acids Res. **18**(19): 5787-5792.
39. **Cezairliyan, B.O., Sauer, R.T.** 2007. Inhibition of regulated proteolysis by RseB. Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(10): 3771-3776.
40. **Chaba, R., Grigorova, I.L., Flynn, J.M., Baker, T.A., Gross, C.A.** 2007. Design principles of the proteolytic cascade governing the sigmaE-mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. Genes & Development **21**(1): 124-136.
41. **China, B., Sory, M.P., N'Guyen BT, De Bruyere M, Cornelis GR.** (1993). Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. Infect. Immun. **61**(8): 3129-3136.
42. **Chiu, H.Y., Flynn, D.M., Hoffbrand, A.V., Politis, D.** 1986. Infection with *Yersinia enterocolitica* in patients with iron overload. Br Med J (Clin Res Ed). **292**(6513):97.
43. **Coppins, R.L., Hall, K.B., Groisman, E.A.** 2007. The intricate world of riboswitches. Curr Opin Microbiol. **10**:176–181.
44. **Cornelis, G.R., Abraham, E.P.** 1975. Beta-lactamases from *Yersinia enterocolitica*. J Gen Microbiol. **87**(2):273–284.

45. **Cornelis G.R.** 1994. *Yersinia* pathogenicity factors. **Curr Top Microbiol Immunol** **192**: 243-263.
46. **Cornelis, G. R., Boland A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P., Stainier, I.** 1998. The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**(4): 1315-1352.
47. **Cotter, S. E., Surana, N. K., St Geme, J.W. 3rd.** 2005. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. Trends in Microbiology **13**(5):199-205.
48. **Danese, P.N., Silhavy, T.J.** 1998 CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. J Bacteriol.**180**:831–839.
49. **Dautin, N., Bernstein, H.D.** 2007. Protein Secretion in Gram-Negative Bacteria via the Autotransporter Pathway. Annual Review of Microbiology **61**(1): 89-112.
50. **De Las Penas, A., Connolly, L., Gross, C.A.** 1997. The σ^E -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ^E . Mol Microbiol. **24**:373–385.
51. **Denecker, G., Declercq, W., Geuijen, C.A., Boland, A., Benabdillah, R., van Gorp, M., Sory, MP., Vandenabeele, P., Cornelis, G.R.** 2001. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced Apoptosis of Macrophages Involves the Apoptotic Signaling Cascade Upstream of Bid. J. Biol. Chem. **276**(23):19706-19714.
52. **de Cock, H., Tommassen, J.** 1996. Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *E. coli*. EMBO J. **15**:5567–5573.
53. **De Wulf, P., Kwon, O., Lin, E.C.** (1999). The CpxRA Signal Transduction System of *Escherichia coli*: Growth-Related Autoactivation and Control of Unanticipated Target Operons. J. Bacteriol. **181**(21): 6772-6778.
54. **De Wulf, P., Lin, E.C.** 2000. Cpx Two-Component Signal Transduction in *Escherichia coli*: Excessive CpxR-P Levels Underlie CpxA* Phenotypes. J. Bacteriol. **182**(5):1423-1426
55. **DiGiuseppe, P.A., Silhavy, T.J.** 2003. Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System. J. Bacteriol. **185**(8): 2432-2440.

56. **Dong, H., Nilsson, L., Kurland, C.** 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. J. Bacteriol. 1995, **177**, 1497-1504.
57. **Duguay, A.R., Silhavy, T.J.** 2004. Quality control in the bacterial periplasm. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1694**(1-3): 121-134.
58. **El Tahir, Y., Kuusela, P., Skurnik, M.** (2000) Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification of eight NSVAIG--S motifs on the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. Mol. Microbiol. **37**: 192–206
59. **El Tahir, Y., Skurnik, M.** 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. International Journal of Medical Microbiology **291**(3): 209-218.
60. **Emödy, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skurnik, M., Kapperud, G., O'Toole, P., Wadström, T.** 1989. Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for *yopA*-mediated and chromosomally encoded mechanisms. J. Bacteriol. **171**: 6674–6679
61. **Erickson, J. W., Vaughn, V., Walter, W.A., Neidhardt, F.C., Gross, C.A.** 1987. Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. Genes & Development **1**(5): 419-432
62. **Ewing, W.H., Ross, A.J., Brenner, D.J., Fanning, G.R.** 1978. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology. **28**:37-44.
63. **Flügel, A., Schulze-Koops, H., Heesemann, J., Kuhn, K., Sorokin, L., Burkhardt, H., von der Mark, K., Emmrich, F.** 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
64. **Flynn, J. M., Levchenko, I., Sauer, R.T., Baker, T.A.** 2004. Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. Genes & Development **18**(18):2292-2301.
65. **Gallagher, S., Chakavarti, D.** 2008. Immunoblot Analasis. J Vis Exp. **20**(16): 759.
66. **Gallant, T., Freedman, M., Vellend, H., Francombe, W.H.,** 1986. *Yersinia* sepsis in patients with iron overload treated with deferoxamine. N Engl J Med **314**(25): 1643-.

67. **Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A., Wolf-Watz, H.** 1993. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. Nature **361**(6414): 730-732.
68. **Gemski, P., Lazere, J.R., Casey, T.** 1980. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. **27**(2): 682-685.
69. **Gill, R.T., Valdes J.J., Bentley, W.E.** 2000. A Comparative Study of Global Stress Gene Regulation in Response to Overexpression of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. Metabolic Engineering **2**(3):178-189.
70. **Gray, L.D.** 1995 *Escherichia, Salmonella, Shigella, and Yersinia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of clinical microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology, 450-6.
71. **Gripenberg-Lerche, C., Skurnik, M., Zhang, L. J., Söderström, K. O., Toivanen, P.** 1994. Role of YadA in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: Experimental studies with rats. Infect. Immun. **62**:5568–5575
72. **Gripenberg-Lerche, C., Skurnik, M., Toivanen, P.** 1995. Role ofYadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: Experimental studies with rats. Infect. Immun. **63**:3222–3226
73. **Grosskinsky, U., Schütz, M., Fritz M, Schmid Y, Lamparter MC, Szczesny P, Lupas AN, Autenrieth IB, Linke D.** 2007. A Conserved Glycine Residue of Trimeric Autotransporter Domains Plays a Key Role in *Yersinia* Adhesin A Autotransport. J. Bacteriol. **189**(24): 9011-9019.
74. **Guan, K.L., Dixon, J.E.** 1990. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. Science. **249**(4968):553–556.
75. **Hasselblatt, H., Kurzbauer, R., Wilken, C., Krojer, T., Sawa, J., Kurt, J., Kirk, R., Hasenbein, S., Ehrmann, M., Clausen, T.** 2007. Regulation of the sigmaE stress response by DegS: how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress. Genes & Development **21**(20):2659-2670.
76. **Heesemann, J., Gross, U., Grüter, L.** 1987. Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*. Contrib Microbiol Immunol. **9**:312–316.

77. **Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Nataro, J.P.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. Trends in Microbiology **6**(9):370-378.
78. **Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the sigmaS RpoS Subunit of RNA Polymerase. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66**(3):373-395.
79. **Hewstone, A.S., Davidson, G.P.** 1972. *Yersinia enterocolitica* septicaemia with arthritis in a thalassaemic child. Medical Journal of Australia **1**, 1035–1038.
80. **Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., Heesemann, J.** 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. EMBO J. **19**:5989–5999.
81. **Huber, D., Bukau, B.** (2008). DegP: a Protein "Death Star". Structure. **16**(7):989-990.
82. **Huston, W., Theodoropoulos, C., Mathews, S.A., Timms, P.** 2008. *Chlamydia trachomatis* responds to heat shock, penicillin induced persistence, and IFN-gamma persistence by altering levels of the extracytoplasmic stress response protease HtrA. BMC Microbiology **8**(1):190.
83. **Iriarte, M., Cornelis, G.R.** 1998. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. Molecular Microbiology **29**(3): 915-929.
84. **Juris, S.J., Rudolph, A.E., Huddler, D., Orth, K., Dixon, J.E.** 2000. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: Actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(17):9431-9436.
85. **Kanehara, K., Ito, K., and Akiyama, Y.** 2002. YaeL (EcfE) activates the σ^E pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti- σ^E , RseA Genes Dev. **16**:2147-2155
86. **Kapperud, G., Lassen, J.** 1983. Relationship of virulence-associated autoagglutination to hemagglutinin production in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria. Infect. Immun. **42**(1):163-169.
87. **Kappemud, G., Skarpeid, H.-J., Solberg, R., Bergan, T.** 1985. Outer membrane proteins and plasmids in different *Yersinia enterocolitica* serogroups isolated from man and animals. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B **93**:27-35.

88. **Kim, D.J., Kim, K.K.** 2005. Structure and Function of HtrA Family of Proteins, the Key Players in Protein Quality Control. J Biochem Mol Biol. **38(3):**266-74
89. **Kim, D.Y., Jin K.S., Kwon. E., Ree, M., Kim, K.K.** 2007. Crystal structure of RseB and a model of its binding mode to RseA. Proceedings of the National Academy of Sciences **104(21):**8779-8784.
90. **Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A.M., Skurnik, M., Meri, S.** 2008. *Yersinia enterocolitica* Serum Resistance Proteins YadA and Ail Bind the Complement Regulator C4b-Binding Protein. PLoS Pathog **4(8):**e1000140.
91. **Knowles, T.J., Scott-Tucker, A., Overduin, M., Henderson, I.R.,** 2009, Membrane protein architects: the role of BAM complex in outer membrane protein assembly. Nature Reviews Microbiology **7(3):** 206-214.
92. **Koornhof, H.J., Smego R.A. Jr., Nicol, M.** 1999. Yersiniosis II: The Pathogenesis of *Yersinia* Infections. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **18(2):**87-112.
93. **Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M., Clausen, T.** 2002. Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. Nature **416(6879):**455-459.
94. **Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H.R., Ehrmann, M., Clausen, T.** 2008. Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. Nature **453(7197):**885-890.
95. **Kuehnert MJ, Jarvis WR, Schaffer DA, Chaffin DJ.** 1997. Platelet transfusion reaction due to *Yersinia enterocolitica* JAMA. **278:**550.
96. **Lachica, R.V., Zink, D.L.** 1984. Plasmid-associated cell surface charge and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. **44(2):** 540-543.
97. **Lachica, R.V., Zink D.L., Ferris, W.R.** 1984. Association of fibril structure formation with cell surface properties of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. **46(1):**272-275.
98. **Lambert de Rouvroit, C.S., Cornelis, G.R.** 1992. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. Molecular Microbiology **6(3):**395-409.

99. **Lämmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**(5259):680-5.
100. **Laskowska, E., Kuczyńska-Wiśnik, D., Skórko-Glonek, J., Taylor, A.** 1996. Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro. Molecular Microbiology **22**(3):555-571.
101. **Leung, K.Y., Straley, S.C.** 1989. The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. J. Bacteriol. **171**(9): 4623-4632.
102. **Leung, K.Y., Reisner, B.S., Straley, S.C.** (1990). YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. Infect. Immun. **58**(10): 3262-3271.
103. **Levchenko, I., Grant, R.A., Flynn, J.M., Sauer, R.T., Baker, T.A.** 2005. Versatile modes of peptide recognition by the AAA plus adaptor protein SspB. Nature Structural & Molecular Biology **12**(6):520-525.
104. **Lipinska, B., Sharma, S., Georgopoulos, C.** 1988. Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a sigma³²-independent mechanism of heat-inducible transcription. Nucl. Acids Res. **16**(21):10053-10067.
105. **Lipinska, B., Fayet, O., Baird L, Georgopoulos C.** 1989. Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* htrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. J. Bacteriol. **171**(3): 1574-1584.
106. **Lipinska, B., Zylicz, M., Georgopoulos, C.** 1990. The HtrA (DegP) Protein, Essential for *Escherichia coli* Survival at High Temperatures, Is an Endopeptidase. J. Bacteriol. **172**(4):1791-1797
107. **Loosmore, S.M., Yang, Y.P., Coleman D.C., Shortreed, J.M., England, D.M., Klein, M.H.** 1997. Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease. Infect. Immun. **65**(9):3701-3707.
108. **Mantle, M., Basaraba, L., Peacock, S.C., Gall, D.G.** 1989. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. Infect. Immun. **57**(11):3292-3299.
109. **Massé, E., Majdalani, N., Gottesmann, S.** 2003. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. Current Opinion in Microbiology **6**(2):120-124.

110. **Mileykovskaya, E., Dowhan W.** 1997. The Cpx two-component signal transduction pathway is activated in *Escherichia coli* mutant strains lacking phosphatidylethanolamine. J. Bacteriol. **179**(4):1029-1034.
111. **Nakajima, R., Motin, V., Brubaker, R.R.** 1995. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. Infect. Immun. **63**(8):3021-3029.
112. **Oomen CJ, Van Ulsen P, Van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P.** 2004. Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. Embo J. **23**(6):1257-1266.
113. **Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M.B., Bao, Z.Q., Palmer, L.E., Bliska, J.B., Mangel, W.F., Staskawicz, B., Dixon, J.E.** 2000. Disruption of Signaling by *Yersinia* Effector YopJ, a Ubiquitin-Like Protein Protease. Science **290**(5496):1594-1597.
114. **Paerregaard, A., Espersen, F., Jensen, O.M., Skurnik, M.** 1991. Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. Infect. Immun. **59**:253-260.
115. **Paerregaard, A., Espersen, F., Skurnik, M.** 1991. Role of *Yersinia* outer membrane protein YadA in adhesion to rabbit intestinal tissue and rabbit intestinal brush border membrane vesicles. APMIS **99**:226-232.
116. **Pallen, M.J., Wren, B.W.** 1997. The HtrA family of serine proteases. Molecular Microbiology **26**:209-221.
117. **Pepe, J.C., Wachtel, M.R., Wagar, E., Miller, V.L.** 1995. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. Infect. Immun. **63**(12):4837-4848.
118. **Peterson, J.H., Szabady, R.L., Bernstein, H.D.** 2006. An Unusual Signal Peptide Extension Inhibits the Binding of Bacterial Presecretory Proteins to the Signal Recognition Particle, Trigger Factor, and the SecYEG Complex. J. Biol. Chem. **281**(14):9038-9048.
119. **Pfeiffer, A.** 1889. Über die bacilläre Pseudotuberkulose bei Nagethieren. Verlag von George Thieme pp. 1-42
120. **Pilz, D., Vocke, T., Heesemann, J., Brade, V.** 1992. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. Infect. Immun. **60**(1):189-195.

121. **Piroth, L., Meyer, P., Bielefeld, P., Besancenot, J.F.** 1997. *Yersinia* bacteremia and iron overload. Revue de Médecine Interne, La **18**(12):932-938.
122. **Pogliano, J., Lynch, A.S., Belin, D., Lin, E.C., Beckwith, J.** 1997. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. Genes & Development **11**(9):1169-1182.
123. **Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., Meyer, T.F.** 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Nature **325**(6103):458-462.
124. **Portnoy, D.A., Falkow, S.** 1981. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. **148**(3):877-883.
125. **Portnoy, D.A., Moseley S.L., Falkow, S.** 1981. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. Infect. Immun. **31**(2):775-782.
126. **Raivio, T.L., Silhavy, T.J.** 1997. Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two- component system. J. Bacteriol. **179**(24):7724-7733.
127. **Raivio, T.L., Popkin, D.L., Silhavy, T.J.** 1999. The Cpx Envelope Stress Response Is Controlled by Amplification and Feedback Inhibition. J. Bacteriol. **181**(17):5263-5272.
128. **Raivio, T.L., Silhavy T.J.** 1999. The sigmaE and Cpx regulatory pathways: Overlapping but distinct envelope stress responses. Current Opinion in Microbiology **2**(2):159-165.
129. **Raivio, T.L., Silhavy, T.J.** 2001. Periplasmic stress and ECF-sigma factors. Annual Review of Microbiology **55**(1):591.
130. **Rauter, H., Overeijnder, M., Doornbosch, D., Schalkhammer, T.** 2003. DegP and related genes as stress-markers for *E.coli*-viability-ultra-sensitive RT- Realtime PCR-Chemical Monthly **11**:1489-1498
131. **Rawlings, N.D., Barret, A.J.** 1994. Families of serine peptidases. Methods Enzymol. **244**:19-61
132. **Rhodium, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., Gross, C.A.** 2006. Conserved and Variable Functions of the sigmaE Stress Response in Related Genomes. PLoS Biology **4**(1): e2.
133. **Riederer, B.M.** 2008. Non-covalent and covalent protein labeling in two-dimensional gel electrophoresis J. Proteomics **71**(2):231-44.

134. **Roggenkamp, A., Neuberger, H.R., Flügel, A., Schmoll, T., Heesemann, J.** 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. Molecular Microbiology **16**(6):1207-1219.
135. **Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R., Heesemann, J.** 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**(7):2506-2514.
136. **Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C.A., Truelzsch, K., Hoffmann, H., Heesemann, J.** 2003. Molecular Analysis of Transport and Oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* Adhesin YadA. J. Bacteriol. **185**(13):3735-3744.
137. **Rosqvist, R., Forsberg, A., Wolf-Watz, H.** 1991. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. Infect. Immun. **59**(12): 4562-4569.
138. **Rouviere, P.E., De Las Penas, A., Meccas, J., Lu, C.Z., Rudd, K.E.** 1995. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, σ^E , in *Escherichia coli*. Embo J. **14**:1032–1042.
139. **Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J., Roberts, M.** 2006. Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. Nat Rev Micro **4**(5):383-394.
140. **Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S., Heesemann, J.** 1996. "Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils." Infect. Immun. **64**(3):724-733.
141. **Saras, J., Heldin, C.H.,** 1996. PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. Trends in Biochemical Sciences **21**(12):455-458.
142. **Schindler, M., Schütz, M.** 2009. Unpubliziert.
143. **Schmid, Y., Grassl, G.A., Bühler, O.T., Skurnik, M., Autenrieth, I.B., Bohn, E.** 2004. *Yersinia enterocolitica* Adhesin A Induces Production of Interleukin-8 in Epithelial Cells. Infect. Immun. **72**(12):6780-6789.
144. **Schleifstein, J.I., Coleman, M.B.** 1939. An unidentified microorganism resembling *B. ligniere* and *Past. Pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *New York State Journal of Medicine*, 1939, **39**:1749-1753.

145. **Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., Kirsch, T., Swoboda, B, Bull, C., Goodman, S., Emmrich, F.** 1993. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. Infect. Immun. **61**(6):2513-2519.
146. **Schulze, A., Downward, J.** 2001. Navigating gene expression using microarrays — a technology review. Nature Cell Biology **3**(8):E190-95
147. **Sebes, J.I., Mabry, E.H .Jr., Rabinowitz, J.G.** 1976. Lung abscess and osteomyelitis of the rib due to *Yersinia enterocolitica*. Chest **69**(4): 546-8
148. **Selinger, D.W., Saxena, R.M., Cheung, K.J., Church, G.M., Rosenow, C.** 2003. Global RNA Half-Life Analysis in *Escherichia coli* Reveals Positional Patterns of Transcript Degradation. Genome Research **13**(2):216-223.
149. **Sijbrandi, R., Urbanus, M.L., ten Hagen-Jongman, C.M., Bernstein, H.D., Oudega, B., Otto, B.R., Luirink, J.** 2003. Signal Recognition Particle (SRP)-mediated Targeting and Sec-dependent Translocation of an Extracellular *Escherichia coli* Protein. J. Biol. Chem. **278**(7):4654-4659.
150. **Sing, A., Rost, D., Tvardovskaia, N., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Kirschning, C.J., Aepfelbacher, M., Heesemann, J.** 2002. *Yersinia* V-Antigen Exploits Toll-like Receptor 2 and CD14 for Interleukin 10-mediated Immunosuppression. J. Exp. Med. **196**(8):1017-1024.
151. **Skrzypek, E., Cowen, C., Straley, S.C.** 1998. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. Molecular Microbiology **30**(5):1051-1065.
152. **Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D., Silhavy, T.J.** 2007. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. Genes Dev. **21**:2473–2484.
153. **Skorko-Glonek, J., Krzewski, K., Lipinska, B., Bertoli, E., Tanfani, F.** 1995. Comparison of the structure of wild-type HtrA heat shock protease and mutant HtrA proteins. A Fourier transform infrared spectroscopic study. J Biol Chem. **270**:11140–11146
154. **Skorko-Glonek, J., Sobiecka-Szkatula, A., Lipinska, B.** 2006. Characterization of disulfide exchange between DsbA and HtrA proteins from *Escherichia coli*. Acta Biochim Pol. **53**:585–589.

155. **Skorko-Glonek, J., Sobiecka-Szkatula, A., Narkiewicz, J., Lipinska, B.** 2008. The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures. Microbiology **154**(12):3649-3658.
156. **Skurnik, M., Bolin, I., Heikkinen, H., Piha, S., Wolf-Watz, H.** 1984. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia spp.* J. Bacteriol. **158**:1033-1036.
157. **Skurnik, M.** 1985. Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. Infect. Immun. **47**:183-190.
158. **Skurnik, M., Wolf-Watz, H.** 1989. Analysis of the yopA gene encoding the Yopl virulence determinants of *Yersinia spp.* Mol. Microbiol. **3**:517-529.
159. **Skurnik, M., Toivanen, P.** 1992. LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. J. Bacteriol. **174**(6):2047-2051.
160. **Skurnik, M., el-Tahir, Y., Saarinen, M., Jalkanen, S., Toivanen, P.** 1994. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. Infect. Immun. **62**(4):1252-1261.
161. **Smego, R.A., Fren, J., Koornhof, H.J.** 1999. Yersiniosis I: Microbiological and Clinicoepidemiological Aspects of Plague and Non-Plague *Yersinia* Infections Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **18**(1):1-15
162. **Spiess, C., Beil, A., Ehrmann, M.** 1999. A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell **97**(3):339-347.
163. **Stoddard, J.J., Wechsler, D.S., Nataro, J.P., Casella, J.F.** (1994). *Yersinia enterocolitica* infection in a patient with sickle cell disease after exposure to chitterlings. Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. **16**:153–155.
164. **Strauch, K.L., Johnson, K., Beckwith, J.** 1989. Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. J. Bacteriol. **171**(5):2689-2696.
165. **Sulakvelidze, A.** 2000. *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. Microbes and Infection **2**(5):497-513.
166. **Szabady, R.L., Peterson, J.H., Skillman, K.M., Bernstein, H.D.** 2005. An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a

- bacterial autotransporter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(1):221-226.
167. **Tacket, C.O., Levine, M.M.** 2007. CVD 908, CVD 908-htrA, and CVD 909 Live Oral Typhoid Vaccines: A Logical Progression. Clinical Infectious Diseases **45**(s1):S20-S23.
 168. **Tamm, A., Tarkkanen, A., Korhonen, T., Kuusela, P., Toivanen, P., Skurnik, M.** 1993. Hydrophobic domains affect the collagen binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. Mol. Microbiol. **10**:995-1011
 169. **Tertti, R., Skurnik M., Vartio, T., Kuusela, P.** 1992. Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. Infect. Immun. **60**(7):3021-3024.
 170. **Ursing, J., Brenner, D.J., Bercovier, H., Fanning, G.R., Steigerwalt, A.G., Brault, J., Mollaret, H.H.** 1980. *Yersinia frederiksenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnase-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol. **4**:213-217.
 171. **Van Loghem, J.J.** 1944. The classification of plague-bacillus. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology. **10**:15-16.
 172. **Veiga E, Sugawara E, Nikaido H, de Lorenzo V, Fernandez LA.** 2002. Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. Embo J **21**(9):2122-2131.
 173. **Vogel, J., Papenfort, K.** 2006. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. Current Opinion in Microbiology **9**(6):605-611.
 174. **Walsh, N.P., Alba, B.M., Bose, B., Gross, C.A., Sauer, R.T.** 2003. OMP Peptide Signals Initiate the Envelope-Stress Response by Activating DegS Protease via Relief of Inhibition Mediated by Its PDZ Domain. Cell **113**(1):61-71.
 175. **Wandinger, S.K., Richter, K., Buchner, J.** 2008. The Hsp90 Chaperone Machinery. J. Biol. Chem. **283**(27):18473-18477.
 176. **Wauters, G., Janssens, M., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J.** 1988. "*Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., Formerly Called *Yersinia enterocolitica* Biogroups 3A and 3B." Int J Syst Bacteriol **38**(4):424- 429
 177. **Welkos, S., Friedlander, A., McDowell, D., Weeks, J., Tobery, S.** 1998. V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. Microbial Pathogenesis **24**(3):185-196.

178. **Wülfing, C., Plückthun, A.** 1994. Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology **12**(5):685-692.
179. **Yang, Y., Isberg, R.R.** 1993. Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis* yadA product. Infect. Immun. **61**(9):3907-3913.
180. **Yao, T., Meccas, J, Healy, J.I., Falkow, S., Chien, Y.** 1999. Suppression of T and B Lymphocyte Activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence Factor, YopH. J. Exp. Med. **190**(9):1343-1350.
181. **Zumbihl, R., Aepfelbacher, M., Andor, A., Jacobi, C.A., Ruckdeschel, K., Rouot, B., Heesemann, J.** 1999. The Cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* Induces Modification and Cellular Redistribution of the Small GTP-binding Protein RhoA. J. Biol. Chem. **274**(41):29289-29293.

7 Abkürzungen

al.	Alumni
bidest.	Zwei mal destilliert
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic acid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
PCR	Polychromasekettenreaktion
p.a.	Per analysi
M	Molar
mM	Milimolar
min	Minuten
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natrium Chlorid
Qty	Quantity
sRNA	Small untranslated ribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
RT-PCR	Reverse transcription real time PCR
sec	Sekunden
TBE	Tris/Borat/EDTA
TPE	Tris/Phosphat/EDTA
<i>Y. enterocolitica</i>	Yersinia enterocolitica
<i>Y. pestis</i>	Yersinia pestis
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Yersinia pseudotuberculosis
<i>Y. spp.</i>	Yersinia specie

8 Danksagung

Frau Dr. Monika Schütz danke ich herzlich für ihre umfangreiche Betreuung und Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft, ihren unerschöpflichen Enthusiasmus sowie die kritische und geduldige Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. I. B. Autenrieth danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Einen ganz besonderen Dank gilt Herrn Dipl. biochem. Martin Köberle für seine fortwährende Unterstützung, seine unermüdliche Geduld, sowie für seine unentbehrlichen Ratschläge zur Durchführung der Versuche und zur Auswertung der Ergebnisse und für das zügige und gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. med. Susanne Berchtold, Frau Dipl. biochem. Ulli Grosskinsky, Herrn Dipl. biol. Magnus Schäfer, Herrn Dipl. biochem. Christian Eberhardt, Frau Gudrun Härer, Frau Birgit Manncke und Frau cand. med. Eva Weiss für ihre Unterstützung in der alltäglichen Laborarbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt der Studienstiftung des deutschen Volkes für ihre großzügige finanzielle Unterstützung meines Studiums, sowie für das Vermitteln von Ehrgeiz und Pflichtbewusstsein.

Ich bedanke mich auch bei meinen Freunden und meinen Bundesbrüdern meiner Alten Turnerschaft Eberhardina-Markomania zu Tübingen für die notwendige Zerstreung in meiner Freizeit, die treuen Freundschaften und die unermüdliche Solidarität.

Ein ganz liebes Dankeschön und eine herzliche Umarmung an meine Eltern und an meine Schwester, ohne deren Beistand ich das Abschließen der Arbeit nicht so zielstrebig verfolgt hätte.

Diese Arbeit widme ich meinen Großeltern, die mir auf Grund ihrer gelebten Werte stets Vorbilder waren, als Dank für Ihre uneingeschränkte Unterstützung.

9 Lebenslauf

Bildungsweg

- 1990-1991: Erste Klasse an der Sonning Common Primary School, GB
- 1991-1993: Einschulung in der European School in Culham, GB
- 1993-1997: European School Uccle I, Brüssel
- 1997-2003: Lycée International de Saint Germain en Laye
- Seit 2003 : Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Abgelegte Prüfungen

- Erlangung der deutschen allgemeinen Hochschulreife und des französischen Baccalauréats mit der Note 1,0 oder „Mention très bien“
- Cambridge Certificate of Proficiency in English, Note A
- Sprachzeugnis der Universidad de Granada, UNIcert level III im Spanischen, Beurteilung „sehr gut“
- 1. Staatsexamen mit 1,5 oder „sehr gut“
- 2. Staatsexamen mit 1,5 oder „sehr gut“ am 23.11.2010
- Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes 2004-2010

Promotion

- 04/2007 – 04/2009: Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Tübingen zum Thema *Einfluss der Expression punktmutierter Varianten des Yersinia Adhäsins A (YadA) auf die Expression der periplasmatischen Chaperon-Protease DegP*, betreut von Frau Dr. Monika Schütz.

Praktika und Berufserfahrung

- Klinische Praktika: - Dreimonatiges Krankenpflegepraktikum in Osorno, Chile und im Universitätsklinikum Tübingen
 - Einmonatige Famulatur in der Allgemeinchirurgie Vivantes-Klinikums Berlin-Friedrichshain
 - Einmonatige Famulatur in der Inneren Medizin in Osorno, Chile
 - Einmonatige Famulatur in der Universitätshautklinik der Universität Tübingen

- Fünfzehntägige Famulatur in der Radiologischen Klinik der Universität Tübingen
 - Fünfzehntägige Famulatur in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Umweltmedizin des Klinikums Schwabing, München
 - Fünfzehntägige Famulatur bei Dr. Frieder Allmendinger, Facharzt für Dermatologie und Allergologie, Esslingen.
 - Halbes Tertial der Inneren Medizin bei Prof. Hendry, Department of Nephrology, King's College, London
 - Halbes Tertial der Inneren Medizin des Praktischen Jahres bei Prof. Dr. Zoller, Katharinenhospital, Stuttgart
 - Tertial der Chirurgie des Praktischen Jahres am Lehrkrankenhaus Hospital Base de Osorno der Universidad Austral de Chile
 - Tertial des Praktischen Jahres an der Hautklinik der Universität Tübingen bei Prof. Dr. Röcken
- Weitere Praktika:
 - Einmonatiges Praktikum bei Royal Numico BV, jetzt Teil der Groupe Danone, in den Bereichen Research & Development sowie Marketing & Vertrieb, in Erlangen und Amsterdam
 - Dreimonatiges Praktikum in der Ethics Unit des Department for Ethics, Trade, Human Rights & Health Law der World Health Organisation in Genf, Schweiz
 - Berufserfahrung:
 - Mitglied der InOne Consult, einer Studentischen Unternehmensberatung und Mitarbeit an Projekten in den Bereichen Gründungsberatung und Marketing
 - Jetzige Position: Assistenzarzt der Universitäts-Hautklinik Tübingen

Weitere Qualifikationen

- Teilnahme am Kurs Einführung in die Betriebswirtschaftslehre, 2009
- Teilnahme an einem Rhetorikseminar, 2009
- Teilnahme an der Managementakademie der Studienstiftung des deutschen Volkes, 2009
- Teilnahme an der Strategy School von The Boston Consulting Group, 2009
- Co-Autor der WHO-Publikation *Research Ethics committees: basic concepts for capacity building*, WHO Press, 2009
- Mitglied des AStA, 2004/2005
- Vorsitzender einer hochschulpolitischen Organisation, 2005/2006

**Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Einfluss der Expression punktmutierter Varianten des
Yersinia Adhäsins A (YadA) auf die Expression der
periplasmatischen Chaperon-Protease DegP**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Tarun Mehra
aus Reading, Großbritannien
2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Die Gattung <i>Yersinia</i>	6
1.2	Medizinische Relevanz enteropathogener <i>Yersinia spp.</i>	7
1.3	Die Spezies <i>Yersinia enterocolitica</i>	8
1.4	Autotransporter	12
1.5	Das äußere Membranprotein <i>Yersinia</i> Adhäsın A	13
1.6	Das periplasmatische <i>stress-response</i> System von <i>E.coli</i>	17
1.7	Das periplasmatische Enzym DegP	22
1.8	Zielsetzung	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3	Chemikalien	27
2.1.4	Puffer und Lösungen	28
2.1.5	Antikörper	32
2.1.6	Antibiotika	33
2.1.7	Enzyme	33
2.1.8	Primer	33
2.1.9	Kommerzielle Kits	34
2.1.10	Bakterienstämme und Vektoren	35
2.2	Methoden	37
2.2.1	Bakterienkultur	37
2.2.2	RNA-Extraktion	38
2.2.3	Reverse Transkription der mRNA	39
2.2.4	Konventionelle PCR	40
2.2.5	Quantitative Real-Time PCR	41
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.7	SDS-Page	43
2.2.8	Western-Blot	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Qualitativer Vergleich der DegP-Expression im Western-Blot	45
3.1.1	Vergleich der DegP-Expression 1h nach Induktion der YadA-Expression	46
3.1.2	Vergleich der DegP-Expression im Zeitverlauf	47
3.2	Qualitativer Vergleich der DegP-Transkription mittels konventioneller PCR	50
3.2.1	Etablierung der konventionellen PCR	50
3.2.2	Überprüfung der qualitativen DegP-Expression durch konventionelle PCR	57
3.3	Quantitativer Vergleich der DegP-Transkription mittels Real Time PCR	62
3.3.1	Überprüfung der cDNA-Qualität	62
3.3.2	Untersuchung mittels Real Time PCR	64

<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>75</u>
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>83</u>
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>84</u>
<u>7</u>	<u>Abkürzungen</u>	<u>101</u>
<u>8</u>	<u>Danksagung</u>	<u>102</u>
<u>9</u>	<u>Lebenslauf</u>	<u>104</u>

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Im Jahre 1894 gelang dem Schweizer Alexandre Yersin (1863-1943) in Hongkong die Isolation des Erregers der Beulenpest, dem nach ihm benannten Bakterium *Yersinia pestis*.

Zusammen mit zehn weiteren Spezies bildet *Yersinia pestis* den Genus *Yersinia spp.*, welcher zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehört. Somit sind *Yersinia spp.* gramnegative, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende, Katalase-positive, Oxidase-negative Stäbchen (Bercovier & Molleret, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984).

Bisher sind drei Spezies als zweifelsfrei humanpathogen anzusehen, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, wobei diese primär als Zoonosen zu betrachten sind (Gray, Manual of Clinical Microbiology, 6th ed., 1995).

Tabelle 1: die Gattung *Yersinia spp.*

<i>Yersinia spp.</i>	Pathogenität	Klassifizierung
<i>Y. pestis</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>	humanpathogen	Van Loghem, 1944 Schleifstein & Coleman, 1939 Pfeiffer, 1989
<i>Y. frederiksenii</i> <i>Y. intermedia</i> <i>Y. kristensii</i> <i>Y. aldovae</i> <i>Y. bercovieri</i> <i>Y. mollaretti</i> <i>Y. rhodei</i> <i>Y. ruckeri</i>	Bisher als apathogen für Menschen geltend, obwohl die Möglichkeit einer Beteiligung bei humanen Pathologien bei Weitem nicht ausgeschlossen werden sollte (Sulakvelidze, 2000).	Ursing et al., 1981 Brenner et al., 1980 Bercovier et al., 1980 Bercovier et al., 1984 Wauters et al., 1988 Wauters et al., 1988 Aleksic et al., 1987 Ewing et al., 1978

1.2 Medizinische Relevanz enteropathogener *Yersinia spp.*

Das klinische Bild einer Yersiniose wird von den beiden Erregern *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* hervorgerufen (Smego et al., 1999). Die Hauptreservoirs für die beiden Keime sind Nutztiere wie Schweine und Rinder, Nagetiere und Haustiere wie Hunde und Katzen (Bottone et al., 1997). Manche Vogelarten sind zusätzliche Wirte von *Y. pseudotuberculosis* (Butler 1979, 1994). Die Infektion erfolgt meistens fäkal-oral, durch die Aufnahme von kontaminiertem Trinkwasser oder Speisen wie Schweinefleisch und Milchprodukte, sowie durch Übertragung von Mensch zu Mensch oder von Tier zu Mensch mit einem Mindestinoculum von 10^9 Keimen (Bottone, 1977, 1997). Infektionen durch kontaminierte Blutkonserven sind ebenfalls beschrieben worden (Bottone 1997; CDC 1991, 1997; Kuehnert et al., 1997).

Die Yersiniosen können sich auf vielfältige Art und Weise manifestieren, als Gastroenteritis bzw. Gastroenterokolitis mit akuter mesenterialen Adenitis, reaktiver Polyarthrit, Erythema Nodosum, Erythema Multiforme und als Sepsis, um die häufigsten zu nennen (Bottone ,1997; Smego et al., 1999).

Eine akute Gastroenteritis ist die häufigste Form einer klinisch manifesten Infektion mit *Y. enterocolitica*, die am häufigsten Kinder betrifft (Bottone ,1997). Die Symptome werden durch eine Invasion der M-Zellen über die Peyerschen Plaques der Darm-Mukosa und die darauf folgende Schädigung der Darm-Mukosa verursacht (Autenrieth & Firsching, 1996) und umfassen schleimig-blutige Durchfälle, Fieber und abdominelle Beschwerden (Smego et al. 1999). Die Symptome können zu einer Verwechslung des Casus mit einer akuten Appendizitis führen, welche sich mit einem ähnlichen Bild präsentieren kann (Butler & Dennis in Mandell, Douglas Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 2005). Bei schweren, septischen Verläufen treten gehäuft septische Absiedelungen in Form von Abzessen in multiplen Organen wie Leber und Milz (Beeching et al., 1985), weiter in Lunge, Knochen, ZNS und Endokard auf (Sebes et al., 1976; Appelbaum et al., 1983). Schwere Verläufe

treten gehäuft bei Patienten mit erhöhtem Eisenblutspiegel wie es bei Thalassämien, aplastischer Anämie, Drepanozytose oder Hämochromatose, sowie bei Patienten unter Desoxiferramin-Therapie auf (Bouza et al., 1980; Stoddard et al., 1994; Chiu et al., 1986; Gallant et al., 1986; Hewstone, 1972; Piroth et al., 1997; Capron et al., 1984). Die Letalität einer behandelten *Y. enterocolitica* Sepsis beträgt 50% (Butler & Denis in Mandell, Douglas Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 2005).

Die häufigste Form einer von *Y. pseudotuberculosis* verursachten Yersiniose ist eine mesenteriale Adenitis. Die Letalität einer behandelten *Y. pseudotuberculosis* Sepsis beträgt 75% (Butler & Denis in Mandell, Douglas Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 2005).

Zum Nachweis können im gegebenen Fall Blutkulturen sowie Kulturen aus Zerebrospinalflüssigkeit oder mesenterialen Lymphknoten gewonnen werden. Die Gewinnung von Kulturen aus Stuhlproben gestaltet sich deutlich schwieriger (Butler & Denis in Mandell, Douglas Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 2005).

Bei unkomplizierten Verläufen erübrigt sich eine Antibiotika-Therapie, da die Krankheit selbstlimitierend verläuft. Bei schweren Verläufen wird eine antibiotische Behandlung durchgeführt. Serotypen von *Y. enterocolitica* besitzen eine induzierbare β -Lactamase-Aktivität, die verschiedene Penicilline und Cephalosporine der 1. und 2. Generation inaktivieren (Cornelis, 1975; Cornelis & Abraham, 1975). Zur Behandlung eignen sich bestimmte Aminoglykoside oder Ceftriaxon, bei einer ZNS-Beteiligung ein Cephalosporin der dritten Generation (Smego et al., 1999).

1.3 Die Spezies *Yersinia enterocolitica*

Die Spezies *Yersinia enterocolitica* kann in 6 Biotypen, welche wiederum in ungefähr 60 Serotypen eingeteilt werden, unterschieden werden. Die Biotypen

1B, 2, 3, 4, 5 und 6 sind humanpathogen, der Biotyp 1A hingegen nicht (Bottone 1997, et al., 1999).

Tabelle 2: Ordnung von Biotyp, Serotyp und Pathogenität von *Y. enterocolitica* (nach Bottone 1997)

Biotyp	Serotyp	Humanpathogenität
1A	O:5 ; O:6,30 ; O:7,8 ; O:18 ; O:46	nein
1B	O:8 ; O ; O:13 ; O:18 ; O:46	ja
2	O:9 ; O:5,27	ja
3	O:1,2,3 O:,27	ja
4	O:3	ja
5	O:2,3	ja

Auf Grund elektronmikroskopischer Aufnahmen gilt *Y. enterocolitica* als extrazelluläres Pathogen (Autenrieth & Firsching, 1996), welches aber auch intrazellulär auftreten kann (Koornhof et al., 1999).

Um die Kolonisierung des Darms zu ermöglichen, muss *Y. enterocolitica* an die Darmwand binden. Versuche von Mantle et al. (1983) haben gezeigt, dass virulente *Y. enterocolitica* Stämme besser an die Membranen des intestinalen Bürstensaums von Kaninchen binden als avirulente. Dabei spielt das äußere Membranprotein YadA eine wichtige Rolle, da es die Bindung des Bakteriums an Hep-2 Zellen (Heesemann & Grüter, 1987) sowie an intestinale Bürstensaummembranen ermöglicht (Mantle et al. 1989; Paerregaard et al., 1991).

YadA wird auf dem 64-75kb großen Virulenzplasmid pYV (plasmid of *Yersinia* virulence) kodiert (Portnoy et al., 1981; El-Tahir & Skurnik, 2001), welches in avirulenten Stämmen nicht vorkommt (Gemski et al., 1980; Portnoy & Falkow, 1981). Stämme mit diesem Plasmid exprimieren einige Virulenzfaktoren bei 37°C, aber nicht bei 25°C (Bottone, 1997), so dass man die Expression von

Tabelle 3: einige pYV-Plasmid kodierte Pathogenitätsfaktoren

Pathogenitätsfaktor	Bekannte Funktionen	Referenzen
<u>YopT</u>	Zerstörung der Aktinfilamente und Veränderungen des Zytoskeletts.	Iriarte & Cornelis, 1998; Zumbihl et al., 1999
<u>YopH</u>	Protein- Tyrosin Phosphatase. Verhindert Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten. Inhibition von Signaltransduktionskaskaden in B- und T- Lymphozyten. Hemmt Proliferation von T- Zellen.	Guan and Dixon, 1990; Black and Bliska, 1997; Black and Bliska, 1995; Yao et al., 1999
<u>YopE</u>	Zytotoxin. Hemmt Phagozytose und zerstört Aktin-Filamente.	Rosqvist et al., 1991 ; Black and Bliska, 2000;
<u>YopM</u>	Plasmaagglutination. Interagiert mit und aktiviert eukaryontische Kinasen.	Leung et al., 1990, Leung and Straley, 1989; Skrzypek et al., 1998
<u>YopO</u>	Zerstörung des Aktinzytoskeletts. Proteinkinase.	Juris et al., 2000, Galyov et al., 1993 ; Barz et al., 2000
<u>YopP</u>	Induziert Apoptose in murinen Makrophagen. Reduziert die TNF α -Sekretion in Makrophagen. Blockiert die MAP Kinase- und NF- κ B-abhängigen Signaltransduktionswege. Hemmt Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 und TNF- α sowie die Expression eukaryotischer, inflammatorischer, zellulärer Adhäsionsmoleküle.	Denecker et al., 2001; Boland and Cornelis, 1998; Orth et al., 2000; Ruckdeschel et al., 2001
<u>LcrV</u>	Supprimiert die Expression von TNF α und IFN- γ . Inhibiert Chemotaxis von Neutrophilen. Induziert IL-10 Produktion in Makrophagen.	Nakajima et al., 1995; Welkos et al., 1998 ; Sing et al., 2002
<u>YadA</u>	Vermittelt zelluläre Adhäsion durch Bindung an Kollagen, zelluläres Fibronectin und Laminin. Verleiht Phagozytoseresistenz und Schutz gegen das Wirken des Komplementsystems.	Heesemann and Grüter, 1987; Roggenkamp et al., 1996; Roggenkamp et al., 1995; Schulze-Koops et al., 1993; Tamm et al., 1993; China et al., 1993

1.4 Autotransporter

Die zwei Membranen gramnegativer Bakterien erschweren die Sekretion bakterieller Proteine in das extrazelluläre Milieu, sowie die Biogenese äußerer Membranproteine, da gleich zwei Membranbarrieren, die äußere und die innere Bakterienmembran, sowie der periplasmatische Raum, welcher kein ATP enthält (Wüfling & Plückthun, 1994), passiert werden müssen. Bakterien haben zu diesem Zweck verschiedene Sekretionsmechanismen entwickelt, welche man in sieben verschiedene Typen unterteilen kann. Das Protein kann in zwei Schritten in die äußere Membran durch die beiden Membranen geschleust oder direkt in den Extrazellulärraum transportiert werden (Dautin & Bernstein, 2007). Das Typ V Sekretionssystem ist jedoch von allen übrigen sechs das am weitesten verbreitete und es wurde lange Zeit angenommen, es sei auch das einfachste. Das Typ V Sekretionssystem beschreibt eine heterogene Gruppe von Proteinen, die Autotransporter. Sie besitzen alle eine abspaltbare Signalsequenz, eine N-terminale Passenger-Domäne zwischen unter 20 und über 400 kDa, sowie einen C-terminalen Translokator- oder β -Domäne von ungefähr 30 kDa (Dautin & Bernstein, 2007). Die Autotransporter können wiederum in klassische und in trimere Autotransporter unterteilt werden (Cotter et al., 2005). Die Signalsequenz markiert das Protein für das Sec Sekretionssystem der inneren Membran und initiiert deren Passage (Peterson et al., 2006; Sijbrandi et al., 2003). Ohne β -Domäne gelangt das Protein nicht in den Extrazellulärraum (Pohlner et al., 1987). Dies führte zur These, dass die β -Domäne eine Pore aus transmembranalen β -Faltblättern bildet, welche in die äußere Membran integriert wird und durch die die Passengerdomäne, das eigentliche, zu sekretierende Protein, hindurchtritt (Henderson et al., 1998). Mittlerweile wird angenommen, dass die sogenannten β -barrell assembly machinery, auch BAM-Komplex genannt, bei der Insertion von äußeren Membranproteinen eine Schlüsselrolle zukommt. Nach Eintritt ins Periplasma wird die leader Sequenz von einer Signalpeptidase erkannt und prozessiert, worauf sich die äußeren Membranproteine mit periplasmatischen Chaperon-Proteinen wie Skp, DegP und SurA assoziieren. Diese halten die OMPs in

ungefalteten Zustand und transportieren die Membranproteine an den BAM-Komplex. Wie der BAM-Komplex jedoch genau an der Faltung und Insertion von äußeren Membranproteinen in die äußere Bakterienmembran beteiligt ist, konnte noch nicht endgültig geklärt werden. (Zusammengefasst in Knowles et al., 2009)

1.5 Das äußere Membranprotein *Yersinia* Adhäsins A

Yersinia Adhäsins A wird von dem gleichnamigen Gen, welches sich auf dem pYV-Virulenzplasmid befindet, kodiert (Skurnik & Wolf-Watz, 1989) und wird bei 37°C aber nicht unter 30°C exprimiert (Skurnik & Toivanen, 1992). Die Expression von YadA ist von dem VirF/LcrF Aktivator abhängig (Lambert de Rouvroit et al., 1992; Skurnik & Toivanen, 1992), ist bei Anzucht in Mangelmedium am größten (Kapperud et al., 1985) und ist nicht Ca²⁺-abhängig (Skurnik, 1985).

YadA bestehend aus drei homologen Untereinheiten und gilt als der Prototyp der trimeren Autotransporter (Roggenkamp et al., 2003; Cotter et al., 2005).

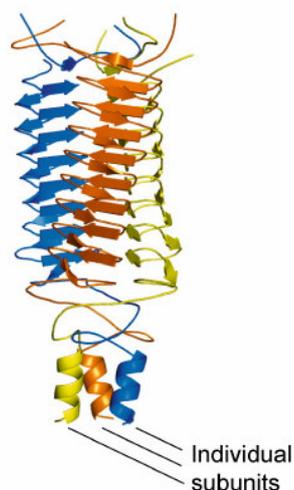


Abbildung 2: Kopfdomäne und Teil vom Stiel von YadA mit Darstellung der drei verschiedenen Untereinheiten. Nach Dautin und Bernstein, 2007

Jedes Monomer besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, einer Head-Domäne, einer Neck-Domäne, einer Stalk-Domäne, einer Linking-Region, deren C-terminales Ende einen Hairpin-Loop bildet, sowie einer C-terminalen Transmembrandomäne, bestehend aus vier β -Faltblattstrukturen. Die drei Stalk-Domänen bilden miteinander coiled-coil Strukturen (Roggenkamp et al., 1996). Es gibt vier gängige Modelle zur Erklärung der Biogenese trimerer Autotransporter, welche die Passage des Monomers an die Bakterienoberfläche erklären. Entweder werden die drei Head-, Neck- und Stalk-Domänen durch die aus Transmembrandomäne und Linking-Region gebildete und in der äußeren Membran verankerten Translokator-Domäne direkt oder als hairpin-loop an die Bakterienoberfläche geschleust (Roggenkamp et al., 2003; Ackermann et al., 2008). Weitere Modelle schlagen den Transport als Multimer von verschiedenen Monomeren durch eine gemeinsame Pore (Veiga et al., 2002) oder die Insertion der Autotransporter in die äußere Bakterienmembran durch den BAM-Komplex (Oomen et al., 2004). Die ersten drei Modelle werden in Abbildung 3 erläutert. Das Multimermodell und das Threading-Modell sind jetzt jedoch vom Modell des BAM-Komplex weitgehend widerlegt worden (Knowles et al., 2009).

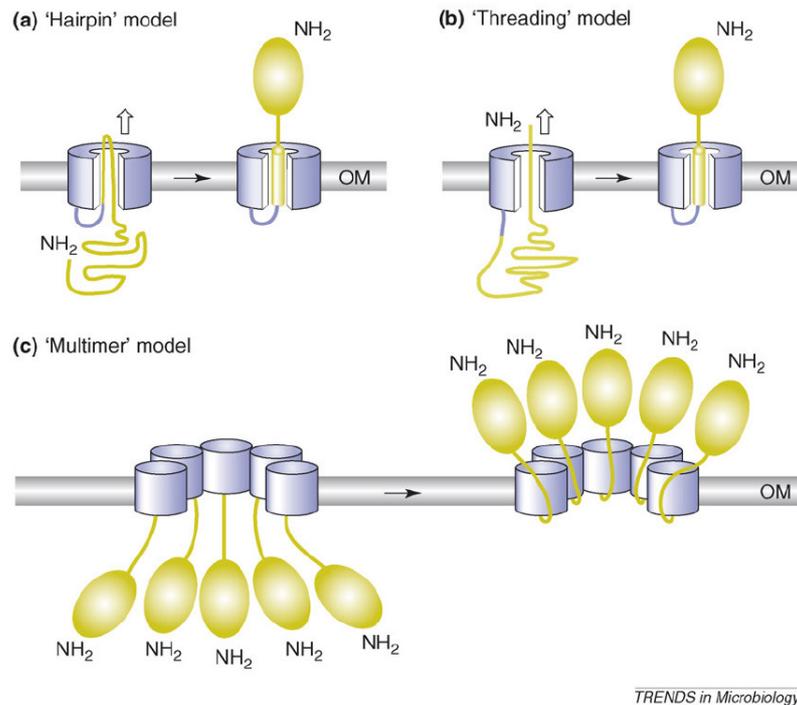


Abbildung 3: Modelle der Insertion von Autotransporter-Proteinen in die äußere Membran Gram negativer Bakterien (Bernstein, 2007)

Im „Hairpin Modell“ faltet sich das Monomer zuerst und tritt als doppelter Strang durch die Pore hindurch. Im Threading Modell tritt das N-terminale Ende zuerst durch die Pore hindurch und das Monomer wird als Strang an die Oberfläche gefädelt. Im Multimer Modell bilden mehrere Transportuntereinheiten eine gemeinsame, große Pore, durch die die Monomere hindurchtreten.

Das molekulare Modell des gesamten YadA-Proteins wurde 2006 von Koretke et al. erstellt (Koretke et al., 2006).

Grosskinsky et al. haben 2007 gezeigt, dass die Größe der Pore des Membranankers wesentlichen Einfluss auf die Stabilität, sowie auf die Passage-Rate von YadA ausübt (Grosskinsky et al., 2007). Dafür wurde das G389, eine Aminosäure der in das Lumen hineinragenden Seitenkette durch andere Aminosäuren mit längeren Seitenketten (A, S, T, N, H) ersetzt. Je größer die Seitenkette der eingebrachten Aminosäuren war, desto weniger YadA konnte auf der Bakterienoberfläche nachgewiesen werden.

An der Oberfläche bildet das Protein eine so genannte Lollipop-Struktur und bedeckt die gesamte Bakterienoberfläche, was dem Bakterium hydrophobe Eigenschaften verleiht (Hoiczky et al., 2000).

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verschiedenen Funktionen von YadA.

Tabelle 4: die Funktionen von YadA, modifiziert nach El-Tahir & Skurnik, 2001

Eigenschaften	Beschreibung	Referenzen
<u>Virulenz</u>	Voraussetzung für die Virulenz von <i>Y. enterocolitica</i> -Stämmen im Mausmodell	Pepe et al., 1995; Tamm et al., 1993
<u>Autoagglutination</u>	Aggregation von Bakterien durch YadA-vermittelte hydrophobe Wechselwirkungen	Balligand et al., 1985; Skurnik et al., 1984
<u>Hämagglutination</u>	YadA ⁺ <i>Yersiniae</i> führen zur Agglutination von Meerschweinchen-Erythrozyten	Kapperud and Lassen, 1983; Kapperud et al., 1985
<u>Hydrophobizität</u>	YadA ⁺ Bakterienhaufen lösen sich in organischen Lösungsmitteln und binden an Polystyren.	Lachica and Zink, 1984; Lachica et al., 1984; Paerregaard et al., 1991a; Paerregaard et al., 1991b
<u>Kollagenbindung</u>	YadA ⁺ Bakterien oder aufgereinigtes YadA binden an α_1 -Ketten von Kollagen, vermittelt von den NVSA/GXXS-Motiven der Kopf-Domäne	El Tahir et al., 2000; Emödy et al., 1989; Tamm et al., 1993
<u>Fibronektinbindung</u>	YadA ⁺ Bakterien oder aufgereinigtes YadA binden an immobilisiertem jedoch nicht löslichem zellulärem Fibronektin mit niedrigerer Affinität als Plasma-Fibronektin	Schulze-Koops et al., 1993; Tertti et al., 1992
<u>Lamininbindung</u>	YadA ⁺ Bakterien oder aufgereinigtes YadA binden Laminin Fragment E1	Flügel et al., 1994; Tamm et al., 1993
<u>Serumresistenz</u>	YadA verhindert die Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems. Bindet an Faktor H und C4bp.	Balligand et al., 1985; China et al., 1993; Pilz et al., 1992; Roggenkamp et al., 1996; Kirjavainen et al., 2008
<u>Zellinvasion</u>	YadA vermittelt die Invasion von Zellkulturen	Bliska et al., 1993; Yang and Isberg, 1993

<u>Verursachung von Arthritis</u>	YadA und dessen kollagenbindendes Potential ist eine Voraussetzung für die Entstehung einer reaktiven Arthritis im Tiermodell (Ratte)	Gripenberg-Lerche et al., 1995; Gripenberg-Lerche et al., 1994;
<u>Bindung an Bürstensaummembranen und Muzin</u>	YadA ⁺ Bakterien binden an Bürstensaummembranevesikeln, aufgereinigtes Muzin, sowie an Dünndarmgewebe des Kaninchens.	Mantle et al., 1989; Paerregaard et al., 1991a; Paerregaard et al., 1991b
<u>Bindung an der Submukosa</u>	YadA ⁺ Bakterien binden an intestinale Submukosa. Diese Bindung wird durch Kollagen/Laminin-Behandlung aufgehoben.	Skurnik et al., 1994
<u>Epithelzellenadhäsion</u>	YadA ⁺ Bakterien binden an Epithelzellmembranen und verhindern Rezeptor-vermittelte Phagozytose.	Bukholm et al., 1990; Heesemann and Grüter, 1987
<u>Bindung an neutrophile Granulozyten</u>	YadA ⁺ Bakterien binden an neutrophile Granulozyten. Hierbei kommt der N-terminalen Domäne der Kopf-Region eine Schlüsselrolle zu.	Roggenkamp et al., 1996; Ruckdeschel et al., 1996
<u>Inhibition Interferon-vermittelter Eigenschaften</u>	Interferon-behandelte Zellkulturen können nicht von Salmonella und Shigella, aber doch von YadA ⁺ <i>Y.pseudotuberculosis</i> Stämmen invadiert werden.	Bukholm et al., 1990
<u>Induktion von Interleukin-Produktion</u>	YadA induziert die IL-8 Produktion in Epithelzellen.	Schmid et al., 2004

1.6 Das periplasmatische *stress-response* System von *E. coli*

Analog zu den zytoplasmatischen Mechanismen, die *E. coli* zur Bewältigung von metabolischem, physikalischem und chemischem Stress entwickelt hat, besitzt das Bakterium ebenfalls ein *stress-response* System im

periplasmatischen Raum (Raivo & Silhavy, 2001), welches gegen Störungen im Periplasma und in der äußeren Bakterienmembran gerichtet ist.

Dieses besteht aus verschiedenen, im Periplasma vorkommenden Proteinen, deren Expression über Stress-sensitive Mechanismen reguliert werden.

Unter anderem gehören zu diesen Proteinen Transkriptionsfaktoren, die das stress-response System positiv oder negativ verstärken, sowie Enzyme mit proteolytischer und/oder Faltungsfunktion (Rowley et al., 2006).

Bisher sind vier stress-response Systeme identifiziert worden: das extracytoplasmatic function (ECF) sigma factor System, das Cpx-System, das BaeRS-System, und das Phage-shock-response System, wovon die beiden erstgenannten die am besten untersuchten sind (Rowley et al., 2006).

Durch Stressoren wie Hitze, Ethanol und Akkumulation von äußeren Membranproteinen, also Vorgänge welche die korrekte Passage von äußeren Membranproteinen vom Periplasma an die Bakterienoberfläche stören können, wird das ECF σ -System aktiviert (Rowley et al., 2006). Dabei kommt dem Sigma Faktor E (σ^E) eine Schlüsselrolle zu (Erickson et al., 1987). An das RNA polymerase core enzyme (E) gebunden, transkribiert E σ^E stress-response Gene, die zur Expression von periplasmatischen Enzymen wie Chaperonen und Proteasen führen (Rouvière et al., 1995; Rhodius et al., 2006). Im inaktiven Zustand wird der Transkriptionsfaktor an der Innenseite der inneren Bakterienmembran durch die cytoplasmatische Domäne des transmembranösen anti- σ Faktors RseA gebunden (Hasselblatt et al., 2007). Fallen falsch gefaltete Proteine im Periplasma an, aktivieren diese die dem Periplasma zugewandte, an der inneren Bakterienmembran gebundene Protease DegS, welche RseA an der periplasmatischen Seite schneidet (Walsh et al., 2003). Dadurch wird der RseP-Inhibitor RseB von RseA abgespalten, was zu Aktivierung der membran-gebundenen Protease RseP führt (De Las Penas et al., 1997; Cezairliyan & Sauer, 2007; Kim et al., 2007). Dies führt zur Abspaltung vom zytoplasmatischen RseA mit dem gebundenen σ^E (Ades et al., 1999; Kanehara et al., 2002), welches nun mit der RNA Polymerase interagiert und die Transkription von σ^E -abhängigen stress-response Genen hochreguliert (Flynn et al., 2004; Levchenko et al., 2005; Chaba et al., 2007). Zu den σ^E -

regulierten Genen gehören u. a. *degP*, eine Chaperon-Protease, *skp*, ein Chaperon, *fkpA* und *surA*, Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, letztere zusätzlich mit Chaperon-Funktion, das eigene Gen *rpoE*, sowie *rseA*, *rseB*, *rseC* und *rseP*, Gene der gleichnamigen Proteine in der σ^E -assoziierten Signaltransduktionskette (Rowley et al., 2006).

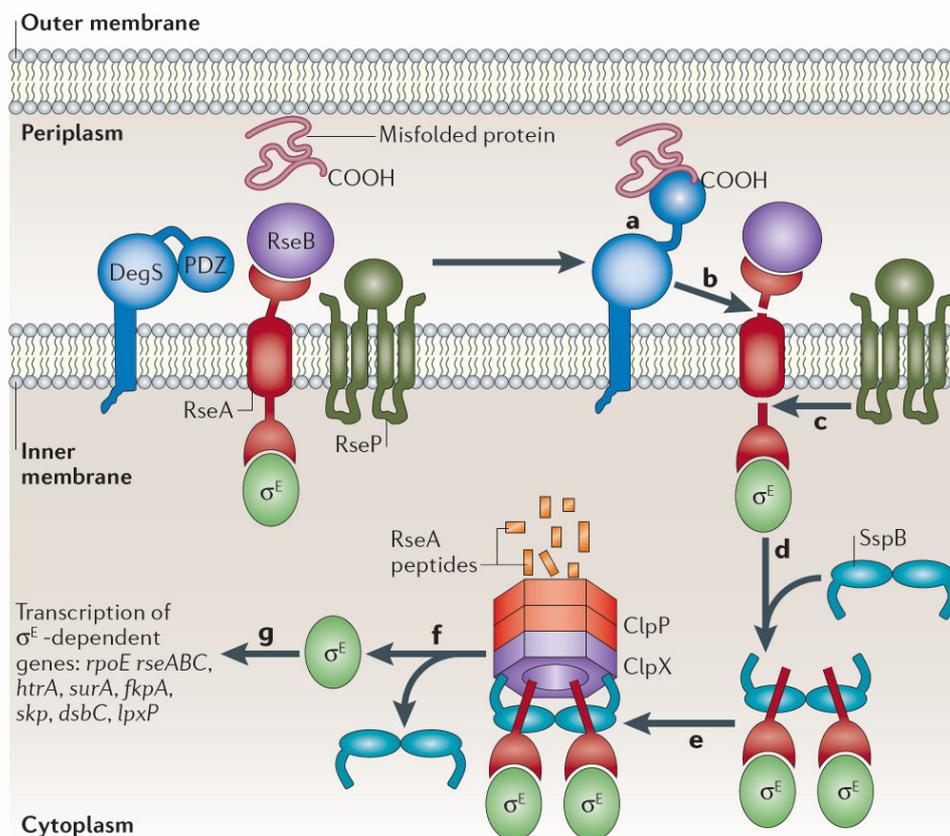


Abbildung 4: Modell der Regulierung der σ^E -Signalkaskade, aus Rowley et al., 2006

Der Hauptmechanismus für die σ^E -Aktivierung ist die proteolytische Spaltung von RseA. In der Abwesenheit von fehlgefalteten Proteinen wird diese Spaltung durch die Interaktion der PDZ-Domäne mit dem katalytischen Zentrum von DegS verhindert. In Anwesenheit von fehlerhaft gefalteten äußeren Membranproteinen interagieren diese mit der PDZ-Domäne (a). Dies führt zur Aktivierung der Proteasefunktion von DegS, welche RseA an einer periplasmatisch lokalisierten Stelle spaltet (b). Daraufhin spaltet RseP RseA an einer cytoplasmatischen Stelle, welches den gebundenen σ^E -Faktor ins Zytoplasma freisetzt (c). Dort bindet der gebundene σ^E -Faktor an SspB (d), welches den Komplex zu ClpXP hin leitet (e). ClpXP degradiert spezifisch das RseA-Fragment, und setzt so den σ^E -Faktor frei. Dadurch kann σ^E an eine RNA Polymerase binden und die Transkription σ^E -abhängiger Gene initiieren. Nach Rowley et al., 2006

Ein weiterer extrazytoplasmatischer stress-response Signalweg in *E. coli* ist die zweiteilige CpxRA-Signaltransduktionskaskade, bestehend aus der Transmembran-Sensor-Kinase CpxA und dem zytoplasmatischen response-Regulators CpxR (Raivio & Silhavy, 1997, 1999; DiGiuseppe & Silhavy, 2003; Pogliano et al., 1997). Diese Signalkaskade reguliert die Expression vieler stress-response Proteine, bei einigen, wie z.B. DegP, in Überlappung mit der σ^E -Regulation. Weitere Bestandteile sind die Disulfidisomerase DsbA, die periplasmatische Peptidyl-Prolyl-Isomerase PpiD, sowie CpxR, CpxA und CpxP. Die Cpx-Signaltransduktionskaskade wird durch Stress der äußeren Bakterienmembran aktiviert. Stressoren können z.B. alkalischer pH (Danese & Silhavy, 1998) und gestörte Zusammensetzung der äußeren Membran durch erhöhte Expression von Lipoproteinen wie NlpE oder P Pili sein (Mileykovskaya & Dowhan, 1997; Rowley et al., 2006). Dies führt zur Dissoziation des negativen Regulators CpxP von CpxA, worauf die Kinase-Funktion von CpxA aktiviert und CpxR von CpxA phosphoryliert wird (Raivio et al., 1999; Raivio et Silhavy, 1997; DiGiuseppe & Silhavy, 2003; De Wulf et al., 2000). Das phosphorylierte CpxR reguliert die Expression der Zielgene durch Bindung an spezifische Erkennungsstellen (De Wulf et al., 1999).

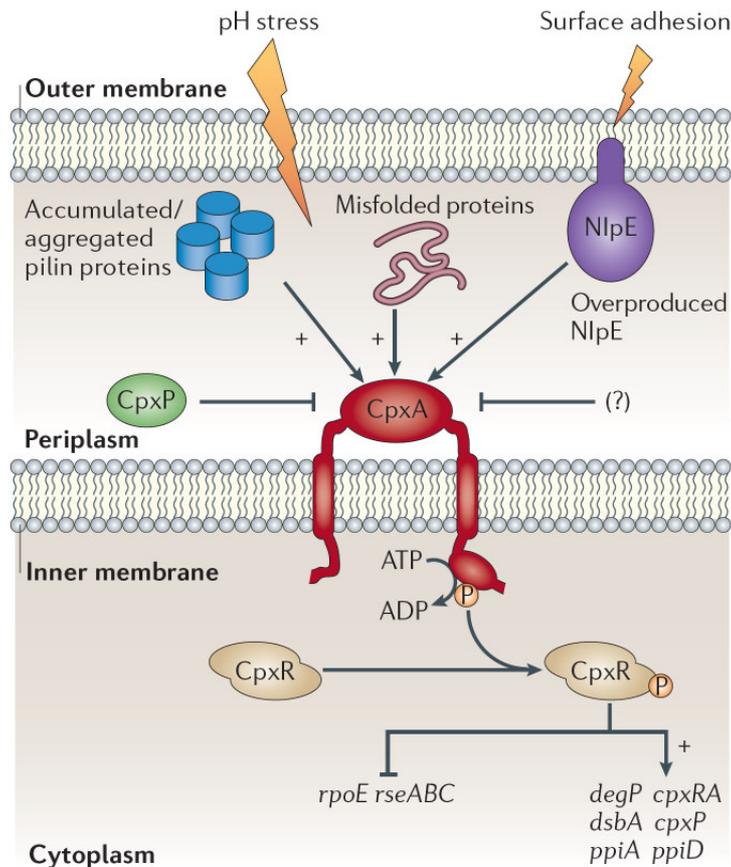


Abbildung 5: Modell der Regulation der CpxRA Signalkaskade, nach Rowley et al., 2006

Verschiedene Stressfaktoren, die äußere Bakterienmembran betreffend, führen durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus zu einer Autophosphorylierung eines cytoplasmatisch gelegenen Histidins von CpxA. CpxA transferiert dann die Phosphatgruppe auf CpxR. Das phosphorylierte CpxR kann dann an spezifischen Stellen der DNA binden und dadurch die Transkription der Zielgene aktivieren, oder positiv oder negativ regulieren.

Für manche periplasmatische stress-response Proteine gibt es also eine Überlappung der Regulation, durch CpxRA und σ^E . Eines dieser Proteine ist das periplasmatische Enzym DegP, auch unter dem Namen HtrA bekannt, welches eine doppelte Funktion einnimmt, nämlich die einer Protease und die eines Chaperons zugleich.

1.7 Das periplasmatische Enzym DegP

Das periplasmatische Enzym DegP, auch HtrA genannt (Lipinska et al. 1988), gehört zur Familie der Serinproteasen (Skórko-Glonek et al. 1995), d.h. das katalytische Zentrum des Enzyms enthält die Aminosäure Serin.

Das DegP-Monomer besitzt zwei verschiedene, konservierte Schlüsseldomänen, nämlich eine Proteasedomäne und zwei C-terminale PDZ-Domänen (Kim & Kim, 2005).

Die proteolytische Domäne wird von zwei β -Barrels gebildet, welche mit einer flexiblen Linker-Domäne, Q-Linker benannt, verbunden werden (Kim & Kim, 2005). Die katalytische Triade von DegP, welche für die Proteolyse verantwortlich ist, besteht aus den Aminosäuren Serin210, Aspartat135 und Histidin105 (Rawlings & Barret, 1994).

Die PDZ-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen (Saras & Heldin, 1996).

Zunächst wurde DegP als periplasmatische Protease in *E. coli* identifiziert, die irreversibel falsch gefaltete Proteine im bakteriellen Periplasma abbaut und notwendig für das Überleben bei hohen Temperaturen ist. (Lipinska et al., 1988; Strauch & Beckwith, 1988). Die proteolytische Aktivität von DegP ist ATP-unabhängig (Laskowska et al., 1996). Regelrecht gefaltete Proteine wie das native MalS (Spiess et al., 1999) werden hingegen nicht abgebaut. Grosskinsky et al. (2007) haben gezeigt, dass G389 punktmutierte YadA Moleküle deutlich stärker auf der Bakterienoberfläche von DegP-defizienten *E. coli* Stämmen exprimiert werden als in DegP-kompetenten, was den proteolytischen Abbau von punktmutierten YadA Molekülen durch DegP nahe legt.

Des Weiteren ist eine Chaperon-Aktivität von DegP bekannt. Diese Funktion nimmt DegP aber nur bei niedrigen Temperaturen wahr (Spiess et al., 1999).

Die proteolytische Aktivität von DegP nimmt hingegen bei steigenden Temperaturen erheblich zu, am schnellsten zwischen 32°C und 42°C (Skórko-Glonek et al. 1995; Spiess et al. 1999). Daher wurde ein temperaturabhängiger, funktioneller „switch“ von Chaperon zu Protease und umgekehrt vorgeschlagen. Hierbei könnte den PDZ-Domänen eine Schlüsselfunktion

zukommen, da Krojer et al. (2002) ihnen eine regulatorische Funktion der proteolytischen Aktivität zuschrieb.

Drei DegP Monomere bilden durch Interaktion der proteolytischen Zentren Trimere, wovon zwei sich durch Interaktion der Q-Linker zu Hexameren anlagern (Krojer et al., 2002). Die letzte Publikation von Krojer et al. (2008) legt nahe, dass das DegP-Hexamer wahrscheinlich die Konfiguration des ruhenden Enzyms darstellt. Im aktiven Zustand lagere sich dann DegP zu großen sphärischen Dodecameren oder 24-meren an. Die zentrale Kavität dieser sehr großen 24-meren ist groß genug, um ein ca. 300 kDa großes Protein fassen zu können und hiermit alle bekannten äußeren Membranproteine (Huber & Bukau, 2008). Darüber hinaus zeigten Krojer et al., dass durch Zugabe physiologischer Substrate sich DegP eben zu diesen Multimeren zusammenlagert und dadurch dessen proteolytische Aktivität um das 15-fache steigt. DegP lagert sich also um seine Substrate herum an und kapselt diese dann ab, um diese dann proteolytisch abzubauen. Eine Einkapselung der Substrate zum Zwecke der Faltung im Rahmen der Chaperon-Aktivität von DegP wird ebenfalls vorgeschlagen (Krojer et al., 2008).

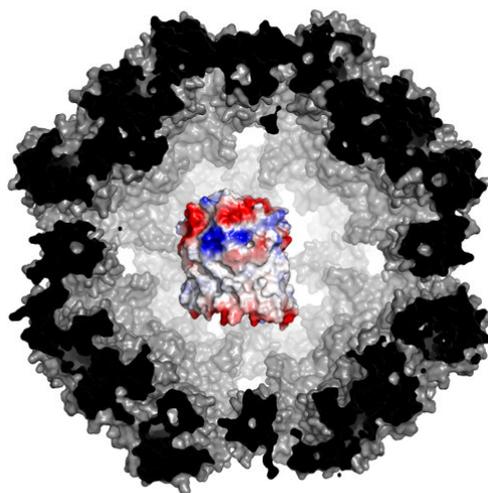


Abbildung 6: DegP₂₄ mit eingefangenem OmpC, Pressephoto des IMPs, Wien

(Quelle: <http://www.imp.ac.at/pressefoto-degp>)

1.8 Zielsetzung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass YadA, das Punktmutationen an einem stark konservierten Glycin innerhalb des C-terminalen Membranankers enthält, je nach Größe der inserierten Aminosäure (A<S<T<N<H) in einem *E. coli* Stamm, der die periplasmatische Chaperone-Protease DegP exprimiert, DegP-abhängig degradiert wird (Grosskinsky et al., 2007). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die YadA-Mutanten, die in signifikant geringerem Maße in die äußere Membran inseriert werden (YadA G389T, N, H) als wildtypisches YadA oder die Mutanten YadA G389S und G389A, die Expression von DegP aktivieren. Die zugrundeliegende Hypothese dafür war, dass ein äußeres Membranprotein (OMP), das in der Integrationsgeschwindigkeit bzw. -effizienz beeinträchtigt ist, im Periplasma akkumuliert. Diese Akkumulation oder auch die Akkumulation fehlgefalteter OMPs wirkt toxisch für die Bakterien und induziert daher eine Stressantwort, die unter anderem zur Expression von DegP führt. Um die periplasmatische Akkumulation unserer YadA-Mutanten indirekt zu quantifizieren, sollte in dieser Arbeit die DegP mRNA- und Proteinexpression nach Induktion der Expression der verschiedenen YadA-Mutanten gemessen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarose-Gel-Elektrophoresekammern	BioRad, München
Analysewaagen (R160P, PT 1200)	Sartorius, Göttingen
Bakterien-Brutschrank (B20)	Heraeus, Hanau
Brutschrank Function Line	Heraeus, Hanau
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA, Köln
Eppendorf-Zentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschränke	Kirsch, Offenburg
Gelelektrophoreseapperratur PowerPac 1000	BioRad, München
Heizblock (TR-L-288)	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Kühlschränke	Liebherr, Biberach
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen
Mikrowelle Micromat	AEG, Stockholm, Schweden
PCR Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Photometer Ultrospec 3000 pro	AmershamPharmacia Freiburg
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttelgerät, Unimax 2010	Heidolph, Kelheim
SDS-PAGE-Kammern (Protean III; Mini Protean)	BioRad, München
Sicherheitswerkbank (BDK-S 1800)	BDK Luft- und Reinraumtechnik
Real-Time PCR Thermocycler	Applied Biosystems,

Roller-Mixer

Thermomixer comfort

UV-Transluminator BioDoc Analyse

Vortexer mixer 7-2020

Wasserbad

Zentrifuge Eppendorf 5412 R, Minispin plus

Zentrifuge Multifuge 3S-R

Zentrifuge Rotilabo®

Foster City, USA

Greiner,

Frickenhausen

Eppendorf, Hamburg

Biometra, Göttingen

neoLab, Heidelberg

Memmert, Schwabach

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Hanau

Carl Roth, Karlsruhe

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Autoradiographie-Filme (Kodak X-OMAT)

Einmalküvetten

Eppendorf-Gefäße

Glaskolben und Flaschen

Membranen für Immunoblots (Cellulosenitrat)

Parafilm „M“

PCR-Gefäße

Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)

Pipettenspitzen (10 µl)

Pipettenspitzen (200 µl)

Pipettenspitzen (1000 µl)

RT-PCR 96-Well Platten

RT-PCR Adhesive Covers

Sigma-Aldrich,

Deisenhofen

Sarstedt, Berlin

Eppendorf, Hamburg

Schott Duran, Mainz

Schleicher & Schuell,

Dassel

American National

Can, USA

Fisher Scientific,

Schwerte

Becton Dickinson,

Heidelberg

Gilson, USA

Brand, Wertheim

Sarstedt, Berlin

PeqLab, Erlangen

Applied Biosystems,

Rundboden-Röhrchen (13 ml)
Spitzboden-Röhrchen (15 ml, 50 ml)

Foster City, USA
Greiner, Nürtingen
Becton Dickinson,
Heidelberg
Millipore, Eschborn

Whatman Filterpapier

Weitere Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Eppendorf, Hamburg; Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg; Greiner, Nürtingen; Sartorius, Göttingen.

2.1.3 Chemikalien

β -Mercaptoethanol

Merck, Darmstadt

Acrylamid Mix

Roth, Karlsruhe

Agarose

Tebu-Bio, Offenbach

Anhydrotetrazyklin

Ammoniumpersulfat

Merck, Darmstadt

Aqua ad injectabilia

Braun, Melsungen

Bacto Trypton

ICN, USA

Bacto Hefeextrakt

ICN, USA

Bromphenolblau

Sigma-Aldrich,
Taufkirchen

dNTPs

ECL-Reagenz

Roth, Karlsruhe

EDTA

Serva, Heidelberg

Essigsäure p.a.

Roth, Karlsruhe

Ethanol p.a.

Merck, Darmstadt

Glycin

Roth, Karlsruhe

Isopropanol

Merck, Darmstadt

Loading Buffer

Magermilchpulver

Saliter, Obergünzburg

PCR-Puffer 10x	
Ponceau S	Serva, Heidelberg
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
RNAse-Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween	Merck, Darmstadt

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

2.1.4 Puffer und Lösungen

Bakterienkultur

Folgende Medien wurden für Bakterienkulturen verwendet:

Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertani Medium	5 g NaCl 5 g Bacto Hefeextrakt 10 g Bacto Trypton in 1 l H ₂ O bidest. gelöst, pH 7,4-7,6
Einfriermedium für Bakterienkulturen "Gly-Stocks"	20 % Glycerin-haltiges LB-Medium
LB-Ampicillin Medium	Verdünnung 1:1000, Endkonzentration 100 mg/l

LB-Agarplatten	Herstellung im Hause
LB-Agarplatten mit Ampicillin	Ampicillinkonzentration 100 µg/ml

RNA-Extraktion

Folgende Puffer wurden für die Extraktion verwendet:

Puffer	Zusammensetzung
TE-Lysozym Puffer	10 mM Tris CL 1 mM EDTA pH 8,0 Lysozym Konzentration 400 µg/ml
RLT-Mercaptoethanol Puffer	RLT-Puffer von der Firma Qiagen bezogen Zugabe von 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml RLT-Puffer
RPE-Puffer	RPE-Puffer von der Firma Qiagen bezogen. 1:5 mit Ethanol p.a. verdünnt

Agarosegel-Elektrophorese

Folgende Puffer wurden zur Agarosegel-Elektrophorese verwendet:

Puffer	Zusammensetzung
TBE-Puffer	1:5 Verdünnung von der 5-fach konzentrierten Stammlösung. Zusammensetzung der Stammlösung wie folgt: 54 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH-Wert 8,3 (eingestellt mit Essigsäure) Aqua bidest. ad 1l

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Im Rahmen der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden verwendet:

Lösung	Zusammensetzung
Tris Puffer 1,5 M	181,71 g Tris Base ad 1l Aqua bidest. mit HCL auf pH 8,8 titriert
Tris Puffer 0,5 M	60,57 g Tris Base ad 1l Aqua bidest. Mit HCL auf pH 6,8 titriert

<p>Trenngel, 10 % Acrylamid Mix</p>	<p>Pro Gel: 1,9 ml H₂O Millipore 1,7 ml 30 % Acrylamid Mix 1,3 ml 1,5 M Tris Puffer, pH 8,8 50 µl 10 % SDS 50 µl 10 % Ammoniumpersulfat 2µl TEMED</p>
<p>Sammegel, 10 % Acrylamid Mix</p>	<p>1,4 ml H₂O Millipore 335 µl 30 % Acrylamid Mix 250 µl 0,5 M Tris Puffer, pH 6,8 20 µl 10 % SDS 20 µl 10 % Ammoniumpersulfat 2 µl TEMED</p>
<p>SDS-Laufpuffer</p>	<p>Verwendete Lösung durch 1:5 Verdünnung der Stammlösung hergestellt. Zusammensetzung der Stammlösung wie folgt: 60,55 g Tris Base 288,15 g Glycerin 100 ml 10 % SDS ad 2 l H₂O bidest.</p>
<p>Lämmli-Puffer, 5x konzentriert</p>	<p>314 mM Tris/HCl (pH 6,8) 50 % (v/v) Glycerin 5 % (w/v) SDS 5 % β-Mercaptoethanol 0,0025 % Bromphenolblau</p>

Western-Blot

Für Western-Blots wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung	Zusammensetzung
Blot-Puffer	3 g Tris Base 14,44 g Glycin ad 1 l H ₂ O bidest.
Wasch-Puffer	18 g NaCl 20 ml 1 M Tris pH 7,4 4 ml Tween 20 ad 2 l H ₂ O bidest.
Block-Puffer	5 g Magermilchpulver der Firma Silter in 100 ml Wasch-Puffer (5%-Lösung)
Ponceau Rouge, 10x konzentriert	10 g Ponceau S 150 ml TCA 150 g Sulfosalicylsäure Aqua bidest.

2.1.5 Antikörper

Im Rahmen des Immunoblots verwendeten Antikörper:

Primärantikörper:

Anti-DegP Rabbit IgG Antikörper

Geschenk des Department of
Biochemistry, University of Gdansk,
Polen (Skórko-Glonek et al. 2006)

Sekundärantikörper

Peroxidase-konjugierter Goat Anti-Rabbit IgG Fragment- spezifischer Antikörper	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
--	---

2.1.6 Antibiotika

Im Rahmen der Bakterienkulturen verwendete Antibiotika:

Ampicillin	ICN, USA
------------	----------

2.1.7 Enzyme

Verwendete Enzyme:

Taq Polymerase	Fermentas
Lysozym	Applichem

2.1.8 Primer

Im Rahmen der PCR und qRT-PCR verwendete Primer:

Oligonukleotid	Sequenz	Schmelz- temperatur	Annealing Temperatur
YadA_5	5'-atgactaaagattttaagatcagtgtc-3'	49 °C	47 °C
YadArev_400bp'	5'-cagcgacaccagtatctgaag-3'	50 °C	47 °C
YadA_100_5'	5'-agaaagcaatccgtgaatcg-3'	52 °C	47 °C
YadA_100_3'	5'-gctgtttaagcggctgaac-3'	52 °C	47 °C

Oligonukleotid	Sequenz	Schmelztemperatur	Annealing Temperatur
degP_fwd	5'-ccacattagcactgag-3'	34 °C	53 °C
degP_rev	5'-ttaaagaccgtcgc-3'	38 °C	53 °C
degP_fwd 2	5'-gctgatccaaatccagaacc-3'	51 °C	50 °C
degP_rev 2	5'-tgttgacaccgatcagttcg-3'	52 °C	50 °C
DegP_100_5'	5'-caggttgattccagctccat-3'	51 °C	48 °C
Degp_100_3'	5-acctttcttcaggccgatct-3'	52 °C	48 °C

Alle Primer wurden von der Firma Biomers, Ulm, bezogen.

2.1.9 Marker und kommerzielle Kits

DNA-Ladder :	GeneRuler 100bp DNA-Ladder Plus, Fermentas
Protein-Ladder:	PageRuler, Fermentas
RNA-Extraktion:	RNeasy, Qiagen
RT-PCR:	QuantiTect RT-PCR, Qiagen
qRT-PCR :	QuantiTect SYBR-Green PCR-Mix, 2x konzentriert, Qiagen
	SYBR-Green I qPCR Master Mix Plus, 2x konzentriert, Eurogentec

2.1.10 Bakterienstämme und Vektoren

In dieser Arbeit verwendeter Bakterienstamm:

Stämme	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)omp8	F ⁻ , ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) ; ΔlamB ompF::Tn5ΔompAΔompC	(Prilipov et al., 1998)

In dieser Arbeit verwendeten Plasmide:

Plasmid	Beschreibung	Referenz
<u>pASK IBA2 YadAO:8</u>	YadAO:8 von <i>Y. enterocolitica</i> aus pYadA ^{O:8} über Restriktionsschnittstellen XbaI und SalI in pASK-IBA2 eingeführt; Ampicillin-Resistenz	(Schmid et al., 2004)
pASK IBA2 YadAwt	Keine Mutation, Expression von YadA Wildtyp, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)
pASK IBA2 G389A	Durch gerichtete Punktmutation hervorgerufener Aminosäureaustausch G398A im Membrananker von YadA, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)
pASK IBA2 G389S	Durch gerichtete Punktmutation hervorgerufener Aminosäureaustausch G398S im Membrananker von YadA, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pASK IBA2 G389T	Durch gerichtete Punktmutation hervorgerufener Aminosäureaustausch G398T im Membrananker von YadA, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)
pASK IBA2 G389N	Durch gerichtete Punktmutation hervorgerufener Aminosäureaustausch G398N im Membrananker von YadA, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)
pASK IBA2 G389H	Durch gerichtete Punktmutation hervorgerufener Aminosäureaustausch G398H im Membrananker von YadA, Anhydrotetrazyklin-induzierbar	(Grosskinsky et al., 2007)
pASK-IBA2 LV	Leervektor ohne Insert	(Grosskinsky et al., 2007)
pJS13	Enthält das htrA (DegP) Gen unter Kontrolle eines konstitutiven pT7 Promoters	(Skórko-Glonek et al., 1995)

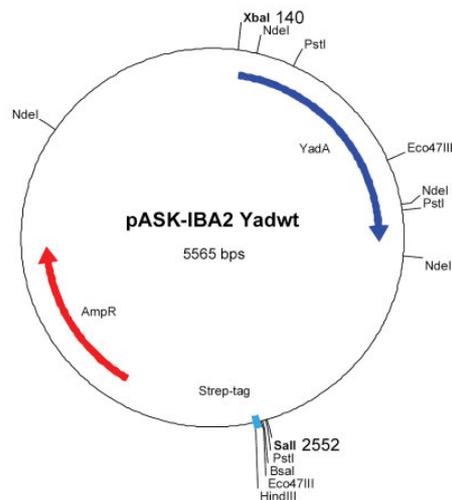


Abbildung 7: Vektor pASK IBA2 YadAwT
(Grosskinsky et al., 2007)

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkultur

Für sämtliche Experimente wurden *E.coli* Kulturen von BL21(DE3)omp8 verwendet. Die Stammkulturen wurden als Aliquots bei -20°C in 20% Glycerol-LB Medium gelagert.

Zur Herstellung kompetenter Bakterien für die Isolation von mRNA wurden Proben aus den gefrorenen Aliquots in 10 ml LB-Ampicillin Medium gegeben und über Nacht bei 37°C im Brutschrank geschüttelt. Nach Anwachsen der Bakterien wurde eine Kolonie auf eine neue LB-Ampicillin Agarplatte ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Platten wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 4°C gelagert. Bei Bedarf wurde eine Kolonie in 6 ml LB-Ampicillin Medium gegeben und über Nacht bei 37°C bei 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Übernachtskulturen 5min bei 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 2ml frischem LB-Ampicillin Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Extinktion von 1 ml 1:20 verdünnter Probe bei 600 nm Wellenlänge gegen den

Leerwert der LB-Ampicillin Lösung gemessen. Die nun herzustellenden Bakterienkulturen im Flüssigmedium wurden auf einen Extinktionswert von 0,1 bei 600 nm eingestellt. Das hierfür benötigte Volumen der frischen Bakteriensuspension wurde nach folgender Gleichung errechnet:

$$V_{\text{Bakteriensuspension}} = 1 / (\text{OD}_{600} / 5 \cdot 10^{-3}) \cdot V_{\text{total neue Proben}}$$

wobei OD600 die gemessene Extinktion der 1:20 verdünnten Bakterienprobe bei 600 nm darstellt. Das errechnete Volumen (V) wurde dem Volumen der nun herzustellenden Bakterienkulturen, üblicherweise 4 ml, hinzugegeben und bei 37° C bei 200 rpm 2 h geschüttelt. Im Anschluss wurden die Proben mit 40 ng/ml Anhydrotetrazyklin (Endkonzentration), später mit 100 ng/ml Anhydrotetrazyklin (Endkonzentration) versetzt, um die Transkription der pASK IBA2 Plasmide zu induzieren, dann wieder bei 37° C geschüttelt und die Proben nach der gewünschten Zeit während der Phase exponentiellen Wachstums entnommen.

2.2.2 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das Kit RNeasy von Qiagen verwendet. 800 µl der induzierten Proben wurden entnommen und in Eppendorf Gefäße gegeben. Diese wurden 5 min bei 5000 g bei 4° C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Lysozym-TE Puffer durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350 µl mit β-Mercaptoethanol versetztem RLT Puffer zugegeben, durch Vortexen gemischt und 250 µl Ethanol p.a. hinzugefügt. Das gesamte Volumen wurde auf eine 2 ml Trennsäule gegeben und 15 s bei 8000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Auf dieselbe Säule wurden 700 µl RW1-Puffer gegeben und wieder 15 s bei 8000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchlauf samt Auffangbehälter wurde verworfen. Die Säule kam in einen neuen Auffangbehälter und wurde mit 500 µl RPE Puffer durch 15 s Zentrifugieren bei 8000 g gewaschen. Der Durchlauf

wurde verworfen. Die Säule wurde ein weiteres Mal mit 500 µl RPE Puffer, diesmal aber durch 2 min Zentrifugieren bei 8000 g gewaschen und der Durchlauf wurde verworfen. Zum Trocknen wurde die Säule nochmals 1 min bei 13000 g zentrifugiert. Die Säule wurde einem verschließbaren 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgesetzt, 50 µl RNase-freies Wasser wurde auf die Membran pipettiert und die RNA durch 1 min Zentrifugieren bei 8000 g eluiert.

Im Anschluss wurde 1 µl der RNA Lösung mit 60 µl Millipore Wasser verdünnt und die RNA-Konzentration gegen den Leerwert gemessen.

Nach dem Entnehmen von 1 µl wurden die RNA-Aliquots sofort bei -20°C eingefroren.

Im Verlauf der Arbeit wurde das Extraktionsprotokoll folgendermaßen modifiziert (17.08.2007), auf Grund einer sehr kurzen Halbwertszeit der mRNA von DegP:

Die Eppendorf Gefäße mit 800 µl Bakteriensuspension wurden fortan nicht mehr 5 min, sondern 2 min abzentrifugiert.

Auf den Lysozymverdau wurde verzichtet, dafür wurden aber die Aliquots in Flüssigstickstoff schockgefroren, um die Bakterienwand aufzubrechen. Vor der Zugabe des RLT-Puffers wurden die Proben kurz, d.h. unter einer Minute bei Raumtemperatur angetaut. Nach Beendigung des RNA-Extraktionsprotokolls wurde pro RNA-Aliquot 1 µl RNase-Inhibitor zugegeben.

2.2.3 Reverse Transkription der mRNA

Für diesen Schritt wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die RNA-Proben sowie die Reverse Transkriptase wurden auf Eis aufgetaut. Der gDNA Wipeout Puffer, der RT-Puffer, der Primer Mix sowie das RNase-freie Wasser wurden bei Raumtemperatur aufgetaut.

An Hand der gemessenen RNA-Konzentrationen (c) wurde das Volumen (v) der RNA-Lösung berechnet, welches genau 1 µg RNA enthält: $V_{1\mu\text{g RNA}} = 1/C_{\text{RNA}}$.

Jeweils 2 µl gDNA Wipeout Puffer, $V_{1\mu\text{g RNA}}$, und RNase-freies Wasser ad 14 µl wurden zusammenpipettiert, kurz (3 s) zentrifugiert und für 2 min bei 42° C im Heizblock inkubiert, dann sofort auf Eis gelagert. Der Reverse-Transkriptions-Mastermix wurde wie folgt hergestellt: pro RNA-Probe 1 µl der Reversen Transkriptase, 4 µl des RT-Puffers und 1 µl des Primer Mixes plus ca. 10 % extra Volumen um den Verlust beim Pipettieren zu kompensieren. So wurde z.B. bei 10 vorhandenen Proben 11x Mastermix hergestellt. Der Mastermix, 6 µl, wurde auf entsprechend viele PCR-Gefäße verteilt und die jeweilige Template-RNA hinzupipettiert. Die Proben wurden in einem Thermocycler bei 42° C 30 min, dann 3 min bei 95° C lang inkubiert und im Anschluss bei 4° C gelagert.

2.2.4 Konventionelle Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die durch die Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mittels PCR, als semi-quantitative Messmethode, untersucht, um etwaige eindeutige Unterschiede in der Expression von der mRNA von DegP in den verschiedenen Bakterienstämmen nachzuweisen. Dabei werden die DNA-Stränge durch Hitze getrennt, durch gezielte Wahl der Annealing-Temperatur die spezifische Anlagerung der Primer ermöglicht und durch Temperatur-Einstellung die Bindung und Aktivierung der Taq-Polymerase bewirkt, die Elongation der cDNA Stränge startend. Durch Wiederholung der Zyklen wurden die gewünschten Abschnitte exponentiell vervielfältigt. Pro Ansatz wurden verwendet:

- 5 µl 10x konzentrierter Puffer
- 1 µl 5' Primer 1:10 verdünnt (10 pmol/µl)
- 1 µl 3' Primer 1:10 verdünnt (10pmol/µl)
- 1 µl dNTPs (10mM)
- 1µl Taq Polymerase (10 U/ µl)

40 µl Aqua ad injectabilia

sowie 1 µl cDNA Template

Die verwendeten PCR-Programme waren:

- 1) 2 min 94° C
- 2) 1 min 94° C
- 3) 30 sec Annealing-Temperatur des jeweiligen Primer-Paares
- 4) 30 sec 72° C
- 5) 5 min 72° C
- 6) ∞ 4° C

Die Anzahl der Wiederholungen der Zyklen (Schritte 2, 3 und 4) betrug für DegP cDNA 39 x, für YadA cDNA 29 x.

2.2.5 Quantitative Real-Time PCR

Diese Methode basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, erlaubt aber eine Quantifizierung des PCR-Produktes. Dafür verwendet man einen Farbstoff, in diesem Fall den fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green I, welcher durch Interkalation in doppelsträngige Nukleinsäuren an Fluoreszenz zunimmt. Diese Fluoreszenz nimmt proportional zum entstandenen PCR-Produkt zu, so dass man durch Fluoreszenzmessungen auf die Menge an entstandenem Produkt schließen kann.

Für unsere Versuchsreihen wurde ein RT-PCR Gerät Applied Biosystems GeneAmp 5700 verwendet.

Zuerst wurde ein Pipettierplan für die 96-Well Platten erstellt. Es wurde immer mit Duplikaten gearbeitet, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

Sämtliche cDNA-Proben wurden 1:4 verdünnt. Dabei wurden 6 µl Probe mit 18 µl Aqua ad injectabilia vermengt. Zur Herstellung der für die Standardkurven notwendigen cDNA-Pools wurden 3 µl von sämtlichen cDNA-Verdünnungen entnommen und miteinander vermengt. Diese wurden 1:3 mit Aqua ad injectabilia verdünnt und dadurch erhielt man den Pool 1. Der Pool -1 entstand

aus 5 µl Pool 1 und 45 µl Aqua ad injectabilia, der Pool -2 aus 5 µl Pool -1 und 45 µl Aqua ad injectabilia und der Pool -3 aus 5 µl Pool -2 und 45 µl Aqua ad injectabilia.

Pro Reaktionsansatz (25 µl) wurden pipettiert:

12,5 µl	qRT-PCR SYBR Green PCR-Mix 2x konzentriert
2 µl	5' Primer 1:4 verdünnt
2 µl	3' Primer 1:4 verdünnt
2 µl	cDNA, 1:4 verdünnt
6,5 µl	Aqua ad injectabilia

Die cDNA wurde in 96-Well Platten vorgelegt. Die übrigen Reagenzien wurden als Mastermix zusammenpipettiert, wobei immer ca. 10 % Überschuss hergestellt wurde, um Pipettierverluste auszugleichen. Der 2 x PCR-Mix wurde auf Eis aufgetaut und gelagert. Der fertige Mastermix wurde ebenfalls auf Eis gelagert. Dann wurden je Ansatz 23 µl Mastermix zu der vorgelegten cDNA pipettiert. Die fertigen Platten wurden 1 min bei 1000 g zentrifugiert.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

- 1) 2 min 50 °C
- 2) 10 min 95 °C
- 3) 15 sec 95 °C
- 4) 30 sec 48 °C
- 5) 30 sec 72 °C

Die Schritte 3), 4) und 5) wurden 44 x wiederholt.

Die erhaltenen Daten sowie die errechneten Kurven wurden elektronisch abgespeichert.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegele bestanden aus 1 % Agarose in TBE-Puffer.

Die Proben wurden mit 10 % Loading Buffer vermischt. Die Taschen wurden mit

15 µl Probe-Puffer Gemisch beladen. Als Größenstandard wurde eine Tasche stets mit einer DNA Ladder beladen. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Gele bei einer kontinuierlichen Spannung von 100 V bis 120 V laufen gelassen. Zur Färbung wurden die Gele für 30 min in eine EtBr-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/l gelegt und im Anschluss 30 min in einem Wasserbad entfärbt.

Die gefärbten Gele wurden unter UV-Licht fotografiert und das Foto elektronisch abgespeichert.

2.2.7 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Proteinproben denaturiert und in einem Spannungsfeld Ihrer Größe nach aufgetrennt. In unserem Falle wurden die entsprechenden Bakterienkulturen gemäß 2.2.1 angesetzt, mit AHTC induziert und nach entsprechender Induktionsdauer 1 ml in einem Eppendorf-Gefäß geerntet. Die Probe wurde bei 4000 g 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Währenddessen wurde die Extinktion der 1:20 verdünnten Bakterienkultur bei 600 nm gemessen. Das Bakterienpellet wurde in einer Menge Aqua ad injectabilia gelöst, die dem gemessenen Extinktionswert entspricht, d.h. wenn der gemessene Wert 0,028 betrug, so wurde das Pellet in 28 µl Aqua ad iniectionabilia gelöst. Im Anschluss wurde das gelöste Pellet mit einem identischen Volumen SDS-haltigem, denaturierendem, 5 x konzentriertem Puffer (modifiziert nach Lämmli, 1970) versetzt. Die Proteinprobe wurde nun 10 min bei 95° C in einem Heizblock aufgeköcht, dann bei -20° C eingefroren oder auf Eis abgekühlt und direkt weiterverwendet.

Für die Gelelektrophorese wurden 10 % SDS-Polyacrylamid-Gele in den Gelkammern nach Anleitung des Herstellers befestigt und die Kammer mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die Kämmen wurden entfernt und 10 µl der fertigen Proteinproben in die Gelkammern pipettiert. Eine Tasche pro Gel wurde immer mit 7 µl eines Proteinstandards beladen.

Die Gele wurden bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel laufen gelassen, bis sich die Proben am Ende des Sammelgels konzentriert hatten. Dann wurde die Stärke auf 30 mA pro Gel erhöht.

2.2.8 Western-Blot

Beim Western-Blot werden durch SDS-Page aufgetrennte Proteinproben auf eine Nitrosezellulosemembran übertragen. Die Membran wird abgesättigt und dann mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser wird durch einen an eine Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper detektiert. In Anwesenheit eines geeigneten Substrates katalysiert die Peroxidase eine lumineszierende Reaktion, die Autoradiographie-Filme schwärzen kann. So kann das Vorhandensein spezifischer Proteine durch den Nachweis von schwarzen Banden auf diesen Filmen bewiesen werden.

Dazu werden die Nitrozellulose-Membranen, das Whatman-Papier und die Schwämme in Blot-Puffer eingeweicht. Die Gele aus der SDS-Gelelektrophorese werden entnommen und die Glasplatten vorsichtig voneinander gelöst. Mit einem Schaber wird das Sammelgel entfernt. Der Gelhalter wird in folgender Reihenfolge geschichtet: schwarze Seite Gelhalter → Schwamm → Whatman Papier → Gel → Membran → Whatman Papier → Schwamm → weiße Seite Gelhalter. Dabei wird beachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran befinden. Der/die Gelhalter werden in die vorgesehene Kammer mit einem Kühlakku gegeben, die Kammer wird mit Blot-Puffer aufgefüllt und 1 h bei 300 mA geblottet. Dann wird die Membran entnommen, mit Ponceau Rouge gefärbt, kurz mit VE-Wasser abgespült, die Banden der Proteinleiter mit Kugelschreiber markiert und die gefärbte Membran zur Dokumentation fotokopiert. Im Anschluss werden die Membranen 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4° C übernacht in einem Blockpuffer geblockt, um unspezifische Anlagerungen des Primärantikörpers zu vermeiden.

In unserem Fall haben wir daraufhin den Primärantikörper Anti-DegP (Rabbit) 1:10 000 mit dem Blockpuffer verdünnt. In dem ersten Versuch wurde mit einer Konzentration von 1:2000 gearbeitet, auf Grund der starken Markierung wurde nach sukzessiver Optimierung die Konzentration von 1:10 000 als optimal festgelegt. Die Membran wurde dann über Nacht mit dem verdünnten Primärantikörper bei 4° C auf einem Rollator inkubiert, am nächsten morgen 3 x 10 min mit Western-Wash Puffer gewaschen und daraufhin 1 h bei Raumtemperatur mit dem 1:10 000 Peroxidase-konjugiertem Goat Anti-Rabbit IgG spezifischen Sekundärantikörper auf einem Rollator inkubiert. Nach 3-maligem 10-minütigem Waschen mit Western-Wash Puffer wurde die Membran mit ECL-Reagenz gespült, um die Peroxidase-Reaktion zu starten. Dann wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien mit einem Film in eine Fotoplatte gelegt, je nach Intensität der Reaktion 5 s, 10 s, 20 s, 30 s, 45s, 1 min oder 2 min bis zum Erhalten verwertbarer Banden belichtet und der Film entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Qualitativer Vergleich der DegP-Expression im Western-Blot

Nach Übernachtskultur der sieben verschiedenen *E. coli* Stämme, nämlich *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 G389A, *E. coli* pASK-IBA2 G389S, *E. coli* pASK-IBA2 G389T, *E. coli* pASK-IBA2 G389N, *E. coli* pASK-IBA2 G389H sowie *E. coli* pASK-IBA2 LV (LV steht für Leervektor; enthält im Gegensatz zu den anderen Plasmiden keine für YadA kodierende Sequenz), wurden sie durch Zugabe von 40 ng/ml bzw. 100 ng/ml Anhydrotetracyclin induziert. Nach o.g. Protokoll wurden die Proteinproben hergestellt und an Hand von SDS-PAGE und Western-Blot untersucht.

Da die Aminosäurenaustausche unterschiedlich stark die Barrel-Stabilität von YadA beeinflussen und somit die Passage von YadA an die bakterielle Oberfläche beeinträchtigen könnten, wurde vermutet, dass die akkumulierte Menge von YadA im periplasmatischen Raum in den verschiedenen Stämmen unterschiedlich sei, welches wiederum eine stärker oder schwächer ausgeprägte Expression der Chaperon-Protease DegP zur Folge hätte. Daraufhin formulierten wir folgende Hypothese: Die Expression punktmutierter Versionen von YadA führt zur gesteigerten Akkumulation von YadA im Periplasma, welches im Rahmen einer Stress-Response wiederum zu einer vermehrten Expression von DegP führt.

Diese Hypothese wollten wir mittels Western-Blot verifizieren: stärkere Banden auf DegP bei den aus Stämmen mit mutiertem *yadA* gewonnenen Proben sind ein semi-quantitativer Beweis für eine stärkere Expression von DegP in diesen Stämmen. Als Referenzwerte dienten *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt und *E. coli* pASK-IBA2 LV, letzterer mit einer Grundexpression von DegP ohne YadA-Expression, ersterer mit einer DegP-Expression bei einer Expression des wildtypischen YadA-Proteins.

Das DegP-Protein befindet sich nach Abschluss der SDS-PAGE auf Höhe der 50 kDa Markerbande und stellt die erste Bande im Western Blot da (Lipinska et al., 1990).

3.1.1 Vergleich der DegP-Expression 1h nach Induktion der YadA Expression

In der ersten Versuchsreihe wurde die Expression von DegP der sieben verschiedenen *E. coli* Stämme nach einer einstündigen Induktion mit einer Anhydrotetrazyklinkonzentration von 100 ng/ml miteinander verglichen. Es wurde pro Spur eine identische Anzahl von Bakterien aufgetragen.

Der Versuch wurde dreifach wiederholt, die ersten beiden Male wurde der 1. Antikörper 1:5000 verdünnt, beim dritten Mal erfolgte eine Optimierung auf eine 1:10 000 Verdünnung, auf Grund der hohen Signalstärke der Banden und der

hieraus resultierenden Intensität der DegP Proteinbanden durch den Primärantikörper.

Stellvertretend werden die Ergebnisse des zweiten Versuchs abgebildet.

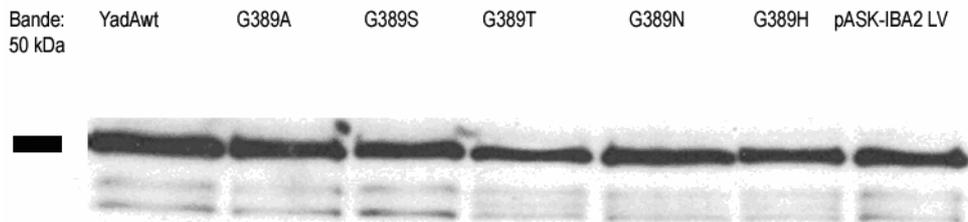


Abbildung 8: Western-Blot mit Primärantikörper gegen DegP, 1h Inkubation

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Konzentration des 1. Antikörpers 1:5000. In den 8 Taschen des Gels liefen, von links nach rechts: 7 μ l Proteinleiter, 10 μ l Proteinproben aufbereitet nach Lämmler, 1970, aus Kulturen von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Banden sichtbar. Es kann kein Unterschied in der Menge von DegP festgestellt werden.

Wesentliche Unterschiede in der Intensität der Banden waren nicht erkennbar, weder im Vergleich von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt mit den mutierten Stämmen, weder im Vergleich der mutierten Stämme mit *E. coli* pASK-IBA2 LV, noch im Vergleich von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt mit *E. coli* pASK-IBA2 LV.

Ein wesentlicher Unterschied der Quantität des Proteins DegP 1 h nach Induktion war in den verschiedenen Stämmen nicht erkennbar.

3.1.2 Vergleich der DegP-Expression Im Zeitverlauf

Es gab zwei verschiedene Erklärungen, wieso keine Unterschiede in den Banden sichtbar waren: entweder es gab überhaupt keinen Unterschied in der Expression von DegP oder nach 1 h Induktionsdauer war die Expression von DegP schon so stark, dass nun kein Unterschied in der Analyse im Western-Blot mehr erkennbar war. Zur weiteren Untersuchung wurden nun Proben nach

verschiedenen Induktionsdauern von YadA entnommen und im Western-Blot analysiert, um die DegP-Expression im Verlauf der Induktion von YadA semi-quantitativ zu bestimmen und gegebenenfalls geeignetere Zeitpunkte zum Vergleich der DegP Expression auswählen zu können. Stellvertretend sind die Ergebnisse des 2. Versuchs abgebildet.

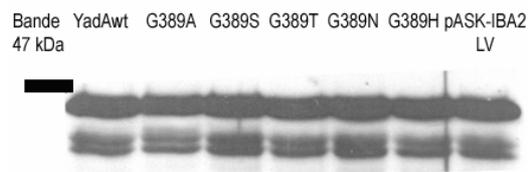


Abbildung 9: Western-Blot mit Primärantikörper gegen DegP, vor Induktion mit AHTC

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Konzentration des 1. Antikörpers 1:20 000. In den 8 Taschen des Gels liefen, von links nach rechts: 7 µl Proteinleiter, 10 µl Proteinproben aufbereitet nach Lämmli, 1970, aus Kulturen von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Banden sichtbar. Es kann kein Unterschied in der Menge von DegP festgestellt werden, aber eine sehr hohe basale Expression von DegP.

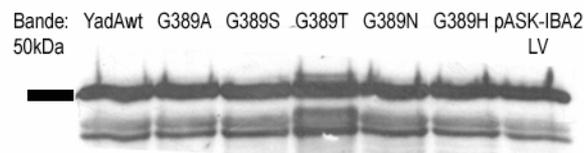


Abbildung 10: Western-Blot mit Primärantikörper gegen DegP, Inkubation mit AHTC 15'

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Konzentration des 1. Antikörpers 1:20 000. In den 8 Taschen des Gels liefen, von links nach rechts: 7 µl Proteinleiter, 10 µl Proteinproben aufbereitet nach Lämmli, 1970, aus Kulturen von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Banden sichtbar. Es kann kein Unterschied in der Menge von DegP festgestellt werden.

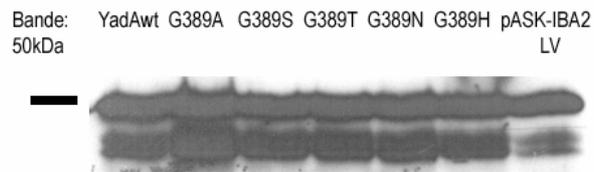


Abbildung 11: Western-Blot mit Primärantikörper gegen DegP, Inkubation mit AHTC 60'

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Konzentration des 1. Antikörpers 1:20 000. In den 8 Taschen des Gels liefen, von links nach rechts: 7 µl Proteinleiter, 10 µl Proteinproben aufbereitet nach Lämml, 1970, aus Kulturen von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Banden sichtbar. Es kann kein Unterschied in der Menge von DegP festgestellt werden.

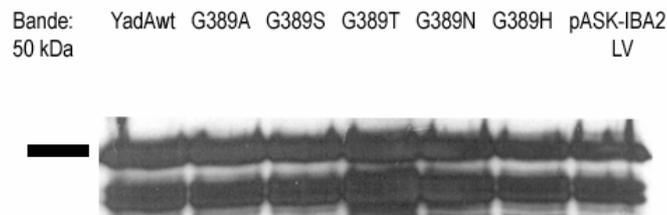


Abbildung 12: Western-Blot mit Primärantikörper gegen DegP, Inkubation Mit AHTC 90'

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Konzentration des 1. Antikörpers 1:20 000. In den 8 Taschen des Gels liefen, von links nach rechts: 7 µl Proteinleiter, 10 µl Proteinproben aufbereitet nach Lämml, 1970, aus Kulturen von *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Banden sichtbar. Es kann kein Unterschied in der Menge von DegP festgestellt werden.

Auch in dieser Versuchsreihe waren keine Intensitätsunterschiede der verschiedenen Banden erkennbar, so dass eine unterschiedliche DegP-Expression bei der Expression verschieden stark mutierter YadA-Moleküle auf Proteinebene zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nicht bewiesen werden konnte.

3.2 Qualitativer Vergleich der DegP-Transkription mittels konventioneller PCR

Nachdem auf der Proteinebene keine Unterschiede sichtbar waren, sollte nun die Transkription des Gens des Enzyms DegP untersucht werden. Wir formulierten folgende Hypothese: die Transkription mutierter *yadA* Sequenzen führt zur gesteigerten Akkumulation von periplasmatischem YadA, welches wiederum zu einer vermehrten Expression von DegP führt. Diese sind auf Proteinebene mittels Analyse nach Western-Blot nicht sichtbar. Jedoch könnte eine Veränderung der Homöostase von DegP auf der Ebene der Transkription des entsprechenden Gens nachweisbar sein.

Hierzu sollte zunächst der Nachweis von *yadA*- und *degP*-Transkription durch konventionelle RT-PCR etabliert werden. Zu diesem Zweck führten wir die Extraktion und reverse Transkription der mRNA durch, bevor wir sie mittels PCR amplifizierten. Zur Kontrolle der erfolgreichen reversen Transkription führten wir die konventionelle PCR vor den angestrebten quantitativen Messungen durch. Die konventionelle PCR diene als Kontrolle der erfolgreichen DNA-Synthese und kann auch als semi-quantitative Nachweismethode dienen, wenn konsistent relative Unterschiede in der Bandenintensität nachgewiesen werden können. Unterschiedlich starke DegP Banden in den Ergebnissen der konventionellen PCR wären also ein Nachweis unterschiedlich starker *degP* Transkription gewesen.

Eine Optimierung der RNA-Extraktion, reversen Transkription und konventionellen PCR war erforderlich.

3.2.1 Etablierung der konventionellen PCR

Nach Anzucht der Bakterienstämme in Übernachtskulturen gemäß erwähntem Protokoll und Induktion für 1 h mit 40 ng/ml Anhydrotetracyclin, wurde die RNA nach einem vom Herstellerprotokoll leicht modifizierten Protokoll mit dem Kit RNeasy extrahiert (siehe Abschnitt *Material und Methoden*). Nach reverser

Transkription der gewonnenen mRNA in cDNA wurde diese mittels konventioneller PCR nachgewiesen. Hierbei wurden die Primer YadA_5', YadArev_400bp, degP_fwd und degP_rev verwendet. Die verwendeten PCR Programme waren für DegP: 2' bei 94°C, (1' bei 94°C, 30'' bei 53°C, 30'' bei 72°C) * 30x, 5' 72°C, 4°C ∞ ; und für YadA: 2' bei 94°C, (1' bei 94°C, 30'' bei 47°C, 30'' bei 72°C) * 30x, 5' 72°C, 4°C ∞. Nach Auftrennen mittels Gelelektrophorese und Färben in Ethidiumbromid wurde folgendes Bild erhalten:

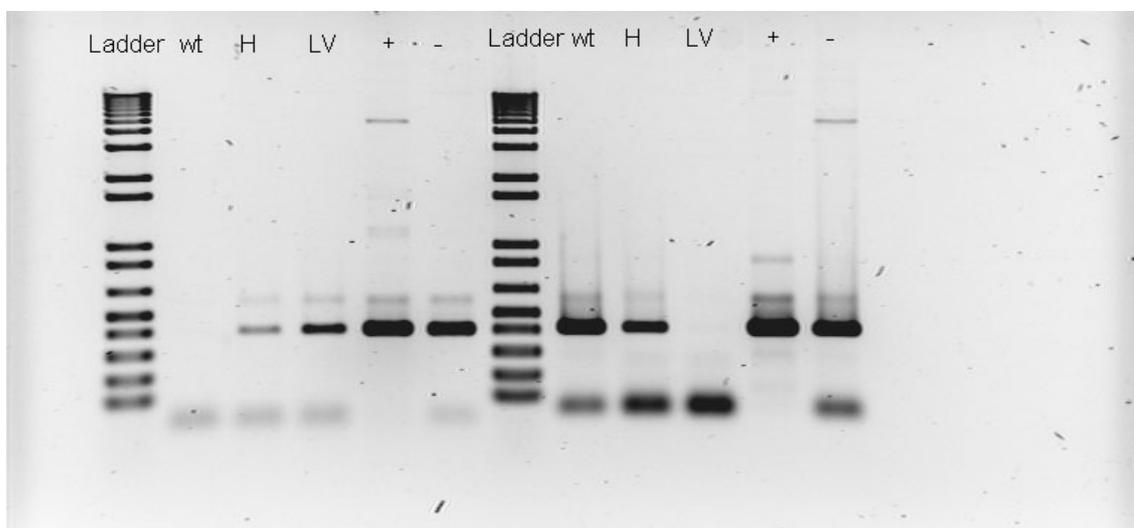


Abbildung 13: PCR mit DegP- und YadA-Primern, 1. Testlauf

DegP I YadA

WTi, Hi und LV sind die Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, YadA G389H und LV, die mit Anhydrotetracyclin 40ng/ml 1h lang induziert wurden. Die positive Negativkontrolle war durch eine Verunreinigung zu erklären.

Es fielen eine nicht vorhandene Bande von DegP im YadAwt im Vergleich zum YadA G389H auf, sowie eine starke Bande in der Bahn der YadA Negativkontrolle (Millipor Wasser). Deswegen wiederholten wir den Versuch. Nach identischem Vorgehen waren aber in der nächsten PCR auf DegP, außer in der Bahn der Positivkontrolle, keine Banden mehr sichtbar.

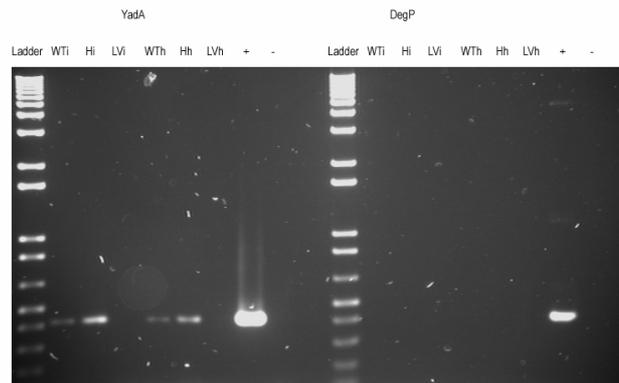


Abbildung 14: PCR mit DegP- und YadA-Primern, 2. Testlauf

YadA | DegP

WTi, Hi und LVi sind die Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H und *E. coli* pASK-IBA2 LV, die mit Anhydrotetrazyklin 40ng/ml 1h lang induziert wurden, WTh, Hh und LVh die selben *E. coli*-Stämme, jedoch erfolgte die *degP*-Transkription durch einen 1-minütigen Hitzeschock bei 50°C. DegP-cDNA war in den Proben aus den Bakterienkulturen nicht nachweisbar.

Daraufhin folgte eine extensive Fehlersuche, wobei sämtliche Parameter überprüft wurden:

- Die Bakterienkulturen wurden nunmehr mit 100 ng/ml Anhydroterazyklin induziert. Dies führte allein nicht zum Erfolg, die Induktion mit erhöhter Anhydrotetrazyklinkonzentration wurde jedoch beibehalten.
- Das PCR Protokoll wurde modifiziert, so dass der zweite, dritte und vierte Schritt 34 Mal anstelle von 29 Mal wiederholt und die Annealing Temperatur auf 50°C gesenkt wurden. Die DegP-banden bleiben trotzdem nur sehr schlecht oder gar unsichtbar.
- Die gesamten Reagenzien der PCR wurden überprüft, indem bei einem Versuch jeweils eines gegen ein aus einem anderen Laborraum stammendes, frisches Reagenz ausgetauscht wurde. Dies führte nicht zum Erfolg, die Banden auf DegP waren weiterhin nicht nachweisbar. Eine DNase-Kontamination eines Reagenz war nicht nachweisbar.

- Es wurden die Bakterienkulturen zu mehreren Zeitpunkten geerntet, um etwaige günstigere Induktionsdauern ausfindig zu machen: zu den verschiedenen Zeitpunkten waren keine nennenswerten Unterschiede sichtbar.
- Es wurden neue Primer für DegP mit einem kleineren Amplikon bestellt, degP_fwd 2 und degP_rev 2, welche überzeugend funktionierten.

Folgend werden die PCRs mit neuen Primern der Zeitreihen aller Stämme abgebildet:

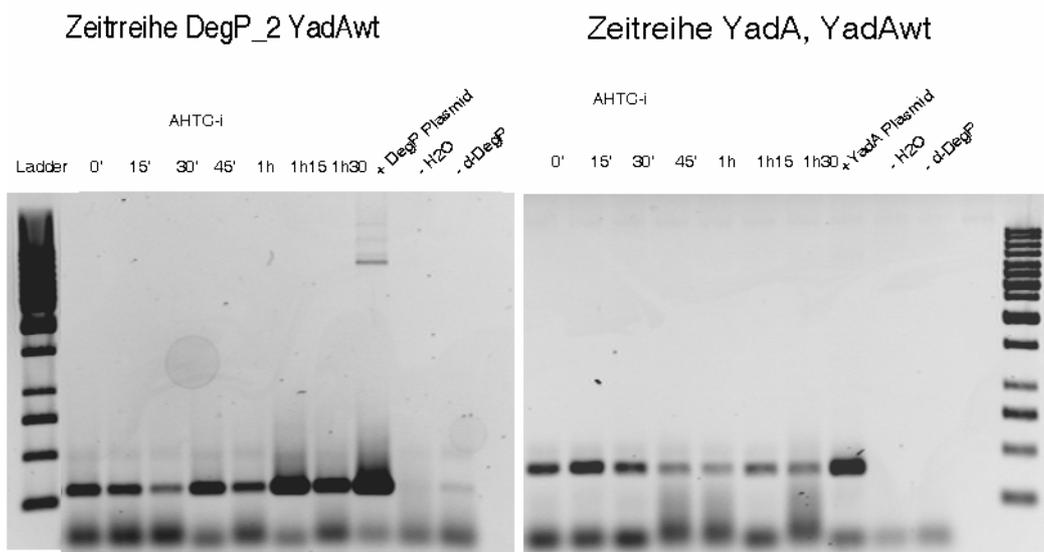
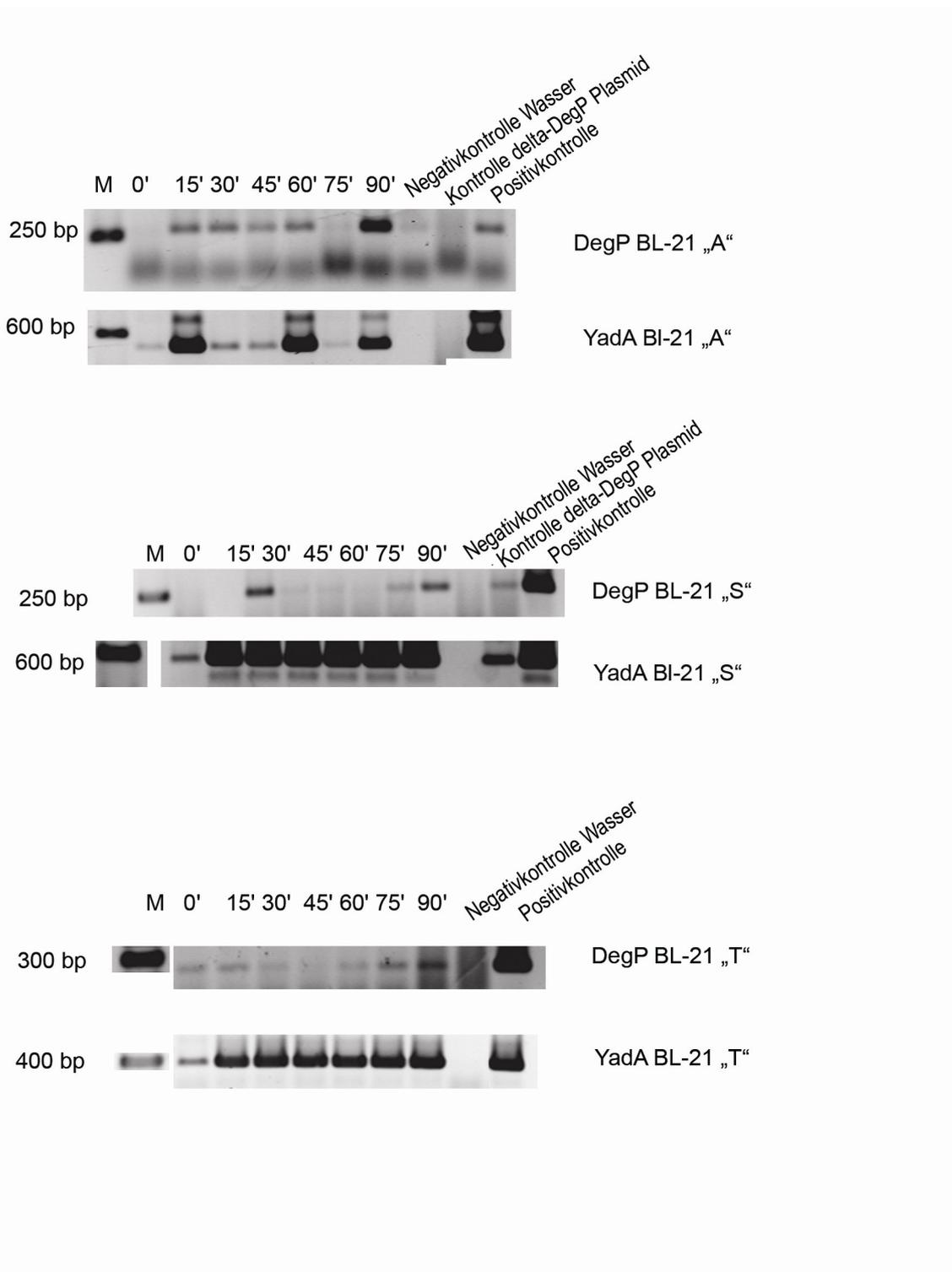


Abbildung 15a: PCR mit DegP- und YadA-Primern, Zeitreihen, Stamm *E. coli* pASK-IBA2

YadAwt

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Wiederholung des PCR-Zyklus bei DegP 34x, Annealingtemperatur bei DegP 50°C, frische Reagenzien, neue Primer auf DegP degp_fwd2 und degp_rev2. Banden v.l.n.r. DNA-Leiter, Proben gewonnen vor AHTC Induktion, Proben jeweils 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min und 90 min mit AHTC induziert, Positivkontrolle mit DegP-Plasmid, Negativkontrollen Milipor Wasser und Plasmid ohne Insert. Es lagen inhomogene Bandenstärken von DegP und YadA vor, d.h. es waren schwankende Mengen von DegP- und YadA c-DNA vorhanden.



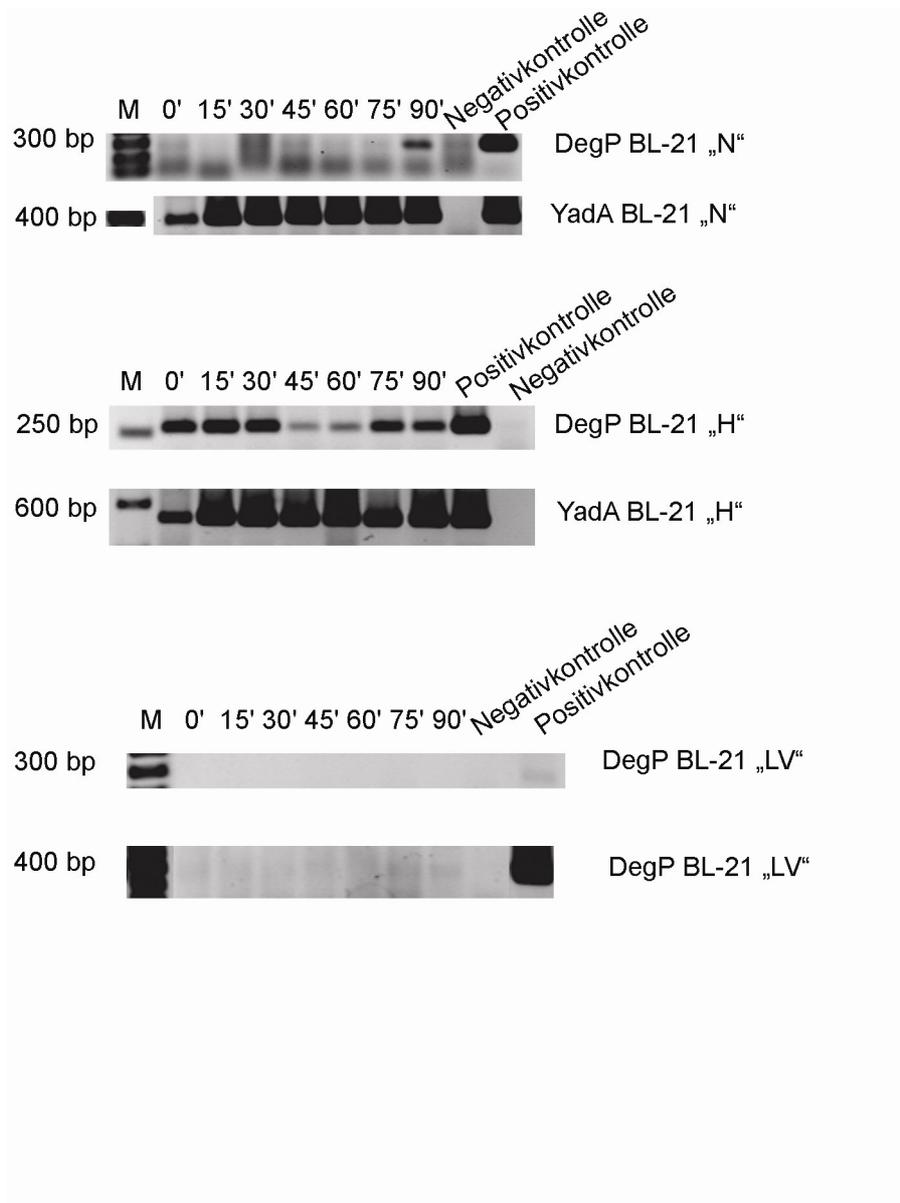


Abbildung 15b: PCR mit DegP- und YadA-Primern, Zeitreihen, Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, *E. coli* pASK-IBA2 LV

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Wiederholung des PCR-Zyklus bei DegP 34x, Annealingtemperatur bei DegP 50°C, frische Reagenzien, neue Primer auf DegP degp_fwd2 und degp_rev2. Banden v.l.n.r. DNA-Leiter, Proben gewonnen vor AHTC Induktion, Proben jeweils 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min und 90 min mit AHTC induziert, Positivkontrolle mit DegP-Plasmid, Negativkontrollen Millipore Wasser und Plasmid ohne Insert. Es lagen inhomogene Bandenstärken von DegP und YadA vor, d.h. es waren schwankende Mengen von DegP- und YadA c-DNA vorhanden.

Die PCR schien etabliert, doch in der folgenden PCR erschien in sämtlichen DegP-Bahnen Schmier und ließ keine oder nur sehr schwache Banden erkennen:

Zeitreihe DegP BL-21 "WT"

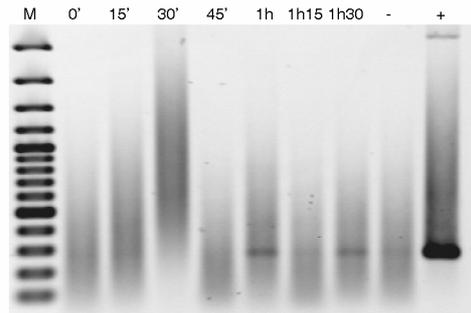


Abbildung 16: PCR mit DegP-Primern, unspezifische Amplifikation

Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt. AHTC Konzentration 100 ng/ml, Primer auf DegP *degp_fwd2* und *degp_rev2*. Banden v.l.n.r. DNA-Leiter, Proben gewonnen vor AHTC Induktion, Proben jeweils 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min und 90 min mit AHTC induziert, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Milipor Wasser. Verschmierte Bahnen: Banden von DegP z.T. nicht, z.T. nur sehr schwach erkennbar. Erklärbar u.a. durch Verunreinigungen, schlecht funktionierende Primer oder unsaubere RNA-Extraktion.

Daraufhin erfolgte eine weitere Fehlersuche, die erfolglos blieb. Es wurden dann neue Primer bestellt, *YadA_100_5'*, *YadA_100_3'*, *DegP_100_5'* und *Degp_100_3'*, bei denen die zu erwartende Größe des Amplikons 100 bp betrug. Das PCR Programm auf DegP wurde auch soweit modifiziert, dass fortan der zweite, dritte und vierte Schritt 39 statt 34 Mal wiederholt wurden, sowie jetzt 2 µl cDNA-Template für eine PCR verwendet wurden.

Des Weiteren wurde als mögliche Fehlerquelle die Halbwertszeit der DegP-mRNA identifiziert: in einer Publikation von Selinger et al. wurde eine durchschnittliche Halbwertszeit der gesamten untersuchten mRNA von 6,8 min angegeben, wobei Halbwertszeiten von unter 1,5 min vorkamen (Selinger et al., 2003). Mit Hinblick auf das relativ lange Protokoll zur mRNA-Gewinnung, alleine bei dem Abzentrifugieren und dem Lysozymverdau dauern bereits 10 min,

wurde das Protokoll wie im Abschnitt *Material und Methoden* (siehe Kapitel 2.2.2 RNA-Extraktion, S. 38) beschrieben geändert.

3.2.2 Überprüfung der qualitativen DegP-Expression durch konventionelle PCR

Nach Modifikation des Protokolls erhielten wir methodisch befriedigende Ergebnisse: sowohl die spezifischen Banden auf DegP als auch die auf YadA waren in allen weiteren PCRs deutlich und ohne Schmier sichtbar:

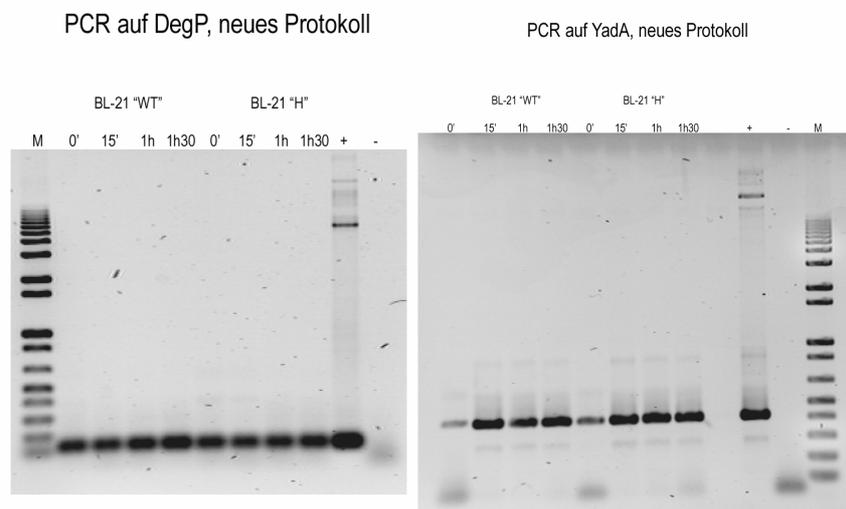


Abbildung 17a: Ergebnisse der PCR mit DegP- und YadA-Primern, endgültiges Protokoll, Zeitreihen der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt und *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H
 AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von DegP mit DegP_100_5' und DegP_100_3', Amplifikation von YadA mit YadA_100_3' und YadA100_5'. PCR auf DegP: Banden v.l.n.r.: DNA-Leiter, dann Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt und *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser. PCR auf YadA: : Banden v.l.n.r.: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt und *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser, DNA-Leiter. Homogen starke Banden von DegP, also keine signifikanten Unterschiede in der Menge DegP-cDNA nachweisbar. Schwache Banden von YadA vor Induktion, homogen starke Banden von YadA nach Induktion, konsistent mit einer Erhöhung der vorhandenen Menge von YadA cDNA nach AHTC-Induktion.

PCR auf DegP, neues Protokoll

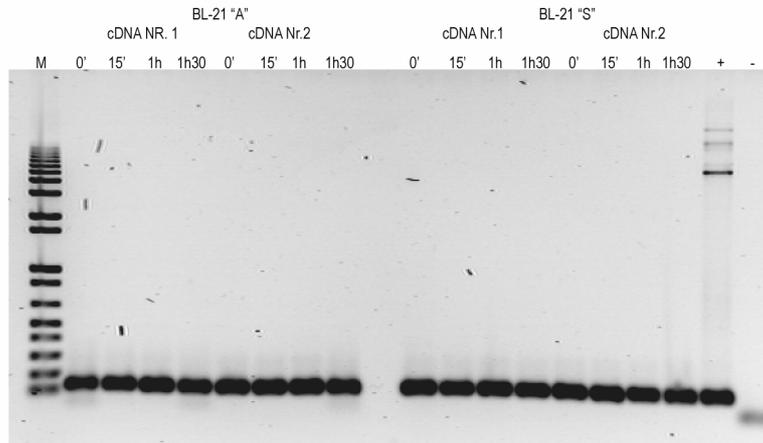


Abbildung 17b: Ergebnisse der PCR mit DegP- und YadA-Primern, endgültiges Protokoll, Zeitreihen der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A und *E. coli* pASK-IBA2 YadA G38S, jeweils 2 verschiedene cDNA Proben

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von DegP mit DegP_100_5' und DegP_100_3' Banden v.l.n.r.: DNA-Leiter, PCR *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für jede cDNA-Reihe,

PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für jede cDNA-Reihe, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser.

Homogen starke Banden von DegP, d.h. keinen signifikanten Unterschied in der Menge von DegP-cDNA nachweisbar.

PCR auf YadA, neues Protokoll

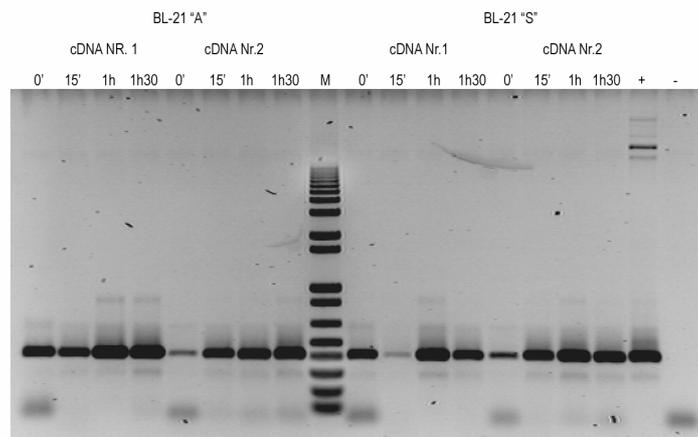


Abbildung 17c: Ergebnisse der PCR mit YadA-Primern, endgültiges Protokoll, Zeitreihen der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A und *E. coli* pASK-IBA2 G389S, jeweils 2 verschiedene cDNA Proben

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von YadA mit YadA_100_3' und YadA100_5'
 PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 G389A: Banden v.l.n.r.: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für jede cDNA-Reihe, dann DNA-Marker, es folgt die PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 G389S: Banden v.l.n.r.: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert, jeweils für jede cDNA-Reihe, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser. DNA-Leiter. Schwache Banden von YadA vor Induktion, homogen starke Banden von YadA nach Induktion, vereinbar mit Beginn der *yadA*-Transkription nach AHTC-Induktion.

PCR auf DegP, neues Protokoll

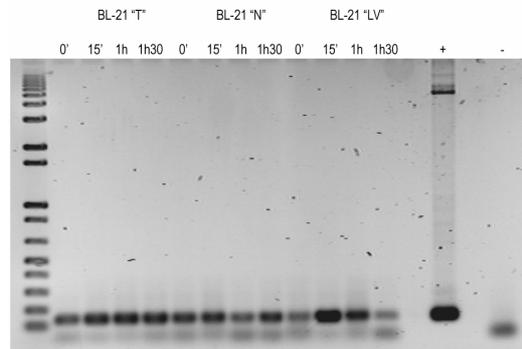


Abbildung 17d: Ergebnisse der PCR mit DegP-Primern, endgültiges Protokoll, Zeitreihen der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 G389T, *E. coli* pASK-IBA2 G389N und *E. coli* pASK-IBA2 LV

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von DegP mit DegP_100_5' und DegP_100_3'
Banden v.l.n.r.: DNA-Marker, PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 G389T: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 G389N: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 LV: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser. DNA-Leiter. Homogen starke Banden von DegP, keine signifikanten Unterschiede in der Menge von DegP-cDNA nachweisbar.

PCR auf YadA, neues Protokoll

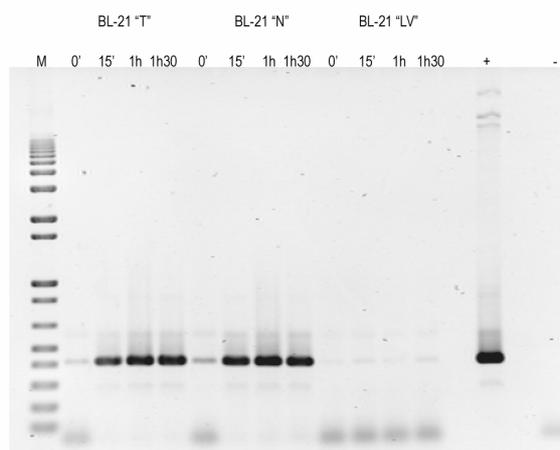


Abbildung 17e: Ergebnisse der PCRs mit YadA-Primern, endgültiges Protokoll, Zeitreihen der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 G389T, *E. coli* pASK-IBA2 G389N und *E. coli* pASK-IBA2 LV

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von YadA mit YadA_100_3' und YadA100_5' Banden v.l.n.r.: DNA-Marker, PCR *E. coli* pASK-IBA2 G389T: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 G389N: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. PCR auf *E. coli* pASK-IBA2 LV: Zeitreihen mit Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15 min, 60 min und 90 min mit AHTC induziert. Positivkontrolle mit YadA-Plasmid, Negativkontrolle Millipore Wasser. DNA-Leiter. Schwache Banden von YadA vor Induktion, homogen starke Bande von YadA nach Induktion.

Beim qualitativen Nachweis der DegP mRNA Expression durch rtPCR konnten keine Unterschiede im DegP-mRNA Level nach Expression von YadAwt, YadA G389A, YadA G389S, YadA G389T, YadA G389N, YadA G389H und dem Leervektor detektiert werden. Beim Nachweis der YadA mRNA lag erwartungsgemäß nach Induktion der YadA Expression die mRNA in höherer Kopiezahl vor als vor Induktion, ein weiterer Anstieg während des Beobachtungszeitraumes konnte in dieser qualitativen PCR dagegen nicht beobachtet werden.

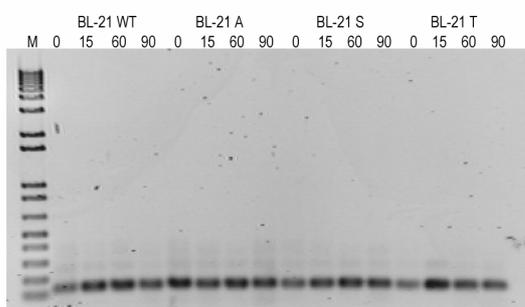
3.3 Quantitativer Vergleich der DegP-Transkription mittels Real Time PCR

3.3.1 Überprüfung der Proben auf Integrität der cDNA

Aus Bakterienkulturen sämtlicher Stämme, geerntet zu sämtlichen Zeitpunkten vor und nach Induktion, wurde nach gleichem Procedere wie im Abschnitt *Material und Methoden* (ab Kapitel 2.2.2 RNA Extraktion, Seite 38) beschrieben die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Um sich der Verwertbarkeit der cDNA Proben für die Analyse mittels Real Time PCR zu vergewissern, wurden vorab diese Proben mittels konventioneller PCR auf das Vorhandensein der nachzuweisenden Genprodukte untersucht. Es wurde die gleiche Methodik angewandt wie in *Material und Methoden* beschrieben, mit den Primerpaaren YadA_100_5' und YadA_100_3', sowie DegP_100_5' und Degp_100_3, mit den jeweiligen Annealing Temperaturen von 47°C und 50°C.

Die erwarteten Banden waren deutlich sichtbar und die Proben wurden als verwendbar gewertet. Hier sind stellvertretend die Ergebnisse der 2. Versuchsreihe gezeigt.

Kontrolle der cDNA, PCR auf DegP



Kontrolle der cDNA, PCR auf DegP

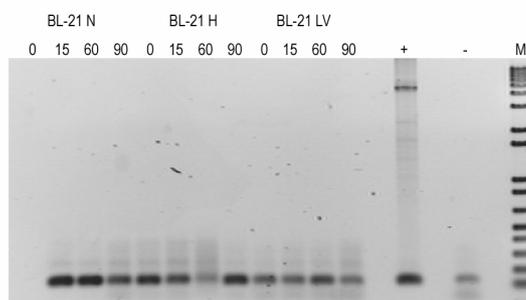


Abbildung 18a: Kontrolle der cDNA, konventionelle PCR auf DegP

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von DegP mit DegP_100_5' und DegP_100_3' Banden v.l.n.r.: DNA-Marker, Proben der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, *E. coli* pASK-IBA2 LV, jeweils die Zeitreihen mit den Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15', 60' und 90' mit AHTC induziert, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle mit Millipore Wasser, DNA-Marker. Unterschiedlich starke Banden auf DegP sichtbar, was auf eine unterschiedliche große, aber stets vorhandene Menge an DegP mRNA nach Extraktion schließen lässt. Eine sehr schwache Bande ist in der Negativkontrolle erkennbar, was jedoch die Güte der Proben nicht in Frage stellte.

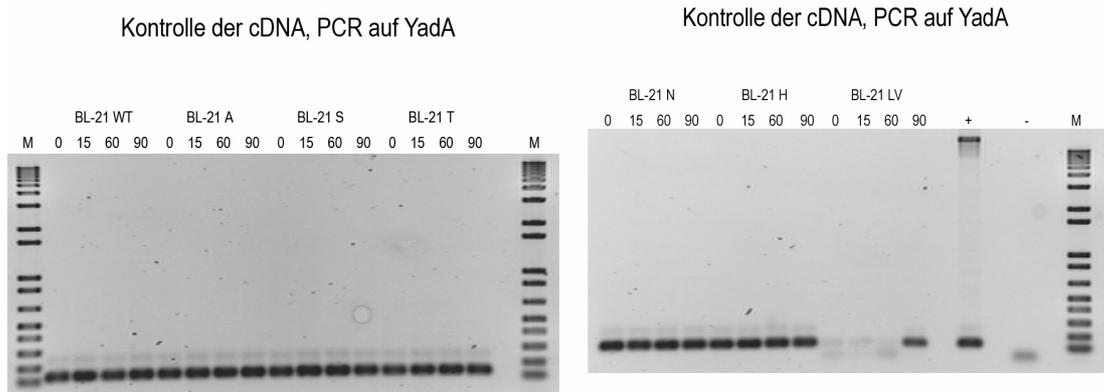


Abbildung 18b: Kontrolle der cDNA, konventionelle PCR auf YadA

AHTC Konzentration 100 ng/ml, Amplifikation von YadA mit YadA_100_3' und YadA100_5' Banden v.l.n.r.: DNA-Marker, Proben der Stämme *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, *E. coli* pASK-IBA2 LV, jeweils die Zeitreihen mit den Proben gewonnen vor AHTC Induktion und Proben jeweils 15', 60' und 90' mit AHTC induziert, Positivkontrolle mit *degP*-Plasmid, Negativkontrolle mit Millipore Wasser, DNA-Marker. Unterschiedlich starke Banden auf YadA sichtbar, was auf eine unterschiedlich große, aber stets vorhandene Menge an YadA mRNA nach Extraktion schließen lässt. Außer im Stamm *E. coli* pASK-IBA2 LV: zu den Zeitpunkten 0', 15' 60' ist keine YadA-cDNA nachweisbar und zu dem Zeitpunkt 90' ist eine schwache Bande erkennbar, erklärbar durch z.B. eine Kontamination bei der PCR-Amplifikation.

3.3.2 Untersuchung mittels Real Time PCR

Es wurden zwei Real Time PCRs pro Versuch durchgeführt, jeweils eine zum Nachweis von YadA mRNA und DegP mRNA. Pro PCR wurden sämtliche cDNA Proben in Duplikaten analysiert, so dass wir pro Bakterienstamm und Erntezeitpunkt jeweils zwei Messwerte in Quantity (Qty) (relativer Zuwachs der Fluoreszenz, proportional zur amplifizierten Menge template cDNA) erhielten, zwei für DegP und zwei für YadA. Aus diesen beiden Werten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet. Hier sind die Ergebnisse von zwei Versuchen gegenübergestellt.

Zuerst sind hier die gemessenen Werte der beiden Versuche tabellarisch wiedergegeben.

Tabelle 5: Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten 0', 15', 60' und 90', in Qty

Ergebnisse in Qty		0'			
		DegP		YadA	
		Mittelwert	Standardabw	Mittelwert	Standardabw
YadAwt	Versuch 1	1,81E+00	8,70E-01	5,08E-03	7,99E-04
	Versuch 2	2,08E+00	8,06E-01	1,06E-03	0,00E+00
G389 A	Versuch 1	4,91E-01	7,28E-02	9,43E-05	1,94E-05
	Versuch 2	2,41E+00	2,55E-01	5,81E-04	3,14E-04
G389 S	Versuch 1	1,60E+00	6,86E-01	1,94E-05	7,78E-06
	Versuch 2	1,13E+00	1,27E-01	3,72E-04	1,24E-04
G389 T	Versuch 1	1,35E-01	3,46E-02	1,64E-03	5,59E-04
	Versuch 2	2,18E-01	1,24E-01	1,34E-03	1,98E-04
G389 N	Versuch 1	3,20E+00	2,55E-01	9,43E-04	4,31E-05
	Versuch 2	1,94E-02	1,48E-03	6,60E-03	1,77E-04
G389 H	Versuch 1	6,09E-02	1,27E-02	8,00E-04	1,92E-04
	Versuch 2	1,63E-02	8,77E-03	1,77E-03	5,44E-04
G389 LV	Versuch 1	1,85E-01	6,51E-02	6,83E-04	1,70E-05
	Versuch 2	4,32E+01	3,43E+01	1,30E-03	6,36E-05
Ergebnisse in Qty		15'			
		DegP		YadA	
		Mittelwert	Standardabw	Mittelwert	Standardabw
YadA wt	Versuch 1	4,11E-01	3,68E-02	8,81E-01	2,96E-01
	Versuch 2	2,03E+01	1,25E+01	1,83E+00	7,07E-02
G389 A	Versuch 1	4,40E-01	1,62E-01	2,40E-02	8,27E-03
	Versuch 2	9,44E+00	1,65E+00	1,21E-01	7,63E-02
G389 S	Versuch 1	1,52E+00	1,33E+00	2,57E-02	3,27E-02
	Versuch 2	4,17E+01	3,28E+01	9,78E-01	5,98E-01
G389 T	Versuch 1	2,67E+00	5,66E-01	3,50E+00	2,76E-01
	Versuch 2	5,15E+00	5,59E-01	4,35E-01	7,07E-02
G389 N	Versuch 1	2,69E-01	1,05E-01	1,00E-01	4,36E-02
	Versuch 2	2,06E-01	1,09E-01	4,25E+00	4,99E+00
G389 H	Versuch 1	2,69E-01	9,90E-03	3,13E-01	1,23E-01
	Versuch 2	2,90E-01	1,29E-01	1,32E-01	2,83E-03
G389 LV	Versuch 1	9,21E-01	3,53E-01	5,67E-04	4,67E-05
	Versuch 2	1,03E+01	1,23E+00	1,18E-03	1,98E-04

Ergebnisse in Qty		60'			
		DegP		YadA	
		Mittelwert	Standardabw	Mittelwert	Standardabw
YadAwt	Versuch 1	6,79E-01	7,07E-04	2,06E+02	6,69E+01
	Versuch 2	2,06E+02	6,69E+01	1,38E+00	1,91E-01
G389 A	Versuch 1	3,91E-01	1,43E-01	4,42E+01	8,63E-01
	Versuch 2	4,42E+01	8,63E-01	1,37E+00	5,23E-01
G389 S	Versuch 1	4,86E-01	1,54E-01	2,32E+01	7,43E+00
	Versuch 2	2,32E+01	7,43E+00	7,89E-01	3,75E-02
G389 T	Versuch 1	1,49E+00	1,84E-01	2,50E+01	4,01E+00
	Versuch 2	2,50E+01	4,01E+00	7,22E-01	2,50E-01
G389 N	Versuch 1	6,40E-01	7,00E-02	5,19E+01	2,77E+01
	Versuch 2	5,19E+01	2,72E+01	1,49E+00	2,83E-01
G389 H	Versuch 1	1,73E-01	8,98E-02	7,06E-02	1,86E-02
	Versuch 2	7,06E-02	1,86E-02	3,91E-01	4,03E-02
G389 LV	Versuch 1	5,65E-01	5,94E-02	4,69E+00	1,61E+00
	Versuch 2	4,69E+00	1,61E+00	1,18E-03	1,34E-04
Ergebnisse in Qty		90'			
		DegP		YadA	
		Mittelwert	Standardabw	Mittelwert	Standardabw
YadAwt	Versuch 1	5,43E-01	1,83E-01	4,09E-01	2,16E-01
	Versuch 2	9,02E+01	3,04E+01	1,14E+00	5,23E-01
G389 A	Versuch 1	9,01E+00	1,26E+00	4,31E-03	3,53E-03
	Versuch 2	3,67E+01	3,23E+01	1,01E+00	4,31E-01
G389 S	Versuch 1	1,58E-01	1,14E-01	2,36E-02	1,27E-03
	Versuch 2	1,66E+00	3,61E-01	1,21E+00	9,51E-01
G389 T	Versuch 1	9,02E-01	8,49E-02	4,91E-01	3,75E-01
	Versuch 2	1,46E+01	4,33E+00	4,92E-01	3,59E-01
G389 N	Versuch 1	3,69E-01	1,37E-01	3,16E-01	1,92E-01
	Versuch 2	1,10E+00	5,03E-01	1,45E+00	1,34E-01
G389 H	Versuch 1	2,54E-01	4,88E-02	3,82E-01	8,84E-02
	Versuch 2	9,86E-02	5,57E-02	4,60E-01	6,72E-02
G389 LV	Versuch 1	3,82E-01	1,16E-01	6,52E-04	1,38E-04
	Versuch 2	2,81E+01	8,85E+00	1,37E-03	9,90E-05

Im Folgenden werden die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Man sieht die Mittelwerte der Duplikate der real time PCRs auf YadA und DegP zu den jeweiligen Zeitpunkten gegenübergestellt. Die Ergebnisse werden in relativer Zunahme der Fluoreszenz (Qty) gemessen. Es werden nacheinander jeweils der erste und der zweite Versuch pro *E. coli* Stamm gezeigt.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt.

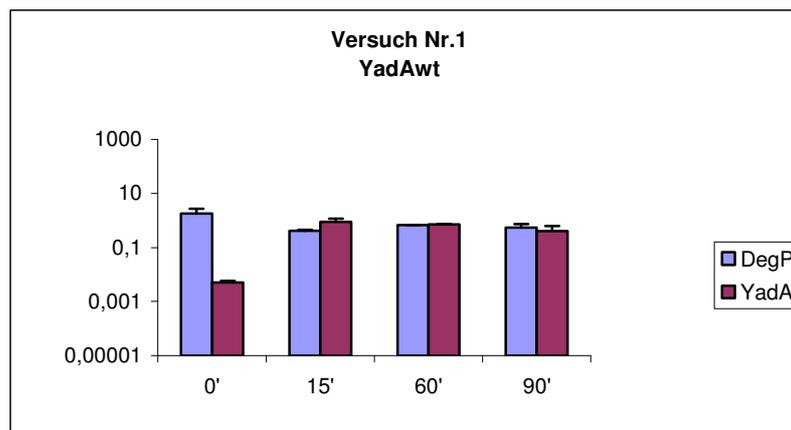


Abbildung 19a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

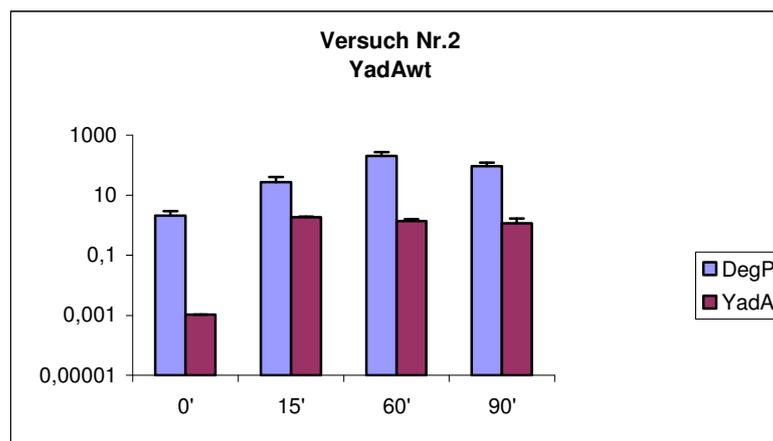


Abbildung 19b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadAwt, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A.

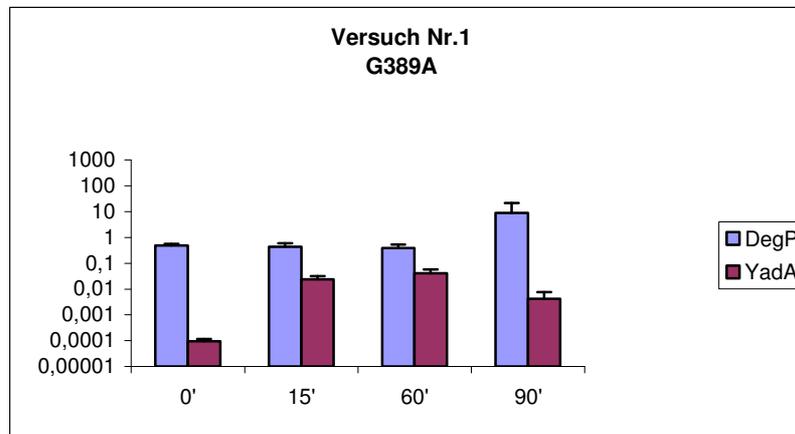


Abbildung 20a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

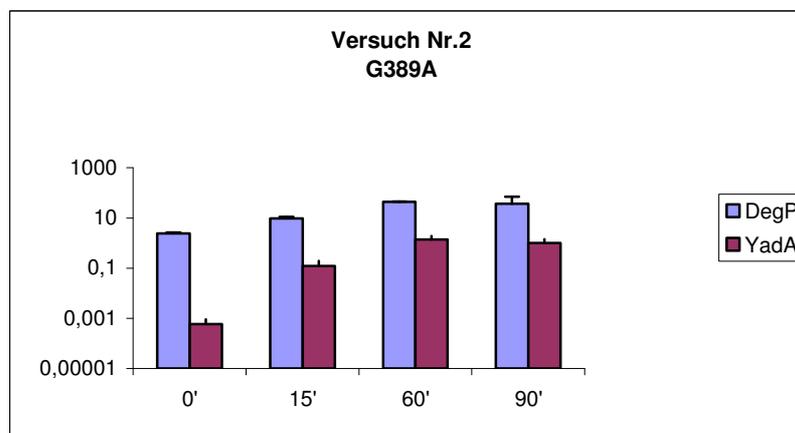


Abbildung 20b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S.

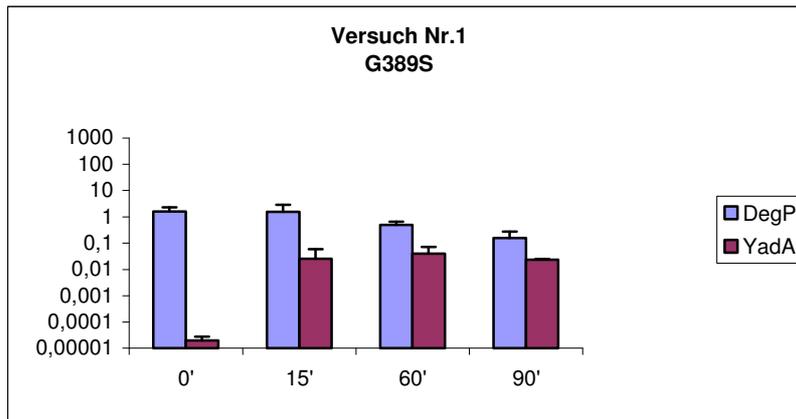


Abbildung 21a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten $t = 0, 15 \text{ min}, 60 \text{ min}$ und 90 min , in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389S, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 3 Größenordnungen vor und nach Induktion.

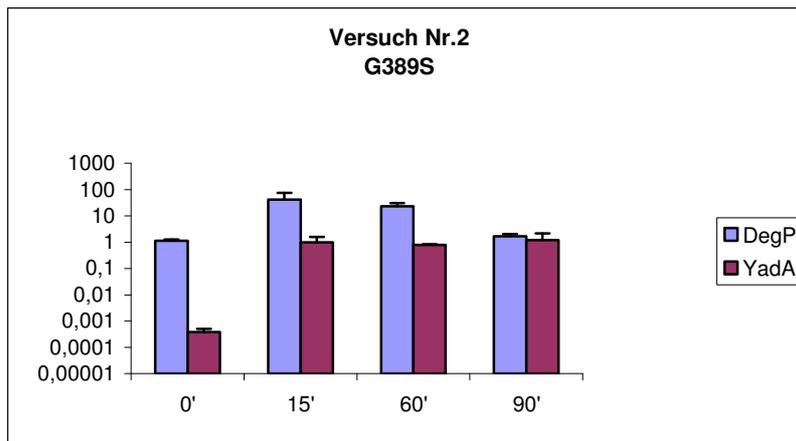


Abbildung 21b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten $t = 0, 15 \text{ min}, 60 \text{ min}$ und 90 min , in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389A, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T.

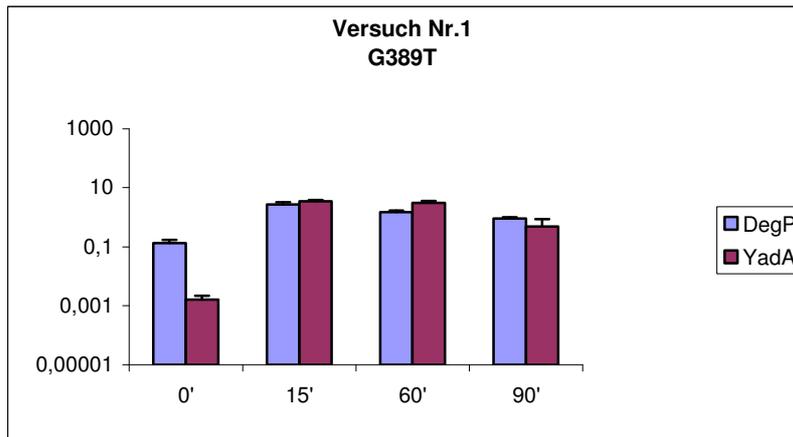


Abbildung 22a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 4 Größenordnungen vor und nach Induktion.

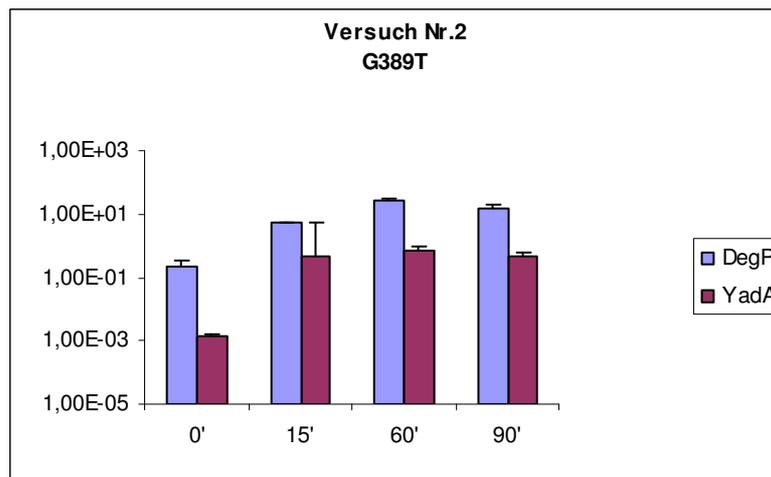


Abbildung 22b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389T, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N.

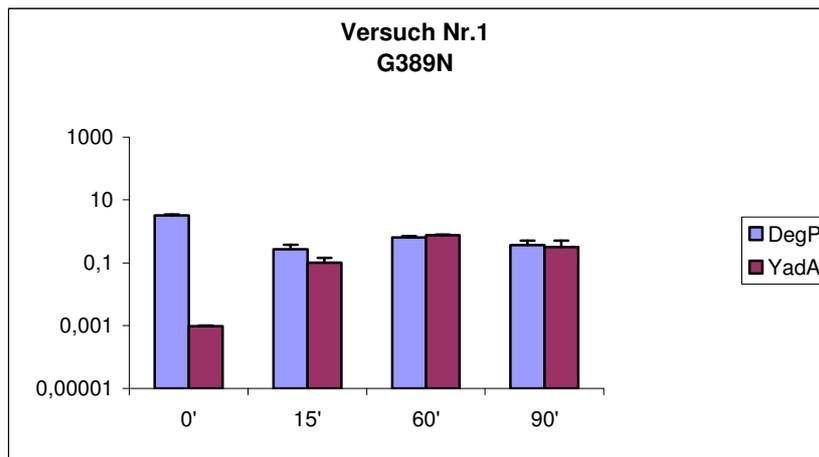


Abbildung 23a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min', in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

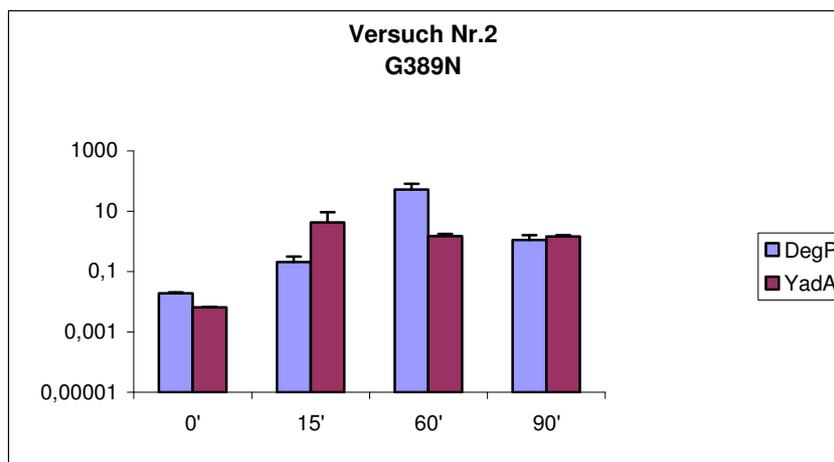


Abbildung 23b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389N, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 3 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H.

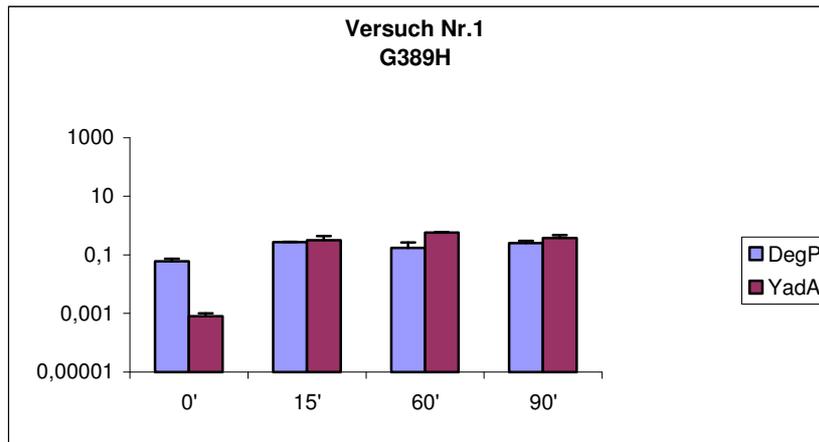


Abbildung 24a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

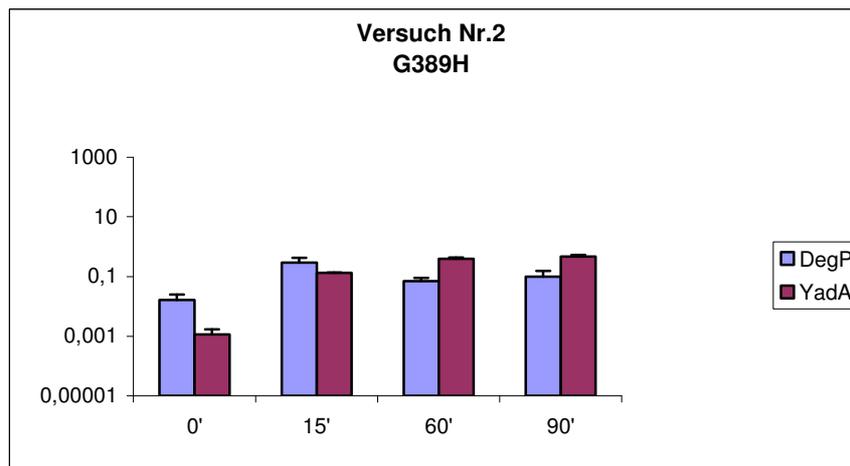


Abbildung 24b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 YadA G389H, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, Anstieg der YadA-mRNA Menge um ca. 2 Größenordnungen vor und nach Induktion.

Es folgen die graphischen Darstellungen der Ergebnisse des ersten und des zweiten Versuchs für den Stamm *E. coli* pASK-IBA2 LV.

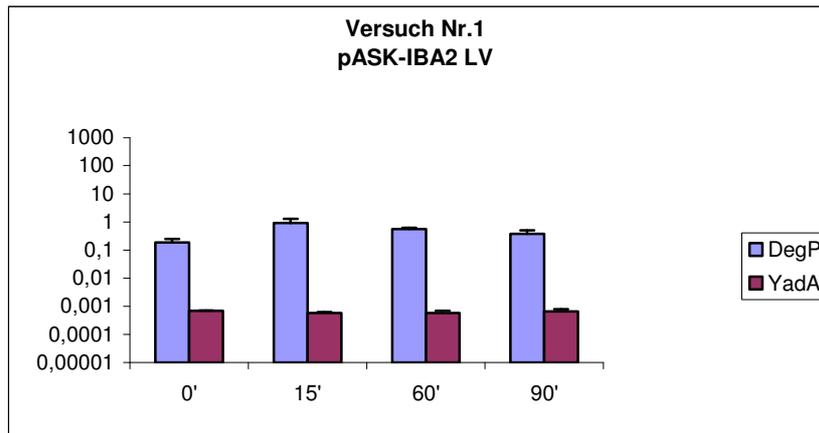


Abbildung 25a: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 LV, Versuch Nr.1

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, kein Anstieg der YadA-mRNA Menge vor und nach Induktion.

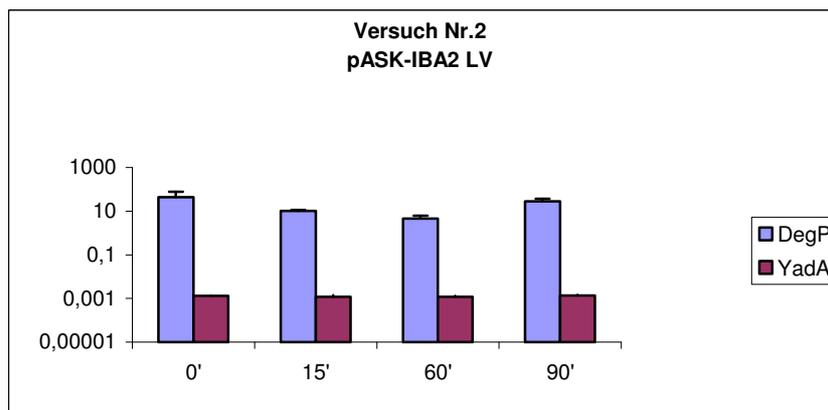


Abbildung 25b: Relative Menge an cDNA von YadA und DegP zu den Zeitpunkten t = 0, 15 min, 60 min und 90 min, in Qty, Stamm *E. coli* pASK-IBA2 LV, Versuch Nr.2

Es konnte keine signifikante Veränderung der relativen DegP-mRNA über die Zeit detektiert werden, kein Anstieg der YadA-mRNA Menge vor und nach Induktion.

Es wurde eine logarithmische Darstellung der Ergebnisse gewählt, da sonst die Abbildung der Ergebnisse nicht möglich gewesen wäre.

Die Menge an gemessener cDNA von YadA war zum Zeitpunkt 0' bei jedem Versuch um mindestens eine Größenordnung von 10^2 geringer als zu den

Zeitpunkten 15', 60' und 90', außer bei dem Stamm pASK-IBA2 LV, also dem Stamm, der kein YadA exprimieren sollte. Dort war kein Anstieg von YadA-cDNA zu verzeichnen, die Menge an gemessener YadA-cDNA bleibt bei einer Größenordnung von 10^{-3} Qty konstant, was wie erwartet mit einer nicht vorhandenen Expression von YadA vereinbar war.

Wenn man aber berücksichtigt, dass die Ergebnisse auf einer logarithmischen Skala abgebildet wurden, muss auf die erhebliche Streuung der gemessenen Mengen an YadA hingewiesen werden; abgebildet sind jeweils die Mittelwerte zweier Messungen. Zwischen den Messungen zu einem Zeitpunkt und eines bestimmten Stammes bestehen zum Teil große Abweichungen. Ähnliches kann auch für die Transkription von DegP gesagt werden. Zwischen den Messungen zweier Versuche bestehen z. T. große Unterschiede und auch im Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Stämme miteinander gibt es eine z.T. starke Streuung, die Unterschiede sind nicht signifikant.

4 Diskussion

Die Expression des periplasmatischen Enzyms mit Chaperon- und Proteasefunktion DegP (Spiess et al., 1999, Lipinska et al., 1988) wird durch die Akkumulation von äußeren Membranproteinen im periplasmatischen Raum über die Aktivierung des ECF σ -Systems durch Steigerung der Transkription von *degP* verstärkt (Rowley et al., 2006). Nun stellte sich die Frage, ob die Akkumulation des äußeren Membranproteins YadA zu einer verstärkten Expression von DegP führt. Eine verminderte Expression von fehlerhaftem YadA an der bakteriellen Oberfläche und die im Vergleich erhöhte Expression von fehlerhaftem YadA an der Oberfläche DegP-defizienter *E. coli* Stämme, lässt eine Beteiligung von DegP am Abbau fehlerhafter YadA-Moleküle vermuten (Grosskinsky et al. 2007). Dies ist vereinbar mit dem Modell, dass äußere Membranproteine in das Periplasma sezerniert und an die äußere Membran geführt werden, bevor sie in die äußere Bakterienmembran integriert und gegebenenfalls bei Akkumulation, bedingt z.B. durch Fehlfaltung, durch Proteasen wie DegP abgebaut werden (Danese & Silhavy 1998, de Cock et al., 1996; Duguay & Silhavy 2004). Sklar et al. schlagen vor, dass DegP eine Auffangrolle in der Faltung von äußeren Membranproteinen im periplasmatischen Raum wahrnimmt, zusammen mit dem Chaperon Skp, dass aber die Hauptaufgabe dem Peptidyl-Prolyl-Isomerase Enzym mit allgemeiner Chaperonfunktion SurA zukommt (Sklar et al., 2007). Des Weiteren könnte DegP bei der Insertion von äußeren Membranproteinen in der äußeren Bakterienmembran beteiligt sein (Krojer et al., 2008), vielleicht also dann auch bei der Insertion von YadA. Nun wird der Transport von YadA-Molekülen, die durch den Austausch von einem konservierten Glycin-Rest verändert worden sind, gestört (Grosskinsky et al. 2007). Das fehlerhafte YadA könnte demzufolge im Periplasma akkumulieren. Wie oben erwähnt ist DegP an den verschiedenen Stellen der Protein-Homöostase im Periplasma beteiligt und höchstwahrscheinlich fordert die Expression mutierter YadA-Proteine eine gesteigerte Aktivität dieses Enzyms. Signaltransduktionskaskaden, die bei

veränderten Rahmenbedingungen die Transkription von *degP* verstärken, sind bekannt (Raivio & Silhavy 2001).

In Hinblick dessen wurde die Arbeitshypothese formuliert, dass die Expression fehlerhafter YadA-Moleküle die Expression von DegP verstärkt.

Die Veränderung der Expression auf Proteinebene sollte mittels Western-Blot, eine Veränderung der Transkription mittels PCR und RT-PCR nachgewiesen werden.

Nun war in den Western-Blot Analysen kein Unterschied erkennbar, weder im Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte, noch im Vergleich der unterschiedlichen Stämme. Die Hypothese, dass die Menge an DegP mit zunehmender Dauer des durch die Expression des fehlerhaften YadAs verursachten Stresses sichtbar ansteigt, konnte nicht verifiziert, aber auch nicht verworfen werden. Eine mögliche Abnahme der DegP-Menge im Verlauf, vereinbar durch die Bewältigung des Stresses, war ebenfalls nicht erkennbar. Die Banden waren im zeitlichen Verlauf alle gleich stark sichtbar. Eine zweite Hypothese, die mit dieser Versuchsreihe untersucht werden sollte, nämlich dass DegP in den mutierten Stämmen stärker exprimiert wird im Vergleich zu dem YadAwt und dem Bakterienstamm, welcher kein YadA exprimiert, konnte ebenfalls nicht bestätigt werden. Auch hier war kein Unterschied in der DegP-Menge erkennbar. Unsere Hypothese, nämlich dass ein gesteigerter Stress durch Anfallen fehlerhafter YadA Moleküle eine gesteigerte DegP Expression zur Folge hat, hätte jedoch eine verstärkte Expression von DegP nach Induktion der YadA-Expression der mutierten Stämme im Vergleich zu den Proben vor Induktion, als auch im Vergleich zu dem Wildtyp- und Leervektor-Stamm verlangt. DegP ist ein Protein des Periplasmas, welches konstitutiv, als housekeeping Gen, exprimiert wird (Lipinska et al. 1989; Strauch et al. 1989) und die Expression von fehlerhaftem YadA ist nicht die einzige Stressquelle, auf die DegP antworten soll (Pallen & Wren 1997). Deshalb können die Ergebnisse der Western-Blots Reihe mit der These erklärt werden, dass das DegP in allen untersuchten Bakterienreihen konstitutiv auf einem hohen Niveau exprimiert

war und so die Unterschiede in der Western-Blot Analyse nicht detektierbar waren. War nun der Ansatz von vornherein als falsch zu beurteilen? Dem widersprechen Loosmore et al. aus dem Jahr 1997, die einen komparativen Immunoblot auf HtrA, bzw. DegP in *Haemophilus influenzae* spp. unter Standardbedingungen und nach Stressinduktion durchgeführt haben. Sie fanden heraus, dass DegP konstitutiv auf niedrigem Niveau unter allen Bedingungen exprimiert wird, im Verlauf aber unter Stress zunahm, so dass *H. influenzae* HtrA bzw. DegP ebenfalls als stress-response Protein gelten kann (Loosmore et al., 1997). In einer 2008 erschienenen Publikation von Huston et al. wird ebenfalls eine Zunahme der Bandenstärke im Western Blot auf DegP nach Kultur von *C. trachomatis*L2 unter Hitzeschock nachgewiesen (Huston et al., 2008). Skorko-Glonek et al. wiesen einen Unterschied in der Expression von DegP in verschiedenen Stämmen nach (Skorko-Glonek et al., 2008). Unsere Arbeit hatte einen ähnlichen methodologischen Ansatz, konnte aber keinen Anstieg von *E. coli* DegP nach Expression von punktmutiertem YadA zeigen, durch eine konstitutiv hohe Expression von DegP in diesen Bakterienstämmen erklärbar. Um einen Anstieg von DegP nach Expression von mutiertem YadA erfassen zu können, müsste daher entweder eine Methodik ausgewählt werden, die auch Zuwächse von Proteinen im hohen Bereich erfassen kann, oder das Ausgangsniveau von DegP müsste gesenkt werden. Dies könnte womöglich durch eine Optimierung der Wachstums- und Induktionsbedingungen oder durch die Wahl anderer Bakterienstämme, wie z.B. *E. coli* JM109, wie er von Loosmore et al. verwendet wurde, erreicht werden (Loosmore et al. 1997). Als alternative Erfassungsmethoden für das DegP Protein wären als weitere semi-quantitative Methode mit aber höherer Differenzierungskapazität ein 2D-Immunoblot denkbar oder auch ein ELISA, was eine noch genauere Quantifizierung ermöglichen würde. Eine Erwähnung dieser beiden Methoden zur komparativen Messung von DegP ist zu diesem Zeitpunkt in der gängigen Literatur nicht gefunden worden.

Des Weiteren muss erwähnt werden, dass die absolute Menge an DegP nicht notwendigerweise mit dem Stress des Bakteriums korrelieren muss. DegP ist nicht das einzige periplasmatische stress-response Protein von *E. coli*, FkpA,

Skp und SurA sind nur drei weitere (Rowley et al. 2006). Darüber hinaus kann *E. coli* über posttranslationale Modifikationen die Funktion von Enzymen steuern, z.B. über Acetylierung und Phosphorylierung von Hsp90 (Wandinger et al., 2008).

Es ist daher durchaus sinnvoll, die Stressantwort auf Transkriptionsebene zu untersuchen. Periplasmatischer Stress, wie er durch die Akkumulation von Proteinen im Periplasma verursacht wird, führt bei *E. coli* über eine Aktivierung der σ^E -Signaltransduktionskaskade zu einer vermehrten Transkription von *degP* (Raivio & Silhavy, 2001; Rowley et al., 2006). Auch wenn sich daher die Proteinmenge nicht kurzfristig verändert, eine Veränderung über die regulatorischen envelope stress response Mechanismen wäre wahrscheinlich. Daher war die Hypothese berechtigt, dass eine Expression von mutiertem YadA eine messbare Zunahme von DegP-mRNA zur Folge hat.

Die Messung von DegP-mRNA sowie YadA-mRNA erfolgte semi-quantitativ, d.h. es wurde auf die Messung eines house-keeping Gens verzichtet, da nur Unterschiede von DegP- und YadA-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten und im Vergleich der verschiedenen Stämme von Interesse war, da ausschließlich ein stärkerer Anstieg von DegP nach Induktion der YadA Expression bei den Stämmen, die das mutierte YadA exprimierten, im Vergleich zu den Stämmen, die entweder den Wildtyp oder überhaupt kein YadA exprimierten, nachgewiesen werden sollte.

Nun stellte sich heraus, dass die Transkription von *degP* in sämtlichen *E. coli* Stämmen keinem Muster folgt. Im Vergleich zur Transkription von *yadA*, welches konstant einen deutlichen Sprung um eine Größenordnung von 10^2 Qty nach entsprechender Induktion machte, mit Ausnahme des Leervektor-Stammes, verhielt sich die *degP* Transkription erratisch, sowohl im zeitlichen Verlauf, als auch im Vergleich der verschiedenen Stämme untereinander. So konnte keine signifikante Zunahme der *degP*-Transkription nach Induktion von YadA verzeichnet werden und auch die *degP*-Transkription ist in den Stämmen mit fehlerhaftem YadA nicht signifikant höher als in den *E. coli* Stämmen, die entweder kein YadA oder den Wildtyp exprimieren; die Zu- und Abnahme der *degP*-Transkription scheint im gewählten experimentellen Setup nicht mit dem

Grad an Stress, der durch die Expression der verschiedenen YadA Moleküle zu vermuten war, zu korrelieren. Die Menge an *degP* cDNA in *E.coli* G389H war beispielsweise im 2. Versuch, im Vergleich zu *E.coli* pASK-IBA2 LV oder auch YadAwt konstant um ca. zwei Größenordnungen niedriger, obwohl der Stamm mit der Expression der G389H Mutation ein YadA exprimiert, welches *in vitro* in nur sehr geringen Mengen an die bakterielle Oberfläche gelang (Grosskinsky et al., 2007), im Gegenteil zu den beiden Stämmen, die entweder kein YadA oder strukturell intaktes YadA exprimierten. Die Expression von G386H mutiertem YadA sollte nach unserer Hypothese stärkeren Stress für das Bakterium bedeuten, als die Expression von YadA vom Wildtyp oder das Fehlen von YadA. Zumindest theoretisch bedeutet dies eine deutlich geringere Aktivierung der ECF-Signaltransduktionskaskade in letzteren beiden Stämmen, welches sich in einer im Vergleich zu den Stämmen mit mutierten *yadA* Sequenzen in einem geringeren Anstieg der Transkriptionssteigerung von *degP* nach Induktion durch AHTC widerspiegeln sollte.

Wie ist dies zu erklären? Rauter et al. suchten sich das Gen *degP* aus, da es ein großes Induktionsratio, ca. 100fach, nach Hitzeschock hatte (Gill et al., 2000; Rauters et al., 2003). Sie fanden eine höchste DegP-RNA Expression nach 40 min, mit einer Steigerung um das 110fache. Des Weiteren konnten sie eine *degP*-Expression durch Co-Stimulation durch UV-Licht oder 4% Ethanol ausschließen, Nährstoffmangel steigerte aber die *degP*-Expression (Rauter et al., 2002). Ist die *degP*-Expression also wirklich so stabil? Sie isolierten die bakterielle mRNA mit dem gleichen Kit wie wir verwendeten, die real time PCR und die reverse Transkription wurden jedoch nach einem One-Step Protokoll im Light-Cycler durchgeführt. Des Weiteren setzten sie *E. coli* zur Stressinduktion einem Hitzeschock aus und induzierten nicht die Expression mutierter äußerer Membranproteine. Die *degP*-Expression unterlag in unseren Versuchen starken, eher erratischen Schwankungen, mit einem z. T. hohen Grundniveau an *degP*-cDNA. Darüber hinaus musste das RNA-Extraktionsprotokoll deutlich verkürzt werden, da offensichtlich die *degP*-mRNA in sämtlichen *E. coli* BL21 Stämmen eine sehr kurze Halbwertszeit hat.

Grundsätzlich ist mRNA sehr instabil (Bernstein et al., 2002) und unsere Schwankungen in der *degP*-Expression durch diese Instabilität erklärt werden. Des Weiteren trifft die Instabilität des Transkriptoms nicht auf alle mRNAs in gleicher Weise zu, da manche mRNA schneller abgebaut wird als andere (Selinger et al., 2003). In der konventionellen PCR-Kontrolle der cDNA wurde auch eine größere Stabilität der *yadA*-mRNA im Vergleich zur *degP*-RNA festgestellt. Dies ist dadurch erklärbar, dass die bakterielle mRNA der Proteine, die für eine schnelle Anpassung an das äußere Milieu notwendig sind, eine kürzere Halbwertszeit besitzen um dem Organismus eine schnellere Adaptation an Schwankungen zu ermöglichen. Selinger et al. fanden heraus, dass unter der mRNA mit einer Halbwertszeit unter 5 min, mögliche bakterielle Enzyme überrepräsentiert waren (Selinger et al., 2003). Daher überrascht es nicht, wenn *degP*-mRNA im Vergleich zur *yadA*-mRNA deutlich schneller abgebaut wird. Und es ist wichtig sich zu vergegenwärtigen, dass die RNA-Messung trotzdem nur eine Momentaufnahme der Homöostase der mRNA Transkription ist, dessen Gleichgewicht durch Synthese und Abbau bestimmt wird.

Unsere Ergebnisse können dann durch die Hypothese einer hohen base-line Transkriptionsrate von *degP* mit einer sehr kurzen Halbwertszeit der *degP*-mRNA in den *E.coli* BL21 Stämmen erklärt werden. Ein Anstieg der Transkriptionsrate von *degP* durch die Expression von sich im Periplasma akkumulierenden äußeren Membranproteinen wäre dann auch nicht einfach erfassbar.

Damit kann man auch unsere Ergebnisse der Immunoblots auf DegP erklären, da eine hohe base-line Transkriptionsrate von DegP-mRNA mit einer hohen Grundmenge an DegP im Periplasma vereinbar ist. Die Unterschiede in der Menge an DegP sind dann nicht durch eine Analyse nach Western-Blot erfassbar, da sich das Protein im Überschuss befindet. Ein stress response kann auch vorrangig über die Regulation der Expression anderer periplasmatischer Enzyme, wie z.B. SurA oder Skp erfolgen. Des Weiteren passen sich Bakterien an veränderte metabolische oder ökologische Bedingungen nur zum Teil über die Regulation der mRNA Transkription an (Schulze & Downward, 2001). Die Abbaugeschwindigkeit prokaryotischer

mRNA ist auch bei weitem nicht konstant und kann durch eine Reihe von Umständen beeinflusst werden (Carrier & Keasling, 1997). Neben der Sekundärstruktur der mRNA wie z.B. 3' Hairpins (Braun et al., 1996), 5' Hairpins (Boot et al., 1996) oder der allgemeinen Translationsgeschwindigkeit (Carrier & Keasling, 1997), sowie der allgemeinen Transkriptionsgeschwindigkeit (Chevrier-Miller et al., 1990) spielen auch bakterielle Wachstumsbedingungen, wie die Bedingungen der Bakterienkultur (Albertson & Nystrom, 1994) und die Expressionsgeschwindigkeit bakterieller Proteine (Dong et al., 1995) eine wichtige Rolle, da eine geringe Wachstumsrate, sowie eine Protein-Überexpression die mRNA-Stabilität negativ beeinflussen. Postranslationale Modifizierung von Enzymen (Wandinger et al., 2008) und Bindung von sRNA an mRNA (Massé et al., 2003; Vogel & Pappenfort, 2006) spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Bindung von sRNA an mRNA reguliert auch die Transkription von *rpoS*, das in der ECF σ -Signaltransduktionskaskade eine wichtige Rolle spielt (Hengge-Aronis, 2002). Auch die Organisation der 5'-untranslated regions, 5'UTRs genannt (Brantl, 2004; Coppins et al., 2007), ist ein wichtiger Regulationsmechanismus prokaryotischer Organismen. Damit kann auch nicht alleine von der erhöhten Menge an Transkriptionsprodukten eines Gens auf die endgültige, biologisch aktive Menge eines bakteriellen Proteins geschlossen werden. Die Ergebnisse sowie die Literatur lassen daher eine hohe Grundmenge an DegP im Periplasma vermuten, die sich nur geringfügig durch die Akkumulation von mutiertem YadA erhöht. Beweisen aber können die Ergebnisse es nicht.

Um Ansatzpunkte zur Veränderung der periplasmatischen Enzymexpression in *E.coli* BL21 nach Stressinduktion zu finden, könnten DIGE-Analysen, oder differential two-dimensional gel electrophoresis zu verschiedenen Zeitpunkten der Induktion der YadA-Expression durchgeführt werden, um einen Vergleich des kompletten Proteoms des Periplasmas zu zwei verschiedenen Zeitpunkten zu ermöglichen (Riederer, 2008). Dabei würde nicht nur DegP, sondern auch sämtliche weiteren Proteasen und Chaperone des Periplasmas erfasst werden, was eine genauere Erfassung der bakteriellen Antwort auf Akkumulation von äußeren Membranproteinen im Periplasma ermöglichen würde. Daraufhin

könnten die Mengen dieser Enzyme gezielt mit quantitativen Methoden wie z.B. ELISA bestimmt werden.

Ziel dieser Arbeit war ein größeres Verständnis der Interaktion zwischen periplasmatischen stress-response Enzymen wie DegP und äußeren Membranproteinen pathogener Keime, die zu einem größeren Verständnis möglicher Angriffspunkte für antibakterielle Substanzen führen sollen.

Die Erforschung des Enzyms DegP öffnet viele klinische Perspektiven, vor allem im Bereich der Infektiologie und der Onkologie. So waren DegP-defiziente Stämme von *Salmonella typhi* als lebendige, in ihrer Pathogenität attenuierten Vakzine in Entwicklung (Tacket et al., 2007). Des Weiteren könnte DegP ein möglicher Angriffspunkt der Tumorthherapie werden, da humane Varianten von DegP womöglich als Tumorsuppressoren fungieren, da humanes HtrA1 und HtrA3 in Endometrium-Carcinom mit zunehmenden Schweregrad der Erkrankung herabreguliert werden (Bowden et al., 2006). Auch im malignen Melanom ist HtrA1 mit zunehmender Progression der Erkrankung herabreguliert und kann im umgekehrten Fall das Wachstum von Metastasen unterdrücken (Baldi et al., 2002).

5 Zusammenfassung

Das klinische Bild einer manifesten Infektion mit dem humanpathogenen, Gram-negativen Stäbchenbakterium *Yersinia enterocolitica* ist sehr vielfältig und reicht von einer selbstlimitierenden Gastroenteritis bis hin zu einer schweren Sepsis. Ein Pathogenitätsfaktor dieses Bakteriums ist das äußere Membranprotein YadA, ein trimere Autotransporter. Das Enzym DegP, welches in der periplasmatischen Stressantwort von *E. coli* eine doppelte Funktion als Chaperon und Protease wahrnimmt, ist auch an der Antwort auf den durch die Expression mutierter YadA Moleküle verursachten Stress beteiligt.

Die Untersuchung des Einflusses dieses von YadA verursachten Stresses auf die Expression von DegP ist Gegenstand der Dissertation.

Hierzu wurden mittels Western-Blot mögliche Unterschiede der Proteinexpression von DegP sowohl vor und nach Expression von YadA als auch von verschiedenen Bakterienstämmen, die unterschiedliche YadA Proteine exprimierten, untersucht. Erkennbare Unterschiede waren nicht feststellbar, die basale Expression von DegP war im Vergleich stets hoch.

Zur Untersuchung der DegP mRNA-Produktion wurde die mRNA von DegP als auch von YadA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Bei Versuchen, die Produkte mittels konventioneller PCR nachzuweisen, wurde ein sehr schneller Abbau der DegP-mRNA festgestellt, so dass das Isolationsprotokoll optimiert werden musste.

Im semiquantitativen Vergleich der Transkriptionsrate mittels RT-PCR konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von DegP in Abhängigkeit von der Expression punktmutierter Varianten von YadA festgestellt werden. Zusammengefasst konnten wir hier zeigen, dass eine hohe basale Expression der DegP-mRNA mit schnellem Abbau vorliegt, sowie eine hohe basale Expression des DegP-Enzyms, die nicht wesentlich durch eine Akkumulation äußerer Membranproteine wie YadA im Periplasma gesteigert wird.

6 Literaturverzeichnis

1. **Ackermann, N., Tiller, M., Anding, G., Roggenkamp, A., Heesemann, J.** 2008. Contribution of Trimeric Autotransporter C-Terminal Domains of Oligomeric Coiled-Coil Adhesin (Oca) Family Members YadA, UspA1, EibA, and Hia to Translocation of the YadA Passenger Domain and Virulence of *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. **190**: 5031-5043
2. **Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M., Gross, C.A.** 1999. The *Escherichia coli* σ^E -dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. Genes Dev. **13**:2449–2461.
3. **Albertson, N.H., Nyström, T.** 1994 Effects of starvation for exogenous carbon on functional mRNA stability and rate of peptide chain elongation in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **117**:181–187.
4. **Aleksic, S., Steigerwalt, A.G., Bockemühl, J., Huntley-Carter, G.P., Brenner, D.J.** 1987. *Yersinia rohdei* sp. nov. isolated from Human and Dog Feces and Surface Water. Int J Syst Bacteriol **37**(4): 327-332.
5. **Appelbaum, J.S., Wilding, G., Morse, L.J.** 1983. *Yersinia enterocolitica* endocarditis. Arch Intern Med. **143**(11):2150–2151.
6. **Autenrieth, I.B. & Firsching, R.** 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. J Med Microbiol **44**: 285-294.
7. **Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricalà, C., Amantea, A., Noonan, DM., Albini, A., Natali, PG., Lombardi, D., Paggi, MG.** (2002) The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. Oncogene 21:6684-6688
8. **Balligand, G., Laroche, Y., Cornelis, G.** 1985. Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. Infect. Immun. **48**(3): 782-786.
9. **Barz, C., Abahji, T.N., Trülzsch K, Heesemann J.** 2000. The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. FEBS Letters **482**(1-2): 139-143.

10. **Beeching, N.J., Hart, H.H., Synek, B.J., Bremner, D.A.** 1985 A patient with hemosiderosis and multiple liver abscesses due to *Yersinia enterocolitica*. Pathology **17**: 530
11. **Bercovier, H., Ursing, J., Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Carter, G.P., Mollaret, H.H.** 1980. *Yersinia kristensenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of sucrose-negative strains (formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol. **4**, 219-224.
12. **Bercovier, H., Steigerwalt, A.G., Guiyoule, A., Huntley-Carter, G., Brenner, D.J.** 1984. *Yersinia aldovae* (Formerly *Yersinia enterocolitica*-Like Group X2): a New Species of *Enterobacteriaceae* Isolated from Aquatic Ecosystems." Int J Syst Bacteriol **34**(2): 166-172.
13. **Bercovier & Molleret,** 1984, Bergey's Manual of Sytematic Bacteriology
14. **Bernstein HD.** Are bacterial "autotransporters" really transporters? 2007. Trends in Microbiology. **15**(10): 441-447
15. **Bernstein, J. A., A. B. Khodursky, P. H. Lin, S. Lin-Chao, and S. N. Cohen.** 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **99**:9697-9702.
16. **Bliska, J., Black, D.** 1995. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. Infect. Immun. **63**(2): 681-685.
17. **Black, D. S., Bliska, J.B.** 1997. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. EMBO J. **16**:2730-2744.
18. **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.
19. **Bliska, J.B., Copass, M.C., Falkow, S,** 1993. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. Infect Immun. **61**(9):3914–3921
20. **Boland, A., Cornelis G.R.** 1998. Role of YopP in Suppression of Tumor Necrosis Factor Alpha Release by Macrophages during *Yersinia* Infection. Infect. Immun. **66**(5): 1878-1884.

21. **Boot, H.J., Pouwels, H.P.** 1996. Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. Molecular Microbiology **21**(6): 1117-1123.
22. **Bottonne, E.J.** 1977. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic organism. Crit. Rev. Microbiol. **5**:211–241.
23. **Bottonne, E.J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin.Microbiol.Rev. **10**:257-276.
24. **Bottonne, E.J.** 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microbes and Infection **1**(4): 323-333.
25. **Bouza, E., Dominguez, M., Buzon, L., Boixeoda, D., Revillo, M.J., de Rafael, L., Martinez-Beltran, J.** 2006. *Yersinia enterocolitica* septicemia. Am J Clin Pathol **74**:404–409, 1980
26. **Bowden, M. A., Di Nezza-Cossens, L.A., Jobling, T., Salamonsen, L.A., Nie, G.** 2006. Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer. Gynecologic Oncology **103**(1): 253-260.
27. **Brantl, S.** 2004. Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. Trends in Microbiology **12**(11): 473-475.
28. **Braun, F., Hajnsdorf, E., Regnier, P.** 1996. Polynucleotide phosphorylase is required for the rapid degradation of the RNase E processed *rpsO* mRNA of *Escherichia coli* devoid of its 3' hairpin, Mol. Microbiol. **19** (1996), pp. 997–1005.
29. **Brenner, D.J., Bercovier, H., Ursing, J., Alonso, J.M., Steigerwalt A.G., Fanning, G.R., Carter, G.P., Mollaret, H.H.**1980. *Yersinia intermedia*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains (formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol. **4**, 207-212.
30. **Bukholm, G., Kapperud, G., Skurnik, M.** 1990. Genetic evidence that the *yopA* gene-encoded *Yersinia* outer membrane protein Yop1 mediates inhibition of the anti-invasive effect of interferon. Infect. Immun. **58**, 2245–2251.
31. **Butler, T.** 1979. *Yersinia* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Douglas RG (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases. pp 1797–1800
32. **Butler, T.** 1994. *Yersinia* infections: centennial of the discovery of the plague bacillus. Clinical Infectious Diseases **19**:655–663

33. **Butler, T., Dennis, D.T.** 2005. *Yersinia species*, including plague. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed., vol. 2.:2691-2701
34. **Capron, J.P., Capron-Chivrac, D., Tossou, H., Delamarre, J., Eb, F.** 1984. Spontaneous *Yersinia enterocolitica* peritonitis in idiopathic hemochromatosis. Gastroenterology **87**(6):1372-5.
35. **Carrier T.A., Keasling J.D.** 1997. Controlling Messenger RNA Stability in Bacteria: Strategies for Engineering Gene Expression. Biotechnology Progress **13**(6): 699-708.
36. **CDC.** 1991. *Yersinia enterocolitica* bacteremia and endotoxin shock associated with red blood cell transfusion. MMWR **40**:176-8.
37. **CDC.** 1997. Red Blood Cell Transfusions Contaminated with *Yersinia enterocolitica* -- United States, 1991-1996, and Initiation of a National Study to Detect Bacteria-Associated Transfusion Reactions. MMWR. **46**(24);553-5
38. **Chevrier-Miller, M., Jacques, M., Raibaud, O., Dreyfus, M.** 1990. Transcription of single-copy hybrid lacZ genes by T7 RNA polymerase in *Escherichia coli*: mRNA synthesis and degradation can be uncoupled from translation. Nucl. Acids Res. **18**(19): 5787-5792.
39. **Cezairliyan, B.O., Sauer, R.T.** 2007. Inhibition of regulated proteolysis by RseB. Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(10): 3771-3776.
40. **Chaba, R., Grigorova, I.L., Flynn, J.M., Baker, T.A., Gross, C.A.** 2007. Design principles of the proteolytic cascade governing the sigmaE-mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. Genes & Development **21**(1): 124-136.
41. **China, B., Sory, M.P., N'Guyen BT, De Bruyere M, Cornelis GR.** (1993). Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. Infect. Immun. **61**(8): 3129-3136.
42. **Chiu, H.Y., Flynn, D.M., Hoffbrand, A.V., Politis, D.** 1986. Infection with *Yersinia enterocolitica* in patients with iron overload. Br Med J (Clin Res Ed). **292**(6513):97.
43. **Coppins, R.L., Hall, K.B., Groisman, E.A.** 2007. The intricate world of riboswitches. Curr Opin Microbiol. **10**:176–181.
44. **Cornelis, G.R., Abraham, E.P.** 1975. Beta-lactamases from *Yersinia enterocolitica*. J Gen Microbiol. **87**(2):273–284.

45. **Cornelis G.R.** 1994. *Yersinia* pathogenicity factors. **Curr Top Microbiol Immunol** **192**: 243-263.
46. **Cornelis, G. R., Boland A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P., Stainier, I.** 1998. The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**(4): 1315-1352.
47. **Cotter, S. E., Surana, N. K., St Geme, J.W. 3rd.** 2005. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. Trends in Microbiology **13**(5):199-205.
48. **Danese, P.N., Silhavy, T.J.** 1998 CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. J Bacteriol.**180**:831–839.
49. **Dautin, N., Bernstein, H.D.** 2007. Protein Secretion in Gram-Negative Bacteria via the Autotransporter Pathway. Annual Review of Microbiology **61**(1): 89-112.
50. **De Las Penas, A., Connolly, L., Gross, C.A.** 1997. The σ^E -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ^E . Mol Microbiol. **24**:373–385.
51. **Denecker, G., Declercq, W., Geuijen, C.A., Boland, A., Benabdillah, R., van Gorp, M., Sory, MP., Vandenabeele, P., Cornelis, G.R.** 2001. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced Apoptosis of Macrophages Involves the Apoptotic Signaling Cascade Upstream of Bid. J. Biol. Chem. **276**(23):19706-19714.
52. **de Cock, H., Tommassen, J.** 1996. Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *E. coli*. EMBO J. **15**:5567–5573.
53. **De Wulf, P., Kwon, O., Lin, E.C.** (1999). The CpxRA Signal Transduction System of *Escherichia coli*: Growth-Related Autoactivation and Control of Unanticipated Target Operons. J. Bacteriol. **181**(21): 6772-6778.
54. **De Wulf, P., Lin, E.C.** 2000. Cpx Two-Component Signal Transduction in *Escherichia coli*: Excessive CpxR-P Levels Underlie CpxA* Phenotypes. J. Bacteriol. **182**(5):1423-1426
55. **DiGiuseppe, P.A., Silhavy, T.J.** 2003. Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System. J. Bacteriol. **185**(8): 2432-2440.

56. **Dong, H., Nilsson, L., Kurland, C.** 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. J. Bacteriol. 1995, **177**, 1497-1504.
57. **Duguay, A.R., Silhavy, T.J.** 2004. Quality control in the bacterial periplasm. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1694**(1-3): 121-134.
58. **El Tahir, Y., Kuusela, P., Skurnik, M.** (2000) Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification of eight NSVAIG--S motifs on the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. Mol. Microbiol. **37**: 192–206
59. **El Tahir, Y., Skurnik, M.** 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. International Journal of Medical Microbiology **291**(3): 209-218.
60. **Emödy, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skurnik, M., Kapperud, G., O'Toole, P., Wadström, T.** 1989. Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for *yopA*-mediated and chromosomally encoded mechanisms. J. Bacteriol. **171**: 6674–6679
61. **Erickson, J. W., Vaughn, V., Walter, W.A., Neidhardt, F.C., Gross, C.A.** 1987. Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. Genes & Development **1**(5): 419-432
62. **Ewing, W.H., Ross, A.J., Brenner, D.J., Fanning, G.R.** 1978. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology. **28**:37-44.
63. **Flügel, A., Schulze-Koops, H., Heesemann, J., Kuhn, K., Sorokin, L., Burkhardt, H., von der Mark, K., Emmrich, F.** 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
64. **Flynn, J. M., Levchenko, I., Sauer, R.T., Baker, T.A.** 2004. Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. Genes & Development **18**(18):2292-2301.
65. **Gallagher, S., Chakavarti, D.** 2008. Immunoblot Analasis. J Vis Exp. **20**(16): 759.
66. **Gallant, T., Freedman, M., Vellend, H., Francombe, W.H.,** 1986. *Yersinia* sepsis in patients with iron overload treated with deferoxamine. N Engl J Med **314**(25): 1643-.

67. **Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A., Wolf-Watz, H.** 1993. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. Nature **361**(6414): 730-732.
68. **Gemski, P., Lazere, J.R., Casey, T.** 1980. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. **27**(2): 682-685.
69. **Gill, R.T., Valdes J.J., Bentley, W.E.** 2000. A Comparative Study of Global Stress Gene Regulation in Response to Overexpression of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. Metabolic Engineering **2**(3):178-189.
70. **Gray, L.D.** 1995 *Escherichia, Salmonella, Shigella, and Yersinia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of clinical microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology, 450-6.
71. **Gripenberg-Lerche, C., Skurnik, M., Zhang, L. J., Söderström, K. O., Toivanen, P.** 1994. Role of YadA in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: Experimental studies with rats. Infect. Immun. **62**:5568–5575
72. **Gripenberg-Lerche, C., Skurnik, M., Toivanen, P.** 1995. Role ofYadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: Experimental studies with rats. Infect. Immun. **63**:3222–3226
73. **Grosskinsky, U., Schütz, M., Fritz M, Schmid Y, Lamparter MC, Szczesny P, Lupas AN, Autenrieth IB, Linke D.** 2007. A Conserved Glycine Residue of Trimeric Autotransporter Domains Plays a Key Role in *Yersinia* Adhesin A Autotransport. J. Bacteriol. **189**(24): 9011-9019.
74. **Guan, K.L., Dixon, J.E.** 1990. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. Science. **249**(4968):553–556.
75. **Hasselblatt, H., Kurzbauer, R., Wilken, C., Krojer, T., Sawa, J., Kurt, J., Kirk, R., Hasenbein, S., Ehrmann, M., Clausen, T.** 2007. Regulation of the sigmaE stress response by DegS: how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress. Genes & Development **21**(20):2659-2670.
76. **Heesemann, J., Gross, U., Grüter, L.** 1987. Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*. Contrib Microbiol Immunol. **9**:312–316.

77. **Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Nataro, J.P.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. Trends in Microbiology **6**(9):370-378.
78. **Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the sigmaS RpoS Subunit of RNA Polymerase. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66**(3):373-395.
79. **Hewstone, A.S., Davidson, G.P.** 1972. *Yersinia enterocolitica* septicaemia with arthritis in a thalassaemic child. Medical Journal of Australia **1**, 1035–1038.
80. **Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., Heesemann, J.** 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. EMBO J. **19**:5989–5999.
81. **Huber, D., Bukau, B.** (2008). DegP: a Protein "Death Star". Structure. **16**(7):989-990.
82. **Huston, W., Theodoropoulos, C., Mathews, S.A., Timms, P.** 2008. *Chlamydia trachomatis* responds to heat shock, penicillin induced persistence, and IFN-gamma persistence by altering levels of the extracytoplasmic stress response protease HtrA. BMC Microbiology **8**(1):190.
83. **Iriarte, M., Cornelis, G.R.** 1998. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. Molecular Microbiology **29**(3): 915-929.
84. **Juris, S.J., Rudolph, A.E., Huddler, D., Orth, K., Dixon, J.E.** 2000. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: Actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(17):9431-9436.
85. **Kanehara, K., Ito, K., and Akiyama, Y.** 2002. YaeL (EcfE) activates the σ^E pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti- σ^E , RseA Genes Dev. **16**:2147-2155
86. **Kapperud, G., Lassen, J.** 1983. Relationship of virulence-associated autoagglutination to hemagglutinin production in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria. Infect. Immun. **42**(1):163-169.
87. **Kappemud, G., Skarpeid, H.-J., Solberg, R., Bergan, T.** 1985. Outer membrane proteins and plasmids in different *Yersinia enterocolitica* serogroups isolated from man and animals. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B **93**:27-35.

88. **Kim, D.J., Kim, K.K.** 2005. Structure and Function of HtrA Family of Proteins, the Key Players in Protein Quality Control. J Biochem Mol Biol. **38(3):**266-74
89. **Kim, D.Y., Jin K.S., Kwon. E., Ree, M., Kim, K.K.** 2007. Crystal structure of RseB and a model of its binding mode to RseA. Proceedings of the National Academy of Sciences **104(21):**8779-8784.
90. **Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A.M., Skurnik, M., Meri, S.** 2008. *Yersinia enterocolitica* Serum Resistance Proteins YadA and Ail Bind the Complement Regulator C4b-Binding Protein. PLoS Pathog **4(8):**e1000140.
91. **Knowles, T.J., Scott-Tucker, A., Overduin, M., Henderson, I.R.,** 2009, Membrane protein architects: the role of BAM complex in outer membrane protein assembly. Nature Reviews Microbiology **7(3):** 206-214.
92. **Koornhof, H.J., Smego R.A. Jr., Nicol, M.** 1999. Yersiniosis II: The Pathogenesis of *Yersinia* Infections. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **18(2):**87-112.
93. **Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M., Clausen, T.** 2002. Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. Nature **416(6879):**455-459.
94. **Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H.R., Ehrmann, M., Clausen, T.** 2008. Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. Nature **453(7197):**885-890.
95. **Kuehnert MJ, Jarvis WR, Schaffer DA, Chaffin DJ.** 1997. Platelet transfusion reaction due to *Yersinia enterocolitica* JAMA. **278:**550.
96. **Lachica, R.V., Zink, D.L.** 1984. Plasmid-associated cell surface charge and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. **44(2):** 540-543.
97. **Lachica, R.V., Zink D.L., Ferris, W.R.** 1984. Association of fibril structure formation with cell surface properties of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. **46(1):**272-275.
98. **Lambert de Rouvroit, C.S., Cornelis, G.R.** 1992. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. Molecular Microbiology **6(3):**395-409.

99. **Lämmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**(5259):680-5.
100. **Laskowska, E., Kuczyńska-Wiśnik, D., Skórko-Glonek, J., Taylor, A.** 1996. Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro. Molecular Microbiology **22**(3):555-571.
101. **Leung, K.Y., Straley, S.C.** 1989. The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. J. Bacteriol. **171**(9): 4623-4632.
102. **Leung, K.Y., Reisner, B.S., Straley, S.C.** (1990). YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. Infect. Immun. **58**(10): 3262-3271.
103. **Levchenko, I., Grant, R.A., Flynn, J.M., Sauer, R.T., Baker, T.A.** 2005. Versatile modes of peptide recognition by the AAA plus adaptor protein SspB. Nature Structural & Molecular Biology **12**(6):520-525.
104. **Lipinska, B., Sharma, S., Georgopoulos, C.** 1988. Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a sigma³²-independent mechanism of heat-inducible transcription. Nucl. Acids Res. **16**(21):10053-10067.
105. **Lipinska, B., Fayet, O., Baird L, Georgopoulos C.** 1989. Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* htrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. J. Bacteriol. **171**(3): 1574-1584.
106. **Lipinska, B., Zylicz, M., Georgopoulos, C.** 1990. The HtrA (DegP) Protein, Essential for *Escherichia coli* Survival at High Temperatures, Is an Endopeptidase. J. Bacteriol. **172**(4):1791-1797
107. **Loosmore, S.M., Yang, Y.P., Coleman D.C., Shortreed, J.M., England, D.M., Klein, M.H.** 1997. Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease. Infect. Immun. **65**(9):3701-3707.
108. **Mantle, M., Basaraba, L., Peacock, S.C., Gall, D.G.** 1989. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. Infect. Immun. **57**(11):3292-3299.
109. **Massé, E., Majdalani, N., Gottesmann, S.** 2003. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. Current Opinion in Microbiology **6**(2):120-124.

110. **Mileykovskaya, E., Dowhan W.** 1997. The Cpx two-component signal transduction pathway is activated in *Escherichia coli* mutant strains lacking phosphatidylethanolamine. J. Bacteriol. **179**(4):1029-1034.
111. **Nakajima, R., Motin, V., Brubaker, R.R.** 1995. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. Infect. Immun. **63**(8):3021-3029.
112. **Oomen CJ, Van Ulsen P, Van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P.** 2004. Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. Embo J. **23**(6):1257-1266.
113. **Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M.B., Bao, Z.Q., Palmer, L.E., Bliska, J.B., Mangel, W.F., Staskawicz, B., Dixon, J.E.** 2000. Disruption of Signaling by *Yersinia* Effector YopJ, a Ubiquitin-Like Protein Protease. Science **290**(5496):1594-1597.
114. **Paerregaard, A., Espersen, F., Jensen, O.M., Skurnik, M.** 1991. Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. Infect. Immun. **59**:253-260.
115. **Paerregaard, A., Espersen, F., Skurnik, M.** 1991. Role of *Yersinia* outer membrane protein YadA in adhesion to rabbit intestinal tissue and rabbit intestinal brush border membrane vesicles. APMIS **99**:226-232.
116. **Pallen, M.J., Wren, B.W.** 1997. The HtrA family of serine proteases. Molecular Microbiology **26**:209-221.
117. **Pepe, J.C., Wachtel, M.R., Wagar, E., Miller, V.L.** 1995. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. Infect. Immun. **63**(12):4837-4848.
118. **Peterson, J.H., Szabady, R.L., Bernstein, H.D.** 2006. An Unusual Signal Peptide Extension Inhibits the Binding of Bacterial Presecretory Proteins to the Signal Recognition Particle, Trigger Factor, and the SecYEG Complex. J. Biol. Chem. **281**(14):9038-9048.
119. **Pfeiffer, A.** 1889. Über die bacilläre Pseudotuberkulose bei Nagethieren. Verlag von George Thieme pp. 1-42
120. **Pilz, D., Vocke, T., Heesemann, J., Brade, V.** 1992. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. Infect. Immun. **60**(1):189-195.

121. **Piroth, L., Meyer, P., Bielefeld, P., Besancenot, J.F.** 1997. *Yersinia* bacteremia and iron overload. Revue de Médecine Interne, La **18**(12):932-938.
122. **Pogliano, J., Lynch, A.S., Belin, D., Lin, E.C., Beckwith, J.** 1997. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. Genes & Development **11**(9):1169-1182.
123. **Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., Meyer, T.F.** 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Nature **325**(6103):458-462.
124. **Portnoy, D.A., Falkow, S.** 1981. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. **148**(3):877-883.
125. **Portnoy, D.A., Moseley S.L., Falkow, S.** 1981. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. Infect. Immun. **31**(2):775-782.
126. **Raivio, T.L., Silhavy, T.J.** 1997. Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two- component system. J. Bacteriol. **179**(24):7724-7733.
127. **Raivio, T.L., Popkin, D.L., Silhavy, T.J.** 1999. The Cpx Envelope Stress Response Is Controlled by Amplification and Feedback Inhibition. J. Bacteriol. **181**(17):5263-5272.
128. **Raivio, T.L., Silhavy T.J.** 1999. The sigmaE and Cpx regulatory pathways: Overlapping but distinct envelope stress responses. Current Opinion in Microbiology **2**(2):159-165.
129. **Raivio, T.L., Silhavy, T.J.** 2001. Periplasmic stress and ECF-sigma factors. Annual Review of Microbiology **55**(1):591.
130. **Rauter, H., Overeijnder, M., Doornbosch, D., Schalkhammer, T.** 2003. DegP and related genes as stress-markers for *E.coli*-viability-ultra-sensitive RT- Realtime PCR-Chemical Monthly **11**:1489-1498
131. **Rawlings, N.D., Barret, A.J.** 1994. Families of serine peptidases. Methods Enzymol. **244**:19-61
132. **Rhodus, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., Gross, C.A.** 2006. Conserved and Variable Functions of the sigmaE Stress Response in Related Genomes. PLoS Biology **4**(1): e2.
133. **Riederer, B.M.** 2008. Non-covalent and covalent protein labeling in two-dimensional gel electrophoresis J. Proteomics **71**(2):231-44.

134. **Roggenkamp, A., Neuberger, H.R., Flügel, A., Schmoll, T., Heesemann, J.** 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. Molecular Microbiology **16**(6):1207-1219.
135. **Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R., Heesemann, J.** 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**(7):2506-2514.
136. **Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C.A., Truelzsch, K., Hoffmann, H., Heesemann, J.** 2003. Molecular Analysis of Transport and Oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* Adhesin YadA. J. Bacteriol. **185**(13):3735-3744.
137. **Rosqvist, R., Forsberg, A., Wolf-Watz, H.** 1991. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. Infect. Immun. **59**(12): 4562-4569.
138. **Rouviere, P.E., De Las Penas, A., Meccas, J., Lu, C.Z., Rudd, K.E.** 1995. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, σ^E , in *Escherichia coli*. Embo J. **14**:1032–1042.
139. **Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J., Roberts, M.** 2006. Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. Nat Rev Micro **4**(5):383-394.
140. **Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S., Heesemann, J.** 1996. "Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils." Infect. Immun. **64**(3):724-733.
141. **Saras, J., Heldin, C.H.,** 1996. PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. Trends in Biochemical Sciences **21**(12):455-458.
142. **Schindler, M., Schütz, M.** 2009. Unpubliziert.
143. **Schmid, Y., Grassl, G.A., Bühler, O.T., Skurnik, M., Autenrieth, I.B., Bohn, E.** 2004. *Yersinia enterocolitica* Adhesin A Induces Production of Interleukin-8 in Epithelial Cells. Infect. Immun. **72**(12):6780-6789.
144. **Schleifstein, J.I., Coleman, M.B.** 1939. An unidentified microorganism resembling *B. ligniere* and *Past. Pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *New York State Journal of Medicine*, 1939, **39**:1749-1753.

145. **Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., Kirsch, T., Swoboda, B, Bull, C., Goodman, S., Emmrich, F.** 1993. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. Infect. Immun. **61**(6):2513-2519.
146. **Schulze, A., Downward, J.** 2001. Navigating gene expression using microarrays — a technology review. Nature Cell Biology **3**(8):E190-95
147. **Sebes, J.I., Mabry, E.H .Jr., Rabinowitz, J.G.** 1976. Lung abscess and osteomyelitis of the rib due to *Yersinia enterocolitica*. Chest **69**(4): 546-8
148. **Selinger, D.W., Saxena, R.M., Cheung, K.J., Church, G.M., Rosenow, C.** 2003. Global RNA Half-Life Analysis in *Escherichia coli* Reveals Positional Patterns of Transcript Degradation. Genome Research **13**(2):216-223.
149. **Sijbrandi, R., Urbanus, M.L., ten Hagen-Jongman, C.M., Bernstein, H.D., Oudega, B., Otto, B.R., Luirink, J.** 2003. Signal Recognition Particle (SRP)-mediated Targeting and Sec-dependent Translocation of an Extracellular *Escherichia coli* Protein. J. Biol. Chem. **278**(7):4654-4659.
150. **Sing, A., Rost, D., Tvardovskaia, N., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Kirschning, C.J., Aepfelbacher, M., Heesemann, J.** 2002. *Yersinia* V-Antigen Exploits Toll-like Receptor 2 and CD14 for Interleukin 10-mediated Immunosuppression. J. Exp. Med. **196**(8):1017-1024.
151. **Skrzypek, E., Cowen, C., Straley, S.C.** 1998. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. Molecular Microbiology **30**(5):1051-1065.
152. **Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D., Silhavy, T.J.** 2007. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. Genes Dev. **21**:2473–2484.
153. **Skorko-Glonek, J., Krzewski, K., Lipinska, B., Bertoli, E., Tanfani, F.** 1995. Comparison of the structure of wild-type HtrA heat shock protease and mutant HtrA proteins. A Fourier transform infrared spectroscopic study. J Biol Chem. **270**:11140–11146
154. **Skorko-Glonek, J., Sobiecka-Szkatula, A., Lipinska, B.** 2006. Characterization of disulfide exchange between DsbA and HtrA proteins from *Escherichia coli*. Acta Biochim Pol. **53**:585–589.

155. **Skorko-Glonek, J., Sobiecka-Szkatula, A., Narkiewicz, J., Lipinska, B.** 2008. The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures. Microbiology **154**(12):3649-3658.
156. **Skurnik, M., Bolin, I., Heikkinen, H., Piha, S., Wolf-Watz, H.** 1984. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia spp.* J. Bacteriol. **158**:1033-1036.
157. **Skurnik, M.** 1985. Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. Infect. Immun. **47**:183-190.
158. **Skurnik, M., Wolf-Watz, H.** 1989. Analysis of the yopA gene encoding the Yopl virulence determinants of *Yersinia spp.* Mol. Microbiol. **3**:517-529.
159. **Skurnik, M., Toivanen, P.** 1992. LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. J. Bacteriol. **174**(6):2047-2051.
160. **Skurnik, M., el-Tahir, Y., Saarinen, M., Jalkanen, S., Toivanen, P.** 1994. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. Infect. Immun. **62**(4):1252-1261.
161. **Smego, R.A., Fren, J., Koornhof, H.J.** 1999. Yersiniosis I: Microbiological and Clinicoepidemiological Aspects of Plague and Non-Plague *Yersinia* Infections Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **18**(1):1-15
162. **Spiess, C., Beil, A., Ehrmann, M.** 1999. A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell **97**(3):339-347.
163. **Stoddard, J.J., Wechsler, D.S., Nataro, J.P., Casella, J.F.** (1994). *Yersinia enterocolitica* infection in a patient with sickle cell disease after exposure to chitterlings. Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. **16**:153-155.
164. **Strauch, K.L., Johnson, K., Beckwith, J.** 1989. Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. J. Bacteriol. **171**(5):2689-2696.
165. **Sulakvelidze, A.** 2000. *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. Microbes and Infection **2**(5):497-513.
166. **Szabady, R.L., Peterson, J.H., Skillman, K.M., Bernstein, H.D.** 2005. An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a

- bacterial autotransporter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(1):221-226.
167. **Tacket, C.O., Levine, M.M.** 2007. CVD 908, CVD 908-htrA, and CVD 909 Live Oral Typhoid Vaccines: A Logical Progression. Clinical Infectious Diseases **45**(s1):S20-S23.
 168. **Tamm, A., Tarkkanen, A., Korhonen, T., Kuusela, P., Toivanen, P., Skurnik, M.** 1993. Hydrophobic domains affect the collagen binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. Mol. Microbiol. **10**:995-1011
 169. **Tertti, R., Skurnik M., Vartio, T., Kuusela, P.** 1992. Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. Infect. Immun. **60**(7):3021-3024.
 170. **Ursing, J., Brenner, D.J., Bercovier, H., Fanning, G.R., Steigerwalt, A.G., Brault, J., Mollaret, H.H.** 1980. *Yersinia frederiksenii*: a new species of *Enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol. **4**:213-217.
 171. **Van Loghem, J.J.** 1944. The classification of plague-bacillus. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology. **10**:15-16.
 172. **Veiga E, Sugawara E, Nikaido H, de Lorenzo V, Fernandez LA.** 2002. Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. Embo J **21**(9):2122-2131.
 173. **Vogel, J., Papenfort, K.** 2006. Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. Current Opinion in Microbiology **9**(6):605-611.
 174. **Walsh, N.P., Alba, B.M., Bose, B., Gross, C.A., Sauer, R.T.** 2003. OMP Peptide Signals Initiate the Envelope-Stress Response by Activating DegS Protease via Relief of Inhibition Mediated by Its PDZ Domain. Cell **113**(1):61-71.
 175. **Wandinger, S.K., Richter, K., Buchner, J.** 2008. The Hsp90 Chaperone Machinery. J. Biol. Chem. **283**(27):18473-18477.
 176. **Wauters, G., Janssens, M., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J.** 1988. "*Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., Formerly Called *Yersinia enterocolitica* Biogroups 3A and 3B." Int J Syst Bacteriol **38**(4):424- 429
 177. **Welkos, S., Friedlander, A., McDowell, D., Weeks, J., Tobery, S.** 1998. V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. Microbial Pathogenesis **24**(3):185-196.

178. **Wülfing, C., Plückthun, A.** 1994. Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology **12**(5):685-692.
179. **Yang, Y., Isberg, R.R.** 1993. Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis* yadA product. Infect. Immun. **61**(9):3907-3913.
180. **Yao, T., Meccas, J, Healy, J.I., Falkow, S., Chien, Y.** 1999. Suppression of T and B Lymphocyte Activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence Factor, YopH. J. Exp. Med. **190**(9):1343-1350.
181. **Zumbihl, R., Aepfelbacher, M., Andor, A., Jacobi, C.A., Ruckdeschel, K., Rouot, B., Heesemann, J.** 1999. The Cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* Induces Modification and Cellular Redistribution of the Small GTP-binding Protein RhoA. J. Biol. Chem. **274**(41):29289-29293.

7 Abkürzungen

al.	Alumni
bidest.	Zwei mal destilliert
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic acid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
PCR	Polychromasekettenreaktion
p.a.	Per analysi
M	Molar
mM	Milimolar
min	Minuten
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natrium Chlorid
Qty	Quantity
sRNA	Small untranslated ribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
RT-PCR	Reverse transcription real time PCR
sec	Sekunden
TBE	Tris/Borat/EDTA
TPE	Tris/Phosphat/EDTA
<i>Y. enterocolitica</i>	Yersinia enterocolitica
<i>Y. pestis</i>	Yersinia pestis
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Yersinia pseudotuberculosis
<i>Y. spp.</i>	Yersinia specie

8 Danksagung

Frau Dr. Monika Schütz danke ich herzlich für ihre umfangreiche Betreuung und Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft, ihren unerschöpflichen Enthusiasmus sowie die kritische und geduldige Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. I. B. Autenrieth danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Einen ganz besonderen Dank gilt Herrn Dipl. biochem. Martin Köberle für seine fortwährende Unterstützung, seine unermüdliche Geduld, sowie für seine unentbehrlichen Ratschläge zur Durchführung der Versuche und zur Auswertung der Ergebnisse und für das zügige und gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. med. Susanne Berchtold, Frau Dipl. biochem. Ulli Grosskinsky, Herrn Dipl. biol. Magnus Schäfer, Herrn Dipl. biochem. Christian Eberhardt, Frau Gudrun Härer, Frau Birgit Manncke und Frau cand. med. Eva Weiss für ihre Unterstützung in der alltäglichen Laborarbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt der Studienstiftung des deutschen Volkes für ihre großzügige finanzielle Unterstützung meines Studiums, sowie für das Vermitteln von Ehrgeiz und Pflichtbewusstsein.

Ich bedanke mich auch bei meinen Freunden und meinen Bundesbrüdern meiner Alten Turnerschaft Eberhardina-Markomania zu Tübingen für die notwendige Zerstreung in meiner Freizeit, die treuen Freundschaften und die unermüdliche Solidarität.

Ein ganz liebes Dankeschön und eine herzliche Umarmung an meine Eltern und an meine Schwester, ohne deren Beistand ich das Abschließen der Arbeit nicht so zielstrebig verfolgt hätte.

Diese Arbeit widme ich meinen Großeltern, die mir auf Grund ihrer gelebten Werte stets Vorbilder waren, als Dank für Ihre uneingeschränkte Unterstützung.

9 Lebenslauf

Bildungsweg

- 1990-1991: Erste Klasse an der Sonning Common Primary School, GB
- 1991-1993: Einschulung in der European School in Culham, GB
- 1993-1997: European School Uccle I, Brüssel
- 1997-2003: Lycée International de Saint Germain en Laye
- Seit 2003 : Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Abgelegte Prüfungen

- Erlangung der deutschen allgemeinen Hochschulreife und des französischen Baccalauréats mit der Note 1,0 oder „Mention très bien“
- Cambridge Certificate of Proficiency in English, Note A
- Sprachzeugnis der Universidad de Granada, UNIcert level III im Spanischen, Beurteilung „sehr gut“
- 1. Staatsexamen mit 1,5 oder „sehr gut“
- 2. Staatsexamen mit 1,5 oder „sehr gut“ am 23.11.2010
- Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes 2004-2010

Promotion

- 04/2007 – 04/2009: Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Tübingen zum Thema *Einfluss der Expression punktmutierter Varianten des Yersinia Adhäsins A (YadA) auf die Expression der periplasmatischen Chaperon-Protease DegP*, betreut von Frau Dr. Monika Schütz.

Praktika und Berufserfahrung

- Klinische Praktika: - Dreimonatiges Krankenpflegepraktikum in Osorno, Chile und im Universitätsklinikum Tübingen
 - Einmonatige Famulatur in der Allgemeinchirurgie Vivantes-Klinikums Berlin-Friedrichshain
 - Einmonatige Famulatur in der Inneren Medizin in Osorno, Chile
 - Einmonatige Famulatur in der Universitätshautklinik der Universität Tübingen

- Fünfzehntägige Famulatur in der Radiologischen Klinik der Universität Tübingen
 - Fünfzehntägige Famulatur in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Umweltmedizin des Klinikums Schwabing, München
 - Fünfzehntägige Famulatur bei Dr. Frieder Allmendinger, Facharzt für Dermatologie und Allergologie, Esslingen.
 - Halbes Tertial der Inneren Medizin bei Prof. Hendry, Department of Nephrology, King's College, London
 - Halbes Tertial der Inneren Medizin des Praktischen Jahres bei Prof. Dr. Zoller, Katharinenhospital, Stuttgart
 - Tertial der Chirurgie des Praktischen Jahres am Lehrkrankenhaus Hospital Base de Osorno der Universidad Austral de Chile
 - Tertial des Praktischen Jahres an der Hautklinik der Universität Tübingen bei Prof. Dr. Röcken
- Weitere Praktika:
 - Einmonatiges Praktikum bei Royal Numico BV, jetzt Teil der Groupe Danone, in den Bereichen Research & Development sowie Marketing & Vertrieb, in Erlangen und Amsterdam
 - Dreimonatiges Praktikum in der Ethics Unit des Department for Ethics, Trade, Human Rights & Health Law der World Health Organisation in Genf, Schweiz
 - Berufserfahrung:
 - Mitglied der InOne Consult, einer Studentischen Unternehmensberatung und Mitarbeit an Projekten in den Bereichen Gründungsberatung und Marketing
 - Jetzige Position:
 - Assistenzarzt der Universitäts-Hautklinik Tübingen

Weitere Qualifikationen

- Teilnahme am Kurs Einführung in die Betriebswirtschaftslehre, 2009
- Teilnahme an einem Rhetorikseminar, 2009
- Teilnahme an der Managementakademie der Studienstiftung des deutschen Volkes, 2009
- Teilnahme an der Strategy School von The Boston Consulting Group, 2009
- Co-Autor der WHO-Publikation *Research Ethics committees: basic concepts for capacity building*, WHO Press, 2009
- Mitglied des AStA, 2004/2005
- Vorsitzender einer hochschulpolitischen Organisation, 2005/2006