

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

**Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**Untersuchung zur Translokation von  
„*Yersinia outer proteins*“ in Wirtszellen mit Hilfe des  
YopE-Cre Reportersystems**

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

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

**vorgelegt von  
SANDRA KOVAČEVIĆ  
aus  
Ludwigsburg**

**2010**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

Meinen Eltern und Diana

Optimismus ist in seinem Wesen  
keine Ansicht über die gegenwärtige Situation,  
sondern er ist eine Lebenskraft,  
eine Kraft der Hoffnung, wo andere resignierten,  
eine Kraft,  
die die Zukunft niemals dem Gegner überlässt,  
sondern sie für sich in Anspruch nimmt.

*Dietrich Bonhoeffer*



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Gattung <i>Yersinia</i> und ihre medizinische Bedeutung.....	1
1.2	Das pYV Plasmid und die Pathogenitätsfaktoren von <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	2
1.3	Das Typ III-Sekretionssystem .....	6
1.4	Yersiniose in der Maus.....	9
1.5	Das <i>Cre-loxP</i> Rekombinationssystem.....	10
1.6	<i>Cre loxP</i> als Reportersystem <i>in vitro</i> : CV1-5B Fibroblasten.....	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit .....	13
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Materialien .....	16
2.1.1	Geräte.....	16
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.3	Laborchemikalien.....	19
2.1.3.1	Allgemeine Laborchemikalien.....	19
2.1.3.2	Zellkulturformulierungen .....	22
2.1.3.3	Antibiotika.....	22
2.1.3.4	Kits .....	23
2.1.4	Proteine .....	23
2.1.4.1	Größenstandards .....	23
2.1.4.2	Enzyme .....	23
2.1.4.3	Antikörper .....	24
2.1.5	Nukleinsäuren.....	24
2.1.5.1	Oligonukleotide.....	24
2.1.5.2	Plasmide.....	25
2.1.6	Zelllinien.....	26
2.1.7	Bakterienstämme.....	26
2.1.8	Medien.....	28
2.1.8.1	Bakteriennährmedien .....	28
2.1.8.2	Zellkulturmedien .....	28
2.1.9	Lösungen und Puffer .....	29
2.1.9.1	Allgemeine Lösungen und Puffer .....	29
2.1.9.2	Puffer und Lösungen für die Proteingelektrophorese .....	30
2.1.9.3	Puffer für Immunoblotting (Western Blot) .....	30
2.1.9.4	Probenpuffer für die Agarosegelelektrophorese .....	31
2.1.9.5	Lösungen für den $\beta$ -Galaktosidase Nachweis.....	32
2.1.9.6	Lösungen für FACS.....	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	33
2.2.1.1	Plasmid-Präparation mit Nucleobond AX-Säulen .....	33
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.2.1.3	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen .....	34
2.2.1.4	DNA Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	34
2.2.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	34

2.2.1.6	Dephosphorylierung .....	35
2.2.1.7	Auffüllen von Überhängen durch DNA Polymerase I (Klenow-Fragment).....	35
2.2.1.8	Phenol/Chloroform-Extraktion .....	35
2.2.1.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	36
2.2.1.10	Natriumacetat-Fällung von DNA.....	37
2.2.1.11	DNA Konzentrationsbestimmung .....	37
2.2.1.12	Herstellung und Transformation von Calcium- kompetenten <i>E. coli</i> Bakterien.....	38
2.2.1.13	Herstellung und Transformation von elektrokompetenten Bakterien.....	39
2.2.1.14	Isolierung der Gesamt DNA aus Bakterien.....	39
2.2.2	Proteinchemische und allgemeine biochemische Methoden.....	40
2.2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen .....	40
2.2.2.2	Immunoblot (Western Blot).....	42
2.2.2.3	Proteinbestimmung .....	43
2.2.2.4	Gewinnung von Kernproteinen.....	43
2.2.2.5	TCA-Fällung sekretierter Proteine .....	44
2.2.3	Mikrobiologische Methoden .....	45
2.2.3.1	Kultivierung von Bakterien.....	45
2.2.3.2	Herstellung von Gefrierkulturen von Bakterien.....	45
2.2.3.3	Induktion der Proteinsekretion von <i>Yersinia</i> - Stämmen.....	46
2.2.4	Zellbiologische Methoden .....	46
2.2.4.1	Passagieren von eukaryontischen Zell-Linien .....	47
2.2.4.2	Zellzahlbestimmung .....	47
2.2.4.3	Einfrieren von Zellen .....	47
2.2.4.4	In <i>vitro</i> Infektion von eukaryonten Zellen.....	48
2.2.4.5	Transfektion von eukaryontische Zelllinien mit ExGen 500 .....	49
2.2.4.6	Darstellung der Proteinexpression durch Nachweis von $\beta$ -Galaktosidase.....	50
2.2.4.7	Quantifizierung $\beta$ -Galaktosidase positiver Zellen durch Auszählen.....	51
2.2.5	Durchflußzytometrische –Analyse (FACS) .....	51
2.2.5.1	Intrazelluläre $\beta$ -Galaktosidase Färbung .....	52
3	Ergebnisse .....	53
3.1	Klonierungen.....	53
3.1.1	Transiente Expression und Rekombination der Cre Rekombinase.....	53
3.1.2	Herstellung der Fusionsproteine YopE <sub>138</sub> -Cre und YopE <sub>52</sub> -Cre .....	54
3.1.3	Herstellung von pCDNA3yopE <sub>138</sub> cre und pCDNA3yopE <sub>52</sub> cre.....	59
3.2	Überprüfung der Expression und Funktionalität der Fusionsproteine YopE-Cre.....	62
3.3	Untersuchungen zur Sekretion des YopE-Cre Fusionsproteins.....	63

3.4	Untersuchungen zur Translokation .....	64
3.5	Vergleichende Untersuchungen der Translokation und Transfektion .....	66
3.6	<i>In vitro</i> Infektionen und Transfektionen .....	68
3.6.1	Etablierung der Nachweismethode .....	68
3.6.1.1	Infektion transient transfizierter HeLa Zellen .....	68
3.6.1.2	Entwicklung einer stabilen Zelllinie.....	72
3.6.1.3	Infektion von CV1-5B Zellen.....	73
3.6.2	Quantifizierung der Rekombinationseffizienz der Fusionsproteine .....	75
3.6.2.1	Quantifizierung durch Auszählen.....	75
3.6.2.2	Quantifizierung von Yop Translokation durch durchflusszytometrische Analyse .....	76
4	Diskussion .....	80
4.1	YopE <sub>138</sub> Cre / YopE <sub>52</sub> Cre .....	81
4.2	Sekretion und Translokation von YopE <sub>138</sub> Cre / YopE <sub>52</sub> Cre .....	82
4.3	<i>In vitro</i> Infektionen und Nachweismethoden .....	84
4.4	Cre-lox P als Reportersystem zum Nachweis der Translokation von Yop´s .....	85
5	Zusammenfassung .....	88
6	Abkürzungen .....	90
7	Literatur .....	95
8	Danksagung .....	107
9	Lebenslauf.....	108





# 1 Einleitung

## 1.1 Die Gattung *Yersinia* und ihre medizinische Bedeutung

Die Gattung *Yersinia* wurde 1964 nach dem Schweizer Bakteriologen Alexandre J. Yersin benannt (47), der 1894 als erster den Erreger der Pest isolierte. Die Mitglieder der Gattung *Yersinia* gehören zu der Familie der *Enterobacteriaceae* (102) und sind ubiquitär verbreitete, Gram-negative Stäbchenbakterien. Sie sind pleomorph, nicht sporenbildend, fakultativ anaerob und wachsen optimal bei 27 – 30 °C. Bekannt sind elf Arten, von denen drei humapathogen sind (26, 34): *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica*.

*Yersinia pestis* ist der Erreger der sogenannten Beulen- und Lungenpest und war im Mittelalter und der frühen Neuzeit für verheerende Epidemien verantwortlich.

*Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* stellen die enteropathogenen Vertreter der Gattung *Yersinia* dar (113). Die Infektion durch *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* erfolgt auf dem fäkal-oralem Infektionsweg durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln, insbesondere Schweinefleisch, nicht pasteurisierte Milch oder verunreinigtes Trinkwasser (38,3). Beide Erreger führen zu einem ähnlichen Erkrankungsbild, der Yersiniose. Es erkranken vor allem Kinder und immungeschwächte Personen. Nach einer Inkubationszeit von drei bis sieben Tagen beginnt die Erkrankung mit einer akuten Gastroenteritis, die durch Übelkeit und Diarrhoe, kolikartige abdominale Beschwerden sowie Fieber gekennzeichnet ist. Die Erkrankung ist in der Regel selbstlimitierend, in seltenen Fällen verläuft die Infektion jedoch septisch mit Bildung von Abszessen in Leber, Milz und anderen Organen. Dies tritt beispielsweise bei Immunsuppression, Desferrioxamin-

Behandlung und bei Patienten mit Eisenüberladung auf (23,24,87). Chronisch persistierende Yersiniosen sind ebenfalls selten (61).

In 10 % der Erkrankungen kann im Anschluss als immunpathologische Folgeerkrankung eine reaktive Arthritis, ein Erythema nodosum oder eine Uveitis auftreten. Besonders davon betroffen sind Patienten, die das MCH-Gen HLA B27 tragen (1). Die reaktive Arthritis tritt einige Tage bis hin zu Monate nach der akuten Enteritis auf und heilt nach ein bis zwölf Monaten spontan aus. Bei einer geringen Anzahl der Patienten verbleiben Residuen, wie z.B. leichte Rückenschmerzen bis hin zu einer Sacroilitis. In seltenen Fällen kommt es zu einer ankylosierenden Spondylitis (120).

Die Therapie der akuten Infektion mit *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* beinhaltet den Ausgleich des Flüssigkeits- und Elektrolytverlustes. Eine antibiotische Therapie ist bei schweren Verläufen, einer Sepsis oder bei immunsupprimierten Patienten notwendig. Die Diagnose wird durch Erregeranzucht aus Stuhlproben, Blutkulturen oder durch serologische Verfahren, z.B. Widal-Agglutination oder Immunoblot gestellt.

Nach elektronenmikroskopischen und zellbiologischen Untersuchungen wurde *Y. enterocolitica* als extrazelluläres Pathogen beschrieben (10,42,57), es tritt in einigen Fällen aber auch intrazellulär auf (72). Ähnliches gilt für *Y. pseudotuberculosis* (109,110).

Die drei humanpathogenen *Yersinien* Stämme weisen trotz unterschiedlicher Infektionswege und Krankheitsbilder folgende Gemeinsamkeiten auf: den Tropismus gegenüber lymphoidem Gewebe und die Resistenz gegenüber der unspezifischen Immunabwehr, insbesondere Makrophagen und polymorphonuclearen Leukozyten (88).

## **1.2 Das pYV Plasmid und die Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica***

Bei der Infektion mit enteropathogenen *Yersinien* spielen die Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes in der Immunantwort eine initiale Rolle. Die Interaktion

von *Yersinia enterocolitica* mit Epithelzellen induziert die Ausschüttung von Zytokinen, wodurch Makrophagen und PNMs rekrutiert werden. Diese stellen gemeinsam mit den natürlichen Killerzellen eine erste Verteidigungslinie der angeborenen Immunität dar, durch die eine primäre Infektion mit *Y. enterocolitica* in den ersten Tagen eingedämmt wird (11,12,14,33,58,98). Im weiteren Verlauf werden die Erreger durch die adaptive, T-Zell-vermittelte Immunantwort bekämpft (7,8,11,14).

*Yersinien* besitzen eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren, die die Invasion und Ausbreitung im Wirtsorganismus ermöglichen. Diese sind teilweise chromosomal (91) und teilweise auf einem stark konserviertem, 70 kb großen Virulenzplasmid kodiert (114). Auf diesem, als pYV bezeichneten Virulenzplasmid, sind die Yop-Gene in einem Virulon organisiert. Es kodiert zum einen für Proteine, die den Sekretions-Apparat bilden, und zum anderen für Proteine, die sogenannten Yops (*Yersinia outer proteins*), die durch dieses Transportsystem in die Wirtszellen transloziert werden. Bei *Y. enterocolitica* sind bisher sechs Effektor-Yops beschrieben worden, die man als YopH, YopE, YopT, YopO, YopP und YopM bezeichnet.

In der aktuellen Forschung finden die vom pYV Plasmid kodierten Faktoren, die über das Typ III-Sekretionssystem in die Wirtszelle transloziert werden, besondere Bedeutung. Diese Effektor-Yops greifen an unterschiedlichen Stellen in die Physiologie der Wirtszelle ein, wodurch sowohl die unspezifische wie auch die spezifische Immunantwort beeinflusst wird (19,41,45,81,82,96). Auf zellulärer Ebene inhibieren die Yops insbesondere bei Makrophagen über intrazelluläre Kaskaden die Phagozytose und induzieren letztendlich deren Apoptose (19,41,45,81,82,96). In Tabelle 1 ist eine Übersicht über einige der bekannten und gut charakterisierten Virulenzfaktoren dargestellt.

**Tab. 1:** Übersicht der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren enteropathogener *Yersinien*.

<b>Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren</b>		
<b>Faktor</b>	<b>Funktion</b>	<b>Literatur</b>
Inv	Adhäsion, ein Invasin. Durch Bindung an $\beta$ 1 Integrine wird die Transzytose durch M-Zellen, die Internalisierung in Epithel-Zellen und die Sekretion von IL-8 vermittelt. Aktivierung von B- und T-Lymphozyten zur Proliferation oder Zytokin-Sekretion. Die Bildung von Pseudopodien bei T-Lymphozyten wird induziert und die hapto- und chemotaktische Wirkung vermittelt.	(75), (104), (85), (106), (70), (27), (44), (78), (5).
Ail	Vermittelt neben der Adhäsion an und Invasion in Epithel-Zellen auch Serum-Resistenz.	(80), (21), (86).
Myf	Fimbrien, die möglicherweise als intestinaler Kolonisierungsfaktor zusammen mit Yst Diarrhoe auslösen.	(67)
RovA	Regulator von Invasin und anderen chromosomalen Virulenzgenen. Beeinflussung der Inflammation in Peyerschen Plaques.	(43), (90).
SodA	Detoxifiziert Sauerstoff-Radikale, die durch Kontakt mit polymorphonukleären Leukozyten gebildet werden. Vermittelt Virulenz bei der Besiedelung von Leber und Milz, aber nicht bei der Kolonisierung von Peyerschen Plaques.	(93)
Yst	Hitzestabiles Enterotoxin. Es stimuliert die Guanylat-Zyklase intestinaler Epithel-Zellen und löst Diarrhoe aus.	(40), (89), (92).
HPI	(“High Pathogenicity Island”) Kodiert für das Siderophor Yersiniabactin und damit assoziierte Gene. Es vermittelt so die Aufnahme von Eisen. Möglicherweise immunsupprimierende Wirkung auf B- und T-Zellen, Makrophagen und PMNs.	(55), (9), (13).

<b>pYV kodierte Pathogenitätsfaktoren</b>		
<b>Faktor</b>	<b>Funktion</b>	<b>Literatur</b>
YadA	Vermittelt Adhärenz an epitheliale Zellen und professionelle Phagozyten. Bindet an Kollagen, zelluläres Fibronectin und Laminin. Vermittelt Phagozytoseresistenz und Schutz gegen Komplement-vermittelte Lyse (durch Bindung an Faktor H) und Defensine.	(60), (95), (94), (107), (121), (31).
LcrV	Supprimiert die Expression von TNF $\alpha$ und IFN- $\gamma$ . Inhibiert die Chemotaxis von Neutrophilen. Induziert in Makrophagen die Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10.	(127), (111).
YopE	Zytotoxin, aktiviert GTPase, führt durch Interaktion mit Rho, Rac, Cdc42 zur Zerstörung der Aktin-Filamente und verhindert so die Phagozytose.	(2), (19), (84), (97)
YopT	Zerstörung der Aktin-Filamente und Veränderung des Zytoskeletts durch Modifikation von RhoA, was zu einer Umverteilung von RhoA von der Membran ins Zytosol führt.	(66), (131).
YopH	Protein-Tyrosin Phosphatase, welche die Proteine des fokalen Adhäsions-Komplexes dephosphoryliert. Verhindert durch Auflösung der fokalen Adhäsions-Komplexe die Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten. Suppression des "oxidative burst". Inhibition der Antigen-Rezeptor assoziierten Signaltransduktionskaskaden in B- und T-Lymphozyten.	(53), (18), (20), (98), (130).
YopO (YpkA)	Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts, was zur Abrundung von Zellen führt. Protein-Kinase, die durch Aktin aktiviert wird und die Auto-phosphorylierung von Serin-Resten katalysiert. Interagiert mit RhoA und Rac1.	(69), (50), (15).
YopM	Agglutination von Plasma. Homolog zum von Willebrand-Faktor. Wird in den Nukleus transportiert, Funktion unklar.	(76), (77), (112).

Bei unterschiedlicher Nomenklatur der einzelnen Faktoren von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* werden diese als zweites genannt.

### 1.3 Das Typ III-Sekretionssystem

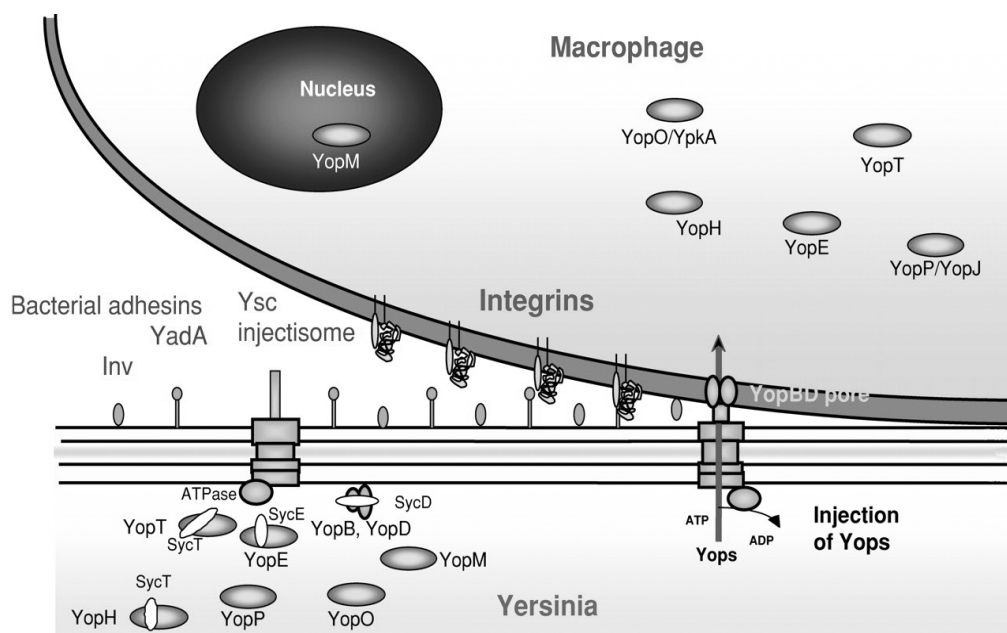
Das Typ III-Sekretionssystem (TTSS) wurde zunächst bei Isolaten von *Yersinia spp.*, *Shigella spp.* und *Salmonella typhimurium* beschrieben. Bei vielen Gram-negativen Bakterien ist es ein weit verbreiteter Mechanismus zur Sekretion und Translokation von Virulenzfaktoren oder „Effektor“-Proteinen in eukaryotische Wirtszellen um das wirtseigene Immunsystem zu umgehen (37,49). Das Vorkommen dieser TTSS ist jedoch keineswegs auf human- und tierpathogene Bakterien beschränkt, sie werden auch bei einer ganzen Reihe von pflanzenpathogenen Bakterien, wie z.B. *Pseudomonas spezieis* beschrieben (59). Bekannt sind bisher über 20 unterschiedliche Typ III-Sekretionssysteme in Tier- und Pflanzenpathogenen (35). Komponenten des TTSS weisen Homologien zum Flagellen-Export-System auf, was als Hinweis auf einen gemeinsamen evolutiven Ursprung gewertet werden kann (124).

Eines der bisher am besten untersuchten Sekretionssysteme ist das *Yersinia* Ysc System. Unter physiologischen Bedingungen wird die Sekretion und Translokation der Yops durch den direkten Kontakt des Bakteriums mit der eukaryotischen Zelle getriggert, *in vitro* lässt sich dies jedoch auch durch Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen in das Nährmedium auslösen. Bei *Salmonellen*, *Shigellen* und *Yersinien* wird der Typ III-Sekretionsapparat als Injektiosom bezeichnet. Es umfasst etwa 25 Proteine (35,49,65) und ist aus einem Basalkörper und einer nadelförmigen Struktur, die diesem aufsitzt, aufgebaut. Der Basalkörper durchspannt die Peptidoglykanschicht sowie die innere und äußere bakterielle Membran (73). Beide Komponenten schließen einen Kanal von 20-30 Å Innendurchmesser ein (73) durch welchen die Proteine die Bakterienhülle passieren (35). Unter den sekretierten Proteinen werden drei Kategorien unterschieden:

1. Effektorproteine, die nach Wirtszellkontakt sekretiert und in die Wirtszelle injiziert werden. Bei *Yersinia enterocolitica* sind dies YopE, H, M, O, T und P.

2. Proteine mit regulatorischer Funktion für den Proteinexport. Bei *Yersinia spp.* fungiert YopN möglicherweise als eine Art Verschlussstopfen, der nach Interaktion mit der Wirtszelle via Adhäsine YadA entfernt wird (22). LcrQ/YscM fungieren möglicherweise ebenfalls als Regulatoren (36).
3. Proteine, die für die Translokation der eigentlichen Effektoren in die Wirtszellen verantwortlich sind indem sie eine Pore in der Zellmembran bilden. Bei *Yersinia spp.* sind dies die sogenannten Translokator-Yops, YopB, YopD und LcrV (100).

Für die Injektion der Yops (siehe Abb. 1) sind außer dem direkten Kontakt des Bakteriums mit der eukaryotischen Zelle die drei Translokator-Yops, YopB, YopD und LcrV (100) erforderlich. Diese destabilisieren die eukaryotische Membran in dem Maße, das ein Eindringen der Nadel in die Membran ermöglicht (35).



**Abb. 1:** Übersicht über das Modell der Typ III-Sekretion von *Yersinia spp.* (Die Abbildung wurde aus Cornelis, 2002b entnommen (35)). Unter wirtsspezifischen Bedingungen, synthetisieren *Yersinien* Yops und exprimieren den TSS III auf ihrer Zelloberfläche. Das Bakterium tritt mittels der Adhäsine Inv und YadA in Kontakt mit der eukaryotischen Zelle. Dies führt zur Öffnung des Sekretions-Kanals und zur Sekretion der Translokator-Yops B, D und LcrV, wodurch es zur Porenbildung in der Membran der Zielzelle kommt. Die Effektor-Yops können nun direkt ins Zytosol der Wirtszelle transloziert werden. Syc: *specific yop chaperone*.

Der exakte Mechanismus der Yop-Sekretion und deren Signalwege wird trotz intensiver Untersuchung noch kontrovers diskutiert. In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die ersten 15 Codons von YopE, das bezüglich des Transportmechanismus am besten untersuchte Yop, ausreichen um die Sekretion der Reporterproteine zu ermöglichen (4,115). Die Translokation einiger Yops wiederum bedarf eines zusätzlichen zweiten Signals. Die dafür weiter downstream liegenden Erkennungssequenzen sind zwar für die Bindung an den Sekretionsapparat nicht essentiell, jedoch vermitteln sie die optimale und somit sekretionskompetente Entfaltung des Yops durch die Bindung an das entsprechende Chaperon (128). Für YopE sind hierfür Kodon 16 bis 50 ausreichend. Die Chaperone, sogenannten Syc-Proteine, werden zu einer neuen Familie der Typ III-Sekretions-Chaperone zusammengefasst (126). Während die Effektor-Yops YopE, H und T die entsprechenden Chaperone SycE, H und T besitzen, benötigen YopP, YopO/YpkA und Yop M keine Chaperone zur Sekretion. Die Transporter-Yops YopB und D haben ein gemeinsames Chaperon, das SycD (125). Die unterschiedlichen Chaperone weisen nur geringe oder keine sequenzielle Ähnlichkeiten auf, besitzen aber gleiche strukturelle Eigenschaften. Sie sind kleine (<20 kDa), saure Proteine mit einer C-terminalen amphipatischen Helix. Einige der Chaperone, wie zum Beispiel Syc E, bilden Dimere (17,126,126). Das Fehlen von Chaperonen wirkt sich lediglich auf die Sekretion der entsprechenden Yops aus, ohne dabei die Sekretion anderer Proteine zu beeinträchtigen (125). Die Bindung des Chaperons an sein Partner-Yop vor der Translokation stabilisiert das Yop und schützt es vor intrabakterieller Degradation (48).

Möglicherweise dient die Chaperonbindung nicht nur dazu, Yops durch partielle oder vollständige Entfaltung sekretionskompetent zu machen, sondern auch dazu, unter ihnen eine Sekretionshierarchie zu etablieren, um die Wirkung auf die Zelle zu maximieren (25).

Das Typ III-Sekretionssystem (TTSS) ist entscheidend für die Virulenz von *Yersinien*. Es wurden verschiedene Methoden zur Untersuchung der Yop Translokation über das TTSS in eukaryotische Zellen *in vitro* und *in vivo*



entwickelt. Zur Detektion der Effektor-Proteine des TTSS werden direkte biochemische oder mikroskopische Methoden, und indirekte Methoden durch verschiedene Reportersysteme angewandt. So konnte durch Herstellung eines Expressionsvektors bestehend aus YopE-Cya (Adenylatcyclase) und quantitativer Analyse der Umsetzung von ATP zu cAMP gezeigt werden, dass das YopE-CyA Fusionsprotein in das Zytosol infizierter Makrophagen über den Typ III-Sekretions/Translokationsapparat transloziert wird (115).

Jacobi et al entwickelten ein Reportersystem, welches auf YopE-GFP und YopE-Luziferase Fusionsproteinen basiert. Hiermit konnten *Yersinien*, die das Fusionsprotein exprimieren, in Zellkulturen und in Maus-Infektionen mittels Fluoreszenz detektiert werden. Die Yop- Injektion konnte hiermit nicht eindeutig nachgewiesen oder quantifiziert werden (68).

Das Problem mit welchen Zellen *Yersinien in vivo* interagieren und in welche Zellen Yops *in vivo* transloziert werden konnte durch diese Arbeiten jedoch nicht geklärt werden.

## 1.4 Yersiniose in der Maus

Der Krankheitsverlauf wie auch die Symptome der enteropathogenen Yersiniose sind bei Menschen und Nagetieren vergleichbar (29,62). Für die Untersuchung der Pathogenitätsmechanismen der enteropathogenen *Yersinien* werden deshalb Tiermodelle herangezogen, wobei das Mausmodell besonders gut charakterisiert ist.

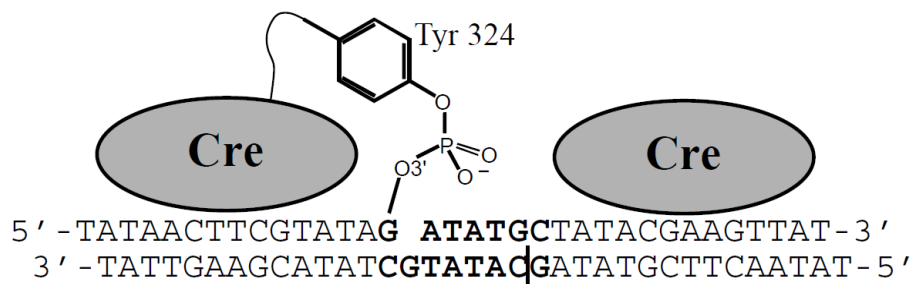
Nach oraler Infektion überwinden die *Yersinien* die intestinale Epithelbarriere über die spezialisierten M-Zellen (membranöse Epithelzellen), dringen in die Peyerschen Plaques, vermehren sich dort extrazellulär und bilden Abszesse, die sich einerseits in das Darmlumen entleeren und andererseits zur Dissemination der *Yersinien* in mesenteriale Lymphknoten, Milz, Leber und Blutbahn führen (10,52,57). Sie können wahrscheinlich über Jahre in Lymphknoten persistieren. Das chromosomal kodierte Invasin ist an der Interaktion der *Yersinien* mit  $\beta$ 1-Integrin der M-Zellen und an der nachfolgenden Transcytose der *Yersinien* beteiligt (32,105). Durch Interaktion von

*Y. enterocolitica* mit Epithelzellen und Zellen der Peyerschen Plaques wird die Sekretion von IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 und GM-CSF induziert (6,70). Dadurch kommt es zu einer Einwanderung von polymorphonukleären Leukozyten (PMNs) und Monozyten (12). Nach Passage der *Yersinien* durch die M-Zellen werden zusätzlich zu Yada auch Yops exprimiert und diese in die Wirtszelle injiziert. Die Yops inhibieren in vielfältiger Weise die Signaltransduktionskaskade, die die Abwehrzellen normalerweise nach bakteriellem Kontakt aktivieren würde. Auf diesem Wege kommt es zur Blockierung der Phagozytose und des *oxidativen bursts* der PMNs und Makrophagen (36).

## 1.5 Das *Cre-loxP* Rekombinationssystem

Das Cre-Protein gehört zur Familie der DNA-Rekombinasen. Die natürliche Funktion befindet sich im Lebenszyklus des Bakteriophagen P1, wo Cre (**c**auses **r**ecombination) unter anderem dazu benötigt wird nach der Vermehrung der Phagen-DNA DNA-Untereinheiten voneinander zu trennen (117-119).

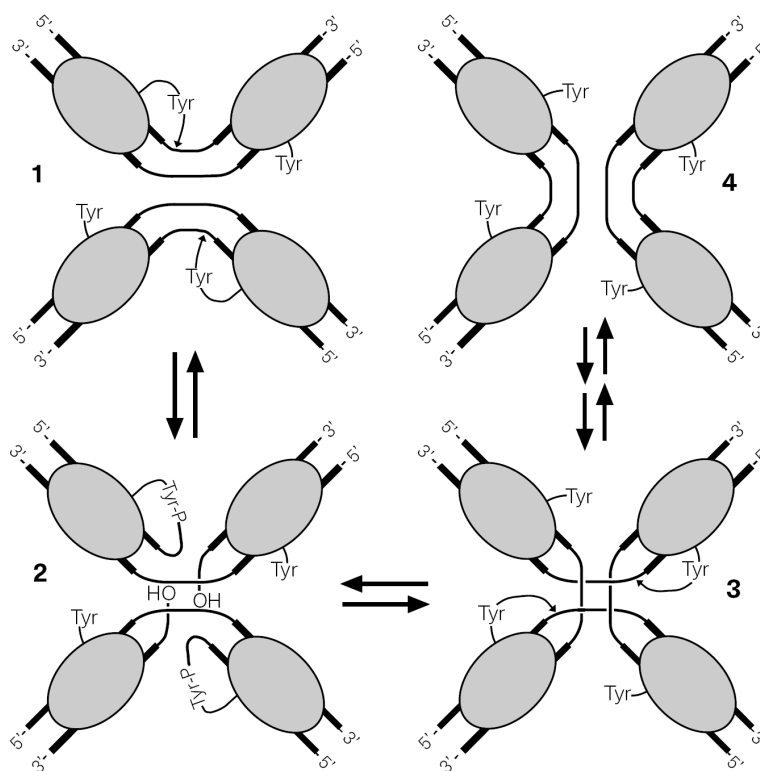
Die 38 kDa große Cre Rekombinase vermittelt die ortsspezifische Rekombination zwischen zwei identischen Erkennungssequenzen, den *loxP*-Elementen (*loxP* = **l**ocus of **c**rossing over (**x**) aus **P**1). Die Erkennungssequenz ist 34 bp lang und setzt sich aus zwei invertierten Wiederholungen („inverted repeats“, 13bp) und einer asymmetrischen Kernsequenz („spacer“, 8bp) zusammen (siehe Abb. 2). Der „spacer“ gibt der *loxP*-Sequenz eine Orientierung, die für das Ergebnis der Rekombination von Bedeutung ist.



**Abb. 2:** Spezifische Bindung der Cre-Moleküle an die „inverted repeats“ der *loxP*-Erkennungssequenz mit Angriff durch das nukleophile Tyrosin<sub>324</sub> zwischen der 1. und 2. Base in der „spacer“-Region. (Abbildung aus Guo et al., 1997, Fig. 1c entnommen, (54)).

Eine Cre-vermittelte Rekombination zwischen zwei *loxP*-Elementen geschieht mit Basenpaargenauigkeit. Die DNA wird geschnitten und im asymmetrischen Zwischenstück religiert. Liegen beide *loxP*-Elemente in gleicher Orientierung auf dem gleichen DNA-Strang, so führt dies zum Ausschneiden der dazwischen liegenden Sequenz als zirkuläres Molekül. Weisen die beiden *loxP*-Sequenzen in entgegengesetzter Richtungen, so kommt es zur Umkehrung (Inversion) der durch *loxPs* flankierten Bereiche. Bei der intermolekularen Rekombination liegen die *loxP*-Sequenzen auf unterschiedlichem Molekül, zum Beispiel auf zwei Chromosomen oder auf einem Chromosom und einem Plasmid. Die intermolekulare Rekombination führt zum reziproken Austausch der die *loxP*-Sequenzen flankierenden Bereiche, beziehungsweise zur Integration des *loxP*-tragenden Plasmids in den *loxP*-tragenden Genlokus (64,101).

Die Cre-Rekombinase bindet als Dimer jeweils an die „inverted repeats“ der *loxP*-Sequenz. Insgesamt sind vier Cre-Moleküle an der Rekombination beteiligt. Der genaue Verlauf der ortsgerichteten Rekombination ist detailliert in Abb. 3 erklärt.



1. Zwei Cre Moleküle binden an die *loxP* loci und assoziieren dadurch die Bildung einer Rekombinationssynapse.

2. Konservierte Tyr324 Reste schneiden beide Substrate und bilden kovalente 3'-Phosphotyrosin DNA-Cre Zwischenprodukte aus, die antiparallel zueinander angeordnet sind.

3. Die freigewordene 5'-OH-Gruppe agiert als Nukleophil und greift wiederum die entstandene Phosphotyrosin-Bindung des anderen Reaktionspartners an. Daraus resultiert die Entstehung einer Holliday-Struktur als Zwischenstufe.

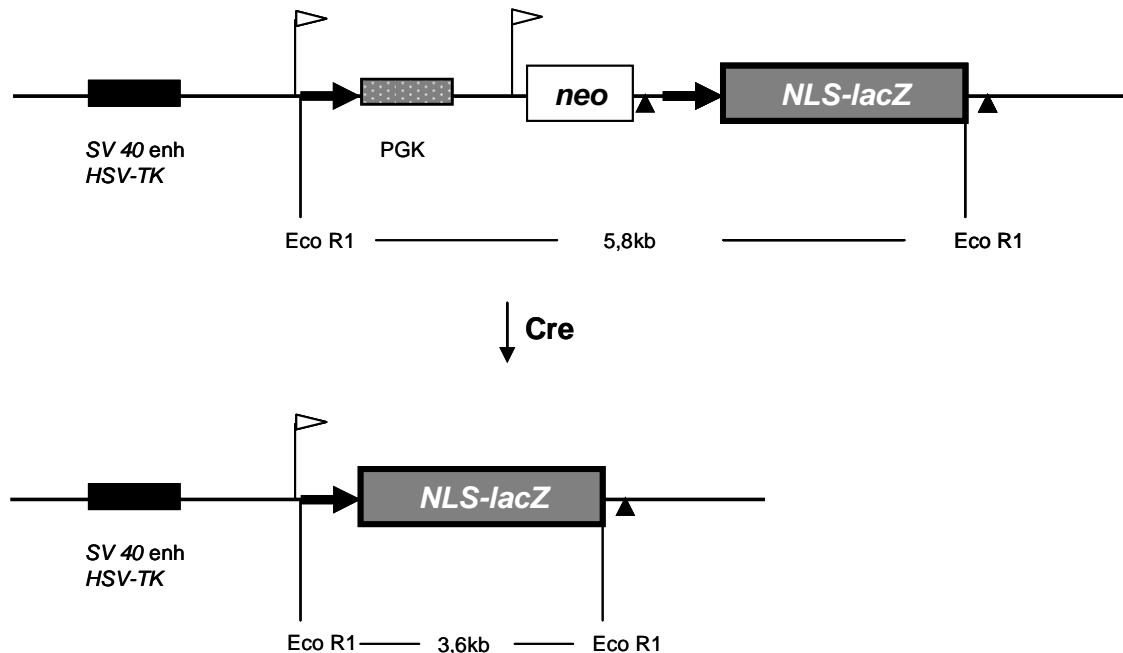
4. Die Spaltung des Intermediates und der Strangaustausch in einer zweiten Runde führen zu den rekombinierten Produkten.

**Abb. 3:** Reaktionsmechanismus des Cre-*lox*-Rekombinationssystems (39). Die Cre Rekombinase (graue Ellipse) mit dem aktiven Tyrosin-Rest (Tyr<sub>324</sub>) bindet an die *loxP* Erkennungssequenzen. (Die Abbildung wurde aus Guo et al., 1997 Fig 1a entnommen (54)).

## 1.6 Cre *loxP* als Reportersystem *in vitro*: CV1-5B Fibroblasten

Die Fibroblasten-Zelllinie CV1-5B ist eine transgene Zelllinie, die ein bewährtes System zur *in vitro* Darstellung von Cre-Aktivität ist (71). Diese Linie stammt von Nierenzellen der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) ab und wurde 1964 in Kultur genommen. Später wurden die Zellen genetisch verändert. Die Fibroblasten enthalten als Reporter gen ein *NLS-lacZ* Konstrukt. Dem aus *E.coli* stammenden  $\beta$ -Galaktosidase-Gen *lacZ* ist ein Kernlokalisationsignal (*NLS*) angehängt. Durch Cre-vermittelte Rekombination gelangt das *NLS-lacZ* Konstrukt unter die Kontrolle seines Promotors, so dass  $\beta$ -Galaktosidase

exprimiert wird (Abb.4). Ein SV 40 NLS (“nuclear localisation signal“) verbessert durch Interaktion mit Kernporenproteinen den Kernimport des  $\beta$ -Galaktosidase Proteins.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Cre-vermittelten Rekombination anhand des Zielkonstruktes der CV1-5B Fibroblasten. Das Neomycin-Gen (*neo*), welches von einem PGK Promoter gesteuert wird, trennt den ORF des *lacZ*-Gens vom Promoter. Ein SV40 Polyadenylierungssignal ( $\blacktriangle$ ) downstream des Neomycin ORFs (*neo*) verhindert die Expression des  $\beta$ -Galaktosidase Proteins. Das Neomycin-Gen wird durch zwei *loxP* Elemente ( $\blacktriangleright$ ) flankiert. Durch Cre-vermittelte Rekombination wird das Neomycin-Gen entfernt und somit steht das NLS-*lacZ* Gen unter der Kontrolle des SV40 / HSV TK Promoter (Abbildung nach Kellendonk et al, 1996, (71)).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das bisherige Wissen über die Funktion und Rolle der Virulenzfaktoren von *Yersinien* ist vor allem durch *in vitro* Untersuchungen der Wechselwirkungen definierter Zellpopulationen mit *Yersinien* analysiert worden. Es war jedoch vollkommen unklar, in welche Zellen *Yops* *in vivo* während einer Infektion transloziert werden. Die bisherigen etablierten Reportersysteme waren für solche Untersuchungen nicht geeignet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein *loxP*-Cre basiertes Reportersystem zu entwickeln, um in Infektionsexperimenten von kultivierten Zellen diejenigen Zellen zu erkennen, in die die

Yops transloziert werden. Langfristig gesehen sollte dieses System dazu dienen, die Translokation von Yops im *Y. enterocolitica* Mausinfektionsmodell *in vivo* nachweisen zu können.

Dazu sollten *Y. enterocolitica* Bakterienstämme hergestellt werden, die YopE-Cre Recombinase Fusionsproteine exprimieren. In einem *in vitro* Zellsystem sollte überprüft werden, ob diese Fusionsproteine nach *Y. enterocolitica* Infektion in Wirtszellen transloziert werden und ob es anschließend zur effizienten Expression des Reportergens  $\beta$ -Galaktosidase kommt.

Als Grundlage der Analyse dienen Resultate früherer Untersuchungen, die die Translokation von Fusionsproteinen über das Typ III-Sekretionssystem von *Yersinia* analysieren (68). Dafür wurden Reporterproteine an die ersten 138 Aminosäuren des YopE-Proteins fusioniert und eine, auf dem Typ III-Sekretionssystem basierende, Translokation des Reporterproteins EGFP in Zielzellen nachgewiesen. Allerdings weist dieses System nur eine relativ geringe Sensitivität auf. Ursache hierfür ist, dass für die Detektion des Reporterproteins eine bestimmte Mindestmenge in der Zielzelle vorliegen muss, wofür die Translokationseffizienz aber oft nicht ausreichend ist. In der vorliegenden Arbeit sollte die Sensitivität des Systems erhöht werden, indem YopE nicht an das Reporterprotein selbst fusioniert wird, sondern an die Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1. Aufgrund der Tatsache, dass *Yersinien* das YopE-Cre-Rekombinase Fusionsprotein exprimieren, sollte nach der Translokation des YopE-Cre Recombinase in die Wirtszelle das Reportergen *lacZ* exprimiert werden können. Durch Anfärbung der  $\beta$ -Galaktosidase mittels x-Gal Färbung sollten die Yop Virulon tragenden Wirtszellen identifizierbar sein (Abb. 5).

Durch Untersuchungen mit YopE Fragmenten fusioniert an DHFR (46) wurde die Funktion des Syc Chaperons für die Sekretion von Yops über das Typ III-Sekretionssystem von *Yersinia* analysiert. Hierbei wurde die Sekretion von YopE-DHFR Hybriden, die 16, 52 und 80 Aminosäuren von YopE sowie YopE in voller Länge enthielten, miteinander verglichen. Die Proteine müssen in

ungefalteter oder teilweise gefalteter Form vorliegen um sekretiert zu werden, in gefalteter Form blockiert das Protein den Sekretionskanal des TTSS irreversibel. Die ersten 52 Aminosäuren von YopE kodieren für die minimale SycE-Bindungsdomäne (128). Diese vermittelt die Bindung des Syc Chaperons an das Protein. Durch die Bindung des Syc Chaperons wird die Faltung des Proteins verhindert und dieses effizienter sekretiert. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollten in der vorliegenden Arbeit YopE-Cre Konstrukte hergestellt werden, und deren Sekretion sowie Translokation in die Wirtszelle untersucht werden.

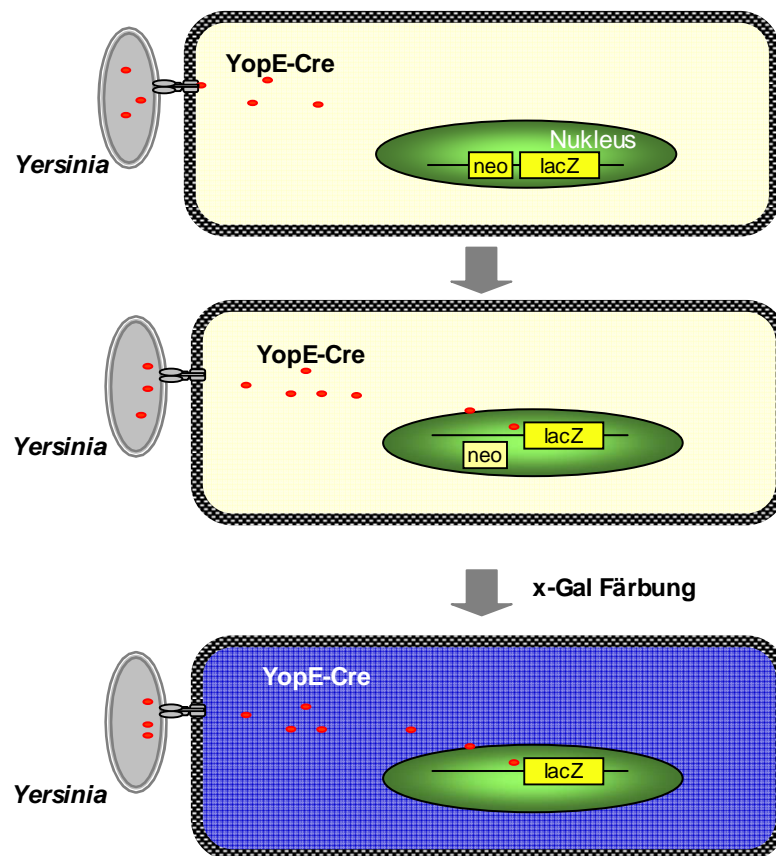


Abb. 5: Schematische Darstellung der Infektion von CV1-5B Fibroblasten mit *Yersinien*, die YopE-Cre Fusionsproteine exprimieren. Nach Translokation in die Zielzelle kommt es zur Cre vermittelten Rekombination des Reportergens und zur Expression von  $\beta$ -Galaktosidase. Diese wird mittels x-Gal Färbung durch Blaufärbung sichtbar.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Tab. 2: Übersicht über Geräte, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bakterien-Brutschrank	Heraeus B20, B6420	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Eismaschine	AF 20	Scotsman
Elektroporations Gerät	Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Elektroporations-Zusatzgerät	Pulse Controller Plus	Bio-Rad, München
FACS	FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	L 2200 S	Sartorius, Göttingen
Foto-Entwicklungsmaschine	Curix 60	Agfa, Köln
Geldokumentation	BioDoc Analyse	Biometra, Göttingen
Geldokumentation	Fluor-S Multiimager	Bio-Rad, München
Heizschüttler für Mikrogefäße	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Homogenisatoren	Tenbroeck tissue grinder	Wheaton Science Products, USA
Magnetheizrührer	RCT basic	IKA Werk, Staufen
Mikrowellenherd	Micromat	AEG, Frankfurt a. M.
Mini-Tisch-Zentrifuge	MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Assistent	Karl Hecht, Sondheim
PCR-Thermocycler	T3	Biometra, Göttingen



<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Photometer	Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10µl, 100 µl, 1000 µl)	Reference, Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf, Hamburg
Pufferbad für Agarosegele	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Rotoren f. Sorvall-Zentrifuge	SM 24, SS 34, SL1500	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Schüttelinkubator	HT	Infors, Bottmingen
Schüttler (Wippe)	WT 16	Biometra, Göttingen
SDS-PAGE-Kammern	Mini Protean II	Bio-Rad, München
Semi-Dry Transfer-Apparatur	Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Spannungsquellen für Elektrophorese	Power Pac 200, 300	Bio-Rad, München
Sterilbank	BDK-S 1200, 1500	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl
Tisch-Zentrifuge m. Kühlung	5417-R	Eppendorf, Hamburg
UV Transluminator	FLX-20 M	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe	CVC 2000	Vacuubrand, Wertheim
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	WB 10	Memmert, Schwabach
Zentrifuge	Sorvall RC 5C Plus	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Zentrifuge	Heraeus Biofuge Stratos	Kendro Laboratory Products, Langenselbold

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zellkultur-Brutschrank	Heraeus BBD 6220	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Zentrifugengefäße Sorvall	OR 250 ml, FL 25 ml, 50 ml	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Kühlung UV-Laser	Laserpure 20	Coherent, Dieburg
Mikroskop	DM IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop	TelaVal 31, Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Digitalkamera	Axiocam Color	Carl Zeiss, Jena
Netzteil UV-Laser	Enterprise	Coherent, Dieburg
Netzteil Vis-Laser	CTR MIC	Leica Microsystems, Wetzlar

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Übersicht über der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Autoradiographie-Filme (Kodak X-OMAT)	Kodak-Industrie, Cedex, F
Deckplättchen	Menzel, Braunschweig
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Eppendorf-Gefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Kanülen (0,4 x 19 mm, 0,9 x 70 mm)	Braun, Melsungen
Kunststoffflaschen, steril	Corning, USA
Membranen für Blots (PVDF)	Millipore, Eschborn
Mikrotiter-Platten (Spitzboden)	Greiner, Nürtingen

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Objektträger (Superfrost)	Menzel, Braunschweig
PCR-Gefäße	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipetten (5ml, 10ml)	Corning, USA
Pipettenspitzen (10 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (100 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 µl)	Greiner, Nürtingen
Plastik-Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Rundboden-Röhrchen (13 ml)	Greiner, Nürtingen
Spitzboden-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen (1 ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter (stericup)	Millipore, Eschborn
Whatman Papier	Bio-Rad, München
Zellkulturflaschen (25, 80, 175 cm <sup>2</sup> )	Nunc, Roskilde, DK
Zellkulturplatten (6-, 12-Vertiefungen)	Nunc, Roskilde, DK
Zellschaber	Corning, USA

### 2.1.3 Laborchemikalien

#### 2.1.3.1 Allgemeine Laborchemikalien

**Tab. 4:** In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
β-Mercaptoethanol	E. Merck, Darmstadt
Aceton	E. Merck, Darmstadt
Acrylamid / Bisacrylamid Mix (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	Eurobio, Les Iles Ulies, F
APS (Ammoniumpersulfat)	E. Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, MI, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	Biomol, Hamburg
Developer A, B	Agfa, Köln
Diaminobenzidin	Applichem, Darmstadt
Dimethylformamid	E. Merck, Darmstadt
Dithiotreitol	Applichem, Darmstadt
dNTPs	Roche, Mannheim
ECL-Westernblotdetektionssystem	Amersham Pharmacia, Freiburg
EGTA (Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,N'-Tetraacetat)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	E. Merck, Darmstadt
Ethanol	E. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
ExGen 500	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Formaldehyd	E. Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutardialdehyd	E. Merck, Darmstadt
Glyzerin	E. Merck, Darmstadt
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	ICN, CA, USA
Hirn-Herz Bouillon (BHI)	Difco, MI, USA
Imidazol	Applichem, Darmstadt

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Kaliumhexazyanoferat II	E. Merck, Darmstadt
Kaliumhexazyanoferat III Trihydrat	E. Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Methanol	E. Merck, Darmstadt
NaCl	E. Merck, Darmstadt
NaOH	E. Merck, Darmstadt
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S Lösung	Serva, Heidelberg
Proteasen-Inhibitor Tabletten	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rapid Fixer	Agfa, Köln
Schwefelsäure	E. Merck, Darmstadt
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyl-diamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
TCA (Trichloressigsäure)	E. Merck, Darmstadt
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton	ICN, CA, USA
Tween 20	E. Merck, Darmstadt
x-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid)	Peq-Lab, Erlangen

### 2.1.3.2 Zellkulturformulierungen

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Zellkulturformulierungen.

Produkt	Hersteller
DMEM high Glucose	Gibco BRL, Eggenstein
Hank's Salt Solution	Biochrom, Berlin
HEPES (1M)	Biochrom, Berlin
Instamed Click's / RPMI 1640 1:1	Biochrom, Berlin
Instamed PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
L-Glutamin (200 mM)	Gibco BRL, Eggenstein
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
PBS Dulbecco	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (100µg/ml)	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA Lösung	Gibco BRL, Eggenstein

### 2.1.3.3 Antibiotika

Tab. 6: Übersicht über die eingesetzten Antibiotika.

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

### 2.1.3.4 Kits

**Tab. 7:** Übersicht der verwendeten Kits.

Produkt	Hersteller
$\beta$ -Galaktosidase Staining Kit	Active Motif, Rixensart, B
Nucleobond AX500 / AX500 endo free	Machery-Nagel, Düren
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.1.4 Proteine

### 2.1.4.1 Größenstandards

**Tab.8:** Größenstandards, die in dieser Arbeit zur Verwendung kamen.

Produkt	Hersteller
1 kb Plus DNA Ladder	Gibco BRL, Eggenstein
BenchMark Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.4.2 Enzyme

**Tab. 9:** Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme.

Enzym	Hersteller
BamH I	NEB, Frankfurt
Bgl II	NEB, Frankfurt
EcoR I	NEB, Frankfurt
Sal I	NEB, Frankfurt

Enzym	Hersteller
Hind III	NEB, Frankfurt
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt
Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Pfu Polymerase	Stratagene Amsterdam
Xba I	NEB, Frankfurt
Xho I	NEB, Frankfurt

### 2.1.4.3 Antikörper

Tab. 10: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Tier	Hersteller
anti Cre	Kaninchen	Merck-Novagen, Darmstadt
anti GST-YopE	Kaninchen	AG Authenrieth
anti $\beta$ -Galaktosidase	Maus	Roche Diagnostics, Mannheim
anti Maus IgG <sub>2a+b</sub> PE	Ratte	Becton Dickinson, Heidelberg
anti Kaninchen IgG	Schwein	DakoCytomation, Glostrup, DK

### 2.1.5 Nukleinsäuren

#### 2.1.5.1 Oligonukleotide

Tab. 11: Übersicht der in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide und deren Verwendungszweck.

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
<i>creBg/Ifwd</i>	ACG <b>AGA TCT</b> ATG CCC AAG AAG AAG AGG	<i>cre</i> Klonierung / Nachweis



Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung
<i>creSalI</i> rev	AAA <b>GTC GAC</b> CTA ATC GCC ATC TTC CAG	<i>cre</i> Klonierung / Nachweis <i>yopE52 nls cre</i> Nachweis
Cre ATG fwd	ATG CCC AAG AAG AAG AAG AA	<i>yopE52 nls cre</i> Klonierung / Nachweis
<i>YopE52</i> (53) rev	ACC CTG AGG GCT TTC AGT	<i>yopE52 nls cre</i> Klonierung / Nachweis
<i>yopEEcoRI</i> fwd	GGG <b>GAA TTC</b> ATG AAA ATA TCA TCA TTT ATT TCT AAC	<i>yopE52 nls cre</i> / <i>yopE138 nls cre</i> Klonierung in pCDNA3
lacZ 2002-2504fwd	TCG TCT GAC CGA TGA TCC GC	lacZ Amplifikation, Testung stabile Linie
lacZ 2002-2504fwd	AAT CAG CGC CGT AAG CCG AC	lacZ Amplifikation, Testung stabile Linie
lacZ 1205-1530fwd	GTC GGT TAC GGC CAG GAC AGT CGT T	lacZ Amplifikation, Testung stabile Linie
lacZ 1530-1205rev	ACC TGC GTT TCA CCC TGC CA	lacZ Amplifikation, Testung stabile Linie

Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind hervorgehoben.

### 2.1.5.2 Plasmide

Tab. 12: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Bezeichnung	Herkunft	Eigenschaften
pACYC184	NEB, Frankfurt	4,2 kb, geringe Kopienzahl, Klonierungsvektor f. Entero- bakterien, Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>
pNHAN	N. Hitziger	pCJYE138-G3 Austausch von gfp3 gegen <i>virD2</i> -Gen; Cm <sup>R</sup>
pACYC184yopE138cre	diese Arbeit	pACYC184 mit yopE138 nls cre sycE Insert
pACYC184yopE52cre	diese Arbeit	pACYC184 mit yopE52 nls cre sycE Insert

Bezeichnung	Herkunft	Eigenschaften
pBKEFNLScre	GBF, 2001	Eukaryotischer Expressionsvektor mit cre-Insert, Kan <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>
pEFlacZneoflox	GBF Braunschweig	Eukaryotischer Expressionsvektor mit lacZ-Insert, gefloخته Neo <sup>R</sup>
pCDNA3	Invitrogen, Karlsruhe	5,4 kb, Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>
pCDNA3yopE52cre	diese Arbeit	pCDNA3 mit yopE52 nls cre sycE Insert
pCDNA3yopE138cre	diese Arbeit	pCDNA3 mit yopE138 nls cre sycE Insert

### 2.1.6 Zelllinien

Tab. 13: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp / Spezies	Besonderheit	Quelle
CV1-5B	Fibroblasten / Grünaffe	stabil transfiziert mit Cre induzierbarem lacZ	Kellendonk et al, 1996, Wunderlich et al, 2001
HeLa	Epithelzellen / Mensch	aus Cervix-Karzinom	ATCC, USA

### 2.1.7 Bakterienstämme

Tab. 14: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Ausgangsstämme:		
Stamm	Beschreibung	Quelle
E. coli DH5 $\alpha$	endA1 hsdR17(r <sub>k-m<sub>k+</sub></sub> ) supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 $\Delta$ (lacZYA-argFU169) ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15)	Hanahan, 1983
E. coli One Shot TOP10	Chemisch kompetenter Klonierungsstamm	Invitrogen, Karlsruhe

<b>Ausgangsstämme:</b>		
<b>Stamm</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Quelle</b>
Y. enterocolitica WA-C pTTSS, genannt: WA-C(pTTSS)	Y. enterocolitica WA-C mit Plasmid pTTSS, kodierend für das Typ III-Sekretions-system und YadA von Y. enterocolitica, NaI <sup>R</sup> , Spec <sup>R</sup>	Trülsch et al, 2001
Y. enterocolitica pYVeO:8 <sup>+</sup> Wa-314, genannt: WA-P	Y. enterocolitica Wildtypstamm WA-314, Serotyp O:8, NaI <sup>R</sup>	Heesemann et al, 1987
Y. enterocolitica WA-C (pYV-515)	Derivat von WA-314 mit Insertion von Tn5 in IcrD, ist defizient in Typ III-Sekretion; NaI <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ruckdeschel
<b>Spezielle <i>E.coli</i> Stämme:</b>		
<b>Stamm</b>	<b>Plasmid</b>	<b>Quelle</b>
E. coli DH5 $\alpha$	pCDNA3YopE <sub>138</sub> cre	diese Arbeit
E. coli DH5 $\alpha$	pCDNA3YopE <sub>52</sub> cre	diese Arbeit
E. coli DH5 $\alpha$	pACYC184yopE <sub>138</sub> cre	diese Arbeit
E. coli DH5 $\alpha$	pACYC184yopE <sub>52</sub> cre	diese Arbeit
<b>Y. enterocolitica Ausgangsstamm:</b>		
<b>Stamm</b>	<b>Plasmid</b>	<b>Quelle</b>
WA-P	pACYC184yopE138cre	diese Arbeit
<b>Spezielle Y. enterocolitica Stämme:</b>		
<b>Stamm</b>	<b>Plasmid</b>	<b>Quelle</b>
WA-C(pTTSS)	pACYC184yopE138cre	diese Arbeit
WA-C(pTTSS)	pACYC184yopE52cre	diese Arbeit
WA-C(pYV-515)	pACYC184yopE138cre	diese Arbeit

## 2.1.8 Medien

### 2.1.8.1 Bakteriennährmedien

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

**Tab.15:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien.

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Agar	15 g Bacto Agar ad 1l LB-Medium
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl ad 1 l a. dest. pH 7,5
Hirn-Herz-Medium (BHI) (Brain Heart Infusion)	37 g/l BHI-Pulver ad 1 l a. bidest. pH 7,4
SOC-Medium	2 g Trypton, 0,55 g Hefeextrakt, 1 ml NaCl-Lösung (10 mM), 1 ml KCl-Lösung (10 mM), 20 mM Glukose ad 100 ml a. dest. pH 7,0
GYT	10 % (v/v) Glycerin, 0,125 % (w/v) Hefeextrakt, 0,25 % (w/v) Trypton ad 0,25 l a. bidest.

### 2.1.8.2 Zellkulturmedien

**Tab.16:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien.

Nährmedium	Zusammensetzung
Click's Medium (Click's/RPMI 1640 1:1)	11.41 mg Instamed Click's/RPMI 1640 1:1 ad 1 l a. bidest., pH 7,4 NaCO <sub>3</sub>
HBSS 2 % FCS	50 ml Hank's Salt Solution, 1 % (v/v) HEPES, 2 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert 1 h, 56 °C)
PBS (Instamed) (für unsterile Anwendungen)	9,55 g Instamed PBS Dulbecco's ad 1 l

Nährmedium	Zusammensetzung
Vollmedium DEMEM	500 ml DMEM, 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert 1 h, 56 °C), 1 % (v/v) L-Glutamin (200 mM), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100µg/ml)
Vollmedium RPMI	500 ml RPMI 1640, 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert 1 h, 56 °C), 1 % (v/v) L-Glutamin (200 mM), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml)

## 2.1.9 Lösungen und Puffer

### 2.1.9.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

5x TBE-Puffer :	54 g	Tris-Base
	27,5 g	Borsäure
	20 ml	0.5 M EDTA
	pH 8,3	eingestellt mit Essigsäure
	<i>ad</i> 1 l	<i>a. dest.</i>
Extraktionspuffer	1	Protease-Inhibitor Tablette
	0,5 ml	Triton X-100
	<i>ad</i> 50 ml	PBS
PBT:	0,1 % (w/v)	BSA
	0,1 % (v/v)	Tergitol
	<i>ad</i> 250 ml	PBS

### 2.1.9.2 Puffer und Lösungen für die Proteingelektrophorese

10 % APS:	10 % (w/v)	APS in <i>a. bidest.</i>
10 % SDS:	10 % (w/v)	SDS in <i>a. bidest.</i>
AA/BA (30:0,8):	30 % (w/v) 0,8 % (w/v)	Acrylamid, Bisacrylamid
Sammelgelpuffer:	0,5 M	Tris-HCl pH 6.8
Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris-HCl pH 8.6
10 x Laufpuffer (SDS-Page):	500 mM 1,92 M 1 % (w/v)	Tris / HCl pH 7 Glyzin SDS
5x Probenpuffer (Laemmli):	1 ml 0,8 ml 1,6 ml 0,8 g 0,05 % (w/v) <i>ad</i> 8 ml	0.5 M Tris pH 6.8 Glyzerin 10 % SDS Dithiotreitol Bromphenolblau <i>a. bidest.</i>

### 2.1.9.3 Puffer für Immunoblotting (Western Blot)

WB-Transferpuffer:	50 mM 105 mM 1,3 mM 10 % (v/v)	Tris, pH 8.0 Glyzin SDS Methanol
WB-Waschpuffer:	0,9 % 10 mM	NaCl Tris/HCl (pH 7,4)

	0,2 % (v/v)	Tween 20
ECL-Lösung 1:	2,5 mM	Luminol
	400 µM	Paracoumarsäure
	100 mM	Tris/HCl pH 8,5
ECL-Lösung 2:	5,4 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	100 mM	Tris/HCl, pH 8,5
Substratpuffer:	500 ml	50 mM Tris/HCL pH 5,2
	0,122 g	Imidazol
Substrat:	1 Spatelspitze	Diaminobenzidin
	25 ml	Substratpuffer
	12,5 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %
Stopplösung:	14 ml	Schwefelsäure (95 - 97 %)
	<i>ad</i> 500 ml	<i>a. dest.</i>

#### 2.1.9.4 Probenpuffer für die Agarosegelelektrophorese

DNA-Farbmarker:	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,05 % (w/v)	Xylencyanol
	50 % (w/v)	Glyzerin
	0,1 mM	EDTA
	in 1x TBE-Puffer	
Orange-G-Farbmarker:	43,5 ml	Glyzerin
	200 mg	Orange G
	<i>ad</i> 100 ml	<i>a. dest.</i>

### 2.1.9.5 Lösungen für den $\beta$ -Galaktosidase Nachweis

Färbelösung 1	400 mM	Kaliumhexacyanoferrat II in <i>a. dest.</i>
Färbelösung 2	400 mM	Kaliumhexacyanoferrat III in <i>a. dest.</i>
Färbelösung 3	200 mM	Magnesiumchlorid in <i>a. dest.</i>
Komplett-Färbelösung: (für eine Vertiefung)	10 $\mu$ l	Färbelösung 1
	10 $\mu$ l	Färbelösung 2
	10 $\mu$ l	Färbelösung 3
	50 $\mu$ l	X-Gal 20 mg/ml in DMF
	920 $\mu$ l	PBS
Fixing Solution:	0,7 %	Formaldehyd
	0,05 %	Glutardialdehyd
	<i>ad</i> 50 ml	PBS

### 2.1.9.6 Lösungen für FACS

Fixierungspuffer:	33 ml	Aceton
	17 ml	PBS
PBSF:	5 %	FCS (hitzeinaktiviert 1 h, 56 °C)
	<i>ad</i> 10 ml	PBS



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Plasmid-Präparation mit Nucleobond AX-Säulen

Um Plasmid-DNA aufzureinigen wurden die Plasmidpräparationskits der Firmen Macherey-Nagel (für größere Mengen) und Qiagen (für kleinere Mengen) verwendet.

Die Plasmid-DNA wird bei dieser Methode nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (16) mit anschließender Anionenaustausch-Chromatographie isoliert. Es wurde nach den entsprechenden Arbeitsanweisungen des jeweiligen Herstellers gearbeitet.

#### 2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Gele wurde eine 1 % (w/v) Agaroselösung in 0,5 % TBE-Puffer aufgekocht, unter Rühren abgekühlt und in einen Schlitten mit Kamm gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine mit 0,5 % TBE-Puffer befüllte Elektrophoresewanne eingesetzt. Die DNA-Lösungen wurden mit 1/5 Volumen DNA-Farbmarker versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die DNA-Proben wurden mit einer Feldstärke von 2,5 V/cm<sup>2</sup> elektrophoretisch aufgetrennt.

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

Zur Detektion wurden die Gele ca. 10 min in einem Ethidiumbromidbad (10 µg/ml Ethidiumbromid in *a. bidest.*) gefärbt und anschließend ca. 10 - 20 Minuten in *a. dest.* gewaschen. Fotografiert wurde die Fluoreszenz des

in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bei Durchleuchtung mit 254 nm UV-Licht.

Die DNA Agarose-Gelelektrophorese wurde analytisch und präparativ genutzt.

### **2.2.1.3 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen**

Zur Präparation von Agarose-Gelen wurden diese nach der Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht betrachtet. Dies wurde kurz gehalten um DNA-Strang-Brüche zu vermeiden. Die benötigten Banden wurden manuell mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem Qiagen Gel Extraction Kit entsprechend den Angaben des Herstellers daraus isoliert.

### **2.2.1.4 DNA Verdau mit Restriktionsendonukleasen**

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

Die Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgte mit den unter 2.1 aufgeführten Restriktionsenzymen und den geeigneten, vom Hersteller angegebenen Puffern. Maximal 1 µg DNA wurde in einem Volumen von 20 µl mit 2 – 5 U Restriktionsenzym für 1 – 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

### **2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden können mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft werden. Vektor- und Insert-DNA wurden in einem Mengen-Verhältnis von 1:3 (Vektor : Insert) eingesetzt. Die DNA Lösung wurde mit 1 U T4-Ligase und 2 µl Ligase-Puffer vermischt und mit *a. bidest.* auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde dann bei 16 °C über Nacht im Wärmeblock inkubiert. Um eine Religation des Vektors zu verhindern wurde die Vektor-DNA vor der Ligation dephosphoryliert (siehe 2.2.1.6).

### **2.2.1.6 Dephosphorylierung**

Nach der Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen wurden durch eine 15-minütige Inkubation bei 65 °C die Restriktionsenzyme inaktiviert (je nach Herstellerempfehlung auch bei höheren Temperaturen). Der Reaktionsansatz mit der zu dephosphorylierenden DNA wurde mit 1 U alkalischer Phosphatase versetzt. Die Inkubationsbedingungen für diesen Vorgang betragen für 5'-Überhänge 5 Minuten bei 37 °C. Bei 3'-Überhängen und glatten Enden wurde 5 Minuten bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch Zugabe von 3 µl 50 mM EDTA-Lösung und 15-minütiger Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

### **2.2.1.7 Auffüllen von Überhängen durch DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)**

Um nach einer hydrolytischen Spaltung mit Restriktionsenzymen, bei der ein 3'-Überhang entstand, ein glattes Ende herzustellen, wurde das 5'-Ende mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I aufgefüllt. Zunächst wurden hierfür die Restriktionsendonukleasen denaturiert. Zu diesem Ansatz gab man 1 µl eines dNTP-Mixes (Stammlösungs-Konzentration: 0,5 mM pro dNTP), sowie 1 U des Klenow-Fragmentes hinzu. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.1.8).

### **2.2.1.8 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Um Proteine aus einer DNA-Lösung zu entfernen führte man eine Phenol/Chloroform-Extraktion durch. Dabei wurde die DNA-Lösung mit TE-Puffer auf 400 µl aufgefüllt, und dann mit 400 µl Phenol/Chloroform-Lösung (50:50) versetzt. Die hydrophobe Phase wurde durch PLG abgetrennt. Die wässrige Phase wurde nochmals mit 400 µl Chloroform versetzt, das wieder durch PLG abgetrennt wurde. Den Überstand entnahm man und führte eine Natriumacetat-Fällung (2.2.1.10) durch.

### 2.2.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion (83) dient der exponentiellen Amplifikation eines definierten DNA-Fragmentes (Matrizen-DNA), welches zwischen zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primer) liegt.

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

Für Klonierungen von bestimmten DNA-Abschnitten wurde aufgereinigte DNA verwendet. Zur Überprüfung von Bakterienstämmen und erfolgten Klonierungen wurde Gesamtzell-Lysat von Bakterien amplifiziert. Gesamtzell-Lysate wurden hergestellt indem Einzelkolonien von einer LB-Agar-Platte in 40 µl *a. bidest.* in ein Eppendorf-Gefäß überführt, für 10 min bei 100 °C inkubiert, die Suspension für 5 min bei 20 000 g abzentrifugiert und der Überstand zur Weiterverwendung abgenommen wurde.

#### Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatz für 50 µl:

5 µl 10x Taq-Puffer

1 µl dNTPs (Stammlösungs-Konzentration: 10 mM pro dNTP)

5 µl Primer fwd (Stammlösungs-Konzentration: 10 pmol/µl)

5 µl Primer rev (Stammlösungs-Konzentration: 10 pmol/µl)

0,3 µl Taq-Polymerase

3 µl der DNA-Lösung

*ad 50 µl a. bidest.*

Das Standard PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

1 min Denaturierung bei 94 °C gefolgt von 33 Zyklen mit folgender Prozedur:  
45 sec bei 94 °C, 45 sec bei Annealing-Temperatur der eingesetzten Primer,

Elongation bei 72 °C (Elongationszeit der Taq-Polymerase 1000 bp/min), erneuter Start der Prozedur. Abschließend folgte ein Extensionsschritt von 10 min bei 72 °C.

Jeweils 10 µl eines PCR-Ansatzes wurden anschließend über Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.2) analysiert.

Wurde das PCR-Produkt anschließend für Klonierungen verwendet, wurde der Standardansatz folgendermaßen modifiziert: anstatt der Taq-Polymerase wurden 2,5 U *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt. Die Elongationszeit in diesem Fall beträgt nur ca. 500 bp/min. Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte mit einem QIAquick-Kit entsprechend den Angaben des Herstellers.

#### **2.2.1.10 Natriumacetat-Fällung von DNA**

1 Volumen der Probe wurden mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und 7/3 Volumen von eiskaltem 100 %-igem Ethanol versetzt, geschüttelt und 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei 4 °C und 20 000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde nun mit 70 %-igem eiskaltem Ethanol gewaschen und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zuletzt wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in *a. bidest.* aufgenommen.

#### **2.2.1.11 DNA Konzentrationsbestimmung**

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde spektrometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Für die Absorption sind die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das Verhältnis OD 260 nm/OD 280 nm für reine DNA ist 1,8. Die Reinheit der DNA und die Qualität der Präparation können so bestimmt werden.

### 2.2.1.12 Herstellung und Transformation von Calcium-kompetenten *E. coli* Bakterien

*E. coli* wurden nach dem von Hanahan (56) entwickelten Verfahren transformiert. Hierfür wurden zunächst Calcium-kompetente *E. coli* Bakterien folgendermaßen hergestellt: Eine Einzelkolonie wurde in LB-Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Damit wurde eine Hauptkultur mit dem Verdünnungsfaktor 1:100 in LB-Medium angeimpft, und bei 37 °C geschüttelt bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 erreicht war. Die Bakterien wurden danach bei 2500 g in Falcon-Tubes für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert und in eiskaltem TFB1-Puffer (100 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 mM Kaliumacetat, 15 % Glycerin) aufgenommen. Pro 100 ml Kulturflüssigkeit wurden 30 ml TFB1-Puffer verwendet. Die Bakterien wurden erneut für 5 min bei 4 °C inkubiert und unter denselben Bedingungen wie oben angegeben abzentrifugiert. Die Bakterien wurden nun in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer (10 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM KCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>) pro 1 ml Kulturflüssigkeit resuspendiert. Die Suspension wurde dann zu 100 µl in Eppendorf-Gefäße aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden die Calcium-kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit der Plasmid-DNA (ca. 5 µl Ligationsansatz oder 0,5 µl gereinigtes Plasmid) gemischt und für 45 min auf Eis inkubiert. Für die Aufnahme der DNA folgte dann ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec im Wärmeblock. Anschließend wurde der Ansatz erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien-Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium gegeben und bei 37 °C für 1 h geschüttelt. Zuletzt wurden die Bakterien-Suspensionen auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Von den erhaltenen Kulturen wurde eine Stammpatte angelegt, die bei 4 °C aufbewahrt wurde.

### 2.2.1.13 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Für die Herstellung von elektrokompetenten Bakterien wurde zunächst eine Übernachtskultur der gewünschten Bakterien in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt. Von dieser Übernachtskultur wurde 1 ml in 100 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C für *E. coli*-Stämme, bzw. 27 °C für *Y. enterocolitica*-Stämme so lange geschüttelt, bis eine OD<sub>500</sub> von 0,4 bis 0,6 erreicht wurde. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 2500 g und 4 °C für 20 min geerntet und danach bei 4 °C gehalten. Zum Waschen wurden die Bakterien in 2 x 50 ml *a. bidest.* aufgenommen und anschließend in sterilen Einmal-Zentrifugen-Röhrchen für 10 min bei 4 °C mit 2500 g abzentrifugiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Pellet in einer 10 %-igen Glycerin-Lösung (mit *a. bidest.*) aufgenommen und unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 2 ml der 10 %-igen Glycerin-Lösung aufgenommen, in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die eingefrorenen Aliquots der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit DNA vermischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gefüllt. Die Elektroporation wurde bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium bei 37 °C für *E. coli*-Stämme, bzw. 27 °C für *Y. enterocolitica*-Stämme inkubiert und dann auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen.

### 2.2.1.14 Isolierung der Gesamt DNA aus Bakterien

Es wurden Übernachtskulturen der zu untersuchenden *Yersinien* angelegt. Diese wurden 1:50 in 10 ml BHI-Medium verdünnt, welches mit den entsprechenden Antibiotika versetzt worden war. Die Kulturen wurden dann 1,5 Stunden lang bei 27 °C geschüttelt, danach die Temperatur auf 37 °C erhöht und für weitere zwei Stunden geschüttelt. Danach wurden die Bakterien 10 Minuten bei 2850 g

abzentrifugiert, das Pellet in 400 µl TE-Puffer (50 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nach diesem Schritt erfolgte die Zugabe von 200 µl Sarkosyl-Puffer (50 mM Tris, 20 mM EDTA, 5 % Sarkosyl, pH 8,0) sowie 200 µl Proteinase K-Lösung (Proteinase K 1 mg/ml in 50 mM Tris, 20 mM EDTA). Es folgte eine Inkubation von 1 Stunde bei 56 °C. Anschließend wurden die Ansätze 15 sec gevortext. Zuletzt wurde zur Entfernung von Proteinen aus der so gewonnen DNA-Lösung eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.1.8) durchgeführt.

## **2.2.2 Proteinchemische und allgemeine biochemische Methoden**

### **2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

Mittels der Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamid-Gel Electrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht, unabhängig von ihrer Ladung und Struktur, getrennt (74). SDS als anionisches, amphipathisches Detergenz im Auftragspuffer bindet im Verhältnis 1:1,4 pro Aminosäure an die kationischen Reste der Proteine und verleiht ihm damit eine negative Überschussladung, die sich proportional zur Größe des Proteins verhält und die proteineigene Ladung vernachlässigbar macht. Durch die Denaturierung der Proteine mittels SDS und Hitze, sowie dem Einsetzen des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) werden die Proteine in lineare Polypeptidketten umgewandelt. Das DTT trennt dabei die Disulfidbrücken der Proteine. Der Einfluss der nativen Oberflächenstruktur der Proteine auf ihr Wanderungsverhalten wird so möglichst gering gehalten.

Die Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten während der Elektrophorese ausschließlich von ihrer Größe abhängig ist. Der Trennbereich wird über die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentrationen im Gel kontrolliert.

Für die Elektrophorese wurden kleine Gele (Trennstrecke ca. 5,5 cm) in einer Bio-Rad Apparatur verwendet. Es wurden 10.5 %-ige Trenngele eingesetzt, um eine Auftrennung im Bereich von 10 - 100 kDa zu erreichen. Die Gießapparatur



wurde nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Das Trenngel wurde in der Vertikalkammer bis zu 2/3 des Endvolumens gefüllt und mit n-Butanol überschichtet um eine glatte Trennfläche zu bekommen. Nach einstündiger Polymerisation des Trenngels und Entfernung des n-Butanols wurde das Sammelgel in das verbleibende Volumen der Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach erneuter einstündiger Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit einem Viertel ihres Volumens an 5x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min gekocht und dann vorsichtig in die Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x SDS-Elektrophorese-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel durchgeführt.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel entweder gefärbt oder für ein Immuno-Blotting weiterverwendet. Zum Färben wurde das Gel unter leichtem Schütteln für 10 – 30 min in Coomassie-Blue-Färbelösung inkubiert und anschließend durch Inkubation für 1 – 2 h in der Entfärbelösung entfärbt, die 2 bis 3 mal gewechselt wurde.

#### Zusammensetzung der Polyacrylamidgele:

	Trenngel	Sammelgel
AA/BA (30:0,8)	3,5 ml	1,0 ml
Tris/HCl (1,5 M)	1,9 ml	0 ml
Tris/HCl (0,5 M)	0 ml	1,2 ml
<i>a. dest.</i>	2,4 ml	3,6 ml
SDS-Lösung (10 %)	80 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl
APS (10 %)	100 µl	50 µl
10 % APS:	10 % (w/v) APS in <i>a. bidest.</i>	
10 % SDS:	10 % (w/v) SDS in <i>a. bidest.</i>	
AA/BA (30:0,8):	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,6	

10x Elektrophoresepuffer:	30 g Tris-HCl, 144,4 g Glycin, 100 ml 10 % SDS, <i>ad 1 l a. bidest.</i>
5x SDS-Probenpuffer:	314 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 5 % 2-Mercaptoethanol, 0,0025 % Bromphenolblau
Coomassie-Blue-Lösung:	1250 mg Coomassie R-250, 500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, <i>ad 1 l a. dest.</i>
Entfärbelösung:	25 % Ethanol, 8 % Essigsäure

### 2.2.2.2 Immunoblot (Western Blot)

Über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine können aufgrund der negativen Ladung des gebundenen SDS elektrophoretisch weiter auf eine Nitrocellulose oder PVDF-Membran übertragen werden (Western Blot). Hierbei wird das SDS im Laufe des Transfers abgetrennt. Anschließend können gebloottete Proteine durch eine spezifische, sehr sensitive Immunreaktion nachgewiesen werden (Immunoblot, (122)).

Der Transfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennter Proteine wurde in einer „semi-dry“-Transfer-Apparatur (Bio-Rad) durchgeführt. Der Aufbau erfolgte nach Anleitung von Bio-Rad. Der Proteintransfer dauerte bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA ungefähr 1 Stunde. Der Erfolg wurde durch die reversible Färbung der Membran mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S Rouge (99) überprüft und die Markerproteine des angefärbten Standards (Bio-Rad) markiert. Die Membran wurde anschließend zur Blockierung von freien Bindungsstellen entweder 3 Stunden in Blockierungspuffer (PBS + 2 % FCS) auf einem Gelschüttler bei Raumtemperatur inkubiert, oder über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer (TBST mit 5 % Magermilchpulver) geschwenkt. Anschließend wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Inkubation mit primärem Antikörper, verdünnt in Waschpuffer (PBS + 2 % FCS) für 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Rotationsschüttler

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

Die Detektion mit dem ECL-System (*enhanced chemiluminescence*) erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers (Amersham Pharmacia). Durch das Auflegen eines Röntgenfilmes (30 sec bis 1 h) wurde die von der Peroxidase katalysierte Lichtreaktion nachgewiesen.

### **2.2.2.3 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA-Proteinbestimmungstest nach den Angaben des Herstellers.

### **2.2.2.4 Gewinnung von Kernproteinen**

Zur Überprüfung der Translokation der Effektorproteinen von *Y. enterocolitica* in den Zellkern wurden Kernproteine aus CV1-5B Fibroblasten nach Infektion mit diversen *Y. enterocolitica* Stämmen gewonnen, und anschließend mittels Immunoblotting analysiert.

Als Vorbereitung hierfür wurden zwei Tage vor der Infektion  $1 \times 10^7$  CV1-5B Fibroblasten in Zellkulturflaschen ausgesät. Dabei wurden Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 80 cm<sup>2</sup> verwendet. Am Vortag der Infektion wurden Übernachtskulturen der zu untersuchenden Bakterienstämme angeimpft. Am nächsten Tag wurden diese 1:25 in frischem Medium verdünnt, für 35 Minuten bei 27 °C und danach eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Vor Zugabe der Bakterien wurden die CV1-5B Fibroblasten zweimal mit warmem PBS gewaschen. Die Infektion wurde in Clicks-Medium (8 ml), welches Glutamin enthielt, mit einer MOI von 50 für 3,5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

Anschließend wurden die CV1-5B Fibroblasten zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann mit sechs Milliliter kaltem NE1-Puffer (10 mM HEPES; 15 mM KCl; 0,1mM EDTA (pH 8,0)) versetzt. Durch den leicht hypotonen Puffer quellen die Zellen auf. Dieser Vorgang lief für zehn Minuten auf Eis ab. Danach wurde der Puffer NE1 gegen vier Milliliter NE2-Puffer (NE1; 0,2 % (v/v) IGEPAL630; Proteaseinhibitoren) ausgewechselt. Das Detergenz in diesem Puffer schließt die vorgequollenen Zellen auf. Dieser Aufschluss erfolgte auf Eis für fünf Minuten. Die Reste der Zellen wurden abgekratzt und zehn Minuten bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der zytosolische Proteine beinhaltet, wurde verworfen. Das Pellet, in dem sich neben den Zellkernen noch Zellbruchstücke sowie Bakterien befinden, wurde in einem Milliliter des Puffers NE3 (25mM HEPES; 50 mM KCl ; 0,1 mM EDTA (pH 8,0); 10 % Glycerol; Proteaseinhibitoren) aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 4 °C und 2000 g. Im Anschluss wurde das Pellet in 200 µl NE3-Puffer resuspendiert und mit 16,7 µl einer 5 M NaCl-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit. Der Überstand, der die Kernproteine enthält, wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.2.5 TCA-Fällung sekretierter Proteine**

Die durch Induktion von *Yersinien*- Kulturen sekretierten Proteine (2.2.3.3) wurden mittels Trichloressigsäure gefällt. Hierbei wurde die Proteinlösung mit einer 100 %-igen TCA-Lösung so versetzt, dass eine 10 %-ige TCA-Lösung entstand. Nach Inkubation von 1 h auf Eis wurde die Lösung bei 15 000 g und 4 °C 25 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Präzipitat mit eiskaltem Aceton resuspendiert und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Suspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert und dann für 10 min bei 12 000 g und 4 °C abzentrifugiert. Die so gefällten Proteine wurden noch zweimal wie oben beschrieben mit Aceton gewaschen. Nach dem letzten

Waschschritt wurden die Proteine in ca. 30 µl *a. dest.* aufgenommen und mit 1 M NaOH neutralisiert.

## **2.2.3 Mikrobiologische Methoden**

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

### **2.2.3.1 Kultivierung von Bakterien**

Die Anzucht der *E. coli*-Kulturen erfolgte bei 37 °C in LB-Medium entweder durch Animpfen aus einer Glyzerinkultur oder aus einer Einzelkolonie von der Agarplatte.

*Y. enterocolitica* wurde standardmäßig bei 27 °C in LB kultiviert. War die Induktion der auf dem Virulenzplasmid kodierten Gene erwünscht wurde bei 37 °C in BHI kultiviert. Die Kultivierung erfolgte auf Festmedien in einem Bakterienbrutschrank oder in Flüssigmedium in einem Schüttler mit 200 rpm.

Die Ernte von Bakterien aus Flüssigmedium erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation der Kulturflüssigkeiten bei 5000 g und 4 °C in einem SLA3000-Rotor oder bei 2850 g für 15 Minuten in einer Zellkultur-Zentrifuge.

### **2.2.3.2 Herstellung von Gefrierkulturen von Bakterien**

Die verwendeten Bakterienstämme wurden langfristig als Einfrierkulturen gelagert. Einfrierkulturen wurden hergestellt, indem über Nacht angezogene Bakterien in Einfriermedium (LB-Medium mit 20 % Glycerin) aufgenommen und in Eppendorf-Gefäßen bei -80 °C eingefroren und gelagert wurden.

### 2.2.3.3 Induktion der Proteinsekretion von *Yersinia*- Stämmen

Die Proteinsekretion der *Yersinia*-Stämme wird durch Inkubation bei 37 °C unter Kalziumentzug stimuliert (63). Zur Untersuchung der sezernierten Proteine wurden diese im weiteren Schritt mittels TCA aus dem Kulturüberstand gefällt. Eine Übernachtskultur des entsprechenden *Yersinia*-Stammes wurde 1:25 in BHI-Medium, das bei Bedarf mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurde, verdünnt und für zwei Stunden bei 27 °C geschüttelt. Danach erfolgte die Induktion. Hierfür wurden MgCl<sub>2</sub>, EGTA und Glukose in Endkonzentrationen von 10 mM, 5 mM bzw. 0,2 % zugegeben. Die Temperatur wurde auf 37 °C erhöht und die Bakterien für 3 h weiter inkubiert. Die OD<sub>600</sub> der Kulturen wurde bestimmt. Anschließend wurden die Bakterien 10 Minuten lang bei 3500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde zur Untersuchung der intrazellulären Proteine eingefroren, die sezernierten Proteine aus dem Überstand mit TCA gefällt (s. 2.2.2.5).

Zur weiteren Analyse wurde die Verfahren SDS-PAGE (2.2.2.1) und Immunoblotting (2.2.2.2) angewandt. Die eingefrorenen Bakterienpellets wurden aufgetaut, in 2 ml PBS aufgenommen und ein Aliquot 1:1 mit SDS-Probenpuffer verdünnt. Die präzipitierten Proteine aus dem Überstand wurden ebenfalls mit SDS-Probenpuffer versetzt. Alle Proben wurden anhand der OD<sub>600</sub> normalisiert auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

## 2.2.4 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilarbeitsbank durchgeführt. Alle Zellen wurden in einem Zellkultur-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Materialien und Lösungen wurden bereits steril vom Hersteller bezogen oder steril filtriert.

### **2.2.4.1 Passagieren von eukaryontischen Zell-Linien**

Die Versuche für diese Arbeit wurden mit HeLa Zellen und CV1-5B Fibroblasten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 80 cm<sup>2</sup> (175 cm<sup>2</sup>) Gewebekultur-Flaschen in Vollmedium. Für die Fibroblasten wurde das Vollmedium DEMEM, für die HeLa Zellen das Vollmedium RPMI (2.1.8.2) verwendet. Dreimal wöchentlich wurden die zu 80 bis 90 % konfluenten Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:6 gesplittet. Hierfür wurden die Zellen mit 10 ml (20 ml) PBS gewaschen, durch Inkubation mit 2,5 ml (5 ml) Trypsin / EDTA für 10 min abgelöst. Um das Trypsin zu neutralisieren wurden die Zellen danach in 7,5 ml (15 ml) Kulturmedium (bei 37 °C) aufgenommen. Die Zellen wurden danach sedimentiert (400 g, 5 min), erneut in Zellkulturmedium aufgenommen und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Dabei wurde in jede Flasche ein Viertel oder ein Sechstel der ursprünglichen Zellmenge ausgesät.

### **2.2.4.2 Zellzahlbestimmung**

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der selektiv nekrotische Zellen färbt indem er in die nicht mehr intakte Membran der Zellen eindringt und diese blau färbt. Die Zellsuspension wurde in eine Neubauer Zählkammer (0,0025 mm x 0,0025 mm x 0,1 mm) gegeben und ausgezählt. Das Produkt aus der gemittelten Anzahl der nicht gefärbten Zellen je Großquadrat, Kammerfaktor ( $1 \times 10^4$  Zellen/ml) und Verdünnungsfaktor ergab die Konzentration der Zellen in der ursprünglichen Zellsuspension.

### **2.2.4.3 Einfrieren von Zellen**

Die Zellen wurden geerntet, abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO, 90 % FCS, sterilfiltriert) pro ca.  $10^7$  Zellen aufgenommen und erst für 24 h bei -20 °C, dann für weitere 24 h bei -80 °C gelagert und schließlich zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 2.2.4.4 In *vitro* Infektion von eukaryonten Zellen

Am Vortag der Infektion wurden Übernachtskulturen der zu untersuchenden Bakterienstämme angeimpft. Am nächsten Tag wurden diese 1:25 in frischem BHI-Medium verdünnt, für 35 Minuten bei 27 °C und danach eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach spektrometrischer Keimzahlbestimmung wurde das Suspensionsvolumen der benötigten Bakterienzahl berechnet und dieses in Eppendorf-Gefäßen 5 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 100 µl Clicks-Medium resuspendiert. Die Infektionen wurden mit einer MOI von 50 durchgeführt.

Je nach Versuch wurden entweder HeLa Zellen oder CV1-5B Fibroblasten 2 Tage zuvor in 80 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit dem entsprechendem Vollmedium inokuliert. Für den  $\beta$ -Galaktosidase Nachweis wurden 12-Vertiefungen-Platten verwendet. Hierfür wurden pro Vertiefung  $1 \times 10^5$  Zellen einen Tag vor der Infektion ausgesät und diesen 1 ml des entsprechenden Vollmediums zugegeben.

Vor der Infektion wurden die Zellen zweimal mit PBS (bei 37 °C) vorsichtig gewaschen und Clicks-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden auf die Zellkulturen pipettiert, durch leichtes Schütteln verteilt und anschließend bei 400 x g für 5 min bei Raumtemperatur auf die Zellen zentrifugiert. Danach folgte eine Inkubation für 3,5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Infektion wurde beendet, indem das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS (37 °C) gewaschen wurden.

Sollten die Zellen für den  $\beta$ -Galaktosidase Nachweis verwendet werden, wurde nun Vollmedium, welches Gentamycin (Endkonzentration: 100 µg / ml) enthielt, zugegeben. Das Gentamycin diente zur Abtötung der verbleibenden Bakterien. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und am folgenden Tag analysiert.



### 2.2.4.5 Transfektion von eukaryontische Zelllinien mit ExGen 500

Für die Transfektion mittels ExGen 500 wurden in dieser Arbeit die eukaryontischen Zelllinien HeLa und CV1-5B Fibroblasten verwendet.

ExGen 500 ist ein nicht-virales, nicht-liposomales Transfektionsreagenz, welches aus dem kationischen Polymer Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 22 kDa besteht. Das Polyethylenimin bildet mit der DNA Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die DNA/ExGen 500-Komplexe werden mittels Endocytose in die Zelle aufgenommen. Eine Transfektion mittels ExGen 500 erreicht in der Regel eine hohe Effizienz. Dies beruht zum einen auf der hohen Kapazität für kondensierte DNA und der Interaktion mit anionischen Proteoglykanen auf der Zellmembran, und zum anderen auf dem Schutz der DNA vor Degradation.

Für die Transfektion wurden am Vortag die Zellen je nach Ansatz in 80 cm<sup>2</sup> bzw. 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen, oder 12-Vertiefungen Platten ausgesät. Die Zellen wurden am Folgetag mit PBS (bei 37 °C) gewaschen, mit OptiMEM versetzt und zur Regeneration für 1 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Ansatz	HeLa Zellen	Fibroblasten	PBS	OptiMEM
Zellkulturflasche 80 cm <sup>2</sup> 175 cm <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>7</sup> 2 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>7</sup> 2 x 10 <sup>7</sup>	10 ml	8 ml
12-Vertiefungen Platte	1 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	1 ml	0,5 ml

Die Transfektion mittels ExGen 500 erfolgte in einer gegenüber den Herstellerangaben abgewandelten Form.

Hierbei wurden zunächst je nach Ansatz die Transfektionslösungen vorbereitet.

Ansatz	Lösung A	Lösung B
1x10 <sup>5</sup>	4 µl ExGen, 150 mM NaCl ad 50 µl	1,5 µg DNA, 150 mM NaCl <i>ad</i> 50 µl

Ansatz	Lösung A	Lösung B
$2 \times 10^7$	80 $\mu$ l ExGen + 920 $\mu$ l 150 mM NaCl	10 $\mu$ g DNA, 150 mM NaCl <i>ad</i> 1000 $\mu$ l.

Lösung A wurde vorsichtig zu Lösung B pipettiert und danach sofort für 10 sec gemischt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Danach wurde die DNA-ExGen-Lösung tropfenweise zu den 50-70 % konfluenten Zellen gegeben und diese anschließend bei 400 g zentrifugiert. Die Zellen wurden für 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium vorsichtig abgesaugt und durch das den Zellen entsprechende Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden über Nacht weiter im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde entweder die Proteinexpression mittels Nachweis von  $\beta$ -Galaktosidase (2.2.4.6) analysiert, oder die Zellen zur Gewinnung (2.2.2.4) und Untersuchung der Kernproteine mittels Immunoblotting (2.2.2.2) weiter verwendet.

#### 2.2.4.6 Darstellung der Proteinexpression durch Nachweis von $\beta$ -Galaktosidase

Eukaryonte Zellen, die nach Infektion mit *Yersinia*-Bakterien oder nach Transfektion rekombinante Proteine exprimieren, wurden mittels des Nachweises von  $\beta$ -Galaktosidase optisch dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür das  $\beta$ -Galaktosidase Staining Kit von Active Motif nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei diesem Verfahren wird ausgenutzt, dass das *lacZ* Genprodukt  $\beta$ -Galaktosidase den Farbstoff x-Gal hydrolysiert und das Hydrolyseprodukt mit Kaliumhexacyanoferrat einen blauen Komplex bildet.

Am Tag zuvor waren HeLa-Zellen bzw. Fibroblasten mit *Yersinien*-Bakterien infiziert, bzw. tranfiziert worden. Am Folgetag wurde das Medium der Zellen aus jeder Vertiefung vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1 ml PBS (37 °C) gewaschen. Dem Waschschrift folgte das Fixieren der Zellen. Hierfür wurde pro Vertiefung 1 ml der zum Kit gehörenden Fixing-Solution gegeben.

Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Fixing-Solution abgesaugt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Der Waschschrift wurde dreimal durchgeführt. Danach wurde pro Vertiefung 1 ml der Färbelösung zugegeben und die Zellen damit für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgesaugt und die Zellen mit 1 ml 70 % Glycerin in PBS eingedeckt. Die gefärbten Zellen konnten so gleich, oder zu einem späteren Zeitpunkt, fotografiert werden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

#### **2.2.4.7 Quantifizierung $\beta$ -Galaktosidase positiver Zellen durch Auszählen**

Die Quantifizierung der Infektions- oder Transfektionsversuche erfolgte entweder durch FACS-Analyse oder mittels Auszählen nachdem die Zellen mit dem  $\beta$ -Galaktosidase Nachweis gefärbt wurden.

Die Methode des Auszählens wurde durch Martin Köberle etabliert (132). Es wurden pro Experiment 5 - 6 Gesichtsfelder des gefärbten Zellrasens fotografiert und die Fotos mit einem Gitter aus 5 x 6 Quadraten überlegt.

Der prozentuale Anteil positiver Zellen wurde i.d.R. aus dem Durchschnitt der Gesamtzellzahl pro Quadrat aus 6 Quadraten und dem Durchschnitt der Zahl blauer Zellen pro Quadrat aus allen 30 Quadraten gebildet.

War die Zellverteilung innerhalb des fotografierten Bereichs inhomogen, wurde auch die Gesamtzellzahl aus allen Quadraten des Gitters bestimmt.

War die Zahl der positiven Zellen sehr gering (< 1 %) wurde die Gesamtzellzahl nur aus drei Quadraten je Gesichtsfeld bestimmt (132).

#### **2.2.5 Durchflußzytometrische –Analyse (FACS)**

Die FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären

Proteinen. Grundlage ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Zellen einer gefärbten Einzelzellsuspension werden durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Das dabei erzeugte Streulicht  $90^\circ$  zum Laser (SSC) und das Fluoreszenzlicht (FSC) werden separat detektiert. Das Fluoreszenzlicht (FSC) ist ein Maß für die Zellgröße. Es lassen sich gleichzeitig verschiedene Fluoreszenzen unterschiedlicher Wellenlänge verursacht durch die angewendeten Fluoreszenzfarbstoffe oder durch exogene Färbungen (Propidiumiodid, Fluoreszenz gekoppelte Antikörper) messen.

### **2.2.5.1 Intrazelluläre $\beta$ -Galaktosidase Färbung**

24 Stunden nach Transfektion oder Infektion der CV1-5B Fibroblasten wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in den Vertiefungen einmal mit  $37^\circ$  warmen PBS gewaschen und anschließend mit  $300 \mu\text{l}$  Trypsin-EDTA abgelöst. Durch Zugabe von  $1000 \mu\text{l}$  Vollmedium wurde das Trypsin inaktiviert. Es folgte dreimaliges Waschen mit jeweils  $1000 \mu\text{l}$  PBS (Zentrifugation  $400 \text{ g}$ ,  $5 \text{ min}$ , RT).

Zum Fixieren wurden die Zellen mit  $2 \text{ ml}$  Aceton / PBS (66:34) über 20 Minuten bei  $4^\circ \text{C}$  inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit  $2 \text{ ml}$   $4^\circ \text{C}$  kaltem PBS (Zentrifugation  $400 \text{ g}$ ,  $5 \text{ min}$ , RT) wurde das Zellpellet in  $30 \mu\text{l}$  des primären anti- $\beta$ -Galaktosidase Antikörpers 1:50 in PBSF aufgenommen und eine 96-Vertiefungen V- Platte überführt und  $45 \text{ min}$  bei  $37^\circ \text{C}$  geschüttelt. Danach wurde zweimal mit  $1 \text{ ml}$  PBS ( $37^\circ \text{C}$ ) gewaschen (Zentrifugation  $400 \text{ g}$ ,  $5 \text{ min}$ , RT). Das Pellet wurde in  $30 \mu\text{l}$  des sekundären Ratte anti-Maus IgG2a+b PE Antikörpers 1 : 3 in PBSF  $30 \text{ min}$  bei  $37^\circ \text{C}$  geschüttelt. Nach 2 Waschschritten mit  $1000 \mu\text{l}$  PBS (Zentrifugation  $400 \text{ g}$ ,  $5 \text{ min}$ , RT) wurde das Zellpellet in  $300 \mu\text{l}$  kaltem PBS aufgenommen und bis zur FACS Analyse auf Eis gelagert (nach Vanderplassen et al, 1994, abgewandelt).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierungen

#### 3.1.1 Transiente Expression und Rekombination der Cre Rekombinase

Um Yop Translokation *in vitro* nachweisen zu können, sollte ein Genexpressionsvektor, der ein Fusionsprotein bestehend aus einem YopE-Fragment und Cre-Rekombinase exprimiert, generiert werden. Dieser Genexpressionsvektor sollte dann in *Yersinien* transformiert werden, um zu überprüfen, ob mit Hilfe eines solchen Systems Yop Translokation in Zellkultur nachweisbar wäre. Als ein Grundbaustein zum Aufbau eines solchen Systems stand zunächst der Expressionsvektor pBKEFNLScre zur Verfügung.

Der Expressionsvektor pBKEFNLScre enthält den offenen Leserahmen der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 sowie ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Nach Transfektion von Zellen wird Cre-Rekombinase exprimiert. Das NLS bewirkt durch Interaktion mit Kernporenproteinen eine Verbesserung des Kernimportes der Cre-Rekombinase. Der Expressionsvektor pEFlacZneoflox trägt das aus *E.coli* stammende  $\beta$ -Galaktosidase Gen (*lacZ*). Ein Neomycin-Gen (*neo*), welches durch zwei *loxP* Elemente flankiert wird, liegt zwischen Promotor und dem offenen Leserahmen (ORF) des *lacZ*-Gens und verhindert somit die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase. Bei gleichzeitiger Expression von pBKEFNLScre und pEFlacZneoflox kommt es zur intramolekularen Rekombination. Die Cre-Rekombinase deletiert das gefloxtete Neomycin-Gen, so dass  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert wird (siehe Abb. 4, Einleitung).

Um die Funktionalität der beiden Expressionsvektoren zu überprüfen, wurden HeLa Zellen mit pBKEFNLScre und pEFlacZneoflox gleichzeitig transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Transfektionen mit pBKEFNLScre sowie pEFlacZneoflox einzeln durchgeführt. Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidase

Expression durch Färbung mittels x-Gal (Bromo-chloro-indolyl-galactopyranosid) detektiert. Wie in Abbildung 6 dargestellt kommt es nur nach gleichzeitiger Transfektion von pBKEFNLScre und pEFlacZneoflox zur Blaufärbung einiger Zellen, jedoch nicht nach Transfektion mit einem der beiden Expressionsvektoren allein. Hiermit wurde gezeigt, dass die Vektoren pBKEFNLScre und pEFlacZneoflox funktionell sind und die kodierende Cre-Rekombinase zur Konstruktion eines YopE-Cre Fusionsproteins prinzipiell zur Etablierung eines Reportersystems geeignet wäre.

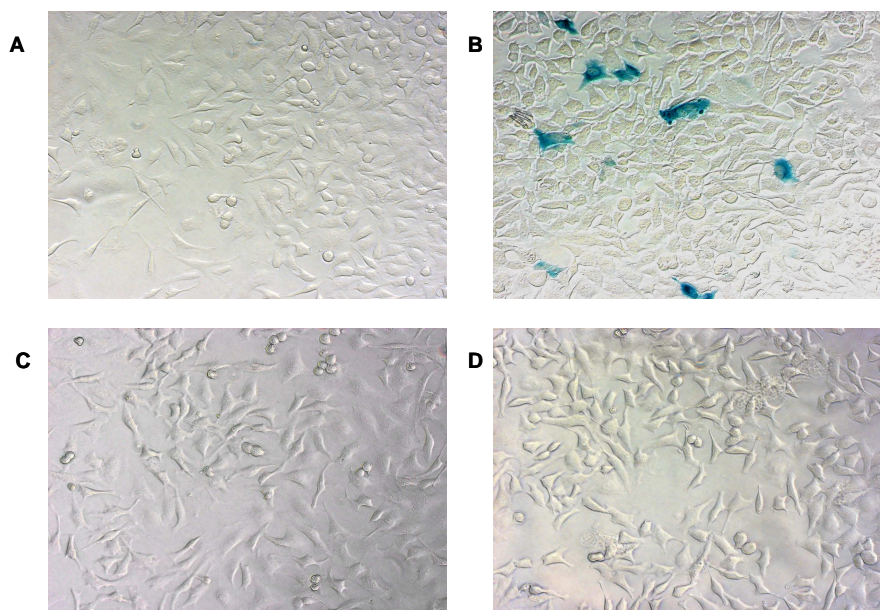


Abb. 6: Nachweis der Funktionalität des Vektors pBKEFNLScre. Hela Zellen wurden (A) nicht transfiziert, (B) transfiziert mit pEFlacZneoflox und pBKEFNLScre, (C) transfiziert mit pBKEFNLScre, oder (D) transfiziert mit pEFlacZneoflox. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit x-Gal gefärbt. In den Zellen, die eine Blaufärbung aufweisen fand durch Cre-Rekombinaseaktivität eine Rekombination im Vektor pEFlacZneoflox statt.

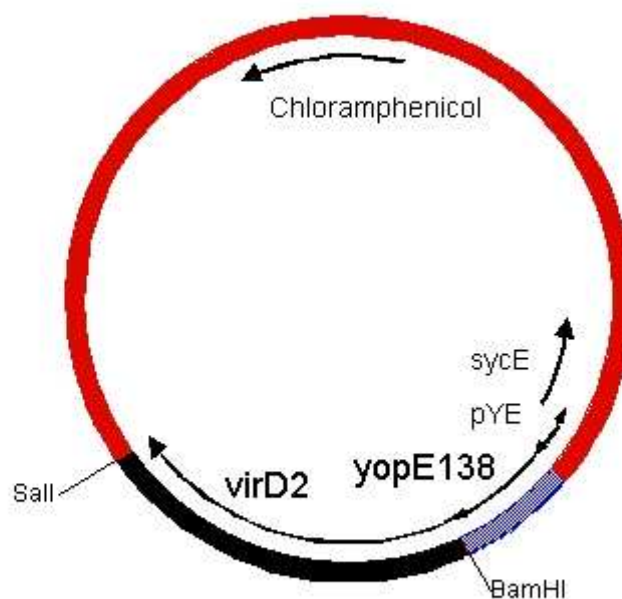
### 3.1.2 Herstellung der Fusionsproteine YopE<sub>138</sub>-Cre und YopE<sub>52</sub>-Cre

Frühere Untersuchungen zeigten, daß die Translokationseffizienz einen limitierenden Faktor bei der Detektion von Reporterproteinen darstellt. Jacobi et al (68) verwendeten als Reporterprotein GFP, welches an die ersten 138 Aminosäuren von YopE fusioniert war. Hierbei zeigte sich, dass die Detektion

des Reporterproteins in der Zielzelle aufgrund der geringen translozierten Menge problematisch war. Um die Sensitivität zu erhöhen wurde YopE nicht an das Reporterprotein selbst, sondern an die Cre-Rekombinase fusioniert. Diese aktiviert nach Translokation in die Zielzelle das Reporterogen.

Zur Herstellung eines Genfragmentes, welches für die Fusionsproteine YopE<sub>138</sub>-Cre oder YopE<sub>52</sub>-Cre kodiert, wurde als Ausgangsplasmid der Vektor pNHAN5 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Derivat des Plasmides pCJYE138-G3, das von N. Hitziger modifiziert wurde. Der Vektor pNHAN5 enthält das YopE-Chaperon *sycE*, den Promotor und den offenen Leseraster, der für die ersten 138 Aminosäuren von YopE kodiert.

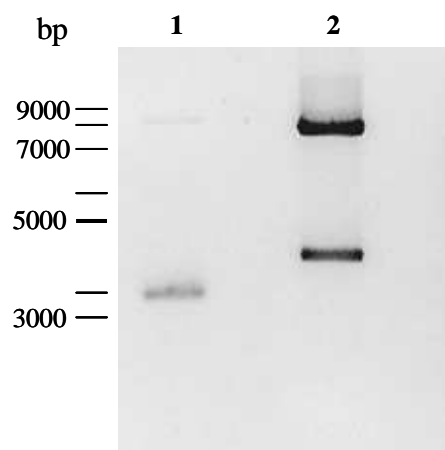
Unter Beibehaltung des Leserasters schließt daran das *virD<sub>2</sub>*-Gen an, welches von den Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sal*I flankiert wird. Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung des Plasmides pNHAN5.



**Abb.7:** Karte des Plasmids pNHAN5. Neben einer Chloramphenicolresistenz trägt das Plasmid das *sycE*-Gen mit Promotor, den Promotor des *yopE*-Gens (pYE), den ORF für die ersten 138 Aminosäuren des YopE-Proteins von *Y. enterocolitica*. Über die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sal*I wurde das NLScre-Gen in dieses Plasmid kloniert, so dass ein Fusionsprotein aus YopE und NLScre exprimiert wird.

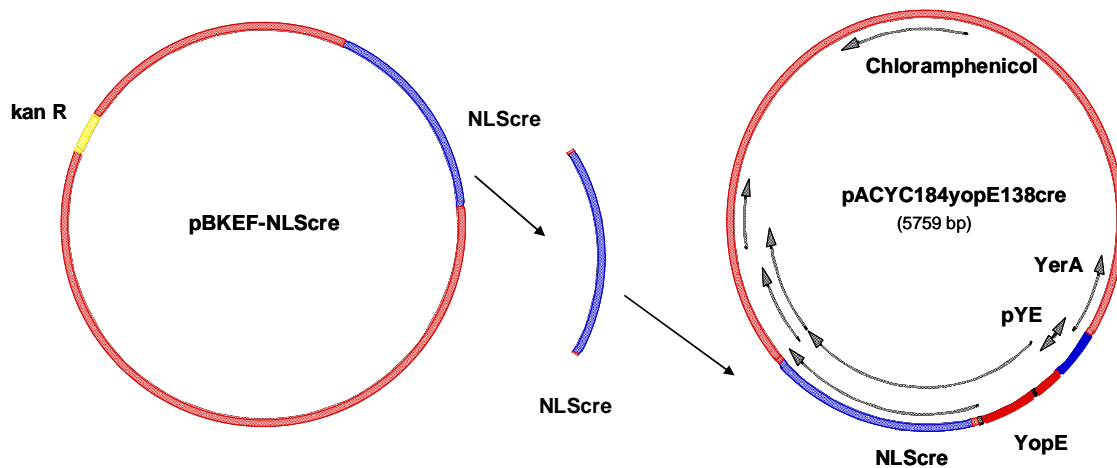
Mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Sa*II wurde der Vektor pNHAN5 linearisiert, wobei zwei DNA-Fragmente, der Vektorrückgrat pACYC und das *virD2*-Genfragment entstehen. Das NLScre Gen wurde unter Verwendung der Primer *creBgl*II (fwd) und *creSa*II (rev) aus dem Plasmid pBKEFNLScre amplifiziert und danach mit den Endonukleasen *Bgl*II und *Sa*II geschnitten. Anschließend wurde das PCR-Amplifikat der NLScre-Sequenz (Insert) und der Restriktionsverdau von pNHAN5 mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das NLScre DNA-Fragment und der pACYC Vektorrückgrat wurden manuell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und im nachfolgendem Schritt ligiert, wobei die Schnittstellen für die Endonuklease *Bam*HI und *Bgl*II zerstört wurden. Abbildung 8 zeigt das Agarosegel mit den beschriebenen DNA-Fragmenten. Der so konstruierte Vektor wurde als pACYC184yopE<sub>138</sub>cre bezeichnet.

In Abbildung 9 sind die einzelnen Klonierungsschritte schematisch dargestellt.



**Abb. 8:** Agarosegel der DNA Fragmente für die Klonierung von pACYC184yopE<sub>138</sub>cre. (1) PCR Amplifikat der NLScre Sequenz (Insert) mit einer Größe von 4000 bp. (2) Der Restriktionsverdau von pNHAN5 ergibt 2 DNA Fragmente: den Vektorrückgrat mit einer Größe von 8000 bp und das *virD2*-Genfragment mit einer Größe von 4500 bp. Der Vektorrückgrat von pACYC und das NLScre Insert wurden manuell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Extraktion aus dem Gel ligiert.





**Abb. 9:** Klonierungsschema zur Herstellung von pACYC184yopE<sub>138</sub>cre aus pBKEFNLScre. Das NLScre DNA Fragment (Insert) wurde aus pBKEFNLScre amplifiziert und mit den Endonukleasen *Bgl*I und *Sal*I geschnitten. pNHAN5 wurde mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Sal*I linearisiert, wobei *virD*<sub>2</sub>-Gen entfernt wurde und der Vektorrückgrat von pACYC entsteht. Anschließend wurde das NLScre Fragment in den Vektorrückgrat ligiert.

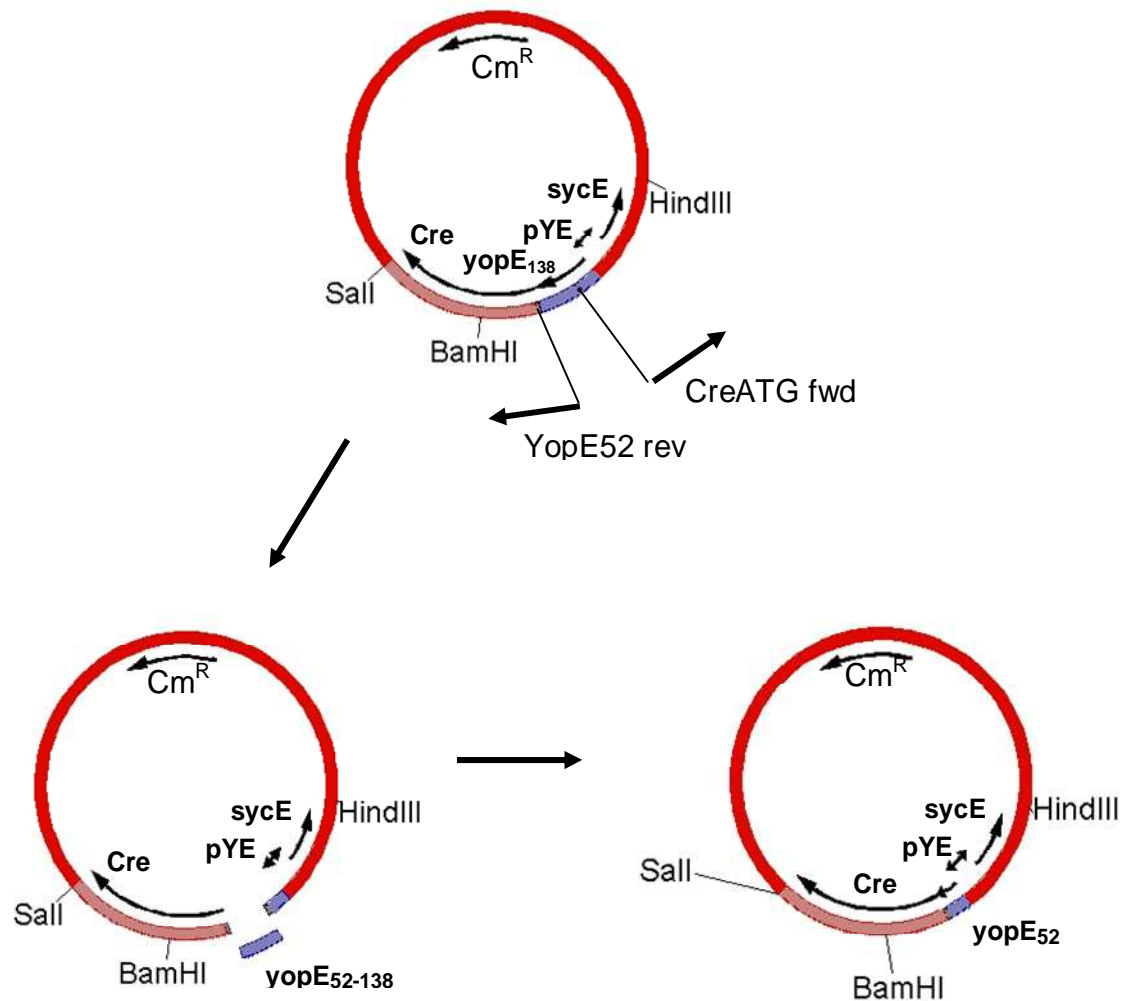
*E. coli* DH5 $\alpha$  wurden mit pACYC184yopE<sub>138</sub>cre transformiert. Aus 20 der erhaltenen Klone wurde DNA isoliert und durch Restriktionsverdau mit *Hind*III überprüft. Die Endonuklease *Hind*III linearisiert pACYC184yopE<sub>138</sub>cre. 11 der 20 Klone ließen sich durch *Hind*III Restriktionsverdau linearisieren. Mehrere dieser positiven Klone wurden sequenziert, wobei die Richtigkeit der Sequenz des inserierten PCR-Fragmentes bestätigt wurde. Einer der positiven Klone wurde für die Transformation von *Yersinien* Stämmen verwendet.

Bei Untersuchungen mit YopE Fragmenten fusioniert an DHFR wurde gezeigt, dass die Sekretion von YopE Fusionsproteinen davon abhängt, ob das Protein linearisiert oder gefaltet vorliegt (46). Die Bindung des SycE Chaperon an das DHFR schützt das Fusionsprotein vor Faltung und bewirkt somit die effiziente Sekretion. Die ersten 15 Codons von YopE kodieren für das Sekretionssignal, die Region zwischen den Aminosäuren 16 und 50 von YopE vermittelt die Bindung des Chaperons, sie wird als minimale SycE-Bindungsdomäne bezeichnet (128). Feldmann et al untersuchten die Sekretion von YopE-DHFR Hybriden, die 16 (YopE<sub>16</sub>), 52 (YopE<sub>52</sub>) und 138 (YopE<sub>138</sub>) Aminosäuren von YopE enthielten sowie YopE in voller Länge. Hierbei wurde gezeigt, dass das YopE<sub>52</sub>-DHFR Fusionsprotein im Vergleich zu YopE<sub>138</sub>-DHFR effizienter sekretiert wird (46).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde mittels Deletionsmutagenese zusätzlich der Vektor pACYC184yopE<sub>52</sub>cre generiert. Die PCR mit den Primern YopE52 rev und CreATG fwd führten zur Amplifikation des gesamten Vektors mit Ausnahme der letzten 86 Basenpaare des YopE Genfragmentes. Somit enthält der Vektor pACYC184yopE<sub>52</sub>cre die ersten 52 Aminosäuren von YopE. Anschliessend wurde die DNA *DpnI* verdaut um die methylierte, zur PCR-Amplifikation verwendete DNA zu verdauen. Die amplifizierte DNA wurde mit T4 Ligase enzymatisch ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. In Abbildung 10 sind die einzelnen Klonierungsschritte der Deletionsmutagenese wiedergegeben.

Nach der Transformation wurden verschiedene Bakterienklone geerntet, die DNA davon präpariert und diese im Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *PstI* überprüft.

Durch *in vitro* Versuche sollte im weiteren Schritt die Funktionalität der auf den hergestellten Expressionvektoren kodierten Fusionsproteine YopE<sub>138</sub>-Cre und YopE<sub>52</sub>-Cre sowie deren Sekretion und Translokation untersucht werden.



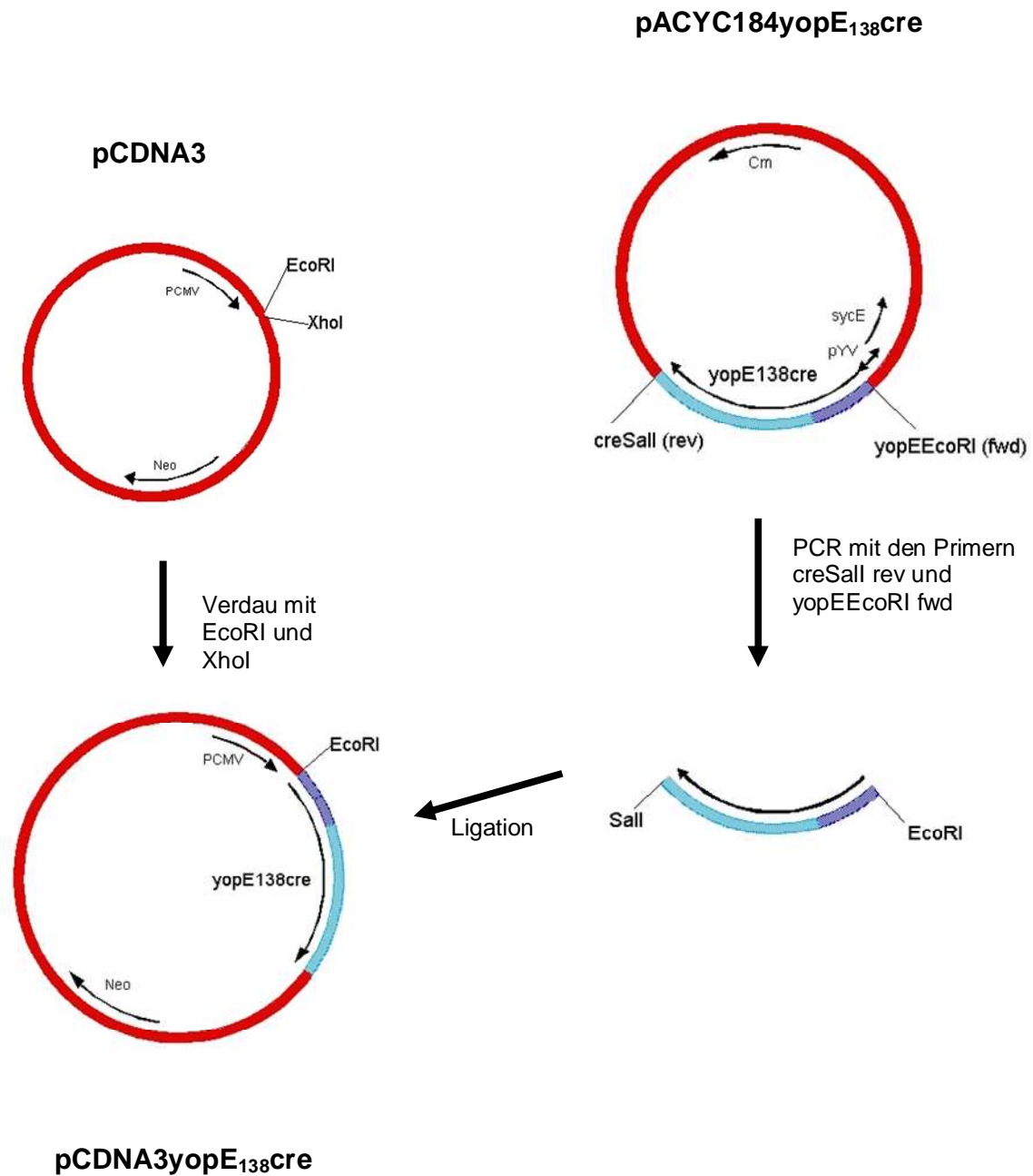
**Abb. 10:** Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zur Generierung des Vektors pACYC184yopE<sub>52</sub>cre. Die PCR mit den Primern YopE52 rev und CreATG fwd führte zur Amplifikation des gesamten Vektors mit Ausnahme der Aminosäuren 53 bis 138 von YopE. Der somit linearisierte Vektor wurde anschließend mit *DpnI* verdaut und ligiert.

### 3.1.3 Herstellung von pCDNA3yopE<sub>138</sub>cre und pCDNA3yopE<sub>52</sub>cre

Es war unklar, ob die YopE-Fragmente YopE<sub>138</sub> bzw. YopE<sub>52</sub> fusioniert an die Cre-Rekombinase eine negative Auswirkung auf die Cre-Rekombinaseaktivität haben. Daher sollte der Einfluss der YopE<sub>138</sub> und YopE<sub>52</sub> Sekretionsdomänen auf die enzymatische Aktivität der Cre Rekombinase in Transfektionsversuchen untersucht werden.

Hierfür wurden zunächst die Sequenzen der beiden Fusionsproteine in den eukaryotischen Vektor pCDNA3 kloniert. Für die Amplifikation der yopE<sub>138</sub>cre und yopE<sub>52</sub>cre Genfragmente aus pACYC184yopE<sub>138</sub>cre und

pACYC184yopE<sub>52</sub>cre wurden jeweils die gleichen Primer verwendet, da sich beide Fusionsproteine in ihren Sequenzen lediglich in der Länge des yopE-Gens unterschieden. Die verwendeten Primer enthielten eine *Sall* bzw. *EcoRI* Schnittstelle. Der Vektor pCDNA3 wurde mit den Endonukleasen *XhoI* und *EcoRI* geschnitten und mit dem yopE<sub>138</sub>cre PCR-Produkt, sowie yopE<sub>52</sub>cre PCR-Produkt ligiert. Die neu generierten Plasmide wurden als pCDNA3yopE<sub>138</sub>cre und pCDNA3yopE<sub>52</sub>cre bezeichnet. In Abbildung 11 sind die einzelnen Klonierungsschritte für pCDNA3yopE<sub>138</sub>cre abgebildet.



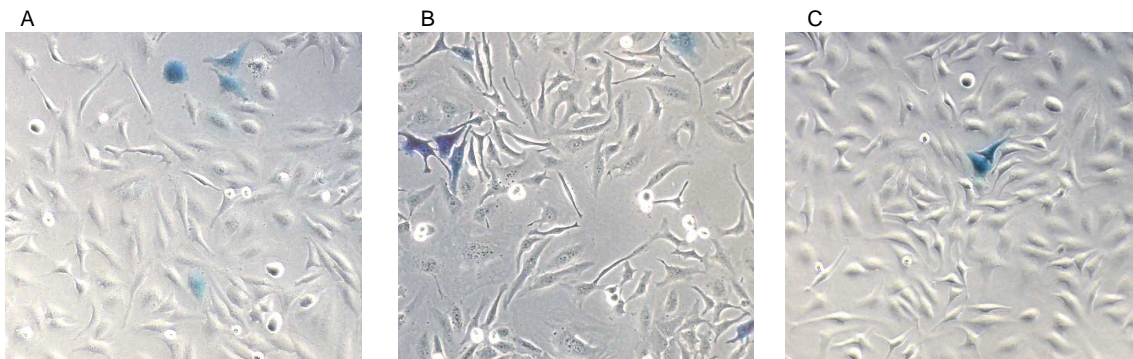
**Abb. 11:** Klonierungsschema zur Herstellung von pCDNA3yopE<sub>138</sub>Cre aus pACYC184yopE<sub>138</sub>cre. Das Genfragment yopE<sub>138</sub>cre wurde mit den Primern creSalI und yopEEcoRI unter Verwendung der Vektor-DNA pACYC184yopE<sub>138</sub>cre amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass die Schnittstellen für SalI und EcoRI entstehen. Der Expressionsvektor pCDNA3 wurde im Restriktionsverdau mit EcoRI und XhoI linearisiert. Die Schnittstellen XhoI und SalI sind kompatibel. Im Anschluß folgte die Ligation des YopE<sub>138</sub>cre Genfragmentes mit dem linearisierten Vektor pCDNA3 mit T4 Ligase.

### 3.2 Überprüfung der Expression und Funktionalität der Fusionsproteine YopE-Cre

Zur Untersuchung der Expression der YopE-Cre Fusionsproteine wurden HeLa Zellen mit den Expressionsvektoren pCDNA3yopE<sub>138</sub>cre und pCDNA3yopE<sub>52</sub>cre transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellproteine der HeLa Zellen gewonnen und diese mittels Immunoblot Analyse untersucht. Als Kontrolle diente die Transfektion mit dem Vektor pBKEFNLScre. Die Zellen wurden in Lämmli Puffer lysiert und die Zellproteine mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt. In der darauffolgenden Westernblotanalyse konnten die YopE-Cre Fusionsproteine sowie die Cre Rekombinase mittels eines Cre spezifischen Antikörpers detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der Rekombinationsfähigkeit der Fusionsproteine wurden Färbungen transfizierter HeLa Zellen durchgeführt. Die Vektoren pCDNA3yopE<sub>138</sub>cre, pCDNA3yopE<sub>52</sub>cre und als Kontrolle pBKEFNLScre wurden jeweils mit pEFlacZneoflox in HeLa Zellen kotransfiziert. Als weitere Kontrollen wurden ebenso Transfektionen der einzelnen Vektoren durchgeführt. Durch x-Gal Färbung konnte bei den doppelt transfizierten Zellen durch Blaufärbung Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 12). Nach Transfektion der einzelnen Vektoren hingegen konnte keine Galaktosidaseaktivität der Zellen nachgewiesen werden.

Damit wurde gezeigt, dass die Funktionalität der Cre-Rekombinase durch die Fusion mit dem YopE Protein prinzipiell nicht beeinträchtigt wird.



**Abb. 12:** X-Gal Färbung transfizierter HeLa Zellen. Doppeltransfektion mit (A) pCDNAyopE<sub>138</sub>cre und pEFlacZneoflox, (B) pCDNAyopE<sub>52</sub>cre und pEFlacZneoflox, (C) pBKEFNLScre und pEFlacZneoflox.

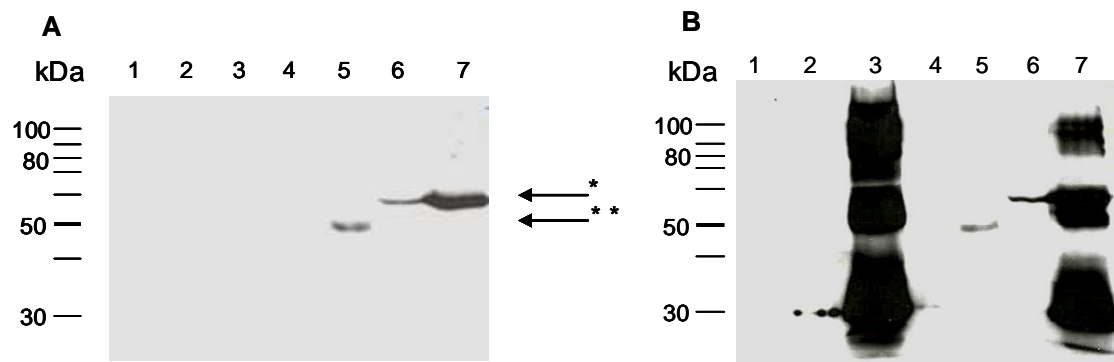
### 3.3 Untersuchungen zur Sekretion des YopE-Cre Fusionsproteins

Nachdem die Funktionalität der YopE-Cre Fusionsproteine gesichert war, sollte nun untersucht werden ob diese auch von *Y. enterocolitica* Stämmen sekretiert werden können. Verschiedene *Yersinia*-Stämme wurden mit den Plasmiden pACYC184yopE<sub>138</sub>cre und pACYC184yopE<sub>52</sub>cre per Elektroporation transformiert. Neben dem Wildtypstamm WA-P wurden der sekretionsdefiziente Stamm WA-C(pYV-515) sowie der Stamm WA-C(pTTSS) verwendet. Bei dem Stamm WA-C(pTTSS) handelt es sich um eine Mutante, die das Originalpathogenitätsplasmid nicht mehr besitzt. Die für den Aufbau des Typ III-Sekretionssystem notwendigen Gene wurden bei WA-C(pTTSS) auf einem anderen Plasmid eingeführt (123), so dass das Translokationssystem funktionsfähig ist, die zytotoxischen Effektor-Yops jedoch fehlen. Die transformierten Stämme wurden WA-P(yopE<sub>138</sub>cre), WA-C(pTTSS yopE<sub>138</sub>cre), WA-C(pTTSS yopE<sub>52</sub>cre) und WA-C(pYV-515 yopE<sub>138</sub>cre) benannt.

Sowohl transformierte Stämme wie auch untransformierte Ausgangsstämme wurden unter Bedingungen angezchtet, die zur Expression des Typ III-Sekretionssystems führen (37 °C, Ca<sup>2+</sup>-Mangel). Die sekretierten Proteine wurden durch TCA-Fällung aus dem Überstand gewonnen und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden dann Coomassie-Blau Färbungen (nicht abgebildet) und Immunoblot-Analysen

durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit einem Cre spezifischen Antikörper sowie einem YopE spezifischen Antiserum (Abb. 13). Es konnten Fusionsproteine in den Überständen der transformierten Stämme WA-P und WA-C(pTTSS) nachgewiesen werden, jedoch nicht in den Überständen des transformierten WA-C(pYV-515) Stammes. Die Position der detektierten Proteine entspricht in etwa den errechneten Molekulargewichten der Fusionsproteine von 45 kDa für YopE<sub>52</sub>-Cre und 54 kDa für YopE<sub>138</sub>-Cre. YopE<sub>138</sub>-Cre ist bei 60 kDa zu detektieren, was für ein verändertes Laufverhalten des Proteins im Gel spricht.

Von den transfizierten *Yersinia* Stämmen wurden Gefrierkulturen angelegt, die dann für die folgenden Versuche verwendet wurden.



**Abb. 13:** Westernblot Analyse der Sekretion von *Y. enterocolitica*-Stämmen, die mit dem pACYC184yopE<sub>138</sub>cre oder pACYC184yopE<sub>52</sub>cre Plasmid transformiert wurden. Immundetektion mit Anti-Cre (**A**) und anti-YopE (**B**). 1: WA-C(pYV-515), 2: WA-C(pTTSS), 3: WA-P, 4: WA-C(pYV-515yopE<sub>138</sub>cre), 5: WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre), 6: WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre), 7: WA-P(yopE<sub>138</sub>Cre). Detektion von YopE: 1. Kaninchen anti GST-YopE 1:10 000, 2. Schwein anti Kaninchen IgG 1:1000 konjugiert mit Meerrettichperoxydase. Detektion von Cre: 1. Kaninchen anti Cre 1:10 000, 2. Schwein anti Kaninchen IgG 1:1000 konjugiert mit Meerrettichperoxydase. Die Pfeile geben die Banden der erwarteten Fusionsproteine an \*: YopE<sub>138</sub>Cre, \*\*: YopE<sub>52</sub>Cre.

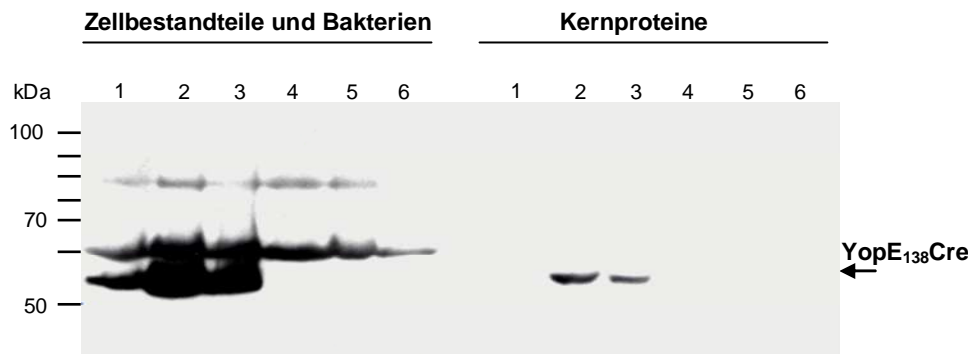
### 3.4 Untersuchungen zur Translokation

Zum Nachweis der Translokation von YopE-Cre Fusionsproteinen wurden Immunoblot Analysen von Zellkernextrakten von Zellen, die zuvor mit *Yersinia*-Stämmen infiziert wurden, durchgeführt. Die Cre Rekombinase des YopE-Cre Fusionsproteins enthält eine Kernlokalisationsdomäne (NLS) Sequenz, wodurch sie nach Translokation in die Zelle in den Zellkern gelangt. Für den



Translokationsversuch wurden verschiedene Zelllinien (HeLa Zellen, die Fibroblastenlinie CV1-5B) verwendet. Die Isolierung der nukleären Proteine erfolgte dabei nach dem Protokoll von Schreiber et al (103).

Die Zellen wurden mit *Yersinia*-Stämmen infiziert, nach 4 Stunden Inkubation lysiert und die nukleären Proteine extrahiert. Die Proteinkonzentration der Überstände wurde bestimmt und für die SDS-PAGE gleiche Proteinmengen der Proben auf das Gel aufgetragen. Von den Pellets, die durch Zentrifugation nach der Extraktion erhalten wurden, wurden gleiche Volumina auf das Gel aufgetragen. Die Pellets enthalten Zellbestandteile sowie Bakterien von der Infektion. In Abbildung 14 ist die Westernblot Analyse der Kernproteine und der Pellets von HeLa Zellen dargestellt. Die HeLa Zellen wurden mit *Yersinia*-Stämmen (WA-P, WA-C(pTTSS), WA-C(pYV-515)), die mit dem Vektor pACYC184yopE<sub>138</sub>cre transformiert wurden, und als Kontrolle mit den untransformierten Ausgangsstämmen infiziert. Die Immundetektion erfolgte mit einem Cre spezifischen Antikörper. In der Fraktion der analysierten Kernproteine wurde das Fusionsprotein YopE<sub>138</sub>Cre bei den Zellen, die mit WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>Cre) und WA-P(yopE<sub>138</sub>cre) infiziert wurden, nachgewiesen. Bei den mit WA-C(pYV-515yopE<sub>138</sub>Cre) infizierten Zellen konnte in den Kernproteinen YopE<sub>138</sub>Cre nicht detektiert werden. In der Fraktion der Pellets wurden bei allen Zellen, die mit den transformierten *Yersinia*-Stämmen infiziert wurden, das YopE<sub>138</sub>Cre Fusionsprotein detektiert, jedoch nicht bei den Zellen, die mit den Ausgangsstämmen infiziert wurden. Somit kann auf eine Translokation des Fusionsproteins in die Zielzellen über das Typ III-Sekretionssystem geschlossen werden. Betrachtet man in Abbildung 14 die Proteinmenge, die von den Stämmen WA-P(yopE<sub>138</sub>cre) und WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre) transloziert wurde, so ist ein quantitativer Unterschied erkennbar.



**Abb. 14:** Westernblot Analyse der Translokation des YopE<sub>138</sub>Cre Fusionsproteins. Aus infizierten HeLa Zellen wurden Kernproteine extrahiert. Die benutzten Stämme entsprechen den Nummern: 1: WA-C(pYV-515yopE<sub>138</sub>cre), 2: WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre), 3: WA-P(yopE<sub>138</sub>cre), 4: WA-C(pYV-515), 5: WA-C(pTTSS), 6: WA-P. Zur Detektion wurde ein polyklonaler Anti-Cre Antikörper verwendet.

### 3.5 Vergleichende Untersuchungen der Translokation und Transfektion

In den vorangegangenen Untersuchungen zur Translokation war ein quantitativer Unterschied in der translozierten Proteinmenge aufgefallen. Es wird mehr YopE<sub>52</sub>Cre Protein von den *Yersinien* transloziert als YopE<sub>138</sub>Cre.

Im folgenden Experiment wurden die translozierten Fusionsproteine quantitativ mit den Fusionsproteinen, die von den Zellen nach Transfektion exprimiert wurden, verglichen.

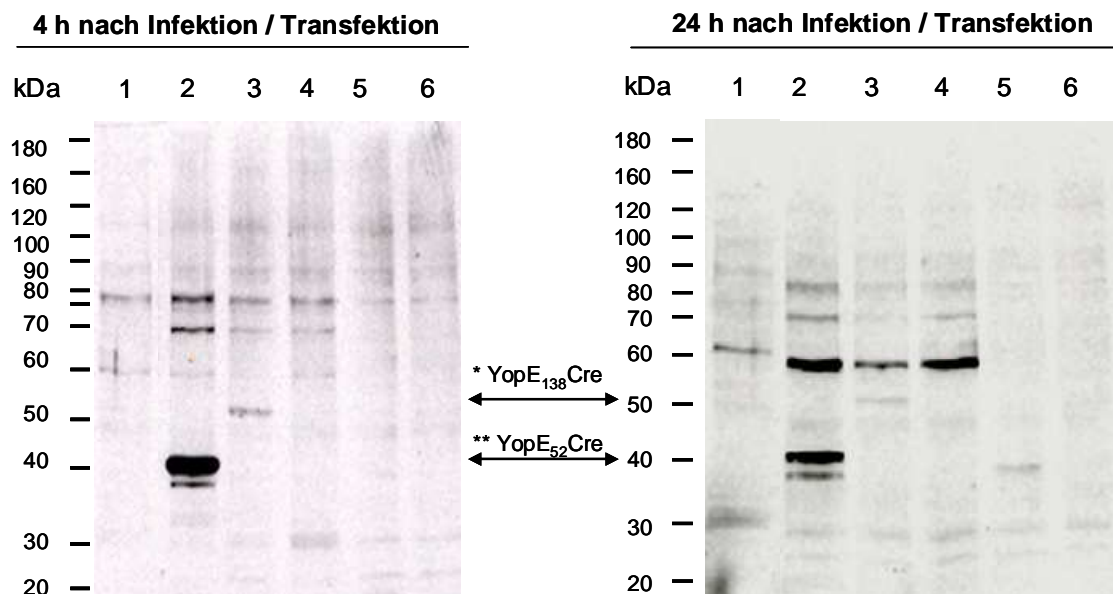
Hierfür wurden CV1-5B Fibroblasten mit den Stämmen WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre), WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre), WA-C(pYV-515yopE<sub>138</sub>Cre) und WA-C(pTTSS) infiziert, sowie mit den Expressionsvektoren pCDNA3yopE<sub>52</sub>cre und pCDNA3yopE<sub>138</sub>cre transfiziert. Nach 4 sowie nach 24 Stunden wurden die Zellkernproteine der CV1-5B Fibroblasten gewonnen und mittels Westernblot Analyse untersucht. Die Immundetektion erfolgte mit einem Cre spezifischen Antikörper.

In Abbildung 15 ist die Immunoblot Analyse der Kernextrakte dargestellt. In der Fraktion der Zellkernextrakte, die nach 4 Stunden gewonnen wurde, wurden die von WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre) und WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) translozierten Fusionsproteine YopE<sub>52</sub>Cre und YopE<sub>138</sub>Cre nachgewiesen. In den

Zellkernextrakten der transfizierten Fibroblasten konnten keine Fusionsproteine detektiert werden.

In der Fraktion der Zellkernextrakte, die nach 24 Stunden gewonnen wurde, wurden ebenfalls die von WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre) und WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) translozierten Fusionsproteine detektiert. Bei den Zellkernextrakten der mit pCDNA3yopE<sub>52</sub>cre transfizierten Fibroblasten konnte das Fusionsprotein YopE<sub>52</sub>Cre ebenfalls nachgewiesen werden, nicht jedoch bei den Zellen, die mit pCDNA3yopE<sub>138</sub>cre transfiziert wurden.

Zu beiden Zeitpunkten konnten in den Zellkernextrakten der Fibroblasten, die mit WA-C(pYV-515yopE<sub>138</sub>Cre) und WA-C(pTTSS) infiziert worden waren, keine Fusionsproteine nachgewiesen werden.



**Abb. 15:** Westernblot Analyse der Zellkernextrakte aus CV1-5B Fibroblasten 4 und 24 Stunden nach Infektion und Transfektion. Zur Infektion wurden die Stämme: WA-C(pYV-515) (1), WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) (2), WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre) (3), WA-C(pTTSS) (4) verwendet. Zur Transfektion wurden pCDNA3yopE<sub>52</sub>cre (5) und pCDNA3yopE<sub>138</sub>cre (6) benutzt. Die aufgetragene Proteinmenge der einzelnen Proben beträgt 21,5 µg. Zur Detektion wurde ein polyklonaler Anti-Cre Antikörper verwendet. Die Pfeile geben die Banden der erwarteten Fusionsproteine an (\* YopE<sub>138</sub>cre, \*\* YopE<sub>52</sub>cre).

Bei allen Proben wurde die gleiche Proteinmenge aufgetragen. Vergleicht man nun die Banden der detektierten Fusionsproteine, so wird zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Infektion/Transfektion deutlich, dass wesentlich mehr YopE<sub>52</sub>Cre transloziert wird als YopE<sub>138</sub>Cre. Auch beim Zeitpunkt 24 Stunden nach

Infektion/Transfektion ist die Bande des YopE<sub>52</sub>Cre um ein mehrfaches stärker als die Bande des YopE<sub>138</sub>Cre. In der Fraktion der Zellkernextrakte der transfizierten Fibroblasten konnte lediglich beim Zeitpunkt 24 Stunden das Fusionsprotein YopE<sub>52</sub>Cre detektiert werden. Dessen Bande ist eher schwach ausgeprägt, entsprechend der Bande des translozierten YopE<sub>138</sub>Cre Fusionproteins.

Aufgrund der Ergebnisse ist folgendes anzunehmen:

- das Fusionsprotein YopE<sub>52</sub>Cre wird mengenmäßig besser transloziert als YopE<sub>138</sub>Cre.
- 4 Stunden nach der Infektion befindet sich mehr Fusionsprotein im Zellkern als 24 Stunden nach der Infektion. Demzufolge hat die Degradation des Fusionsproteins zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektion begonnen.
- 4 Stunden nach der Transfektion wird sehr wenig oder noch kein Fusionsprotein von den Zellen exprimiert.
- 24 Stunden nach der Transfektion exprimieren die Zellen das Fusionsprotein, jedoch wenig.

## **3.6 *In vitro* Infektionen und Transfektionen**

### **3.6.1 Etablierung der Nachweismethode**

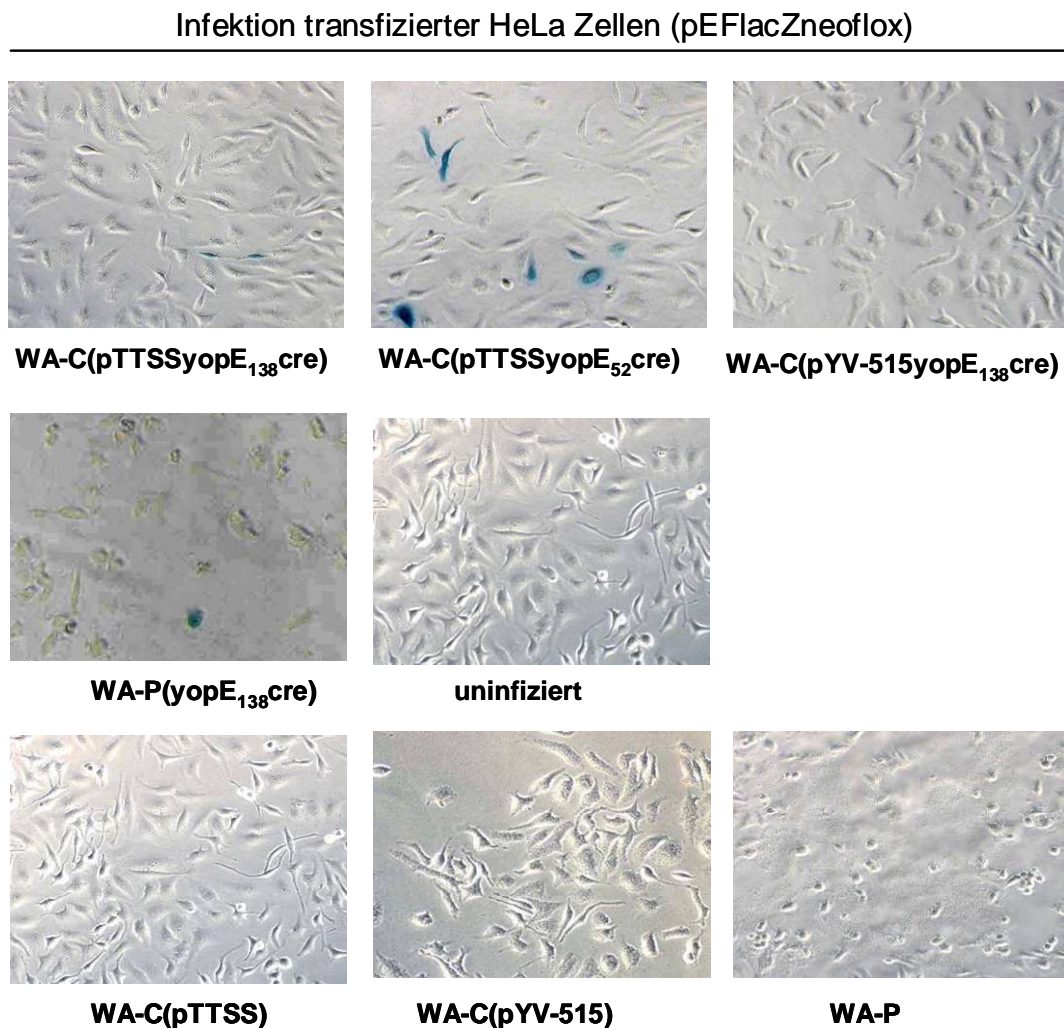
#### **3.6.1.1 Infektion transient transfizierter HeLa Zellen**

Um zu überprüfen, ob mit diesem System Yop Translokation *in vitro* nachweisbar ist, wurden Infektionsversuche mit allen neu generierten *Yersinia*-Stämmen durchgeführt. Hierfür wurden HeLa Zellen vor Beginn der Infektionsversuche mit dem Vektor pEFlacZneoflox transfiziert. Dadurch befand sich das Reporter-gen lacZneoflox in den Zellen. Bei den Zellen, in die das Fusionsprotein YopE-Cre von den *Yersinien* transloziert wurde, kam es zur Cre

vermittelten Rekombination des Reportergens. Dadurch konnte das lacZ Gen exprimiert werden, was durch  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in der histologischen Färbung durch Blaufärbung der Zellen nachgewiesen werden konnte.

Die transfizierten HeLa Zellen wurden mit WA-P(yopE<sub>138</sub>cre), WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre), WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre), WA-C(pYV-515yopE<sub>138</sub>cre) Stämmen, sowie den korrespondierenden Ausgangsstämmen WA-P, WA-C(pTTSS) und WA-C(pYV-115) inkubiert. Die Infektion wurde nach 4 Stunden Inkubationszeit durch Waschen und Gentamycingabe beendet. Die Zellen wurden weiterhin für 24 Stunden kultiviert, damit die  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert werden konnte.

Abbildung 16 zeigt, dass bei Hela Zellen, die transient mit dem Vektor pEFlacZneoflox transfiziert wurden und mit den Stämmen WA-P(yopE<sub>138</sub>cre), WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre), WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) infiziert wurden, im  $\beta$ -Galaktosidase Nachweis einige Zellen blau angefärbt werden konnten. Bei den uninfizierten Zellen sowie den Zellen, die mit den nicht transformierten Stämmen und WA-C(pYVyopE<sub>138</sub>cre) infiziert wurden, konnten dagegen keine Zellen gefärbt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich Cre Rekombinaseaktivität nach *Yersinien*-Infektion mit YopE-Cre exprimierenden Stämmen spezifisch als Blaufärbung nachweisen lässt.



**Abb. 16.** HeLa Zellen nach x-Gal Färbung. Die Zellen wurden vor der Infektion mit den angegebenen *Yersinien*-Stämmen mit dem Vektor pEFlacZneoflox transient transfiziert (2 h). Anschließend wurden die Zellen nicht infiziert oder mit den gekennzeichneten Stämmen für 4 h infiziert. Dann wurde zu den Zellen Gentamycin gegeben und nach weiteren 20 Stunden wurden die Zellen mit x-Gal gefärbt.

In den einzelnen Infektionsversuchen fielen bezüglich der Translokationseffizienz des Vektors pEFlacZneoflox wie auch der Rekombinationseffizienz der YopE-Cre Fusionsproteine betreffend quantitative Unterschiede auf. Auch der Vergleich der unterschiedlich transformierten *Yersinien*-Stämme zeigte quantitative Unterschiede in der Rekombinationseffizienz. So wurde bei den Infektionsversuchen mit dem Stamm WAP(yopE<sub>138</sub>cre) lediglich in einem Versuch eine blaue Zelle beobachtet. Hierbei fiel auf, dass der Großteil der HeLa Zellen abgerundet war und sich bereits abgelöst hatte. In den Infektionsversuchen mit den Stämmen WAC(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre) und

WAC(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) wurden stets blaue Zellen beobachtet. Bei allen durchgeführten Versuchen fiel auf, dass bei der Infektion mit WAC(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) mehr blaue Zellen zu finden waren, als bei der Infektion mit WAC(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre). Allerdings schwankte die Menge der beobachteten blauen Zellen sehr. Bei allen durchgeführten Infektionsversuchen wurde auch die Transfektionseffizienz kontrolliert. Hierbei wurden die HeLa Zellen mit pEFlacZneoflox und pBKEFNLScre kotransfiziert. Auffallend war, dass es deutliche quantitative Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den einzelnen Versuchen gab. Die schwankenden Mengen an beobachteten blauen Zellen sind somit am ehesten mit der inkonstanten Transfektionseffizienz zu begründen.

Zur quantitativen Einschätzung der Rekombinationseffizienz der Fusionsproteine YopE<sub>138</sub>Cre und YopE<sub>52</sub>Cre wurden trotz dieses systemischen Fehlers in einem der Infektionsversuche die blauen Zellen gezählt.

Hierfür wurde der gefärbte Zellrasen fotografiert und auf die Fotos ein Gitter gelegt. Durch Bestimmung der durchschnittlichen Zellzahl pro Gitterquadrat (repräsentativ bestimmt aus 6 Zählquadraten) und der durchschnittlichen Zahl positiver (blauer) Zellen pro Gitterquadrat wurde der prozentuale Anteil positiver Zellen bestimmt. Als Rekombinationseffizienz eines Versuchs wurde der Durchschnitt aus den Auszählungen von 4 bzw. 5 Ausschnitten angegeben. Diese Quantifizierungsmethode wurde von M. Köberle etabliert (132).

In Tabelle 17 sind die Auszählungsergebnisse eines Infektionsversuches dargestellt. Das Fusionsprotein YopE<sub>52</sub>cre hat eine 8,5 fache höhere Rekombinationseffizienz als YopE<sub>138</sub>cre.

Stamm	Gezählte positive Zellen	Zellzahl gezählt	Gesamtzellzahl errechnet	Anteil positiver Zellen
WA-C(pTTSSyopE <sub>138</sub> cre)	14	853	4265	0,33%
WA-C(pTTSSyopE <sub>52</sub> cre)	50	357	1785	2,80%

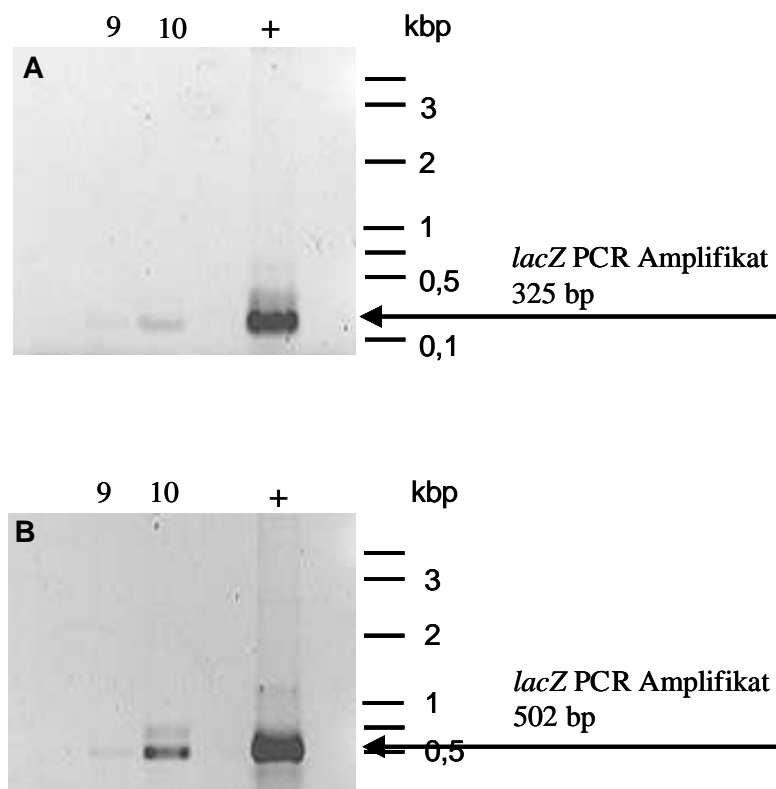
**Tab. 17:** Auszählungsergebnisse der Infektionen von transient transfizierten HeLa Zellen mit WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre) und WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) nach dem  $\beta$ -Galaktosidase Nachweis. Es wurde ein Experiment durchgeführt. 4 bzw. 5 Ausschnitte wurden abfotografiert und aus diesen jeweils 6 von 30 Quadranten gezählt. Aus der insgesamt gezählten Zellzahl wurde die Gesamtzellzahl hochgerechnet, die in den ausgewerteten Ausschnitten enthalten war.

### 3.6.1.2 Entwicklung einer stabilen Zelllinie

Es sollte eine Zelllinie entwickelt werden, die das Reporter-gen lacZneoflox stabil in ihrem Genom integriert hat. Kommt es zur Translokation des YopE-Cre Fusionsproteins mit nachfolgender Rekombination des Reporter-gens, so kann die Cre Rekombinaseaktivität in den Zellen durch Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression mittels x-Gal Färbung detektiert werden.

Der Vektor pEFlacZneoflox wurde hierfür zuerst mit der Restriktionsendonuklease *NotI* linearisiert und dann in HeLa Zellen transfiziert. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte unter dem Selektionsdruck des Antibiotikums G418. Hierbei handelt es sich um ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das in seiner Struktur den Antibiotika Gentamycin, Neomycin und Kanamycin gleicht. Da der Vektor pEFlacZneoflox die Resistenz für Neomycin trägt, können in Anwesenheit von G418 nur die Zellen auf Dauer überleben, die das Plasmid in ihrem Genom enthalten. Die transfizierten Zellen wurden mit G418 kultiviert, einzelne Zellpopulationen wurden isoliert und weiter subkultiviert. Um sicherzustellen, dass das Reporter-gen lacZneoflox in das Genom der Zellen integriert worden war, wurde bei allen Zellklonen die genomische DNA isoliert und diese mittels PCR Analyse auf das Reporter-gen untersucht. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Sequenzabschnitte des lacZneoflox Gens amplifiziert um auszuschließen, dass nur ein Teil des Gens ins Genom eingebaut wurde. Die Primerpaare wurden dabei so gewählt, dass die vor und hinter der Neomycinkassette liegenden Sequenzen amplifiziert wurden. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pEFlacZneoflox verwendet. Hierbei konnte bei lediglich zwei Klonen das Reporter-gen vollständig nachgewiesen werden (Abb. 17).





**Abb. 17:** Gelelektrophorese der PCR Amplifikate der Zellklone 9 und 10. In **A** wurden die Primer lac Z1205-1530fwd und lacZ 1530-1205 rev verwendet. Das Amplifikat hat eine Größe von 325 bp. In **B** wurde das Primerpaar lacZ 2002-2504fwd und lacZ 2504-2002rev verwendet, die Größe des Amplifikates beträgt 502 bp. Als Positivkontrolle (+) wurden PCRs mit denselben Primerpaaren aus dem Vektor pEFlacZneolox durchgeführt. Die Banden der Amplifikate sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Funktionalität der beiden Zellklone wurde im Transfektionsversuch mit dem Vektor pBKEFNLScre überprüft. Hierbei konnte bei keinem der Klone  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Beide Zellklone waren somit nicht funktionell.

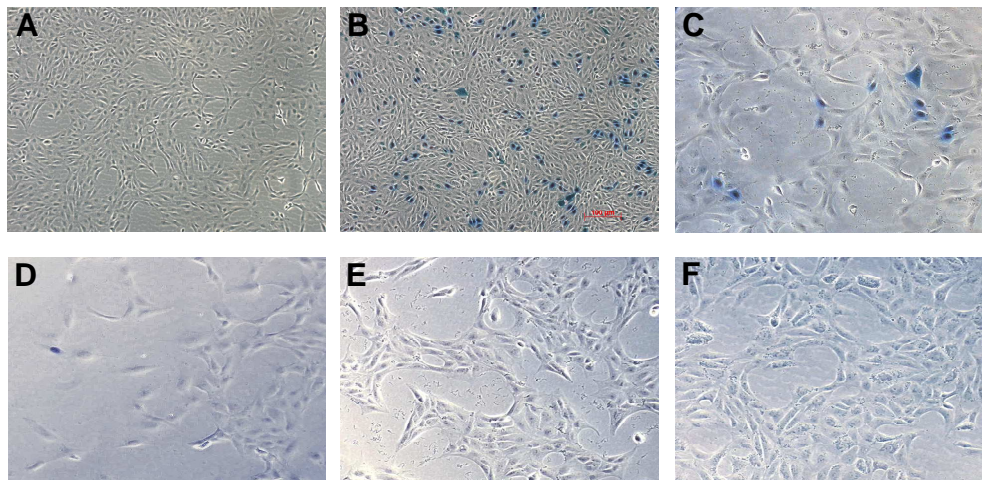
### 3.6.1.3 Infektion von CV1-5B Zellen

Für die weiteren Versuche wurde die Fibroblasten-Zelllinie CV1-5B verwendet, die freundlicherweise von Werner Müller (Helmholtzzentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurde. Bei diesen Zellen handelt es sich um Fibroblasten, die als Reporterzellen ein *NLSlacZ*

Konstrukt enthalten. Das aus *E.coli* stammende  $\beta$ -Galaktosidase-Gen *lacZ* ist durch die Insertion einer geflochtenen Neomycinresistenz Kasette vom Promotor getrennt. Durch Cre-vermittelte Rekombination wird die Neomycinresistenz Kasette entfernt. Das *NLS-lacZ* Konstrukt gelangt dadurch unter die Kontrolle seines Promotors, so dass  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert wird (71).

Die Infektionsversuche wurden mit den Stämmen WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre), WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre), WA-P(yopE<sub>138</sub>cre), WA-C(pYV-515yopE<sub>138</sub>cre) sowie den korrespondierenden Ausgangsstämmen durchgeführt. Dazu wurden am Vortag CV1-5B Fibroblasten mit einer MOI von 50 für 4 Stunden mit den jeweiligen *Yersinien*-Stämmen infiziert. Die Infektion wurde durch Waschen und Gentamycingabe gestoppt. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden kultiviert, damit die  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert werden konnte. Danach folgte die Auswertung anhand des  $\beta$ -Galaktosidasenachweises.

Abbildung 18 zeigt, dass bei CV1-5B Zellen, die mit den Stämmen WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre) und WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) infiziert wurden, nach der  $\beta$ -Galaktosidase Färbung blaue Zellen nachgewiesen werden konnten. Bei den uninfizierten Zellen und den Zellen, die mit WA-P(yopE<sub>138</sub>cre) und WA-C(pYV-515yopE<sub>138</sub>cre) (Abb. 18 A, E und F) sowie den Ausgangsstämmen infiziert wurden, wurden dagegen keine blauen Zellen beobachtet.



**Abb.18:** CV1-5B Fibroblasten nach x-Gal Färbung. **A und B:** zehnfache Objektiv-Vergrößerung. **C-F:** vierzigfache Objektiv-Vergrößerung. **A:** uninfiziert, **B:** nach WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) Infektion, **C:** ebenfalls nach WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) Infektion, vierzigfache Vergrößerung, **D:** WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre), **E:** nach WA-P(yopE<sub>138</sub>cre) Infektion. **F:** nach WA-C(pYV-515yopE<sub>138</sub>cre) Infektion.

### 3.6.2 Quantifizierung der Rekombinationseffizienz der Fusionsproteine

#### 3.6.2.1 Quantifizierung durch Auszählen

Die Rekombinationseffizienz der Infektionsversuche von CV1-5B Fibroblasten wurde durch Auszählen nach der Methode von M. Köberle bestimmt (132) (siehe Material und Methoden, 2.2.4.7).

Am Folgetag der Infektion wurde zunächst der  $\beta$ -Galaktosidase Nachweis durchgeführt. Der so gefärbte Zellrasen wurde abfotografiert und auf die Fotos ein Gitter gelegt. Es wurde die durchschnittliche Zellzahl und die durchschnittliche Zahl blauer Zellen pro Gitterquadrat bestimmt. Als Rekombinationseffizienz eines Versuches wurde der Durchschnitt aus den Auszählungen von 3, bzw. 4 Ausschnitten gegeben.

Es wurden jeweils zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Da kein Hintergrund auftrat mussten die Negativkontrollen (uninfizierte CV1-5B Kulturen; Infektion mit den nicht transformierten *Yersinia*- Ausgangsstämmen) nicht ausgezählt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt.

Stamm	Zellzahl	Zellzahl (blaue Zellen)		Durchschnitt	Standardabweichung
		insgesamt	Anteil		
WA-C(pTTSSyopE <sub>52</sub> cre) (Versuch 1)	1265	32	2,53%	3,46%	1,05%
	277	10	3,61%		
	531	15	2,82%		
	389	19	4,88%		
WA-C(pTTSSyopE <sub>52</sub> cre) (Versuch 2)	2035	170	8,35%	9,46%	1,61%
	1655	187	11,30%		
	1985	173	8,72%		
WA-C(pTTSSyopE <sub>138</sub> cre) (Versuch 1)	107	1	0,93%	0,31%	0,54%
	178	0	0,00%		
	540	0	0,00%		
WA-C(pTTSSyopE <sub>138</sub> cre) (Versuch 2)	4520	2	0,04%	0,01%	0,03%
	1950	0	0,00%		
	1015	0	0,00%		

**Tab. 18:** Auszählungsergebnisse der Infektionen von CV1-5B Zellen mit WA-C(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre) und WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) nach dem  $\beta$ -Galaktosidase Nachweis. Es wurden jeweils zwei unabhängige Experimente durchgeführt. 3 bzw. 4 Ausschnitte des Zellrasens wurden jeweils abfotografiert und gezählt. Die daraus errechnete Zellzahl der betrachteten Ausschnitte ist angegeben. Die Anzahl der in den Ausschnitten gezählten blauen Zellen ist insgesamt und prozentual auf die Zellzahl bezogen angegeben. Der Durchschnitt und die Standardabweichung beziehen sich auf die angegebenen Anteile an blauen Zellen.

### 3.6.2.2 Quantifizierung von Yop Translokation durch durchflusszytometrische Analyse

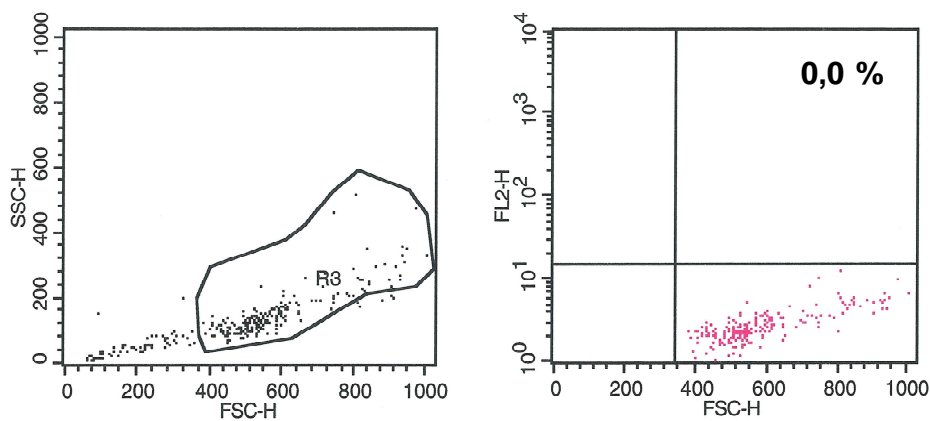
Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die CV1-5B Fibroblasten 24 Stunden nach der Infektion und Transfektion aus der Zellkulturschale abgelöst, gewaschen und mit Aceton / PBS (66:34) fixiert. Die intrazelluläre Färbung erfolgte mit dem primären Antikörper Maus anti- $\beta$ -Galaktosidase (1:50) und dem sekundärem Antikörper Ratte anti-Maus IgG<sub>2a+b</sub> (PE 1:3). Die Konzentration der beiden Antikörper wurde in mehreren Schritten austitriert.

Die CV1-5B Fibroblasten wurden am Vortag mit den Stamm WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) und als Negativkontrolle mit dem Stamm WAC(pTTSS) infiziert, sowie mit dem Vektor pCDNA3yopE<sub>52</sub>cre und pCDNA3 transfiziert. Zur Beurteilung des Hintergrundes der intrazellulären Färbung wurden uninfizierte und untransfizierte CV1-5B Fibroblasten verwendet. Bei den mit WA-C(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) infizierten Fibroblasten kam es durchschnittlich bei 4,12 % der Zellen und in der Fraktion der mit pCDNA3yopE<sub>52</sub>cre transfizierten Zellen bei 2,59 % zur Cre vermittelten Rekombination. Von den als

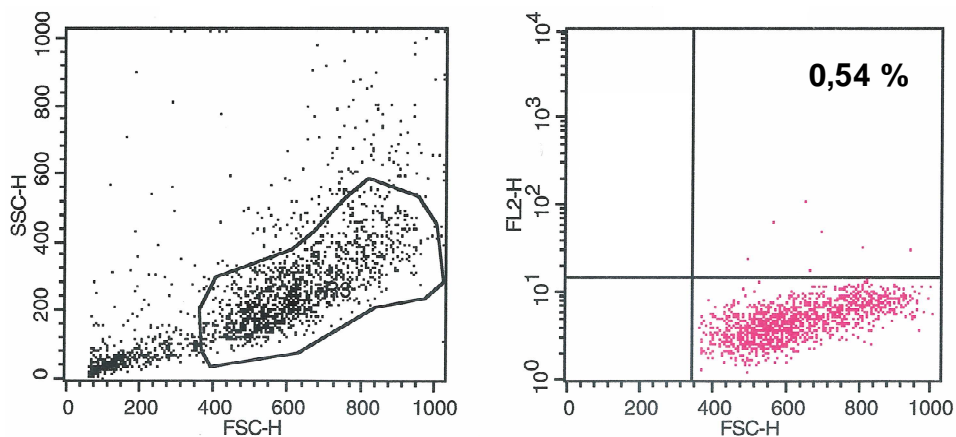
Negativkontrolle mit WAC(pTTSS) infizierten und mit pCDNA3 transformierten Zellen waren im Durchschnitt 0,37 % der infizierten und 0,09 % der transfizierten Zellen falsch positive Zellen nachweisbar.

In der Fraktion der untransfizierten und uninfizierten Fibroblasten wurden durchschnittlich 0,04 % der Zellen falsch positiv gemessen. Somit trat bei den durchflußzytometrischen Analysen im Gegensatz zum  $\beta$ -Galaktosidase Nachweis mittels x-Gal Färbung ein leichter Hintergrund auf. In Abbildung 19 ist die Fax-Analyse eines der oben beschriebenen Versuche dargestellt. Die einzelnen Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst, zu den Versuchen wurden jeweils 2 bzw. 3 Experimente durchgeführt.

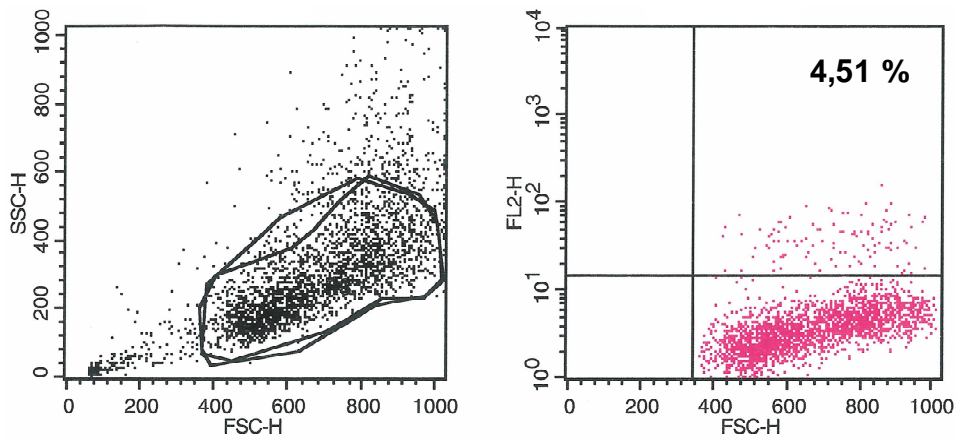
### FACS Analyse nicht infizierter CV1-5B Fibroblasten



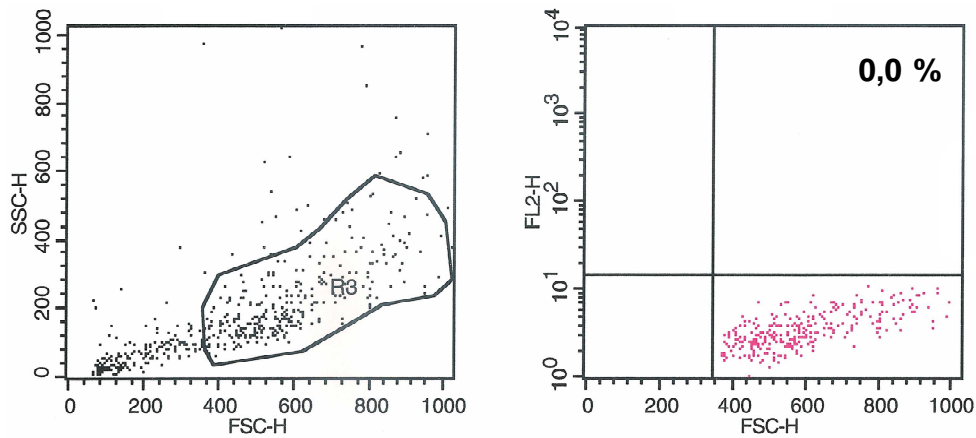
### FACS Analyse von CV1-5B Fibroblasten nach Infektion mit WA-C(pTTSS)



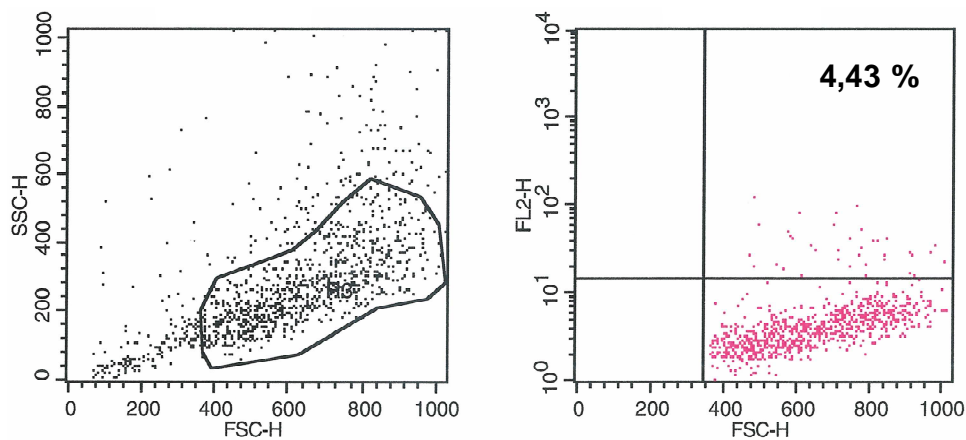
### FACS Analyse von CV1-5B Fibroblasten nach Infektion mit WA-C(pTTSSyopE52cre)



### FACS Analyse von CV1-5B Fibroblasten nach Transfektion mit pCDNA3



### FACS Analyse von CV1-5B Fibroblasten nach Transfektion mit pCDNA3yopE<sub>52</sub>cre



**Abbildung 19:** FACS Analyse von CV1-5B Fibroblasten nach Infektion mit *Yersinia* Stämmen und Transfektion (die verwendeten Stämme / Vektoren sind angegeben).

Stamm / Vektor	Positive Zellen		Ausgewertete Zellen
nicht infiziert (3 Experimente)	0,00%	Ø 0,04%	215
	0,04%		9495
	0,08%		5253
WA-C(pTTSS) (2 Experimente)	0,10%	Ø 0,37%	9314
	0,54%		1299
WA-C(pTTSSyopE <sub>52</sub> cre) (3 Experimente)	4,51%	Ø 4,12%	2266
	1,12%		9816
	6,74%		4901
pCDNA3 (2 Experimente)	0,00%	Ø 0,09%	305
	0,18%		9050
pCDNA3yopE <sub>52</sub> cre (2 Experimente)	4,43%	Ø 2,59%	820
	0,75%		799

**Tab. 19:** Quantifizierung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität der CV1-5B Fibroblasten mittels FACS Analyse. Die Fibroblasten wurden mit den angegebenen Stämmen infiziert, bzw. mit den angegebenen Vektoren transfiziert. Der Anteil der Ereignisse im rechten oberen Quadranten wird als Anteil an positiven Zellen angegeben.

## 4 Diskussion

*Yersinien* verfügen über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die ihre Invasion und Ausbreitung im Wirtsorganismus ermöglichen. Auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten haben *Yersinien* vielfältige Wirkungen. Sie inhibieren Phagozytose, oxidativen burst sowie die Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  und Interleukin-8 und induzieren Apoptose (36). In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass viele dieser Wirkungen von den Effektor-Yops abhängig sind, die über den Typ III-Sekretions/Translokationsapparat in das Zytoplasma von Abwehrzellen transloziert werden. So wird nach Kontakt von *Yersinien* mit Wirtszellen ein Sekretionsapparat aufgebaut. Über diesen Sekretionsapparat werden zunächst die Proteine YopB und YopD in die Wirtszellmembranen und über die, in der Wirtszellmembran gebildete Poren werden dann die sogenannten Effektor Yops, YopE, YopH, YopM, YopT, YopO und YopP in die Wirtszellen, die verschiedene Zellfunktionen ausser Kraft setzen, injiziert. Über die molekularbiologische Funktionsweise der meisten dieser Yops ist vieles bekannt (108).

Zum besseren Verständnis der TTSS von *Yersinia* wurden Reportersysteme entwickelt, um Fragen adressieren zu können, wie im Detail die Translokation von Effektor-Yops funktioniert und in welche Zellen *in vivo* Yops transloziert werden.

So entwickelten Jacobi et al (68) ein Reportersystem, welches auf YopE-GFP und YopE-Luziferase Fusionsproteinen basiert. Hiermit konnten *Yersinien*, die das Fusionsprotein exprimieren, in Zellkulturen und in Maus-Infektionen mittels Fluoreszenz detektiert werden. Die direkte Yop Injektion konnte mit diesem System jedoch nicht eindeutig nachgewiesen oder quantifiziert werden. Nachteil dieses Reportersystems ist, dass *Yersinien*, die das Fusionsprotein exprimieren, die gleiche Fluoreszenz aufweisen wie die infizierten Zellen. Bei *in vivo* Versuchen war mit diesem System nicht möglich zu unterscheiden, ob die Fluoreszenz von infizierten Zellen oder von *Yersinien* ausgeht, die das Fusionsprotein exprimieren.



Sory et al (116) entwickelten einen Expressionsvektor bestehend aus YopE-Cya (Adenylatcyclase). Durch quantitative Analyse der Umsetzung von ATP zu cAMP konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das YopE-CyA Fusionsprotein in das Zytosol infizierter Makrophagen über den Typ III-Sekretions/Translokationsapparat transloziert wird. Zudem war es mit diesem System möglich die Funktion von YopB und YopD für die Translokation von Yops mittels Messung von cAMP infizierter Zellen zu demonstrieren. Allerdings waren diese Systeme nicht dafür geeignet um *in vivo* zu zeigen, in welche Zellen Yops injiziert werden. Somit blieb unklar, auf welche Zellen die *Yersinien in vivo* wirken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war ein Reportersystem, basierend auf einem Cre-YopE Fusionsprotein und lox P flankiertem Reportergenkonstrukt zu entwickeln, um durch Infektion von *in vitro* Modellen diejenigen Zellen zu erkennen, in welche das Yop-Virulon transloziert wird.

Dieses Cre-lox P Reportersystem sollte als Grundbaustein für nachfolgende *in vivo* Untersuchungen des Infektions- und Ausbreitungsweges von *Yersinia enterocolitica* dienen.

#### 4.1 YopE<sub>138</sub>Cre / YopE<sub>52</sub>Cre

Untersuchungen zur Sekretion von YopE-DHFR Hybriden über das TTSS hatten gezeigt, dass die Sekretionseffizienz von YopE Fusionsproteinen davon abhängig ist, ob das Protein linearisiert oder gefaltet vorliegt (46). Feldmann et al zeigten, dass das YopE<sub>52</sub>-DHFR Fusionsprotein im Vergleich zu YopE<sub>138</sub>-DHFR effizienter sekretiert wird.

Anlehnend an diese Untersuchungen wurden in dieser Arbeit Expressionsvektoren, bestehend aus N-terminalen YopE Fragmenten und einer C-terminalen NLSCre Domäne, konstruiert. Die offenen Leserahmen der yopE<sub>138</sub>Cre- und yopE<sub>52</sub>Cre- Konstrukte wurden jeweils zusammen mit denen von *sycE* (dem YopE Sekretionschaperon) in den enterobakteriellen Vektor pACYC184 kloniert.

Zur Überprüfung der Funktionalität der Cre Rekombinase wurden die yopE<sub>138</sub>Cre- und yopE<sub>52</sub>Cre Konstrukte in den eukaryoten Vektor pCDNA3, der zur Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen geeignet ist, kloniert. Es konnte gezeigt werden, dass die Fusion der Cre Rekombinase an einen N-terminalen Teil von YopE keinen Effekt auf die enzymatische Aktivität von Cre ausübt (siehe Ergebnisse 3.2, Abbildung 12).

## 4.2 Sekretion und Translokation von YopE<sub>138</sub>Cre / YopE<sub>52</sub>Cre

Aufgrund der Vorbefunde, dass das YopE keinen Einfluss auf die Cre Enzymaktivität hatte, konnte nun im nächsten Schritt untersucht werden, ob solche Fusionsproteine als Reporter zum Nachweis der Yop Translokation geeignet wären.

Die *Yersinia enterocolitica* Stämme WA-P und WA-C(pTTSS) wurden jeweils mit den konstruierten Expressionsvektoren pACYC184yopE<sub>138</sub>cre und pACYC184yopE<sub>52</sub>cre transformiert. Der Stamm WA-C(pTTSS) besitzt nicht das Originalpathogenitätsplasmid. Die für den Aufbau des Typ III-Sekretionssystem notwendigen Gene wurden auf einem anderen Plasmid eingeführt (123), so dass das Translokationssystem funktionsfähig ist, die zytotoxischen Effektor-Yops jedoch fehlen. Es konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine YopE<sub>138</sub>Cre und YopE<sub>52</sub>Cre in BHI Medium sekretiert werden (siehe Ergebnisse 3.3, Abbildung 13).

Untersuchungen zur Translokation der Fusionsproteine ergaben Unterschiede in der Translokationseffizienz der beiden *Yersinia*-Stämme WA-P(yopE<sub>138</sub>cre) und WA-C(pTTSS yopE<sub>138</sub>cre). Mittels Westernblot Analysen von Kernextrakten infizierter CV1-5B Fibroblasten (Ergebnisse 3.4, Abb. 14) konnte gezeigt werden, dass WA-C(pTTSS yopE<sub>138</sub>cre) mehr YopE<sub>138</sub>Cre Protein transloziert als WA-P(yopE<sub>138</sub>cre). Dies entspricht den Ergebnissen der Infektionsversuche mit HeLa Zellen, die zuvor transient mit dem Reportergenkonstrukt transfiziert worden waren (siehe Ergebnisse 3.6.1.1). 24 Stunden nach Infektion mit WA-P(yopE<sub>138</sub>cre) waren die HeLa Zellen zum Großteil abgerundet und es

konnten kaum  $\beta$ -Galaktosidase positive Zellen beobachtet werden. In der Fraktion der HeLa Zellen, die mit WA-C(pTTSS yopE<sub>138</sub>cre) infiziert wurden, waren keine ausgeprägten Veränderungen der Zellstruktur erkennbar sowie vereinzelt  $\beta$ -Galaktosidase positive Zellen nachweisbar.

Die geringere Translokationseffizienz von WA-P(yopE<sub>138</sub>cre) könnte damit zu erklären sein, dass zusätzlich zu YopE<sub>138</sub>Cre weitere Effektor-Yops sekretiert und transloziert werden. Diese üben zudem eine zytotoxische Wirkung auf die Zielzelle aus, so dass es zum Abrunden und Absterben der Zellen kommt.

Anhand der Westernblot-Analysen von Zellkernextrakten infizierter CV1-5B Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein YopE<sub>52</sub>Cre im Vergleich zu YopE<sub>138</sub>cre quantitativ besser transloziert wird. Die Fibroblasten wurden mit den Stämmen WA-C(pTTSS yopE<sub>138</sub>cre) und WA-C(pTTSS yopE<sub>52</sub>cre) infiziert, die Zellkernextrakte nach 4 und 24 Stunden gewonnen (siehe Ergebnisse 3.5). In Abbildung 15 ist zu sehen, dass die Proteinbande von YopE<sub>52</sub>Cre um ein mehrfaches stärker ist als die Bande von YopE<sub>138</sub>Cre, und dass sich 4 Stunden nach Infektion mehr Fusionsprotein im Zellkern befindet als 24 Stunden nach Infektion.

Entsprechend den Untersuchungen der Translokation von YopE-DHFR Hybriden von Feldman et al (46) könnte es beim YopE-Cre Fusionsprotein auch sein, dass das YopE<sub>138</sub>Cre Protein partiell in gefalteter Form vorliegt, sodass es zwar den Sekretionskanal nicht blockiert, aber im Vergleich zu YopE<sub>52</sub>Cre weniger effizient sekretiert wird.

Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektion wurde in den Zellkernen der Fibroblasten weniger Fusionsprotein nachgewiesen als zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Infektion. Dies könnte damit zu erklären sein, dass die Degradation des Fusionsproteins im Verlauf der ersten 24 Stunden nach Translokation in der Zielzelle beginnen könnte.

### 4.3 *In vitro* Infektionen und Nachweismethoden

Zunächst wurden Infektionsversuche mit HeLa Zellen, die zuvor mit dem Reporter-gen pEFlacZneoflox transient transfiziert worden waren, durchgeführt. Die Zellen wurden mit den *Yersinia* Stämmen mit einer MOI von 50, und Infektionsdauer von 4 Stunden infiziert. 24 Stunden nach Infektion wurde die  $\beta$ -Galaktosidase Expression der Zellen mittels x-Gal Färbung der Zellen nachgewiesen. Ausschließlich bei den Zellen, die mit pEFlacZneoflox transfiziert wurden und bei denen die Translokation von YopE-Cre stattgefunden hat, kam es zu einem Cre vermittelten Rekombinationsereignis und damit auch zur Expression von  $\beta$ -Galaktosidase. Bei allen durchgeführten Versuchen fiel auf, dass bei der Infektion mit WAC(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) mehr blaue Zellen zu finden waren, als bei der Infektion mit WAC(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre). Allerdings schwankte die Menge der beobachteten blauen Zellen sehr. Auch in den zur Kontrolle der Transfektion durchgeführten Kotransfektionen mit den Expressionsvektoren pEFlacZneoflox und pBKEFNLS-Cre fielen erhebliche Schwankungen in der Menge der Rekombinationsereignisse auf.

Die schwankende Anzahl der beobachteten blauen Zellen in den Infektionsversuchen ist wahrscheinlich mit der inkonstanten Transfektionseffizienz zu begründen. Zellen, bei denen es zwar zur Translokation von YopE-Cre, jedoch nicht zur Transfektion mit dem Reporter-gen gekommen war, wurden in der x-Gal Färbung nicht erfasst.

Dieses System eignet sich somit nicht zum quantitativen Nachweis der Rekombinationseffizienz der Fusionsproteine. Die nachfolgenden *in vitro* Infektionsversuche wurden im CV1-5B Fibroblastenmodell, das sich für die Detektion von Cre-Aktivität bewährt hat, durchgeführt (71, 129).

Es wurden zwei Quantifizierungsmethoden zur Auswertung der Infektionsversuche angewandt. Ausgewertet wurde mittels Auszählung und durch FACS-Analyse. Die Quantifizierungsmethode durch FACS-Analyse wurde in dieser Arbeit etabliert. Die Versuche wurden im CV1-5B Fibroblastenmodell durchgeführt. Bei beiden verwendeten Auswertungsmethoden konnte bei den

Infektionen mit WAC(pTTSSyopE<sub>52</sub>cre) mehr Fibroblastenzellen mit  $\beta$ -Galaktosidase-Expression detektiert werden als bei Infektionen mit WAC(pTTSSyopE<sub>138</sub>cre).

Die Quantifizierung durch FACS-Analyse hatte gegenüber dem Auszählen den Vorteil des deutlich geringeren Zeitaufwandes. Vorteil des Auszählens war, dass kein Hintergrund auftrat und damit die Sensitivität höher war.

#### 4.4 Cre-lox P als Reportersystem zum Nachweis der Translokation von Yop's

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das YopE-Cre System zur Untersuchung der Translokation von Yops prinzipiell geeignet ist. Es wurden damit Grundlagen für in der Zwischenzeit durchgeführte Arbeiten zur Quantifizierung und Optimierung des Systems gelegt. In den nachfolgenden Arbeiten von M. Köberle (132) zeigte die Verwendung des *Yersinien*-Stammes E40 (Serotyp O:9) eine höhere Rekombinationseffizienz. Infektionsversuche im Maus-Modell jedoch zeigten, dass das System *in vivo* nicht geeignet ist. Ein großer Nachteil des Systems ist, dass die Rekombinaseaktivität erst nach 24 Stunden detektierbar ist.

Briones et al (28) entwickelten ein SopE-Cre Reportersystem zur Untersuchung von Proteintransfer über das Typ III-Sekretionssystem von *Salmonella enterica* (serovar Thyphimurium). Auch diese Untersuchungen ergaben, dass das Cre-System als Reportersystem zum Nachweis von Proteintranslokation für *in vivo* Modelle nicht geeignet ist.

Zwischenzeitlich wurde in unterschiedlichen Arbeiten ein neues Reportersystem, basierend auf TEM-1- $\beta$ -Lactamase entwickelt, das die Injektion von Typ III-Effektoren in Wirtszellen durch *E. coli* (30), *Samonella enterica* (51) sowie *Yersinia pestis* (79) darstellt.

Das System besteht aus TTSS-Effektoren fusioniert an TEM-1 $\beta$ -Lactamase von *E.coli*. Die infizierten Zellen werden mit CCF2-AM, die veresterte Form von CCF2 gefärbt. Dieses wird nach Aufnahme in die Zelle von der endogenen

Esterase zu CCF2 gespalten. Die Injektion von Effektor-TEM-1 $\beta$ -Lactamase Fusionsproteinen kann über die Umsetzung des fluoreszenten  $\beta$ -Lactamase-Substrats CCF2 analysiert werden. CCF2 fluoresziert im grünen Spektralbereich. TEM- $\beta$ -Lactamase spaltet CCF2 und führt zur Fluoreszenz des gespaltenen CCF2 im blauen Spektralbereich. Dieses Reportersystem ermöglicht den spezifischen Nachweis des injizierten Effektor-TEM-Fusionsproteins bei *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen.

Marketon et al (79) verwendeten für Infektionsversuche im Maus Modell mit *Yersinia pestis* einen Expressionsvektor, der das Fusionsprotein YopM- $\beta$ -Lactamase (YopM-bla) exprimierte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Yops vorwiegend in Granulozyten, dendritische Zellen und Makrophagen injiziert werden, während die Injektion in T- und B-Lymphozyten eher selten vorkommt. Das Untersuchungszeitfenster nach Infektion der Mäuse mit *Yersinia pestis* lag bei 24 bis 48 Stunden nach Infektion. Bei Untersuchungen zur Sekretion der YopM-bla Fusionsproteine konnte erst nach 24 Stunden und bis zu 48 Stunden nach Infektion der Mäuse die Sekretion von YopM-bla detektiert werden. Bei Untersuchungen zu Zeitpunkten, die länger als 48 Stunden post Infektion lagen, waren die meisten der Mäuse verstorben, oder die Milzzellen waren stark nekrotisch oder apoptotisch.

Geddes et al (51) verwendete TEM- $\beta$ -Laktamase (bla) fusioniert an 6 unterschiedliche Effektoren der zwei Typ III-Sekretionsapparate von *Salmonella enterica*, SPI-1 und SPI-2 TTSS (*salmonella pathogenicity island 1* und *2*) für *in vitro* und *in vivo* Infektionsuntersuchungen. Hierbei zeigten Geddes et al, dass nach Infektion in Mäuse *Salmonella* die Effektor-bla Fusionsproteine über das SPI-1 TTSS vorwiegend in Granulozyten der Milz injiziert.

Aufbauend auf den in der vorliegenden Arbeit konstruierten Expressionsvektoren und den nachfolgenden Arbeiten von M. Köberle wurde auch für *Yersinia enterocolitica* ein auf TEM-1- $\beta$ -Lactamase basierendes Reportersystem etabliert (133), mit dem unter anderem gezeigt werden konnte, dass nach *Y. enterocolitica* Infektion Yop Translokation primär in Granulozyten und B-Zellen stattfindet.

Nachteil des TEM-1- $\beta$ -Lactamase Systems ist, dass kein Nachweis der injizierten Effektoren-Fusionsproteine *in situ* möglich ist.

Ein Ausblick für weitere Arbeiten wäre daher die Entwicklung neuer Farbstoffe, die sich auch für *in situ* Untersuchungen eignen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass basierend auf diesen ersten, hier durchgeführten Arbeiten die Pionierarbeiten für die Entwicklung eines geeigneten Reportersystems zum Nachweis der *Yersinia enterocolitica* Yop Translokation gelegt wurden.

## 5 Zusammenfassung

Humanpathogene *Yersinien* unterlaufen die primären Abwehrmechanismen des Wirtes, indem sie eine Gruppe von Virulenzfaktoren, die sogenannten *Yersinia outer proteins* (Yop) E, T, H, M, O und P mittels eines Typ III-Sekretionssystems (TTSS) direkt in Wirtszellen translozieren. Diese Yops inhibieren Wirtszellfunktionen und nehmen so negativen Einfluss auf die Immunabwehr.

In diversen Studien wurden zum besseren Verständnis, wie die Yop Translokation durch das TTSS von *Yersinien* funktioniert, verschiedene Reportersysteme entwickelt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein Reportersystem, basierend auf einem Cre-YopE Fusionsprotein und lox P flankiertem Reportergenkonstrukt zu entwickeln, um in Infektionsexperimenten zunächst von kultivierten Zellen diejenigen Zellen zu erkennen, in die die Yops transloziert werden. Langfristig sollte dieses System dazu dienen, Yop Translokation im Mausinfektionsmodell nachzuweisen.

Das Prinzip des Systems ist es, einen *Yersinien*-Stamm zu generieren, der nach Kontakt mit Zellen ein YopE-Cre Fusionsprotein in die Zelle injiziert. Die translozierte Cre Rekombinase deletiert dann ein Genfragment, so dass ein konstitutiv aktiver Promotorbereich in die Nähe eines für  $\beta$ -Galaktosidase kodierenden Genabschnitts gebracht wird. Nach Expression von  $\beta$ -Galaktosidase kann diese durch Färbung mit x-Gal, wobei eine Blaufärbung entsteht, nachgewiesen werden kann.

Es wurden Expressionsvektoren bestehend aus N-terminalen YopE Fragmenten (YopE<sub>138</sub>, YopE<sub>52</sub>) und einer C-terminalen NLSCre Domäne konstruiert. Durch transiente Transfektion von Zellen mit diesen Vektoren konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität der Cre-Rekombinase durch die Fusion an die YopE Fragmente nicht beeinträchtigt wird.

Die *Yersinien*-Stämme WA-P und WA-CpTTSS (Serotyp O:8, Typ III-Sekretionssystem, aber keine Effektor-Yops) wurden mit den konstruierten Expressionsvektoren pACYC184yopE<sub>52</sub>Cre und pACYC184yopE<sub>138</sub>Cre transformiert und anschließend die Sekretion und



Translokation der YopE-Cre Hybride beider Reporterstämme untersucht. Die Sekretion und Translokation der Fusionsproteine konnte für beide Reporterstämme nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich, dass der Reporterstamm WA-C(pTTSS) eine höhere Sekretions- und Translokationseffizienz aufweist als der Reporterstamm WA-P, der zusätzlich zum YopE-Cre Fusionsprotein weitere zytotoxische Effektor-Yops sekretiert.

In vergleichenden Untersuchungen der Translokation der YopE-Cre Hybride konnte gezeigt werden, dass YopE<sub>52</sub>Cre besser transloziert wird als YopE<sub>138</sub>Cre. Dies entspricht den Untersuchungen von Feldmann et al mit YopE-DHFR Hybriden (46).

Zur quantitativen Auswertung der Translokation von YopE-Cre in Zellen nach *Yersinien*-Infektion wurde weiterhin eine auf Durchflusszytometrie basierende Methode etabliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit ein Reportersystem etabliert werden konnte, das zur Untersuchung der Translokation von Yops prinzipiell geeignet ist. Allerdings ist der Anteil an Zellen, in denen Yop Translokation mit Hilfe des YopE-Cre Systems nach Infektion nachweisbar ist, mit weniger als 10 % relativ gering. In den nachfolgenden Arbeiten von Martin Köberle (132) konnte das System weiter optimiert werden, erwies sich aber für *in vivo* Untersuchungen als unzureichend.

Auch Untersuchungen von Briones et al (28) zum Proteintransfer über das TTSS von *Salmonella enterica* basierend auf einem SopE-Cre Reportersystem bestätigten retrospektiv, dass das Cre-System als Reportersystem zum Nachweis von Proteintranslokation durch TTSS-Systeme für *in vivo* Modelle wenig geeignet ist.

## 6 Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
A	Adenin
<i>a. bidest.</i>	<i>aqua bidestillata</i>
<i>a. dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
AK	Antikörper
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5´-Triphosphat
BA	Bisacrylamid
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BHI	<i>brain heart infusion</i>
C	Cytosin
Ca	Calcium
CaCl	Calciumchlorid
cAMP	cyklisches Adenosin-Monophosphat
Cl	Chlor
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
Cre	<i>causes recombination</i> (Enzymaktivität)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxy nucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol, Threo 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

ECL	<i>enhanced chemo luminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,N'- Tetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAP	GTPase Aktivierendes Protein
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
H	<i>hydrogen</i> (Wasserstoff)
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-HydroxyEthyl)-Piperazin-1-Ethan-Sulfonsäure
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasser
HPI	<i>high pathogenicity island</i>
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
KCl	Kaliumchlorid
lacZ	β-Galaktosidase
LB	Luria Bertani (Medium)
Lcr	<i>low Calcium response</i>
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
MEM	<i>modified Eagles medium</i>

Mg	Magnesium
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonatMinute
M-Zelle	<i>microfold-Zelle</i> oder <i>microfold-Zelle</i>
N	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaI <sup>R</sup>	Nalidixin-Resistenz
NaOH	Natriumhydroxid
Neo <sup>R</sup>	Neomycin-Resistenz
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
O	<i>Oxygen</i> (Sauerstoff)
OD	<i>optical density</i> (Optische Dichte)
ORF	<i>open reading frame</i>
ori	<i>origin of replication</i>
Ova	Ovalbumin
PAGE	<i>polyacrylamid gel electrophoresis</i>
PB	PBS-BSA
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PBT	PBS-BSA-Tergitol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMN	polymorphonucleare Neutrophile
PNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat Dinatrium
PP	Peyer'sche Plaques
PVDF	Polyvinylidifluorid
<i>pYV</i>	<i>plasmid Yersinia virulence</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycated end products</i>
Rho	Ras-Homolog

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SDS	<i>sodium-dodecylsulfate</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
sodA	Superoxid-Dismutase A
Spec <sup>R</sup>	Spectinomycin-Resistenz
SPI-1	<i>salmonella pathogenicity island 1</i>
SPI-2	<i>salmonella pathogenicity island 2</i>
Syc	<i>specific yop chaperone</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
T4	<i>T4 Bacteriophage</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Tri-Chlorine acidic Acid
Tc <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenz
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tk	Thymidinkinase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTSS	<i>type three secretion system</i>
Tyr	Tyrosin
UV	UltraViolet
v/v	Volumen pro Volumen
Vis	<i>visible</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
x-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid

Y.	<i>Yersinia</i>
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>

### Einheiten und Größenordnungen

Å	Angström
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunden
kb	Basenpaare x 1000
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
m	milli
mA	Milliampere
μ	mikro
F	Farad (SI Einheit für elektrische Kapazität)
M	Mol/l-1, molar
min	Minuten
nm	nanometer
Ω	Ohm
rpm	<i>rounds per minute</i>
sec	Sekunden
U	<i>units</i> (Einheit)

## 7 Literatur

1. **Ahvonon, P. and K. Dickhoff.** 1974. Uveitis, episcleritis and conjunctivitis associated with *Yersinia* infection. Acta Ophthalmol. Suppl. Copenh. **123**:209-212.
2. **Aili, M., M. Telepnev, B. Hallberg, H. Wolf-Watz, and R. Rosqvist.** 2003. In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity. Microb. Pathog. **34**:297-308.
3. **Aleksic, S. and J. Bockemühl.** 1990. Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. Immun. Infekt. **18**:178-185.
4. **Anderson, D. M. and O. Schneewind.** 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. Science **278**:1140-1143.
5. **Arencibia, I., N. C. Suarez, H. Wolf-Watz, and K. G. Sundqvist.** 1997. *Yersinia* invasin, a bacterial beta1-integrin ligand, is a potent inducer of lymphocyte motility and migration to collagen type IV and fibronectin. J. Immunol. **159**:1853-1859.
6. **Arnold, R., J. Scheffer, B. Konig, and W. Konig.** 1993. Effects of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cytokine gene expression and release from human polymorphonuclear granulocytes and epithelial (HEp-2) cells. Infect. Immun. **61**:2545-2552.
7. **Autenrieth, I. B., M. Beer, P. Hantschmann, S. Preger, U. Vogel, B. Heymer, and J. Heesemann.** 1993. The cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in different inbred strains of mice: evidence for an important role of T lymphocytes. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis **278**:383-395.
8. **Autenrieth, I. B., E. Bohn, M. Beer, S. Preger, G. Heinze, and J. Heesemann.** 1995. Role of T-helper-cell subtypes and cytokines in immunity to *Yersinia enterocolitica* in susceptible and resistant strains of mice. Contrib. Microbiol. Immunol. **13**:203-206.
9. **Autenrieth, I. B., E. Bohn, J. H. Ewald, and J. Heesemann.** 1995. Deferoxamine B but not deferoxamine G1 inhibits cytokine production in murine bone marrow macrophages. J Infect Dis **172**:490-496.
10. **Autenrieth, I. B. and R. Firsching.** 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. J Med Microbiol **44**:285-294.
11. **Autenrieth, I. B., P. Hantschmann, B. Heymer, and J. Heesemann.** 1993. Immunohistological characterization of the cellular immune response against

- Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiol.* **187**:1-16.
12. **Autenrieth, I. B., V. Kempf, T. Sprinz, S. Preger, and A. Schnell.** 1996. Defence mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. *Infect Immun* **64**:1357-1368.
  13. **Autenrieth, I. B., R. Reissbrodt, E. Saken, R. Berner, U. Vogel, W. Rabsch, and J. Heesemann.** 1994. Desferrioxamine-promoted virulence of *Yersinia enterocolitica* in mice depends on both desferrioxamine type and mouse strain. *J Infect Dis* **169**:562-567.
  14. **Autenrieth, I. B., U. Vogel, S. Preger, B. Heymer, and J. Heesemann.** 1993. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T- cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect Immun* **61**:2585-2595.
  15. **Barz, C., T. N. Abahji, K. Trulzsch, and J. Heesemann.** 2000. The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* **482**:139-143.
  16. **Birnboim, H. C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* **7**:1513-1523.
  17. **Birtalan, S. and P. Ghosh.** 2001. Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nat. Struct. Biol.* **8**:974-978.
  18. **Black, D. S. and J. B. Bliska.** 1997. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J.* **16**:2730-2744.
  19. **Black, D. S. and J. B. Bliska.** 2000. The RhoGAP activity of the *Yersinia* pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol. Microbiol.* **37**:515-527.
  20. **Bliska, J. B. and D. S. Black.** 1995. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia* pseudotuberculosis tyrosine phosphatase. *Infect. Immun.* **63**:681-685.
  21. **Bliska, J. B. and S. Falkow.** 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:3561-3565.
  22. **Boland, A., M. P. Sory, M. Iriarte, C. Kerbouch, P. Wattiau, and G. R. Cornelis.** 1996. Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J.* **15**:5191-5201.



23. **Bottone, E. J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:257-276.
24. **Bouza, E., A. Dominguez, M. Meseguer, L. Buzon, D. Boixeda, M. J. Revillo, L. de Rafael, and J. Martinez Beltran.** 1980. *Yersinia enterocolitica* Septicemia. *Am. J Clin. Pathol.* **74**:404-409.
25. **Boyd, A. P., I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 2000. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J. Bacteriol.* **182**:4811-4821.
26. **Brenner, D. J.** 1979. Speciation in *Yersinia*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **5**:33-43.
27. **Brett, S. J., A. V. Mazurov, I. G. Charles, and J. P. Tite.** 1993. The invasin protein of *Yersinia* spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins. *Eur. J. Immunol.* **23**:1608-1614.
28. **Briones, G., D. Hofreuter, and J. E. Galan.** 2006. Cre reporter system to monitor the translocation of type III secreted proteins into host cells. *Infect. Immun.* **74**:1084-1090.
29. **Carter, P. B.** 1975. Animal model of human disease. *Yersinia* enteritis. Animal model: oral *Yersinia enterocolitica* infection of mice. *Am J Pathol.* **81**:703-706.
30. **Charpentier, X. and E. Oswald.** 2004. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J. Bacteriol.* **186**:5486-5495.
31. **China, B., M. P. Sory, B. T. N'Guyen, M. de Bruyere, and G. R. Cornelis.** 1993. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect. Immun.* **61**:3129-3136.
32. **Clark, M. A., B. H. Hirst, and M. A. Jepson.** 1998. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* **66**:1237-1243.
33. **Conlan, J. W.** 1997. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **65**:630-635.
34. **Cornelis, G., Y. Laroche, G. Balligand, M. P. Sory, and G. Wauters.** 1987. *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev Infect Dis* **9**:64-87.
35. **Cornelis, G. R.** 2002. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* **158**:401-408.

36. **Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory, and I. Stainier.** 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol Biol. Rev* **62**:1315-1352.
37. **Cornelis, G. R. and G. F. Van.** 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54:735-74**.:735-774.
38. **Cover, T. L. and R. C. Aber.** 1989. *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* **321**:16-24.
39. **Craig, N. L.** 1988. The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* **22:77-105**.:77-105.
40. **Delor, I. and G. R. Cornelis.** 1992. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* **60**:4269-4277.
41. **Denecker, G., W. Declercq, C. A. Geuijen, A. Boland, R. Benabdillah, M. van Gurp, M. P. Sory, P. Vandenabeele, and G. R. Cornelis.** 2001. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J. Biol. Chem.* **276**:19706-19714.
42. **Devenish, J. A. and D. A. Schiemann.** 1981. HeLa cell infection by *Yersinia enterocolitica*: evidence for lack of intracellular multiplication and development of a new procedure for quantitative expression of infectivity. *Infect. Immun.* **32**:48-55.
43. **Dube, P. H., S. A. Handley, P. A. Revell, and V. L. Miller.** 2003. The *roxA* mutant of *Yersinia enterocolitica* displays differential degrees of virulence depending on the route of infection. *Infect. Immun.* **71**:3512-3520.
44. **Ennis, E., R. R. Isberg, and Y. Shimizu.** 1993. Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial beta 1 integrin ligand invasins. *J. Exp. Med.* **177**:207-212.
45. **Fallman, M., K. Andersson, S. Hakansson, K. E. Magnusson, O. Stendahl, and H. Wolf-Watz.** 1995. *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect. Immun.* **63**:3117-3124.
46. **Feldman, M. F., S. Muller, E. Wuest, and G. R. Cornelis.** 2002. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol. Microbiol.* **46**:1183-1197.
47. **Frederiksen, W.** 1964. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella X*). *Proc 14th Scand Congr Path Microbiol* 103-104.
48. **Frithz-Lindsten, E., R. Rosqvist, L. Johansson, and A. Forsberg.** 1995. The chaperone-like protein YerA of *Yersinia pseudotuberculosis* stabilizes YopE in the cytoplasm but is dispensable for targeting to the secretion loci. *Mol Microbiol.* **16**:635-647.

49. **Galan, J. E. and A. Collmer.** 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**:1322-1328.
50. **Galyov, E. E., S. Hakansson, A. Forsberg, and H. Wolf-Watz.** 1993. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**:730-732.
51. **Geddes, K., F. Cruz, and F. Heffron.** 2007. Analysis of cells targeted by *Salmonella* type III secretion in vivo. *PLoS. Pathog.* **3**:e196.
52. **Grutzkau, A., C. Hanski, H. Hahn, and E. O. Riecken.** 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**:1011-1015.
53. **Guan, K. L. and J. E. Dixon.** 1990. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* **249**:553-556.
54. **Guo, F., D. N. Gopaul, and G. D. van Duyne.** 1997. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* **389**:40-46.
55. **Haag, H., K. Hantke, H. Drechsel, I. Stojiljkovic, G. Jung, and H. Zähler.** 1993. Purification of Yersiniabactin: a siderophore and a possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol* **139**:2159-2165.
56. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
57. **Hanski, C., U. Kutschka, H. P. Schmoranzer, M. Naumann, A. Stallmach, H. Hahn, H. Menge, and E. O. Riecken.** 1989. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect Immun.* **57**:673-678.
58. **Hanski, C., M. Naumann, A. Grutzkau, G. Pluschke, B. Friedrich, H. Hahn, and E. O. Riecken.** 1991. Humoral and cellular defense against intestinal murine infection with *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **59**:1106-1111.
59. **He, S. Y.** 1997. Hrp-controlled interkingdom protein transport: learning from flagellar assembly? *Trends Microbiol.* **5**:489-495.
60. **Heesemann J. and Grüter L.** 1987. Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **40**:37-41.
61. **Heesemann, J., J. de Koning, and J. A. A. Hoogkamp-Korstanje.** 1988. Folgeerkrankungen nach Infektion mit enteropathogenen Yersinien: Neue diagnostische Methoden unter Berücksichtigung von Virulenzantigenen. *Immun. Infekt.* **16 (Sonderheft 1)**,18.

62. **Heesemann, J., K. Gaede, and I. B. Autenrieth.** 1993. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis. *APMIS* **101**:417-429.
63. **Heesemann, J., U. Gross, N. Schmidt, and R. Laufs.** 1986. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect Immun* **54**:561-567.
64. **Hoess, R., K. Abremski, S. Irwin, M. Kendall, and A. Mack.** 1990. DNA specificity of the Cre recombinase resides in the 25 kDa carboxyl domain of the protein. *J. Mol. Biol.* **216**:873-882.
65. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:379-433.
66. **Iriarte, M. and G. R. Cornelis.** 1998. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol. Microbiol.* **29**:915-929.
67. **Iriarte, M., J. C. Vanooteghem, I. Delor, R. Diaz, S. Knutton, and G. R. Cornelis.** 1993. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **9**:507-520.
68. **Jacobi, C. A., A. Roggenkamp, A. Rakin, R. Zumbihl, L. Leitritz, and J. Heesemann.** 1998. In vitro and in vivo expression studies of yopE from *Yersinia enterocolitica* using the gfp reporter gene. *Mol. Microbiol.* **30**:865-882.
69. **Juris, S. J., A. E. Rudolph, D. Huddler, K. Orth, and J. E. Dixon.** 2000. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:9431-9436.
70. **Kampik, D., R. Schulte, and I. B. Autenrieth.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections. *Infect Immun.* 2000. May. ;68. (5. ):2484. -92. **68**:2484-2492.
71. **Kellendonk, C., F. Tronche, A. P. Monaghan, P. O. Angrand, F. Stewart, and G. Schutz.** 1996. Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res.* **24**:1404-1411.
72. **Koornhof, H. J., R. A. Smego, Jr., and M. Nicol.** 1999. Yersiniosis. II: The pathogenesis of *Yersinia* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:87-112.
73. **Kubori, T., A. Sukhan, S. I. Aizawa, and J. E. Galan.** 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:10225-10230.

74. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
75. **Leong, J. M., R. S. Fournier, and R. R. Isberg.** 1990. Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J* **9**:1979-1989.
76. **Leung, K. Y., B. S. Reisner, and S. C. Straley.** 1990. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* **58**:3262-3271.
77. **Leung, K. Y. and S. C. Straley.** 1989. The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J. Bacteriol.* **171**:4623-4632.
78. **Lundgren, E., N. Carballeira, R. Vazquez, E. Dubinina, H. Branden, H. Persson, and H. Wolf-Watz.** 1996. Invasin of *Yersinia pseudotuberculosis* activates human peripheral B cells. *Infect. Immun.* **64**:829-835.
79. **Marketon, M. M., R. W. DePaolo, K. L. DeBord, B. Jabri, and O. Schneewind.** 2005. Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* **309**:1739-1741.
80. **Miller, V. L., B. B. Finlay, and S. Falkow.** 1988. Factors essential for the penetration of mammalian cells by *Yersinia*. *Curr Top Microbiol Immunol* **138**:15-39.
81. **Mills, S. D., A. Boland, M. P. Sory, P. van der Smissen, C. Kerbouch, B. B. Finlay, and G. R. Cornelis.** 1997. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:12638-12643.
82. **Monack, D. M., J. Meccas, N. Ghori, and S. Falkow.** 1997. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:10385-10390.
83. **Mullis, K. B. and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.
84. **Pawel-Rammingen, U., M. V. Telepnev, G. Schmidt, K. Aktories, H. Wolf-Watz, and R. Rosqvist.** 2000. GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol. Microbiol.* **36**:737-748.
85. **Pepe, J. C. and V. L. Miller.** 1993. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:6473-6477.

86. **Pierson, D. E. and S. Falkow.** 1990. Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences. *Infect Immun* **58**:1059-1064.
87. **Rabson, A. R., A. F. Hallett, and H. J. Koornhof.** 1975. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Infect. Dis.* **131**:447-451.
88. **Rakin, A. and J. Heesemann.** 1995. Virulence-associated *fyuA/irp2* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* biotype 1B carries a novel insertion sequence IS1328. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**:287-292.
89. **Ramamurthy, T., K. Yoshino, X. Huang, N. G. Balakrish, E. Carniel, T. Maruyama, H. Fukushima, and T. Takeda.** 1997. The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. *Microb. Pathog.* **23**:189-200.
90. **Revell, P. A. and V. L. Miller.** 2000. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol. Microbiol.* **35**:677-685.
91. **Revell, P. A. and V. L. Miller.** 2001. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:159-164.
92. **Robins-Browne, R. M., C. J. Jansen van Vuuren, C. S. Still, M. D. Miliotis, and H. J. Koornhof.** 1979. The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis. *Contrib. Microbiol Immunol.* **5**:324-328.
93. **Roggenkamp, A., T. Bittner, L. Leitritz, A. Sing, and J. Heesemann.** 1997. Contribution of the Mn-cofactored superoxide dismutase (*SodA*) to the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O8. *Infect. Immun.* **65**:4705-4710.
94. **Roggenkamp, A., H. R. Neuberger, A. Flugel, T. Schmoll, and J. Heesemann.** 1995. Substitution of two histidine residues in *YadA* protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol. Microbiol.* **16**:1207-1219.
95. **Roggenkamp, A., K. Ruckdeschel, L. Leitritz, R. Schmitt, and J. Heesemann.** 1996. Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein *YadA* of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect. Immun.* **64**:2506-2514.
96. **Rosqvist, R., I. Bolin, and H. Wolf Watz.** 1988. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the *Yop2b* protein. *Infect Immun* **56**:2139-2143.
97. **Rosqvist, R., A. Forsberg, and H. Wolf Watz.** 1991. Microinjection of the *Yersinia* *YopE* cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Biochem. Soc. Trans.* **19**:1131-1132.

98. **Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, S. Schubert, and J. Heesemann.** 1996. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun.* **64**:724-733.
99. **Salinovich, O. and R. C. Montelaro.** 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**:341-347.
100. **Sarker, M. R., C. Neyt, I. Stainier, and G. R. Cornelis.** 1998. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J. Bacteriol.* **180**:1207-1214.
101. **Sauer, B., M. Whealy, A. Robbins, and L. Enquist.** 1987. Site-specific insertion of DNA into a pseudorabies virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**:9108-9112.
102. **Schleifstein, J. I. and M. B. Coleman.** 1939. An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Pasteurella pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *NY State J Med* **39**:1749-1753.
103. **Schreiber, E., P. Matthias, M. M. Muller, and W. Schaffner.** 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**:6419.
104. **Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson, and I. B. Autenrieth.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* 2000. Aug. ;14. (11. ):1471. -84. **14**:1471-1484.
105. **Schulte, R., S. Kerneis, S. Klinke, H. Bartels, S. Preger, J. P. Kraehenbuhl, E. Pringault, and I. B. Autenrieth.** 2000. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol.* **2**:173-185.
106. **Schulte, R., P. Wattiau, E. L. Hartland, R. M. Robins Browne, and G. R. Cornelis.** 1996. Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* **64**:2106-2113.
107. **Schulze Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, T. Kirsch, B. Swoboda, C. Bull, S. Goodman, and F. Emmrich.** 1993. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect. Immun.* **61**:2513-2519.
108. **Shao, F.** 2008. Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**:21-29.

109. **Shepel, M., J. Boyd, J. Luider, and A. P. Gibb.** 2001. Interaction of *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* with platelets. *J. Med. Microbiol.* **50**:1030-1038.
110. **Simonet, M., S. Richard, and P. Berche.** 1990. Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect Immun* **58**:841-845.
111. **Sing, A., A. Roggenkamp, A. M. Geiger, and J. Heesemann.** 2002. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* **168**:1315-1321.
112. **Skrzypek, E., C. Cowan, and S. C. Straley.** 1998. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol. Microbiol.* **30**:1051-1065.
113. **Smego, R. A., J. Frean, and H. J. Koornhof.** 1999. Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague *Yersinia* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:1-15.
114. **Snellings, N. J., M. Poppek, and L. E. Lindler.** 2001. Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon. *Infect. Immun.* **69**:4627-4638.
115. **Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:11998-12002.
116. **Sory, M. P. and G. R. Cornelis.** 1994. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol.* **14**:583-594.
117. **Sternberg, N., S. Austin, D. Hamilton, and M. Yarmolinsky.** 1978. Analysis of bacteriophage P1 immunity by using lambda-P1 recombinants constructed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**:5594-5598.
118. **Sternberg, N. and D. Hamilton.** 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* **150**:467-486.
119. **Sternberg, N., B. Sauer, R. Hoess, and K. Abremski.** 1986. Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J. Mol. Biol.* **20**;187:197-212.
120. **Stolk-Engelaar, V. M. and J. A. Hoogkamp-Korstanje.** 1996. Clinical presentation and diagnosis of gastrointestinal infections by *Yersinia enterocolitica* in 261 Dutch patients. *Scand. J. Infect. Dis.* **28**:571-575.



121. **Tamm, A., A.-M. Tarkkanen, P. K. Korhonen, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 1993. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **10**:995-1011.
122. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:4350-4354.
123. **Trulzsch, K., A. Roggenkamp, M. Aepfelbacher, G. Wilharm, K. Ruckdeschel, and J. Heesemann.** 2003. Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**:167-177.
124. **Van Gijsegem, F., C. Gough, C. Zischek, E. Niqueux, M. Arlat, S. Genin, P. Barberis, S. German, P. Castello, and C. Boucher.** 1995. The hrp gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol Microbiol.* **15**:1095-1114.
125. **Wattiau, P., B. Bernier, P. Deslee, T. Michiels, and G. R. Cornelis.** 1994. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:10493-10497.
126. **Wattiau, P., S. Woestyn, and G. R. Cornelis.** 1996. Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **20**:255-262.
127. **Welkos, S., A. Friedlander, D. McDowell, J. Weeks, and S. Tobery.** 1998. V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. *Microb. Pathog.* **24**:185-196.
128. **Woestyn, S., M. P. Sory, A. Boland, O. Lequenne, and G. R. Cornelis.** 1996. The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol.* **20**:1261-1271.
129. **Wunderlich, F. T., H. Wildner, K. Rajewsky, and F. Edenhofer.** 2001. New variants of inducible Cre recombinase: a novel mutant of Cre-PR fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility. *Nucleic Acids Res.* **29**:E47.
130. **Yao, T., J. Mecsas, J. I. Healy, S. Falkow, and Y. Chien.** 1999. Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J. Exp. Med.* **190**:1343-1350.
131. **Zumbihl, R., M. Aepfelbacher, A. Andor, C. A. Jacobi, K. Ruckdeschel, B. Rouot, and J. Heesemann.** 1999. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* **274**:29289-29293.

132. **Köberle, M.** 2004. Etablierung eines Reportersystems zum Nachweis der Translokation von Yersinia outer proteins von *Y. enterocolitica* in vitro und in vivo. Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, angefertigt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene.
133. **Köberle, M.** et al. 2009. *Yersinia enterocolitica* Targets Cells of the Innate and Adaptive Immune System by Injection of Yops in a Mouse Infection Model PLoS Pathog. 2009 Aug;5(8):e1000551.

## 8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Erwin Bohn für die gute Betreuung und sein großes Interesse an dem vorliegenden Thema. Dankbar bin ich für seine Motivation und die hilfreichen Kommentare zum Manuskript.

Prof. Dr. Autenrieth danke ich für die interessante Themenstellung, die Anregungen sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Bei Prof. Dr. Lang bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ich danke Martin Köberle, der mit viel Enthusiasmus und Motivation meine Arbeit weitergeführt hat.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern für die vielen hilfreichen Tipps, die Unterstützung bei der Einarbeitung, die Diskussionen sowie die freundliche Atmosphäre, die die Zeit der Laborarbeit angenehm und schön gemacht hat. Besonderer Dank gilt Niclas für das Vertrauen und sein Herausfordern mich aus dem „Mediziner-Denken“ zu lösen. Auch Yvonne danke ich für ihr Zu-mir-Halten, ihre Freundschaft und Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Daniel, für seine unerschöpfliche Geduld, Motivation und konstruktive Hilfe insbesondere bei Word-spezifischen Fragen. Außerdem danke ich meiner Familie für ihr stetiges an mich Glauben.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Sandra Kovačević  
Geburtsdatum: 19.10.1975  
Geburtsort: Ludwigsburg

### Schulausbildung:

1982 – 1986 Grundschole Kornwestheim  
1986 – 1995 Ernst-Sigle-Gymnasium Kornwestheim  
1995 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Berufsausbildung:

1995 – 1998 Kinderkrankenpflegeschole Esslingen  
1998 Abschluss: Staatlich examinierte  
Kinderkrankenschwester

### Studium:

10/1998 Studium der Humanmedizin an der Universität  
Greifswald  
09/2000 Ärztliche Vorprüfung  
03/2001 Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an  
der Universität Tübingen  
03/2002 1. Staatsexamen  
09/2004 2. Staatsexamen  
25/11/2005 3. Staatsexamen

### Praktisches Jahr:

10/2004 – 09/2005 Praktisches Jahr im Klinikum am Steinenberg in  
Reutlingen  
1. Terial: Innere Medizin  
2. Terial: Pädiatrie  
3. Terial: Chirurgie

**Promotionsarbeit:**

09/2005-03/2010

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Thema: „Untersuchung zur Translokation von „*Yersinia outer proteins*“ in Wirtszellen mit Hilfe des YopE-Cre Reportersystems, betreut durch Dr. E. Bohn (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. I. B. Autenrieth)