

„Untersuchung der Interaktion von  $\beta$ 1 Integrinen mit  
Adhäsinen von *Yersinia enterocolitica* und deren Bedeutung  
für Adhäsion und Yop-Translokation“

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Mößner, Sara

-2016-

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. E. Bohn

2. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Schindler



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Die Gattung <i>Yersinia</i> – Morphologie, Klassifikation, und Krankheitsbilder .....	1
1.2. Yersiniose am Mausinfektionsmodell .....	2
1.3. Pathogenitätsfaktoren von <i>Ye</i> .....	3
1.3.1. Invasin .....	3
1.3.2. YadA .....	4
1.3.3. Typ III Sekretionssystem .....	5
1.4. $\beta 1$ Integrine und Interaktionspartner .....	7
1.5. Zielsetzungen dieser Arbeit .....	10
2. Material und Methoden .....	12
2.1. Material .....	12
2.1.1. Geräte .....	12
2.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	13
2.1.3. Laborchemikalien .....	14
2.1.4. Antibiotika .....	16
2.1.5. Zelllinien .....	16
2.1.6. Zellkulturmedien .....	18
2.1.7. Bakterienstämme .....	19
2.1.8. Bakterien-Nährmedien .....	19
2.1.9. Software .....	20
2.2. Methoden .....	20
2.2.1. Mikrobiologische Methoden .....	20
2.2.2. Arbeiten mit Zellkulturen .....	21
2.2.3. Durchflusszytometrie ( <i>durchgeführt von Dr. Birgit Keller</i> ) .....	26
2.2.4. Statistik .....	27
3. Ergebnisse .....	28
3.1. Relevanz von $\beta 1$ Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> .....	28

3.2.	Rolle der Zytoplasmadomäne von $\beta 1$ Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> .....	32
3.3.	Effekt von $Mn^{2+}$ induzierter $\beta 1$ Integrin Aktivierung für Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> .....	36
3.4.	Bedeutung von Heparan Sulfat Proteoglykanen für Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> .....	40
3.5.	Bedeutung der Signaltransduktion am proximalen NPXY Motiv von $\beta 1$ Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> .....	44
3.6.	Bedeutung des Aktinzytoskeletts für Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> .....	48
3.7.	Bedeutung der Signaltransduktion von $\beta 1$ Integrinen über die Integrin Linked Kinase für Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> .....	51
3.8.	Bedeutung der Signaltransduktion von $\beta 1$ Integrinen über die Focal Adhesion Kinase für Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> .....	54
3.9.	Relevanz von $\beta 1$ Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> an bzw. in Epithelzellen .....	57
3.10.	Relevanz von $\beta 6$ Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i>	60
4.	Diskussion.....	63
4.1.	Interaktion der Signaltransduktion von $\beta 1$ Integrinen mit Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> .....	64
4.2.	Einfluss der Aktivierung von $\beta 1$ Integrinen auf Adhäsion und Yop-Translokation von <i>Ye</i> .....	66
4.3.	Fehlende YadA vermittelte Yop-Translokation an ILK Zellen bei vorhandener Adhäsion.....	68
4.4.	Heparan Sulfat Proteoglykane als möglicher Corezeptor für YadA.....	68
4.5.	Bedeutung von $\beta 1$ Integrin assoziierten Signalmolekülen für Adhäsion und Yop Translokation von <i>Ye</i> .....	70
4.6.	$\beta 1$ Integrin unabhängige Adhäsion und Yop Translokation von <i>Ye</i> in Epithelzellen .....	72
5.	Zusammenfassung.....	75
6.	Abkürzungen .....	77

7. Literaturverzeichnis .....	80
8. Erklärung zum Eigenanteil .....	92
9. Veröffentlichungen .....	93
10. Danksagung .....	93

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Gattung *Yersinia* – Morphologie, Klassifikation, und Krankheitsbilder

“un bacille court, trapu, à bouts arrondis, assez facile à colorer par les couleurs d’aniline, et ne se teignant pas par la méthode de Gram”<sup>1</sup> notierte sich der Schweizer Wissenschaftler Alexandre Émile Jean Yersin über ein Bakterium, das er im Jahr 1894 aus einer Pestbeule isolierte. Es handelte sich um den Erreger der Pest, *Yersinia pestis*, welcher heute noch seinen Namen trägt [1].

Die Gattung *Yersinia* umfasst, außer *Yersinia pestis*, nach heutigem Wissensstand noch 10 weitere Arten. Es handelt sich dabei um Gram-negative, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende, pleomorphe Stäbchenbakterien, die der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet werden [1, 2]. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt bei 26-30° [3, 4].

Drei der bekannten Yersinien-Spezies sind hierbei humanpathogen [5]: *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* (*Ye*) und *Yersinia pseudotuberculosis* (*Yps*). *Ye* und *Yps* stellen die enteropathogenen Varianten der Yersinien dar, die auf fäkal-oralem Weg übertragen werden. Häufig findet eine Übertragung durch kontaminierte Nahrungsmittel statt wie Schlachtprodukte (hauptsächlich Schweinefleisch), nicht pasteurisierte Milch oder kontaminiertes Trinkwasser [6-8]. Vor allem immundefiziente Personen und Kinder erkranken dadurch an einer Yersiniose [9, 10]. Nach einer Inkubationszeit von ca. 2-7 Tagen äußert sich diese durch eine mesenteriale Lymphadenitis und eine Gastroenteritis mit Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö und Fieber [9, 11] In wenigen Fällen kann es zu einem septischen Verlauf mit Abszessen in Leber oder Milz kommen [12]. Von

---

<sup>1</sup> frz.:“ein untersetzt gebauter Bazillus mit abgerundeten Enden, welcher sich leicht mit Anilinfarben einfärben lässt, jedoch nicht über das Verfahren nach Gram“ „La Peste Bubonique A Hong-Kong“, in: *Annales de l’Institut Pasteur* 1894, VIII, S. 662-667, zitiert nach dem französischen Portal BibNum (bibliothèque numérique de textes scientifiques), gefördert vom Ministère de l’Enseignement supérieur et de la Recherche (Wissenschaftsministerium) [www.bibnum.education.fr/sciencesdelavie/m%C3%A9decine-clinique/la-mise-en-%C3%A9vidence-du-bacille-de-la-peste-hongkong-1894](http://www.bibnum.education.fr/sciencesdelavie/m%C3%A9decine-clinique/la-mise-en-%C3%A9vidence-du-bacille-de-la-peste-hongkong-1894) (abgerufen am 07. Juli 2015)

septischen Verläufen sind meist immunsupprimierte Patienten oder Personen mit einer Eisenüberladung betroffen [10, 13, 14].

Nach einer Infektion mit Yersinien besteht die Gefahr von immunpathologischen Spätfolgen, z.B. einer reaktiven Arthritis, einem Erythema nodosum oder einer Uveitits [15, 16]. In der Regel verläuft die Yersiniose aber selbstlimitierend. Chronische Infektionen kommen äußerst selten vor [17].

Die Behandlung der Erkrankung erfolgt symptomatisch über Flüssigkeits- und Elektrolytausgleich [18]. In schweren Fällen kommen Antibiotika zum Einsatz, z.B. Cephalosporine der dritten Generation und Fluorchinolone [19].

## **1.2. Yersiniose am Mausinfektionsmodell**

Der genaue Infektionsweg von *Ye* lässt sich am Mausmodell studieren: *Ye* gelangt über den Gastrointestinaltrakt in den Organismus. Die Bakterien nutzen hierfür Lymphfollikel im Ileum, die Peyer'schen Plaques, als Invasionsroute [20]. Der Übertritt vom Darmlumen in die Peyer'schen Plaques erfolgt durch Transzytose über M-Zellen [21, 22]. M-Zellen können Antigene vom Darmlumen in den Extrazellularraum transportieren, wo sie diese an Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen weitergeben. Diesen Weg nutzen verschiedene enteropathogene Keime - und auch *Ye* [23]. Die Bindung von *Ye* an M-Zellen erfolgt über Invasin an  $\beta 1$  Integrine [24, 25]. Die Interaktion von *Ye* mit den beteiligten Epithelzellen führt zu Sekretion von Interleukin-8 (IL-8), Interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) [26, 27]. Dies induziert die Einwanderung von Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten [28]. Nach Transzytose durch M-Zellen vermehrt sich *Ye* in den Peyer'schen Plaques und führt über die oben genannten Immunreaktionen zur Bildung von Mikroabszessen unterhalb des follikelassoziierten Epithels [22]. Die weitere Ausbreitung von *Ye* erfolgt über mesenteriale Lymphknoten und/oder den Blutweg, Leber und Milz, wodurch auch eine systemische Infektion ausgelöst werden kann [22, 29]. Vieles deutet darauf hin, dass *Ye* nach Eintritt in den Organismus über M-Zellen

größtenteils extrazellulär an Zellen adhärirt und eine Internalisierung durch Yop-Injektion über das Typ III Sekretionssystem (TTSS) verhindert wird [30-32].

### **1.3. Pathogenitätsfaktoren von *Ye***

Verschiedene Virulenzfaktoren ermöglichen die Infektion von Wirtsorganismen durch *Ye*. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Faktoren Invasin, YadA und das TTSS.

#### **1.3.1. Invasin**

Invasin ist ein chromosomal codierter Pathogenitätsfaktor von *Ye* [33]. Es handelt sich um ein Oberflächenprotein, das zu den nicht-fimbriellen Adhäsinen und der Familie der Intimine und Invasine gehört [34, 35]. Invasin wird optimal bei niedrigem pH-Wert und Temperaturen um 23-26°C exprimiert [36]. Seine Expression und somit auch die Virulenz von *Ye* wird über RovA reguliert [37].

Invasin ist ein membranständiges Protein mit vier Domänen, die ähnlich den Immunglobulinen gefaltet sind [38]. Die Bindungsstellen des Invasin für Adhäsion an Integrine befinden sich dabei am C-terminalen Invasinende an einer Disulfidschleife um Asp<sup>911</sup> [39] und der Region um Asp<sup>811</sup> [40]. Insgesamt kann Invasin an fünf Integrine binden:  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  und  $\alpha v\beta 1$  [41]. Diese stellen Rezeptoren für Komponenten der extrazellulären Matrix dar oder sind an Interaktionen zwischen Zellen beteiligt [25, 42].

Für die Internalisierung von Bakterien ist vor allem eine starke Invasinaffinität nötig sowie das Vorhandensein von  $\beta 1$  Integrinen [43]. Integrine müssen dabei rund um das Bakterium gebunden sein, was in einer Art Reißverschlussverfahren geschieht („zippering“) [38, 44]. Über eine Reorganisation des Zytoskeletts bilden sich Pseudopodien der Zelle aus, die das Bakterium einhüllen und zu dessen Aufnahme führen [45].

Invasin ist vor allem für den Beginn der Infektion wichtig [24, 36]. Über Interaktion mit  $\beta 1$ -Integrinen der M-Zellen im Dünndarm vermittelt Invasin den Eintritt der Bakterien in diese Zellen [46, 47]. In den Wirtszellen ruft Invasin eine

proinflammatorische Antwort hervor, u.a. durch Sekretion von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , GCS-F und IL-8 und Rekrutierung von Entzündungszellen, wie polymorphkernigen Leukozyten [48] [49] [27] [50]. Es kann zur chemotaktischen Aktivierung, Migration und Proliferation von T-Zellen mit der Freisetzung weiterer Zytokine kommen [51, 52]. Für das *Yps*-Invasin wurde zudem gezeigt, dass seine direkte Bindung an  $\beta$ 1 Integrine auf T-Zellen zur Apoptose und Nekrose der T-Lymphozyten führt [53].

### 1.3.2. YadA

YadA ist ein Plasmid-codierter (pYV) Pathogenitätsfaktor [54, 55]. Es gehört zur Familie der Trimeren Autotransporter Adhäsine (TAA) [56]. Optimale Temperaturen für die Expression von YadA sind 37°C [57]. Die Expression wird dabei über den Faktor VirF reguliert [58].

YadA besitzt eine dreigeteilte Lollipopstruktur mit N-terminalem Kopf, einem Mittelstab und einer C-terminalen Membranankerdomäne [34]. Das N-terminale Ende kann mit anderen Molekülen interagieren und ermöglicht so Autoagglutination, Bindung an neutrophile Granulozyten und Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) wie z. B. Kollagen [59-62]. Der Mittelstab, eine *Coiled-Coil Formation*, hilft bei der Stabilisierung und Oligomerisierung von YadA [34]. Die Verankerung von YadA in der äußeren Bakterienmembran erfolgt über das C-terminale Ende. Es sorgt für die Stabilität der YadA Monomere und deren Oligomerisierung zu tetrameren Bündeln [34, 63].

YadA spielt eine wichtige Rolle für die Adhäsion an ECM-Proteine, Zelladhäsion, Serumresistenz, Autoagglutination und arthrogenem Potential von *Ye* [64]. Es ist essentiell für die Virulenz von *Yersinien*, wie das Mausmodell zeigte [61, 65].

Nach Invasion der *Yersinien* ist YadA das dominante Adhäsins. Es vermittelt Adhäsion an Epithelzellen [66], intestinale Submucosa [67], neutrophile Granulozyten [62] und die ECM [60, 61]. Spezielle Bindungspartner von YadA innerhalb der ECM sind Kollagen [60, 68, 69], zelluläres Fibronectin [70] und

Laminin [60, 69]. Am Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass YadA mit seinem Potential zur Kollagenbindung eine reaktive Arthritis triggern kann [71, 72].

YadA schützt das Bakterium vor dem Komplementsystem und der Lyse durch Defensine u.a. durch die Bindung an Faktor H [73, 74]. In stationärer Kultur konnte Autoagglutination von *Ye* bei einer Optimaltemperatur von 37°C durch YadA ausgelöst werden [75].

### 1.3.3. Typ III Sekretionssystem

Das Typ III Sekretionssystem (TTSS) ist ein Werkzeug vieler Gram-negativer Bakterien um Virulenzfaktoren in eukaryontische Zellen einzubringen [76]. Über die injizierten bakteriellen Proteine kann die Zellfunktion zum Vorteil des Bakteriums beeinflusst werden [76].

Das *Yersinia secretion component* (Ysc) System ist aus ca. 27 Proteinen aufgebaut, die einen Basalkörper und eine externe nadelartige Struktur bilden [77, 78]. Der Basalkörper besteht aus ringförmigen Proteinen, die die Hülle der Bakterien aus innerer und äußerer bakterieller Membran und der Peptidoglykanschicht durchspannen [79, 80]. Dem Basalkörper sitzt die nadelförmige Struktur auf, die außen am Bakterium hervorragt [79, 81]. Diese Nadel ist innen hohl, ca. 60-80 nm lang und besteht aus dem Protein YscF [82]. Sie ermöglicht die ATP-abhängige Proteinsekretion [83].

Sekretiert werden verschiedene Gruppen von Proteinen, die sogenannten *Yersinia outer proteins* (Yops). YopB und YopD bilden unter Einfluss von LcrV eine Pore in der Wirtszellwand, die das Eindringen der eigentlichen Effektorproteine ermöglicht [84]. Außerdem sind regulatorische Yops vorhanden, welche die Yop-Injektion beeinflussen können. So stoppen YopN und YscF bei hoher Kalziumkonzentration die Yop-Injektion [85, 86]. Regulatorische Effekte hat zudem der Faktor LcrG, der auch für eine effiziente Yop-Translokation notwendig ist [87]. LcrG verhindert zusammen mit YopN eine Yop-Translokation bei hohen Kalziumkonzentrationen und fehlendem Kontakt zu eukaryontischen Zellen [88, 89]. Derzeit bekannte Effektor-Yops, die in die

Wirtszelle injiziert werden können, sind YopE, YopH, YopM, YopO/YpkA, YopP und YopT. Sie können auf die Signaltransduktion der Zelle Einfluss nehmen und inhibieren somit die proinflammatorische Antwort der Wirtszelle wie z.B. Induktion von Apoptose, Phagozytose oder die Veränderung des Aktinzytoskeletts [77, 90] (Tab.: 1).

**Tab. 1:** Übersicht über die verschiedenen Effektor-Yops

<b>YopE</b>	YopE wirkt zytotoxisch. Es interagiert mit Rho, Rac und Cdc42 [91, 92]. Dadurch kommt es zur Aktivierung von GTPasen, Hemmung von Phagozytose, Porenformation und IL-1 $\beta$ Produktion sowie zur Zerstörung von Aktin-Filamenten [92-95].
<b>YopH</b>	YopH ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase [96]. Seine Zielstrukturen sind fokale Adhäsionskomplexe, LAT, SLP-76 und Lck [97-99]. Es unterdrückt die Aktivierung von T-Lymphozyten über Antigene [97, 98]. Es kann den Aufbau fokaler Adhäsionen (FA) schwächen [99]. Zudem verhindert es Phagozytose durch Makrophagen und polymorphnukleäre Leukozyten [32, 100]. In Makrophagen kann es einen <i>oxidativen burst</i> unterdrücken [101].
<b>YopM:</b>	Die Funktion von YopM ist noch weitgehend unklar. Es ist jedoch wichtig für die Virulenz von <i>Ye</i> . [102]. Nachgewiesen sind eine Depletion von NK-Zellen und eine Thrombin-Bindungsfähigkeit für YopM aus <i>Y. pestis</i> [103, 104].
<b>YopO/YpK</b>	YopO/YpK ist eine Serin/Threonin-Kinase, die durch G-Aktin aktiviert wird [105, 106] und an a RhoA und Rac bindet [107, 108]. Sie kann das Aktinzytoskelett zerstören [105] und Phagozytose verhindern [100, 109].
<b>YopP</b>	YopP blockiert die Aktivierung der MKK im MAPK-Signalweg und den Faktor NF- $\kappa$ B, was zur Suppression von TNF- $\alpha$ und IL-8-Produktion führt [110-112]. Außerdem wird die MAP-Kinase-vermittelte Antigenaufnahme in dendritische Zellen durch YopP verhindert [113] und Apoptose in Makrophagen induziert [114].

<b>YopT</b>	YopT ist eine Cysteinprotease, die Rho, Rac, und Cdc42 an ihrem COOH-terminus proteolytisch spaltet [115]. Dies resultiert in einer Veränderungen des Zytoskeletts und der Zerstörung von Aktinfilamentstrukturen [115, 116]. YopT kann Phagozytose von Yersinien verhindern [100].
-------------	---

Das TTSS ist essentiell für die Virulenz von *Ye* [102]. Die Regulation erfolgt über Kalziumkonzentration und Temperatur, mit optimalen Bedingungen bei einer Temperatur von 37°C und in Abwesenheit von Kalziumionen [58].

Für die Aktivierung des TTSS, die Bildung von Poren in der Wirtszellmembran und die Translokation von Yops ist eine vorherige Adhäsion der Yersinien an die Wirtszelle nötig [117].

#### 1.4. $\beta$ 1 Integrine und Interaktionspartner

Adhäsion von *Ye* an Wirtszellen wird vor allem über die Bindung von Invasin an  $\beta$ 1 Integrine [25] und die Bindung von YadA an Fibronectin, Kollagen oder Laminin, welche ebenfalls an  $\beta$ 1 Integrine binden, vermittelt [60, 68-70].

Während sich  $\beta$ 1 Integrine im Epithel normalerweise an der Basalseite der Zelle befinden, sind sie an M-Zellen auch apikal lokalisiert und ermöglichen so das Eindringen der Bakterien in den Organismus [118].

Integrine sind aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaute, heterodimere Transmembranproteine, die u.a. als Zelloberflächenrezeptoren fungieren [119]. Im Augenblick sind 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Integrine formen können [120]. Jede Untereinheit besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, einer Transmembranregion und einer kleinen Zytoplasmadomäne [121].

Das humane  $\beta$ 1 Integrin existiert in vier Isoformen  $\beta$ 1A,  $\beta$ 1B,  $\beta$ 1C und  $\beta$ 1D [122]. Diese unterscheiden sich in ihrer Zytoplasmadomäne, welche in einen proximalen, bei allen  $\beta$ 1 Integrienen identischen Teil und einen distalen, variablen Teil eingeteilt werden kann [123]. Der proximale, zellmembrannahe

Teil wird von Exon 6 codiert [124]. An ihm befinden sich Bindungsstellen für die Focal Adhesion Kinase (FAK), Paxillin [125] und  $\alpha$ -Aktinin [126]. Der distale, variable Teil liegt C-terminal und unterscheidet sich in  $\beta$ 1A,  $\beta$ 1B,  $\beta$ 1C und  $\beta$ 1D Integrinen [124]. Er enthält unter anderem Bindungsstellen für Talin [127] und Kindlin [128].

Integrine vermitteln mechanische Kräfte und Adhäsion, sie sind an der Signaltransduktion der Zelle beteiligt und regulieren so Zellproliferation, Zellüberleben und Zelldifferenzierung. Integrine vermitteln Kommunikation zwischen Zellen oder Interaktion mit der ECM [129-133]. Kommunikation über Integrine findet dabei bidirektional statt. Extrazelluläre Reize können über Integrine Veränderungen der intrazellulären Signalwege verursachen. Gleichzeitig können Integrine über intrazelluläre Stimuli aktiviert werden, was ihre Affinität für extrazelluläre Liganden verändert [130, 134]. Da Integrine keine eigene enzymatische Aktivität oder eigene Aktinbindungsstellen aufweisen, sind sie auf verschiedene Adaptorproteine angewiesen [135]. Eine direkte Verbindung von Integrin zum Aktinzytoskelett vermitteln z.B. Talin, Filamin und  $\alpha$ -Aktinin.

Talin ist ein Aktin-bindendes Protein und verbindet  $\beta$ 1 Integrine direkt mit Aktin [136, 137]. Durch diese Verbindung kann Talin mechanische Kräfte von der ECM auf die Zelle übertragen. Die Bindung von Talin an eine  $\beta$ 1 Zytoplasmadomäne aktiviert das Integrin und erhöht dessen Affinität für extrazelluläre Liganden [138-140]. Talin bindet dabei an ein konserviertes NP(I/L)Y Motiv im zytoplasmatischen Ende des  $\beta$ 1A bzw.  $\beta$ 3 Integrins [127]. Die Bindung von Talin an die  $\beta$ -Ketten des heterodimeren Integrinrezeptors führt dazu, dass die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Kette auseinander rücken, was eine Konformationsänderung des Integrinrezeptors und so eine erhöhte Liganden-Affinität zur Folge hat [138]. Dieser Vorgang wird als die Integrinaktivierung bezeichnet. Da die Aktivierung vom intrazellulär lokalisierten Talin initiiert wird, spricht man hier auch von „inside-out signaling“.

Ein wichtiger Partner von Talin ist Kindlin-2, das essentiell für Talin-induzierte Integrinaktivierung ist [141]. Kindline sind, wie Talin intrazelluläre Adaptorproteine, die an FAs rekrutiert werden. Sie können Integrine über

Bindung an  $\beta 1$  oder  $\beta 3$  zytoplasmatische Enden aktivieren [128, 142]. Kindlin-1 und -2 binden dabei im Gegensatz zu Talin an das distal zur Membran gelegene NPXY Motiv von  $\beta 1A$  bzw.  $\beta 3$  Integrinen. Die Bindung von Kindlin kann dabei durch eine einzige Aminosäuresubstitution ( $Y_{795}A$ ) verhindert werden [128].

Talin bindet des Weiteren an Vinculin. [136]. Dieses stabilisiert die Integrin-Aktin-Bindung über eine Bindung an Aktin und Talin [143]. Vinculin ist für stabile Integrin beinhaltende Adhäsionsstellen nötig. Vinculin defiziente Fibroblasten exprimieren weniger und kleinere Fokale Adhäsionen (FAs) als Vinculin exprimierende Fibroblasten [144]. Bei FAs handelt es sich um Integrin enthaltende Adhäsionsstellen, die außer Integrinen noch Signalmoleküle wie FAK, Paxillin und Scr, sowie Gerüstproteine wie Talin, Vinculin und  $\alpha$ -Aktinin enthalten und daher als Makromoleküle bezeichnet werden [145]. FAs vermitteln mechanischen Kontakt zur ECM sowie Signale, die das Zellverhalten beeinflussen können [146, 147]. Sie entstehen bei Kontakt extrazellulärer Integrindomänen zu ECM-Proteinen. Als Folge werden Signale an das Aktinzytoskelett vermittelt. Die Integrine ziehen sich zu Clustern zusammen und bilden so FAs [145].

$\alpha$ -Aktinin ist ebenfalls ein Adaptorprotein, das eine direkte Verbindung zwischen  $\beta 1$ -Integrinen und Aktin herstellen kann [148]. Es ist an Entstehung, Reifung und Stärkung von FAs beteiligt [149, 150]. Je höher die mechanischer Beanspruchung von Adhäsionen ist, umso mehr  $\alpha$ -Aktinin wird in FAs eingelagert [151]. Über Aktin bindende Proteine können Integrine Einfluss auf das Aktinzytoskelett nehmen und so Adhäsion, Zellmigration und Zellausbreitung vermitteln [152].

An Integrine bindend und indirekt mit dem Zytoskelett assoziiert sind die Integrin-Linked-Kinase (ILK), Paxillin und FAK. Sie üben regulatorische Effekte aus.

ILK ist ein Adaptorprotein und eine Kinase, die  $\beta 1$  und  $\beta 3$  Integrine indirekt mit Aktin verbinden kann. Dies erfolgt über eine Bindung von Parvin. Weitere Bindungspartner von ILK sind Vinculin und Paxillin, das wiederum an Parvin bindet [153]. ILK ist an der Integrin-assoziierten Regulation und Reorganisation

des Aktinzytoskeletts beteiligt [154, 155]. Es spielt eine wichtige Rolle bei Zellmigration, Zellproliferation, Formation von FAs und Stressfasern. In Skelettmuskelzellen von Zebrafischen konnte zudem gezeigt werden, dass ILK wichtig für die Stabilisierung von FAs ist [156].

FAK ist eine Non-Rezeptor-Tyrosin-Kinase [157]. Die N-terminale nichtkatalytische Domäne von FAK kann direkt an das zytoplasmatische Ende von  $\beta 1$  Integrinen binden. Die genaue Relevanz dessen ist aber noch unklar [125]. Das C-terminale Ende von FAK enthält die Focal Adhesion Targeting (FAT) Domain, an der Paxillin [158] und Talin [159] binden können, welche an der Interaktion von FAK mit Integrinen beteiligt sind. FAK kann die Zellmotilität regulieren, indem es das Zytoskelett und Zelladhäsion beeinflusst [160]. Aktivierte Integrine führen zur Aktivierung von FAK über erhöhte Aktivität der Kinase [161] und Tyrosinphosphorylation [162-164]. FAK defiziente Zellen zeigen eine reduzierte Motilität, jedoch mehr und größere FAs, was darauf hindeutet, dass FAK weniger für die initiale Bildung als für einen ständigen Umbau der FAs und somit für die Zellmotilität bedeutsam ist [165].

Integrine können zudem mit vielen weiteren Molekülen interagieren, die hier jedoch nicht weiter beschrieben werden. Es kann angenommen werden, dass Yersinien die Signaltransduktion von Integrinen und auf diese Weise Zellfunktionen wie Zelladhäsion oder Zellmotilität für die Infektion ausnutzen.

## **1.5. Zielsetzungen dieser Arbeit**

Wichtige Schritte bei Infektionen mit *Ye* sind die Adhäsion an und Yop-Translokation in Zellen. *Ye* adhärirt an Wirtszellen durch eine Interaktion von Invasin bzw. YadA mit  $\beta 1$  Integrinen. Isberg und Leong zeigten 1990 für Invasin eine direkte Bindung an  $\beta 1$  Integrine [25], während für YadA eine indirekte Interaktion über ECM-Proteine angenommen wird [68-70]. Adhäsion kann verschiedene zelluläre Prozesse auslösen: beispielsweise eine durch  $\beta 1$  Integrin vermittelte Internalisierung von Yersinien oder die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden [166, 167].

Dr. Birgit Keller untersuchte den Einfluss von  $\beta 1$  Integrinen und der  $\beta 1$  Integrin vermittelten Signaltransduktion auf Adhäsion und Yop-Translokation. Hierauf aufbauend sollte untersucht werden, ob und wie die Adhäsion der Bakterien mit der Translokation assoziiert ist.

Die Hauptfragen der vorliegenden Arbeit lauten – einerseits auf Bakterienseite: Lassen sich die Ergebnisse spezifisch den Pathogenitätsfaktoren Invasin oder YadA zuschreiben?

Andererseits stellt sich auf Zellseite die Frage, welche Bedeutung die Signaltransduktion über  $\beta 1A$  Zytoplasmadomänen für die Adhäsion hat, welche Rolle der Aktivierungszustand der Integrine in diesem Kontext spielt und welchen Einfluss verschiedene integrinassoziierte Proteine wie FAK, ILK oder Talin auf die Adhäsion hat.

Hinweisen auf zusätzliche Interaktionspartner für Ye, welche  $\beta 1$  Integrin unabhängig Adhäsion an und Yop-Translokation in die Zelle ermöglichen, wurde nachgegangen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

**Tab. 2:** Übersicht der in der Arbeit eingesetzten Geräte

<b>GERÄT</b>	<b>BEZEICHNUNG</b>	<b>HERSTELLER</b>
Durchflusszytometer	Fortessa LSR II	Becton Dickinson, Heidelberg
Handdispenser	Multipette® Plus	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Olympus BX51	Olympus, Hamburg
Mikroskop	Telaval 31	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Digitalkamera	Olympus DP71	Olympus, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Zählkammer Neubauer	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf Reverence 10, 100, 1000	Eppendorf Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus-akku	Hirschmann- Laborgeräte, Eberstadt
Reagenzglasschüttler	Heidolph Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelinkubator	HT, Multitron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz

<b>GERÄT</b>	<b>BEZEICHNUNG</b>	<b>HERSTELLER</b>
Sterilbank	BDK-S 1200 und 1500	BDK, Luft- und Raumfahrttechnik, Sonnenbühl
Vakuumpumpe	CVC 2000	Vacuubrand, Wertheim
Wasserbad	WB 10	Memmert, Schwabach
Zellkulturbrutschrank	BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge	Heraeus Biofuge Stratos	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

**Tab. 3:** Übersicht der in der Arbeit eingesetzten Verbrauchsmaterialien

<b>PRODUKT</b>	<b>HERSTELLER</b>
Cover Slips (steril)	Menzel GmbH, Braunschweig
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfgefäße (1,5ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Objektträger mit Mattrand	R. Langenbrinck, Emmerdingen
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl))	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (5ml, 10ml, 20ml, 50ml) (steril)	Corning Inc., Corning, New York, USA

<b>PRODUKT</b>	<b>HERSTELLER</b>
Combitips (2,5ml, 5ml)	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenröhrchen (14ml) mit Verschlusskappe	BD Bioscience, Heidelberg
Spitzbodenröhrchen (15ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spitzbodenröhrchen (50ml)	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturflaschen (80, 175 cm <sup>2</sup> )	Nunc, Langenselbold
Zellkulturplatte (24 Well Platte)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

### 2.1.3. Laborchemikalien

**Tab. 4:** Übersicht der in der Arbeit eingesetzten Laborchemikalien

<b>PRODUKT</b>	<b>HERSTELLER</b>
CCF4-Am Loading Kit (enthält Lösung A, B und C)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM high Glucose	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
DMEM/F12 + Glutamax <sup>TM</sup> –I	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
DMEM + GlutaMAX <sup>TM</sup> -i	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA (Versen) 1% (w/v)	Biochrom AG, Berlin
EDTA/Trypsin	Gibco Life Technologies, Darmstadt
Entellan	Merck Chemicals, Darmstadt
FCS (foetal bovine serum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<b>PRODUKT</b>	<b>HERSTELLER</b>
Fuchsin	Diagnostik, Mikrobiologie, Tübingen
Hefeextrakt	ICN, CA, USA
Heparin Sodium Salt (50mg/ml)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Hygromycin B	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
L-Glutamin 200mM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Manganese sulfate monohydrate	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	E. Merck, Darmstadt
PBS Dulbecco	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PFA	Merck Chemicals, Darmstadt
Probenecid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Roti Histokit	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton	ICN, CA, USA

#### 2.1.4. Antibiotika

**Tab. 5:** Übersicht der in der Arbeit eingesetzten Antibiotika

PRODUKT	HERSTELLER	STAMMLÖSUNG
Arsenit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	400 mM in Wasser
Kanamycin	Applichem, Darmstadt	50 mg/ml in Wasser
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	10 mg/ml in Wasser
Penicillin/Streptomycin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe	10.000 Units/ml Penicillin 10.000 µg/ml Streptomycin
Streptomycin	Applichem, Darmstadt	50 mg/ml in Wasser
Tetracyclin	Applichem, Darmstadt	12,5 mg/ml in 70% Ethanol

#### 2.1.5. Zelllinien

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärente Zellen. Verwendet wurden die im Folgenden aufgeführten Zelllinien:

**FAK<sup>+/+</sup>:** Murine embryonale Fibroblasten, die homozygot null für p53, aber nicht für FAK sind.

**FAK<sup>-/-</sup>:** Murine embryonale Fibroblasten, die homozygot null für p53 und FAK sind.

Die Bezugsquelle für die FAK<sup>+/+</sup> und FAK<sup>-/-</sup> Zelllinien war LGC Standards, ATCC.

**GD25β1<sup>-/-</sup>:** Murine embryonale Fibroblasten, welche aus dem embryonalen Stammzellklon G201 gewonnen wurden und deren β1 Integrin Untereinheit deletiert ist. [168]

**GD25β1A:** GD25β1<sup>-/-</sup> Zellen, die stabil mit humanem β1-Integrin IsoformA transfiziert wurden [169].

**GD25β1COM:** GD25β1<sup>-/-</sup> Fibroblasten, die stabil mit humanem β1 Integrin transfiziert wurden, bei dem der für Isoform A spezifische Teil der zytoplasmatischen Domäne deletiert ist [123].

**GD25β1TR:** GD25β1<sup>-/-</sup> Zellen, die stabil mit einem humanen β1-Integrin transfiziert wurden, bei dem die zytoplasmatische Domäne vollständig deletiert wurde [123].

Saviero F. Retta stellte die aufgeführten GD25β1<sup>-/-</sup>, GD25β1A, GD25β1COM und GD25β1TR Zelllinien zur Verfügung [123].

**GD25pmSCV:** GD25 β1<sup>-/-</sup> Zellen die mit pmSCVpuro transduziert wurden.

**GD25pmSCV-ITGB6:** GD25 β1<sup>-/-</sup> Zellen, die mit pmSCVpuro-ITGB6 transduziert wurden.

Dr. Birgit Keller stellte die GD25pmSCV und GD25pmSCV-ITGB6 Zelllinien zur Verfügung [170].

**ILK<sup>+/+</sup>:** Murine fibroblastoide Nierenzellen mit einem geflochten ILK-Gen.

**ILK<sup>-/-</sup>:** Murine fibroblastoide Nierenzellen, die für das ILK-Gen defizient sind.

Die ILK<sup>+/+</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zelllinien wurden von Prof. Dr. Reinhard Fässler zur Verfügung gestellt [154].

**IMCDβ1<sup>-/-</sup>:** Murine epitheliale Nierenzellen, deren endogenes β1 Integrin deletiert wurde.

**IMCDβ1A:** IMCDβ1<sup>-/-</sup> Zellen, in die ein humanes β1A Integrin integriert wurde.

Die IMCDβ1<sup>-/-</sup> und IMCDβ1A Zelllinien wurden von Prof. Dr. Reinhard Fässler zur Verfügung gestellt [171] [172].

**YY>AY:** Murine Fibroblasten mit einem Aminosäureaustausch in der  $\beta 1$  Zytoplasmadomäne:  $Y_{783}>A$ .

**YY>YY:** Murine Fibroblasten, welche der Wildtyp zur YY>AY Zelllinie sind.

Die YY>AY und YY>YY Zelllinien wurden von Prof. Dr. Reinhard Fässler zur Verfügung gestellt [173].

### **2.1.6. Zellkulturmedien**

Alle Zellkulturmedien wurden gebrauchsfertig vom Hersteller geliefert, bei 4°C gelagert und mit FCS (fötale Kälberserum), Penicillin/ Streptomycin und L-Glutamin komplementiert. Das fötale Kälberserum wurde vor Gebrauch für 30 min bei 56°C inaktiviert.

Für die Zelllinien FAK<sup>+/+</sup>, FAK<sup>-/-</sup>, GD25 $\beta$ 1<sup>-/-</sup>, GD25 $\beta$ 1A, GD25 $\beta$ 1COM, GD25 $\beta$ 1TR, GD25pMSCV, GD25pMSCV-ITGB6, YY>AY und YY>YY wurde DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 units/ml PenicillinG und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin verwendet. Zu den transfizierten Zelllinien GD25 $\beta$ 1A, GD25 $\beta$ 1COM und GD25 $\beta$ 1TR wurde zusätzlich 300  $\mu$ g/ml Hygromycin, bzw. zu GD25pmSCV und GD25pmSCV-ITGB6 2  $\mu$ g/ml Puromycin hinzugefügt.

Für die Zelllinien ILK<sup>+/+</sup> und ILK<sup>-/-</sup> wurde DMEM + Glutamax mit 10% FCS, 100 units/ml PenicillinG und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin verwendet.

Die Zelllinien IMCD $\beta$ 1<sup>-/-</sup> und IMCD $\beta$ 1A wurden in DMEM-F12 + Glutamax mit den Zusätzen 10% FCS, 100 units/ml PenicillinG und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin kultiviert.

Für die Infektion mit Ye wurden die Zellkulturmedien ohne FCS, L-Glutamin und Antibiotika verwendet.

### 2.1.7. Bakterienstämme

**Tab. 6:** Übersicht der in der Arbeit eingesetzten Bakterienstämme

<b>STAMM</b>	<b>BESCHREIBUNG</b>	<b>QUELLE</b>
Y.e. E40-pBla	E40 $\Delta asd$ Stamm, transformiert mit pMK-Bla. Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	Köberle et al., 2009 [174]
Y.e. E40 $\Delta$ Inv-pBla	E40 $\Delta asd \Delta inv$ Stamm, transformiert mit pMK-Bla. Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> . Invasin defizient	Keller et al., [170]
Y.e. E40 $\Delta$ YadA-pBla	pYV <sup>-</sup> $\Delta asd$ pBla Stamm, transformiert mit pLJM4029 (YadA-) und pMK-Bla, Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Strep <sup>R</sup> . YadA defizient	Keller et al., [170]
Y.e. E40 $\Delta$ Inv $\Delta$ YadA-pBla	pYV40 Plasmid des E40 $\Delta asd \Delta inv$ Stamms wurde ersetzt durch pLJM4029 (YadA-) und anschließend transformiert mit pMK-Bla. Nal <sup>R</sup> , Ars <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Strep <sup>R</sup> . Invasin und YadA defizient	Keller et al., [170]

### 2.1.8. Bakterien-Nährmedien

Für die Kultivierung der Bakterienstämme wurde LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, ad 1 l a. dest. pH 7,5) verwendet. Je nach Stamm wurden dem Nährmedium verschiedene Antibiotika zugesetzt (siehe Tabelle 5), um das Wachstum anderer als der gewünschten Bakterien zu verhindern.

## 2.1.9. Software

**Tab. 7:** Übersicht der in der Arbeit eingesetzten Software

<b>PROGRAMM</b>	<b>HERSTELLER</b>
Adobe Photoshop CS, Version 8.0.1	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Cell^B 2.6	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
GIMP 2.4.6	Gnu Image Manipulation Program, Boston, USA
GraphPad Prism Version 4.03	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Kultivierung von Ye

Die Anzucht von Ye im Rahmen der Adhäsions- und Translokationsassays erfolgte durch Beimpfung aus Glycerinkulturen, die bei -20°C gelagert wurden. Die Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium (5 ml) mit entsprechenden Antibiotikakombinationen (siehe 2.1.8) bei 27°C über Nacht in Schüttelinkubatoren kultiviert.

Aus den Übernachtskulturen wurden am folgenden Tag Subkulturen in 5 ml LB-Flüssigmedium (Verdünnungsfaktor 1:20) hergestellt. Zur Induktion der Gene,

die auf dem Virulenzplasmid kodiert waren, wurden die Subkulturen bei 37°C auf einem Schüttelinkubator für drei weitere Stunden inkubiert.

#### **2.2.1.2. Ernte von Ye und Bestimmung der Bakterienzahl für die Infektion**

Nach der Kultivierung fand die Ernte der Yersinien für die folgende Zellinfektion statt. Die Bakterien wurden bei 4500 g für 5 min (RT) abzentrifugiert. Nach der Sedimentation wurde der Überstand an Medium entfernt, die Yersinien mit 5 ml PBS gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 4495 rpm, RT). Das entstehende Bakterienpellet wurde in 2 ml PBS resuspendiert.

Zur Bestimmung der Bakterienzahl wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt ( $OD_{600}$ ). Dazu wurde die Bakteriensuspension mit PBS in einer Einmalküvette verdünnt (Verdünnungsfaktor 20). Als Leerwert diente reines PBS. Eine  $OD_{600}$  von 1 entspricht hier der Konzentration von  $0,5 \times 10^9$  B/ml. Verrechnet mit dem Verdünnungsfaktor 20 kann die Anzahl der Yersinien pro Milliliter bestimmt werden.

Bei den durchgeführten Infektionen betrug die MOI (multiplicity of infection) 100. Das entspricht bei einer Zellzahl von  $1,0 \times 10^5$  Zellen  $1,0 \times 10^7$  Bakterien. Die benötigte Menge an Bakteriensuspension für die Infektion wurde in einem Volumen von 100  $\mu$ l PBS zu den Zellen gegeben.

#### **2.2.2. Arbeiten mit Zellkulturen**

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden größtenteils unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Lösungen wurden entweder steril vom Hersteller bezogen oder vor Gebrauch autoklaviert. Lösungen, die in Kontakt mit den Zellen kamen, wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C aufgewärmt.

### **2.2.2.1. Kultivierung von Gewebeskulturzellen**

Alle benötigten Zellen wurden als Zellstocks in Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die Gefrierstocks im 37°C warmen Wasserbad für wenige Minuten aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 9 ml des entsprechenden Mediums (siehe 2.1.6) überführt und abzentrifugiert (5 min, 400 g, RT), um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert und zur Kultivierung in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>3</sup>) mit 25 ml Medium überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Zellkulturbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>. Nach jeweils 2 – 3 Tagen wurden die Zellen bei einer Konfluenz zwischen 60 und 90% passagiert.

### **2.2.2.2. Ablösen von Gewebeskulturzellen**

Das Ablösen der Zellen aus den Zellkulturflaschen erfolgte mit EDTA und Trypsin. Zuerst wurde das Medium aus der Flasche entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Um das Ablösen zu erleichtern, wurden die Zellen anschließend mit 2 ml 1%-EDTA-Lösung gewaschen. EDTA fungiert als Chelator für zweiwertige Ionen und kann so Kalzium koordinativ binden. Kalzium interagiert mit Integrinen und anderen Zelladhäsionsmolekülen. Wird es durch EDTA gebunden, steht es hierfür nicht mehr zur Verfügung, was zu einer gestörten Zelladhäsion führt. Zum vollständigen Ablösen der Zellen wurden 3 ml einer EDTA/Trypsin-Lösung verwendet, bei einer Inkubationszeit von 2 – 5 min und 37°C. Trypsin ist eine Serinprotease und spaltet alle Verbindungen auf der Zelloberfläche proteolytisch. Sobald die Zellen sich vom Gefäßboden ablösen, wurden 8 ml des entsprechenden Zellkulturmedium zugegeben, die Zellsuspension in Falcons überführt und die Zellen abzentrifugiert (5 min, 400 g, RT). EDTA/Trypsin sollte zügig entfernt werden, da Trypsin nach einiger Zeit von Zellen internalisiert wird und so auch innerhalb der Zelle seine proteolytische

Wirkung entfaltet. Das abzentrifugierte Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert.

### **2.2.2.3. Bestimmung der Lebendzellzahl**

Um eine definierte Zellzahl aussäen zu können, muss die Lebendzellzahl bestimmt werden. Dazu wurde Trypanblau und eine Neubauer Zählkammer verwendet. Trypanblau dient zur Unterscheidung toter von lebendigen Zellen am Mikroskop. Tote Zellen werden blau angefärbt, da deren Zellmembran nicht mehr intakt ist. Lebende Zellen werden nicht angefärbt. Eine Neubauer Zählkammer umfasst ein definiertes Volumen, in dem die Anzahl von Zellen bestimmt werden kann.

Um die Zellzahl in einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden 10 µl der Suspension mit 90 µl einer Trypanblau-Lösung verdünnt (Verdünnungsfaktor 1:10). 10 µl dieser Verdünnung wurden in eine Neubauer Zählkammer mit den Maßen 0,0025 mm x 0,0025 mm x 0,1 mm überführt. Unter einem Auflichtmikroskop wurden die lebenden Zellen in den vier Großquadraten ausgezählt. Über den Mittelwert der Zellzahl in den 4 Quadraten, den Kammerfaktor ( $1 \cdot 10^4$  Zellen/ml) und den Verdünnungsfaktor (10) konnte die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter berechnet werden.

### **2.2.2.4. Adhäsionsassays**

Um die Adhäsion der *Yersinia* E40 Stämme an unterschiedliche Zelllinien zu untersuchen, wurden je  $1,0 \times 10^5$  Zellen in 500 µl ihres Mediums auf sterile cover slips in eine 24-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am folgenden Tag wurde eine Stunde vor der Infektion mit Ye das Medium in den Wells durch Medium ohne FCS und Antibiotika ersetzt. Die Zellen wurden mit einer MOI von 100 infiziert, d.h.  $1,0 \times 10^7$  Bakterien wurden auf  $1,0 \times 10^5$  Zellen in einem Well appliziert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>.

Nach der Infektion wurden die Zellen in den Wells drei Mal mit 500 µl PBS gewaschen, um nicht adhärierende Bakterien und totes Zellmaterial zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 300 µl 4% PFA in PBS für 15 min bei RT fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 500 µl PBS, wurde eine Fuchsin-Färbung mit 300 µl einer Fuchsin-Lösung für 1,5 min durchgeführt, gefolgt von nochmaligem Waschen mit 500 µl PBS. Zuletzt wurden die cover slips mithilfe einer gebogenen Kanüle aus den Wells entfernt und mit Entellan oder Roti<sup>®</sup>-Histokit auf Objektträger aufgebracht. Zur Auswertung der adhärierenden Bakterien pro Zelle wurde ein Lichtmikroskop und das PC-Programm ImageJ verwendet. Alle in den Adhäsionsassays erstellten Replikat wurden mit einem Lichtmikroskop bei 60-facher Vergrößerung in Ölimmersion mikroskopiert. Pro Replikat wurden über eine angeschlossene Digitalkamera fünf bis zehn Fotos angefertigt, sodass jeweils mindestens 100 Zellen komplett abgebildet waren. Über das Programm ImageJ erfolgte die Auszählung der adhärierenden Bakterien pro Zelle. Hierbei wurden immer nur komplett abgebildete Zellen und ihre adhärierenden Bakterien gezählt. Pro Replikat wurden jeweils mindestens 100 Zellen ausgewertet.

#### **2.2.2.5. Inkubation der Zellen mit verschiedenen Substanzen**

Für bestimmte Fragestellungen war die Inkubation der Zellen mit verschiedenen Substanzen erforderlich.

Um die Auswirkung einer Integrin-Aktivierung auf die Adhäsion und Yop Translokation von *Ye* zu untersuchen, wurden die Zellen mit einer MnSO<sub>4</sub>-Lösung inkubiert. Die MnSO<sub>4</sub>-Lösung wurde dem Medium eine Stunde vor der Infektion hinzugefügt, sodass sich eine Konzentration von 0,5 mM ergab. Als Negativkontrolle wurde statt der MnSO<sub>4</sub>-Lösung das gleiche Volumen Milliporwasser verwendet.

Um eine Beteiligung des Aktinzytoskeletts an Adhäsion und Yop Translokation von *Ye* zu untersuchen, wurde die Aktin-Polymerisierung in den Zellen mit CytochalasinD inhibiert. Dazu wurde dem Medium zwei Stunden vor der Infektion eine CytochalasinD-Lösung beigefügt, so dass eine Konzentration von

2 µg/ml erreicht wurde. In den Kontrollexperimenten wurde statt CytochalasinD das gleiche Volumen DMSO verwendet.

Um den Einfluss von Heparin zu untersuchen, wurde eine Stunde vor der Infektion mit *Ye* eine Heparin-Natrium-Salzlösung (50mg/ml in Ampuwa) zugefügt, so dass sich eine Endkonzentration von 1mg/ml Heparin ergab. Als Negativkontrolle wurde nur das entsprechende Volumen Ampuwa zu den Zellen gegeben.

Die Zugabe der Substanzen erfolgte jeweils zeitgleich mit dem Mediumwechsel vor der Infektion. Die Substanzen wurden auch während der Infektion mit *Ye* im Medium belassen.

#### **2.2.2.6. Nachweis der Yop-Translokation mit einem $\beta$ -Lactamase Reporter System (*durchgeführt von Dr. Birgit Keller*)**

Zum Nachweis der Yop-Translokation in eukaryontische Zellen wurde ein *Yersinia* Stamm verwendet, der ein YopE- $\beta$ -Lactamase Fusionsprotein exprimiert. Bei der Infektion von Wirtszellen mit diesem Stamm, kommt es über das TTSS zur Yop-Injektion und somit auch zur Injektion des Fusionsproteins. Die Zellen wurden anschließend mit dem Farbstoff CCF4 gefärbt. Dieser fluoresziert bei Anregung mit einer Wellenlänge von 409 nm grün. Die über das TTSS injizierte  $\beta$ -Lactamase spaltet das CCF4, wobei ein Spaltprodukt entsteht, das bei Anregung eine blaue Fluoreszenz zeigt. Auf diese Weise können Zellen mit injizierten Yops als blau fluoreszierende Zellen in der Durchflusszytometrie detektiert werden. Zellen, in die keine Yops injiziert wurden, fluoreszieren grün. Als Kontrolle wurde ein *Yersinia* Stamm mit einem YopE-Ovalbumin Fusionsprotein verwendet.

#### **2.2.2.7. Durchführung von Translokationsassays mit CCF4-Färbung der Zellen (*durchgeführt von Dr. Birgit Keller*)**

Um die Yop-Translokation in verschiedene Zellen zu erkennen, wurden  $1,25 \times 10^5$  Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte ausgesät. Die Kultivierung der Zellen

erfolgte über Nacht bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>. Eine Stunde vor der Infektion wurde das Zellkulturmedium durch Medium ohne FCS und Antibiotika ersetzt. Die Infektion der Zellen erfolgte mit den verschiedenen *Yersinia* E40 Stämmen und einer MOI von 100. Um den Kontakt zwischen Zellen und Bakterien herzustellen, wurden die Platten bei 300 g für 2 min zentrifugiert. Es folgte eine Infektionszeit von 1 h bei 37°C im Brutschrank.

Nach der Infektion wurden die Zellen einmal mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 200 µl Trypsin/EDTA aus den Wells abgelöst und, nach Abstoppen der Reaktion mit jeweils 800 µl DMEM, in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (400 g, 5 min) und einmal in 1 ml FACS-Puffer gewaschen.

Zur Färbung der Zellen wurde die CCF4-Färbelösung nach den Herstellerangaben angesetzt (pro 100 µl Lösung jeweils 0,1 µl Lösung A + 1 µl Lösung B, 10 µl Lösung C, 1 µl Probenecid und 87,9 µl DMEM + 1% Pen/Strep) und zu jeweils 100 µl auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 40 min bei RT mit der Färbelösung inkubiert. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde 200 µl PBS + 1% Pen/Strep zu den Zellen gegeben. Anschließend erfolgte im Durchflusszytometer die Detektion und Quantifizierung der Yop-Translokation.

### **2.2.3. Durchflusszytometrie (durchgeführt von Dr. Birgit Keller)**

Für die Untersuchung der Yop-Translokation wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt. Diese dient zur Analyse verschiedener Zelleigenschaften, wie zum Beispiel Größe, Granularität oder Fluoreszenz.

Die zu analysierende Zellsuspension wird hierfür über eine Stahlkapillare angesaugt und in eine Messküvette eingebracht. Die Zellen werden durch die Pufferflüssigkeit, in der sie sich befinden, beschleunigt und zum Analysepunkt transportiert. Dort können Laserdetektoren Fluoreszenz und/oder Streulicht messen. Über die Lichtstreuung können Aussagen über die Größe, Oberflächenstruktur und Granularität (intrazelluläre Bestandteile) der Zelle gemacht werden. Lösliche Fluoreszenz-Farbstoffe, die sich in der Zelle anreichern (in dieser Arbeit CCF-4), können durch Laser mit einem für diesen

Farbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich angeregt werden. Die folgende Photoemission wird über entsprechende Detektoren gemessen.

#### **2.2.4. Statistik**

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPrism4. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Experimente wurden jeweils aus mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet, sofern nicht anders angegeben. Der Vergleich von jeweils zwei Datenreihen wurde mit einem gepaarten, zweiseitigen T-Test auf Signifikanz analysiert. Wurden mehr als zwei Datenreihen verglichen, wurde ein Oneway Anova Test mit einem Bonferroni Posttest zum Vergleich aller Gruppen verwendet. Ergebnisse wurden ab einem p-Wert  $< 0,05$  als schwach signifikant, ab einem p-Wert  $< 0,01$  als signifikant und ab  $p < 0,001$  als stark signifikant eingeordnet.

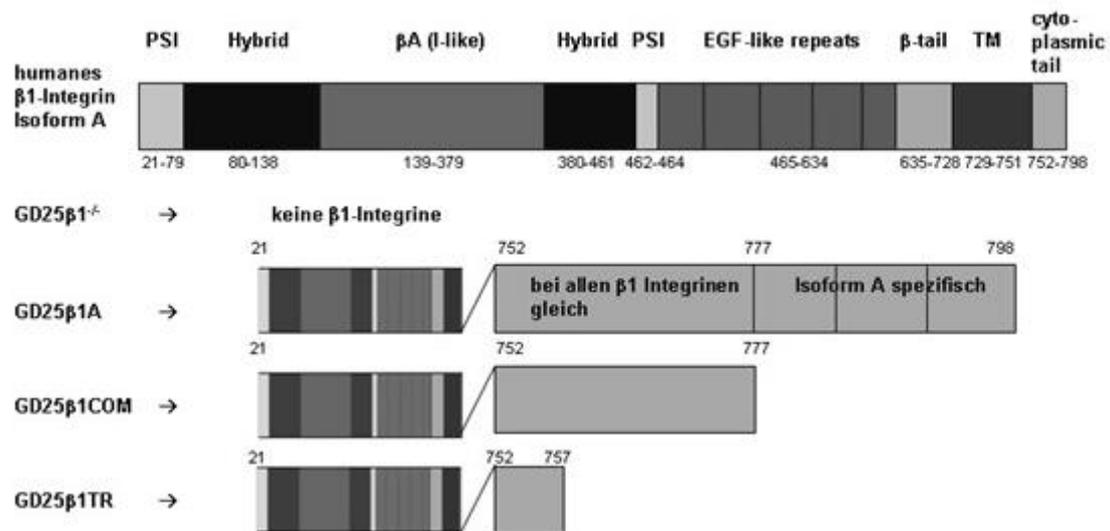
### 3. Ergebnisse

Diese Arbeit untersuchte, wie  $\beta 1$  Integrine und  $\beta 1$  Integrin vermittelte Signalwege die Adhäsion von *Ye* beeinflussen. Ein Aspekt dabei war, wie die Adhäsion mit der nachfolgenden Yop Injektion assoziiert ist. Zur besseren Erläuterung wurden dazu die von Dr. Birgit Keller erhobenen Daten zur Yop Translokation in den Ergebnisteil integriert, sind aber nur als Diskussionsgrundlage Bestandteil dieser Arbeit. Jeder Teil ist entsprechend gekennzeichnet.

Es wurden Infektionsexperimente mit Zelllinien durchgeführt, die verschiedene Mutationen im  $\beta 1$  Integrin oder in  $\beta 1$ -assoziierten Signalproteinen aufweisen. Welche Rolle die Adhäsine Invasin und YadA von *Ye* bei der Interaktion mit  $\beta 1$  Integrinen spielen, wurde mit verschiedenen *Yersinia* Mutantenstämmen untersucht. Zum Einsatz kamen die Stämme E40-pBla,  $\Delta$ Inv-pBla,  $\Delta$ YadA-pBla, und  $\Delta$ Inv $\Delta$ YadA-pBla. Bei E40-pBla handelt es sich um einen Wildtyp, der beide Adhäsine exprimiert.  $\Delta$ Inv-pBla ist eine Mutationsvariante ohne Invasin. Dies ermöglicht eine genauere Untersuchung des verbleibenden Faktors YadA.  $\Delta$ YadA-pBla exprimiert kein YadA, wodurch die Rolle von Invasin besser beurteilt werden kann.  $\Delta$ Inv $\Delta$ YadA-pBla exprimiert weder Invasin noch YadA. Mit diesem Stamm war es möglich die Existenz weiterer potentieller Adhäsionsfaktoren zu untersuchen.

#### 3.1. Relevanz von $\beta 1$ Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von *Ye*

Ob  $\beta 1$  Integrine für Adhäsion und Yop-Translokation von *Ye* essentiell sind, wurde mit  $\beta 1$  defizienten und  $\beta 1$  exprimierenden Fibroblasten untersucht. Bei GD25 $\beta 1^{-/-}$  Fibroblasten ist das  $\beta 1$  Integrin vollständig deletiert. Die GD25 $\beta 1A$  Fibroblasten wurden mit dem humanen  $\beta 1$  Integrin IsoformA stabil transfiziert (Abb. 1).



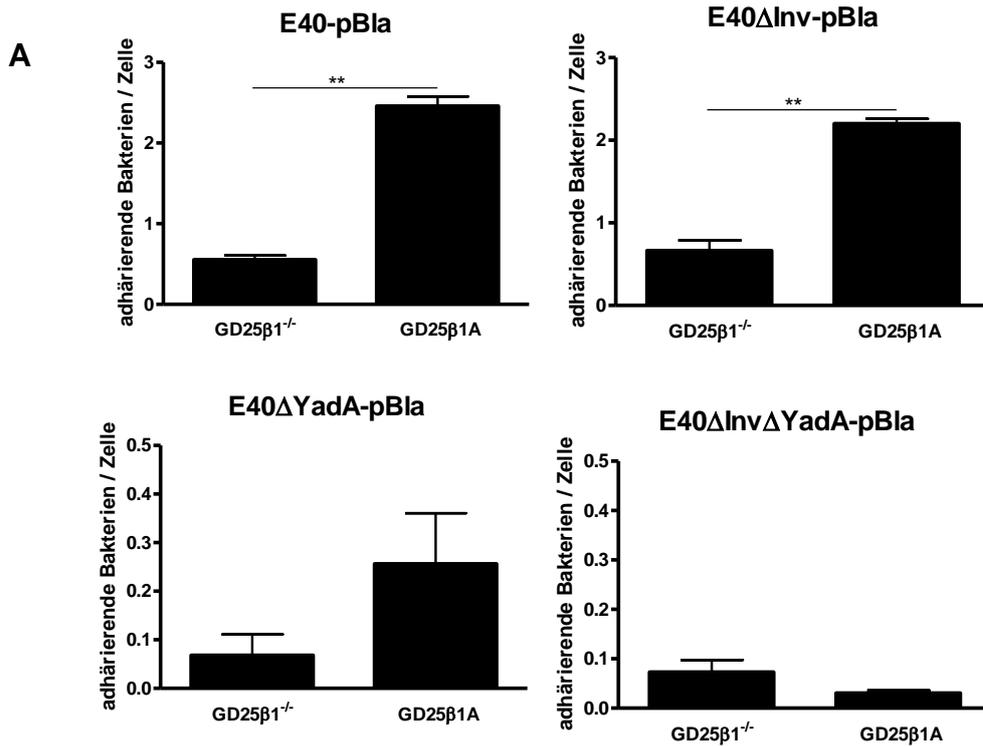
**Abb.1: Verschiedene Formen des humanen  $\beta 1$  Integrins mit denen GD25 Fibroblasten transfiziert wurden**

Diese Abbildung wurde mit freundlicher Erlaubnis von PD Dr. Erwin Bohn übernommen.

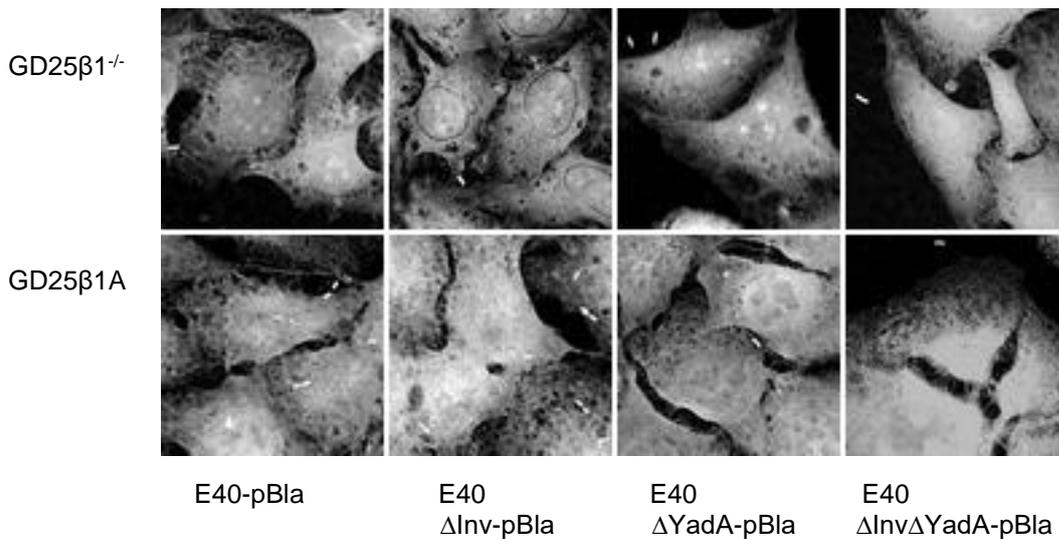
Die GD25 Fibroblasten wurden mit den *Yersinia*-Stämmen E40-pBla,  $\Delta Inv$ -pBla,  $\Delta YadA$ -pBla, und  $\Delta Inv\Delta YadA$ -pBla infiziert. In den Adhäsionsassays wurde für 30 min mit einer MOI von 100 infiziert. Nach Fixierung (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin wurde mikroskopisch ausgewertet wie viele Bakterien pro Zelle adhären. Für die Translokationsassays wurden die Bakterien 2 min mit 300 g auf die Zellen zentrifugiert. Es folgte für 60 min eine Infektion mit einer MOI von 100. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit CCF4 gefärbt und mit der Durchflusszytometrie analysiert (Abb.2).

Die Ergebnisse zeigten, dass nur eine geringgradige Adhäsion und keine Yop Translokation in die  $\beta 1$  defizienten Fibroblasten vermittelt wurde. Im Gegensatz dazu kam es in GD25 $\beta 1A$  Fibroblasten bei Experimenten mit allen *Yersinia*-Stämmen zu hoher Yop-Translokation (ca. 60-80% blaue Zellen), davon ausgenommen war  $\Delta Inv\Delta YadA$ -pBla. Es war auffällig, dass vor allem YadA eine hohe Adhäsion an GD25 $\beta 1A$  Fibroblasten vermittelte ( $\emptyset$  2,201 Bakterien/Zelle), während Invasin ebenfalls Adhäsion vermittelte, jedoch in sehr viel geringerem Ausmaß als YadA ( $\emptyset$  0,257 B/Z). Der große Unterschied in der durch  $\Delta Inv$ -pBla vermittelten Adhäsion im Vergleich zu  $\Delta YadA$ -pBla spiegelte sich so nicht in den Ergebnissen der Experimente zur Yop-Translokation wider und zeigte sich

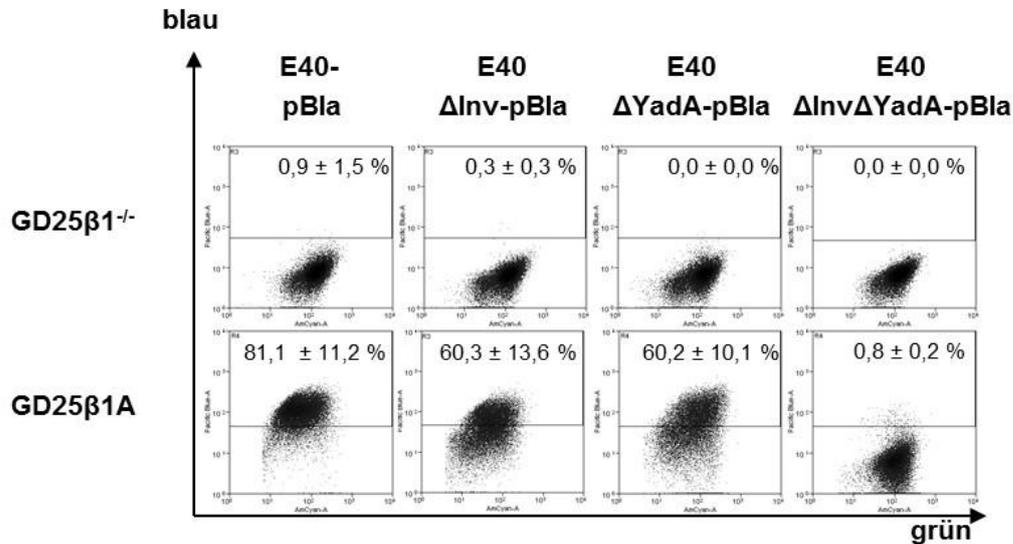
auch in den folgenden Untersuchungen.  $\Delta\text{Inv}\Delta\text{YadA}$ -pBla vermittelte weder Adhäsion noch Yop-Translokation an bzw. in GD25 $\beta$ 1A Fibroblasten. Diese Ergebnisse zeigen die hohe Bedeutung der  $\beta$ 1 Integrine für Adhäsion und Yop-Translokation. Zudem konnte gezeigt werden, dass für die Vermittlung von Adhäsion und Yop-Translokation mindestens einer der beiden Faktoren YadA und/oder Invasin vorhanden sein muss.



**B**



C



**Abb. 2: Einfluss von β1 Integrinen auf Invasin und YadA vermittelte Adhäsion und Yop Injektion bei Fibroblasten**

**A** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an GD25β1<sup>-/-</sup> und GD25β1A Zelllinien (Infektion 30min, MOI 100). Pro Zelllinie wurden 3 Experimente mit jeweils 2 Replikaten durchgeführt, an denen adhärrierenden Bakterien an jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte über einen gepaarten, zweiseitigen T-Test. (\*p< 0,05; \*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001)

**B** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an GD25β1<sup>-/-</sup> und GD25β1A Zelllinien. Nach der Infektion (30min, MOI 100), erfolgte Fixation (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin. Repräsentative Gebiete der mikroskopischen Auswertung werden hier dargestellt.

**C** Yop-Injektion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla in GD25β1<sup>-/-</sup> und GD25β1A Zelllinien (Aufzentrifugieren der Bakterien 2min 300g, Infektion 60min, MOI 100). Nach Färbung mit CCF4 erfolgte die Analyse mit der Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz an blau fluoreszierenden Zellen zeigt die Höhe der Yop-Injektion an. Die abgebildeten Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils mindestens vier Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-Way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest (p<0,001). Die Daten in C wurden von Dr. Birgit Keller zur Verfügung gestellt.

### 3.2. Rolle der Zytoplasmadomäne von $\beta 1$ Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von Ye

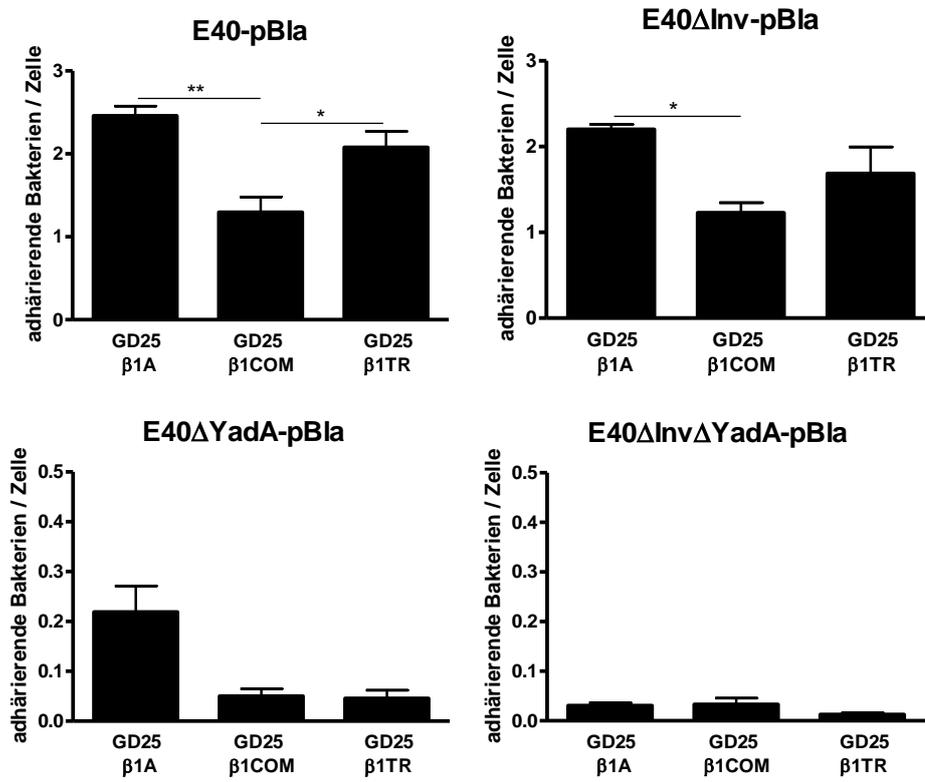
Um die Rolle der Zytoplasmadomäne des  $\beta 1$  Integrins für Adhäsion und Yop Translokation von Ye zu untersuchen, wurden GD25 Fibroblasten mit Mutationen im zytoplasmatischen Teil des  $\beta 1A$  Integrins verwendet. In GD25 $\beta 1COM$  Zellen fehlt der variable distale Teil der  $\beta 1$  Zytoplasmadomäne und somit Bindungsstellen für z.B. Kindlin [128] oder Talin [127]. Nur der proximale Teil, der bei allen  $\beta 1$  Integrinen gleich ist, wird exprimiert. Bei GD25 $\beta 1TR$  Fibroblasten ist die ganze Zytoplasmadomäne des  $\beta 1$  Integrins deletiert (Abb.1). GD25 $\beta 1A$ , GD25 $\beta 1COM$  oder GD25 $\beta 1TR$  Fibroblasten wurden mit den Bakterienstämmen E40-pBla,  $\Delta Inv$ -pBla,  $\Delta YadA$ -pBla oder  $\Delta Yad\Delta Inv$ -pBla infiziert und die Adhäsion an Zellen bzw. die Yop Translokation in Zellen bestimmt. In den Adhäsionsassays erfolgte die Infektion für 30 min mit einer MOI von 100. Nach Fixierung (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin, wurde mikroskopisch ausgewertet. Für die Translokationsassays wurden die Bakterien 2 min mit 300g auf die Zellen zentrifugiert. Es folgte für 60 min eine Infektion mit einer MOI von 100. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit CCF4 gefärbt und mit der Durchflusszytometrie analysiert (Abb.3).

Sowohl nach Infektion mit E40-pBla als auch mit  $\Delta Inv$ -pBla war die Adhäsion von Yersinien an GD25 $\beta 1COM$  Zellen im Vergleich zu GD25 $\beta 1A$  Zellen signifikant niedriger (ca. 50%) während die Adhäsion dieser Stämme an GD25 $\beta 1A$  und GD25 $\beta 1TR$  Zellen vergleichbar war (Abb. 3 A, B). Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass der zytoplasmatische Teil des  $\beta 1$  Integrins eine gewisse, wenn auch untergeordnete Bedeutung für YadA vermittelte Adhäsion hat. Nach Infektion von GD25 $\beta 1A$  Zellen mit  $\Delta YadA$ -pBla konnte eine viel geringere Adhäsion nachgewiesen werden als nach Infektion mit  $\Delta Inv$ -pBla. Außerdem adhärierte der  $\Delta YadA$ -pBla Stamm kaum noch an GD25 $\beta 1COM$  bzw. GD25 $\beta 1TR$  Zellen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Yersinien via Invasin wesentlich schlechter an die Fibroblasten binden als via YadA. Die zytoplasmatischen Domänen der  $\beta 1$  Integrine spielen nur eine kleine Rolle für die YadA vermittelte Adhäsion, bezüglich der Invasin

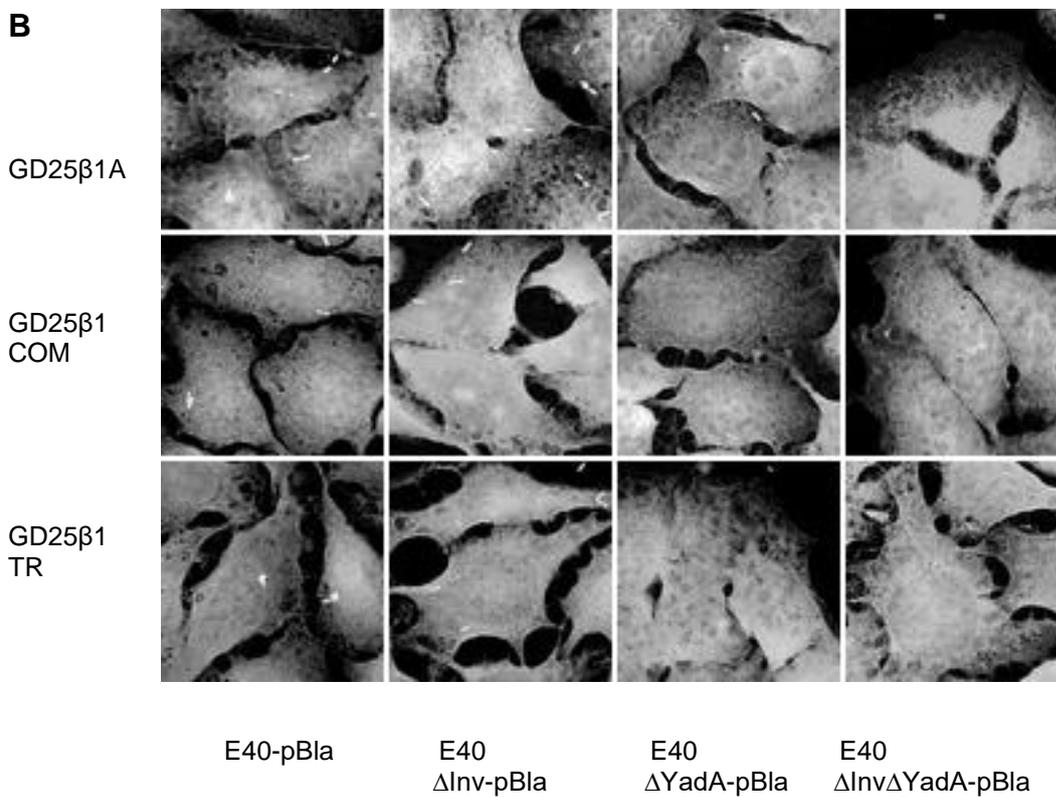
vermittelten Adhäsion kann aufgrund zu geringer Adhärenzzahlen keine signifikante Aussage getroffen werden, eine intakte Zytoplasmadomäne erscheint hier aber essentiell für Adhäsion zu sein.

Die Yop-Injektion zeigte für YadA ähnliche Ergebnisse: YadA vermittelte Yop-Injektion in GD25 $\beta$ 1COM und GD25 $\beta$ 1TR Zellen war im Vergleich zur Yop-Injektion in GD25 $\beta$ 1A Fibroblasten um ca. die Hälfte reduziert. Invasin konnte bei nicht intakter Zytoplasmadomäne des  $\beta$ 1 Integrins kaum Yop-Translokation vermitteln (Abb. 3 C).

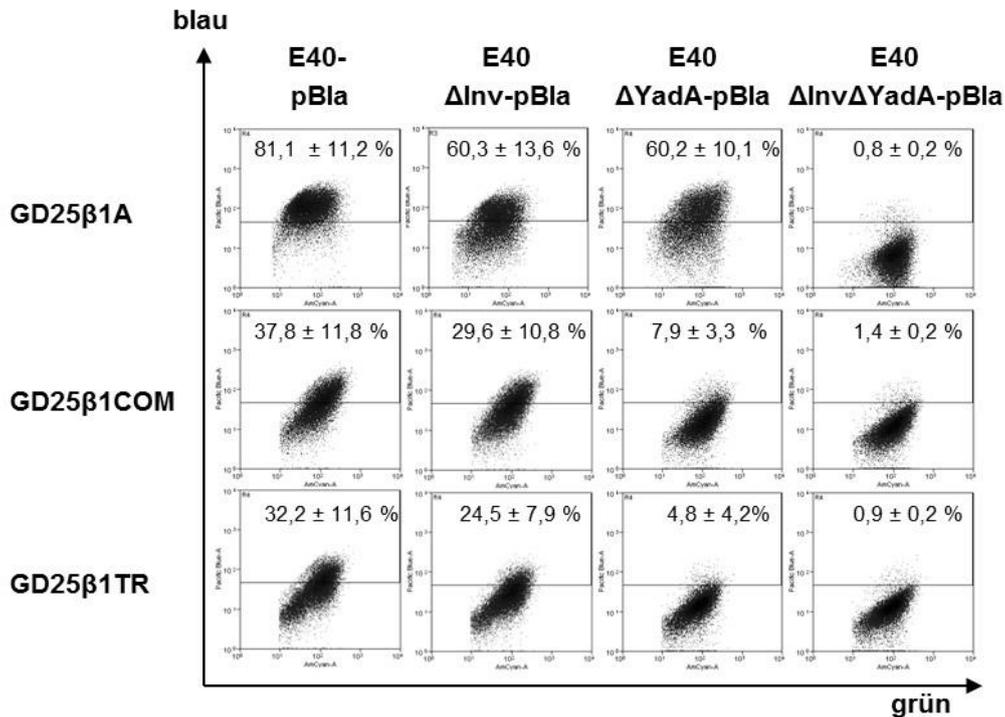
**A**



**B**



C



**Abb. 3: Einfluss der zytoplasmatischen Domänen von  $\beta 1$  Integrinen auf Adhäsion und Yop-Injektion an bzw. in Fibroblasten**

**A** Adhäsion von E40-pBla, E40 $\Delta$ Inv-pBla, E40 $\Delta$ YadA-pBla und E40 $\Delta$ Inv $\Delta$ YadA-pBla an GD25 $\beta$ 1A, GD25 $\beta$ 1COM und GD25 $\beta$ 1TR Zelllinien (Infektion 30min, MOI 100). Pro Zelllinie wurden 5 Experimente mit jeweils 2 Replikaten durchgeführt, an denen adhären den Bakterien an jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem One-Way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

**B** Adhäsion von E40-pBla, E40 $\Delta$ Inv-pBla, E40 $\Delta$ YadA-pBla und E40 $\Delta$ Inv $\Delta$ YadA-pBla an GD25 $\beta$ 1A, GD25 $\beta$ 1COM und GD25 $\beta$ 1TR Zelllinien. Nach der Infektion (30 min, MOI 100), erfolgte Fixation (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin. Repräsentative Gebiete der mikroskopischen Auswertung werden hier dargestellt.

**C** Yop-Injektion von E40-pBla, E40 $\Delta$ Inv-pBla, E40 $\Delta$ YadA-pBla und E40 $\Delta$ Inv  $\Delta$ YadA- pBla in GD25 $\beta$ 1A, GD25 $\beta$ 1COM und GD25 $\beta$ 1TR Zelllinien (Aufzentrifugieren der Bakterien 2min 300g Infektion 60min, MOI 100). Nach Färbung mit CCF4 erfolgte die Analyse mit der Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz an blau fluoreszierenden Zellen zeigt die Höhe der Yop-Injektion an. Die abgebildeten Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils mindestens vier Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-Way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest ( $p < 0,001$ ). Die Daten in C wurden von Dr. Birgit Keller zur Verfügung gestellt.

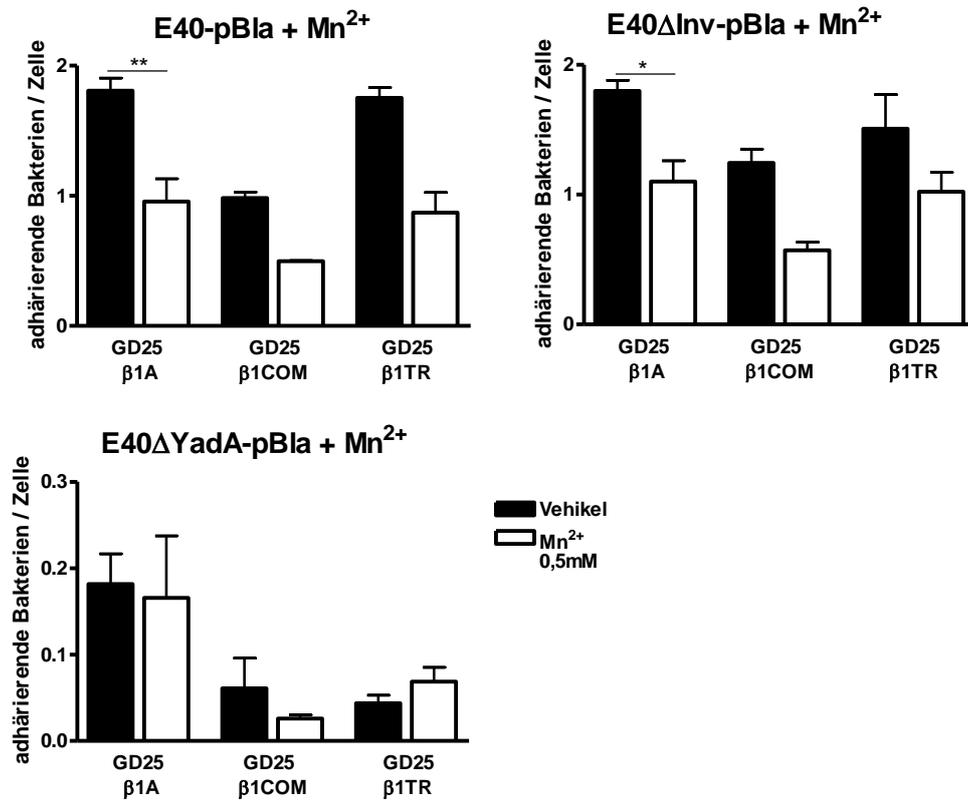
### 3.3. Effekt von $Mn^{2+}$ induzierter $\beta 1$ Integrin Aktivierung für Adhäsion und Yop-Translokation von Ye

$Mn^{2+}$ -Ionen binden an die metal-ion-dependent-adhesion-site (MIDAS) von  $\beta 1$  Integrinen und induzieren dadurch  $\beta 1$  Integrin Aktivierung, was eine höhere Ligandenbindungsaffinität zur Folge hat [175, 176]. GD25 $\beta 1A$ , GD25 $\beta 1COM$  und GD25 $\beta 1TR$  Fibroblasten wurden 1 h vor sowie während der Infektion mit Ye mit 0,5 mM Mangansulfat inkubiert. Als Vehikelkontrolle diente Wasser. In den Adhäsionsassays wurde für 30 min mit einer MOI von 100 infiziert. Nach Fixierung (4%PFA) und Färbung mit Fuchsin, wurde mikroskopisch ausgewertet. Für die Translokationsassays wurden die Bakterien 2 min mit 300g auf die Zellen zentrifugiert. Es folgte für 60 min eine Infektion mit einer MOI von 100. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit CCF4 gefärbt und mit der Durchflusszytometrie analysiert.

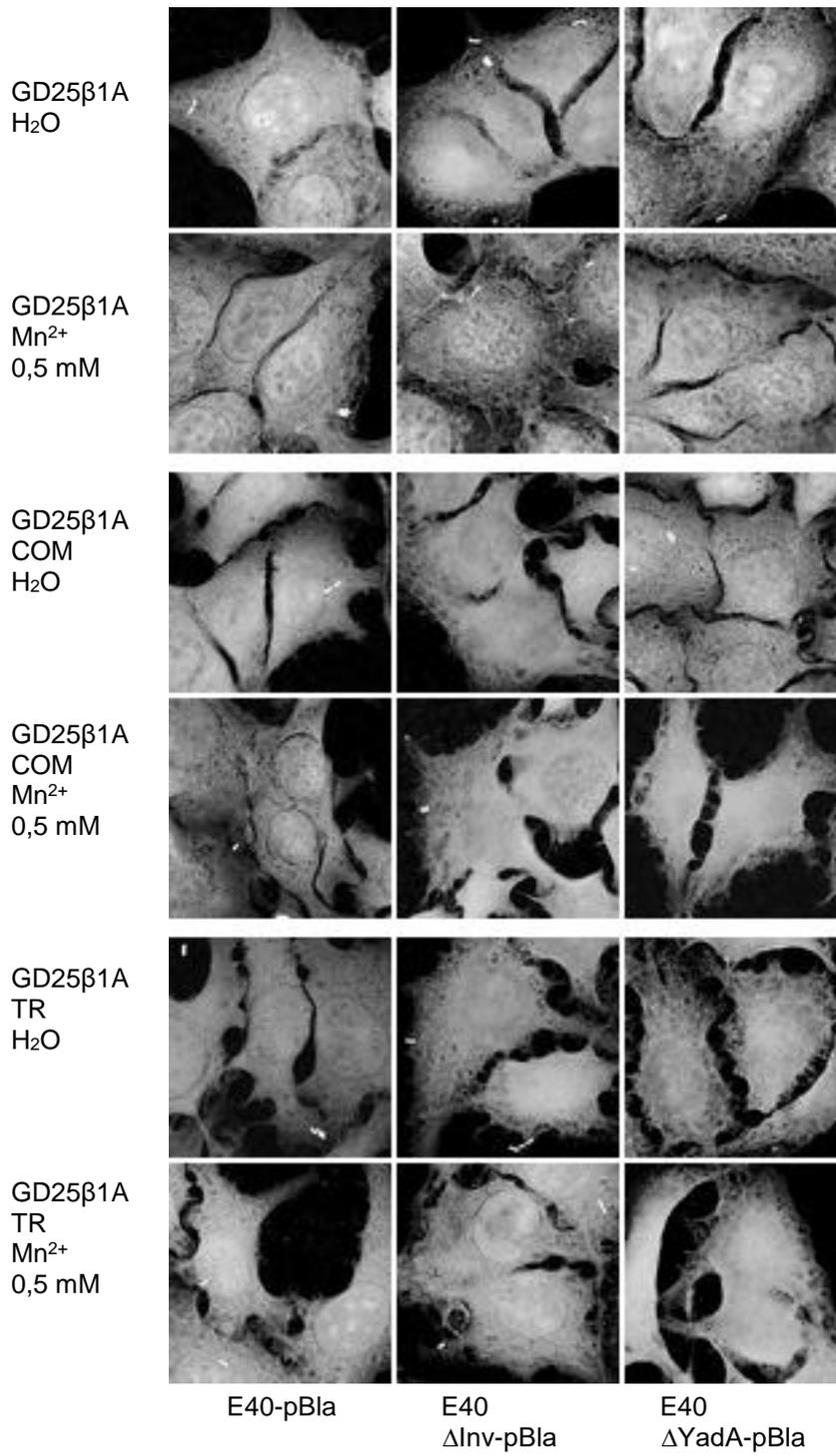
Der Einfluss von Mangansulfat reduzierte die Adhäsion von E40-pBla und  $\Delta Inv$ -pBla an diese Zelllinien, jedoch nicht die Adhäsion von  $\Delta YadA$ -pBla (Abb. 4 A, B).

Die Yop-Translokation von E40-pBla,  $\Delta Inv$ -pBla und  $\Delta YadA$ -pBla konnte durch  $Mn^{2+}$ -induzierte Aktivierung der  $\beta 1$  Integrine in alle Zellen gesteigert werden. Dieser Effekt war besonders deutlich in GD25 $\beta 1COM$  und GD25 $\beta 1TR$  Fibroblasten zu sehen. Hier kam es zu einer Steigerung der Yop-Translokation um ca. 50% (Abb. 4 C). Dieses Ergebnis zeigt eine Auswirkung der Aktivierung von  $\beta 1$  Integrinen auf die Yop-Translokation, welche sich dadurch steigern lässt. In der Adhäsion spiegelt sich dies jedoch nicht wieder.

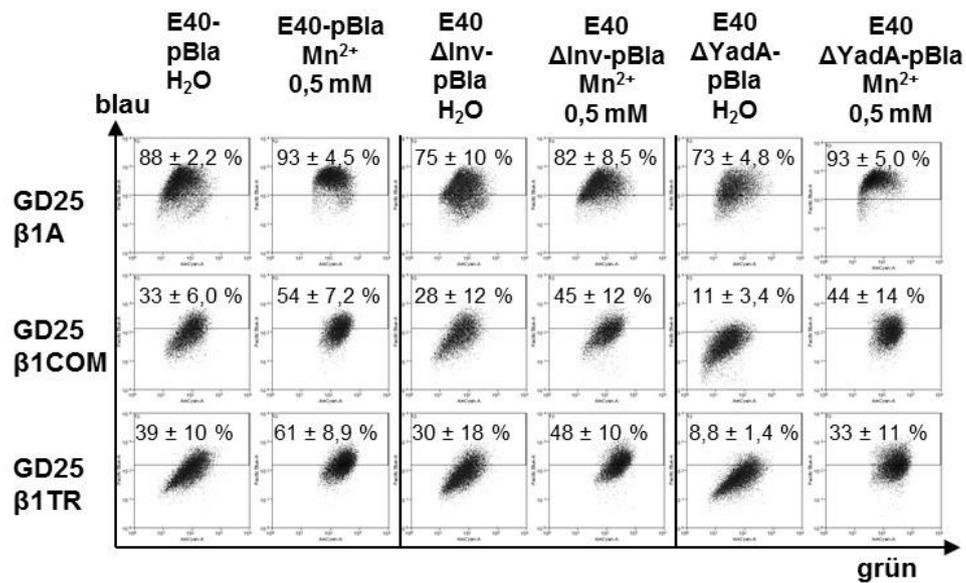
A



**B**



C



#### Abb. 4: Einfluss von Mn<sup>2+</sup>-Ionen auf Adhäsion und Yop Injektion

Die Experimente wurden jeweils unter Vorinkubation mit 0,5 mM MnSO<sub>4</sub> (0,5 mM beginnend 1h vor Infektion) und zur Kontrolle mit der gleichen Menge an Milliporwasser durchgeführt.

**A** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla und E40ΔYadA-pBla an GD25β1A, GD25β1COM und GD25β1TR Zelllinien (Infektion 30min, MOI 100). Die Zellen wurden mit 0,5 mM MnSO<sub>4</sub> für eine Stunde vorbehandelt. Als Vehikelkontrolle diente Wasser. Es wurden 3 Experimente mit jeweils 2 Replikaten durchgeführt (Ausnahme GD25β1COM Zelllinie mit 2 Experimenten und jew. 2 Replikaten). Adhärierende Bakterien an jeweils 100 Zellen pro Experiment wurden ausgezählt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen gepaarten, zweiseitigen T-Test. (\*p< 0,05; \*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001)

**B** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla und E40ΔYadA-pBla an GD25β1A, GD25β1COM und GD25β1TR Zelllinien. Infektion erfolgte für 30min, MOI 100, Fixation mit 4% PFA und Färbung mit Fuchsin. Repräsentative Gebiete der mikroskopischen Auswertung von Experimenten mit und ohne MnSO<sub>4</sub> Vorbehandlung werden gegenübergestellt.

**C** Yop-Injektion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla und E40ΔYadA-pBla in GD25β1A, GD25β1COM und GD25β1TR Zelllinien (Aufzentrifugieren der Bakterien 2min 300g Infektion 60min, MOI 100). Nach Färbung mit CCF4 erfolgte die Analyse mit der Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz an blau fluoreszierenden Zellen zeigt die Höhe der Yop-Injektion an. Die abgebildeten Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils mindestens vier Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-Way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest (p<0,001). Die Daten in C wurden von Dr. Birgit Keller zur Verfügung gestellt.

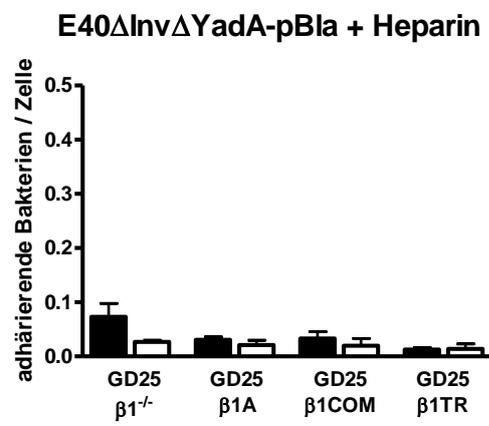
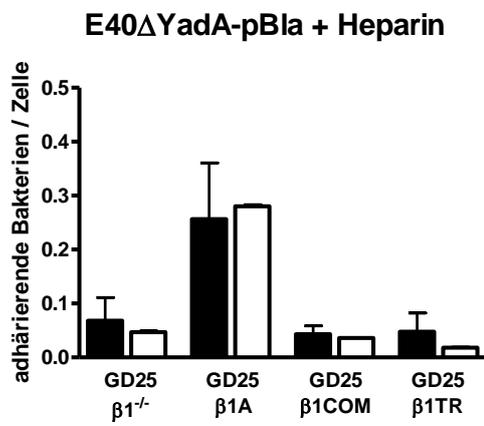
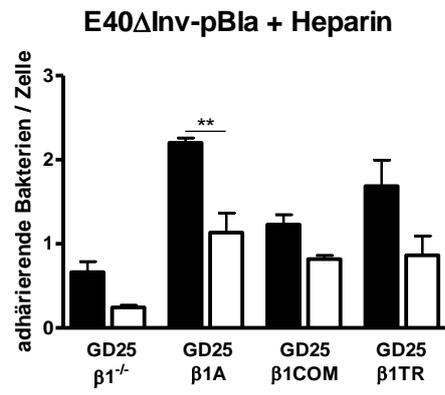
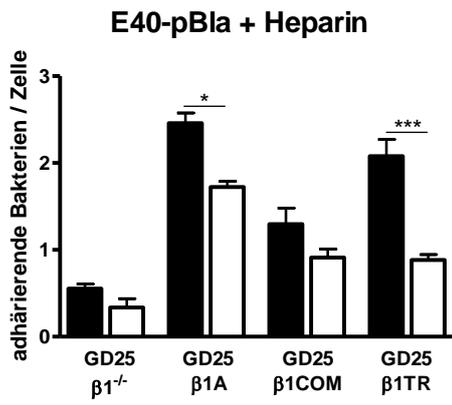
### 3.4. Bedeutung von Heparan Sulfat Proteoglykanen für Adhäsion und Yop-Translokation von *Ye*

Untersucht wurde hier, ob Heparin sowohl die YadA als auch die Invasin vermittelte Adhäsion beeinflussen kann. GD25 $\beta$ 1<sup>-/-</sup>, GD25 $\beta$ 1A, GD25 $\beta$ 1COM und GD25 $\beta$ 1TR Fibroblasten wurden eine Stunde vor und während der Infektion mit verschiedenen *Yersinia*-Stämmen mit einer Konzentration von 1mg/ml Heparin inkubiert. Als Vehikelkontrolle diente Wasser. Infektion in den Adhäsionsassays wurde für 30 min mit einer MOI von 100 durchgeführt. Nach Fixierung (4%PFA) und Färbung mit Fuchsin, wurde mikroskopisch ausgewertet. Für die Translokationsassays wurden die Bakterien 2 min mit 300g auf die Zellen zentrifugiert. Es folgte für 60 min eine Infektion mit einer MOI von 100. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit CCF4 gefärbt und mit der Durchflusszytometrie analysiert.

Nach Infektion mit E40-pBla und  $\Delta$ Inv-Bla war die Adhäsion nach Heparinbehandlung an GD25 $\beta$ 1A Fibroblasten signifikant, an GD25 $\beta$ 1COM Fibroblasten nicht signifikant und an GD25 $\beta$ 1TR Fibroblasten zumindest für E40-pBla signifikant reduziert. Bei Infektion mit  $\Delta$ YadA-pBla hatte Heparin keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle (Abb. 5 A, B).

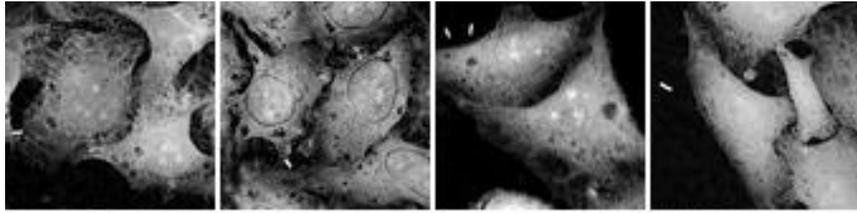
Die Untersuchung der Yop-Translokation mit den gleichen *Yersinia*-Stämmen ergab ähnliche Ergebnisse für E40-pBla und  $\Delta$ Inv-Bla: Heparin konnte YadA vermittelte Yop-Translokation sowohl an GD25 $\beta$ 1A als auch GD25 $\beta$ 1COM Fibroblasten verringern. Heparin hatte jedoch keinen Einfluss auf die Invasin vermittelte Yop-Translokation (Abb. 5 C).

A

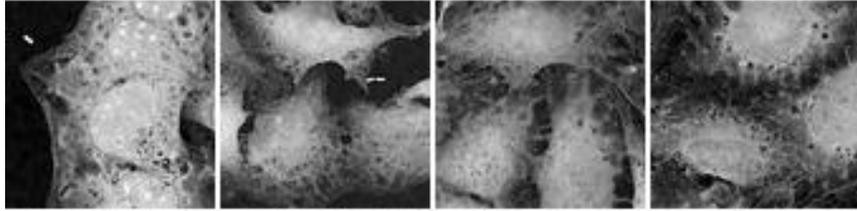


**B**

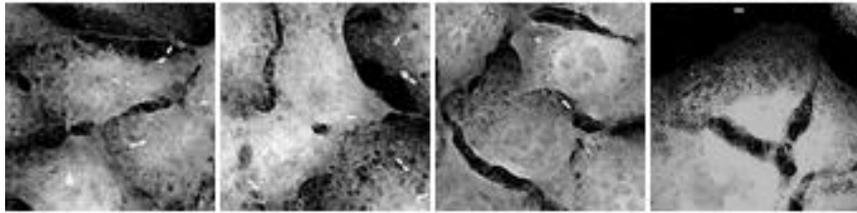
GD25 $\beta$ 1<sup>-/-</sup>  
Kontrolle



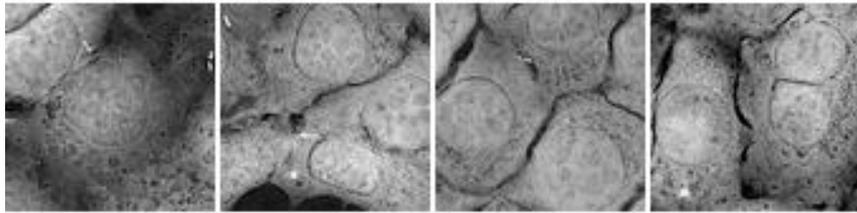
GD25 $\beta$ 1<sup>-/-</sup>  
1 mg/ml  
Heparin



GD25 $\beta$ 1A  
Kontrolle



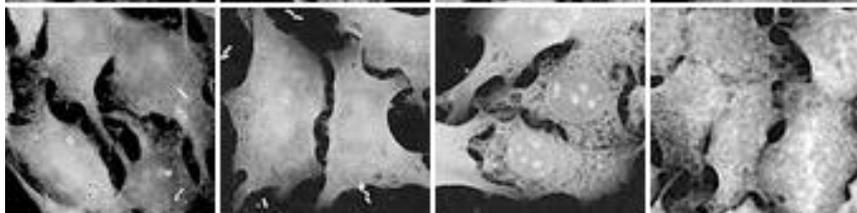
GD25 $\beta$ 1A  
1 mg/ml  
Heparin



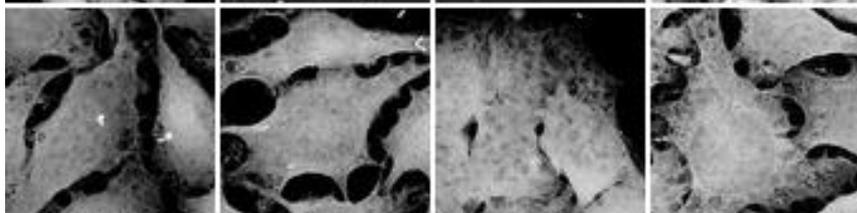
GD25 $\beta$ 1A  
COM  
Kontrolle



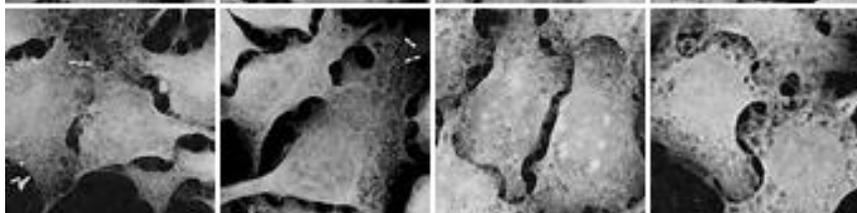
GD25 $\beta$ 1A  
COM  
1 mg/ml  
Heparin



GD25 $\beta$ 1A  
TR  
Kontrolle



GD25 $\beta$ 1A  
TR  
1 mg/ml  
Heparin



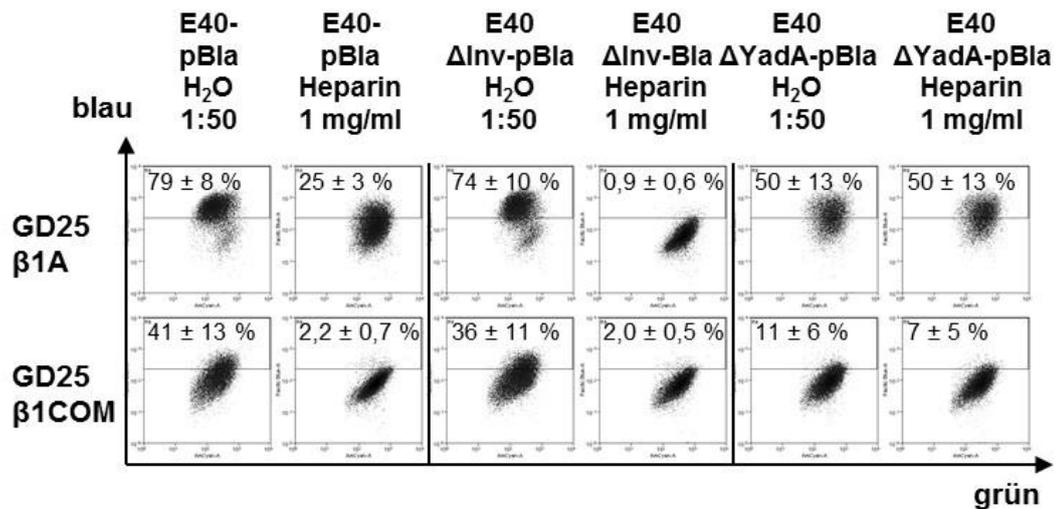
E40-pBla

E40  $\Delta$ Inv-pBla

E40 $\Delta$ YadA-pBla

E40 $\Delta$ Inv $\Delta$ YadA-pBla

C



**Abb.5: Einfluss von Heparin auf Adhäsion und Yop Injektion.**

**A** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an GD25β1<sup>-/-</sup>, GD25β1A, GD25β1COM und GD25β1TR Fibroblasten (Infektion 30min, MOI 100). Die Zellen wurden eine Stunde vor Infektion mit 1mg/ml Heparin inkubiert. Als Vehikelkontrolle diente Wasser. Es wurden 3 Experimente mit jeweils 2 Replikaten durchgeführt. Adhärierende Bakterien an jeweils 100 Zellen pro Experiment wurden ausgezählt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen gepaarten, zweiseitigen T-Test. (\*p< 0,05; \*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001)

**B** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an GD25β1<sup>-/-</sup>, GD25β1A, GD25β1COM und GD25β1TR Zelllinien. Nach der Infektion (30 min, MOI 100), erfolgte Fixation (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin. Repräsentative Gebiete der mikroskopischen Auswertung von Experimenten mit und ohne Heparinbehandlung werden gegenübergestellt.

**C** Yop-Injektion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla in GD25β1A und GD25β1COM Zelllinien (Aufzentrifugieren der Bakterien 2min 300g, Infektion 60min, MOI 100). Nach Färbung mit CCF4 erfolgte die Analyse mit der Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz an blau fluoreszierenden Zellen zeigt die Höhe der Yop-Injektion an. Die abgebildeten Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils mindestens vier Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-Way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest (p<0,001). Daten in C wurden von Dr. Birgit Keller zur Verfügung gestellt.

### **3.5. Bedeutung der Signaltransduktion am proximalen NPXY Motiv von $\beta$ 1 Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von *Ye***

Die Zytoplasmadomäne der  $\beta$ 1 Integrine enthält mehrere wichtige Phosphorylierungsstellen, unter anderem ein proximales NPXY Motiv, an dem Talin binden kann [127]. Zur Untersuchung der Relevanz von Signaltransduktion über dieses NPXY Motiv für Adhäsion und Yop-Translokation von *Ye* wurden YY>AY Fibroblasten mit verändertem proximalem NPXY-Motiv verwendet. Tyrosin (Y<sub>783</sub>) wurde durch Alanin ersetzt und so eine Phosphorylierung und Talinbindung an dieser Stelle verhindert (Abb. 6). Zum Vergleich erfolgte das Experiment mit YY>YY Fibroblasten ohne diese Mutation. In den Adhäsionsassays wurde für 30 min mit einer MOI von 100 infiziert. Nach Fixierung (4%PFA) und Färbung mit Fuchsin, wurde mikroskopisch ausgewertet. Für die Translokationsassays wurden die Bakterien 2 min mit 300g auf die Zellen zentrifugiert. Es folgte für 60 min eine Infektion mit einer MOI von 100. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit CCF4 gefärbt und mit der Durchflusszytometrie analysiert.

Auf die Adhäsion von *Ye* hatte die Veränderung des proximalen NPXY Motivs keinen signifikanten Einfluss (Abb. 7 A, B).

Die Invasin vermittelte Yop-Translokation in YY>AY Fibroblasten war leicht reduziert. Die YadA vermittelte Yop-Translokation zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Zelllinien (Abb. 7 C).

Das Ergebnis zeigt somit, dass die alleinige Mutation der beschriebenen Talinbindungsstelle keinen Einfluss auf Adhäsion und Yop-Translokation hat und weitere Bindungsstellen oder andere Adaptorproteine dies ausgleichen können.

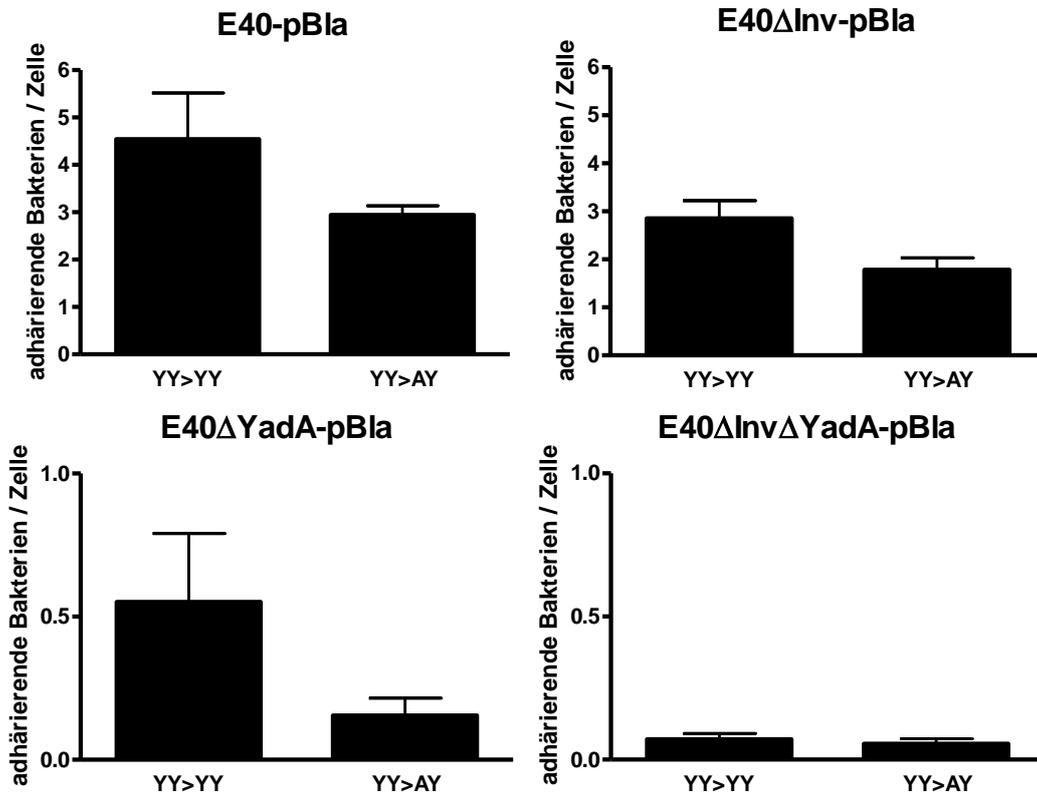


**Abb. 6: Veränderte Talinbindungsstelle im Zytoplasmaende des  $\beta$ 1A Integrin**

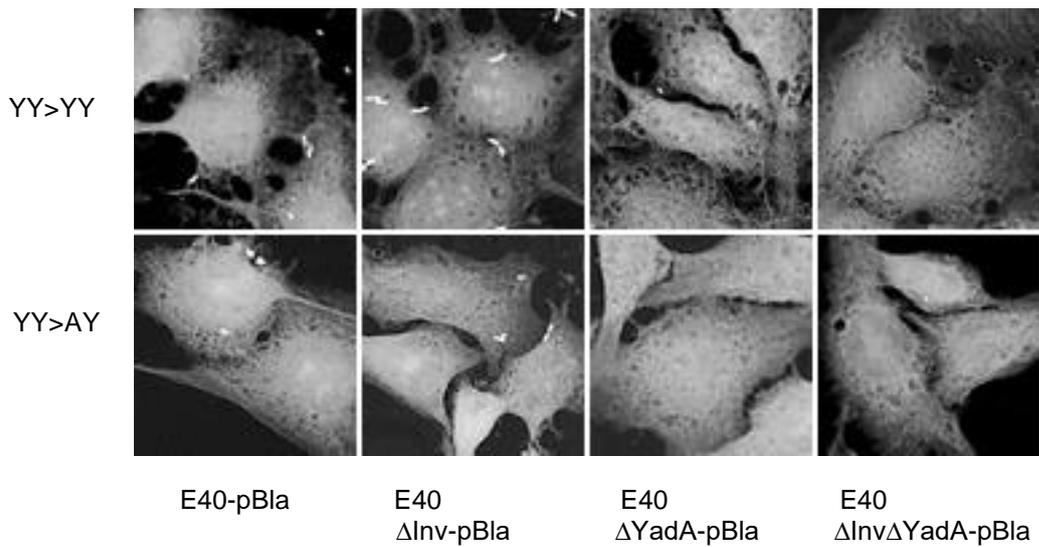
Die Talinbindungsstelle am proximalen NPXY-Motiv des zytoplasmatischen Ende des  $\beta$ 1A Integrin wurde durch einen Tausch der Aminosäuren Tyrosin gegen Alanin in seiner Struktur verändert, so dass dort eine Phosphorylierung und Talinbindung nicht mehr möglich war.

Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Erwin Bohn übernommen.

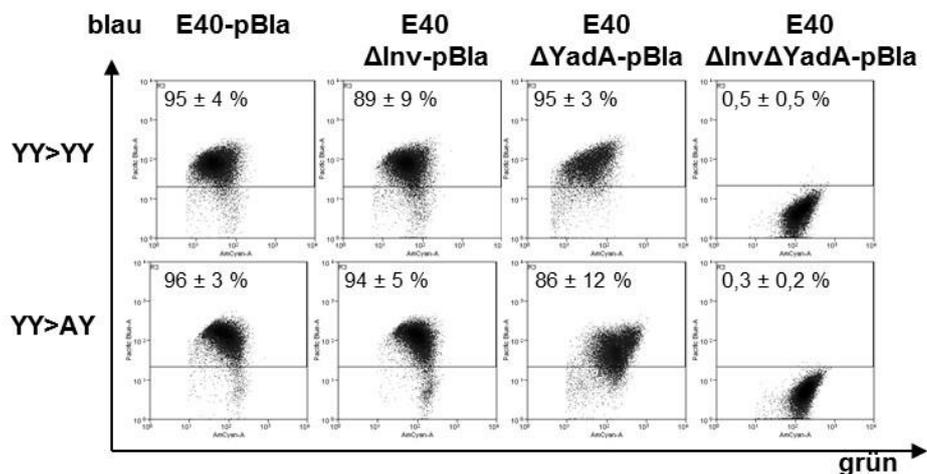
**A**



**B**



C



**Abb. 7: Bedeutung von NPXY Motiven für Invasin und YadA vermittelte Adhäsion und Yop-Injektion an bzw. in Fibroblasten**

**A** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an YY>YY und YY>AY Fibroblasten (Infektion 30min, MOI 100). Pro Zelllinie 3 Experimente mit jew. 3 Replikaten durchgeführt an denen adhätierenden Bakterien an jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte über einen gepaarten, zweiseitigen T-Test. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

**B** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an YY>YY und YY>AY Fibroblasten. Nach der Infektion (30 min, MOI 100), erfolgte Fixation (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin. Repräsentative Gebiete der mikroskopischen Auswertung werden hier dargestellt.

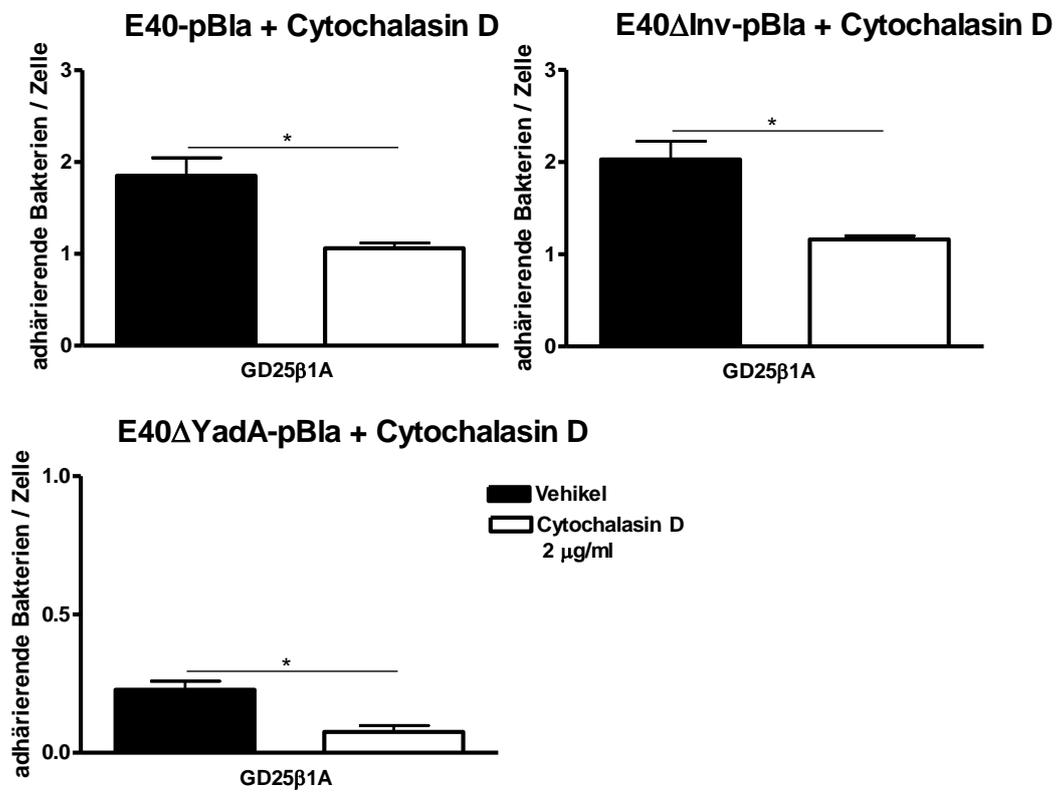
**C** Yop-Injektion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla in YY>YY und YY>AY Fibroblasten (Aufzentrifugieren der Bakterien 2min 300g, Infektion 60min, MOI 100). Nach Färbung mit CCF4 erfolgte die Analyse mit der Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz an blau fluoreszierenden Zellen zeigt die Höhe der Yop-Injektion an. Die abgebildeten Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils mindestens vier Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-Way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest (p<0,001). Daten in C wurden von Dr. Birgit Keller zur Verfügung gestellt.

### **3.6. Bedeutung des Aktinzytoskeletts für Adhäsion und Yop-Translokation von Ye**

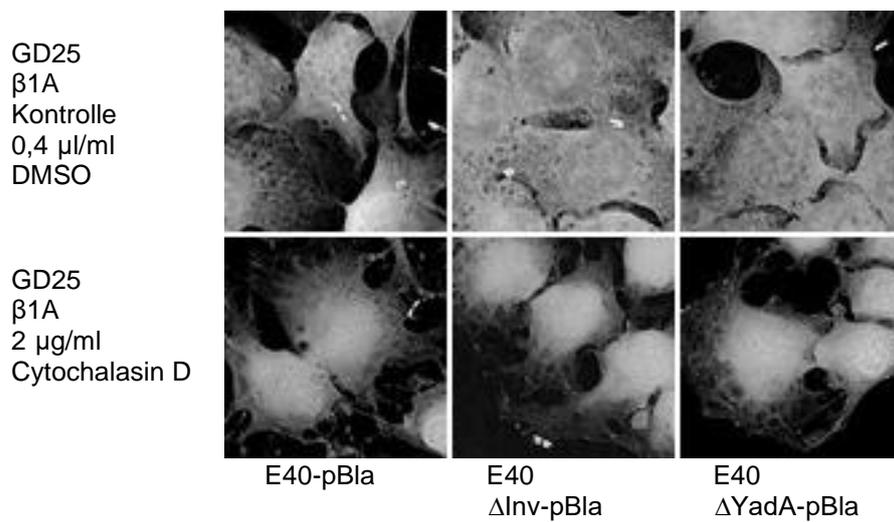
Um die Rolle der Polymerisierung des Aktinzytoskeletts von Wirtszellen für Adhäsion und Yop-Translokation von Ye zu untersuchen, wurde die Aktinpolymerisierung in GD25 $\beta$ 1A Fibroblasten mit Cytochalasin D inhibiert [177]. Die Zellen wurden 2 h vor, sowie während der Infektion mit Ye einer Konzentration von 2  $\mu$ g/ml Cytochalasin D ausgesetzt. Kontrollexperimente wurden mit dem gleichen Volumen DMSO durchgeführt. In den Adhäsionsassays erfolgte die Infektion für 30 min mit einer MOI von 100. Nach Fixierung (4%PFA) und Färbung mit Fuchsin, wurde mikroskopisch ausgewertet. Für die Translokationsassays wurden die Bakterien 2 min mit 300g auf die Zellen zentrifugiert. Es folgte für 60 min eine Infektion mit einer MOI von 100. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit CCF4 gefärbt und mit der Durchflusszytometrie analysiert.

Die Adhäsion von E40-pBla,  $\Delta$ Inv-pBla und  $\Delta$ YadA-pBla war unter Cytochalasin D Einfluss um ca. 50% reduziert (Abb. 8 A, B). Im Gegensatz dazu war nur die Invasin, nicht aber die YadA vermittelte Yop-Translokation von einer Inhibierung der Aktinpolymerisierung mit Cytochalasin D betroffen (Abb. 8 C). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein funktionelles Aktinzytoskelett sowohl die Invasin als auch die YadA vermittelte Adhäsion verbessert. Eine Hemmung der Polymerisation des Aktinzytoskeletts hat jedoch nur Auswirkungen auf die Invasin vermittelte Yop Translokation.

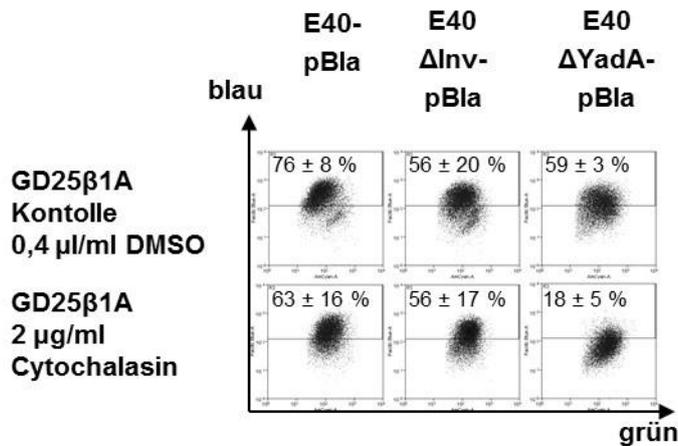
**A**



**B**



C



### Abb. 8: Bedeutung von Aktin für Invasin und YadA vermittelte Adhäsion und Yop Injektion

Die Experimente wurden jeweils unter Cytochalasin D Einfluss (2 μg/ml) und vergleichend mit 0,4 μl/ml DMSO, beginnend 2h vor und während der Infektion durchgeführt.

**A** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla und E40ΔYadA-pBla an GD25β1A Fibroblasten (Infektion 30min, MOI 100). Die Zellen wurden 2h vor Infektion mit 2 μg/ml Cytochalasin D vorbehandelt. Als Vehikelkontrolle wurde 0,4 μl/ml DMSO verwendet. Es wurden 3 Experimente mit je 3 Replikaten durchgeführt. Adhärierende Bakterien an jeweils 100 Zellen pro Experiment wurden ausgezählt. Die statistische Auswertung erfolgte über einen gepaarten, zweiseitigen T-Test. (\*p< 0,05; \*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001)

**B** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla und E40ΔYadA-pBla an GD25β1A Fibroblasten. Nach der Infektion (30 min, MOI 100), erfolgte Fixation (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin. Repräsentative Gebiete der mikroskopischen Auswertung von Experimenten mit und ohne Cytochalasin D Behandlung werden gegenübergestellt.

**C** Yop-Injektion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla in GD25β1A Fibroblasten (Aufzentrifugieren der Bakterien 2min 300g, Infektion 60min, MOI 100). Nach Färbung mit CCF4 erfolgte die Analyse mit der Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz an blau fluoreszierenden Zellen zeigt die Höhe der Yop-Injektion an. Die abgebildeten Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils mindestens vier Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-Way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest (p<0,001). Daten in C wurden von Dr. Birgit Keller zur Verfügung gestellt.

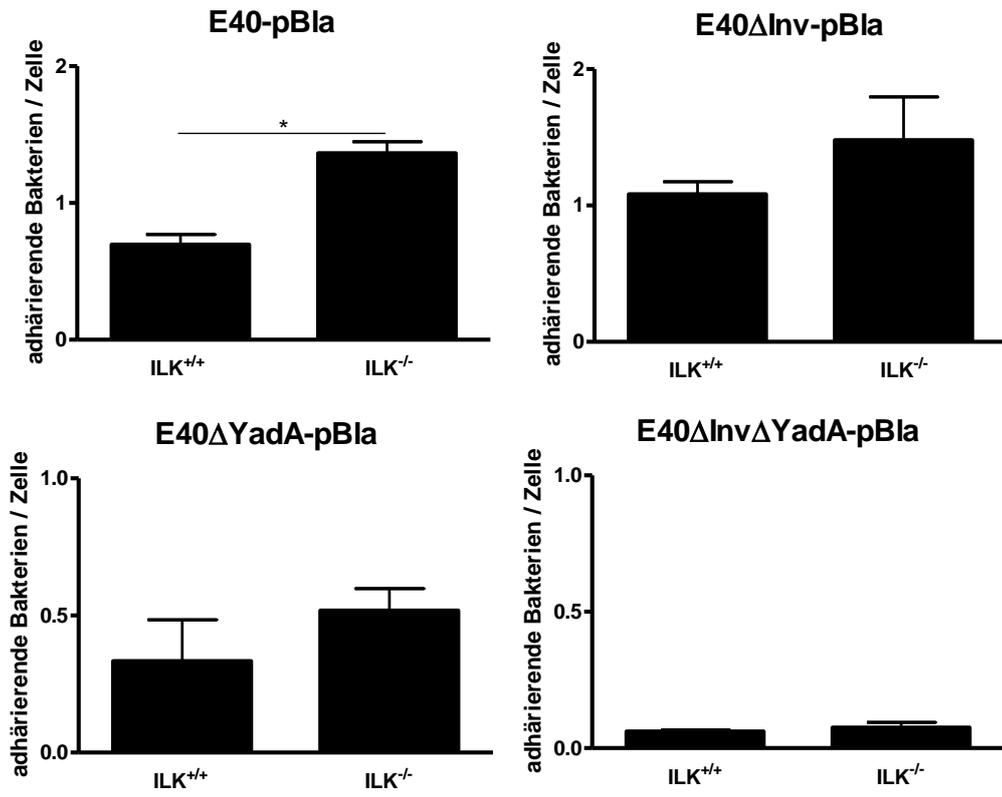
### **3.7. Bedeutung der Signaltransduktion von $\beta$ 1 Integrinen über die Integrin Linked Kinase für Adhäsion und Yop-Translokation von *Ye***

Die Integrin Linked Kinase (ILK) verbindet Integrine indirekt mit dem Aktinzytoskelett [153] und ist an Regulation und Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt [154]. Um die Rolle der Signaltransduktion von  $\beta$ 1 Integrinen über diese Kinase für Adhäsion und Yop-Translokation von *Ye* zu untersuchen, wurden ILK defiziente fibroblastoide Nierenzellen verwendet. Zum Vergleich wurde Adhäsion und Yop-Translokation von *Ye* mit fibroblastoide Nierenzellen untersucht, die ILK exprimierten. In den Adhäsionsassays wurde für 30 min mit einer MOI von 100 infiziert. Nach Fixierung (4%PFA) und Färbung mit Fuchsin, wurde mikroskopisch ausgewertet. Für die Translokationsassays wurden die Bakterien 2 min mit 300g auf die Zellen zentrifugiert. Es folgte für 60 min eine Infektion mit einer MOI von 100. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit CCF4 gefärbt und mit der Durchflusszytometrie analysiert.

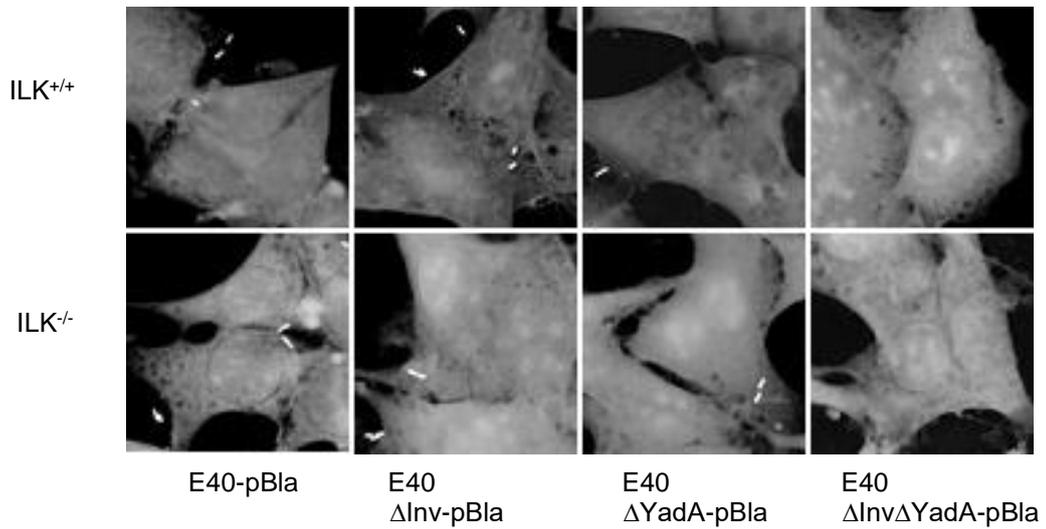
Für die Adhäsion spielte eine ILK Depletion nur eine geringe Rolle. An ILK<sup>-/-</sup> Zellen kam es durch E40-pBla sogar zu einer etwas höheren Adhäsion als an ILK<sup>+/+</sup> Zellen. Für Invasin vermittelte Adhäsion ergab sich kein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien, ebenso wenig für YadA vermittelte Adhäsion. Yop-Translokation in ILK<sup>+/+</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zellen konnte fast nur durch Invasin vermittelt werden. Eine fehlende ILK Expression beeinträchtigte die Invasin vermittelte Yop-Translokation dabei nicht (Abb. 9 C).

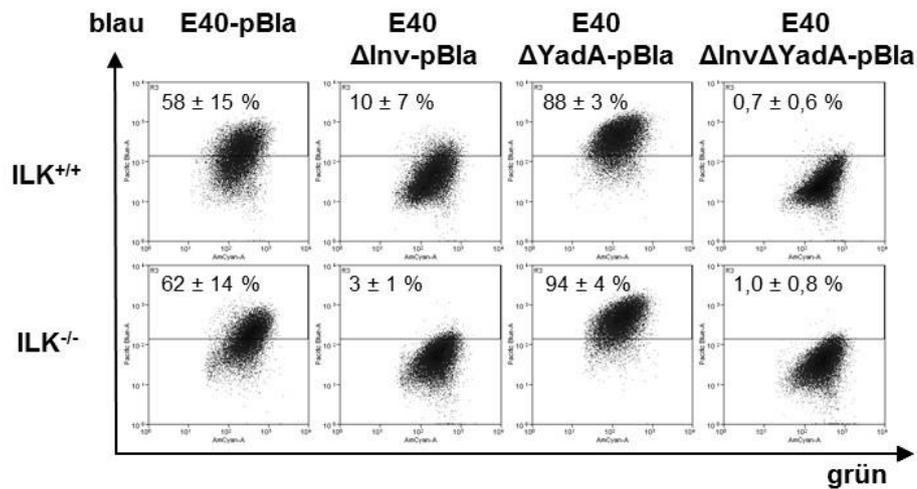
Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, dass die  $\beta$ 1 Integrin exprimierenden ILK<sup>+/+</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zellen noch zusätzliche Faktoren auf der Wirtsseite brauchen damit YadA vermittelte Yop Translokation funktionieren kann.

**A**



**B**



**C**

### Abb. 9: Rolle von ILK für Invasin und YadA vermittelte Adhäsion und Yop-Injektion

**A** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an ILK<sup>+/+</sup> und ILK<sup>-/-</sup> (Infektion 30min, MOI 100). Pro Zelllinie wurden 3 Experimente mit jeweils 3 Replikaten durchgeführt, an denen adhären den Bakterien an jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte über einen gepaarten, zweiseitigen T-Test. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

**B** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an ILK<sup>+/+</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zelllinien. Nach der Infektion (30 min, MOI 100), erfolgte Fixation (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin. Repräsentative Gebiete der mikroskopischen Auswertung werden hier dargestellt.

**C** Yop-Injektion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla in ILK<sup>+/+</sup> und ILK<sup>-/-</sup> Zelllinien (Aufzentrifugieren der Bakterien 2min 300g, Infektion 60min, MOI 100). Nach Färbung mit CCF4 erfolgte die Analyse mit der Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz an blau fluoreszierenden Zellen zeigt die Höhe der Yop-Injektion an. Die abgebildeten Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils mindestens vier Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-Way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest (p<0,001). Daten in C wurden von Dr. Birgit Keller zur Verfügung gestellt.

### **3.8. Bedeutung der Signaltransduktion von $\beta 1$ Integrinen über die Focal Adhesion Kinase für Adhäsion und Yop-Translokation von Ye**

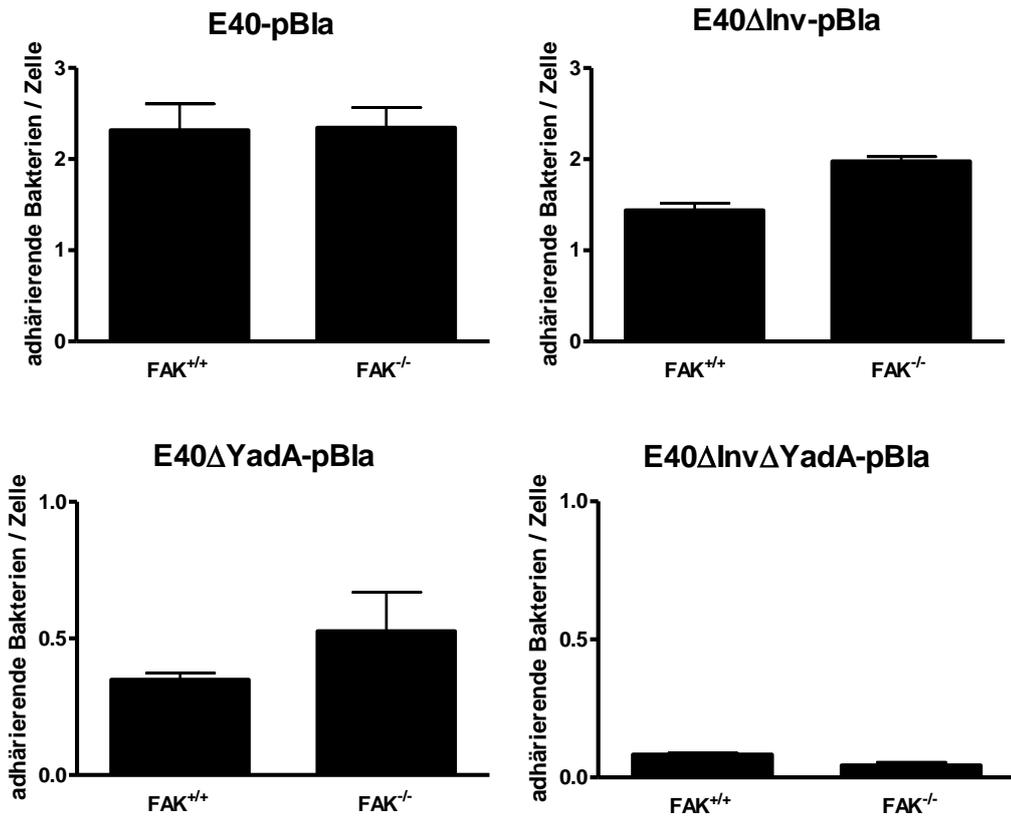
Die Focal Adhesion Kinase ist beteiligt an Zelladhäsion [178] und Zellmotilität [165]. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion über  $\beta 1$  Integrine [179]. Um die Bedeutung der FAK im Rahmen der Signaltransduktion von  $\beta 1$  Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von Ye zu untersuchen, kamen FAK defiziente embryonale Mausfibroblasten zum Einsatz. Zum Vergleich wurden FAK<sup>+/+</sup> Zellen verwendet. Infektion in den Adhäsionsassays erfolgte für 30 min mit einer MOI von 100. Nach Fixierung (4%PFA) und Färbung mit Fuchsin, wurde mikroskopisch ausgewertet. Für die Translokationsassays wurden die Bakterien 2 min mit 300g auf die Zellen zentrifugiert. Es folgte für 60 min eine Infektion mit einer MOI von 100. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit CCF4 gefärbt und mit der Durchflusszytometrie analysiert.

Adhäsion konnte an FAK<sup>+/+</sup> und FAK<sup>-/-</sup> Zellen durch YadA in ähnlicher Höhe vermittelt werden. Auch für Invasin vermittelte Adhäsion gab es keine Unterschied zwischen FAK<sup>+/+</sup> und FAK<sup>-/-</sup> Zellen. Die Deletion von FAK war also ohne Einfluss auf die Adhäsion von Ye (Abb. 10 A, B).

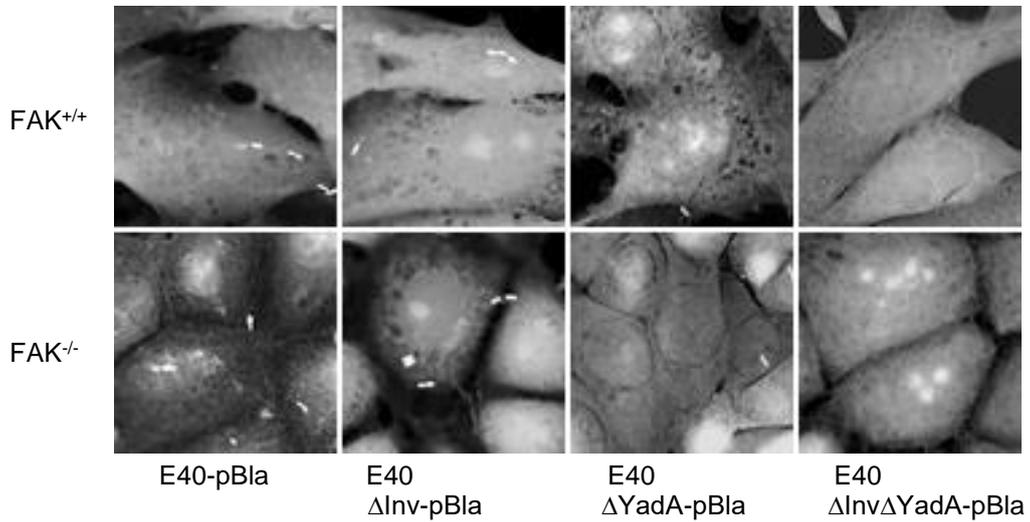
Die Invasin vermittelte Yop-Translokation war in FAK defizienten Zellen leicht erhöht. Weitere Unterschiede bei Yop-Translokation in FAK<sup>+/+</sup> und FAK<sup>-/-</sup> Zelllinien waren nicht erkennbar (Abb. 10 C).

Das Ergebnis zeigt, dass FAK alleine nicht essentiell für Adhäsion und Yop-Translokation ist oder die Funktion von FAK von anderen Kinasen übernommen werden kann.

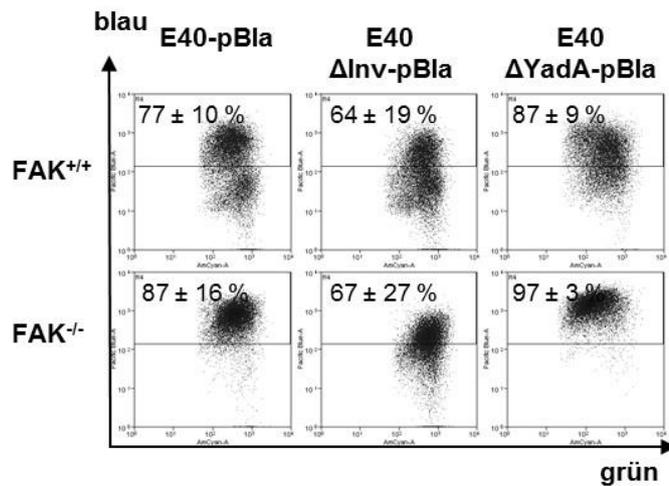
**A**



**B**



C



**Abb. 10: Rolle von FAK für Invasin und YadA vermittelte Adhäsion und Yop-Injektion**

**A** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an FAK<sup>+/+</sup> und FAK<sup>-/-</sup> (Infektion 30min, MOI 100). Pro Zelllinie wurden 2 Experimente mit jeweils 3 Replikaten durchgeführt, an denen adhätierenden Bakterien an jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte über einen gepaarten, zweiseitigen T-Test. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

**B** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an FAK<sup>+/+</sup> und FAK<sup>-/-</sup> Zelllinien. Nach der Infektion (30 min, MOI 100), erfolgte Fixation (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin. Repräsentative Gebiete der mikroskopischen Auswertung werden hier dargestellt.

**C** Yop-Injektion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla und E40ΔYadA-pBla in FAK<sup>+/+</sup> und FAK<sup>-/-</sup> Zelllinien (Aufzentrifugieren der Bakterien 2min 300g, Infektion 60min, MOI 100). Nach Färbung mit CCF4 erfolgte die Analyse mit der Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz an blau fluoreszierenden Zellen zeigt die Höhe der Yop-Injektion an. Die gezeigten Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils mindestens vier Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-Way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest (p<0,001). Die Daten in C wurden von Dr. Birgit Keller zur Verfügung gestellt.

### 3.9. Relevanz von $\beta 1$ Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von Ye an bzw. in Epithelzellen

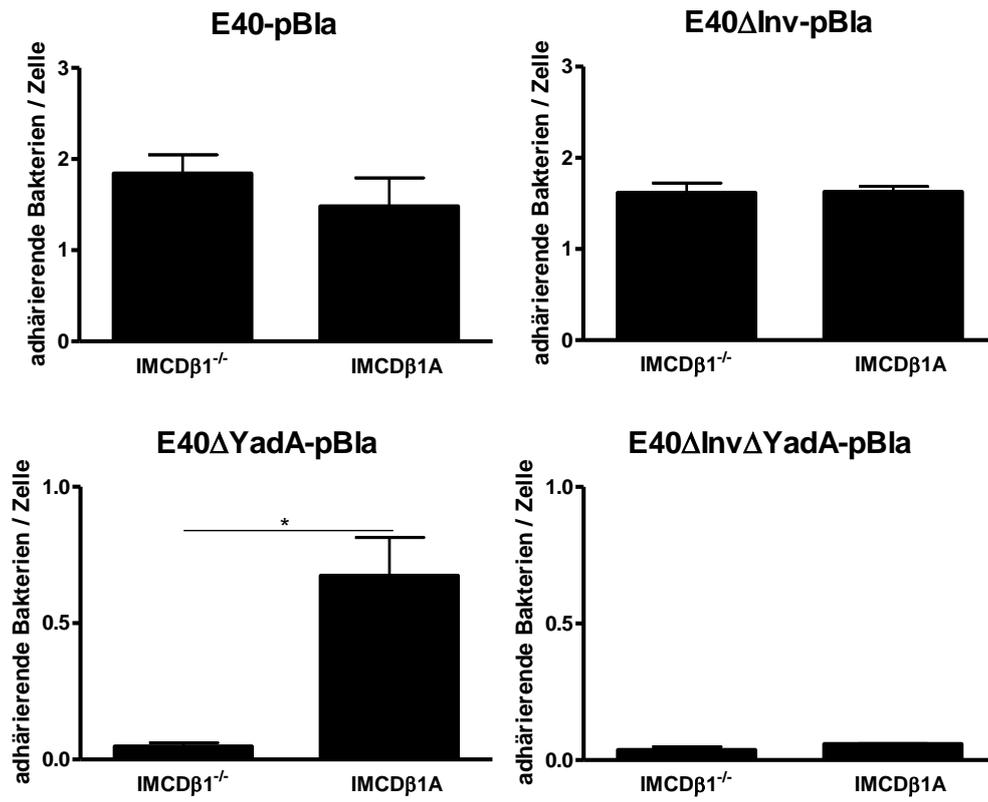
In 3.1 wurde dargelegt, dass  $\beta 1$  Integrine in GD25 Fibroblasten für Adhäsion und Yop-Translokation von Ye sehr wichtig sind. Ob dies auch bei Epithelzellen der Fall ist, wurde mit IMCD Zelllinien untersucht. Verwendet wurden eine IMCD $\beta 1^{-/-}$  Zelllinie mit deletiertem  $\beta 1$  Integrin und IMCD $\beta 1A$  Zellen, die  $\beta 1A$  Integrine exprimierten. In den Adhäsionsassays wurde für 30 min mit einer MOI von 100 infiziert. Nach Fixierung (4%PFA) und Färbung mit Fuchsin, wurde mikroskopisch ausgewertet. Für die Translokationsassays wurden die Bakterien 2 min mit 300g auf die Zellen zentrifugiert. Es folgte für 60 min eine Infektion mit einer MOI von 100. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit CCF4 gefärbt und mit der Durchflusszytometrie analysiert.

Adhäsion an IMCD $\beta 1A$  Zellen war sowohl Invasin als auch YadA vermittelt möglich. Trotz fehlendem  $\beta 1$  Integrin war YadA vermittelte Adhäsion an die IMCD $\beta 1^{-/-}$  Zellen ebenfalls möglich, während Invasin keine Adhäsion an diese Zellen vermittelte. Der  $\Delta Inv \Delta YadA$ -pBla Stamm adhärierte an keine der beiden Zelllinien (Abb. 11 A, B).

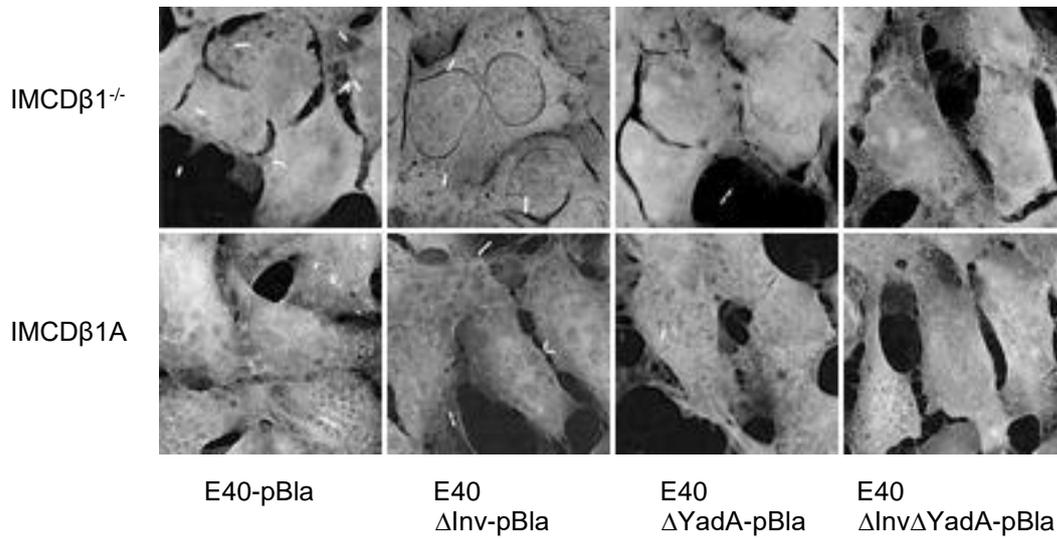
Die Adhäsion korrespondierte diesbezüglich mit der Yop-Translokation in die IMCD Zellen. In IMCD $\beta 1A$  Zellen war Yop-Translokation YadA und Invasin vermittelt möglich, wobei wie in vorherigen Experimenten, die Invasin vermittelte Yop-Translokation um einiges höher als die Adhäsion war. YadA konnte im Gegensatz zu Invasin Yop-Translokation zusätzlich in die  $\beta 1$  defizienten IMCD $\beta 1^{-/-}$  Zellen vermitteln.  $\Delta Inv \Delta YadA$ -pBla vermittelte keine Yop-Translokation in beide Zelllinien (Abb. 11 C).

Dieses Ergebnis zeigt, dass es an  $\beta 1$  defizienten Epithelzellen noch andere Faktoren geben muss, die unabhängig von  $\beta 1$  Integrinen Adhäsion und Yop-Translokation über YadA vermitteln.

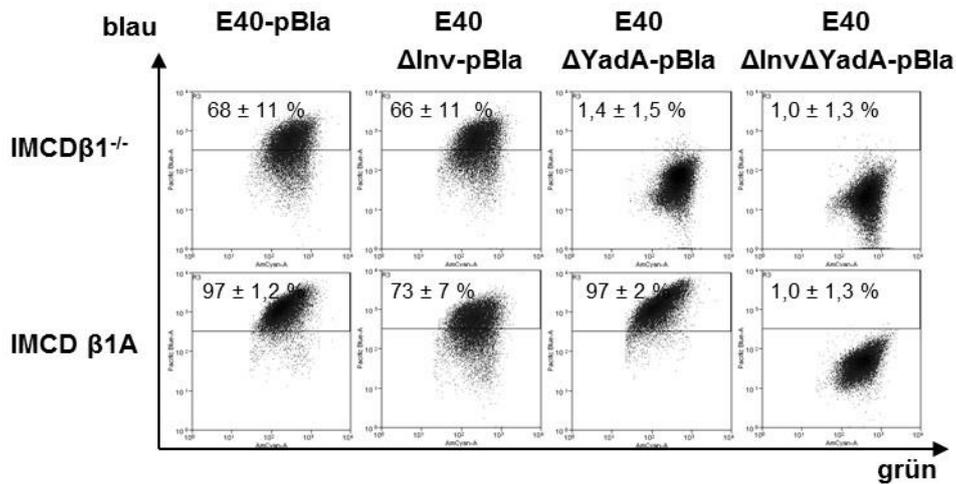
**A**



**B**



C



**Abb. 11: Rolle von β1 Integrinen für Invasin und YadA vermittelte Adhäsion und Yop-Injektion in Epithelzellen**

**A** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an IMCDβ1<sup>-/-</sup> und IMCDβ1A Epithelzellen (Infektion 30min, MOI 100). Pro Zelllinie wurden 3 Experimente mit jeweils 3 Replikaten durchgeführt, an denen adhärerenden Bakterien an jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte über einen gepaarten, zweiseitigen T-Test. (\*p< 0,05; \*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001)

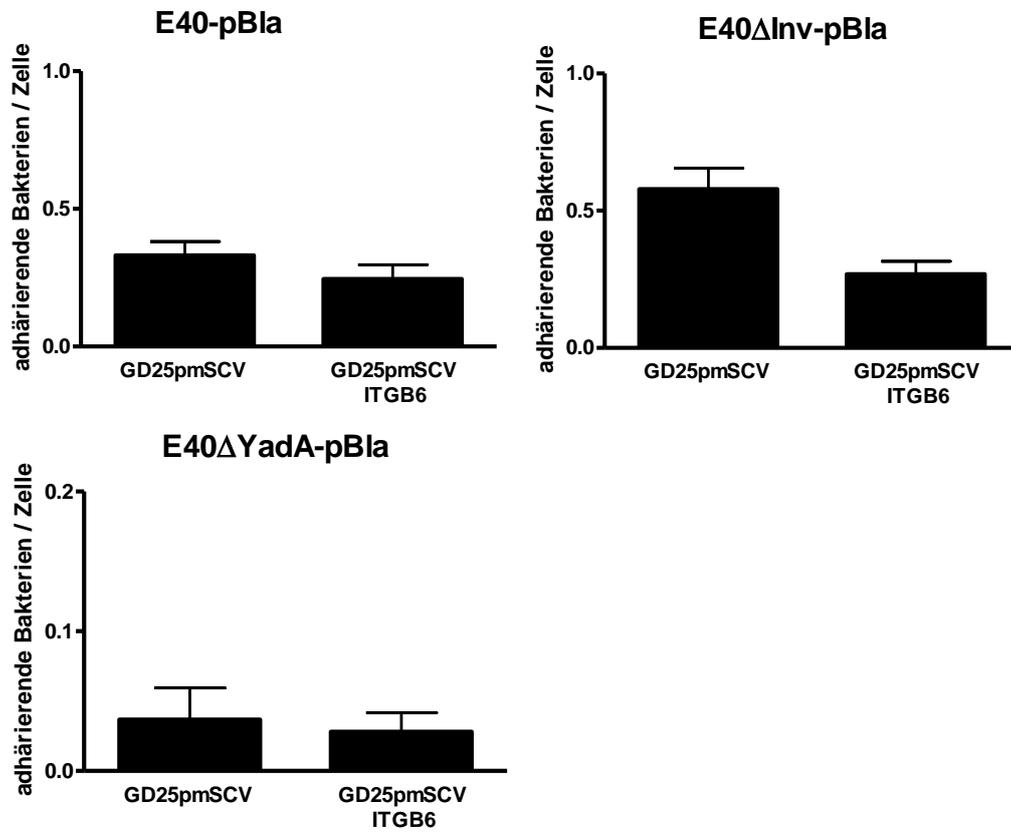
**B** Adhäsion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla an IMCDβ1<sup>-/-</sup> und IMCDβ1A Zelllinien. Nach der Infektion (30 min, MOI 100), erfolgte Fixation (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin. Repräsentative Gebiete der mikroskopischen Auswertung werden hier dargestellt.

**C** Yop-Injektion von E40-pBla, E40ΔInv-pBla, E40ΔYadA-pBla und E40ΔInvΔYadA-pBla in IMCDβ1<sup>-/-</sup> und IMCDβ1A Zelllinien (Aufzentrifugieren der Bakterien 2min 300g, Infektion 60min, MOI 100). Nach Färbung mit CCF4 erfolgte die Analyse mit der Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz an blau fluoreszierenden Zellen zeigt die Höhe der Yop-Injektion an. Die gezeigten Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils mindestens vier Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit einem One-Way ANOVA Test mit Bonferroni Posttest (p<0,001). Daten in C wurden von Dr. Birgit Keller zur Verfügung gestellt.

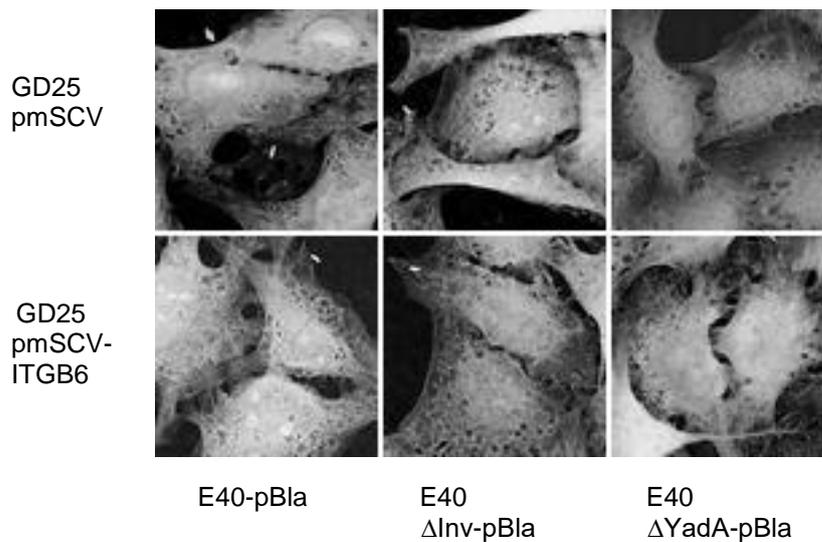
### 3.10. Relevanz von $\beta 6$ Integrinen für Adhäsion und Yop-Translokation von Ye

Die in 3.9 gezeigte YadA vermittelte Adhäsion und Yop-Translokation an bzw. in  $\beta 1$  defiziente IMCD Zellen ließ die Frage nach einem weiteren Faktor aufkommen, der zusätzlich zu  $\beta 1$  Integrinen eine Interaktion mit YadA vermitteln kann und dadurch zu Adhäsion und Yop Translokation von Ye führt.  $\beta 6$  Integrine werden nur von Epithelzellen exprimiert [180], sind an der Bindung von Fibronektin beteiligt [181] und wurden hier als möglicher Kandidat untersucht. Verwendet wurden GD25 $\beta 1^{-/-}$  Zellen, die stabil mit einem  $\beta 6$  Integrin transduziert wurden (GD25pmSCV-ITGB6). Als Vergleich dienten GD25pmSCV Zellen, in die der entsprechende Leervektor transduziert worden war. In den Adhäsionsassays wurde für 30 min mit einer MOI von 100 infiziert. Nach Fixierung (4%PFA) und Färbung mit Fuchsin, wurde mikroskopisch ausgewertet. Vergleichende Translokationsdaten waren hier nicht vorhanden. An beide Zelllinien war die Invasin und YadA vermittelte Adhäsion sehr gering. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Adhäsion an GD25pmSCV-ITGB6 und GD25pmSCV Zellen. (Abb.: 12 A, B). Dieses Ergebnis zeigt, dass für die Adhäsion an GD25 Zellen  $\beta 6$  Integrine keine Rolle spielen.

A



**B**



**Abb. 12: Bedeutung von  $\beta 6$  Integrinen für Adhäsion und Yop-Injektion**

**A** Adhäsion von E40-pBla, E40 $\Delta$ Inv-pBla und E40 $\Delta$ YadA-pBla an GD25pMSCV und GD25pMSCV-ITGB6 Fibroblasten (Infektion 30min, MOI 100). Pro Zelllinie wurden 3 Experimente mit jeweils 2 Replikaten durchgeführt, an denen adhärrierenden Bakterien an jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte über einen gepaarten, zweiseitigen T-Test. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

**B** Adhäsion von E40-pBla, E40 $\Delta$ Inv-pBla und E40 $\Delta$ YadA-pBla an GD25pMSCV und GD25pMSCV-ITGB6 Fibroblasten. Nach der Infektion (30 min, MOI 100), erfolgte Fixation (4% PFA) und Färbung mit Fuchsin. Repräsentative Gebiete der mikroskopischen Auswertung werden hier dargestellt.

## 4. Diskussion

Adhäsion und Yop-Translokation sind wichtige Schritte bei der Infektion mit *Ye*. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen zu einem gewissen Grad einen Zusammenhang zwischen Adhäsion und Yop-Translokation von *Ye*. Während für Invasin vermittelte Adhäsion und Yop-Translokation  $\beta 1$  Integrine eine wichtige Rolle spielen, kann YadA diese auch über andere Faktoren vermitteln. Weitere mögliche Adhäsionsfaktoren von *Ye* wie z.B. Ail [33] oder Myf [182] scheinen bei Adhäsion an die hier verwendeten Fibroblasten und Epithelzelllinien keine Bedeutung zu spielen.

Zum Einfluss der injizierten Effektor-Yops auf Signaltransduktionswege der Zelle existieren diverse Studien [90]. Die Zusammenhänge zwischen Signaltransduktion über  $\beta 1$  Integrine und Adhäsion sowie Yop Translokation von *Ye* sind aber noch nicht vollständig geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden, mit Hilfe verschiedener transgener Zelllinien mit Mutationen im  $\beta 1$  Integrin bzw. in  $\beta 1$  assoziierten Signalmolekülen, sowie mittels eines Reportersystems zur Detektion der Yop-Injektion in Zellen, mögliche Zusammenhänge genauer untersucht.

Hier ist vorab einschränkend zu bemerken, dass Yop Translokation in einem Zellkultursystem bestimmt wurde, bei dem die Yersinien nach Gabe in das Zellmedium auf die Zellen zentrifugiert wurden (2 Minuten mit 300g). Zielvorgabe für die hier durchgeführten Experimente war es jedoch die Adhäsion von *Ye* an die Wirtszellen ohne zusätzlichen Zentrifugationsschritt zu messen. Daher kann nur bedingt ein Zusammenhang zwischen den in dieser Arbeit durchgeführten Adhäsionsexperimenten und den hier beschriebenen Translokationsexperimenten hergestellt werden. In späteren Experimenten wurde diese Problematik berücksichtigt und Adhäsionsassays unter den gleichen Infektionsbedingungen wie die hier beschriebenen Translokationsexperimente durchgeführt [170].

#### **4.1. Interaktion der Signaltransduktion von $\beta 1$ Integrinen mit Adhäsion und Yop-Translokation von Ye**

Eine direkte Interaktion von Invasin mit  $\beta 1$  Integrinen wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen und beschrieben [25, 183]. Für YadA wird eine Bindung an  $\beta 1$  Integrine über diverse Adaptorproteine angenommen. YadA interagiert dabei mit multiplen Bindungspartnern der extrazellulären Matrix (ECM), u.a. Kollagen, Fibronectin und Laminin [69, 70], welche wiederum das Potential haben  $\beta 1$  Integrine zu binden. Diese könnten so eine indirekte Verbindung zwischen YadA und  $\beta 1$  Integrinen ermöglichen. Hinweise darauf zeigen auch Hudson et al [184], welche bei niedrigen Konzentrationen an ECM-Proteinen Invasin, bei höheren Konzentrationen an ECM-Proteinen YadA als dominantes Adhäsion nachwies [184].

Untersuchungen der Adhäsion von Ye an Fibroblasten am Beispiel von GD25 $\beta 1^{-/-}$  und GD25 $\beta 1A$  Zellen bestätigten, dass für eine erfolgreiche Adhäsion von Ye eine Interaktion zwischen  $\beta 1$  Integrinen und YadA oder Invasin nötig ist. YadA und Invasin unterscheiden sich dabei sehr stark in ihren Adhäsionseigenschaften. So vermittelt YadA in Abwesenheit von  $\beta 1$  Integrinen noch immer eine, wenn auch reduzierte Adhäsion. Dies deutete auf andere noch unbekannte YadA vermittelte Adhäsionsmechanismen hin, die unabhängig von  $\beta 1$  Integrinen ablaufen. In nachfolgenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass YadA auch an GD25 Zellen über Integrine der  $\alpha V$ -Familie ( $\alpha Vb3$ ,  $\alpha Vb5$ ,  $\alpha Vb6$ ) binden können [170].

Die Invasin vermittelte Adhäsion ohne zusätzliche Zentrifugation von Ye auf die Zellen ist wesentlich schlechter als die YadA vermittelte Adhäsion und erscheint strikt Integrin abhängig zu sein. Diese strikte Abhängigkeit der Invasin vermittelten Adhäsion von  $\beta 1$  Integrinen findet man auch bei Infektionsbedingungen bei denen Ye 2 Minuten bei 200 g auf die Zellen zentrifugiert wurden. Unter diesen Bedingungen ist allerdings YadA und Invasin vermittelte Adhäsion an GD25 $\beta 1A$  Zellen vergleichbar hoch [170].

Da Adhäsion von Ye als eine Bedingung für Yop-Translokation angenommen werden muss, ist nicht nur die Invasin vermittelte sondern auch die Invasin vermittelte Yop Translokation ebenfalls strikt  $\beta 1$  Integrin-abhängig.

Interessanterweise, findet man jedoch trotz YadA vermittelter Adhäsion an  $\beta 1$  Integrin defiziente Zellen, keine anschließende Yop Translokation. D.h. dass Adhäsion nicht per se zur Yop Translokation führen muss. Aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde hier angenommen, dass trotz Adhäsion die Interaktion zwischen YadA-exprimierenden Ye und GD25 Zellen nicht eng genug ist, damit es auch zur Yop Translokation kommen kann [170].

Im Folgenden wird nun genauer auf Signaltransduktion über die Zytoplasmadomäne der  $\beta 1$  Integrine eingegangen und deren Bedeutung für eine effektive Adhäsion und Yop-Translokation. Die Zytoplasmadomäne der  $\beta 1$  Integrine enthält u.a. zwei NPXY Motive, welche an Tyrosin phosphoryliert werden können. Diese sind wichtige Bindungsstellen für Talin und Kindlin, welche Aufgaben in der Integrin-Aktivierung und Bindung des Integrins an das Aktinzytoskelett übernehmen [127, 128, 141]. Keratinozyten mit Mutationen in diesen NPXY Motiven zeigten verminderte Adhäsion und Migration [173].

Mithilfe von GD25 $\beta 1$ COM Fibroblasten, deren distaler variabler Teil der  $\beta 1$  Zytoplasmadomäne deletiert ist, wurde die genauere Rolle der Zytoplasmadomäne für Adhäsion und Yop Translokation von Ye analysiert. Der deletierte distale Teil beinhaltet u.a. auch oben genannte NPXY Motive. YadA vermittelte hier relativ unabhängig von der Signaltransduktion der distalen  $\beta 1$  Zytoplasmadomäne weiterhin Adhäsion und Yop-Translokation, wenn auch in vermindertem Maße. Invasin dagegen schien für die Vermittlung von Adhäsion und Yop-Translokation auf die intakte Zytoplasmadomäne angewiesen zu sein. Vermutlich ist für die Invasin vermittelte Adhäsion Signaltransduktion über die  $\beta 1$  Zytoplasmadomäne erforderlich und zwar im Sinne einer Aktivierung, also konformativen Änderung des Integrins, die zu einer effektiveren Bindung von Invasin führt.

Gleiches trifft auch auf Invasin vermittelte Internalisierung von Ye in Wirtszellen zu. Gustavsson et al. [185] zeigten, dass eine erfolgreiche Invasin vermittelte Internalisierung von einer intakten  $\beta 1$  Integrin Zytoplasmadomäne abhängig ist: Bei Zellen, deren  $\beta 1$  Integrine Mutationen im distalen NPXY Motiv oder einem doppelten Threonin Motiv zwischen den beiden NPXY Motiven aufwiesen,

konnte kaum noch Invasin vermittelte Internalisierung nachgewiesen werden [185].

Es erfolgten Untersuchungen mit GD25 $\beta$ 1TR Fibroblasten, deren gesamte  $\beta$ 1 Zytoplasmadomäne deletiert ist. Signaltransduktion über Integrine ohne Zytoplasmadomäne ist nicht möglich, da sich intrazellulären Adaptorproteinen und Kinasen so keine Interaktionsmöglichkeit mehr bietet. Die Ergebnisse für Invasin glichen hier den Resultaten für GD25 $\beta$ COM Zellen, wo die Aktivierung von  $\beta$ 1 Integrinen als notwendige Voraussetzung für die Ausbildung von Invasin vermittelter Adhäsion erscheint, was in folgenden Experimenten bestätigt werden konnte [170].

Die Tatsache, dass YadA an GD25 $\beta$ 1TR Fibroblasten immer noch Adhäsion und Yop Translokation vermitteln kann, zeigt, dass dieser Pathogenitätsfaktor auch unabhängig von Signaltransduktion über  $\beta$ 1 Integrine agieren kann bzw. auch andere Bindungsstellen an der Zelloberfläche eine Rolle spielen.

Dass die Adhäsion und Yop-Translokation bei GD25 $\beta$ 1TR gegenüber GD25 $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Fibroblasten stark erhöht ist, deutet jedoch darauf hin, dass die extrazelluläre Domäne der  $\beta$ 1 Integrine für YadA vermittelte Adhäsion und Yop-Translokation durchaus eine Bedeutung hat. Verglichen mit GD25 $\beta$ 1COM und GD25 $\beta$ 1TR Fibroblasten ist die YadA vermittelte Adhäsion und Yop-Translokation an GD25 $\beta$ 1A Fibroblasten mit intakter Zytoplasmadomäne am höchsten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass nicht aktivierte  $\beta$ 1 Integrine für eine YadA vermittelte Adhäsion und nachfolgende Yop Translokation von Ye ausreichend wären, die Aktivierung der  $\beta$ 1 Integrine aber sowohl Adhäsion als auch Yop Translokation verbessert.

#### **4.2. Einfluss der Aktivierung von $\beta$ 1 Integrinen auf Adhäsion und Yop-Translokation von Ye**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Aktivierung des Integrins mit Mn<sup>2+</sup> die Adhäsion an den verwendeten Fibroblasten reduziert ist. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da aktive Integrine in der Regel eine erhöhte Ligandenaffinität zeigen [130]. Speziell für Mn<sup>2+</sup> konnte eine Aktivierung von  $\beta$ 1-

Integrinen nachgewiesen werden, die z.B. zu erhöhter Adhärenz von Fibronectin an Zellen führte [176, 186].  $Mn^{2+}$  bewirkt dabei Veränderungen in der Zugänglichkeit von  $\beta 1$  Integrin-Epitopen, die denen am Liganden-occupierten Rezeptor strukturell ähneln [176]. Über die Aktivierung stehen so mehr Bindungsstellen für Liganden am Integrin zur Verfügung.

Die Yop-Translokation steigerte sich hingegen unter Einfluss von  $Mn^{2+}$ . Dies zeigte sich besonders in GD25 $\beta 1$ COM und GD25 $\beta 1$ TR Fibroblasten. Möglicherweise kann  $Mn^{2+}$  trotz deletierter  $\beta 1$  Zytoplasmadomäne in diesen Zellen eine Aktivierung der extrazellulären Domäne induzieren.

Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Adhäsion von *Ye* bei erhöhter Ligandenbindungsaffinität der Integrine unter Manganeinfluss, wäre die Möglichkeit, dass zu diesem Zeitpunkt *Ye* vermehrt von Zellen internalisiert wurde. Eine Internalisierung von Bakterien ist unter anderem abhängig von Ligandenaffinität und Rezeptordichte der  $\beta 1$  Integrine [43]. Invasin kann allein durch Bindung mit hoher Affinität an  $\beta 1$  Integrine Internalisierung vermitteln [43]. Durch die Aktivierung des Integrins könnte es zu einer sehr hohen Affinität von *Ye* gekommen sein, die eine Internalisierung der Bakterien ausgelöst haben könnte. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die reduzierte Adhäsion.

Theoretisch denkbar wäre hier, dass das  $\beta$ -Lactamase Fusionsprotein nicht in die Zellen injiziert, aber durch Internalisierung aufgenommen wird, in der Zelle aktiv ist und zur Spaltung von CCF4 führt, wodurch eine höhere Yop Injektion detektiert worden wäre als tatsächlich stattgefunden hat.

Das  $\beta$ -Lactamase Reportersystem wurde jedoch von den Entwicklern auf einen derartigen Vorgang getestet, welcher Ergebnisse zur Yop-Injektion verzerren würde. Es wurde eine *Yersinia*-Mutante verwendet, welche zwar YopE- $\beta$ -Lactamase exprimiert, jedoch nicht zur Yop-Injektion befähigt war ( $\Delta$ YscN-pBla). Bei Infektion von HeLa Zellen mit  $\Delta$ YscN-pBla (1h, MOI 100) wurde keine CCF4 Spaltung detektiert. Eine durch Internalisierung von *Ye* bedingte Freisetzung und Funktion der YopE- $\beta$ -Lactamase wurde so für diese Zelllinie ausgeschlossen [174]. Ob sich Unterschiede durch die hier verwendeten

Fibroblasten oder der Integrinaktivierung durch  $Mn^{2+}$  ergaben, muss experimentell überprüft werden.

#### **4.3. Fehlende YadA vermittelte Yop-Translokation an ILK Zellen bei vorhandener Adhäsion**

ILK verbindet Integrine direkt mit dem Aktinzytoskelett und ist an dessen Regulation und Reorganisation beteiligt [153, 154]. In Zellen mit reduzierter ILK-Aktivität ist Invasin vermittelte Invasion signifikant reduziert [187]. Für Adhäsion und Yop-Translokation spielt die Expression von ILK, wie hier gezeigt, keine Rolle. Interessanterweise wurde Yop-Translokation in die verwendeten ILK<sup>+/+</sup> und ILK<sup>-/-</sup> fibroblastoiden Nierenzellen nur durch Invasin nicht aber durch YadA vermittelt. Dieser Effekt zeigte sich nicht bei der Adhäsion, welche auch durch YadA vermittelt werden konnte. Dies könnte auf einen Cofaktor von  $\beta 1$  Integrinen hindeuten, der für YadA vermittelte Translokation notwendig aber in dieser Zelllinie nicht vorhanden ist. Für verschiedene andere enteropathogene Bakterien wurde zudem eine Interaktion von ILK und dem Effektor OpsE gezeigt, was zu einer Reduktion der Umwälzungsrate von FAs führt und den Bakterien eine leichtere Zell-zu-Zell-Infektion ermöglicht. [188]. Ob Yersinien einen vergleichbaren Mechanismus aufweisen ist noch ungeklärt.

#### **4.4. Heparan Sulfat Proteoglykane als möglicher Corezeptor für YadA**

Die Ergebnisse mit ILK-Zelllinien deuten auf einen möglichen Cofaktor für YadA, welcher zusätzlich zu  $\beta 1$  Integrinen Translokation vermittelt hin. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Heparin mit Yop-Translokation interferiert. Daher wurden Heparan Sulfat Proteoglykane (HSPG) als möglicher Corezeptor in Betracht gezogen.

HSPGs sind Zelloberflächenmoleküle, die aus einem Proteinkern und einer bis mehreren Glykosaminoglykanketten bestehen. Sie sind beteiligt an Adhäsion, Motilität, Morphogenese und Differenzierung von Zellen [189]. HSPGs interagieren mit einer großen Bandbreite an verschiedenen Morphogenen,

Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Zytokinen, Komponenten der Gerinnungskaskade und ECM [189]. Während die Glykosaminoglykankette extrazellulär z. B. Kollagen I, II und V oder Fibronectin bindet [190, 191], kann der Proteinkern Signaltransduktion in der Zelle vermitteln.

Nachgewiesen ist eine Interaktion von HSPGs mit multiplen Bakterien, Parasiten und Viren [192], wie beispielsweise Herpes Simplex Viren Typ 1 und 2 [193], HIV [194], enterotoxische *E.coli* [195], *Listeria monocytogenes* [196], *Neissera gonorrhoeae* [197], *Helicobacter pylori* [198] und *Staphylococcus aureus* [199]. Für *Ye* wurde gezeigt, dass Heparin mit Yop Injektion interferiert [200]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass LcrG ein für Yop Translokation regulatorisches Protein, Heparin binden kann [200]. Heparin wird häufig verwendet um ein mögliche Interaktion von Liganden mit HSPGs zu untersuchen. Daher ergab sich die o.g. Hypothese, dass HSPGS möglicherweise einen Corezeptor für Yop Translokation darstellen könnten.

Durch Behandlung der Wirtszellen mit Heparin wurde diese Fragestellung genauer untersucht. Vor allem YadA vermittelte Adhäsion und Yop-Translokation war bei Zugabe von Heparin vermindert. Invasin vermittelte Adhäsion und Yop-Translokation wurde durch Heparin nicht beeinflusst. Denkbar wäre also eine Interaktion von YadA mit dem LcrG-HSPG-Komplex oder auch eine direkte bzw. indirekte Adhäsion von YadA an HSPGs. Indirekte Adhäsion könnte z. B. über Fibronectin vermittelt werden, welches sowohl an YadA [70] als auch an HSPGs binden [201] kann. Weitere Untersuchungen von HSPGs als Rezeptor (Verwendung von HSPG hypomorphen Zelllinien und knockout Zelllinien, denen die HSPGS Syndecan 2 oder 4 fehlten) zeigten, dass HSPGs keine Rolle für die Adhäsion spielen (PD Dr. Erwin Bohn, Dr. Birgit Keller persönliche Kommunikation). Da Heparin stark geladen ist und an viele Proteine wie z.B. auch Collagen oder Fibronectin binden kann, ist daher eher anzunehmen, dass Heparin durch Bindung an Collagen oder andere ECM Proteine, mit der Bindung von YadA interferiert. Dies könnte daher eher ein weiterer Hinweis sein, dass die Interaktion von YadA an  $\beta$ 1 Integrine über eine ECM Brücke erfolgt.

#### 4.5. Bedeutung von $\beta 1$ Integrin assoziierten Signalmolekülen für Adhäsion und Yop Translokation von *Ye*

Da bei GD25 $\beta 1$ COM und GD25 $\beta 1$ TR Fibroblasten mit deletierter distaler, variabler bzw. vollständig deletierter Zytoplasmadomäne der  $\beta 1$  Integrine, Adhäsion und Translokation vermindert waren, wurde die Bedeutung der Signaltransduktion über verschiedene Integrin-assoziierte Moleküle auf die Infektionsmechanismen von *Ye* genauer analysiert.

Untersucht wurde u.a. die Rolle von Talin, das eine Verbindung zwischen Aktin und Integrinen herstellt [137] und zudem essentiell für die Integrinaktivierung ist [138]. Es wurde bereits gezeigt, dass Talin und das proximale NPXY Motiv der  $\beta 1$  Zytoplasmadomäne bei der Internalisierung von *Yersinien*, unter anderem über Reorganisation des Aktinzytoskeletts, eine Rolle spielen [185, 202]. Eine Aminosäuresubstitution (Y<sub>783</sub>>A) im proximalen NPXY Motiv der  $\beta 1$  Integrin-Zytoplasmadomäne beeinflusst die Bindung von Talin an  $\beta 1$ . Diese Mutation führte zu einer etwas geringeren Adhäsion von *Ye* im Vergleich zur Adhäsion an Fibroblasten mit intakten  $\beta 1$  Integrinen. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz zur Adhäsion war Invasin vermittelte Yop Translokation durch diese Mutation deutlicher reduziert. Eine Bindung von Talin an  $\beta 1$  Integrine und somit Integrinaktivierung könnte also durchaus eine Rolle für eine effektive Infektion mit *Ye* spielen, scheint aber erst auf der Ebene der Yop-Translokation eine Bedeutung zu haben. Talin kann jedoch außer am proximalen NPXY Motiv noch an weiteren Stellen der  $\beta 1$  Integrin Zytoplasmadomäne binden [127]. Zur genaueren Klärung der Rolle von Talin sollte also die Adhäsion und Yop Translokation von *Ye* an eine Zelllinie untersucht werden, in der die Talinbindung an Integrine vollständig unterbunden ist. Zudem sollte auch die genauere Rolle der Kindline untersucht werden, die ebenfalls Integrine aktivieren und essentiell für eine Talin-induzierte Integrinaktivierung sind [141, 142].

Eine wichtige Bedeutung für die Internalisierung hat die Polymerisation des Aktinzytoskeletts. Dies wurde für die Internalisierung verschiedenster Bakterien sowie auch *Yersinia* spp. beschrieben [203, 204]. Inwiefern die Aktinpolymerisation auch einen Einfluss auf Adhäsion und Yop-Translokation

ausübt, wurde mithilfe von Cytochalasin D, einem Mycotoxin, das die Aktinpolymerisation hemmen kann [177], untersucht. Inhibierung der Aktinpolymerisierung durch Cytochalasin D reduzierte die Adhäsion an Fibroblasten um ca. 50%. Bereits Young et al. [202] zeigten in Experimenten mit Invasin exprimierenden *E.coli* eine, durch den Einfluss von Cytochalasin D (2 µg/ml), um 50% verringerte Invasin-vermittelte Adhäsion aber, interessanterweise eine um den Faktor 20 erhöhte Invasion [202]. Bei höheren Cytochalasin D Konzentrationen (5 µg/ml) war dieser Effekt noch deutlicher [202]. Aktinpolymerisation scheint also für eine erfolgreiche Adhäsion eine Rolle zu spielen. Jedoch wurden bei den hier durchgeführten Experimenten auch zytotoxische Effekte durch das Cytochalasin D beobachtet (vermehrt abgerundete Zellen). Möglicherweise spielen diese Effekte ebenfalls eine Rolle in der reduzierten Adhäsion. Mithilfe von Adhäsionsexperimenten bei denen die Bakterien auf die Zellen zentrifugiert wurden, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass für die Invasin vermittelte Adhäsion das Aktinzytoskelett für eine optimale Adhäsion von Bedeutung ist. Für die YadA vermittelte Adhäsion konnte hier jedoch keine Unterschiede zwischen der Behandlung mit und ohne Cytochalasin D nachgewiesen werden [170]. Dies spiegelt sich auch in den Translokationsexperimenten wieder, die unter Zentrifugationsbedingungen durchgeführt wurden. Hier konnte in Analogie zu den Adhäsionsassays nur eine Abhängigkeit von Aktinzytoskelettveränderungen bei der Invasin vermittelten und nicht bei der YadA vermittelten Yop Translokation gezeigt werden [170]. Weitere Interaktion mit dem Aktinzytoskelett wurden bis jetzt zudem vor allem über die Effekte verschiedener Yops nachgewiesen, welche nach Injektion Einfluss auf das Aktinzytoskelett nehmen und so Phagozytose oder übermäßige Porenbildung in der Zellmembran verhindern können [205]. Yersinien scheinen außerdem teilweise die mit Aktinpolymerisation assoziierten Zellfunktionen Motilität und Oberflächenadhäsion für die eigene Yop-Translokation und Adhäsion zu nutzen.

FAK, welches ebenfalls die Stabilität von FAs und somit auch Zellmotilität beeinflussen kann [165], hat für Yersinien soweit bekannt vor allem eine Bedeutung für die Invasin-vermittelte Internalisierung. So führt die

Überexpression von FAK zu einer vermehrten Internalisierung [206]. Da FAK bei Zelladhäsion über Signaltransduktion durch Integrine aktiviert wird, ist es möglich, dass auch Ye durch Adhäsion an Wirtszellen FAK aktiviert, mit oben erwähnter Internalisation als Folge [161]. Die Adhäsion von Ye an sich war in den hier durchgeführten Versuchen aber unabhängig von FAK. Ähnliches galt für die Translokation. Einer leicht erhöhten Invasin vermittelten Yop-Translokation in FAK<sup>-/-</sup> Zellen könnte die komplementär hochregulierte Tyrosinkinase Pyk2 in diesen Zellen zu Grunde liegen. Sieg et al. (1998) zeigten mit FAK<sup>-/-</sup> Zellen, dass Pyk2 die Funktion des fehlenden FAK bei Fibronektin vermittelter Signaltransduktion übernehmen kann [207]. Für eine Übertragbarkeit der Ergebnisse spricht die Fibronektinbindung an  $\alpha 5\beta 1$  Integrinen, welche auch Invasin an gleicher oder ähnlicher Stelle binden [208] und eine ähnliche Signaltransduktion wie Fibronektin auslösen können.

#### **4.6. $\beta 1$ Integrin unabhängige Adhäsion und Yop Translokation von Ye in Epithelzellen**

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl YadA als auch Invasin vermittelte Adhäsion und Yop Translokation an und in Fibroblasten abhängig von der Expression von  $\beta 1$  Integrinen sind. Mittels  $\beta 1$  Integrin defizienten Epithelzellen wurde jedoch gezeigt, dass die Expression von  $\beta 1$  Integrinen keine generalisierbare Voraussetzung für Adhäsion und Yop Translokation ist. An und in  $\beta 1$  Integrin defizienten Fibroblasten können Invasin und YadA kaum Adhäsion und Translokation vermitteln. Im Gegensatz dazu vermittelte YadA an die verwendeten IMCD $\beta 1^{-/-}$  Zellen eine hohe Adhäsion, welche eine ähnliche Größenordnung zeigte wie an IMCD $\beta 1A$  Zellen (ca. 1,6 B/Z). Ebenso wurde auch Yop Translokation durch YadA in die  $\beta 1$  defizienten Epithelzellen vermittelt. Für die verwendeten Epithelzellen muss daher ein  $\beta 1$  Integrin unabhängiger Mechanismus existieren, der YadA vermittelte Adhäsion und Yop Translokation ermöglicht und welcher an Fibroblasten nicht oder wenig ausgeprägt ist. Aufgrund des Integrinexpressionsmusters wurde hierbei zunächst als weiterer möglicher Bindungspartner für YadA das  $\alpha V\beta 6$ -Integrin in

Betrachtet gezogen, welches Fibronectin bindet [181] und ausschließlich in Epithelzellen exprimiert wird [180]. Im Gegensatz zu IMCD $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Zellen, welche  $\alpha$ Vb3,  $\alpha$ Vb5 und  $\alpha$ Vb6 Integrine exprimieren, exprimieren GD25 Zellen nur  $\alpha$ Vb3 und  $\alpha$ Vb5 Integrine [170]. An GD25 $\beta$ 1<sup>-/-</sup> Zellen, die stabil mit einem  $\beta$ 6 Integrin transduziert wurden, zeigte sich jedoch keine verstärkte Adhäsion. Im Prinzip ähnliche Ergebnisse wurden unter Infektionsexperimenten mit Zentrifugation erzielt [170].

Anzumerken ist insgesamt, dass die mikroskopische Auswertung durch manuelle Zählung adhätierender Bakterien entsprechend zeitaufwändig ist. Dies begrenzt die Menge an auszählbaren Zellen und Bakterien. Die Auswahl von repräsentativen Gebieten der verwendeten Replikatel können zudem durch einen Experimenterbias verzerrt werden. Hier könnte die Nutzung einer automatisierten, maschinellen Auswertung für Adhäsionsassays wie es z.B. die bildgebende Durchflusszytometrie (Imagestream) bietet, zu genaueren Ergebnissen führen.

Ebenso wurde in Zusammenschau mit später durchgeführten Experimenten [170] festgestellt, dass die Infektionsbedingungen (ohne Zentrifugation versus mit Zentrifugation) partiell einen Einfluss auf die Ergebnisse der Adhäsionsassays hat. Hier waren besonders die Unterschiede der Invasin vermittelten Adhäsion mit und ohne Zentrifugation auffällig. Es wäre daher interessant, ebenfalls Translokationsassays ohne nachfolgende Zentrifugation durchzuführen. Es wird angenommen, dass unter solchen Bedingungen die Invasin vermittelte Translokation analog zu den Adhäsionsexperimenten wesentlich geringer ist als die YadA vermittelte Translokation.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Bedeutung von  $\beta$ 1 Integrinen und des  $\beta$ 1 Integrinsignalweges für die YadA und Invasin vermittelte Adhäsion und soweit möglich auch der Zusammenhang mit der Yop-Translokation gezeigt werden.

Als besonders interessant erwies sich die Erkenntnis, dass Ye nicht ausschließlich von  $\beta$ 1 Integrinen und ihrer Signaltransduktion für Adhäsion und

Yop-Translokation abhängig ist. Für den Adhäsionsfaktor YadA konnte an Epithelzellen eine Vermittlung von Adhäsion und Yop-Translokation gezeigt werden, die unabhängig von  $\beta 1$  Integrinen abläuft. In nachfolgenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Depletion von allen  $\alpha V$  Integrinen auf Epithelzellen, sowohl die Adhäsion als auch die Yop Injektion signifikant reduziert. Dies bedeutet, dass neben  $\beta 1$  Integrinen auch  $\alpha V$  Integrine eine wichtige Rolle für die Adhäsion an und Yop Injektion in Epithelzellen spielen [170].

## 5. Zusammenfassung

Für die Virulenz von *Yersinia enterocolitica* (Ye) ist das Typ III Sekretionssystem (TTSS), eine Injektionsnadel-ähnliche Struktur, von herausragender Bedeutung. Frühere Untersuchungen zeigten, dass Yersinien über das Adhäsion Invasin direkt an  $\beta 1$  Integrine von Wirtszellen binden, während das *Yersinia* Adhäsion A (YadA) indirekt via extrazelluläre Matrixproteine eine Bindung eingeht. Adhäsion an Wirtszellen ist in der Regel die Voraussetzung für eine anschließende Injektion von Effektorproteinen (*Yersinia* outer proteins: Yops) über das TTSS in die Zellen. Dadurch werden Wirtszellfunktionen unterdrückt und es kommt zur Immunevasion.

Generell führt die Bindung von Liganden an  $\beta 1$  Integrine zur Rekrutierung eines fokalen Adhäsionskomplexes an die zytoplasmatische Domäne von  $\beta 1$  Integrinen und zur Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen, wie der Fokal Adhesion Kinase (FAK), der Integrin Linked Kinase (ILK) und einem Aktinzytoskelett-Rearrangement.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Rolle Integrine und Integrinsignalwege für die Invasin und YadA vermittelte Adhäsion spielen und wie sich dies nachfolgend auf die Yop-Injektion auswirkt. Hierfür wurden Zellen mit Ye infiziert und mithilfe eines Adhäsionsassays, die Adhäsion von Ye an Zellen bestimmt. Zum Einsatz kamen verschiedene transgene Zelllinien und *Yersinia* Mutantenstämme.

Es konnte gezeigt werden, dass YadA oder Invasin auf Bakterienseite sowie  $\beta 1$  Integrine bei GD25 Fibroblasten Grundvoraussetzung für die Adhäsion sind. Bei den hier gewählten Infektionsbedingungen für die Adhäsion, bei denen die Bakterien ohne weitere Zentrifugationsschritte auf Zellen gegeben wurden, zeigte sich generell, dass YadA vermittelt wesentlich mehr Bakterien an Zellen binden können als Invasin vermittelt. Die zytoplasmatische Domäne von  $\beta 1$  Integrinen, die zur Integrinaktivierung benötigt wird, ist für die Invasin vermittelte Adhäsion wichtig, spielt aber für die YadA vermittelte Adhäsion nur eine

untergeordnete Rolle. Diese Ergebnisse zeigen prinzipielle Unterschiede in der Interaktion von Invasin und YadA mit  $\beta 1$  Integrinen.

Eine Aktivierung der Integrine mit Mangan und damit erhöhte Ligandenaffinität hatte keinen Effekt auf die Adhäsion. Ebenso wenig hat ein Fehlen der Integrin Linked Kinase, welche Integrine indirekt mit dem Aktinzytoskelett verbindet, einen Einfluss auf die Adhäsion. Wird die Integrin-induzierbare Aktinpolymerisation durch CytochalasinD inhibiert, kann die Adhäsion jedoch signifikant reduziert werden. Zudem wurde gezeigt, dass die Focal Adhesion Kinase nicht für die YadA oder Invasin vermittelte Adhäsion benötigt wird.

Im Unterschied zur Adhäsion an Fibroblasten bindet Ye über YadA auch  $\beta 1$  Integrin-unabhängig an IMCD Epithelzellen. Nachfolgende Untersuchungen ergaben, dass die YadA vermittelte Adhäsion auch über Integrine der  $\alpha V$ -Familie erfolgen kann.

## 6. Abkürzungen

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Ars <sup>R</sup>	Arsenit Resistenz
Asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bla	β-Lactamase
CDC42	cell division control protein 42 homolog
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extra Cellulare Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
FA	focal adhesion
FACS	fluorescence activated cell sorter
FAK	focal adhesion kinase
FAT	Focal Adhesion Targeting
FCS	fetal calf serum
GCS-F	granulocyte colony stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
HSPG	Heparan Sulfat Proteoglykan
IL	Interleukin
ILK	Integrin linked kinase
IMCD	Inner medullary collecting duct
Inv	Invasin
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin Resistenz

LB	Luria Bertani (Medium)
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
Lcr	low-calcium-response
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MCP	monocyte chemotactic protein
Mg	Magnesium
M-Zelle	microfold-Zelle
Myf	mucoïd Yersinia factor
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NaI <sup>R</sup>	Nalidixin Resistenz
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	Optical density
P	Prolin
PBS	phosphate bufferd saline
PFA	Paraformaldehyd
Pyk	Protein tyrosine kinase
pYV	plasmid Yersinia Virulence
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Rho	ras homolog
RT	Raumtemperatur
Scr	Sex combs reduced
SLP-76	SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76kDa
Spp	species pluralis
Strep <sup>R</sup>	Streptomycin Resistenz

TAA	Trimeren Autotransporter Adhäsine
Tetra <sup>R</sup>	Tetracyclin Resistenz
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TTSS	Type three secretion system
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
Y	Tyrosin
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	Yersinia Adhesin A
Ye	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Yop	Yersinia outer protein
Yps	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
Ysc	Yersinia secretion component
z.B.	zum Beispiel

#### **Einheiten:**

°C	Grad Celcius
Mg	Microgramm
MI	Microliter
B/ml	Bakterien/ml
B/Z	Bakterien/Zelle
Cm	Zentimeter
G	Erdbeschleunigung
H	Stunde
Mg	Milligramm
MI	Milliliter
Mm	Millimeter
mM	Millimol
MOI	Multiplicity of infection
Nm	Nanometer
Rpm	revolutions per minute
U	Units

## 7. Literaturverzeichnis

1. Van Loghem, J.J., *The classification of the plague-bacillus*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1944. **10**(1-2): p. 15.
2. Sneath, P.H. and S.T. Cowan, *An electro-taxonomic survey of bacteria*. J Gen Microbiol, 1958. **19**(3): p. 551-65.
3. Cornelis, G.R., et al., *The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1315-52.
4. Carter, P.B., C.F. Varga, and E.E. Keet, *New strain of Yersinia enterocolitica pathogenic for rodents*. Appl Microbiol, 1973. **26**(6): p. 1016-8.
5. Brenner, D.J., *Speciation in Yersinia*. Contrib Microbiol Immunol, 1979. **5**: p. 33-43.
6. Black, R.E., et al., *Epidemic Yersinia enterocolitica infection due to contaminated chocolate milk*. N Engl J Med, 1978. **298**(2): p. 76-9.
7. Kapperud, G., *Yersinia enterocolitica in food hygiene*. Int J Food Microbiol, 1991. **12**(1): p. 53-65.
8. Fredriksson-Ahomaa, M., A. Stolle, and H. Korkeala, *Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica infections*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **47**(3): p. 315-29.
9. Lee, L.A., et al., *Yersinia enterocolitica O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings*. N Engl J Med, 1990. **322**(14): p. 984-7.
10. Bottone, E.J., *Yersinia enterocolitica: the charisma continues*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(2): p. 257-76.
11. Marks, M.I., et al., *Yersinia enterocolitica gastroenteritis: a prospective study of clinical, bacteriologic, and epidemiologic features*. J Pediatr, 1980. **96**(1): p. 26-31.
12. Rabson, A.R., A.F. Hallett, and H.J. Koornhof, *Generalized Yersinia enterocolitica infection*. J Infect Dis, 1975. **131**(4): p. 447-51.
13. Bouza, E., et al., *Yersinia enterocolitica Septicemia*. Am J Clin Pathol, 1980. **74**(4): p. 404-9.
14. Melby, K., et al., *Septicaemia due to Yersinia enterocolitica after oral overdoses of iron*. Br Med J (Clin Res Ed), 1982. **285**(6340): p. 467-8.
15. Saebo, A. and J. Lassen, *A survey of acute and chronic disease associated with Yersinia enterocolitica infection. A Norwegian 10-year follow-up study on 458 hospitalized patients*. Scand J Infect Dis, 1991. **23**(5): p. 517-27.
16. Ahvonen, P., K. Sievers, and K. Aho, *Arthritis associated with Yersinia enterocolitica infection*. Acta Rheumatol Scand, 1969. **15**(3): p. 232-53.
17. Hoogkamp-Korstanje, J.A., *Antibiotics in Yersinia enterocolitica infections*. J Antimicrob Chemother, 1987. **20**(1): p. 123-31.
18. Leitlinien, A., *Akute infektiöse Gastroenteritis*, 2008, Leitlinien der Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung (GPGE).
19. Gayraud, M., et al., *Antibiotic treatment of Yersinia enterocolitica septicemia: a retrospective review of 43 cases*. Clin Infect Dis, 1993. **17**(3): p. 405-10.

20. Hanski, C., et al., *Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of Yersinia enterocolitica serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis*. Infect Immun, 1989. **57**(3): p. 673-8.
21. Grutzkau, A., et al., *Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by Yersinia enterocolitica and other enteroinvasive bacteria*. Gut, 1990. **31**(9): p. 1011-5.
22. Autenrieth, I.B. and R. Firsching, *Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by Yersinia enterocolitica: an ultrastructural and histological study*. J Med Microbiol, 1996. **44**(4): p. 285-94.
23. Neutra, M.R., *M cells in antigen sampling in mucosal tissues*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **236**: p. 17-32.
24. Pepe, J.C. and V.L. Miller, *Yersinia enterocolitica invasin: a primary role in the initiation of infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6473-7.
25. Isberg, R.R. and J.M. Leong, *Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells*. Cell, 1990. **60**(5): p. 861-71.
26. Arnold, R., et al., *Effects of Listeria monocytogenes and Yersinia enterocolitica on cytokine gene expression and release from human polymorphonuclear granulocytes and epithelial (HEp-2) cells*. Infect Immun, 1993. **61**(6): p. 2545-52.
27. Kampik, D., R. Schulte, and I.B. Autenrieth, *Yersinia enterocolitica invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in Yersinia infections*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 2484-92.
28. Autenrieth, I.B., et al., *Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against Yersinia enterocolitica involve integrins and cytokines*. Infect Immun, 1996. **64**(4): p. 1357-68.
29. Carter, P.B., *Animal model of human disease. Yersinia enteritis. Animal model: oral Yersinia enterocolitica infection of mice*. Am J Pathol, 1975. **81**(3): p. 703-6.
30. Persson, C., et al., *The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions*. EMBO J, 1997. **16**(9): p. 2307-18.
31. Persson, C., et al., *Localization of the Yersinia PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism*. Mol Microbiol, 1999. **33**(4): p. 828-38.
32. Visser, L.G., A. Annema, and R. van Furth, *Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized Yersinia enterocolitica by human granulocytes*. Infect Immun, 1995. **63**(7): p. 2570-5.
33. Miller, V.L. and S. Falkow, *Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells*. Infect Immun, 1988. **56**(5): p. 1242-8.
34. Hoiczyk, E., et al., *Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins*. EMBO J, 2000. **19**(22): p. 5989-99.
35. Tsai, J.C., et al., *The bacterial intimins and invasins: a large and novel family of secreted proteins*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14403.

36. Pepe, J.C., J.L. Badger, and V.L. Miller, *Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the Yersinia enterocolitica inv gene*. Mol Microbiol, 1994. **11**(1): p. 123-35.
37. Ellison, D.W., M.B. Lawrenz, and V.L. Miller, *Invasin and beyond: regulation of Yersinia virulence by RovA*. Trends Microbiol, 2004. **12**(6): p. 296-300.
38. Isberg, R.R., Z. Hamburger, and P. Dersch, *Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors*. Microbes Infect, 2000. **2**(7): p. 793-801.
39. Leong, J.M., et al., *An aspartate residue of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein that is critical for integrin binding*. EMBO J, 1995. **14**(3): p. 422-31.
40. Saltman, L.H., et al., *A region of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein that contributes to high affinity binding to integrin receptors*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23438-44.
41. Isberg, R.R. and G. Tran Van Nhieu, *Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors*. Trends Microbiol, 1994. **2**(1): p. 10-4.
42. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
43. Tran Van Nhieu, G. and R.R. Isberg, *Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density*. EMBO J, 1993. **12**(5): p. 1887-95.
44. Cossart, P. and P.J. Sansonetti, *Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens*. Science, 2004. **304**(5668): p. 242-8.
45. Van Nhieu, G.T., et al., *Mutations in the cytoplasmic domain of the integrin beta1 chain indicate a role for endocytosis factors in bacterial internalization*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7665-72.
46. Isberg, R.R. and G.T. Van Nhieu, *The mechanism of phagocytic uptake promoted by invasin-integrin interaction*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(3): p. 120-4.
47. Palumbo, R.N. and C. Wang, *Bacterial invasin: structure, function, and implication for targeted oral gene delivery*. Curr Drug Deliv, 2006. **3**(1): p. 47-53.
48. Jung, H.C., et al., *A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion*. J Clin Invest, 1995. **95**(1): p. 55-65.
49. Schulte, R., et al., *Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent Yersinia enterocolitica*. Infect Immun, 1996. **64**(6): p. 2106-13.
50. Schulte, R., et al., *Yersinia enterocolitica invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers*. FASEB J, 2000. **14**(11): p. 1471-84.
51. Brett, S.J., et al., *The invasin protein of Yersinia spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins*. Eur J Immunol, 1993. **23**(7): p. 1608-14.
52. Arencibia, I., et al., *Yersinia invasin, a bacterial beta1-integrin ligand, is a potent inducer of lymphocyte motility and migration to collagen type IV and fibronectin*. J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1853-9.
53. Arencibia, I., G. Frankel, and K.G. Sundqvist, *Induction of cell death in T lymphocytes by invasin via beta1-integrin*. Eur J Immunol, 2002. **32**(4): p. 1129-38.

54. Cornelis, G., et al., *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev Infect Dis*, 1987. **9**(1): p. 64-87.
55. Bolin, I., L. Norlander, and H. Wolf-Watz, *Temperature-inducible outer membrane protein of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica is associated with the virulence plasmid*. *Infect Immun*, 1982. **37**(2): p. 506-12.
56. Linke, D., et al., *Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function*. *Trends Microbiol*, 2006. **14**(6): p. 264-70.
57. Skurnik, M. and P. Toivanen, *LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol*, 1992. **174**(6): p. 2047-51.
58. Lambert de Rouvroit, C., C. Sluifers, and G.R. Cornelis, *Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*, 1992. **6**(3): p. 395-409.
59. Tahir, Y.E., P. Kuusela, and M. Skurnik, *Functional mapping of the Yersinia enterocolitica adhesin YadA. Identification Of eight NSVAIG - S motifs in the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding*. *Mol Microbiol*, 2000. **37**(1): p. 192-206.
60. Tamm, A., et al., *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*, 1993. **10**(5): p. 995-1011.
61. Roggenkamp, A., et al., *Substitution of two histidine residues in YadA protein of Yersinia enterocolitica abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence*. *Mol Microbiol*, 1995. **16**(6): p. 1207-19.
62. Roggenkamp, A., et al., *Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of Yersinia enterocolitica serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils*. *Infect Immun*, 1996. **64**(7): p. 2506-14.
63. Ackermann, N., et al., *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*, 2008. **190**(14): p. 5031-43.
64. El Tahir, Y. and M. Skurnik, *YadA, the multifaceted Yersinia adhesin*. *Int J Med Microbiol*, 2001. **291**(3): p. 209-18.
65. Schutz, M., et al., *Trimer stability of YadA is critical for virulence of Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*, 2010. **78**(6): p. 2677-90.
66. Heesemann, J. and L. Gruter, *Genetic-Evidence That the Outer-Membrane Protein Yop1 of Yersinia-Enterocolitica Mediates Adherence and Phagocytosis Resistance to Human Epithelial-Cells*. *FEMS Microbiol Lett*, 1987. **40**(1): p. 37-41.
67. Skurnik, M., et al., *YadA mediates specific binding of enteropathogenic Yersinia enterocolitica to human intestinal submucosa*. *Infect Immun*, 1994. **62**(4): p. 1252-61.
68. Emody, L., et al., *Binding to collagen by Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms*. *J Bacteriol*, 1989. **171**(12): p. 6674-9.
69. Flugel, A., et al., *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*, 1994. **269**(47): p. 29732-8.

70. Schulze-Koops, H., et al., *Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin*. Infect Immun, 1993. **61**(6): p. 2513-9.
71. Gripenberg-Lerche, C., et al., *Role of YadA in arthritogenicity of Yersinia enterocolitica serotype O:8: experimental studies with rats*. Infect Immun, 1994. **62**(12): p. 5568-75.
72. Gripenberg-Lerche, C., M. Skurnik, and P. Toivanen, *Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of Yersinia enterocolitica serotype O:8: experimental studies with rats*. Infect Immun, 1995. **63**(8): p. 3222-6.
73. Pilz, D., et al., *Mechanism of YadA-mediated serum resistance of Yersinia enterocolitica serotype O3*. Infect Immun, 1992. **60**(1): p. 189-95.
74. China, B., et al., *Role of the YadA protein in prevention of opsonization of Yersinia enterocolitica by C3b molecules*. Infect Immun, 1993. **61**(8): p. 3129-36.
75. Skurnik, M., et al., *Virulence plasmid-associated autoagglutination in Yersinia spp.* J Bacteriol, 1984. **158**(3): p. 1033-6.
76. Cornelis, G.R. and F. Van Gijsegem, *Assembly and function of type III secretory systems*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: p. 735-74.
77. Cornelis, G.R., *Yersinia type III secretion: send in the effectors*. J Cell Biol, 2002. **158**(3): p. 401-8.
78. Galan, J.E. and A. Collmer, *Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1322-8.
79. Kubori, T., et al., *Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system*. Science, 1998. **280**(5363): p. 602-5.
80. Koster, M., et al., *The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of Yersinia enterocolitica forms a ring-shaped multimeric complex*. Mol Microbiol, 1997. **26**(4): p. 789-97.
81. Loquet, A., et al., *Atomic model of the type III secretion system needle*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 276-9.
82. Hoiczyk, E. and G. Blobel, *Polymerization of a single protein of the pathogen Yersinia enterocolitica into needles punctures eukaryotic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4669-74.
83. Woestyn, S., et al., *YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery*. J Bacteriol, 1994. **176**(6): p. 1561-9.
84. Edqvist, P.J., et al., *Minimal YopB and YopD translocator secretion by Yersinia is sufficient for Yop-effector delivery into target cells*. Microbes Infect, 2007. **9**(2): p. 224-33.
85. Forsberg, A., et al., *The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in Yersinia pseudotuberculosis*. Mol Microbiol, 1991. **5**(4): p. 977-86.
86. Torruellas, J., et al., *The Yersinia pestis type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion*. Mol Microbiol, 2005. **57**(6): p. 1719-33.
87. Sarker, M.R., et al., *LcrG is required for efficient translocation of Yersinia Yop effector proteins into eukaryotic cells*. Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2976-9.
88. Falker, S., M.A. Schmidt, and G. Heussipp, *Altered Ca(2+) regulation of Yop secretion in Yersinia enterocolitica after DNA adenine methyltransferase overproduction is mediated by Clp-dependent degradation of LcrG*. J Bacteriol, 2006. **188**(20): p. 7072-81.

89. Day, J.B., F. Ferracci, and G.V. Plano, *Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by Yersinia pestis yopN, tyeA, syncN, yscB and lcrG deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies*. Mol Microbiol, 2003. **47**(3): p. 807-23.
90. Viboud, G.I. and J.B. Bliska, *Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis*. Annu Rev Microbiol, 2005. **59**: p. 69-89.
91. Aili, M., et al., *In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity*. Microb Pathog, 2003. **34**(6): p. 297-308.
92. Von Pawel-Rammigen, U., et al., *GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure*. Mol Microbiol, 2000. **36**(3): p. 737-48.
93. Schotte, P., et al., *Targeting Rac1 by the Yersinia effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25134-42.
94. Black, D.S. and J.B. Bliska, *The RhoGAP activity of the Yersinia pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence*. Mol Microbiol, 2000. **37**(3): p. 515-27.
95. Andor, A., et al., *YopE of Yersinia, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells*. Cell Microbiol, 2001. **3**(5): p. 301-10.
96. Zhang, Z.Y., et al., *Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant Yersinia protein tyrosine phosphatase*. J Biol Chem, 1992. **267**(33): p. 23759-66.
97. Gerke, C., S. Falkow, and Y.H. Chien, *The adaptor molecules LAT and SLP-76 are specifically targeted by Yersinia to inhibit T cell activation*. J Exp Med, 2005. **201**(3): p. 361-71.
98. Alonso, A., et al., *Lck dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by Yersinia phosphatase YopH*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4922-8.
99. Hamid, N., et al., *YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages*. Microb Pathog, 1999. **27**(4): p. 231-42.
100. Grosdent, N., et al., *Role of Yops and adhesins in resistance of Yersinia enterocolitica to phagocytosis*. Infect Immun, 2002. **70**(8): p. 4165-76.
101. Green, S.P., et al., *Role of YopH in the suppression of tyrosine phosphorylation and respiratory burst activity in murine macrophages infected with Yersinia enterocolitica*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(6): p. 972-7.
102. Trulzsch, K., et al., *Contribution of the major secreted yops of Yersinia enterocolitica O:8 to pathogenicity in the mouse infection model*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5227-34.
103. Kerschen, E.J., et al., *The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells*. Infect Immun, 2004. **72**(8): p. 4589-602.
104. Leung, K.Y., B.S. Reisner, and S.C. Straley, *YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of Yersinia pestis in mice*. Infect Immun, 1990. **58**(10): p. 3262-71.

105. Juris, S.J., et al., *A distinctive role for the Yersinia protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9431-6.
106. Trasak, C., et al., *Yersinia protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process*. J Biol Chem, 2007. **282**(4): p. 2268-77.
107. Dukuzumuremyi, J.M., et al., *The Yersinia protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35281-90.
108. Barz, C., et al., *The Yersinia Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1*. FEBS Lett, 2000. **482**(1-2): p. 139-43.
109. Groves, E., et al., *Sequestering of Rac by the Yersinia effector YopO blocks Fcγ receptor-mediated phagocytosis*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 4087-98.
110. Boland, A. and G.R. Cornelis, *Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection*. Infect Immun, 1998. **66**(5): p. 1878-84.
111. Schesser, K., et al., *The yopJ locus is required for Yersinia-mediated inhibition of NF-κappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity*. Mol Microbiol, 1998. **28**(6): p. 1067-79.
112. Ruckdeschel, K., et al., *Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF-κappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production*. J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 1069-79.
113. Autenrieth, S.E., et al., *Yersinia enterocolitica YopP inhibits MAP kinase-mediated antigen uptake in dendritic cells*. Cell Microbiol, 2007. **9**(2): p. 425-37.
114. Denecker, G., et al., *Yersinia enterocolitica YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 19706-14.
115. Shao, F., et al., *A Yersinia effector and a Pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis*. Cell, 2002. **109**(5): p. 575-88.
116. Iriarte, M. and G.R. Cornelis, *YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells*. Mol Microbiol, 1998. **29**(3): p. 915-29.
117. Mejia, E., J.B. Bliska, and G.I. Viboud, *Yersinia controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity*. PLoS Pathog, 2008. **4**(1): p. e3.
118. Clark, M.A., B.H. Hirst, and M.A. Jepson, *M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of Yersinia pseudotuberculosis to mouse Peyer's patch M cells*. Infect Immun, 1998. **66**(3): p. 1237-43.
119. Hynes, R.O., *Integrins: a family of cell surface receptors*. Cell, 1987. **48**(4): p. 549-54.
120. Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries, *Integrin ligands at a glance*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 19): p. 3901-3.

121. Tamkun, J.W., et al., *Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin*. Cell, 1986. **46**(2): p. 271-82.
122. de Melker, A.A. and A. Sonnenberg, *Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events*. Bioessays, 1999. **21**(6): p. 499-509.
123. Retta, S.F., et al., *beta1-integrin cytoplasmic subdomains involved in dominant negative function*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(4): p. 715-31.
124. Baudoin, C., et al., *Genomic organization of the mouse beta 1 gene: conservation of the beta 1D but not of the beta 1B and beta 1C integrin splice variants*. Cell Adhes Commun, 1996. **4**(1): p. 1-11.
125. Schaller, M.D., et al., *Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains*. J Cell Biol, 1995. **130**(5): p. 1181-7.
126. Otey, C.A., et al., *Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 1993. **268**(28): p. 21193-7.
127. Bouaouina, M., Y. Lad, and D.A. Calderwood, *The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins*. J Biol Chem, 2008. **283**(10): p. 6118-25.
128. Harburger, D.S., M. Bouaouina, and D.A. Calderwood, *Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11485-97.
129. Brakebusch, C., et al., *Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules*. J Cell Sci, 1997. **110** ( Pt 23): p. 2895-904.
130. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
131. Stupack, D.G. and D.A. Cheresh, *Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 19): p. 3729-38.
132. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1028-32.
133. Liddington, R.C. and M.H. Ginsberg, *Integrin activation takes shape*. J Cell Biol, 2002. **158**(5): p. 833-9.
134. Hannigan, G.E., et al., *Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase*. Nature, 1996. **379**(6560): p. 91-6.
135. Legate, K.R. and R. Fassler, *Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 187-98.
136. Gingras, A.R., et al., *Central region of talin has a unique fold that binds vinculin and actin*. J Biol Chem, 2010. **285**(38): p. 29577-87.
137. Horwitz, A., et al., *Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage*. Nature, 1986. **320**(6062): p. 531-3.
138. Tadokoro, S., et al., *Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation*. Science, 2003. **302**(5642): p. 103-6.
139. Calderwood, D.A., *Talin controls integrin activation*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt3): p. 434-7.
140. Wegener, K.L., et al., *Structural basis of integrin activation by talin*. Cell, 2007. **128**(1): p. 171-82.

141. Montanez, E., et al., *Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins*. Genes Dev, 2008. **22**(10): p. 1325-30.
142. Moser, M., et al., *Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 325-30.
143. Humphries, J.D., et al., *Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin*. J Cell Biol, 2007. **179**(5): p. 1043-57.
144. Saunders, R.M., et al., *Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(6): p. 487-500.
145. Geiger, B., et al., *Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 793-805.
146. Riveline, D., et al., *Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism*. J Cell Biol, 2001. **153**(6): p. 1175-86.
147. Chen, C.S., et al., *Cell shape provides global control of focal adhesion assembly*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(2): p. 355-61.
148. Otey, C.A., F.M. Pavalko, and K. Burridge, *An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro*. J Cell Biol, 1990. **111**(2): p. 721-9.
149. Choi, C.K., et al., *Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(9): p. 1039-50.
150. Laukaitis, C.M., et al., *Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells*. J Cell Biol, 2001. **153**(7): p. 1427-40.
151. von Wichert, G., et al., *Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2*. EMBO J, 2003. **22**(19): p. 5023-35.
152. Calderwood, D.A., S.J. Shattil, and M.H. Ginsberg, *Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 22607-10.
153. Legate, K.R., et al., *ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(1): p. 20-31.
154. Sakai, T., et al., *Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation*. Genes Dev, 2003. **17**(7): p. 926-40.
155. Grashoff, C., et al., *Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(5): p. 565-71.
156. Postel, R., et al., *Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex*. Dev Biol, 2008. **318**(1): p. 92-101.
157. Schaller, M.D., et al., *pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 5192-6.
158. Hildebrand, J.D., M.D. Schaller, and J.T. Parsons, *Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(6): p. 637-47.
159. Chen, H.C., et al., *Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin*. J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 16995-9.

160. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 56-68.
161. Lipfert, L., et al., *Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets*. J Cell Biol, 1992. **119**(4): p. 905-12.
162. Kornberg, L.J., et al., *Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8392-6.
163. Kornberg, L., et al., *Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase*. J Biol Chem, 1992. **267**(33): p. 23439-42.
164. Burridge, K., C.E. Turner, and L.H. Romer, *Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly*. J Cell Biol, 1992. **119**(4): p. 893-903.
165. Ilic, D., et al., *Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice*. Nature, 1995. **377**(6549): p. 539-44.
166. Grassl, G.A., et al., *Interaction of Yersinia enterocolitica with epithelial cells: invasin beyond invasion*. Int J Med Microbiol, 2003. **293**(1): p. 41-54.
167. Grassl, G.A., et al., *Activation of NF-kappaB and IL-8 by Yersinia enterocolitica invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades*. Cell Microbiol, 2003. **5**(12): p. 957-71.
168. Fassler, R., et al., *Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts*. J Cell Biol, 1995. **128**(5): p. 979-88.
169. Wennerberg, K., et al., *Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin*. J Cell Biol, 1996. **132**(1-2): p. 227-38.
170. Keller, B., et al., *Yersinia enterocolitica exploits different pathways to accomplish adhesion and toxin injection into host cells*. Cell Microbiol, 2015.
171. Zhang, X., et al., *beta1 integrin is necessary for ureteric bud branching morphogenesis and maintenance of collecting duct structural integrity*. Development, 2009. **136**(19): p. 3357-66.
172. Brakebusch, C., et al., *Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes*. EMBO J, 2000. **19**(15): p. 3990-4003.
173. Czuchra, A., et al., *Genetic analysis of beta1 integrin "activation motifs" in mice*. J Cell Biol, 2006. **174**(6): p. 889-99.
174. Koberle, M., et al., *Yersinia enterocolitica targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model*. PLoS Pathog, 2009. **5**(8): p. e1000551.
175. Mould, A.P., et al., *Conformational changes in the integrin beta A domain provide a mechanism for signal transduction via hybrid domain movement*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17028-35.
176. Ni, H., et al., *Integrin activation by dithiothreitol or Mn<sup>2+</sup> induces a ligand-occupied conformation and exposure of a novel NH<sub>2</sub>-terminal regulatory site on the beta1 integrin chain*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 7981-7.

177. Brenner, S.L. and E.D. Korn, *The effects of cytochalasins on actin polymerization and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerization*. J Biol Chem, 1980. **255**(3): p. 841-4.
178. Michael, K.E., et al., *Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(9): p. 2508-19.
179. Schaller, M.D. and J.T. Parsons, *Focal adhesion kinase and associated proteins*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(5): p. 705-10.
180. Breuss, J.M., et al., *Restricted distribution of integrin beta 6 mRNA in primate epithelial tissues*. J Histochem Cytochem, 1993. **41**(10): p. 1521-7.
181. Busk, M., R. Pytela, and D. Sheppard, *Characterization of the integrin alpha v beta 6 as a fibronectin-binding protein*. J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 5790-6.
182. Iriarte, M., et al., *The Myf fibrillae of Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol, 1993. **9**(3): p. 507-20.
183. Hamburger, Z.A., et al., *Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein*. Science, 1999. **286**(5438): p. 291-5.
184. Hudson, K.J., J.B. Bliska, and A.H. Bouton, *Distinct mechanisms of integrin binding by Yersinia pseudotuberculosis adhesins determine the phagocytic response of host macrophages*. Cell Microbiol, 2005. **7**(10): p. 1474-89.
185. Gustavsson, A., et al., *Role of the beta1-integrin cytoplasmic tail in mediating invasins-promoted internalization of Yersinia*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 13): p. 2669-78.
186. Mould, A.P., *Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes*. J Cell Sci, 1996. **109** ( Pt 11): p. 2613-8.
187. Wang, B., et al., *Integrin-linked kinase is an essential link between integrins and uptake of bacterial pathogens by epithelial cells*. Cell Microbiol, 2006. **8**(2): p. 257-66.
188. Kim, M., et al., *Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment*. Nature, 2009. **459**(7246): p. 578-82.
189. Bernfield, M., et al., *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 729-77.
190. Koda, J.E. and M. Bernfield, *Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Basal extracellular proteoglycan binds specifically to native type I collagen fibrils*. J Biol Chem, 1984. **259**(19): p. 11763-70.
191. Saunders, S. and M. Bernfield, *Cell surface proteoglycan binds mouse mammary epithelial cells to fibronectin and behaves as a receptor for interstitial matrix*. J Cell Biol, 1988. **106**(2): p. 423-30.
192. Henry-Stanley, M.J., et al., *Ability of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-1 to participate in bacterial translocation across the intestinal epithelial barrier*. Shock, 2005. **24**(6): p. 571-6.
193. WuDunn, D. and P.G. Spear, *Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate*. J Virol, 1989. **63**(1): p. 52-8.
194. Mondor, I., S. Ugolini, and Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 3623-34.
195. Fleckenstein, J.M., J.T. Holland, and D.L. Hasty, *Interaction of an outer membrane protein of enterotoxigenic Escherichia coli with cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Infect Immun, 2002. **70**(3): p. 1530-7.

196. Alvarez-Dominguez, C., et al., *Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of Listeria monocytogenes, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition.* Infect Immun, 1997. **65**(1): p. 78-88.
197. van Putten, J.P. and S.M. Paul, *Binding of syndecan-like cell surface proteoglycan receptors is required for Neisseria gonorrhoeae entry into human mucosal cells.* EMBO J, 1995. **14**(10): p. 2144-54.
198. Hirno, S., et al., *Inhibition of heparan sulphate and other glycosaminoglycans binding to Helicobacter pylori by various polysulphated carbohydrates.* FEMS Immunol Med Microbiol, 1995. **10**(3-4): p. 301-6.
199. Liang, O.D., et al., *Binding of heparan sulfate to Staphylococcus aureus.* Infect Immun, 1992. **60**(3): p. 899-906.
200. Boyd, A.P., et al., *Heparin interferes with translocation of Yop proteins into HeLa cells and binds to LcrG, a regulatory component of the Yersinia Yop apparatus.* Mol Microbiol, 1998. **27**(2): p. 425-36.
201. Tumova, S., A. Woods, and J.R. Couchman, *Heparan sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences.* J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9410-7.
202. Young, V.B., S. Falkow, and G.K. Schoolnik, *The invasin protein of Yersinia enterocolitica: internalization of invasin-bearing bacteria by eukaryotic cells is associated with reorganization of the cytoskeleton.* J Cell Biol, 1992. **116**(1): p. 197-207.
203. Su, B., et al., *Signal transduction-mediated adherence and entry of Helicobacter pylori into cultured cells.* Gastroenterology, 1999. **117**(3): p. 595-604.
204. Galan, J.E. and J.B. Bliska, *Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 221-55.
205. Viboud, G.I. and J.B. Bliska, *A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes.* EMBO J, 2001. **20**(19): p. 5373-82.
206. Alrutz, M.A. and R.R. Isberg, *Involvement of focal adhesion kinase in invasin-mediated uptake.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13658-63.
207. Sieg, D.J., et al., *Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK- cell migration.* EMBO J, 1998. **17**(20): p. 5933-47.
208. Van Nhieu, G.T. and R.R. Isberg, *The Yersinia pseudotuberculosis invasin protein and human fibronectin bind to mutually exclusive sites on the alpha 5 beta 1 integrin receptor.* J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24367-75.

## 8. Erklärung zum Eigenanteil

Frau Sara Mößner hat die Versuche und Auswertungen zur Adhäsion durchgeführt, welche in den Abbildungen 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 7A, 7B, 8A, 8B, 9A, 9B, 10A, 10B, 11A, 11B, 12A und 12B dargestellt sind. Die entsprechenden Fotos und Diagramme wurden von Frau Mößner persönlich erstellt, das Manuskript für diese Arbeit wurde ebenso von Frau Mößner selbstständig verfasst.

Frau Dr. Birgit Keller hat die Versuche zur Yop-Translokation durchgeführt, welche in den Abbildungen 2C, 3C, 4C, 5C, 7C, 8C, 9C, 10C und 11 C abgebildet sind. Die entsprechenden Ergebnisse und Diagramme wurden von Frau Dr. Keller mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt. Die von Frau Dr. Keller verwendete Methodik wird im Methodikteil beschrieben, insbesondere in den Kapiteln 2.2.2.6, 2.2.2.7 und 2.2.3.

Frau Dr. Keller war gemeinsam mit PD Dr. E. Bohn an der Konzeption der Studie beteiligt. Beide haben die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

## 9. Veröffentlichungen

Keller B\*, Mühlenkamp M, Deuschle E, Siegfried A, Mössner S, Schade J, Griesinger T, Katava N, Braunsdorf C, Fehrenbacher B, Jimenez-Soto LF, Schaller M, Haas R, Genth H, Retta SF, Meyer H, Böttcher RT, Zent R, Schütz M, Autenrieth IB, Bohn E (2015) *Yersinia enterocolitica* exploits different pathways to accomplish adhesion and toxin injection into host cells. Cellular microbiology doi: 10.1111/cmi.12429. [Epub ahead of print]

## 10. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Birgit Keller für die kompetente Betreuung, gute Einarbeitung im Labor und die vielen konstruktiven Kommentare zum Manuskript.

PD Dr. E. Bohn danke ich für die interessante Themenstellung, gute Betreuung und Ansprechbarkeit, sowie die hilfreichen Ratschläge während des Schreibens.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern für die Unterstützung bei der Einarbeitung die vielen guten Tipps und die freundliche Arbeitsatmosphäre.