



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Regulation und Freisetzung des insektiziden
Komplexes in *Yersinia enterocolitica*

Mandy Starke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. W. Liebl

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. T. Fuchs
2. Univ.-Prof. Dr. M. Hofrichter (nur schriftliche Beurteilung)
Technische Universität Dresden
Univ.-Prof. Dr. S. Scherer (nur mündliche Prüfung)
3. Univ.-Prof. Dr. J. Heesemann (i.R.)
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 10.11.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.03.2015 angenommen.

*“Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt, sondern mit einem Fragezeichen.“*

-Hermann Hesse-

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	XII
SUMMARY	XIV
VORWORT	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i>	3
1.1.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	3
1.1.2 Pathogenese und Virulenzfaktoren	4
1.1.3 Temperaturabhängige Regulation von Virulenzfaktoren.....	6
1.1.4 Physiologie von <i>Yersinia</i> bei niedrigen Temperaturen	8
1.2 Die insektizide Pathogenitätsinsel Tc-PAI_{Ye} in <i>Y. enterocolitica</i>	10
1.2.1 LysR-ähnliche Regulatoren	14
1.2.2 Holin/Endolysin	16
1.2.3 Evolution der Tc-PAI	19
1.3 Zielsetzungen dieser Arbeit.....	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Mikrobiologische Methoden.....	25
2.1.1 Bakterienstämme	25
2.1.2 Kulturbedingungen, Antibiotika und Medien	25
2.1.3 Einfrieren von Bakterien	26
2.2 Molekulargenetische Methoden.....	27
2.2.1 Plasmide und Vektoren	27
2.2.2 Präparation von Nukleinsäuren	27
2.2.2.1 Plasmidisolierung	27
2.2.2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Yersinia</i> spp.	27
2.2.2.3 RNA-Isolation aus <i>Yersinia</i> spp.....	28
2.2.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	30
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion.....	31
2.2.4.1 Standard-PCR	31

2.2.4.2	Quantitative Echtzeit-PCR.....	32
2.2.4.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	35
2.2.5	Bestimmung des Transkriptionsstartes	36
2.2.6	Enzymatische Modifikation von DNA	38
2.2.6.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
2.2.6.2	Dephosphorylierung von DNA	39
2.2.6.3	Ligation	39
2.2.7	DNA-Transfer	39
2.2.7.1	Transformation	39
2.2.7.2	Konjugation.....	41
2.2.8	Konstruktion von <i>Yersinia</i> -Stämmen	42
2.2.8.1	Herstellung von Insertionsmutanten	42
2.2.8.2	Herstellung von Reporterstämmen in <i>Y. enterocolitica</i>	42
2.2.8.3	Herstellung von Deletionsmutanten.....	44
2.2.9	Sequenzierung von DNA	45
2.2.10	Bioinformatische Methoden.....	46
2.2.11	Quantifizierung der Biolumineszenz und Fluoreszenz <i>in vitro</i>	46
2.2.11.1	Visualisierung der Genexpression mit dem <i>Xenogen In Vivo Imaging System</i>	46
2.2.11.2	Quantifizierung der Genexpression mit dem <i>Wallac Victor³</i>	47
2.2.11.3	Bestimmung des Gehaltes an ATP	48
2.2.11.4	Fluoreszenzmikroskopie	48
2.3	Proteinchemische Methoden.....	49
2.3.1	Präparation von Proteinen aus <i>Y. enterocolitica</i>	49
2.3.1.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Flüssigkultur	49
2.3.1.2	Isolierung von Überstandsproteinen	49
2.3.2	Überexpression von Proteinen	49
2.3.2.1	Klonierung der pBAD/HisA (Tet ^R)-Konstrukte	50
2.3.2.2	Expression heterologer Proteine mit Hilfe von pBAD/HisA (Tet ^R) und pET28b	50
2.3.2.3	Zellaufschluss mittels <i>French Pressure Cell</i>	51
2.3.2.4	Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	51
2.3.3	Dialyse von Proteinen.....	52
2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach BRADFORD	53
2.3.5	Circulärdichroismus-Spektroskopie	53
2.3.6	Polyacrylamidgelelektrophorese	54
2.3.6.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	54
2.3.6.2	Tricin-Polyacrylamidgelelektrophorese	56
2.3.6.3	Native Gelelektrophorese.....	57
2.3.6.4	Zymogramm.....	58
2.3.7	Western Blot.....	59
2.3.8	Immunofärbung und chemiluminometrische Detektion.....	60
2.3.9	Gelmobilitätsstudien	61
2.4	Invertebratenversuche	62
2.4.1	Haltung von <i>C. elegans</i>	62
2.4.2	Synchronisation von <i>C. elegans</i>	63
2.4.3	Toxizitätstest mit <i>C. elegans</i>	64

3	ERGEBNISSE	65
3.1	Klonierung der für diese Arbeit essentiellen Vektoren.....	65
3.1.1	Konstruktion eines Reporterplasmides zur Analyse der Genexpression der <i>tc</i> -Gene der Tc-PAI _{Ye} in <i>Y. enterocolitica</i> W22703.....	65
3.1.2	Konstruktion eines Vektors für die Proteinexpression in <i>Y. enterocolitica</i>	66
3.2	Expression der <i>tc</i>-Gene in <i>Y. enterocolitica</i> W22703	67
3.2.1	Expression von <i>tcaA</i> , <i>tcaB</i> , <i>tcaC</i> , <i>tccC1</i> und <i>tccC2</i> bei 15°C und 37°C	67
3.2.2	Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Expression der <i>tc</i> -Gene	69
3.3	Einfluss von TcaR1 und TcaR2 auf die Expression der <i>tc</i>-Gene	71
3.3.1	Bioinformatische Charakterisierung von TcaR1 und TcaR2	71
3.3.2	TcaR2 ist positiv autoreguliert	73
3.3.3	TcaR1 fungiert als Repressor von <i>tcaR2</i>	76
3.3.4	Der Promotor von <i>tcaA</i> liegt in der kodierenden Region von <i>tcaR2</i>	77
3.3.5	TcaR2 ist essentiell für die <i>tcaA</i> -Expression	78
3.3.6	Expression von <i>tcaB</i> ist abhängig von TcaR2	82
3.3.7	TcaR1- und TcaR2-unabhängige Expression von <i>tcaC</i> , <i>tccC1</i> und <i>tccC2</i>	84
3.4	Mechanismus zur temperaturabhängigen Expression von <i>tcaA</i>	86
3.4.1	Fungiert TcaR2 als Thermosensor?.....	86
3.4.2	TcaR2-induzierte <i>tcaA</i> -Expression in <i>E. coli</i>	87
3.4.3	Die Transkription von <i>tcaR2</i> und <i>tcaA</i> ist temperaturabhängig	89
3.4.4	mRNA-Stabilität von <i>tcaR1</i> , <i>tcaR2</i> und <i>tcaA</i> bei 15°C und 37°C	90
3.4.5	Untersuchungen zur mRNA-Sekundärstruktur von <i>tcaA</i>	91
3.4.6	TcaR2 ist bei 37°C instabil	93
3.4.7	Menge an TcaR2 ist bei 15°C höher als bei 37°C	95
3.5	Einfluss weiterer <i>Yersinia</i>-Transkriptionsfaktoren auf die Expression der <i>tc</i>-Gene.....	97
3.5.1	Der <i>Yersinia</i> Virulenz-Modulator YmoA.....	98
3.5.1.1	YmoA reprimiert die <i>tcaA</i> -Expression bei 37°C	98
3.5.1.2	Bioinformatische Charakterisierung von YmoA	99
3.5.1.3	Interaktion von YmoA mit H-NS.....	99
3.5.1.4	YmoA reprimiert die Promotoraktivität von <i>tcaR1</i> und <i>tcaR2</i>	102
3.5.1.5	YmoA reprimiert die Expression aller <i>tc</i> -Gene sowie von <i>tccC2</i>	104
3.5.1.6	YmoA bindet an ein intragenisches <i>tcaA</i> -Fragment	105
3.5.1.7	YmoA bindet an ein intragenisches <i>tcaB</i> -Fragment.....	107
3.5.1.8	YmoA bindet an die Promotoren von <i>tcaC</i> , <i>tccC1</i> und <i>tccC2</i>	108
3.5.1.9	Mechanismus zur YmoA/H-NS-abhängigen <i>tcaA</i> -Repression bei 37°C.....	109
3.5.1.10	YmoA ist thermostabil	112
3.5.2	Die <i>Quorum sensing</i> -Systeme LuxS und YenI	115
3.5.2.1	Die Expression von <i>tcaR2</i> ist <i>Quorum sensing</i> -abhängig	115
3.5.2.2	Die externe Zugabe von HSL-Molekülen hat keinen Einfluss auf die <i>tcaA</i> -Expression	116
3.6	Charakterisierung der phagenverwandten Gene der Tc-PAI_{Ye}	119
3.6.1	Bioinformatische Vorhersage zu den phagenverwandten Genen.....	119
3.6.2	Expression der Lysegene innerhalb der Tc-PAI _{Ye}	120
3.6.3	Holin und Endolysin aus der Tc-PAI _{Ye} von <i>Y. enterocolitica</i> W22703 sind funktional.....	123
3.6.4	Substratspezifität des Endolysins aus <i>Y. enterocolitica</i> W22703.....	125

3.6.5	Funktion der Holin/Endolysin-Kassette in <i>Y. enterocolitica</i> W22703	127
3.6.5.1	Rolle von Holin und Endolysin in der insektiziden Aktivität von <i>Y. enterocolitica</i> W22703.....	128
3.6.5.2	Funktion von Holin/Endolysin <i>in vivo</i>	130
3.7	Bistabile Produktion des insektiziden Toxinkomplexes	133
3.7.1	Heterogene <i>tcaA</i> -Expression in <i>Y. enterocolitica</i> W22703	133
3.7.2	Aufhebung des heterogenen Expressionsverhaltens von <i>tcaA</i> nach der Deletion von <i>ymoA</i>	136
3.7.3	TcaR2 vermittelt die heterogene Expression von <i>tcaA</i>	139
3.7.4	Die Bildung des LysR-ähnlichen Regulators TcaR2 ist bistabil	141
3.8	Regulationsnetzwerk zur Expression der <i>tc</i>-Gene	143
4	DISKUSSION UND AUSBLICK	145
4.1	Expression der <i>tc</i>-Gene in <i>Y. enterocolitica</i> W22703	145
4.2	Regulation der Expression der <i>tc</i>-Gene von <i>Y. enterocolitica</i> W22703	150
4.2.1	Rolle der beiden LysR-ähnlichen Regulatoren in der Expression der <i>tc</i> -Gene.....	150
4.2.2	Ein Komplex aus YmoA und H-NS reprimiert die Expression aller <i>tc</i> -Gene bei 37°C.....	156
4.2.3	Die Expression von <i>tcaR2</i> ist abhängig von der Zelldichte	162
4.3	Yersinien zeigen einen bistabilen Phänotypen	165
4.3.1	Die Expression von <i>tcaR2</i> und <i>tcaA</i> erfolgt nur in einem kleinen Teil der Population	165
4.3.2	Modell zur bistabilen Expression von <i>tcaA</i> in <i>Y. enterocolitica</i> W22703.....	167
4.4	Funktion von Holin und Endolysin in <i>Y. enterocolitica</i> W22703.....	169
4.5	Modell zur temperaturabhängigen Expression der <i>tc</i>-Gene in <i>Y. enterocolitica</i>	175
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	181
6	ANHANG.....	205
	Danksagung.....	238
	Vorveröffentlichungen der Dissertation	240
	Eidesstattliche Erklärung	241
	Curriculum Vitae	242

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genetische Organisation der <i>tc</i> -Loci in <i>P. luminescens</i> W14.	11
Abb. 2: Modell zur Struktur und zur Funktionsweise des ToxinKomplexes von <i>P. luminescens</i>	12
Abb. 3: Organisation der insektiziden Pathogenitätsinsel Tc-PAI _{ve} von <i>Y. enterocolitica</i> W22703.	12
Abb. 4: Promotoraktivität von <i>tcaA</i> , <i>tcaB</i> , <i>tcaC</i> , <i>tccC1</i> und <i>tccC2</i> bei 15°C und 37°C in LB-Medium.	67
Abb. 5: Expression von <i>tcaA</i> und <i>tcaB</i> in den Stämmen W22703 <i>P_{tcaA}::lux</i> , W22703 <i>tcaA(134)::lux</i> , W22703 <i>P_{tcaB}::lux</i> und W22703 <i>tcaB(177)::lux</i> bei 15°C und 37°C in LB-Medium.	68
Abb. 6: Bistabiler Phänotyp auf M9-Agar mit Arabinose als Kohlenstoffquelle.	70
Abb. 7: 3D-Modell von TcaR1 und TcaR2.	72
Abb. 8: Promotoraktivität von <i>tcaR1</i> und <i>tcaR2</i> in Abhängigkeit ihrer Proteinkonzentration bei 15°C und 37°C.	73
Abb. 9: Aufreinigung von TcaR2 aus <i>Y. enterocolitica</i> W22703.	74
Abb. 10: Bindung von TcaR2 an den Promotor von <i>tcaR2</i>	75
Abb. 11: TcaR1 fungiert als Repressor von <i>tcaR2</i>	76
Abb. 12: Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des <i>tcaA</i> -Promotors.	78
Abb. 13: Einfluss der Deletion der LysR-ähnlichen Regulatoren <i>tcaR1</i> und <i>tcaR2</i> auf die <i>tcaA</i> -Expression in LB-Medium bei 15°C und 37°C.	79
Abb. 14: Komplementation der <i>tcaR2</i> -Deletion in dem Stamm W22703 <i>tcaA(134)::lux Δ5'-tcaR2</i>	80
Abb. 15: Bindung von TcaR2 an die Promotorregion von <i>tcaA</i>	81
Abb. 16: Komplementierung der <i>tcaR2</i> -Deletion im Stamm W22703 <i>Δ5'-tcaR2 tcaB(177)::lux</i>	83
Abb. 17: CD-Spektren von TcaR2 bei unterschiedlichen Temperaturen.	86
Abb. 18: Promotoraktivitäten von <i>tcaR1</i> , <i>tcaR2</i> und <i>tcaA</i> im heterologen Host.	87
Abb. 19: Promotorstudien zu <i>tcaR2</i> im heterologen System <i>E. coli</i>	88
Abb. 20: Promotorstudien zu <i>tcaA</i> im heterologen Wirt <i>E. coli</i>	88
Abb. 21: Relative Expression von <i>tcaR1</i> , <i>tcaR2</i> und <i>tcaA</i> bei 15°C im Vergleich zu 37°C.	90
Abb. 22: Graphische Darstellung der Quantifizierung der Transkriptstabilität von <i>tcaR1</i> (A), <i>tcaR2</i> (B) und <i>tcaA</i> (C) bei 15°C und 37°C.	91
Abb. 23: mRNA-Sekundärstruktur von <i>tcaA</i> bei 15°C und 37°C.	92
Abb. 24: Stabilität von TcaR2 bei 15°C und 37°C.	94
Abb. 25: Proteininstabilität von TcaR2 bei 37°C.	95
Abb. 26: Bestimmung der TcaR2-Menge in <i>Y. enterocolitica</i> W22703 bei 15°C und 37°C in verschiedenen Wachstumsphasen.	96
Abb. 27: Einfluss verschiedener <i>Yersinia</i> -Transkriptionsregulatoren auf die <i>tcaA</i> -Expression bei 15°C und 37°C.	97
Abb. 28: Western Blot zur Aufreinigung von YmoA.	100
Abb. 29: Studie zur Bindung von YmoA an den Promotor von <i>tcaA</i>	101
Abb. 30: Einfluss von YmoA auf die Promotoraktivität von <i>tcaR1</i> und <i>tcaR2</i> bei 15°C und 37°C.	102
Abb. 31: Bindung von YmoA an die Promotoren von <i>tcaR1</i> und <i>tcaR2</i>	103

Abb. 32: Einfluss der Deletion von <i>ymoA</i> auf die Promotoraktivität der <i>tc</i> -Gene der Tc-PAI _{Ve} sowie von <i>tccC2</i> bei 15°C und 37°C in LB-Medium.	104
Abb. 33: Bindung von YmoA/H-NS an die DNA-Region von <i>tcaA</i>	106
Abb. 34: Bindung von YmoA/H-NS an ein intragenisches <i>tcaA</i> -Fragment.	106
Abb. 35: Bindung von YmoA/H-NS an den Promotor von <i>tcaB</i> sowie an ein intragenisches <i>tcaB</i> -Fragment.	107
Abb. 36: Bindung von YmoA/H-NS an die Promotoren von <i>tcaC</i> , <i>tccC1</i> und <i>tccC1</i>	109
Abb. 37: Indirekter Hinweis auf die TcaR2-Stabilität bei 37°C.	111
Abb. 38: Menge von YmoA in <i>Y. enterocolitica</i> W22703 während verschiedener Wachstumsphasen bei 15°C und 37°C.	112
Abb. 39: Stabilität von YmoA bei 15°C und 37°C.	113
Abb. 40: Komplementation der Deletion von <i>ymoA</i> im Stamm W22703 $\Delta ymoA$ P _{hol/endo} :: <i>lux</i>	122
Abb. 41: Bindung von YmoA/H-NS an den Promotor von Holin/Endolysin.	122
Abb. 42: Überexpression (A) und anschließende Aufreinigung (B) von Endolysin.	123
Abb. 43: Funktionalität des aufgereinigten Endolysins aus <i>Y. enterocolitica</i> W22703.	124
Abb. 44: Aktivität von Endolysin aus <i>Y. enterocolitica</i> W22703 gegen verschiedene Substrate im Zymogramm.	126
Abb. 45: Zeitliche Entwicklung des Biolumineszenzsignals des ATP Standards.	127
Abb. 46: Detektiertes TcaA-mCherry im Zellpellet von W22703 <i>tcaA</i> -mCherry (WT), W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> -mCherry ($\Delta ymoA$) und W22703 $\Delta hol/endo$ <i>tcaA</i> -mCherry (ΔHE).	129
Abb. 47: Einfluss des Holin/Endolysin-Systems auf die Lebensdauer von <i>C. elegans</i>	130
Abb. 48: Mikroskopische Darstellung eines mit W22703 P _{tcaA} :: <i>mCherry</i> infizierten Wurmes.	132
Abb. 49: Heterogene Expression von <i>tcaA</i> in dem Stamm W22703 P _{tcaA} :: <i>mCherry</i>	134
Abb. 50: Untersuchung der Expression des <i>tcaA</i> -Promotors auf Einzelzellebene.	134
Abb. 51: Entwicklung der Bistabilität des <i>tcaA</i> -Promotors bei verschiedenen Temperaturen.	135
Abb. 52: Aufhebung des heterogenen Expressionsverhaltens von P _{tcaA} nach der Deletion von <i>ymoA</i>	137
Abb. 53: Die Produktion von TcaA erfolgt nur in einem kleinen Teil der Population.	138
Abb. 54: Lokalisierung des TcaA-mCherry-Fusionsproteins an den Zellpolen.	138
Abb. 55: Überexpression von TcaR2 hebt die Bistabilität des <i>tcaA</i> -Promotors auf.	139
Abb. 56: Einfluss von TcaR2 auf die bistabile <i>tcaA</i> -Expression.	140
Abb. 57: Die TcaR2-Produktion erfolgt nur in einem kleinen Teil der Population.	141
Abb. 58: Die Expression von <i>tcaR2</i> ist positiv autoreguliert.	142
Abb. 59: Regulationsnetzwerk zur Temperaturabhängigen <i>tcaA</i> -Expression.	143
Abb. 60: Modell zur Expression der <i>tc</i> -Gene <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	178

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In dieser Studie verwendete Antibiotika.....	25
Tab. 2: Trennbereiche für lineare Nukleinsäurefragmente in Agarosegelen.....	30
Tab. 3: Reaktionsschema zur Synthese von cDNA.	33
Tab. 4: In dieser Arbeit häufig verwendete Restriktionsendonukleasen der Firma Thermo Scientific.	38
Tab. 5: Konzentration der SDS-Gele mit den zugehörigen Trennungsbereichen.	54
Tab. 6: Schritte zur Färbung eines Polyacrylamidgeles.....	56
Tab. 7: Abhängigkeit der Promotoraktivität der einzelnen <i>tc</i> -Gene sowie von <i>tcaR1</i> und <i>tcaR2</i> von der Medienzusammensetzung bei 15°C und 37°C.	69
Tab. 8: Einfluss der TcaR1-Überexpression auf die Promotoraktivität von <i>tcaR2</i> in LB-Medium bei 15°C und 37°C.....	77
Tab. 9: Bindung von TcaR2 an die Promotoren von <i>tcaA</i> und <i>tcaR2</i> bei 4°C, 15°C und 37°C.....	81
Tab. 10: Einfluss der Deletionen von <i>tcaR1</i> und <i>tcaR2</i> auf die <i>tcaB</i> -Expression bei 15°C und 37°C in LB-Medium.....	82
Tab. 11: Einfluss der Deletionen von <i>tcaR1</i> und <i>tcaR2</i> auf die (<i>Promotor</i> -) <i>Aktivität</i> von <i>tcaC</i> , <i>tccC1</i> und <i>tccC2</i> bei 15°C und 37°C in LB-Medium.	85
Tab. 12: Einfluss der <i>ymoA</i> -Deletion auf die <i>tcaA</i> -Expression in LB-Medium bei 15°C und 37°C.....	98
Tab. 13: Einfluss der TcaR2-Überproduktion auf die <i>tcaA</i> -Expression in Gegenwart und Abwesenheit des Repressors YmoA in LB-Medium bei 15°C und 37°C.	110
Tab. 14: YmoA/H-NS zeigt bei 15°C eine verminderte Funktionalität.	114
Tab. 15: Einfluss der beiden <i>Quorum sensing</i> -Synthasen YenI und LuxS auf die Promotoraktivität von <i>tcaR1</i> und <i>tcaR2</i> in LB-Medium bei 15°C und 37°C.....	116
Tab. 16: Gemittelte RLU der Promotoraktivitäten von <i>tcaR1</i> , <i>tcaR2</i> und <i>tcaA</i> nach Zugabe von HSL-Molekülen bei 15°C und 37°C.	117
Tab. 17: Gemittelte RLU der Expression von <i>fliB</i> und <i>fliF</i> nach Zugabe von HSL-Molekülen bei 30°C.....	117
Tab. 18: Gemittelte RLU der Expression von <i>fliB</i> und <i>fliF</i> in Überständen einer <i>Y. enterocolitica</i> -Kultur bei 15°C und 37°C.	118
Tab. 19: Einfluss der Deletionen von <i>tcaR1</i> , <i>tcaR2</i> und <i>ymoA</i> auf die Promotoraktivität von Holin/Endolysin bei 15°C und 37°C in LB-Medium.	121
Tab. 20: Substratspezifität von Endolysin aus <i>Y. enterocolitica</i> W22703.....	126
Tab. 21: Einfluss von Holin und Endolysin auf die nematozide Wirkung von <i>Y. enterocolitica</i>	131

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAP	Ankerprimer (A bridged A nchor P rimer)
ABS	Aktivierungsbindestelle (a ctivating b inding s ite)
AI	Autoinduktor (<i>autoinducer</i>)
Ail	<i>Yersinia</i> -Membranprotein (a ttachement- i nvasive- l ocus)
Amp	A mpicillin
AP	A lkalische P hosphatase
APS	A mmoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AUAP	universeller Amplifikations-Primer (A bridged U niversal A mplification P rimer)
BCIP	5- B romo-4- c hloro-3- i ndoyl- p hosphat
BLAST	B asic L ocal A lignment S earch T ool
bp	B asenpaare (b ase p airs)
BProm	Programm zur Vorhersage von bakteriellen Promotoren (b acterial p romoter p rediction)
BSA	Rinderalbumin (b ovine s erum a lbumin)
Bt	B acillus t huringiensis
C6-HSL	N-Hexanoyl-L- H omoserin-Lakton
C8-HSL	N-Octanoyl-L- H omoserin-Lakton
C	Cytosin
ca.	circa
CAA	Caseinhydrolysat (c asamino a cids)
CAP	Kälteakklimatisierungsproteine (c old a cclimatization p rotein)
CBD	Zellwand-bindende Domäne (c ell w all b inding d omain)
CD	C irculär d ichroismus
CCD	ladungsgekoppeltes Bauelement (c harge- c oupled d evice)
cDNA	komplementäre DNA (c omplementary D N A)
CIP	kälteinduzierte Proteine (c old i nduced p roteins)
Cm	C hloramphenicol
cRLU	auf 15°C korrigierte RLU (c orrected R L U)
CspA	Hauptkälteschockprotein (c old s hock p rotein A)
C _T	Schwellenwert-Zyklus (t hreshold c ycle)
DEPC	D iethylpyrocarbonat
DMF	N,N- D imethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (d eoxyribonucleic a cid)
dNTP	2'- D esoxyribonukleotid t riphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)
DTT	D ithiothreitol
E	Amplifikations-/Primereffizienz
E-Wert	Erwartungswert (e xpected v alue)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Gelmobilitätsstudie (E lectrophoretic M obility S hift A ssays)
endo	E ndolysin
FKS	fötales K älberserum
FLP	Flippase
G	Guanin
GEI	G enominsel
GSP	g enspezifischer P rimer
H-Antigene	Geißelantigene

H-NS	Nucleoid-assoziiertes Protein (<i>histone-like nucleoid structuring protein</i>)
hol	Holin
HPI	Pathogenitätsinsel (<i>high pathogenicity island</i>)
HSL	<i>N</i> -Acyl- H omoserin-Lakton
HTH	H elix- T urn- H elix
IBS	Inhibierungsbindestelle (<i>inhibitor binding site</i>)
IVIS	Bildgebendes System für Biolumineszenz und Fluoreszenz <i>in vivo</i> (<i>In Vivo Imaging Systems</i>)
Inv	I nvasin
kb	Kilob asen
k _D	Dissoziationskonstante
Km	K anamycin
LB-Medium	L uria- B ertani-Medium
lcr	Antwort auf eine geringe Konzentration an Calciumionen (<i>low calcium response</i>)
LPS	L ipopolysaccharid
LTTR	LysR-Familie transkriptioneller Regulatoren (<i>LysR-type transcriptional regulator</i>)
Nal	N alidixinsäure
NAP	N ucleoid-assoziiertes P rotein
NBT	N itroblautetrazolium
Ni-NTA	N ickel- N itrilotriacetat
NGM	Nematoden-Wachstumsmedium (<i>nematode growth medium</i>)
Mcf	Genprodukt des Genes <i>mcf</i> (<i>makes caterpillars floppy</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MM	M inimal- M edium
msc	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
O-Antigene	Oberflächenantigene
OD ₆₀₀	o ptische D ichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAI	Pathogenitätsinsel (<i>pathogenicity island</i>)
p.A.	für die Analyse (<i>pro analysis</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	P henyl m ethylsulfonylfluorid
PVC	<i>Photorhabdus</i> Virulenz-Kassette (<i>Photorhabdus virulence cassette</i> , PVC)
PVDF	Polyvinylidenfluorid (<i>polyvinylidene difluoride</i>)
pYV	<i>Yersinia</i> Virulenzplasmid (<i>plasmid for Yersinia virulence</i>)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>quantitative real time PCR</i>)
RACE	Technik zur schnellen Vervielfältigung von cDNA-Enden (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)
RBS	Erkennungsbindestelle (<i>recognition bindings site</i>)
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten (<i>relative fluorescence units</i>)
Rif	R ifampicin
RLU	relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROI	Bereich von Interesse (<i>region of interest</i>)
RovA	Regulator der Virulenz A (<i>regulator of virulence A</i>)
rRNA	ribosomale RNA (<i>ribosomal RNA</i>)
RT	R aum t emperatur
SAP	Alkalische Phosphatase aus Eismeergarnelen (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SDS	S odium d odecylsulfat
SOC	Transformationsmedium (<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>)

Strp	Streptomycin
T	Thymin
T3SS	Typ-3-Sekretionssystem
T _A	Annealingtemperatur (<i>annealing temperature</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-Puffer (Tris-buffered saline)
TBS-T	TBS mit 0,1% Tween 20
Tc	Toxinkomplex (<i>toxin complex</i>)
TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloroacetic acid</i>)
TcaR2 _{HisA}	His-markiertes TcaR2
TD ₅₀	diejenige Zeit, bei der 50% der Population tot sind (<i>50% time of death</i>)
TdT	Terminalen Deoxynukleotid Transferase
t _{Elongation}	Elongationszeit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tet	Tetrazyklin
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
üNK	über-Nacht-Kultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen/Volumen (<i>volume/volume</i>)
w/v	Masse/Volumen (<i>weight/volume</i>)
YadA	Yersinia Adhärenzprotein A (Yersinia adhesin A)
YmoA	Yersinia Virulenz-Modulator A (Yersinia virulence modulator A)
Yop	Yersinia Outer Protein (Yersinia outer proteins)
Ysa	Yersinia-Sekretionsapparat (Yersinia secretion apparatus)
Yst	Yersinia Enterotoxin (Yersinia-heat-stable enterotoxin)

Physikalische Größen

A	Ampère
Da	Dalton
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde(n)
k _D	Dissoziationskonstante [mol/l]
l	Liter
m	Meter
min	Minute(n)
mol	Mol
T	Temperatur
U	Unit [µM Substratumsatz/min]
V	Volt

Einheitszusätze physikalischer Größen

M	Mega
k	Kilo
c	Centi
m	Milli
µ	Mikro
n	Nano
p	Pico

Zusammenfassung

Seit ihrer erstmaligen Beschreibung 1998 werden die ToxinKomplex (Tc)-Proteine von *Photobacterium luminescens* als Alternative zu den Endotoxinen von *Bacillus thuringiensis* in der Landwirtschaft diskutiert. Das biologisch aktive Tc-Toxin besteht aus den drei Komponenten A, B und C, wobei die C-Komponente die zelltoxische, enzymatische Aktivität besitzt. Sie modifiziert Aktin, was zu einem Zusammenbruch des Zytoskeletts und schließlich zum Tod des Insektes führt. Seit 1998 wurden *tc*-homologe Gene in einer Reihe anderer Bakterien, wie beispielsweise *Xenorhabdus nematophilus*, *Serratia entomophila* sowie *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis*, gefunden. Auch in dem bislang nur als Humanpathogen bekannten Bakterium *Yersinia enterocolitica* wurden *tc*-Gene nachgewiesen. Eine Besonderheit ergibt sich hierbei in der temperaturabhängigen Expression der *tc*-Gene des *Y. enterocolitica*-Stammes W22703, welche zwar bei moderaten Temperaturen (10-20°C), nicht jedoch bei 37°C exprimiert werden. Dies bekräftigt eine Aktivität der Toxine in der Umwelt, z.B. gegenüber Invertebraten, und deutet auf ein Insektenstadium im Lebenszyklus von *Y. enterocolitica* hin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die temperaturabhängige Expression der insektiziden Gene der Pathogenitätsinsel Tc-PAI_{ve} von *Y. enterocolitica* W22703 näher untersucht. Mit Hilfe von Transkriptionsfusionsanalysen konnte gezeigt werden, dass ein Komplex aus YmoA und H-NS die Expression der *tc*-Gene bei 37°C verhindert. Damit ergibt sich für die Repression der *tc*-Gene bei 37°C ein einzigartiger Regulationsmechanismus, bei welchem der LysR-ähnliche Regulator TcaR2 sowie YmoA/H-NS als Antagonisten fungieren. Bei niedrigen Temperaturen wird der positiv autoreguliert Transkriptionsfaktor TcaR2 vermehrt gebildet und induziert die Expression der beiden Toxingene *tcaA* und *tcaB*. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass allein TcaR2 im heterologen System ausreicht, um eine Promotoraktivität von *tcaA* zu induzieren. Bei 37°C kommt es dagegen aufgrund des höheren Oligomerisierungsgrades des YmoA/H-NS-Komplexes sowie des verstärkten Abbaus von TcaR2 durch Proteasen zu einer Repression der insektiziden Toxingene.

Die Expression der *tc*-Gene wird aber nicht nur durch die Temperatur, sondern auch durch die Wachstumsphase reguliert. Dies ließ in *P. luminescens* bereits die Frage aufkommen, ob das *Quorum sensing*-System an der Steuerung beteiligt ist. In vorliegender Arbeit konnte erstmals eine Abhängigkeit der Expression von *tcaR2*, und damit indirekt von *tcaA* und *tcaB*, von den beiden *Quorum sensing*-Synthasen LuxS und YenI gezeigt werden. Dadurch unterliegt die Expression der *tc*-Gene einem hochkomplexen regulatorischem Netzwerk, welches eine energieaufwendige Bildung des Toxins bei zu geringer Zelldichte und/oder Temperaturen von >30°C verhindert.

Anhand einer translationalen Fusion des Toxins TcaA mit dem Fluoreszenzreporter mCherry konnte auf Einzelzellebene weiterhin gezeigt werden, dass bei 15°C nur etwa 5% der Zellen einer *Y. enterocolitica*-Kultur eine rote Fluoreszenz aufweisen. Die Expression von *tcaA* erfolgt demnach bei niedrigen Temperaturen bimodal und nur in einem geringen Teil der Population. Hierbei ist die Anzahl *tcaA*-exprimierender Zellen sowohl von der Konzentration von TcaR2 als auch von YmoA abhängig. Erst mit dem Wegfall von YmoA zeigt die Population ein nahezu einheitliches Expressionsprofil. Damit ist die bistabile Expression von *tcaA* in *Y. enterocolitica* W22703 das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels der beiden Antagonisten TcaR2 und YmoA, wobei YmoA verhindert, dass ein zu großer Teil der Population die insektiziden Toxine produziert.

Abschließend konnte mit Hilfe von Toxizitätstests in dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* erstmals eine wichtige Rolle der beiden Proteine Holin und Endolysin in der Virulenz von *Y. enterocolitica* gezeigt werden. So führte die Deletion der beiden Gene *hol* und *endo* zu einem vollständigen Aufheben der nematoziden Aktivität von *Y. enterocolitica*. Eine Komplementation der Deletion stellte den wildtypischen Infektionsverlauf wieder her. Diese Ergebnisse deuten auf eine physiologische Funktion der Lysekassette hin, möglicherweise durch eine Beteiligung in der Freisetzung der Tc-Proteine.

Die hier vorgestellten Daten erweitern das Spektrum von Virulenzgenen, die durch YmoA reguliert werden und geben einen detaillierten Einblick in das komplexe Regulationsnetzwerk der temperaturabhängigen Expression der insektiziden Gene in *Y. enterocolitica*.

Summary

Since its initial description in 1998, the *toxin complex (tc)*-proteins of *Photorhabdus luminescens* have been discussed as an alternative to endotoxins of *Bacillus thuringiensis* in agriculture. The enzymatic Tc-toxin consists of three components A, B and C, with C showing the cytotoxic activity. The C component modifies actin, which results in a collapse of the cytoskeleton and finally in the death of the insect. Since 1998 *tc*-homologous genes have been found in many other bacteria, including *Xenorhabdus nematophilus*, *Serratia entomophila*, *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Recently *tc*-genes were also found in the genome of *Y. enterocolitica* W22703. A characteristic here is the temperature-dependent expression of these genes, which are expressed at moderate temperatures (10-20°C), but not at 37°C. The cold-induced transcription of the *tc*-genes points to a yet unknown insect stage during the *Y. enterocolitica* life cycle.

This study investigates the low temperature-dependent expression of the insecticidal genes of the pathogenicity island Tc-PAI_{ve} of *Y. enterocolitica* strain W22703. Transcriptional fusion analysis showed that the YmoA/H-NS complex prevents the expression of *tc*-genes at 37°C. This results in a hitherto unique regulatory mechanism, in which the LysR-like regulator TcaR2 and YmoA/H-NS act as antagonists. The production of the positively autoregulated transcription factor TcaR2 is increased at low temperatures, resulting in the induction of the expression of the insecticidal genes *tcaA* and *tcaB*. By using fluorescence microscopy it could be demonstrated that the *tcaA* promoter in heterologous hosts only requires the presence of TcaR2, excluding the requirement of additional, *Yersinia*-specific (co-)factors for toxin gene expression. Due to the higher degree of oligomerization of the complex of YmoA and H-NS and due to the increased degradation of TcaR2 by proteases at 37°C, the insecticidal toxin genes are repressed at this temperature. Furthermore the expression of the *tc*-genes is depending on the growth phase of the bacteria. This raised the question whether the quorum sensing system is involved in the control of the expression of the insecticidal genes. This study for the first time demonstrates the dependency of the expression of *tcaR2*, and thus indirectly of *tcaA* and *tcaB*, on the two quorum sensing synthases LuxS and YenI. Thereby the expression of the *tc*-genes is part of a highly complex regulatory network that prevents the production of the toxin at low cell density and/or temperature >30°C.

To monitor gene expression at single-cell level a translational fusion of TcaA with the fluorescence reporter mCherry was constructed. At 15°C only about 5% of the cells of a culture of *Y. enterocolitica* W22703 exhibit a red fluorescence and thus produce TcaA. Therefore, the expression of *tcaA* at low temperatures is bimodal and occurs only in a small percentage of the population. The number of *tcaA*-expressing cells is limited by the concentration of TcaR2. After the elimination of YmoA the population

shows a nearly uniform expression pattern. The bistable expression of *tcaA* in *Y. enterocolitica* W22703 is the result of a complex interplay of the two antagonists TcaR2 and YmoA, whereupon YmoA prevents the majority of the population to produce the insecticidal toxin.

Finally it was shown in this work that holin and endolysin play an important role in the virulence of *Y. enterocolitica*. In lifespan assays with *Caenorhabditis elegans* the deletion of the two genes *hol* and *endo* led to a complete loss of nematocidal activity of *Y. enterocolitica*. The complementation of this deletion restored the course of infection. These results suggest a physiological function of the lysis cassette, possibly by participating in the release of Tc-proteins.

The data presented in this work extend the range of virulence genes that are regulated by YmoA and provide novel insights into the complex regulatory network of the temperature-dependent expression of the insecticidal genes in *Y. enterocolitica* W22703.

Vorwort

Bakterielle Insektizide stellen eine potenzielle Alternative zu chemischen Breitbandinsektiziden dar. Ein bekanntes Beispiel sind die Endotoxine des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Die *Bt*-Präparate, die insgesamt 2% der Insektizide auf dem Markt ausmachen, bestehen in der Regel aus getrockneten Bakteriensporen und den kristallinen Endotoxinen als Hauptkomponenten. Die *Bt*-Toxine wirken als Insektizide mit Fraßgiftwirkung. Nach der oralen Aufnahme des zunächst ungiftigen Protoxins durch das Insekt wird es im Darm durch Proteasen in das eigentliche Toxin umgewandelt. Dieses wirkt auf die Zellmembran der Darmwand und ist für die Entstehung von großen Poren verantwortlich, die das osmotische Potential der Zelle zerstören und damit Zytolyse bewirken. Als Folge der Zerstörung des Darmepithels können die *B. thuringiensis*-Zellen in die Hämolymphe eindringen, sich dort vermehren und dabei Stoffwechselgifte produzieren, die eine Septikämie verursachen, sodass sie auch eine Bedeutung für den pathologischen Prozess im Insekt haben [Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012]. *Bt*-Präparate werden heute vor allem im ökologischen Landbau eingesetzt. Hierbei sind ihre Vorteile in ihrer Spezifität sowie der guten Umweltverträglichkeit zu sehen [Wolfenbarger *et al.*, 2000]. Nachteilig für ihre Anwendung sind jedoch das enge Wirkungsspektrum, welches oftmals nicht nur auf eine Art, sondern auch auf ein bestimmtes Larvenstadium beschränkt ist, sowie die Ausbildung von Resistenzen. Weitere Insektizideinsätze sind daher die Folge [Wolfenbarger *et al.*, 2000; Bates *et al.*, 2005].

Seit der Entdeckung der *toxin complex* (*tc*)-Proteine von *Photorhabdus luminescens* im Jahr 1998 werden diese aufgrund ihrer insektiziden Wirkung als Alternative zu den *Bt*-Toxinen diskutiert [Bowen *et al.*, 1998a]. Die Gene, die für die Tc-Toxine kodieren, sind in dem Genom von *P. luminescens* auf den vier Genloci *tca*, *tcb*, *tcc* und *tcd* lokalisiert und kodieren für eine unterschiedliche Anzahl an Toxinsubkomplexen [Bowen *et al.*, 1998b]. Bei Injektion der Tc-Toxine in *Manduca sexta* wirken die Tc-Proteine aller vier Genloci toxisch, wobei die Toxine der Genloci *tca* und *tcd* zusätzlich eine orale Toxizität aufweisen [Bowen *et al.*, 1998a]. Aminosäuresequenzvergleiche zeigen, dass die durch die Gene *tca*, *tcb*, *tcc* und *tcd* kodierten Tc-Proteine in A-, B- und C-Komponenten klassifiziert werden können [French-Constant *et al.*, 2005]. Das biologisch aktive Toxin besteht aus allen drei Komponenten, welche zusammen den oligomeren ABC-Komplex bilden. Für die Ausbildung eines aktiven Toxinkomplexes müssen die einzelnen Untereinheiten allerdings nicht auf demselben Genlocus liegen, wodurch eine Austauschbarkeit einzelner Toxinkomponenten sowie eine gewisse Flexibilität ermöglicht wird [Waterfield *et al.*, 2005]. Lange Zeit waren die Funktion und die Struktur der Tc-Proteine nicht geklärt. Erst LANG *et al.* konnten zeigen, dass die C-Subunit die eigentlich toxische Komponente ist und zu einer übermäßig starken Polymerisierung des Aktinzytoskeletts und damit zur

Störung normaler zellulärer Funktionen und der Immunabwehr führt [Lang *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2014]. Die Translokation der C-Untereinheit in die Wirtszelle erfolgt mit Hilfe der A-Komponente. Diese bildet vermutlich eine Pore durch die Zellmembran des Wirtes, durch welche TcC ins Zellinnere geschleust wird. Die B-Untereinheit unterstützt diesen Prozess wahrscheinlich durch Wirkung als Chaperon [Lang *et al.*, 2010; Gatsogiannis *et al.*, 2013].

Neben den Tc-Toxinen aus *P. luminescens* wurden noch weitere Tc-Proteine aus Insektenpathogenen wie *Xenorhabdus nematophila*, *Yersinia entomophaga* und *Serratia entomophila* isoliert [Blackburn *et al.*, 1998; French-Constant *et al.*, 1999; Hurst *et al.*, 2010]. Darüber hinaus konnte in den letzten Jahren auch in verschiedenen Humanpathogenen wie beispielsweise *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica* und *Burkholderia pseudomallei* das Vorhandensein *tc*-homologer Gene im Genom nachgewiesen werden [Hares *et al.*, 2008; Aktories *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013]. Auch in dem Genom des bislang nur als Humanpathogen bekannten Bakteriums *Yersinia enterocolitica* wurde erst kürzlich das Vorkommen von *tc*-Genen beschrieben. Eine Besonderheit der *tc*-homologen Gene in diesem Organismus ergibt sich durch ihre strikte Temperaturabhängigkeit. So werden diese nur bei moderaten Temperaturen (10-20°C), nicht jedoch bei 37°C exprimiert [Bresolin *et al.*, 2006a; Bresolin *et al.*, 2006b]. Trotz der Unterschiede die in der Expression der *tc*-Gene zwischen den beiden Organismen *Y. enterocolitica* und *P. luminescens* beobachtet werden können, lässt die große Ähnlichkeit der A-, B- und C-Komponenten vermuten, dass die Komplex- bzw. Porenbildung in Tc-Toxinen einem ähnlichen Mechanismus bei insekten-, pflanzen- und humanpathogenen Prokaryonten unterliegen [Lang *et al.*, 2010]. So postulierten beispielsweise bereits WATERFIELD *et al.*, dass die Entwicklung von einem Insektenpathogen zu einem Humanpathogen, wie beispielsweise von *Y. pestis*, nur wenige Stufen umfasst [Perry *et al.*, 1997; Waterfield *et al.*, 2004]. Dies ist zum Teil darin begründet, dass das angeborene Immunsystem von Invertebraten große Ähnlichkeiten zu dem von Vertebraten aufweist [Girardin *et al.*, 2002]. Daher erlaubt beispielsweise die Larve von *Galleria mellonella* die Analyse bakterieller Virulenzfaktoren, die von den Bakterien in der Hämolymphe analog zum Invertebratenwirt exprimiert werden [Junqueira, 2012; Cook *et al.*, 2013]. Untersuchungen zu den in Insekten exprimierten Virulenzfaktoren könnten so zu einem besseren Verständnis der Evolution von Krankheitserregern beitragen, wodurch sich wiederum neue Denkansätze für die Schädlingsbekämpfung sowie der medizinischen Grundlagenforschung ergeben könnten [Waterfield *et al.*, 2004]. Thema der vorliegenden Arbeit waren daher die Untersuchung der Regulation der temperaturabhängigen Expression der *tc*-Gene in *Y. enterocolitica* W22703 sowie deren Funktion im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*.

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* erhielt 1964 ihren heutigen Namen, der auf den Schweizer Bakteriologen Alexandre Jean Émile Yersin zurückgeht. Dieser identifizierte während der Honkong-Pest im Jahr 1894 *Yersinia pestis* als Ursache dieser Erkrankung, beschrieb seine wesentlichen Eigenschaften und erkannte die Ratte als Überträger der Seuche [Rolle *et al.*, 2011].

Yersinien gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*, einer Gruppe Gram-negativer, fakultativ anaerober, nicht-sporulierender Stäbchen [Brenner, 1979]. Derzeit können aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften 17 verschiedene *Yersinia*-Arten unterschieden werden [Murros-Konttinen *et al.*, 2010a; Murros-Konttinen *et al.*, 2010b; Souza *et al.*, 2011]. Von diesen sind neben *Y. pestis* noch zwei weitere Arten humanpathogen, namentlich *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica*.

1.1.1 *Yersinia enterocolitica*

Y. enterocolitica kommt weltweit in den gemäßigten bis subtropischen Klimazonen vor [Aleksic *et al.*, 1990]. Als Hauptreservoir gelten wilde und domestizierte Vögel sowie verschiedene Säugetiere wie das Schwein [Cover *et al.*, 1989].

Y. enterocolitica kann bei Temperaturen zwischen -5°C bis +42°C wachsen, wobei sein Temperaturoptimum bei 28-30°C liegt [Nilehn, 2007]. Damit erweist es sich als mesophiles Bakterium, das aufgrund seines psychrotrophen Verhaltens eine bedeutende Rolle als Lebensmittelkeim spielt [Sutherland *et al.*, 1994; Bergann *et al.*, 1995]. Viele Eigenschaften dieses Bakteriums sind temperaturabhängig. So ist *Y. enterocolitica* beispielsweise zwischen 22-28°C peritrich begeißelt, bei 35-37°C dagegen unbegeißelt und damit unbeweglich [Bottone, 1977; Bottone, 1999]. Auch die Expression einiger Virulenzfaktoren des Virulenzplasmides pYV (*plasmid for Yersinia virulence*) ist abhängig von der Temperatur und der Calciumkonzentration [Straley *et al.*, 1981; Portnoy *et al.*, 1985; Straley *et al.*, 1995].

Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften kann die Spezies *Y. enterocolitica* in sechs Biotypen (1A, 1B und die Gruppen 2, 3, 4 und 5) untergliedert werden [Wauters *et al.*, 1987]. Dabei umfasst Biotyp 1A zum größten Teil apathogene Stämme, die in der Umwelt vorkommen. Biotyp 1B, welcher in Amerika vorherrscht, und die Biotypen 2 bis 5 (vorwiegend in Europa, Asien und Australien vorkommend) beinhalten dagegen hochpathogene bis gering pathogene Stämme [Wauters *et al.*, 1987]. Die einzelnen Biotypen können wiederum durch verschiedene Antigene in fast

60 Serotypen eingeteilt werden. Hierbei besitzen insbesondere die Oberflächenantigene (O-Antigene) und die Geißelantigene (H-Antigene) eine diagnostische Bedeutung. Die O-Antigene werden dabei mit Zahlen, die H-Antigene mit Buchstaben bezeichnet. Während in Europa vor allem die Biotypen 2 und 4 mit den Serotypen O:3 und O:9 von klinischer Bedeutung sind [Aleksic *et al.*, 1990], werden in Amerika insbesondere der Biotyp 1B mit den Serotypen O:4, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 beobachtet [Aleksić, 1995].

In vorliegender Arbeit wurde mit dem *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 gearbeitet. Hierbei handelt es sich um einen gering pathogenen Stamm des Biotyps 2 und Serotyps O:9, dem das Virulenzplasmid pYV fehlt [Mulder *et al.*, 1989]. Gene, die für die Pathogenitätsinsel YAPI (*Yersinia adherence pathogenicity island*), die Sekretionssysteme Ysa (*Yersinia secretion apparatus*) und Yts1 (*Yersinia type II secretion 1*) kodieren und im Genom des humanpathogenen *Y. enterocolitica*-Stammes 8081 vorkommen, fehlen gänzlich im Genom von *Y. enterocolitica* W22703 [Fuchs *et al.*, 2011]. Dafür beschrieben FUCHS *et al.* das Vorkommen eines **Typ 3-Sekretionssystems** (T3SS), das sonst nur in apathogenen *Yersinia*-Spezies gefunden werden kann. Zusätzlich konnten BRESOLIN *et al.* eine insektizide und nematozide Aktivität von *Y. enterocolitica* W22703 zeigen, die auf das Vorhandensein einer insektiziden **Pathogenitätsinsel** (*pathogenicity island*, PAI) zurückzuführen ist [Bresolin *et al.*, 2006a].

1.1.2 Pathogenese und Virulenzfaktoren

Y. enterocolitica ist ein häufiger Krankheitserreger, der beim Menschen und bei einer Reihe von Tieren eine Yersiniose verursacht. Die Symptome dieser Infektion sind vielseitig und reichen von leichter Diarrhö bis zur Sepsis. Besonders häufig geht diese Erkrankung mit den Symptomen einer akuten Enteritis (krampfartige Bauchkrämpfe, Fieber, Durchfall und Erbrechen) einher [Arvastson *et al.*, 1971; Vantrappen *et al.*, 1977]. Im Jahr 2013 wurden in Deutschland 2.590 Infektionen mit Yersinien gemeldet, wobei die meisten Erkrankungen durch *Y. enterocolitica* ausgelöst wurden [RobertKoch-Institut, 2014]. Damit gehört die Yersiniose, zusammen mit Infektionen durch *Salmonella enterica* und *Campylobacter jejuni*, zu den häufigsten bakteriellen Magen-Darm-Erkrankungen in Deutschland. Die Infektion mit *Y. enterocolitica* erfolgt oral durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln [Wauters, 1979]. Eine Aufnahme durch Trinkwasser oder Milch ist ebenso möglich [Black *et al.*, 1978]. Entscheidend für die Pathogenität von Yersinien ist das Vorhandensein des ca. 70 Kilobasen (kb) großen Virulenzplasmides pYV [Gemski *et al.*, 1980; Portnoy *et al.*, 1981; Portnoy *et al.*, 1985]. Neben den Genen für ein T3SS sind vor allem die Yops (*Yersinia outer proteins*) und das Adhärenzprotein YadA (*Yersinia adhesin A*) wesentliche, plasmidkodierte Virulenzfaktoren. YadA ist ein 45 kDa großes äußeres Membranprotein, das wichtig für die Zelladhärenz und die Autoagglutination sowie für die

Phagozytose- und Serumresistenz ist [Bottone, 1997]. Durch die Bildung von dimeren und tetrameren Fibrillen wird die Bindung an eine Vielzahl von Zielstrukturen ermöglicht [Heesemann *et al.*, 1987]. Zusätzlich ist es für die Serumresistenz des Erregers verantwortlich [Heesemann *et al.*, 1983].

Eine besondere Bedeutung in der Virulenz von *Y. enterocolitica* kommt den Yops zu. Diese werden in zwei Klassen unterteilt: die Effektorproteine, die im Wesentlichen die zelluläre Abwehr des Wirtes schwächen, und Proteine, die für die Regulation und den korrekten Ablauf des Translokationsprozesses zuständig sind [Cornelis, 2002b]. Nach der Translokation in die Wirtszellen interferieren die Yops mit verschiedenen Targetproteinen und Signalkaskaden. Zu den Hauptaufgaben dieser Polypeptide zählen die Serum- und Phagozytenresistenz sowie die Bildung von verschiedenen Zytokinen [Aepfelbacher *et al.*, 2007]. Damit tragen sie maßgeblich zur Unterdrückung der angeborenen Immunantwort bei und ermöglichen das extrazelluläre Überleben und Replizieren der Yersinien [Rosqvist *et al.*, 1990]. Die Translokation der Yops erfolgt mit Hilfe eines T3SS. Die Proteine, die den Injektionsapparat aufbauen, sind auf dem Virulenzplasmid pYV lokalisiert und unter den Yersinien stark konserviert [Cornelis, 2002a; Cornelis, 2006]. Sobald der Krankheitserreger im Wirt einen Temperaturanstieg auf 37°C erfährt, werden die Gene des T3SS exprimiert und der Injektionsapparat aufgebaut. Dieser besteht aus einem komplexen Basalkörper, der die Peptidoglykanschicht und beide bakteriellen Membranen überspannt, und aus einer nadelförmigen Struktur auf der Außenseite des Bakteriums [Kubori *et al.*, 1998]. Der gesamte Sekretionsapparat besteht aus 27 Proteinen, welche eine hohe Homologie zu Flagellenproteinen aufweisen [Hueck, 1998]. Nach dem Aufbau des Sekretionsapparates und der Synthese der Yops erfolgt bei Kontakt zu eukaryotischen Zellen die Translokation der Proteine mit Hilfe des T3SS.

Obwohl der größte Teil der für die Virulenz von *Y. enterocolitica* verantwortlichen Faktoren auf dem Plasmid pYV lokalisiert sind, gibt es einige chromosomal kodierte Faktoren, die für die Infektion von entscheidender Bedeutung sind. Das Enterotoxin Yst (**Y**ersinia-**h**eat-**s**t**able enterotoxin**) stimuliert die Guanylat-Zyklase im Darm und ist dadurch verantwortlich für den typisch wässrigen Durchfall einer Infektion mit *Y. enterocolitica* [Pai *et al.*, 1978; Delor *et al.*, 1992]. Das *inv*-Gen kodiert für Invasin, ein 103 kDa großes Protein der äußeren Membran. Die Interaktion dieses Proteins mit β 1-Integrinen auf der Oberfläche von M-Zellen ermöglicht *Y. enterocolitica* die Inversion der Peyer'schen Plaques [Pepe *et al.*, 1993a]. Es scheint insbesondere für die erste Phase der Infektion von Bedeutung zu sein und stellt damit den wichtigsten Invasionsfaktor von virulenten Yersinien dar [Pepe *et al.*, 1993b]. Der zweite Adhärenz- und Invasionsfaktor ist das Membranprotein Ail (**a**ttach**e**ment-**i**nvasive-**l**ocus), das nur in pathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen vorkommt [Miller *et al.*, 1989]. Es wird durch das *ail*-Gen kodiert, das sein Expressionsmaximum bei 37°C besitzt [Pierson *et al.*, 1993]. Neben der Adhäsion und Internalisierung von Epithelzellen vermittelt das Ail-Protein auch Serumresistenz [Bliska *et al.*, 1992]. Ebenfalls chromosomal kodiert werden die Gene für die Synthese der Lipopolysaccharide (LPS), den

Hauptkomponenten der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Sie setzen sich aus dem Oligosaccharidkern sowie den Lipid A- und O-Antigenen zusammen. Das Lipid A ist in der Entstehung der bakteriellen Sepsis involviert und innerhalb eines Genus, zusammen mit dem Oligosaccharidkern, hoch konserviert [Jansson *et al.*, 1981; Zhang *et al.*, 1997]. Dagegen können die O-Antigene beträchtlich variieren, was zur Serotypisierung genutzt wird [Wauters *et al.*, 1991]. Besonders pathogene Yersinien besitzen neben anderen Virulenzfaktoren die sogenannte Pathogenitätsinsel HPI (**high pathogenicity island**). Diese kodiert für das Siderophor Yersiniabactin und damit assoziierte Gene [Haag *et al.*, 1993]. Effektive Eisenaufnahmesysteme stellen einen wichtigen Virulenzfaktor dar, da im Wirt die Konzentration an freiem Eisen sehr gering ist. Yersiniabactin bindet Eisen mit einer Assoziationskonstante von 4×10^{36} mol/l und ist somit in der Lage, dieses Metall den meisten Eisenbindepoteinen des Wirtes zu entziehen [Perry *et al.*, 1999].

Der Wegfall eines der genannten Pathogenitätsfaktoren führt nicht unbedingt zu einem Verlust der Pathogenität oder zur Veränderung des Infektionsweges [Pepe *et al.*, 1993b]. Fehlt jedoch das Plasmid pYV, sind die chromosomal kodierten Virulenzfaktoren für eine Persistenz der Bakterien im Darm nicht mehr ausreichend, sodass eine Kolonisierung nicht möglich ist. Der jeweilige Stamm ist apathogen [Portnoy *et al.*, 1981; Heesemann *et al.*, 1984].

1.1.3 Temperaturabhängige Regulation von Virulenzfaktoren in Yersinien

Die Expression der in 1.1.2 genannten *Yersinia*-Virulenzfaktoren wird in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen, wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Nährstoffangebot, Osmolarität und Sauerstoffkonzentration, durch ein komplexes Netzwerk von transkriptionalen und post-transkriptionalen regulatorischen Systemen gesteuert. Werden Yersinien beispielsweise über kontaminiertes Essen aufgenommen und gelangen in den Wirt, muss das Bakterium für ein erfolgreiches Pathogeneseprofil zunächst seine Oberflächenantigene an die neue Umgebungstemperatur von 37°C anpassen [Miller *et al.*, 1989; Galindo *et al.*, 2011]. Daher wird eine Temperatur von 37°C von vielen humanpathogenen Bakterien als Signal für eine erfolgreiche Infektion des Wirtes erkannt.

Nach der oralen Aufnahme der Yersinien ist das Außenmembranprotein Invasin für die effiziente Adhäsion an M-Zellen und damit für die Kolonisierung der Peyer'schen Plaques verantwortlich. Die Expression des *inv*-Gens erfolgt streng umweltskontrolliert bei moderaten Temperaturen, niedriger Osmolarität, in der stationären Phase und in einem nährstoffreichem Milieu [Nagel *et al.*, 2001; Ellison *et al.*, 2004; Trcek *et al.*, 2010]. Es wird bei 27°C maximal exprimiert und ist daher nur in der Frühphase der Infektion von Bedeutung [Pepe *et al.*, 1993b; Nelson *et al.*, 2001]. Die Regulation der *inv*-Expression erfolgt durch die Bindung des Transkriptionsfaktors RovA (**regulator of virulence A**) an

den Promotor des *inv*-Gens, der die Blockierung des Promotors durch H-NS (*Histone-like Nucleoid Structuring Protein*, Nukleoid-assoziiertes Protein) und YmoA (*Yersinia* Virulenz-Modulator A) aufhebt und somit eine Transkription ermöglicht [Nagel *et al.*, 2001; Heroven *et al.*, 2004]. Bei Temperaturen von 37°C ändert sich die Faltung des RovA-Proteins, woraufhin sich seine Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA)-Bindekapazität verringert. Es wird leichter angreifbar für die Spaltung durch ClpP und Lon, zwei ATP-abhängige Proteasen, was aufgrund der positiven Autoregulation von RovA in einer verminderten Bildung des Proteins resultiert [Herbst *et al.*, 2009]. Das ebenfalls chromosomal kodierte Oberflächenprotein Ail, welches lediglich in pathogenen *Yersinia*-Stämmen vertreten ist, wird dagegen ausschließlich bei 37°C exprimiert und vermittelt neben Invasin die Adhärenz, Internalisierung und Serumresistenz von *Y. enterocolitica* [Portnoy *et al.*, 1981; Galindo *et al.*, 2011]. Die Expression von *yadA*, welches für das dritte Oberflächenprotein kodiert, das für den initialen Invasionsschritt der intestinalen Mukosa essentiell ist und auf dem Virulenzplasmid pYV lokalisiert ist, erfolgt ebenfalls vorwiegend bei Wirtstemperatur. Neben dem Adhäsionsfaktor YadA kodiert pYV weiterhin für das Yop-Virulon, ein T3SS und Effektorproteine [Cornelis, 2002b]. Die Expression dieser Gene erfolgt *in vitro* ausschließlich bei 37°C und niedrigen Calciumkonzentrationen. Wird die Temperatur von niedrigen Temperaturen (10-20°C) auf 37°C erhöht, kommt es zu einem verlangsamten Wachstum und zur Induktion der Transkription oben genannter Gene durch den Transkriptionsaktivator VirF [Cambronne *et al.*, 2000]. VirF (LcrF in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*) gehört zur Familie der AraC-Transkriptionsregulatoren [Cornelis *et al.*, 1989; Gallegos *et al.*, 1997] und kann in einer Vielzahl Gram-negativer Bakterien gefunden werden. Die Temperaturkontrolle von VirF erfolgt auf zwei Ebenen: Die Expression von *virF* wird bei 25°C durch das Protein YmoA reprimiert, welches einige Histon-ähnliche Merkmale aufweist [Cornelis *et al.*, 1991; Rohde *et al.*, 1994]. Darüber hinaus bildet die *virF*-Boten-RNA (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) bei diesen Temperaturen stabile Sekundärstrukturen aus, die eine Bindung der Ribosomen verhindern. Infolge einer Temperaturerhöhung auf 37°C wird YmoA proteolytisch abgebaut sowie die Sekundärstruktur der *virF*-mRNA aufgeschmolzen. Eine Transkription und Translation von *virF* ist nun möglich [Böhme *et al.*, 2012]. Während es dadurch zur vollständigen Induktion der Expression der Komponenten des Sekretionsapparates, der Translokatoren und des Proteins YadA kommt, wird im Gegensatz dazu die Expression der Yops und ihrer Chaperone in dieser Phase nur gering angesprochen. Erst durch den Wirtszellkontakt erfolgt die volle Expression und Translokation der Yops [Stainier *et al.*, 1997]. Auslöser hierfür ist vermutlich die Erkennung des Abfalls des Calciumspiegels, welcher in der Wirtszelle im nanomolaren Bereich und in der extrazellulären Matrix im millimolaren Bereich liegt. Dieses regulatorische Phänomen wird als *low calcium response* (lcr) bezeichnet und zeigt sich *in vitro* dadurch, dass bei 37°C und Calciumionen im Medium keine Yops sezerniert werden. Erst durch die Zugabe eines Calciumchelators werden Yops in das umgebende Medium abgegeben. Somit

besitzt *Y. enterocolitica* einen negativen Rückkopplungsmechanismus, der die vorzeitige Expression und Translokation der Yops kontrolliert [Michiels *et al.*, 1990; Straley *et al.*, 1993]. Das komplexe Zusammenspiel zwischen den regulatorischen Komponenten scheint nicht nur die Expression der *Yersinia*-Virulenzfaktoren mit der Adaptation an veränderte Temperatur- und Nährstoffbedingungen während des Infektionsverlaufes, sondern auch mit der Expression bestimmter Stoffwechselwege, der Biofilmbildung und der Motilität zu koordinieren, um so die bakterielle Fitness für die Initiation und Persistenz einer Infektion zu optimieren [Marceau, 2005].

1.1.4 Physiologie von Yersinien bei niedrigen Temperaturen

Zur Beantwortung der Frage, wie sich *Y. enterocolitica* an ein Wachstum bei niedrigen Temperaturen anpasst, verglichen BRESOLIN *et al.* die Transkription des *Y. enterocolitica*-Stammes W22703 mit einer *luxCDABE*-Transposon-Bank bei 10°C und 30°C und stellten hierbei bei 42 von 5.700 Transposon-Mutanten eine deutliche Änderung der Transkriptionsaktivität bei 10°C im Vergleich zu 30°C fest [Bresolin *et al.*, 2006b]. Beim Absinken der Temperaturen werden die Funktionen vieler Prozesse in der Zelle gestört, was bei *Y. enterocolitica* in einem temporären Wachstumsstopp der Zelle resultiert [Neuhaus, 2000]. Niedrige Temperaturen führen zu einer verminderten molekularen Beweglichkeit und damit zu strukturellen Änderungen von Proteinen, Nukleinsäuren und weiterer Moleküle wie Membranlipide. Dies wiederum resultiert in Störungen enzymatischer Reaktionen und Membranfunktionen, wie Transport, Zellteilung und Energieproduktion. Prozesse, in denen Nukleinsäuremoleküle involviert sind, wie Translation, Transkription und mRNA-Faltung, werden ebenfalls stark beeinflusst [Weber *et al.*, 2003]. Bei niedrigen Temperaturen kommt es in der Bakterienzelle zur Reprogrammierung der Proteinsynthese und zur Adaption an die Kälte. Die Proteine, die nach einem Kälteschock synthetisiert werden, können in zwei Gruppen unterteilt werden: kälteinduzierte Proteine (CIP, *cold induced proteins*) und Kälteakklimatisierungsproteine (CAP, *cold acclimatization proteins*). Während die CIPs nur vorübergehend induziert werden, sind die CAPs dauerhaft auf einem erhöhten Niveau vorhanden [Weber *et al.*, 2003]. Abhängig von der Induktionszeit werden die Proteine in die frühen und späten CIPs und CAPs unterteilt. In *Y. enterocolitica* wird das Transkript des Hauptkälteschockproteins CspA (*cold shock protein A*) bereits zwei Minuten nach dem Kälteschock synthetisiert [Neuhaus, 2000; Bresolin *et al.*, 2006b]. Obwohl die genaue Rolle der Csp ungeklärt ist, wurde für CspA aus *Escherichia coli* eine Funktion als Transkriptionsaktivator für den Promotor des *hns* Genes gezeigt [La Teana *et al.*, 1991]. Des Weiteren fungiert es als RNA-Chaperon, das die Sekundärstrukturen der mRNA destabilisiert und damit der RNA-Polymerase zugänglich macht [Jiang *et al.*, 1997]. Nach der Phase der Akklimatisierung, sinkt das Level

der CIPs, und unter Berücksichtigung der neuen Umweltbedingungen wird der Umfang der ursprünglichen Proteinsynthese wieder hergestellt [Bresolin *et al.*, 2006b].

Zu den physiologischen Veränderungen, die mit einer Temperaturverringerung einhergehen, gehört des Weiteren eine Reduktion der molekularen Dynamik von Lipiden, die sich in einer reduzierten Membranfluidität äußert [Weber *et al.*, 2002]. Die Zellmembran von Bakterien besteht aus einer Doppelschicht von Phospholipiden und grenzt das Zellinnere von der Umwelt ab. Ihre Funktionen sind vielseitig und beinhalten beispielsweise Formhaltung, Transport, Atmung und Signalaufnahme. Die richtige Fluidität der Membran ist für diese komplexen Funktionen entscheidend und wird stark durch die Temperatur beeinflusst [Alberts *et al.*, 1994]. Normalerweise liegt die Zellmembran in einem fluiden Zustand vor. Bei Kälte wechselt dieser Zustand jedoch in eine gelartige Phase [Grau *et al.*, 1993]. Daher haben Mikroorganismen Mechanismen entwickelt, um die Fluidität der Membranlipide auch bei niedrigen Temperaturen aufrecht zu erhalten. So konnten GOVERDE *et al.* für *Y. enterocolitica* bei niedrigen Temperaturen beispielsweise eine Zunahme des Anteils an ungesättigten Fettsäuren zeigen [Goverde *et al.*, 1994].

Nach der Adaption der Zellen an Kälte stellten BERSOLIN *et al.* eine deutliche Erhöhung der Expression regulatorischer sowie sensorischer Gene, wie beispielsweise der beiden für Zwei-Komponenten-Systeme kodierenden Gene *uhpABC* und *arcAB*, fest [Bresolin *et al.*, 2006a]. Beide Systeme wurden bereits im Zusammenhang mit anderen Umweltfaktoren beschrieben. So werden z.B. die Gene *arcAB* in *E. coli* verstärkt bei Sauerstoffmangel exprimiert, wodurch ArcAB die Expression von Genen reguliert, die für ein Wachstum unter anaeroben Bedingungen notwendig sind [Gunsalus *et al.*, 1994]. Während des exponentiellen Wachstums detektierten BERSOLIN *et al.* eine verstärkte Induktion von Motilitäts- und Chemotaxisgenen [Bresolin *et al.*, 2006b]. Es ist bekannt, dass *Y. enterocolitica* nur bei Temperaturen unter 30°C Flagellen bildet [Kapatral *et al.*, 1996]. An der Spitze der Hierarchie für die Transkription der Flagellengene befindet sich das *flhDC*-Operon, das für zwei Transkriptionsaktivatoren kodiert, die für die Expression aller Flagellengene notwendig sind. Für die Vermittlung der Temperatursensitivität wird der alternative σ -Faktor FliA verantwortlich gemacht. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass FliA neben der positiven Regulation von Klasse III Genen des Flagellums einen negativ-regulatorischen Einfluss auf plasmidkodierte Virulenzgene (*yadA*, *virC*, *YopQ*) besitzt, wobei der negative Einfluss von FliA vermutlich über eine direkte Bindung dieses Proteins an den Promotor von *virF* vermittelt wird [Horne *et al.*, 2006].

Der Übergang in die stationäre Wachstumsphase zeichnet sich vor allem durch die Induktion von Genen aus, welche in metabolische Prozesse involviert sind. Hier sind insbesondere eine Histidin-Ammoniak-Lyase, drei Enzyme für die Aufnahme und Verwertung von Glykogen, ein Urease-Komplex sowie eine Subtilisin-ähnliche Protease zu erwähnen [Bresolin *et al.*, 2006b]. Durch die verstärkte

Expression dieser Gene, versuchen psychrotolerante Bakterien vermutlich eine verminderte Enzymaktivität zu kompensieren [Kannan *et al.*, 1998].

Während ihrer Untersuchungen zu kälteinduzierten Genen in *Y. enterocolitica* W22703 fanden BRESOLIN *et al.* zwei stammspezifische Gene, die eine signifikante Homologie zu Untereinheiten des insektiziden Toxins aus *P. luminescens* aufweisen [Bresolin *et al.*, 2006b]. Diese Gene sind in einer Pathogenitätsinsel lokalisiert und werden im nächsten Abschnitt näher beschrieben.

1.2 Die insektizide Pathogenitätsinsel Tc-PAI_{Ye} in *Y. enterocolitica*

BRESOLIN *et al.* identifizierten in dem *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 mit Hilfe einer Transposon-gestützten Genomanalyse stammspezifische Gene, die eine signifikante Homologie zu den Untereinheiten des insektiziden Toxinkomplexes aus dem Nematoden-assoziierten Bakterium *P. luminescens* aufweisen [Bresolin, 2004; Bresolin *et al.*, 2006a]. *P. luminescens* lebt in einer Symbiose mit entomopathogenen Nematoden der Art *Heterorhabditis bacteriophora* [Ciche *et al.*, 2003]. Die Nematoden dienen als Vektor für die Übertragung der Bakterien auf Insekten, ihre eigentlichen Wirte. Nach dem Eindringen der Nematoden in das Insekt gelangt *P. luminescens* durch Regurgitation in dessen Hämolymphe und somit in den Darm, wo es sich exponentiell vermehren kann [Clarke, 2008]. Durch die Produktion von Toxinen und anderen, das Gewebe schädigende Moleküle, wird das Insekt als Nahrungsquelle aufgeschlossen [Münch *et al.*, 2008]. Die Nematoden können sich entwickeln und fortpflanzen, wobei sie sich im Wesentlichen von den Bakterien ernähren. Sind alle Nahrungsquellen erschöpft, verlassen die Nematoden als Dauerlarven den Kadaver. Dabei dienen sie *P. luminescens* als Transportmittel und als Schutz vor Umwelteinflüssen [Goodrich-Blair *et al.*, 2007].

Zu den im Insekt produzierten Toxinen gehören die Tc-Proteine [Bowen *et al.*, 1998a; Münch *et al.*, 2008]. Obwohl *P. luminescens* vier native Toxinkomplexe (Tca, Tcb, Tcc und Tcd) produziert, die jeweils eine molekulare Masse von etwa 1 MDa besitzen, weisen nur die beiden Toxine Tca und Tcd eine starke orale insektizide Aktivität auf [Bowen *et al.*, 1998a]. Unter denaturierenden Bedingungen löst sich jeder der vier Toxinkomplexe in eine Reihe kleinerer Proteine mit einer Größe zwischen 30-200 kDa auf [Bowen *et al.*, 1998b]. Diese Proteine lassen sich wiederum in die drei homologen Komponentengruppen A, B, und C einteilen und werden von den sogenannten *tc*-Genen kodiert [Bowen *et al.*, 1998a]. Hierbei kodieren die *tcaAB*- oder *tcb/tcdA*-ähnlichen Gene für die Komponente A, die *tcaC*- oder *tcdB*-ähnlichen Gene für die Subunit B und die *tccC*-ähnlichen Gene für die Untereinheit C [Waterfield *et al.*, 2001b]. Die verschiedenen Toxinkomplexe werden durch die Loci *tca*, *tcb*, *tcc* und *tcd* kodiert und sind in Form von Pathogenitätsinseln angeordnet. Abb. 1 gibt eine Übersicht über die genetische Organisation der verschiedenen *tc*-Loci von *P. luminescens* W14 [Waterfield *et al.*, 2001b; Tennant *et al.*, 2005].

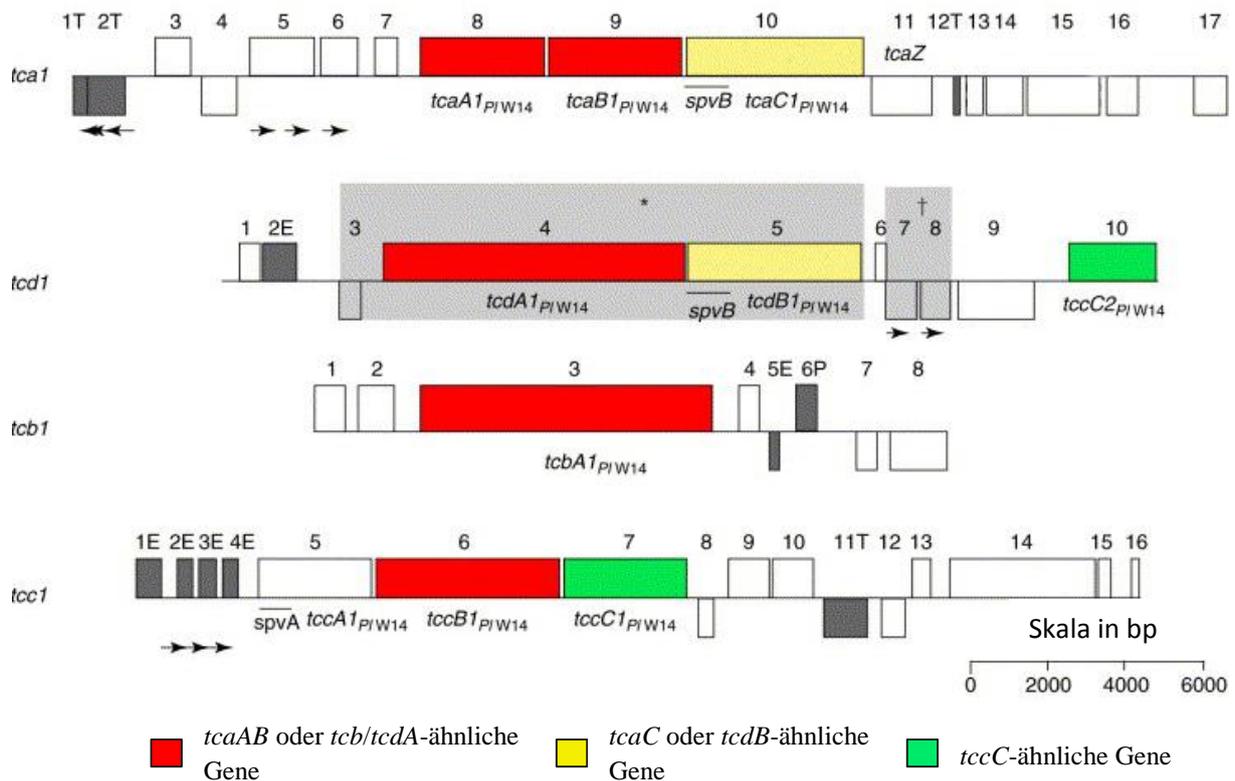


Abb. 1: Genetische Organisation der *tc*-Loci in *P. luminescens* W14. [Waterfield *et al.*, 2001b]

Lange Zeit waren weder die Wirkungsweise noch der molekulare Aufbau der Tc-Toxine bekannt. Erst 2013 konnten GATSOGIANNIS *et al.* mit Hilfe von Kryo-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse die Struktur des funktionalen Toxinkomplexes von *P. luminescens* entschlüsseln [Gatsogiannis *et al.*, 2013]. Demnach besteht das TcA-Protein aus fünf Untereinheiten, die zusammen die Form einer Glocke bilden. Im Inneren der Glocke erzeugen die A-Komponenten einen Kanal, der durch seine Form an eine Vuvuzela erinnert (Abb. 2). Mit Hilfe von 20 Rezeptorbindedomänen ist die TcA-Untereinheit außerdem für die Bindung des Toxinkomplexes an die Wirtszelle verantwortlich. Durch die Bindung der Rezeptorbindedomänen an Rezeptoren der Wirtszelle wird Endozytose induziert. Kommt es zur Änderung des pH-Wertes, entweder in Form eines niedrigen pH-Wertes im Darm oder eines hohen pH-Wertes in den Endosomen, öffnet sich die äußere Hülle des Toxins und der Kanal wird freigegeben. Der Kanal, der wie eine Feder angespannt ist, zieht sich zusammen und wird so durch die Zellmembran gestoßen, wodurch die beiden Toxinkomponenten B und C in die Wirtszelle transportiert werden [Gatsogiannis *et al.*, 2013; Meusch *et al.*, 2014]. Durch die intrinsische Aspartat-Protease-Aktivität von TcC wird die C-Komponente entpackt und verliert dadurch ihre ursprüngliche Struktur. Sie hemmt daraufhin die normale Regulation von Aktin im Zytosol der Wirtszelle, was zur Aggregation sowie zum Funktionsverlust des Zytoskeletts und letztendlich zum Zelltod führt [Lang *et al.*, 2010].

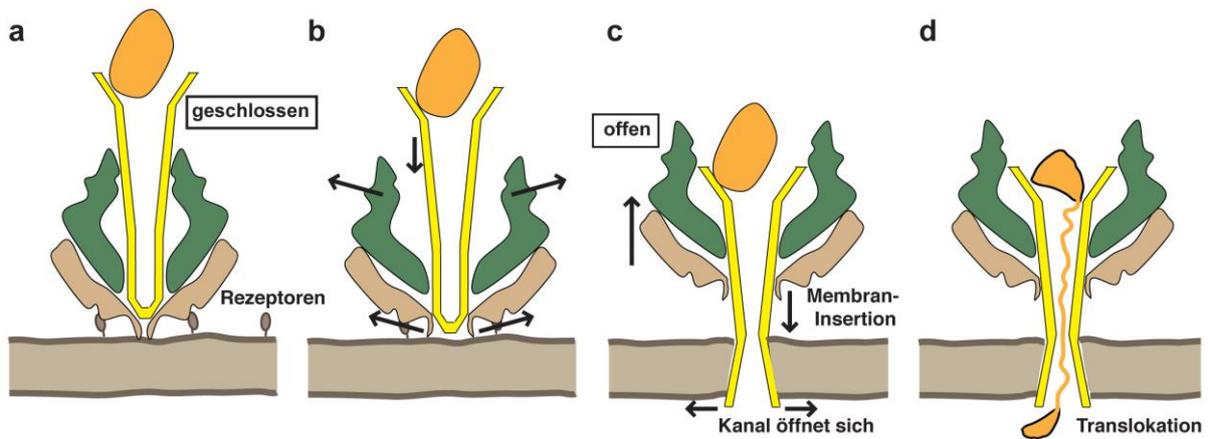


Abb. 2: Modell zur Struktur und zur Funktionsweise des Toxinkomplexes von *P. luminescens*. A) Der Toxinkomplex besteht aus den drei Komponenten A (braun, grün und gelb), B und C (orange). Das Protein TcA besteht dabei aus fünf Untereinheiten (grün und braun), welche durch ihren glockenförmigen Aufbau einen inneren Kanal bilden (gelb). Nach der Bindung des Toxinkomplexes an die Zellmembran der Wirtszelle, wird das Toxin über Endozytose aufgenommen. B) Eine Änderung des pH-Wertes führt zu Konformationsänderungen des Komplexes, C) wodurch sich der zentrale Kanal wie die Kanüle einer Spritze durch die Zellmembran schieben kann. D) TcB und TcC werden in das Zellinnere transportiert. Dabei wird TcC entpackt und verliert seine ursprüngliche Struktur [Gatsogiannis *et al.*, 2013].

Das Auffinden *tc*-homologer Gene in dem *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 deutet darauf hin, dass sein Lebenszyklus ein Insektenstadium beinhalten könnte. Die von BRESOLIN *et al.* gefundenen offenen Leseraster (*open reading frame*, ORF) wurden entsprechend ihrer Ähnlichkeit zu den *tc*-Genen aus *P. luminescens* benannt und sind in einer Pathogenitätsinsel angeordnet [Bresolin *et al.*, 2006a]. Diese umfasst neben vier *tc*-homologen Genen noch zwei regulatorische sowie vier phagenverwandte Gene und ist in Abb. 3 dargestellt.

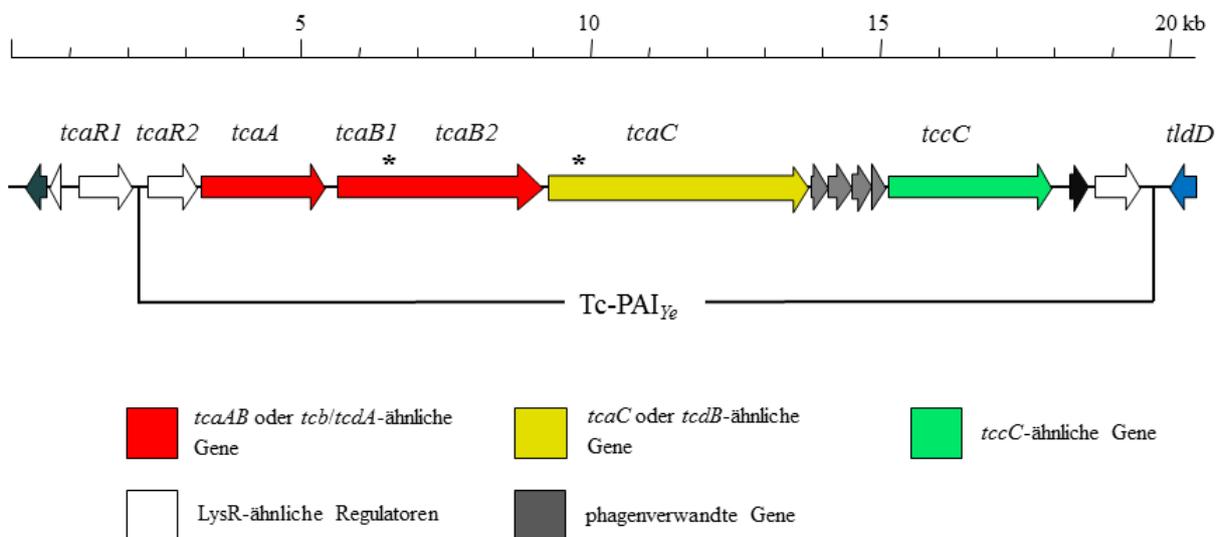


Abb. 3: Organisation der insektiziden Pathogenitätsinsel Tc-PAI_{Ye} von *Y. enterocolitica* W22703. [Fuchs *et al.*, 2008]

Die Gene *tcaA* und *tcaB* kodieren für die A-Komponente des Toxinkomplexes. Dabei ist *tcaB*, das in *P. luminescens* 3570 Basenpaare (**base pairs**, bp) umfasst, in *Y. enterocolitica* W22703 durch eine Deletion von ca. 200 bp in zwei kleinere ORFs von jeweils 1058 bp (*tcaB1*) und 2309 bp (*tcaB2*) unterteilt. *tcaC*, welches für die Untereinheit B kodiert, enthält eine Leserasterverschiebung, die zu einem Stoppcodon führt. Die Expression einer funktionellen C-Domäne kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. *tccC*, welches für die C-Subunit kodiert, ist durch vier phagenverwandte Gene von den anderen *tc*-Genen getrennt. Den *tc*-Genen vorangestellt sind die beiden Gene *tcaR1* und *tcaR2*, deren Genprodukte eine signifikante Homologie zu Regulatoren der LysR-Familie aufweisen. Dabei zählt *tcaR1* nicht zur eigentlichen PAI, da es im Genom aller *Yersinia* spp. gefunden werden kann [Bresolin *et al.*, 2006a; Fuchs *et al.*, 2008].

BRESOLIN *et al.* und FUCHS *et al.* untersuchten das Vorkommen *tc*-homologer Gene auch in anderen *Y. enterocolitica*-Biovaren. Dabei konnten sie zeigen, dass die *tc*-Gene in Form der Tc-PAI_{ve} in den Biovaren 2 bis 5 vorkommt, nicht jedoch in den Biovaren 1A und 1B [Bresolin *et al.*, 2006a; Fuchs *et al.*, 2008]. Einzige Ausnahme bildet der *Y. enterocolitica*-Stamm T83, dessen Tc-Proteine in der Besiedlung des Gastrointestinaltraktes von Mäusen eine Rolle zu spielen scheinen [Tennant *et al.*, 2003]. Auch in anderen *Yersinia* spp., wie beispielsweise in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*, können insektizide Gene gefunden werden [Hinchliffe *et al.*, 2003; Hares *et al.*, 2008]. Hierbei sind die *tc*-Gene immer in Form einer PAI organisiert und an der gleichen Stelle des Genoms, zwischen den Genen YE3797 (*tcaR1*) und YE3798 (*tldD*), lokalisiert. Die Länge der PAI variiert zwischen den einzelnen *Yersinia* spp. und reicht von ca. 17 kb bis etwa 26 kb. Diese Varianz kommt hauptsächlich durch die unterschiedliche Anzahl an *tccC*-Genen zustande. Während beispielsweise *Y. enterocolitica*-Stämme der Biovare 2-5 in der Insel nur für ein *tccC*-Gen kodieren, sind in der Insel von *Y. pseudotuberculosis* vier *tccC*-homologe Gene lokalisiert [Waterfield *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2008].

Unterschiede innerhalb der *Yersinia* spp. zeigen sich auch in der Expression der insektiziden Gene. Während die *tc*-Gene von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* bei 37°C exprimiert werden [Hares *et al.*, 2008], erfolgt bei dieser Temperatur keine Transkription der Gene *tcaA* und *tcaB* von *Y. enterocolitica* W22703. Diese werden nur bei Temperaturen von 10-20°C exprimiert [Bresolin *et al.*, 2006a]. Diese Tatsache unterstützt die Annahme einer Aktivität der Toxine in der Umwelt und im Invertebraten, nicht jedoch im Menschen. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass nur Zellen, die bei moderaten Temperaturen angezogen wurden, letal für Insekten sind. Zellen, die bei 37°C kultiviert wurden, zeigen dagegen keine insektizide Wirkung mehr [Bresolin *et al.*, 2008]. Neben der insektiziden Aktivität besitzt *Y. enterocolitica* W22703 auch eine nematozide Aktivität gegen den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, die auf das Vorhandensein von *tcaA* zurückzuführen ist. So weist die *tcaA*-Deletionsmutante W22703 $\Delta tcaA$ keine insektizide und nematozide Aktivität mehr auf [Bresolin *et al.*, 2006a; Spanier *et al.*, 2010].

Die genauen Mechanismen der temperaturabhängigen Expressionskontrolle der insektiziden Gene *tcaA* und *tcaB* von *Y. enterocolitica* W22703 waren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht aufgeklärt. Die Genprodukte der beiden ORFs *tcaR1* und *tcaR2* weisen signifikante Homologien zu Transkriptionsfaktoren der LysR-Familie auf. Es wurde daher eine Beteiligung der beiden Proteine in der Regulation der kälteinduzierten Expression der *tc*-Gene vermutet.

1.2.1 LysR-ähnliche Regulatoren

Der *tc*-Gene von *Y. enterocolitica* W22703 sind die beiden Gene *tcaR1* und *tcaR2* vorangestellt, deren Genprodukte eine signifikante Homologie zu Proteinen der LysR-Familie transkriptioneller Regulatoren (*LysR-type transcriptional regulator*, LTTR) aufweisen [Bresolin, 2004]. Der Namensgeber der LysR-Familie ist der transkriptionelle Aktivator LysR aus *E. coli*. Dieser aktiviert die Expression von *lysA*, dessen Genprodukt Diaminopimelat zu Lysin decarboxyliert [Stragier *et al.*, 1983]. Die erste Beschreibung der LTTR erfolgte 1988, als neun funktionell ähnliche transkriptionelle Regulatorproteine aufgrund ihrer Aminosäuresequenzhomologie als eine neue Gruppe verwandter bakterieller Regulatoren unterschieden werden konnten [Henikoff *et al.*, 1988]. Die LTTR-Familie ist eine stetig wachsende Gruppe zumeist autoregulierter Transkriptionsregulatoren, die ihre Zielgene in der Regel positiv kontrollieren [Schell, 1993]. Heute bildet diese Proteinfamilie mit mehr als 40.000 potenziellen Mitgliedern die größte Gruppe von globalen bakteriellen Transkriptionsregulatoren [Knapp *et al.*, 2010]. Gene, die durch LTTR reguliert werden, sind unter anderem am Metabolismus, an der Zellteilung, am *Quorum sensing*, an der Virulenz, an der Bewegung und an der Sekretion involviert [Maddocks *et al.*, 2008]. Somit aktivieren LTTR die Transkription einer Vielzahl verschiedener Gene mit äußerst diversen Funktionen [Schell, 1993]. Dabei erfolgt die Aktivierung durch LTTR in der Gegenwart eines Koinduktors bis zu 200-fach [Schell, 1993]. Die Familie der LTTR besitzt strukturell viele Gemeinsamkeiten. Beide in dieser Arbeit beschriebenen Transkriptionsfaktoren weisen mit einer Länge von 309 (TcaR1) bzw. 288 (TcaR2) Aminosäureresten eine für LTTR charakteristische Größe auf [Schell, 1993]. Regulatorproteine werden der Familie der LTTR zugeordnet, wenn sie eine Übereinstimmung von mehr als 20% zu einem anderen Mitglied der LysR-ähnlichen Regulatoren aufweisen und im N-Terminus ein **Helix-turn-Helix** (HTH)-Motiv besitzen [Schell, 1993]. Beide Bedingungen treffen für TcaR1 und TcaR2 zu. N-terminal ist in beiden Proteinen jeweils eine HTH-DNA-Bindedomäne lokalisiert. Die ersten 66 Aminosäurereste, in denen sich eine solche Domäne befindet, sind hierbei hoch konserviert. Sie besteht aus drei Helices, wobei die erste Helix eine stabilisierende Funktion übernimmt, während die zweite und dritte Helix mit der DNA interagieren [Aravind *et al.*, 2005]. Im C-Terminus ist die Effektorbindestelle lokalisiert. Der C-terminale Bereich der LTTR ist weit weniger konserviert als die HTH-DNA-Bindedomäne im N-Terminus und ist mit dieser über eine Linker-

Helix verbunden. Der geringe Grad an Konservierung in diesem Bereich der LTTR ist wahrscheinlich darin begründet, dass die einzelnen Regulatoren verschiedene Effektoren, und somit auch unterschiedliche Effektorbindedomänen, für ihre Aktivität benötigen [Schell, 1993].

LTTR liegen häufig benachbart zum Zielgen und werden meist divergent dazu transkribiert. Durch diese Organisation erfolgt in aller Regel eine negative Autorregulation des Transkriptionsregulators [Schell, 1993]. LTTR fungieren oftmals als Tetramere, wodurch es ihnen möglich ist, lange DNA-Sequenzen zu überspannen [Hryniewicz *et al.*, 1994]. Sie binden an Promotoren ihrer Zielgene, die reich an den Basen Adenin (A) und Thymin (T) sind. Hierbei erfolgt die Bindung an eine palindromische DNA-Sequenz mit der minimalen Konsensussequenz T-N₁₁-A, die sich im Bereich um Position -65 in Bezug auf den jeweiligen Transkriptionsstartpunkt des Zielgenes befindet. Diese Sequenzabfolge wird als Erkennungsbindestelle (*recognition binding site*, RBS) bezeichnet [Schell, 1993]. Die LTTR binden häufig noch an eine zweite Region im Promotor des Zielgenes, die sich in der Nähe der -35 Region befindet (*activating binding site*, ABS). Es wird jedoch postuliert, dass die Bindung an diese Region nur in Anwesenheit des Effektors erfolgt [Schell, 1993]. Einem Modell von McFall zufolge besitzt ein LTTR-Dimer eine höhere Bindeaffinität zur RBS als zur ABS und bindet an diese effektorunabhängig. Daher werden im EMSA Fragmente, die nur eine ABS aufweisen, oftmals nicht gebunden [McFall *et al.*, 1998]. Dennoch ist die Bindung an die ABS notwendig, da Fragmente, die nur die RBS aufweisen, *in vitro* nicht transkribiert werden [Tropel *et al.*, 2004]. Ein zweites LTTR-Dimer könnte effektorabhängig an das erste Dimer binden und daraufhin mit der ABS interagieren [McFall *et al.*, 1998]. Einem weiteren Modell zufolge könnte das LTTR-Tetramer auch in Abwesenheit des Koinduktors an die beiden Regionen binden. Die Bindung des Effektors könnte wiederum zu einer Konformationsänderung des Tetramers und damit zu seiner Aktivierung führen [Tropel *et al.*, 2004]. In manchen Fällen kann sogar eine dritte LTTR-Bindestelle gefunden werden. Diese liegt hinter der ABS und im Fall von CatR, dem Regulator des *catBCA*-Operon von *Pseudomonas putida*, dessen Genprodukte im Katabolismus von Benzoat involviert sind, an der Position +162 bis +196 [Chugani *et al.*, 1998]. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Bindung von CatR an diese Region der Regulator austitriert und damit eine zu hohe Expression des *catBCA*-Operons verhindert wird. Daher wird diese Region auch als Inhibierungsbindestelle (*inhibitor binding site*, IBS) bezeichnet [Tropel *et al.*, 2004].

1.2.2 Holin/Endolysin

Innerhalb der insektiziden Pathogenitätsinsel werden die Gene *tcaC* und *tccC1* durch vier phagenverwandte ORFs voneinander getrennt. Diese kodieren für ein Holin und Endolysin sowie für zwei putative exportierte bzw. sekretierte Proteine [Bresolin *et al.*, 2006a; Reuter, 2008]. Die Organisation dieser Gene erinnert an eine klassische Lysekassette, wie sie in vielen doppelsträngigen DNA-Phagen gefunden werden kann. In diesem Zusammenhang ist die Kasette für die Lyse des Wirtsbakteriums durch Permeabilisierung der Membran und Degradation der Peptidoglykanschicht und damit für die Freisetzung der neu synthetisierten Phagen am Ende des vegetativen Zyklus verantwortlich [Young, 1992; Young *et al.*, 2000].

Holine wurden nach ihrer Fähigkeit benannt, kleine Löcher in der Zytoplasmamembran zu formen [Young, 1992]. Sie sind kleine Proteine mit einer stark hydrophoben und geladenen C-terminalen Domäne [Young *et al.*, 1995] und stellen mit mehr als 250 bekannten oder putativen Sequenzen eine sehr facettenreiche funktionelle Gruppe dar, die ihrerseits wiederum mehr als 50 orthologe Untergruppen bildet [Gründling *et al.*, 2001]. Anhand der Anzahl ihrer Transmembrandomänen können Holine in zwei große Gruppen eingeteilt werden [Young, 1992]. Klasse I-Holine, zu denen beispielsweise das Holin des λ -Phagen zählt, bestehen aus mindestens 87 Aminosäureresten und besitzen drei α -helikale Transmembrandomänen [To *et al.*, 2013]. Holine der Klasse II sind kleiner, haben maximal eine Größe von 78 Aminosäureresten und bilden nur zwei α -helikale Transmembrandomänen aus. Ein Beispiel für diese Holin-Klasse ist das S21-Holin des lambdoiden Phagen 21 [Blasi *et al.*, 1996]. Das Holin des Phagen T4 kann keiner der beiden Klassen zugeordnet werden und bildet eine Klasse für sich [Young *et al.*, 1995]. Es weist nur eine α -helikale Transmembrandomäne auf und besitzt einen sehr großen in das Periplasma gerichteten C-Terminus [Tran *et al.*, 2005]. Der C-Terminus aller Holine der Klassen I und II ist im Zytosol lokalisiert. Der N-Terminus der Klasse I-Holine befindet sich im Periplasma, wohingegen die N-terminale Domäne der Klasse II-Holine im Zytoplasma liegt [Young *et al.*, 2000]. Die Transmembrandomänen der einzelnen Holine interagieren sowohl intra- als auch intermolekular miteinander und katalysieren durch ihre Assemblierung zu oligomeren Molekülen die Ausbildung von Poren in der zytoplasmatischen Zellmembran [White *et al.*, 2011].

Um eine Pore zu bilden, die das Austreten eines ca. 15 kDa großen komplett gefalteten Proteins, wie z.B. eines Endolysins, durch die Zytoplasmamembran ermöglicht, müssen sich mindestens acht Holinmoleküle zu einem Oligomerkomplex zusammenfinden [Young *et al.*, 2000]. Auch wenn für das λ -Holin gezeigt werden konnte, dass es Homomere bildet, ist die genaue Struktur der Pore sowie deren eigentliche Entstehung noch nicht bekannt [Wang, 2006]. In dem allgemein anerkannten Modell von YOUNG *et al.* akkumulieren Holinproteine in der Zytoplasmamembran und bilden bei ausreichender Konzentration sogenannte Holinflöße aus. Die Transmembrandomänen der einzelnen Holine können lateral miteinander wechselwirken und es kommt zur Entstehung kleinerer Löcher in der Membran.

Diese führen zur Erniedrigung des Membranpotentials und zur schlagartigen Bildung großer Poren. Dadurch ist es dem Endolysin möglich, die zytoplasmatische Membran zu passieren und zur Peptidoglykanschicht vorzudringen. Das Resultat ist die Lyse der Wirtszelle und die Freisetzung der neu synthetisierten Phagen [Young *et al.*, 2000; White *et al.*, 2011].

Die Gruppe der Holine ist sehr heterogen und zwischen den verschiedenen Vertretern existieren fast keine signifikanten Homologien. Ausnahmen lassen sich einzig in einzelnen Phagen von taxonomisch sehr nah verwandten Bakterien finden [Young *et al.*, 2006]. Proteine mit signifikanter Homologie zu dem Holin aus *Y. enterocolitica* W22703 stammen aus *Y. enterocolitica* T83, *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*. Hierbei sind die Proteine immer in einer insektiziden Pathogenitätsinsel lokalisiert und von einem Endolysin flankiert [Reuter, 2008]. In 86% der Fälle sind Holine in einem dualen Gencluster mit Endolysin im Phagengenom organisiert [Young *et al.*, 2000]. Nachdem durch das Holin in der zytoplasmatischen Membran Poren gebildet wurden, können Endolysine, die vollständig gefaltet im Zytoplasma vorliegen, an die Zellwand gelangen, wo sie die hydrolytische Spaltung einer Bindung im Peptidoglykan katalysieren [Young, 1992]. Endolysine lassen sich entsprechend ihres Angriffspunktes im Peptidoglykan in folgende Gruppen einteilen: Glykosidasen, auch Muramidase oder Lysozyme genannt, Transglykosylasen sowie Amidase und Endopeptidasen. Während Glykosidasen die glykosidischen Bindungen in der Mureinschicht spalten, spalten Amidase und Endopeptidasen die Peptidvernetzungen [Young *et al.*, 2000]. Mit Ausnahme der Transglykosylasen gehören alle Endolysine zu den Hydrolasen [Loessner, 2005].

Das 133 Aminosäurereste große Endolysin von *Y. enterocolitica* W22703 weist mit einer Identität von 77% sowie einem Erwartungswert (E-Wert) von $1 \times e^{-73}$ eine signifikante Homologie zu einer M15-Peptidase aus *Y. pseudotuberculosis* auf. In anderen *Yersinia* spp. können ebenfalls putative Endolysine mit signifikanter Homologie gefunden werden. Hierbei scheint vor allem der C-Terminus hoch konserviert zu sein. Endolysine müssen zwei grundlegende Funktionen ausführen: die Substraterkennung und die enzymatische Spaltung des Substrates. Die N-terminale Domäne vermittelt die katalytische Aktivität, während die C-terminale Domäne (**cell wall binding domain**, CBD) der Zellwand- und somit der Substraterkennung dient [Loessner, 2005]. Sequenzvergleiche von Enzymen derselben funktionellen Gruppe haben gezeigt, dass die katalytische Region hochkonserviert und im Gegensatz dazu die C-terminale Region variabel ist [Fischetti, 2005]. Für die meisten Endolysine wurde eine hohe Substratspezifität beschrieben. Die CBD bindet spezifisch an ein Substrat im Peptidoglykan der Wirtszelle, was zur Ausrichtung der enzymatisch aktiven Domäne zur Angriffsstelle und damit zu einer effizienten Hydrolyse führt. Folglich wird die Spezifität der Endolysine weitgehend durch die CBD vermittelt, da ohne direkte Bindung an das Substrat keine Hydrolyse möglich ist [Loessner *et al.*, 1995; Loessner, 2005].

Endolysine besitzen in der Regel einen modularen Aufbau. Dieser bietet die Möglichkeit, durch den Austausch einzelner Proteindomänen die Aktivität oder Stabilität der Endolysine auf den jeweiligen Wirt zu optimieren [Borysowski *et al.*, 2006]. Bakteriophagen passen sich durch den modularen Aufbau von Proteinen und der damit verbundenen Möglichkeit zur Konstruktion neuer chimärer Proteine besser an Mutationen oder veränderte Umweltbedingungen an [Diaz *et al.*, 1991]. Trotz ihrer konservierten biologischen Funktion sind Endolysine aus Phagen enzymatisch und architektonisch sehr divers und variieren stark hinsichtlich der Länge und Größe [Oliveira *et al.*, 2013] und nur Endolysine von Phagen gleicher Wirte zeigen viele strukturelle Ähnlichkeiten [Borysowski *et al.*, 2006].

Obwohl Endolysine eine gewisse Heterogenität in ihrer Aktivität und Struktur aufweisen, war bis jetzt jedes getestete Holin/Endolysin-Paar funktional [Young *et al.*, 2000]. Die Überexpression von Holin/Endolysin aus der insektiziden Pathogenitätsinsel von *Y. enterocolitica* W22703 führte ebenfalls zur Zelllyse von *E. coli* [Reuter, 2008] und beweist auch in diesem Fall die Funktionalität beider Proteine. Dabei ist das Endolysin auf die vom Holin gebildeten Poren in der Zytoplasmamembran angewiesen, um zum Substrat vorzudringen [Young *et al.*, 1995].

Die Lysekassette von *Y. enterocolitica* W22703 kodiert noch für zwei weitere phagenverwandte Gene. Diese besitzen jedoch keine signifikanten Homologien zu bereits annotierten Genen und weisen keine konservierten Domänen auf [Reuter, 2008]. Proteine mit ähnlicher Sequenz können auch in anderen *Yersinia* spp., wie beispielsweise in *Y. mollaretti* und *Y. pestis*, gefunden werden, aber auch hier ist deren Funktion nicht bekannt. Eine klassische Lysekassette von doppelsträngigen DNA-Phagen besteht ebenfalls aus vier Genen [Young *et al.*, 2000]. Die Lysekassette von λ -Phagen kodiert neben Holin und Endolysin noch für die zwei Proteine Rz1 und Rz2. Die beiden Gene *rz1* und *rz2* kodieren für membranständige Proteine, deren Rolle in der Zelllyse noch unklar ist. Es wird davon ausgegangen, dass die Proteine in der Spaltung der Oligopeptidbindung zwischen dem Peptidoglykan und dem Lipoprotein Lpp der äußeren Zellmembran involviert sind [Zhang *et al.*, 1999]. REUTER konnte in ihrer Masterarbeit zeigen, dass die Überexpression der vollständigen Lysekassette im Vergleich zur alleinigen Überexpression von Holin und Endolysin zu einem veränderten Lyseprofil führt [Reuter, 2008]. Dies lässt auf eine Beteiligung der beiden Gene in der Zelllyse, beispielsweise in der Feinabstimmung, schließen. Welche Rolle sie dabei genau einnehmen, muss jedoch noch geklärt werden.

1.2.3 Evolution der Tc-PAI

Die insektiziden Gene der verschiedenen *Yersinia* spp. sind in Form einer PAI angeordnet. Daher sollen im nachfolgenden Abschnitt charakteristische Merkmale einer PAI anhand der insektiziden PAI von *Yersinien* aufgezeigt und ihr mögliche Evolution skizziert werden.

Das Genom von Prokaryonten besteht aus einem konservierten Kerngenom, in welchem ein flexibler Anteil genetischer Informationen eingebettet ist. Diese variablen Bereiche bestehen beispielsweise aus integrierten Plasmiden, Bakteriophagen, Transposons oder Insertionssequenzen (IS-Elementen) [Hacker *et al.*, 2001]. Daneben können klar abgegrenzte größere DNA-Bereiche gefunden werden. Diese DNA-Regionen gehören aufgrund ihres abweichenden G+C-Gehaltes nicht zum Kerngenom, kodieren zum Teil für mehrere Virulenzfaktoren und werden als **Genominseln** (GEI) bezeichnet [Knapp *et al.*, 1986]. In Abhängigkeit der Gene, welche in der GEI lokalisiert sind, können sie zur Pathogenität (in Form von Pathogenitätsinseln), zur Fitness, zur Resistenz oder zum Metabolismus beitragen [Dobrindt *et al.*, 2004]. PAIs kommen in pathogenen Stämmen vor, nicht jedoch in avirulenten. Sie weisen eine Größe von mindestens 10 kb auf und kodieren für wenigstens einen Virulenzfaktor. Im Vergleich zum Kerngenom besitzen sie einen unterschiedlichen G+C-Gehalt, sind häufig durch Fragmente mobiler genetischer Elemente begrenzt und sind zumeist instabil [Hacker *et al.*, 1997].

Trotz ihrer Diversität besitzen die Tc-Proteine nur drei Basis-Elemente (A, B und C), was darauf schließen lässt, dass alle drei Komponenten für eine vollständige insektizide Aktivität notwendig sind [Waterfield *et al.*, 2001b]. Dennoch weisen die einzelnen *tc*-Gene der unterschiedlichen Spezies kaum Sequenzähnlichkeiten auf. Einzig auf Proteinebene sind gewisse Homologien auszumachen [Waterfield *et al.*, 2001b]. Die Aminosäuresequenzen der Tc-Proteine von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* weisen eine Ähnlichkeit von 97% auf. Zu den Tc-Proteinen von *P. luminescens* kann dagegen nur eine Ähnlichkeit von 35-70% gefunden werden [Hares *et al.*, 2008]. Viele der *tc*-Loki weisen Charakteristika eines horizontalen Gentransfers auf. So ist beispielsweise der *tcd*-Lokus von *P. luminescens* in unmittelbarer Nähe von tRNA-Genen lokalisiert, welche als „Hotspots“ für die Integration von mobilen genetischen Elementen gelten [Reiter *et al.*, 1989; Williams, 2002], und beinhaltet phagenverwandte Gene wie *ner*-Gene [Waterfield *et al.*, 2001b]. Der horizontale Gentransfer kann dabei durch konjugative Übertragung, phagenvermittelte Transduktion oder Transfer und Einbau freier DNA erfolgen. In der Literatur konnte insbesondere die Übertragung von Virulenzgenen durch Bakteriophagen mehrfach gezeigt werden [Cheetham *et al.*, 1995; Waldor *et al.*, 1996].

In *S. entomophila* sind die insektiziden Gene *sepA*, *sepB* und *sepC* auf dem Plasmid pADAP lokalisiert [Dodd *et al.*, 2006], allerdings kommt das Plasmid nicht in allen *Serratia* spp. vor. Es gibt Stämme, die zwar das Plasmid tragen, denen allerdings die *sep*-Gene fehlen; andere Stämme wiederum tragen zwar die *sep*-Gene, es kommt jedoch zu keiner DNA-Hybridisierung des restlichen Plasmides [Dodd *et al.*,

2006]. In *Y. frederiksenii* sind die *tc*-Gene ebenfalls auf einem Plasmid lokalisiert. Die beiden Komponenten A und B besitzen mit 88% bzw. 87% eine große Ähnlichkeit zu den beiden Genen *sepA* und *sepB* von *S. entomophila*. Einzig die C-Komponenten beider Spezies weisen keine Homologien zueinander auf [Dodd *et al.*, 2006]. Die große Ähnlichkeit der A- und B-Komponenten deutet auf eine mögliche Übertragung der *tc*-Gene durch ein konjugatives Plasmid hin [Dodd *et al.*, 2006]. Damit wären die *tc*-Gene hoch mobil und könnten zwischen verschiedenen Bakterienarten transferiert werden. Obwohl die insektiziden Gene in einer Vielzahl unterschiedlicher Bakterienspezies gefunden werden können, gehen HINCHLIFF *et al.* davon aus, dass die Übertragung zunächst zwischen Organismen stattfand, die die gleiche Nische besiedeln [Hinchliffe *et al.*, 2010]. So argumentieren beispielsweise DODD *et al.*, dass die Übertragung der *sep*-Gene von *S. entomophila* auf *Y. frederiksenii* im Insekt stattgefunden haben könnte. So kann *Y. frederiksenii* zwar auch aus dem Grashüpfer *Costelytra zealandica* isoliert werden [Stucki *et al.*, 1984], zeigt jedoch im Gegensatz zu *S. entomophila* keine toxische Aktivität gegenüber diesem, was vermutlich auf die unterschiedlichen C-Komponenten beider Spezies zurückzuführen ist [Dodd *et al.*, 2006]. Das ubiquitäre Vorkommen von *Y. frederiksenii*, so auch im Wasser und Boden [Botzler, 1987], könnte zu einer Ausbreitung der *tc*-Gene geführt haben. Ähnlichkeiten zum pADAP-Plasmid von *S. entomophila* lassen sich auch im Genom von *P. luminescens* finden [Hurst *et al.*, 2000]. Neben den *tc*-Genen, welche eine große Übereinstimmung zu den *sep*-Genen besitzen, weist die *Photorhabdus* Virulenz-Kassette (**Photorhabdus virulence cassette, PVC**) Homologien zu dem Prophagenlokus des pADAP-Plasmides auf [Yang *et al.*, 2006]. Nach der Aufnahme der *tc*-Gene durch das Plasmid pADAP könnten sich die insektiziden Gene als PAI ins Genom von *P. luminescens* integriert haben. Im Allgemeinen wird in der Literatur davon ausgegangen, dass PAIs aus verschiedenen mobilen genetischen Elementen zusammengesetzt sind, die während der Evolution unabhängig voneinander aufgenommen wurden. Durch ortsspezifische Rekombination am 3'-Ende von tRNA-Genen kommt es zur Integration von Bakteriophagen oder Plasmiden in das bakterielle Chromosom und damit zur Entstehung von PAIs. Diese PAI-Vorläufer können sich durch die Aufnahme weiterer mobiler genetischer Elemente wie Plasmide, Phagengene, IS-Elemente oder Transposons weiterentwickeln [Dobrindt *et al.*, 2004]. Bringt eine so entstandene PAI einen Selektionsvorteil für den Wirt mit sich, kommt es anschließend zu einer Stabilisierung der integrierten DNA. Diese ist in der Regel mit einer Größenreduktion verbunden, bei der Gene für die autonome Replikation oder den Transfer der mobilen genetischen DNA durch Deletionen oder Punktmutationen inaktiviert werden [Hacker *et al.*, 1997; Dobrindt *et al.*, 2004]. Der *tcd*-Lokus von *P. luminescens* stellt ein Beispiel für eine solche PAI dar. Er ist der größte der vier *tc*-Loki dieses Bakteriums und besteht aus folgenden Genen: *tcdA1-tcdA4*, *tcdB1-tcdB2* und *tccC2-tccC5* [Waterfield *et al.*, 2002; Duchaud *et al.*, 2003]. In *P. asymbiotica* ist der *tcd*-Lokus dagegen auf zwei *tcdA*-Gene, ein *tcdB*-Gen sowie zwei *tccC*-Fragmente reduziert [Wilkinson *et al.*, 2009]. Die Neuordnung der *tc*-Gene in verschiedenen *Photorhabdus* spp.

sowie die Deletionen und Duplikationen einiger Gene deuten darauf hin, dass sich die insektizide PAI noch im Prozess der Stabilisierung befindet [Waterfield *et al.*, 2002].

Neben *Y. frederiksenii* können *tc*-Homologe noch in anderen *Yersinia* spp., wie beispielsweise in *Y. enterocolitica* W22703, *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*, gefunden werden. Interessanterweise sind diese nicht auf einem Plasmid lokalisiert und weisen auch sonst keine signifikante Ähnlichkeit zu den *sep*-Genen von *S. entomophila* auf [Waterfield *et al.*, 2007]. Die Tc-PAI_{Ye} der verschiedenen *Yersinia* spp. ist in einem hoch konservierten Bereich des Genoms, zwischen den Genen YE3797 (*tcaR1*) und YE3798 (*tldD*), lokalisiert und zeigt in der Regel die gleiche strukturelle Organisation. Vor allem in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* liegen die beiden *tc*-Operons nahezu klonal vor. Aufgrund der hohen Übereinstimmung (97%) postulieren WATERFIELD *et al.*, dass die Aufnahme der Tc-PAI_{Ye} vor der Trennung der beiden Spezies vor ca. 20.000 Jahren erfolgte [Waterfield *et al.*, 2007]. Die insektizide Pathogenitätsinsel von *Y. mollaretti* weist eine 90%ige Übereinstimmung zu der aus *Y. pseudotuberculosis* auf [Chen *et al.*, 2010]. Dies deutet darauf hin, dass sich *Y. mollaretti* erst nach der Aufnahme des *tca*-Operons von *Y. pseudotuberculosis* abgespalten hat. Die Tc-PAI_{Ye} fehlt jedoch in einer Vielzahl von *Yersinia* spp., wie beispielsweise in *Y. bercovieri*, *Y. intermedia* und *Y. enterocolitica* 8081. Damit könnte sie nicht der Gattung *Yersinia* angestammt sein [Waterfield *et al.*, 2007]. FUCHS *et al.* postulieren dagegen, dass die Insel bereits sehr früh in der evolutionären Phase der Yersinien aufgenommen wurde. Diese Annahme wird dadurch bekräftigt, dass die Insel in den verschiedenen *Yersinia* spp. in einer hoch konservierten Region des *Yersinia*-Genoms inseriert ist. Dies deutet auf ein einziges, in der Evolution sehr früh stattgefundenes Ereignis des horizontalen Gentransfers hin, eventuell unter Beteiligung der in der Insel lokalisierten phagenverwandten Gene [Fuchs *et al.*, 2008].

Die Tc-Proteine von *Y. enterocolitica* zeigen eine starke Variabilität und geben damit Hinweise auf ihre Mannigfaltigkeit. So konnten FUCHS *et al.* zeigen, dass die Tc-Proteine aus *Y. enterocolitica* W22703 eine insektizide und nematozide Wirkung besitzen [Bresolin *et al.*, 2006a; Spanier *et al.*, 2010]. Die Tc-Proteine aus *Y. enterocolitica* T83 spielen dagegen eine wichtige Rolle in der Virulenz gegenüber von Mäusen [Tennant *et al.*, 2005]. Dieses Beispiel zeigt, dass sich die Tc-Proteine an den Lebensstil der Bakterien angepasst haben [Hinchliffe *et al.*, 2010]. Neben einer differenzierten Regulation -die Expression der *tc*-Gene in *Y. enterocolitica* T83 erfolgt bei 37°C [Tennant *et al.*, 2005], während die *tc*-Gene von *Y. enterocolitica* W22703 bei dieser Temperatur reprimiert werden [Bresolin *et al.*, 2006a]- zeigen die PAIs der unterschiedlichen *Yersinia* spp. eine gewisse Degeneration. So besitzt beispielsweise *tcaC* von *Y. enterocolitica* W22703 eine Leserasterverschiebung und *tcaB* ist in zwei ORFs unterteilt [Bresolin *et al.*, 2006a]. Dies könnte eine Anpassung an unterschiedliche Wirte der Subphyla Invertebraten und Vertebraten darstellen und unterstützt die von PINHEIRO *et al.* aufgestellte

Theorie einer divergenten Evolution der *tc*-Gene in den verschiedenen Mikroorganismen [Pinheiro *et al.*, 2007].

Obwohl phylogenetische Analysen bestätigen, dass die *tc*-Gene von *Yersinia* spp. in Form einer PAI über horizontalen Gentransfer erworben wurden, lassen sich nur Vermutungen über die Art und Weise des Transfers aufstellen [Waterfield *et al.*, 2001b]. So wurden die *tc*-Gene eventuell zunächst über ein konjugatives Plasmid, wie dem pADAP von *S. entomophila*, auf Organismen übertragen, die die gleiche Nische besiedelten. Nach dem Transfer auf *Y. frederiksenii*, einem ubiquitär vorkommenden Mikroorganismus, könnten die *tc*-Gene auch auf in Boden und Wasser vorkommende Organismen übertragen worden sein. Heutzutage lassen sich die einzelnen Tc-Komponenten nicht nur in Insekten-assoziierten Organismen finden, sondern auch in einer Vielzahl von Bakterien, für die kein Insektenstadium im Lebenszyklus bekannt ist. Neben *Rodococcus*, *Desulfotomaculum* und *Ralstonia* sind selbst im Genom des pflanzenpathogenen Pilzes *Giberella* genetische Fusionen zwischen der B- und C-Komponente detektierbar [Hinchliffe *et al.*, 2010]. Die Tc-PAIs könnten jedoch nicht nur von integrierten Plasmiden abstammen, sondern auch von Phagen, die die Gene für die Replikation und Selbstübertragung verloren haben [Dobrindt *et al.*, 2004]. Dies würde das Vorhandensein einer Lysekassette mit den phagenverwandten Genen Holin und Endolysin in den verschiedenen *Yersinia* spp. erklären. Für einige PAIs konnte bereits eine Übertragung mittels Helferphagen gezeigt werden. Hierzu zählen die **Vibrio-Pathogenitätsinsel** (VPI, **Vibrio pathogenicity island**) von *Vibrio cholera* [O'Shea *et al.*, 2002], die „**pathogenicity island 1**“ von *Staphylococcus aureus* (SaPI1) [Ruzin *et al.*, 2001] sowie die die HPI von *Y. pseudotuberculosis* [Lesic *et al.*, 2005].

Der Transfer von PAIs trägt zur bakteriellen Evolution bei und ermöglicht eine rapide und effiziente Eroberung neuer ökologischer Nischen [Dobrindt *et al.*, 2004]. Dafür ist eine stringente Regulation der (Virulenz-) Gene notwendig. Bereits 2006 konnte gezeigt werden, dass H-NS eine Schlüsselrolle in der Repression von horizontal erworbenen Genen unter normalen Wachstumsbedingungen spielt [Oshima *et al.*, 2006]. So konnte beispielsweise für *Salmonella* spp. gezeigt werden, dass H-NS bevorzugt an horizontal erworbene Gene mit einem geringen G+C-Gehalt bindet und damit einen Defensivmechanismus gegen fremde DNA darstellt. Eine stabile Übertragung von PAIs wird dadurch zwar ermöglicht, was zu einer Diversifikation des Genoms führt, schädliche Konsequenzen, welche durch die unkontrollierte Expression neu erworbener Gene resultieren könnten, werden durch die Repression jedoch vermieden [Navarre *et al.*, 2006].

1.3 Zielsetzungen dieser Arbeit

Die Expression der meisten Virulenz-assoziierten Gene erfolgt nicht konstitutiv, sondern wird durch das Eindringen in den Wirtsorganismus oder durch bestimmte Umweltsignale, wie beispielsweise der Temperatur, dem pH-Wert, der Osmolarität oder der Verfügbarkeit von Nährstoffen, reguliert [Mekalanos, 1992]. Dabei reagiert die Bakterienzelle auf veränderte Umweltbedingungen mit einer koordinierten Expression ihrer Gene. Die Regulation dieser kann auf transkriptioneller, translationaler und post-translationaler Ebene stattfinden. Bei Prokaryoten erfolgt sie überwiegend durch spezifische Regulatorproteine auf Ebene der Transkription. Hierbei wirken meist mehrere Regulatoren auf die Expression eines (Virulenz-) Genes, was zu einer gegenseitigen Verstärkung oder Hemmung führen kann, wodurch eine Feinabstimmung der Expression erzielt wird [Platt, 1986; McCarthy *et al.*, 1990; Mata *et al.*, 2005].

Für Humanpathogene ist die Körpertemperatur das Signal für eine erfolgreiche Infektion des Wirtes. Infolgedessen werden einige Virulenzfaktoren nur bei 37°C produziert. Im Gegensatz dazu gibt es nur wenige Beispiele für Virulenzfaktoren, die bei moderaten Temperaturen synthetisiert werden. Eines dieser Beispiele ist die Expression der *tc*-Gene der insektiziden Pathogenitätsinsel Tc-PAI_{ye} von *Y. enterocolitica* W22703. Die maximale Expression der Gene *tcaA* und *tcaB* erfolgt nur bei Temperaturen zwischen 10-20°C. Bei 37°C ist die Expression dagegen vollständig reprimiert [Bresolin *et al.*, 2006a].

In vorliegender Arbeit sollte zunächst die temperaturabhängige Expression der *tc*-Gene auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Da den *tc*-Genen von *Y. enterocolitica* W22703 zwei Gene vorangestellt sind, die für Transkriptionsregulatoren der LysR-Familie kodieren, sollte zunächst deren Einfluss auf die *tcaA*-Expression untersucht werden. Im nächsten Schritt sollten dann weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Expression der *tc*-Gene bei unterschiedlichen Temperaturen haben.

Anschließend sollte die Sekretion der hochmolekularen insektiziden Proteine aus der Zelle *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Hierzu wurde vor allem eine mögliche Beteiligung der Lyseproteine Holin und Endolysin in der Ausbildung der insektiziden bzw. nematoziden Aktivität von *Y. enterocolitica* in dem Modellorganismus *C. elegans* analysiert.

Die nähere Charakterisierung der Expression der *tc*-Gene sowie der Freisetzung des insektiziden Toxin Komplexes von *Y. enterocolitica* W22703 sollte dazu beitragen, einen tieferen Einblick in die komplexen Regulationsmechanismen des temperaturgesteuerten Oszillierens von *Y. enterocolitica* zwischen den zwei verschiedenen Pathogenitätsphasen, der Infektion von Invertebraten bzw. von Säugetieren, zu geben.

2 Material und Methoden

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Materialien und Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen und hatten *pro analysi* (p.A.)-Qualität. Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer MilliQ-Anlage (Millipore, Eschborn, Deutschland) hergestellt und gegebenenfalls autoklaviert oder mit einem Membranfilter sterilfiltriert (Millipore). Verbrauchsmaterialien waren Produkte der Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) oder von VWR (Darmstadt, Deutschland).

Eine detaillierte Auflistung der benutzten Chemikalien befindet sich im Anhang in der Tabelle Tab. A 1.

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Bakterienstämme sind im Anhang in Tab. A 2 aufgeführt.

2.1.2 Kulturbedingungen, Antibiotika und Medien

Für die Herstellung einer **über-Nacht-Kultur** (üNK) wird, ausgehend von einem Einzelkolonieausstrich, eine Kolonie in 10 ml Luria Bertani (LB)-Medium resuspendiert und aerob bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (*Y. enterocolitica*) bei 180 Umdrehungen **pro Minute** (UpM) inkubiert. Zur Selektion rekombinanter Stämme werden dem Medium entsprechende Antibiotika zugesetzt (Tab. 1 und Tab. A 3).

Tab. 1: In dieser Studie verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin (Amp)	MilliQ	50	100
Chloramphenicol (Cm)	100% Ethanol	10	20
Kanamycin (Km)	MilliQ	50	50
Nalidixinsäure (Nal)	MilliQ	10	20
Rifampicin (Rif)	100% Methanol	50	100
Streptomycin (Strp)	MilliQ	50	50
Tetrazyklin (Tet)	70% Ethanol	12	12

Die Medien werden nach den aufgeführten Rezepten zusammengestellt und für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Für die Herstellung von Agar wird das Medium vor dem Autoklavieren mit jeweils 1,5% (Masse/Volumen; *weight/volume*, w/v) Agar versetzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C werden den Medien bzw. dem Agar weitere Zusätze, wie Antibiotika, steril zugegeben.

<u>LB-Medium</u> [Bertani, 1951]	10 g	Trypton aus Casein
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
		ad 1000 ml MilliQ
		autoklavieren (121°C, 20 min)
<u>Minimal-Medium (MM)</u> [Sambrook <i>et al.</i> , 2001]	440 ml	MilliQ
	50 ml	10x M9-Salze
	1 ml	1 M MgSO ₄
	5 ml	20% (w/v) Glucose bzw. 20% (w/v) Arabinose bzw. 20% (w/v) Saccharose
	50 µl	1 M CaCl ₂
	1,25 ml	5% (w/v) Caseinhydrolysat (<i>casamino acids</i> , CAA)
<u>10x M9-Salze</u> [Sambrook <i>et al.</i> , 2001]	70 g	Na ₂ HPO ₄
	30 g	KH ₂ PO ₄
	5 g	NaCl
	10 g	NH ₄ Cl
		ad 1000 ml MilliQ
		sterilfiltrieren

2.1.3 Einfrieren von Bakterien

Für die langfristige Lagerung von Bakterienstämmen werden 900 µl der entsprechenden üNK mit 600 µl 50% (Volumen/Volumen; *volume/volume*, v/v) Glycerin vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Plasmide und Vektoren

Die Tabelle Tab. A 4 im Anhang gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren.

2.2.2 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Plasmidisolierung

Die Präparation von Plasmiden unterliegt dem Prinzip der alkalischen Zellyse und anschließender chromatographischer Aufreinigung über eine Anionenaustauschersäule. In dieser Arbeit erfolgte die Präparation von Plasmid-DNA entweder aus 5 ml einer üNK mit Hilfe des *GeneElute™ Plasmid MiniPrep-Kits* (Sigma-Aldrich) oder, wenn größere Mengen an Plasmid-DNA (bis 100 µg) benötigt wurden, aus 400 ml üNK mittels *Plasmid Midi-Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Aufreinigung wird entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt nach einer einminütigen Inkubationszeit mit 30-50 µl 55°C warmen, entsalzten Wassers. Nach der Bestimmung der Konzentration mit Hilfe des NanoDrops (2.2.2.4) wird die Plasmid-DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *Yersinia* spp.

Für die Isolierung chromosomaler DNA aus *Yersinia* spp. werden 1,5 ml einer üNK für 20 min bei 13.200 UpM und Raumtemperatur (RT) pelletiert und in 400 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysozym (10 mg/ml, siehe auch Tab. A 5) wird der Reaktionsansatz für 15 min auf Eis gestellt. Anschließend werden 10 µl 10% Sodiumdodecylsulfat (SDS) sowie 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei 55°C unter ständigem Rotieren im Hybridisierungssofen (Micro-4, Thermo Scientific) inkubiert. Am nächsten Tag wird die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt und mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze zunächst in 96% (v/v) und anschließend in 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Trocknung bei 37°C wird die DNA in 150 µl bidestilliertem Wasser mit 1 µl RNase A (10 mg/ml) resuspendiert, die Konzentration bestimmt (2.2.2.4) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

<u>Lysepuffer</u>	100 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	5 mM	EDTA
	200 mM	NaCl

2.2.2.3 RNA-Isolation aus *Yersinia* spp.

Das Prinzip der Präparation von Ribonukleinsäuren (**Ribonucleic acid**, RNA) beruht auf einer einfachen Phenolextraktion. Bei Verwendung von Trizol, einem Gemisch aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, bleiben Proteine, Lipide und DNA in der organischen Phase, während die RNA in der wässrigen Phase gelöst ist.

RNA ist besonders anfällig gegenüber Degradation. Deswegen wurden alle verwendeten Lösungen mit bidestilliertem Wasser angesetzt, das zuvor mit **Diethylpyrocarbonat** (DEPC) behandelt wurde. Dazu werden 1 ml DEPC zu einem Liter Wasser gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das verbliebene DEPC wird am nächsten Tag durch Autoklavieren (20 min bei 121°C) inaktiviert.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA werden 50 ml einer *Yersinia*-Kultur bis zur gewünschten optischen Dichte bei **600** nm (OD₆₀₀) bei 15°C, 30°C oder 37°C und 180 UpM inkubiert. Die Zellen werden durch anschließende Zentrifugation bei gleicher Inkubationstemperatur für 10 min und 7.000 UpM pelletiert. Das Pellet wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80°C aufbewahrt.

Zur RNA-Präparation wird das Bakterienpellet auf Eis aufgetaut, in 1 ml Trizol resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß mit Schraubverschluss, das mit ca. 100 µl 0,1 mm Silica-Beads gefüllt ist, überführt. Die anschließende Zellyse findet im *Ribolyser* (FastPrep®-24, MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) statt. Hierzu werden die Zellen dreimal für 45 sec bei 6.500 UpM aufgeschlossen [Jakob *et al.*, 2007]. Zwischen jedem Ribolyseschritt wird das Eppendorfgefäß für eine Minute auf Eis inkubiert. Nach dem Zellaufschluss werden die Silica-Beads durch Zentrifugation abgetrennt (3 min bei 13.200 UpM und 4°C) und der Überstand wird in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand werden 200 µl Chloroform gegeben. Die Suspension wird etwa 15 sec kräftig geschüttelt und im Anschluss 5 min bei RT inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 15 min bei 13.200 UpM und 4°C zur Phasenseparation. Dabei entstehen eine untere rote Phenol/Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die wässrige Phase, welche die RNA enthält, wird vorsichtig abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgt durch Zugabe von 500 µl Isopropanol. Der Ansatz wird für 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 4°C für 10 min bei 13.200 UpM zentrifugiert. Nach dem Überstand verworfen wurde, wird das RNA-Präzipitat als gelartiges Sediment sichtbar. Die RNA wird daraufhin mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 7.500 UpM und 4°C für 5 min pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die RNA wird für 10-20 min an der Luft getrocknet und abschließend in 80 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Oftmals befinden sich DNA-Rückstände in der RNA-Präparation, was besonders bei der Analyse der Transkriptmenge durch quantitative Echtzeit PCR (**quantitative real time polymerase chain reaction**, qRT-PCR, 2.2.4.2) unerwünscht ist. Daher wurde in vorliegender Arbeit ein DNA-Verdau angeschlossen.

Hierzu werden zu den 80 µl RNA 10 µl RQ1 RNase-freie DNase (1 U/µl) und 10 µl 10x RQ1 RNase-freier DNase-Puffer (beides Promega, Fitchburg, Massachusetts, USA) gegeben und der Ansatz wird für 45 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Um die DNase wieder zu entfernen, werden dem Ansatz 100 µl Chloroform hinzugegeben. Die Suspension wird 15 sec kräftig geschüttelt und zur Phasenabtrennung 15 min bei 4°C und 13.200 UpM zentrifugiert. Die obere wässrige Phase (ca. 80 µl) wird in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zellbestandteile und restliche DNA werden durch die Verwendung des *RNeasy® Mini-Kits* (Qiagen) entfernt. Hierzu wird die RNA auf 100 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und mit 350 µl RLT-Puffer und 250 µl 100% Ethanol versetzt. Der Ansatz wird auf eine QIAshredder™-Säule in einem 2 ml Eppendorfgefäß pipettiert und für 2 min bei 13.200 UpM und RT zentrifugiert. Anschließend werden auf die Säule 80 µl DNaseI-Inkubationsmix, bestehend aus 10 µl DNaseI und 70 µl Puffer, aufgetragen und 15 min bei RT inkubiert. Zum Waschen werden 350 µl des Puffers RW1 auf die Säule gegeben und für 30 sec bei 13.200 UpM und RT zentrifugiert. 500 µl des zweiten Waschpuffers (RPE) werden auf die Säule pipettiert und für 2 min bei RT und 13.200 UpM zentrifugiert. Um die Säule vollständig von RPE-Pufferresten zu befreien, wird nochmals für 1 min bei 13.200 UpM zentrifugiert. Zur Elution der RNA werden zweimal je 15 µl RNase-freies Wasser auf das Säulenmaterial pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und abschließend für 1 min bei 13.200 UpM zentrifugiert. Zur Überprüfung der Qualität und Quantität der isolierten RNA, wird diese auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (2.2.3). Die Analyse der Konzentration erfolgt mit Hilfe des NanoDrops (2.2.2.4). Zusätzlich wird die Abwesenheit von DNA mit einer Kontroll-PCR nachgewiesen (2.2.4.1). Die RNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäureproben wird spektrophotometrisch mit Hilfe des NanoDrops ND-1000 (Thermo Scientific) durch Messung einer 1 µl Probe gegen bidestilliertes Wasser bestimmt. Dabei werden die Extinktionen bei 260 nm (Absorptionsbereich von Nukleinsäuren), bei 230 nm (Absorptionsbereich von Salzen) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) betrachtet. Die Reinheit der Nukleinsäuren errechnet sich als Quotient von $A_{260/280}$ und von $A_{260/230}$. Das Verhältnis von 260/280 liegt für reine DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0. Kleinere Werte weisen auf Kontaminationen mit Proteinen und Phenol hin. Das Verhältnis von 260/230 sollte für reine Nukleinsäuren größer als 2,0 sein. Geringere Werte als 2,0 weisen auf Kontaminationen durch Zucker, Salze oder organische Lösungsmittel hin.

Zusätzlich zur spektrophotometrischen Messung mit dem NanoDrop wurde die Reinheit von PCR-Fragmenten und Plasmiden auf einem Agarosegel analysiert (2.2.3).

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zu untersuchende DNA und RNA, die in wässriger Lösung durch die Ionisation ihrer Phosphatreste eine negative Nettoladung tragen, können in einer Agarosegelmatrix in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dabei richtet sich die Konzentration der Agarose im Gel nach der Größe der aufzutrennenden Teilchen. Für kleinere Fragmente kann eine bessere Auftrennung mit einem höherprozentig angesetzten Agarosegel erzielt werden. Für größere Fragmente empfehlen sich niederprozentige Gele [Sambrook *et al.*, 2001]. In dieser Arbeit wurden 0,7-2%ige Agarosegele verwendet (Tab. 2).

Tab. 2: Trennbereiche für lineare Nukleinsäurefragmente in Agarosegelen. nach [Sambrook *et al.*, 2001]

Agarose-Konzentration [% (w/v)]	Fragmentlänge [kb]
0,3	5-60
0,7	1-20
1,0	0,6-8
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

In vorliegender Arbeit diente die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen zur Größen- und Mengenabschätzung von isolierter DNA/RNA, Plasmid-DNA und PCR-Produkten sowie der präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten.

Hierzu wird die Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen, mit dem entsprechenden Volumen Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gemischt und in der Mikrowelle erhitzt, bis sie vollständig gelöst ist. Nach kurzer Abkühlung wird die Lösung luftblasenfrei in die vorbereitete horizontale Gelapparatur gegossen. Nach vollständiger Erstarrung der Agarose wird der Kamm entfernt und das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben werden mit 6x Loading Dye (Thermo Scientific) im Verhältnis 5:1 vermischt und in die Taschen pipettiert. Für analytische Gele werden 6 µl Probe geladen, für präparative Gele werden pro Tasche 50 µl Probe aufgetragen. Anschließend werden die zu analysierenden DNA-Fragmente zusammen mit einem Größenmarker (*GeneRuler™ DNA Ladder Mix*, Thermo Scientific) bei 100 V und 100 mA für 30-90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das Gel für ca. 20 min mit einem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (1x GelRed in 0,1M NaCl; Biotium, Hayward, Kalifornien, USA) gefärbt und durch UV-Transillumination bei 320 nm im ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) visualisiert.

<u>50x TAE-Puffer</u>	2 M	Tris Base
(Stammlösung)	50 mM	EDTA
		mit Eisessig auf pH 8.0 einstellen

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

2.2.4.1 Standard-PCR

Die spezifische Vervielfältigung von DNA-Abschnitten *in vitro* erfolgt mittels Polymerase-Kettenreaktion. Mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase und einem zu der zu amplifizierenden DNA komplementären Primerpaar werden multiple Kopien dieser DNA hergestellt. Als Template für eine PCR kann chromosomale DNA (50-100 ng), Plasmid-DNA (20-50 ng) oder 2 µl einer vorher in 100 µl bidestilliertem Wasser gelösten Einzelkolonie genommen werden. Die PCR-Ansätze setzen sich wie folgt zusammen:

1x	Reaktionspuffer	(10x)	5 µl
25 mM	MgCl ₂		3 µl
20 mM	dNTP Mix	(5 mM von jedem dNTP)	2 µl
10 pmol	Primer <i>Forwards</i>		2 µl
10 pmol	Primer <i>Reverse</i>		2 µl
20-100 ng	Template		1-10 µl
5 U/µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase		0,25 µl
			ad 50 µl MilliQ

Alle in vorliegender Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer sind im Anhang in Tab. A 6 aufgeführt und wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die synthetisierten Primer sind in MilliQ-Wasser gelöst und auf eine Stammkonzentration von 10 pmol eingestellt.

Die PCR verläuft in drei Schritten:

1. Denaturierung: Aufschmelzen einer doppelsträngigen DNA (Template) bei 95°C in zwei Einzelstränge
2. Annealing: spezifische Anlagerung der Primer an die DNA
3. Elongation: Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung durch komplementäre Anlagerung von Nucleotiden mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase

Eine Standard-PCR verläuft nach folgendem Protokoll:

Initiale Denaturierung	1 Zyklus	95°C, 5 min
Denaturierung		95°C, 10 sec
Annealing	30-35 Zyklen	T _A , 30 sec
Elongation		72°C, t _{Elongation}
Finale Elongation	1 Zyklus	72°C, 10 min

Für die Bestimmung der Annealingtemperatur T_A von Primern mit einer Größe von 18-24 bp wurde die Schmelztemperatur T_m nach folgender Faustregel berechnet:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{C}+\text{T})$$

Die Annealingtemperatur liegt im Optimalfall 0,5°C unter der niedrigeren beider errechneter Schmelztemperaturen. Sollten PCR-Produkte mit artifiziellen Schnittstellen am 5'- sowie 3'-Ende amplifiziert werden, so betrug die Annealingtemperatur grundsätzlich 51°C.

Die Elongationszeit $t_{\text{Elongation}}$ ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Dabei benötigt die *Taq* DNA-Polymerase für die Amplifizierung von 1.000 bp circa eine Minute.

Zur Überprüfung der Länge und Reinheit der erhaltenen PCR-Produkte werden diese anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (2.2.3).

2.2.4.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR dar. Der wichtigste Unterschied zur klassischen PCR besteht in der Möglichkeit, die amplifizierte DNA noch während der Reaktion in Echtzeit (*real-time*) zu detektieren. Für die Detektion existieren zwei unterschiedliche Ansätze: die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, die sich unspezifisch an die doppelsträngige DNA während der Amplifikation anlagern oder der Einsatz von sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Unabhängig von der verwendeten Detektionsmethode emittiert die Probe innerhalb des Zyklus nur bei Anwesenheit der Zielsequenz ein Fluoreszenzsignal. Hierbei ist die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional zur Menge des amplifizierten Produktes. Die Detektion erfolgt am Ende jedes Elongationsschrittes, nach Anlagerung des Farbstoffes an die doppelsträngige DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBRTM Green (Quanta Biosciences, Gaithersburg, Maryland, USA) genutzt. Dieser lagert sich mit hoher Spezifität in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein. Das hier gebundene SYBRTM Green fluoresziert nach Anregung etwa tausendmal stärker als der nicht gebundene Farbstoff. Allerdings wird bei der Verwendung von SYBRTM Green in der qRT-PCR nicht nur die Fluoreszenz spezifischer PCR-Produkte, sondern auch die unspezifischer Produkte, z.B. von Primerdimeren, gemessen. Aus diesem Grund wird im Anschluss an die qRT-PCR eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, die eine Differenzierung verschiedener PCR-Produkte erlaubt. Dazu wird am Ende des PCR-Laufes die Temperatur schrittweise bis auf 97°C erhöht, sodass die DNA-Stränge wieder denaturieren und als Einzelstränge vorliegen. Der Punkt, an dem die doppelsträngige DNA denaturiert, ist durch einen Abfall der Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes gekennzeichnet.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression verschiedener Gene der *Tc-PAI_{ye}* eingesetzt. Unter Verwendung des *qScriptTM cDNA Super Mix* von Quanta BioSciences wird mittels reverser Transkription die zuvor isolierte RNA (2.2.2.3) nach Anleitung des Herstellers in komplementäre DNA (**complementary DNA**, cDNA) umgeschrieben. Dabei erfolgt die cDNA-Synthese im Thermocycler aus 1 µg Gesamt-RNA mit 4 µl 5x *qScriptTM cDNA Super Mix* in einem

Reaktionsvolumen von 20 µl mit dem in Tab. 3 aufgeführten Programm. Der Reaktionsansatz enthält eine Mischung aus Oligo-dT-Primern (komplementär zum Poly-A-Schwanz des 3`-Endes der mRNA) und einzelsträngigen Hexanukleotiden zufälliger Sequenz.

Tab. 3: Reaktionsschema zur Synthese von cDNA.

Temperatur	Dauer
25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min

Nach erfolgreicher cDNA-Synthese wird der Ansatz mit 80 µl DEPC-Wasser versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Primer für die qRT-PCR werden mit dem Programm Primer 3 Input (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) entworfen. Dabei werden nach Möglichkeit folgende Bedingungen eingehalten: Schmelzpunkte der Primer zwischen 54°C und 55°C mit maximal 0,5°C Temperaturdifferenz zwischen den Schmelzpunkten des *sense*- und *antisense*-Primers, GC-Gehalt der Primer zwischen 40% und 60%, Länge der Primer zwischen 20 und 23 Nukleotiden sowie Länge des Amplikons zwischen 120 und 150 bp. Die Primer werden mittels Oligo Analyzer 3.1 von IDT (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) auf die Möglichkeit zu intra- und intermolekularer Sekundärstrukturbildung analysiert. Das Primerpaar mit der jeweils geringsten Neigung zu Sekundärstrukturen wird mit Hilfe einer Datenbank-Suche [Altschul *et al.*, 1997] auf Spezifität bezüglich des Zielgenes im *Y. enterocolitica* W22703-Genom untersucht.

qRT-PCR-Analysen werden mit dem SmartCycler® (Peqlab, Erlangen, Deutschland) unter Verwendung des *PerfeCTa*TM *SYBR*[®] *Green FastMix*TM (Quanta Biosciences) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Ansatz werden 10 µl Reaktionsmix vorgelegt und mit 5 µl cDNA (entspricht 50 ng Gesamt-RNA) oder 5 µl DEPC-Wasser als Negativkontrolle versetzt.

<u>Ansatz für die qRT-PCR</u>	2x <i>PerfeCTa SYBR Green Fast Mix</i>	10 µl
	10 pmol Primer 1/Primer 2	je 1 µl
	Template	5 µl
	DEPC-Wasser	3 µl

Bei der Benutzung von 16S rRNA als Referenzgen wird die cDNA 10⁻² verdünnt eingesetzt. Jede Messung erfolgt als Duplikat.

Die qRT-PCR wird mit folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung		95°C	10 min
Amplifikation (40 Zyklen)	Denaturierung	95°C	20 sec
	Annealing	53°C	30 sec
	Elongation	72°C	30 sec
Schmelzkurve		53°C bis 97°C	0,2°C pro sec

Für die Quantifizierung der qRT-PCR stehen zwei Strategien zur Verfügung: die relative und die absolute Quantifizierung. Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression des Zielgenes auf ein Kontrollgen bezogen. Ein solches Kontrollgen muss leicht zu detektieren sein und seine Expression sollte nicht während des Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder auch als Antwort auf äußere Einflüsse (z.B. Stress, Antibiotika etc.) variieren. Die absolute Quantifizierung ist aufwendiger, liefert aber exakte Aussagen darüber, wie viel Ziel-DNA in einer Probe enthalten ist.

In vorliegender Arbeit wurden, je nach Fragestellung, beide Quantifizierungsstrategien genutzt.

Ziel der absoluten Quantifizierung ist es, der Probe mit Hilfe des C_T -Wertes eine Startkonzentration zuzuordnen zu können. Als C_T -Wert („Schwellenwert-Zyklus“, *Threshold cycle*, C_T) wird der Zyklus bezeichnet, an dem die Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Für die Bestimmung der Ausgangskonzentration der cDNA (mRNA) werden Standards des zu untersuchenden Genes mit bekannter DNA-Konzentration mitgeführt. Als Standard wird ein PCR-Produkt mit gleicher Länge und Sequenz amplifiziert. Das PCR-Produkt wird seriell verdünnt und die resultierenden C_T -Werte werden gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen DNA-Konzentration aufgetragen. Anhand der Standardkurve kann dann für jede Probe die Startkonzentration bestimmt werden.

Im Unterschied zur absoluten Quantifizierung erlaubt die relative Quantifizierung lediglich eine Angabe über Unterschiede der Verhältnisse zwischen einzelnen Proben und wird mit Hilfe der Berechnungssoftware REST (*Relative Expression Software Tool*) bestimmt [Pfaffl *et al.*, 2002]. Die Ergebnisse werden statistisch getestet und die Expressionsunterschiede werden mit ihren Signifikanzlevels ausgegeben. Die unterschiedliche Genexpression wird als $\Delta\Delta C_T$ -Wert angegeben.

Aus den C_T -Werten des Ziel- und des Referenzgenes für jeweils eine Probe P und eine Kontrolle K, wird nach folgender Formel die relative Expression bestimmt [Livak *et al.*, 2001]:

$$relative\ Expression = 2^{\Delta C_{T_{Zielgen}} - \Delta C_{T_{Referenzgen}}} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

mit:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_{Zielgen}} - \Delta C_{T_{Referenzgen}} = \left(C_{T_{Zielgen,P}} - C_{T_{Referenzgen,P}} \right) - \left(C_{T_{Zielgen,K}} - C_{T_{Referenzgen,K}} \right)$$

Als Referenzgene können z.B. *Housekeeping* Gene verwendet werden. Diese werden konstitutiv und unabhängig vom Zelltyp und Zellstadium exprimiert. Typischerweise handelt es sich hierbei um Gene

des Grundstoffwechsels. In dieser Studie wurde die 16S rRNA von *Y. enterocolitica* W22703 als interne Kontrolle verwendet.

Das $\Delta\Delta C_T$ -Berechnungsschema setzt eine Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus. Dies ist jedoch in der Realität nicht immer gegeben. Daher muss das $\Delta\Delta C_T$ -Modell um die reale Amplifikationseffizienz E korrigiert werden.

$$\text{relative Expression} = E^{-\Delta\Delta C_T}$$

Die Amplifikationseffizienz, auch Primereffizienz genannt, ist vom verwendeten Primerpaar und von den PCR-Bedingungen abhängig. Daher muss für jedes Primerpaar die Effizienz mit Hilfe einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungen erstellt werden. Hierzu werden die C_T -Werte der einzelnen Verdünnungen gegen den dekadischen Logarithmus ihrer jeweiligen Konzentration aufgetragen. Man erhält eine Gerade, deren Steigung m mittels linearer Regression errechnet werden kann. Die Steigung steht in direktem Zusammenhang mit E .

$$E = 10^{-1/m}$$

Durch die Verwendung unterschiedlicher Primerpaare für das Zielgen und das Referenzgen ergibt sich demnach folgende Formel zur Berechnung der relativen Genexpression:

$$\text{relative Expression} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_{T_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_{T_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}}$$

In vorliegender Arbeit wurde nur mit Primerpaaren gearbeitet, deren Primereffizienz größer als 1,8 war (entsprechend einer PCR-Effizienz von über 90%). Alle Primereffizienzen wurden an Verdünnungsreihen über sieben Messpunkte bestimmt.

2.2.4.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgt mit dem *QIAquick® PCR Purification*-Kit (250) von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgt stets mit 50 μ l 55°C warmen MilliQ.

Unsaubere PCR-Produkte sowie restringierte Vektoren werden über eine Gelextraktion aufgereinigt. Hierzu wird die DNA zunächst über ein präparatives Gel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3) und anschließend in einer Färbelösung (1x GelRed in 0,1M NaCl) gefärbt. Die gewünschten Banden werden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in Puffer QG aufgelöst, bevor die eigentliche Aufreinigung nach dem Herstellerprotokoll beginnen kann. Dem Elutionsschritt wird, zur Erhöhung der Ausbeute, eine zusätzliche Inkubation von einer Minute vorangestellt. Die Elution erfolgt mit 30 μ l 55°C warmen MilliQ.

2.2.5 Bestimmung des Transkriptionsstartes

Die 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *tcaR2* und *tcaA* aus *Y. enterocolitica* W22703 verwendet. Ausgehend von einem sequenzspezifischen *reverse*-Primer wird zunächst entlang des mRNA-Stranges die cDNA bis zum 5'-Ende des Transkriptes synthetisiert. Danach wird die RNA hydrolysiert und der cDNA-Strang an seinem unbekanntem 3'-Ende verlängert. Diese sogenannte *tailing*-Reaktion wird durch die terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT; Thermofisher Scientific) katalysiert. In einer sich anschließenden PCR bindet ein spezifischer Primer (**Abridged Anchor Primer, AAP**) an den Überhang und ermöglicht die Zweitstrangsynthese. Die anschließend durchgeführte *nested* PCR erfolgt mit einem zusätzlichen, im ersten Amplikon weiter innen liegenden, **genspezifischen Primer (GSP)** sowie dem **Abridged Universal Amplification Primer (AUAP)**.

Der Durchführung der 5'-RACE wird die Anleitung von Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA) mit einigen Modifikationen zugrunde gelegt. Zuerst erfolgt ausgehend von 5 µg Gesamt-RNA unter Verwendung eines genspezifischen Primers (GSP1) die Erststrangsynthese. Hierbei sollte GSP1 ca. 200 Nukleotide stromabwärts des ursprünglich vorhergesagten Translationsstarts binden.

<u>cDNA-Synthese</u>	5 µg	Gesamt-RNA
	2,5 pmol	GSP1
		ad 13 µl DEPC-H ₂ O

Zur Denaturierung der RNA wird der Ansatz für 1 min bei 70°C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Danach folgt die Zugabe von:

5 µl	5x Reaktionspuffer (Invitrogen)
2,5 µl	25 mM MgCl ₂
1 µl	10 mM dNTP-Mix
2,5 µl	0,1 mM Dithiothreitol (DTT)
1 µl	Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen)

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgt im Thermocycler für 50 min bei 45°C. Die cDNA-Synthese wird durch Erhitzen der Ansätze auf 85°C für 5 min abgestoppt. Nach dem Abbau der RNA mit RNase A (45 min bei 37°C) müssen vor der *tailing*-Reaktion überschüssige dNTPs und der GSP1 entfernt werden. Daher wird die cDNA mit Hilfe des *QIAQuick PCR Purification-Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt (2.2.4.3). Die aufgereinigte cDNA wird anschließend als Template für die *tailing*-Reaktion eingesetzt. Hierbei wird mit Hilfe der TdT in zwei unabhängigen Reaktionen je ein Poly-dC- bzw. Poly-dA-Schwanz an das 3'-Ende der cDNA angehängt.

<u>Tailing-Reaktion</u>	1 µl	cDNA
	4 µl	5x Reaktionspuffer (Thermo Scientific)
	1,3 µl/0,6 µl	dATP bzw. dCTP (0,1 mM)
	1,5 µl	TdT (Thermo Scientific)
		ad 20 µl MilliQ

Der Ansatz wird für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die TdT durch Erhitzen auf 70°C für 10 min deaktiviert. Der Reaktionsansatz wird mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification-Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt (2.2.4.3) und als Template für eine nachfolgende PCR eingesetzt. Die Amplifikation des RACE-Produktes erfolgt in einer PCR-Reaktion mit einem sequenzspezifischen, im Vergleich zum cDNA-Synthese-Primer eingerückten Primer (GSP2), einem für den C- bzw. A-Tail spezifischen Primer, dem sogenannten AAP, und 5 µl cDNA aus der *tailing*-Reaktion. Die Amplifikation der cDNA erfolgt mit folgendem PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	1 Zyklus	95°C, 3 min
Denaturierung		95°C, 30 sec
Annealing	30 Zyklen	49°C, 30 sec
Elongation		72°C, 1 min
Finale Elongation	1 Zyklus	72°C, 3 min

Anschließend werden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch analysiert (2.2.3), mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction-Kits* von Qiagen nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert (2.2.4.3) und als Template in einer *nested* PCR eingesetzt. In der zweiten PCR wird der Primer AUAP, welcher komplementär zum nicht sequenzspezifischen Bereich ist, sowie ein weiterer sequenzspezifischer Primer (GSP3), welcher weiter 5' liegt als GSP2, verwendet. Die *nested* PCR wird mit dem bereits im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Programm durchgeführt. Die erhaltenen 5'-RACE-Produkte werden auf 2%ige Agarosegele aufgetragen, mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction-Kits* (Qiagen, 2.2.4.3) aufgereinigt und der Transkriptionsstart über eine Sequenzierung bei GATC ermittelt.

2.2.6 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme aus vorliegender Arbeit wurden von der Firma Thermo Scientific bezogen und nach Herstellerempfehlungen eingesetzt. Hierzu werden 1 µg DNA mit 1 µl Restriktionsenzym (entspricht 10 U) vermischt und der Reaktionsansatz wird mit bidestilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Verdau erfolgt, sofern nicht anders angegeben, für 3 h bei 37°C. Das Restriktionsenzym wird anschließend entsprechend der Herstellerangaben für 20 min bei 65°C bzw. 80°C inaktiviert. Die am häufigsten verwendeten Restriktionsenzyme in dieser Arbeit sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: In dieser Arbeit häufig verwendete Restriktionsendonukleasen der Firma Thermo Scientific.

Enzym	Units	5'-3' Erkennungssequenz	Puffer
<i>Bam</i> HI	10 U/µl	GGATCC	1x <i>Bam</i> HI-Puffer
<i>Eco</i> RI	10 U/µl	GAATTC	1x <i>Eco</i> RI-Puffer
<i>Hind</i> III	10 U/µl	AAGCTT	1x R-Puffer
<i>Kpn</i> I	10 U/µl	GGTACC	1x <i>Kpn</i> I-Puffer
<i>Nco</i> I	10 U/µl	CCATGG	1x Tango-Puffer
<i>Pvu</i> I	10 U/µl	CGATCG	1x R-Puffer
<i>Sac</i> I	10 U/µl	GAGCTC	1x <i>Sac</i> I-Puffer
<i>Sal</i> I	10 U/µl	GTCGAC	1x O-Puffer
<i>Xba</i> I	10 U/µl	TCTAGA	1x Tango-Puffer
<i>Xho</i> I	10 U/µl	TCCGAG	1x R-Puffer

Nach dem Restriktionsverdau wird das gespaltene PCR-Fragment mit Hilfe des *QIAQuick PCR Purification*-Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 µl 55°C warmen bidestilliertem Wassers eluiert (2.2.4.3). Gespaltene Plasmid-DNA wird nach dem Verdau mit Hilfe der Mikrodialyse entsalzt. Hierzu wird ein MFTM-Millipore-Filter mit einem Porendurchmesser von 0,025 µm mit der matten Seite nach unten auf die Wasseroberfläche einer mit 5 ml bidestilliertem Wasser gefüllten Petrischale gegeben. Anschließend wird die zu entsalzende DNA-Probe auf den Membranfilter pipettiert und nach 30 min wieder abgenommen.

2.2.6.2 Dephosphorylierung von DNA

Um bei der Ligation (2.2.6.3) eine Rezirkularisierung zu verhindern, werden Vektoren, die nur mit einem Restriktionsenzym gespalten wurden, mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase aus Eismeergarnelen (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) an den 5'-Enden dephosphoryliert. Zu diesem Zweck werden 1 µg Plasmid-DNA mit 2 µl 10x SAP-Puffer und 1 µl SAP (beides Thermo Scientific) versetzt. Der Reaktionsansatz wird mit bidestilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die SAP wird durch einen nachfolgenden Hitzeschritt (15 min bei 65°C) inaktiviert und der dephosphorylierte Vektor mit Hilfe der Mikrodialyse entsalzt (2.2.6.1).

2.2.6.3 Ligation

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide werden das gewünschte DNA-Fragment (*Insert*) und das Plasmid mit Hilfe einer Ligase über Phosphordiesterbindungen verknüpft. Für Ligationen wurden generell 1 U T4 DNA Ligase (Invitrogen) sowie der dazugehörige 5x DNA Ligase Puffer verwendet. Für die Klonierung rekombinanter Vektoren werden 50-100 ng linearisierter Vektor und DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:1, 1:2 und 1:5 in einem Gesamtvolumen von 20 µl vermischt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

<u>Ligationsansatz</u>	4 µl	5x DNA Ligase Puffer
	50-100 ng	Vektor
	10-100 ng	DNA-Fragment (<i>Insert</i>)
	1 µl	T4-Ligase (1 U/µl)
		ad 20 µl MilliQ

2.2.7 DNA-Transfer

2.2.7.1 Transformation

Die direkte Aufnahme und stabile Weitergabe von DNA wird als Transformation bezeichnet. Zunächst müssen die Bakterienzellen in einen Zustand überführt werden, der es ihnen ermöglicht, von außen zugeführte DNA in die Zelle aufzunehmen. Diese sogenannte Kompetenz kommt zum einen natürlich vor, zum anderen kann sie künstlich, z.B. über CaCl₂ oder Glycerin, hergestellt werden. In dieser Arbeit wurde rekombinante DNA mit Hilfe der Elektroporation in *E. coli* bzw. in *Yersinia* spp. übertragen. Die Transformation setzt sich dabei aus folgenden zwei Schritten zusammen: der Herstellung elektrokompenter Zellen und dem Einschleusen der DNA in die Zellen über Elektropermeabilisierung der Zellmembran.

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen werden 100 ml LB-Medium, gegebenenfalls versetzt mit Antibiotikum, mit 5 ml üNK inokuliert und bei optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6$) werden die Zellen für 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 7 min bei 6.500 UpM und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird vorsichtig in 50 ml eiskaltem 5%igem Glycerin resuspendiert und erneut für 7 min bei 6.500 UpM und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss werden die Zellen in 25 ml 5%igem Glycerin gelöst und pelletiert. Nach dem die Zellen in 5 ml 5%igem Glycerin resuspendiert wurden, folgt ein letzter Zentrifugationsschritt bei 4°C für 7 min und 6.500 UpM. Danach werden die Zellen in 500 µl eiskaltem 10%igem Glycerin aufgenommen, á 40 µl aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Elektroporation

Die elektrokompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 40 µl sterilem MilliQ und der zu transformierenden rekombinanten DNA gemischt und für eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz vorsichtig in eine sterile und vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Bevor die Elektroporationsküvette in den Elektroporator (Peqlab) gesetzt wird, muss diese gut abgetrocknet werden. Anschließend werden die Zellen einem elektrischen Impuls bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω ausgesetzt. Die Bakterien werden unmittelbar danach in 1 ml *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC)-Medium überführt und für 60 min unter Standardbedingungen inkubiert. Die Selektion transformierter Klone erfolgt durch Anzucht auf Selektivagar.

<u>SOB-Medium</u>	20 g	Trypton
[Hanahan, 1983]	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	NaCl
	0,2 g	KCl
		ad 1000 ml MilliQ
		autoklavieren (121°C, 20 min)

<u>SOC-Medium</u>	47 ml	SOB
[Hanahan, 1983]	1 ml	1 M MgCl ₂
	1 ml	1 M MgSO ₄
	1 ml	1 M Glucose
		sterilfiltrieren

2.2.7.2 Konjugation

Die Übertragung genetischen Materials von einer Bakterienzelle (Donor) auf eine andere (Rezipient) durch direkten Zell-Zell-Kontakt wird als bakterielle Konjugation bezeichnet. In dieser Arbeit wurden die mobilisierbaren Suizidvektoren pKRG9 und pUTs-*lux* (Cm^R) sowie dessen Derivate aus den Donorstämmen SM10 *λpir* und S17.1 *λpir* auf den Empfängerstamm *Y. enterocolitica* W22703 transferiert. Hierbei kamen folgende Ansätze zum Einsatz:

Plattenkonjugation

Eine am Vortag auf Selektivagar flächig ausgestrichene *E. coli*-Kultur wird mit der Impföse aufgenommen und auf frischem LB-Agar ohne Antibiotikazusatz auf eine etwa münzgroße Fläche verteilt. Die doppelte Menge an Rezipient wird ebenfalls von einer am Vortag ausgestrichenen Platte aufgenommen und gründlich mit dem Donor vermischt. Die Konjugation erfolgt mindestens für sechs Stunden bei der für den Rezipienten optimalen Temperatur (30°C bei *Y. enterocolitica*). Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Bakterienmasse vollständig mit der Impföse abgenommen und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Anschließend werden die Verdünnungsstufen 10⁰ bis 10⁻² auf Selektivmedium ausplattiert und für 24 h bei 30°C inkubiert. Gewachsene Kolonien werden auf antibiotikahaltigem LB-Agar vereinzelt und mittels PCR auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

Flüssigkonjugation

Alternativ zur Plattenkonjugation können Rekombinanten auch über die Flüssigkonjugation gewonnen werden. Hierzu werden entsprechende üNK des Donor- und Rezipientenstammes in selektivem LB-Medium angezogen. Von diesen Kulturen werden 100 µl in 10 ml frisches, antibiotikahaltiges LB-Medium inokuliert und bei optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 werden 2,5 ml Donor mit 1,5 ml Rezipient in einem 15 ml Greinerröhrchen vermischt und für 5 min bei 7.500 UpM und RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 10 ml LB-Medium gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 7.500 UpM, RT) wird der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension gleichmäßig auf einem MFTM-Membranfilter (Millipore, Ø 0,43 µm) auf einer vorgewärmten LB-Platte ohne Antibiotikum verteilt. Nachdem die Platte für einige Minuten unter der Sterilbank getrocknet ist, wird sie für zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wird die Zellmasse abgenommen und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁰ bis 10⁻² werden auf Selektivmedium ausplattiert und für 24 h bei 30°C inkubiert. Gewachsene Kolonien werden auf Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Der Erfolg der Insertion wird mittels PCR untersucht (2.2.4).

2.2.8 Konstruktion von *Yersinia*-Stämmen

2.2.8.1 Herstellung von Insertionsmutanten

Insertionsmutanten werden erzeugt, indem ein internes Fragment des zu unterbrechenden Genes in den Pir-abhängigen Vektor pKRG9 (Abb. A 4) kloniert wird. Dazu werden, ausgehend von chromosomaler DNA von *Y. enterocolitica* W22703, intragenische Teilbereiche des zu mutierenden Zielgenes amplifiziert. Die Primer werden dabei so gewählt, dass etwa 200 bis 500 bp lange Fragmente mit einem Abstand von 18 bp stromabwärts vom Startcodon entstehen. Die PCR-Amplifikate werden mit Hilfe des *PCR-Purification*-Kits von Qiagen aufgereinigt (2.2.4.3), mit *SacI* und *XbaI* verdaut (2.2.6.1) und in den ebenfalls mit *SacI/XbaI* geschnittenen Vektor pKRG9 ligiert (2.2.6.3). Die rekombinanten Plasmide werden über Elektroporation in den *E. coli*-Stamm S17.1 λ pir eingebracht (2.2.7.1) und mittels Kolonie-PCR (2.2.4.1) und Sequenzierung (2.2.9) überprüft. Bestätigte rekombinante Plasmide werden über Konjugation (2.2.7.2) in die entsprechenden *Y. enterocolitica*-Stämme transferiert. *Y. enterocolitica*-Exkonjuganten werden auf LB-Agar mit Nalidixinsäure und Chloramphenicol selektiert. Der korrekte Einbau des Vektors in das Genom wird mittels Kolonie-PCR unter Verwendung eines vektorständigen sowie eines genspezifischen Primers nachgewiesen.

2.2.8.2 Herstellung von Reporterstämmen in *Y. enterocolitica*

Zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der Gene der insektiziden Pathogenitätsinsel von *Y. enterocolitica* W22703 werden diese mit promotorlosen Reporter Genen fusioniert. Hierzu werden Transkriptionsfusionen der Promotoren mit dem Reporter *luxCDABE* hergestellt. Die Luciferase katalysiert in Abhängigkeit von Adenosintri-phosphat (ATP), Sauerstoff und Magnesium die oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von 562 nm [de Wet *et al.*, 1987]. Diese Lichtemission kann gemessen werden und ist direkt proportional zur Promotorstärke. Dadurch ist es möglich die transkriptionelle Aktivität der Promotoren von Interesse unter verschiedenen Umweltbedingungen, z.B. bei unterschiedlichen Temperaturen oder Nährstoffbedingungen, zu untersuchen. Zusätzlich wurden in vorliegender Arbeit translationale Fusionen von mCherry bzw. GFP mit Proteinen des insektiziden Toxin-Komplexes erzeugt. Mit Hilfe dieser lassen sich zelluläre Prozesse in Echtzeit in lebenden Zellen beobachten. In vielen Fällen wird das zu untersuchende Protein noch an die korrekte Stelle in der Zelle transportiert, und der Fluoreszenzreporter kann durch Fluoreszenzmikroskopie Aufschluss über die Expressionsrate und Translationseffizienz sowie zeitliche und räumliche Lokalisierung des Zielproteins in der Zelle geben [Kain *et al.*, 1995; van Roessel *et al.*, 2002].

Zur Herstellung der Reporterstämme in *Y. enterocolitica* W22703 wird, ausgehend vom Suizidvektor pUT mini-Tn5 *luxCDABE* Km2 (Abb. A 5, [Winson *et al.*, 1998]), das Transposon über die Restriktionsenzyme *XhoI* und *PvuI* ausgeschnitten (2.2.6.1). Das resultierende Fragment wird mit einer Chloramphenicol-Resistenzkassette ligiert (2.2.6.3), welche zuvor mit den in Tab. A 6 aufgeführten Primern aus dem Vektor pKRG9 mittels PCR amplifiziert und mit *XhoI* und *PvuI* geschnitten wurde. Der resultierende Vektor wird in der weiteren Arbeit als pUTs-*lux* (Cm^R) bezeichnet (Abb. A 6) [Starke *et al.*, 2013].

Die Untersuchung zur Expression der *tc*-Gene von *Y. enterocolitica* W22703 auf Einzelzellebene erfolgt mit den beiden Fluoreszenzreportern GFP und mCherry. Hierzu wird die *luxCDABE*-Kassette aus dem Vektor pUTs-*lux* (Cm^R) mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XhoI* und *KpnI* entfernt (2.2.6.1) und durch *mCherry* bzw. *gfp* substituiert. Die beiden Fragmente für die Fluoreszenzreporter werden mittels PCR aus den beiden Vektoren pProbe-NT (*gfp*; Abb. A 8) bzw. pBR322-*mCherry* (*mCherry*; Abb. A 10) amplifiziert, mit Hilfe des *PCR Purification*-Kits (Qiagen) aufgereinigt (2.2.4.3), mit *XhoI* und *KpnI* verdaut (2.2.6.1) und in den bereits geschnittenen Vektor ligiert (2.2.6.3). Die rekombinanten Plasmide werden über Elektroporation in *E. coli* S17.1 *λpir* transformiert (2.2.7.1) und auf LB-Agar mit Chloramphenicol selektiert. Die resultierenden positiven Vektoren, welche über Kolonie-PCR und Sequenzierung bestätigt wurden, werden im Folgenden als pUTs-*gfp* (Cm^R) (Abb. A 7) bzw. pUTs-*mCherry* (Cm^R) (Abb. A 9) bezeichnet.

Die Konstruktion von Reporterstämmen in *Y. enterocolitica* erfolgt über homologe Rekombination unter Zuhilfenahme der mobilisierbaren, Pir-abhängigen Suizidvektoren pUTs-*lux* (Cm^R), pUTs-*gfp* (Cm^R) und pUTs-*mCherry* (Cm^R) [Starke *et al.*, 2013]. Dazu werden, ausgehend von chromosomaler DNA von *Y. enterocolitica* W22703, die Promotorbereiche bzw. intragenischen Teilbereiche der zu untersuchenden Gene mittels PCR amplifiziert, mit Hilfe des *PCR Purification*-Kits (Qiagen) aufgereinigt (2.2.4.3) und mit *SacI* und *KpnI* geschnitten (2.2.6.1). Die PCR-Fragmente werden in den jeweiligen *SacI/KpnI*-verdauten Vektor ligiert (2.2.6.3) und in *E. coli* S17.1 *λpir* transformiert (2.2.7.1). Nach der Selektion auf LB-Agar mit Chloramphenicol werden die erhaltenen Klone mittels PCR auf das Vorhandensein des rekombinanten Plasmides überprüft. Die Übertragung des Reportergens in das *Y. enterocolitica*-Genom erfolgt über Konjugation (2.2.7.2). Erhaltene *Y. enterocolitica*-Exkonjuganten werden auf Chloramphenicol- und Nalidixinsäure-haltigem LB-Agar selektiert und auf den korrekten Einbau des Vektors in das Chromosom mittels Kolonie-PCR geprüft (2.2.4.1).

2.2.8.3 Herstellung von Deletionsmutanten

Deletion nach DATSENKO und WANNER

Die Konstruktion von Deletionsmutanten in *Y. enterocolitica* erfolgt nach dem Verfahren von DATSENKO und WANNER [Datsenko *et al.*, 2000]. Die Methode beruht auf dem Austausch chromosomaler Sequenzen gegen eine Antibiotika-Resistenzkassette, die zuvor mittels PCR generiert wird. Der Austausch erfolgt dabei über homologe Rekombination und wird durch das Rekombinationssystem des Phagen Lambda ermöglicht, welches zu diesem Zweck in dem entsprechenden *Y. enterocolitica*-Stamm plasmidkodiert (pKD119) exprimiert wird.

Zur Deletion eines Genes in *Y. enterocolitica* W22703 wird zunächst die Kanamycin-Resistenzkassette des Plasmids pKD4 mittels PCR amplifiziert (2.2.4.1). Dazu werden Primer verwendet, die eine etwa 50 bp lange Sequenz homolog zu den 5'- und 3'-flankierenden Bereichen des zu deletierenden Genes enthalten. Das PCR-Produkt wird anschließend in elektrokompetente W22703-Zellen, welche das Plasmid pKD119 enthalten, transformiert (2.2.7.1). Die Ansätze werden nach einer einstündigen Inkubation bei 30°C auf LB-Agar mit Kanamycin ausplattiert. Positive Klone werden zweimal passagiert und der Austausch der chromosomalen Gensequenz wird gegen die Antibiotika-Resistenzkassette mittels Kolonie-PCR überprüft. Die Resistenzkassette wird in einem zweiten Rekombinationsschritt wieder entfernt. Dies erfolgt mit Hilfe einer Flippase (FLP)-Rekombinase der Hefe, welche ebenfalls plasmidkodiert (pCP20) exprimiert wird. Dazu werden die *Y. enterocolitica*-Stämme mit dem Plasmid pCP20 transformiert (2.2.7.1) und zur Selektion positiver Klone auf Chloramphenicol-haltigem LB-Agar ausplattiert. Die Eliminierung der Resistenzkassette wird mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Die Plasmide pKD119 und pCP20 besitzen einen temperatursensitiven Replikationsursprung. Zur Entfernung beider Plasmide werden die Deletionsmutanten daher bei 37°C kultiviert. Die Eliminierung der Plasmide ist bestätigt, wenn die Mutanten nicht mehr in der Lage sind, auf LB-Agar zu wachsen, der Tetrazyklin bzw. Chloramphenicol enthält. Abschließend werden diese Klone mittels PCR und Sequenzierung (2.2.9) auf die erfolgreiche Deletion geprüft.

Konstruktion von Deletionsmutanten mit Hilfe des Suizidplasmides pKNG101

Gene, die nicht mit dem Verfahren nach DATSENKO und WANNER deletiert werden konnten, wurden mit Hilfe des Suizidplasmides pKNG101 deletiert. pKNG101 besitzt den Replikationsursprung des Bakteriophagen R6K, der abhängig von dem *pir*-Genprodukt ist. Außerdem besitzt der Vektor eine Streptomycin-Resistenz als positiven und das *sacB*-Gen als negativen Selektionsmarker [Kaniga *et al.*, 1991]. Für eine Deletion werden zwei 800-1000 bp lange PCR-Produkte amplifiziert, die den 5'- und 3'-flankierenden Bereich des zu deletierenden Genes umfassen. Die beiden amplifizierten

Bereiche werden mit *EcoRI* verdaut und miteinander ligiert (2.2.6.1 und 2.2.6.3). Nach einer anschließenden *nested*-PCR wird das erhaltene Produkt mit *Bam*HI geschnitten und in den zuvor mit *Bam*HI verdauten und dephosphorylierten (2.2.6.2) Vektor pKNG101 ligiert. Durch Elektroporation wird das Ligationsprodukt in *E. coli* CC118 eingebracht (2.2.7.1). Nach Selektion auf LB-Agar mit Streptomycin über Nacht bei 37°C wird das Plasmid isoliert und mittels PCR und Restriktionsverdau auf seine Richtigkeit überprüft. Das validierte Plasmid wird anschließend in elektrokompetente *E. coli* SM10 λ *pir* transformiert und mittels Kolonie-PCR verifiziert. Der konstruierte Deletionsvektor wird über Konjugation (2.2.7.2) in den Zielstamm *Y. enterocolitica* W22703 übertragen und auf Nalidixinsäure- und Streptomycin-haltigem LB-Agar selektiert. pKNG101 kann aufgrund des Fehlens der *pir*-Gene nicht in *Y. enterocolitica* replizieren. So sollten Streptomycin-resistente Klone eine über homologe Rekombination erfolgte Integration des Plasmides aufweisen. Die Integration des Vektors an die gewünschte Stelle im Genom wird mittels Kolonie-PCR unter Verwendung eines vektorständigen und eines genspezifischen Primers überprüft. Positive Klone werden für 12 h bei 30°C in LB-Medium kultiviert und im Anschluss auf LB-Platten mit 5% Saccharose ausplattiert. Das auf dem Plasmid enthaltene *sacB*-Gen kodiert für das Exoenzym Levansucrase aus *Bacillus subtilis*, welches Saccharose in Glucose und das Fructose-Polymer Levan umsetzt [Bramucci *et al.*, 1996]. Dieses Polymer verhindert das Wachstum vieler Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien. Daher sollte bei Saccharose-resistenten Klonen das Plasmid durch ein zweites Rekombinationsereignis aus dem Chromosom entfernt worden sein, wobei entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt wurde. Klone, die sowohl Saccharose-resistent als auch Streptomycin-sensitiv sind, werden mittels Kolonie-PCR unter Verwendung von außerhalb der Deletion liegenden Primern überprüft und anschließend sequenziert (2.2.9).

2.2.9 Sequenzierung von DNA

Die zu sequenzierende DNA wird auf eine Konzentration von 10-50 ng/ μ l (PCR-Fragmente) bzw. 30-100 ng/ μ l (Plasmide) eingestellt und mit 10 pmol/ μ l entsprechenden Primers an die GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) geschickt. Die Sequenzierung erfolgt über das Run24Barcode/*Single Read Sequencing*-Programm von GATC. Die von GATC übermittelten Sequenzen werden gegen die *in silico* Konstrukte mittels des EMBOSS *Pairwise Alignment Algorithm water* (EMBL-EBI) auf ihre Richtigkeit hin geprüft.

2.2.10 Bioinformatische Methoden

Zur Analyse von Nukleotidsequenzen sowie zur *in vitro* Klonierung wird die Software *Clone Manager 8* verwendet. Die Vorhersage putativer bakterieller Promotoren erfolgt mit dem Programm BPROM von Softberry (www.softberry.com). Homologievergleiche, beispielsweise mit der Sequenz von *Y. enterocolitica* 8081, werden über den BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool)-Server des NCBI durchgeführt [Altschul *et al.*, 1997]. Sowohl Nucleotid- als auch Proteinsequenzen werden mit ClustalW verglichen [Thompson *et al.*, 1994], hierfür wird die EBI-Version verwendet (www.ebi.ac.uk/ClustalW/).

Die Vorhersage von Protein-Quartärstrukturen wird mit dem Server von Phyre2 [Kelley *et al.*, 2009] und den darin verwendeten Unterprogrammen getroffen. Vorhersagen zur Proteinfunktion erfolgen mit Hilfe der Datenbank für konservierte Proteindomänen von NCBI [Marchler-Bauer *et al.*, 2009].

2.2.11 Quantifizierung der Biolumineszenz und Fluoreszenz *in vitro*

Das Einbringen von Reportersystemen mit Hilfe des Suizidplasmides pUTs ermöglicht die Analyse der Expression unterschiedlicher Gene in *Y. enterocolitica* unter verschiedenen Bedingungen. Dabei ist die Stärke des Reportersignals proportional zur Expression des Genes.

2.2.11.1 Visualisierung der Genexpression mit dem *Xenogen In Vivo Imaging System*

Die Visualisierung mittels des *Xenogen In Vivo Imaging Systems* (IVIS, Xenogen Corporation, Alameda, Kalifornien, USA) ermöglicht sowohl die bildliche Darstellung als auch eine quantitative Analyse des Verlaufs der Genexpression von *Y. enterocolitica* auf LB-Agar, in Mikrotiterplatten sowie in Modellorganismen wie beispielsweise der Wachsmotte *G. mellonella*.

Für die qualitative Bewertung der Biolumineszenz ausgewählter Stämme werden diese auf selektivem LB-Agar ausgestrichen und bei 15°C bzw. 37°C für 24 bis 48 Stunden inkubiert. Die Platten werden zur Visualisierung der Genexpression in die Dunkelkammer gelegt. In der Detektionskammer wird das emittierte Licht durch eine sensitive, signalverstärkende *cooled charge-coupled device* (CCD)-Kamera (C2400-75H, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) erfasst. Die Signalstärke der Biolumineszenz wird dabei als die Anzahl von Photonen, die in einer Sekunde pro cm² emittiert werden berechnet. Die Integrationszeit der Biolumineszenz- bzw. Fluoreszenzmessung beträgt 1-60 sec unter mittlerer Sensitivität, mittlerer Auflösung und offener Linse. Die Auswertung erfolgt mit der Software *Living Image™ V.4.0 Igor Pro*.

2.2.11.2 Quantifizierung der Genexpression mit dem *Wallac Victor*³

Die Quantifizierung der Expression der verschiedenen *tca*-Gene erfolgt mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesers *Wallac Victor*³ *1420 Multilabel Counter* (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Zunächst werden üNK der zu messenden Stämme im Dreifachansatz in selektivem LB-Medium angesetzt und bei 180 UpM und 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die üNK im Verhältnis 1:1.000 in selektivem LB-Medium verdünnt. Pro üNK werden jeweils vier Kavitäten einer weißen Mikrotiterplatte (μ Clear-Plate von Greiner Bio-One) mit 200 μ l Kultur befüllt. Es werden jeweils zwei Mikrotiterplatten inokuliert, wovon eine bei 37°C inkubiert wird, die andere hingegen bei 15°C. Die Inkubation erfolgt jeweils auf Mikrotiterplatten-Schüttlern (IKA Schüttler MTS4, Janke&Kunkel, Staufen, Deutschland) bei 600 UpM. Stündlich wird neben der OD₆₀₀ (0,1 sec) die Biolumineszenz der Bakterien bei 490 nm (0,1 sec) erfasst. Die Messung wird bis zur stationären Phase durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgt mit Microsoft Excel. Die Biolumineszenzwerte werden als relative Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) angegeben und mit den entsprechenden OD₆₀₀-Werten normalisiert. Dazu wird jeweils der Quotient aus der Biolumineszenz und dem korrelierenden OD₆₀₀-Wert gebildet (RLU/OD₆₀₀). Dieses Verfahren erlaubt einen Vergleich der langsamer wachsenden 15°C-Kulturen mit den bei 37°C gewachsenen Kulturen. Von jedem OD₆₀₀-Wert wird zuvor der Nullwert (reines Medium mit Antibiotika) subtrahiert. Da die Luciferase bei 15°C im Vergleich zu 37°C eine verringerte Aktivität aufzeigt, werden die Biolumineszenzwerte bei 37°C durch Division mit dem Faktor 5,1 auf 15°C korrigiert (*corrected RLU*, cRLU) [Bresolin *et al.*, 2006a]. Zur Bestimmung der Hintergrundlumineszenz wird das promotorlose Konstrukt S17.1 λ *pir* pUTs-*lux* bei 37°C vermessen und auf 15°C korrigiert [Jong *et al.*, 2010]. Die Hintergrundlumineszenz liegt bei circa 100 RLU/OD₆₀₀ und ist damit mit verschiedenen Literaturangaben vergleichbar [Iwama *et al.*, 1999; Edmonds *et al.*, 2010]. Zusätzlich wird ein Schwellenwert für eine signifikante Transkription bestimmt. Hierzu wird die Expression des Stammes S17.1 λ *pir* pUTs-P_{*tcaA*}::*lux* bei 37°C zugrunde gelegt (ca. 700 RLU/OD₆₀₀), da bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass der *tcaA*-Promotor unter diesen Bedingungen nicht aktiv ist [Bresolin *et al.*, 2006a].

2.2.11.3 Bestimmung des Gehaltes an ATP

Die Bestimmung der Konzentration von ATP im Medium von Bakterienkulturen erfolgt im Mikrotiterplatten-Leser *Wallac Victor*³ unter Verwendung des *ATP Determination Kit sensitive assay* (Biaffin, Kassel, Deutschland). Hierzu wird das Lumineszenzreagenz nach Herstellerangaben hergestellt und in Aliquots á 50 µl bei -20°C lichtgeschützt gelagert. Zur Bestimmung der ATP-Konzentration werden je 21 µl des Lumineszenzreagenzes mit 21 µl der zu vermessenden Lösung in 96-Well Platten (μ Clear-Plate, white, Chim. von Greiner Bio-One) gegeben und vorsichtig miteinander vermischt. Die Messung der Lumineszenz erfolgt über 15 min hinweg aller 30 s bei 490 nm (0,1 s). Die Bestimmung des ATP-Gehaltes erfolgt mit Hilfe einer Standardkurve. Hierzu wird eine Verdünnungsreihe (10^{-3} bis 10^{-12} M) von in MilliQ gelöstem ATP-Di-Natriumsalz erstellt und ebenfalls im *Wallac Victor*³ vermessen. Für jede Probe werden drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

2.2.11.4 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der Fluoreszenz von Bakterienkulturen auf Einzelzellebene wird jeweils eine Kolonie von einer Agarplatte gepickt, auf einem Objektträger mit 10 µl phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS-Puffer) vermischt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Bei der Betrachtung von Flüssigkulturen werden direkt 5 µl Kultur auf den Objektträger aufgetragen. Die Analyse der Fluoreszenz erfolgt unter Verwendung des BX51-Mikroskopes (Olympus, Hamburg, Deutschland) zunächst im Hellfeld mit zunehmender Vergrößerung. Anschließend wird die Fluoreszenz der Bakterien unter Anregung mit UV-Licht mit einem geeigneten Farbfilter (GFP: Exzitationsfilter: 460-480 nm, Emissionsfilter: 498-540 nm; mCherry: Exzitationsfilter: 535-555 nm, Emissionsfilter: 570-620 nm) betrachtet. Die Fluoreszenzaufnahmen werden bei 100-facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 1 sec aufgenommen. Die Digitalisierung der Ergebnisse erfolgt mittels *F-View Soft Imaging System* (Olympus, Hamburg) und der Software *F-cell*.

<u>1x PBS</u>	8 g	NaCl
[Dulbecco <i>et al.</i> , 1954]	0,2 g	KCl
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	1,15 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
		ad 800 ml MilliQ
		mit HCl auf einen pH-Wert von 7.4 einstellen
		mit MilliQ auf 1000 ml auffüllen
		sterilfiltrieren

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Präparation von Proteinen aus *Y. enterocolitica*

2.3.1.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Flüssigkultur

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Flüssigkultur, beispielsweise für die SDS-Page, wird eine üNK im Verhältnis 1:100 in 50 ml LB-Medium verdünnt und bei entsprechender Temperatur unter Schütteln bis zur gewünschten OD_{600} angezogen. Anschließend werden 1,5 ml der Kultur bei 4°C und 13.200 UpM zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 µl 1x Laemmli-Puffer (2.3.6.1) resuspendiert. Der Ansatz wird für 10 min bei 100°C aufgeköcht und im Anschluss für 1 min bei RT und 13.200 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird entweder sofort in der SDS-Page eingesetzt (2.3.6.1) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.1.2 Isolierung von Überstandsproteinen

Zur Isolierung von Überstandsproteinen werden 50 ml der zu untersuchenden Kultur für 10 min bei 7.500 UpM und 4°C zentrifugiert. 45 ml des Überstandes werden in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Zu dem Überstand werden 5 ml Trichloressigsäure (*trichloroacetic acid*, TCA) mit einer Endkonzentration von 10% hinzugegeben und die Suspension wird mehrmals invertiert. Zur Fällung der Überstandsproteine wird der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Überstandsproteine durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 7.500 UpM und 4°C pelletiert. Das Pellet wird in 5 ml Aceton gewaschen und erneut für 30 min bei 7.500 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 1 ml Aceton aufgenommen. Anschließend folgt ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13.200 UpM und RT. Nach dem der Überstand verworfen wurde, wird das Pellet in 100 µl 1x Laemmli-Puffer (2.3.6.1) resuspendiert und für 10 min bei 100°C aufgeköcht. Das Proteingemisch wird im Anschluss direkt in einer SDS-Page eingesetzt (2.3.6.1) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.2 Überexpression von Proteinen

Für die Überexpression von Genen werden die beiden Expressionssysteme pET28b (Novagen, Darmstadt, Deutschland) und pBAD/HisA (Invitrogen) eingesetzt. Beide Systeme können über die Zugabe des jeweiligen Induktors feingesteuert werden: pET28b durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und pBAD/HisA durch die Zugabe von Arabinose. Das überexprimierte Protein ist mit einem His₆-Tag fusioniert, was eine einfache Detektion im Western Blot mit einem Anti-His₆-Tag-Antikörper erlaubt.

2.3.2.1 Klonierung der pBAD/HisA (Tet^R)-Konstrukte

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ampicillin-Resistenzkassette des Vektors pBAD/HisA von Invitrogen (Abb. A 12) durch eine Tetrazyklin-Resistenzkassette ersetzt. Hierzu wird die Tetrazyklin-Resistenzkassette zunächst mit Hilfe der in Tab. A 6 aufgeführten Primer aus dem Vektor pACYC184 (Abb. A 14) amplifiziert. Das PCR-Produkt wird mit *Nco*I geschnitten (2.2.6.1) und in die dephosphorylierte *Nco*I-Schnittstelle des Expressionsvektors pBAD/HisA ligiert (2.2.6.2 und 2.2.6.3). Die Ligationsansätze werden in *E. coli* Top10 transformiert (2.2.7.1) und auf Tetrazyklin selektiert. Mittels PCR werden Klone identifiziert, die das rekombinante Plasmid enthalten. Von diesen Klonen wird das Plasmid isoliert (2.2.2.1) und bei GATC sequenziert (2.2.9). Der resultierende Vektor wird fortan als pBAD/HisA (Tet^R) bezeichnet (Abb. A 13).

Für die Überexpression von Genen werden diese vom Start- bis zum Stoppcodon mit den in Tab. A 6 aufgeführten Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte werden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten (2.2.6.1) und in den Vektor pBAD/HisA (Tet^R) ligiert (2.2.6.3). Nach der Transformation der Ligationsansätze in *E. coli* Top10 (2.2.7.1) werden positive Klone mittels PCR identifiziert und mit Hilfe einer Sequenzierung bei GATC bestätigt (2.2.9).

2.3.2.2 Expression heterologer Proteine mit Hilfe von pBAD/HisA (Tet^R) und pET28b

Die optimalen Expressionsbedingungen für die Überexpression von Proteinen werden mit Hilfe von Vorversuchen, durchgeführt nach Herstellerprotokoll (Invitrogen für pBAD/HisA (Tet^R) bzw. Novagen für pET28b), gefunden. Für die Überexpression des gewünschten Proteins im großen Maßstab wird jeweils eine üNK des entsprechenden rekombinanten Stammes bei 30°C (*Yersinia* spp.) bzw. 37°C (*E. coli*) herangezogen. Am nächsten Morgen werden 400 ml LB-Medium, das mit Tetrazyklin (pBAD/HisA (Tet^R)) bzw. mit Kanamycin (pET28b) versetzt wurde, mit 10 ml üNK beimpft und bei entsprechender Temperatur und 180 UpM inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wird die Überexpression des Proteins durch Zugabe der jeweils zuvor ermittelten, optimalen Arabinose- bzw. IPTG-Konzentration induziert. Nach weiteren vier Stunden Inkubation wird die Kultur bei 4°C und 7.500 UpM für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.2.3 Zellaufschluss mittels *French Pressure Cell*

Eine für Proteine schonende und effiziente Methode des Zellaufschlusses stellt die *French Pressure Cell* dar. Das bei -20°C gelagerte Bakterienpellet wird in 4 ml Lysepuffer resuspendiert und in die vorgekühlte Zelle der *French Pressure Cell* (SLM Instruments, Inc., Rochester, New York, USA) überführt. Mit der *French Pressure Cell* wird ein Druck von 800-900 psi auf die Bakterienzelle ausgeübt. Unter diesem Druck wird die Zellsuspension durch eine enge Öffnung gepresst, wodurch die Zellen durch den anschließenden Druckabfall und die auftretenden Scherkräfte zerstört werden. Um einen vollständigen Zellaufschluss und damit eine optimale Proteinausbeute zu erzielen, werden zwei bis drei Passagen der Bakterienzellen durch die *French Pressure Cell* durchgeführt. Zwischen den Arbeitsschritten wird das Zelllysate auf Eis gekühlt. Nach dem Aufschluss wird das Zelllysate mit 1 mM des Proteasehemmers **Phenylmethanolsulfonylfluorid** (PMSF) sowie 10 μl Lysozym (10 mg/ml) und 10 μl DNase I (1 U/ μl) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zelltrümmer durch dreimalige Zentrifugation für 10 min bei 13.200 UpM und 4°C pelletiert. Der Überstand, der die Proteine enthält, wird entnommen und für die Affinitätschromatographie weiterverwendet (2.3.2.4).

<u>Lysepuffer</u>	50 mM	NaH_2PO_4
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
		pH 8.0

2.3.2.4 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung von His₆-Tag-fusionierten Proteinen wird das **Nickel-Nitrilotriacetat** (Ni-NTA) *Fast Start Kit* von Qiagen verwendet. Hierbei enthält die Agarose des Säulenmaterials die Chelat-bildende Verbindung NTA, welche kovalent am Agarosepolymer gebunden und mit Nickel-Ionen komplexiert ist. Nickel-Ionen binden selektiv die Histidin-Reste der His₆-Tag-Fusionsproteine. Proteine ohne His₆-Tag binden nicht an die Nickel-Matrix und werden dadurch aus der Säule gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt mit Imidazol, welches das Histidin des Proteins kompetitiv aus dem Chelatkomplex verdrängt. Da die Elution unter physiologischen Pufferbedingungen erfolgt, erlaubt diese Art der Affinitätschromatographie die Reinigung der Proteine in nativem Zustand.

Die Säule wird zunächst zweimal mit 4 ml Lysepuffer gewaschen und danach zweimal mit dem Zelllysate beladen. Anschließend wird die Matrix zweimal mit 4 ml Waschpuffer gespült, wobei die Waschfraktionen gesammelt werden. Im Anschluss erfolgt die Elution des Proteins mit viermal 500 µl Elutionspuffer. Zur Regeneration der Säule wird diese viermal mit 4 ml 0,5 M NaOH gewaschen und in 30%igem Ethanol bei 4 °C gelagert.

Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgt mittels SDS-PAGE (2.3.6.1) und Western Blot (2.3.7).

<u>Lysepuffer</u>	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
		pH 8.0
<u>Waschpuffer</u>	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	50 mM	Imidazol
		pH 8.0
<u>Elutionspuffer</u>	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol
		pH 8.0

2.3.3 Dialyse von Proteinen

Die Dialyse wird zum Entsalzen oder Umpuffern von Proteinen genutzt. Hierzu werden Dialyseschläuche der Firma Roth mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa verwendet. Zur Umpufferung von aufgereinigtem Protein wird ein Schlauchstück passender Länge in 5 ml Dialysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0,5 mM EDTA, 400 mM L-Arginin, 10% (w/v) Glycerin und 1 mM PMSF) für 10 min äquilibriert. Anschließend wird das Protein in den Schlauch überführt und über Nacht bei 4°C im Dialysepuffer (mindestens 1 l) unter ständigem Rühren inkubiert. Am nächsten Tag wird der Dialysepuffer durch neuen Puffer ersetzt, um so einen höheren Entsalzungs- bzw. Umpufferungsgrad zu erhalten. Nach einer Dialysezeit von weiteren 12 h wird das Protein aus dem Schlauch in sterile Reaktionsgefäße überführt und in 10% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach BRADFORD

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen im Mikrotiterplattenformat erfolgt photometrisch im Plattenleser *Wallac Victor*³ mit Hilfe einer modifizierten Methode nach BRADFORD [Bradford, 1976]. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 in zwei verschiedenen Zuständen vorkommen kann, die jeweils bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren. Durch Bindung an ein Protein wird der Farbstoff vom kationischen Zustand (Absorption bei 470 nm) in den anionischen Zustand überführt (Absorption bei 595 nm). Diese Absorptionsänderung ist über weite Bereiche zur Proteinkonzentration proportional. Da der Farbstoff hauptsächlich an basische Aminosäuren bindet, empfiehlt es sich, die Absorptionsmessungen auf eine Eichgerade mit Albumin Fraktion V zu beziehen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration werden 50 µl der Probe mit 200 µl Bradford-Arbeitslösung (2 Teile 5x Roti-Quant von Roth mit 5,5 Teilen bidestilliertem Wasser) vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung der OD₆₀₀ im Plattenleser *Wallac Victor*³. Die exakte Proteinkonzentration wird durch eine Standardkurve ermittelt, die mit bekannten Konzentrationen (0-100 µg/ml) von Albumin Fraktion V erstellt wird. Für jede Probe werden drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

2.3.5 Circulärdichroismus-Spektroskopie

Die **Circulärdichroismus (CD)**-Spektroskopie dient hauptsächlich dem Studium der Konfiguration und Konformation chiraler Moleküle. Am häufigsten kommt diese Methode in der Proteinbiochemie zur Untersuchung von Proteinstrukturen zum Einsatz. Neben der Bestimmung von Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen können auch Aussagen zur Strukturstabilität unter verschiedenen Umweltbedingungen getroffen werden.

In vorliegender Arbeit kommt die CD-Spektroskopie zur Strukturanalyse von TcaR2 bei 4°C, 20°C und 37°C zum Einsatz. Dazu wird das aufgereinigte Protein via Dialyse (2.3.3) in CD-Puffer (10 mM KH₂PO₄, 50 mM K₂SO₄, pH 7.6) überführt [Schlehuber *et al.*, 2002]. Die Durchführung von CD-Messungen erfolgt in einem Jasco J-810 Spektralpolarimeter (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland). Hierzu werden 200 µl Probe (0,2 mg Protein/ml) in eine 1 mm Quarzglaszelle gegeben und das entsprechende CD-Spektrum wird zwischen 190 nm und 350 nm aufgenommen. Zuvor wird das Referenzspektrum des CD-Puffers ohne Protein gemessen und vom Probenspektrum abgezogen. Die CD-Messung erfolgt unter Verwendung folgender Parameter: Messgeschwindigkeit: 10 nm/min bzw. 20 nm/min; Messmodus: kontinuierlich; Abstand Datenpunkte: 0,1 nm; spektrale Bandbreite: 1 nm sowie 16 Spektrenmittlungen [Schlehuber *et al.*, 2002]. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgt mit dem zum Spektralpolarimeter gehörigen Programm Spectra Analysis.

2.3.6 Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Analyse von Proteinen bzw. Proteinextrakten wird die **Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)** verwendet. Hierbei werden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

2.3.6.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur unabhängigen Trennung von Proteinen vom Ladungszustand wird SDS verwendet. Dieses Detergenz führt zur Denaturierung der Proteine, besonders nach Reduktion mit Mercaptoethanol oder DTT, und unterbindet somit Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). SDS verleiht allen Proteinen eine negative Ladung und überdeckt dadurch deren Eigenladung. Somit kommt es zu einem nahezu konstanten Ladung-zu-Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/ 1 g Protein), wodurch die Wanderungsgeschwindigkeit von der Ladung des Proteins unabhängig und daher ausschließlich eine Funktion der Molekülgröße ist.

Die Prozentigkeit des SDS-Geles wird je nach Größe des nachzuweisenden Proteins gewählt und kann Tab. 5 entnommen werden. Als Größenstandard wurde in vorliegender Arbeit der Längenmarker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, 10-170 kDa der Firma Thermo Scientific verwendet.

Tab. 5: Konzentration der SDS-Gele mit den zugehörigen Trennungsbereichen. [Jansohn *et al.*, 2012]

Gelkonzentration [% (w/v)]	Trennbereich [kDa]
8	50-200
10	30-120
12	20-100
15	10-60

Um eine gute Trennleistung zu erreichen, werden die Proteine in einem 6%igen Sammelgel fokussiert, bevor sie im Trenngel (12,5%) separiert werden. Zu diesem Zweck wird die diskontinuierliche SDS-PAGE angewandt, bei der das Sammelgel eine geringere Acrylamid-Konzentration und einen niedrigeren pH-Wert aufweist als das Trenngel. Dies hat zur Folge, dass die Glycin-Anionen des Laufpuffers aufgrund des niedrigeren pH-Wertes im Sammelgel bevorzugt als ungeladene Zwitterionen vorliegen und daher abgebremst werden. Es entsteht somit eine Zone mit geringerer Leitfähigkeit und erhöhter Feldstärke zwischen den ungehindert in Richtung Anode wandernden Chlorid-Ionen des Sammelgels und den Glycin-Ionen. Die Proteinmoleküle, deren Mobilität zwischen der von Chlorid- und Glycin-Ionen liegt, werden zu einer schmalen Bande fokussiert. An der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel schlägt der pH-Wert um, und die Glycin-Moleküle liegen wieder bevorzugt

als Anionen vor. Sie übertreffen daher die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinmoleküle, und die einzelnen Proteine werden nun bei konstanter Feldstärke entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Nachstehend ist das Pipettierschema für die Herstellung der verwendeten Trenn- und Sammelgele aufgeführt.

<u>Trenngel (12,5%)- für zwei Gele</u>		<u>Sammelgel (6%)- für zwei Gele</u>	
3,32 ml	MilliQ	3,2 ml	MilliQ
3,75 ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	0,6 ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)
1,42 ml	Glycerin (99%)	1,1 ml	Acrylamidlösung
6,25 ml	Acrylamidlösung (30%)	50 µl	15% SDS
100 µl	15% SDS	3 µl	TEMED
10 µl	TEMED	50 µl	10% APS
150 µl	10% APS		

Zwei vorher mit Ethanol gereinigte Glasplatten werden mit Silikonspacern (0,75 mm) versehen, mit Klammern fixiert und auf einer ebenen Fläche platziert. Das frisch zubereitete Trenngel wird luftblasenfrei bis etwa 2 cm unterhalb der Oberkante der kleineren Glasplatte gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngeles wird das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel eingefüllt. Danach wird der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach 30 min ist die Polymerisation des Sammelgeles abgeschlossen und die Kämmen und Spacer können entfernt werden.

Die zu untersuchenden Proben werden vor dem Auftragen mit 1x Laemmli-Puffer (Zellpellets) bzw. 5x Laemmli-Puffer (Proteinlösungen) versetzt, 10 min bei 100°C aufgekocht und anschließend kurz zentrifugiert (1 min, 13.200 UpM, RT). Pro Tasche werden 10 bis 30 µl Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in einer vertikalen Gelkammer (Biometra, Minigel-Twin, Analytik Jena, Jena, Deutschland) mit 1x SDS-Puffer bei einer Spannung von 120 V und einer Stromstärke von 18 mA pro Gel.

<u>5x Laemmli-Puffer</u>	100 mg	Bromphenolblau
[Laemmli, 1970]	3,5 ml	Glycerin (99%)
	1,5 g	SDS
	3,2 ml	1M Tris-HCl (pH 6.8)
	2,5 ml	2-Mercaptoethanol

<u>10x SDS-Laufpuffer</u>	250 mM	Tris-Base
	1920 mM	Glycin
	1% (w/v)	SDS
		ad 1000 ml MilliQ

Nach der Gelelektrophorese wird das Gel entweder für den Western Blot weiterverwendet (2.3.7) oder die Proteine werden mit einer Coomassie-Färbelösung 1-12 h unter Schütteln bei RT visualisiert. Nachfolgende Tabelle beschreibt die einzelnen Färbeschritte.

Tab. 6: Schritte zur Färbung eines Polyacrylamidgeles.

Färbeschritt	Substanz	Menge (pro Gel)	Zeit
Fixierung	Phosphorsäure (85%)	1 ml	10 min
	Methanol	20 ml	
	MilliQ	79 ml	
Färbung	Methanol	20 ml	1-24 h
	Roti®-Blue (5x)	20 ml	
	MilliQ	60 ml	
Entfärben	Methanol	20 ml	ca. 7 h
	MilliQ	80 ml	

2.3.6.2 Tricin-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung kleiner Proteine kann in Anwesenheit von SDS problematisch sein, da Peptide und kleine Proteine Komplexe mit Detergenzien bilden können, die gleich groß und gleich geladen sind wie die SDS-Mizelle selbst. Dadurch wird die Auftrennung von Proteinen mit nah beieinanderliegenden Molmassen nahezu unmöglich. Glycin als Folgeion in der SDS-PAGE führt aufgrund seiner langsamen Wanderung durch das saure Sammelgel zur Konzentrierung von großen Proteinen. Bei Verwendung von Tricin anstatt von Glycin wird das Verhältnis von Mobilität der Folgeionen und Proteinen verändert. Dadurch wird die Trennleistung im Sammelgel in den Bereich niederer Molmassen verlegt und die Auftrennung von Proteinen von < 20 kDa wird ermöglicht. Daher kam in vorliegender Arbeit bei sehr kleinen Proteinen (1 bis 20 kDa) ein 18%iges Tricin-Gel zur Anwendung. Das Pipettierschema für die Herstellung von Tricin-Gelen kann nachfolgendem Abschnitt entnommen werden.

Trenngel (18%)- für zwei Gele

2 ml	Glycerin (99%)
12 ml	Acrylamidlösung (30%)
6,6 ml	Gelpuffer (3x)
20 µl	TEMED
200 µl	10% APS

Sammelgel (4%)-für zwei Gele

7,5 ml	MilliQ
1,6 ml	Acrylamidlösung (30%)
3,1 ml	Gelpuffer (3x)
15 µl	TEMED
150 µl	10% APS

<u>3x Gelpuffer</u>	246,25 ml	3M Tris-HCl (pH 8.45)
	3,75 ml	20% SDS

1x Anodenpuffer 12,12 g Tris
 1,86 ml HCl (37%)
 ad 1000 ml MilliQ

10x Kathodenpuffer 60,83 g Tris
 89,6 g Tricin
 25 ml 20% SDS
 ad 500 ml MilliQ

Die Gelelektrophorese wird bei RT mit 25 mA pro Gel für etwa 3,5 h durchgeführt. Anschließend werden die Gele mit Coomassie gefärbt (2.3.6.1) oder stehen dem Western Blot (2.3.7) zur Verfügung.

2.3.6.3 Native Gelelektrophorese

Native Gelsysteme enthalten kein SDS, das heißt die Ladung der Proteine im Gel richtet sich nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem pH-Wert des verwendeten Puffers. In dieser Arbeit wurden native Gele zur Reinheitskontrolle von Proteinfractionen sowie zur Studie von Protein-Protein-Interaktionen verwendet. Die Herstellung von nativen Gelen entspricht im Wesentlichen der von SDS-Gelen (2.3.6.1).

Trenngel (8%)- für zwei Gele

14,85 ml MilliQ
 7,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)
 7,5 ml Acrylamidlösung (30%)
 15 µl TEMED
 150 µl 10% APS

Sammelgel (4%)- für zwei Gele

7,4 ml MilliQ
 3 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)
 1,5 ml Acrylamidlösung (30%)
 15 µl TEMED
 100 µl 10% APS

5x Ladepuffer 510 mg Bromphenolblau
 25 ml Glycerin (99%)
 15,5 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8)
 7 ml MilliQ

Nativer Laufpuffer 3 g Tris-Base
 14,4 g Glycin
 ad 1000 ml MilliQ

Die zu analysierenden nativen Proteinlösungen werden mit dem Probenpuffer vermischt und direkt aufs Gel geladen (5-20 µl). Die Elektrophorese erfolgt bei 4°C und 20-25 mA für circa 3 h. Anschließend werden die Proteinbanden über eine Färbung mit Coomassie-Blau visualisiert (2.3.6.1).

2.3.6.4 Zymogramm

Zur Charakterisierung der Substratspezifität von Endolysin aus *Y. enterocolitica* W22703 kommen modifizierte Zymogramme zum Einsatz. Als Substrat werden lyophilisierte Zellen von verschiedenen *Yersinia* spp. verwendet. Hierzu werden die zu untersuchenden Stämme in 50 ml LB-Medium bei 30°C und 180 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen und anschließend für 20 min bei 121°C autoklaviert. Danach werden die Zellen für 10 min bei 10.000 UpM und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss werden die Zellen für 24 h bei -20°C im Vakuum lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Herstellung von Zymogramm-Gelen entspricht im Wesentlichen der von SDS-Gelen (2.3.6.1). In das 15%ige Trenngel werden 0,2% (w/v) lyophilisierte Zellen eingegossen. Dem Trenngel ist ein 4%iges Sammelgel vorangestellt.

Trenngel (15%)- für zwei Gele

3,6 ml	MilliQ
3,75 ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)
15 ml	Acrylamidlösung (30%)
150 µl	20% SDS
20 µl	TEMED
150 µl	10% APS
30 mg	lyophilisierte Zellen

Sammelgel (4%)- für zwei Gele

3,1 ml	MilliQ
1,25 ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)
670 µl	Acrylamidlösung
25 µl	20% SDS
5 µl	TEMED
25 µl	10% APS

20 µl aufgereinigtes Endolysin (1 mg/ml) werden mit 5 µl 5x Laemmli-Puffer versetzt, für 3 min bei 100°C aufgekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Kontrolle dienen BSA und Lysozym, welche der gleichen Behandlung unterzogen werden. Die Gelelektrophorese wird bei RT und 20 mA pro Gel für ca. 1,5 h durchgeführt. Anschließend wird das Gel dreimal für 10 min bei RT in MilliQ gewaschen. Nach der Äquilibration im Denaturierungspuffer (5 min bei RT) wird das Zymogramm über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird das Gel für 5 min mit MilliQ gewaschen und für 3 h in Färbelösung gelegt. Das Entfärben in MilliQ erfolgt so lange, bis eine durchscheinende Bande bei der Lysozym-Positivkontrolle detektiert werden kann. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird das Gel eingescannt und densitometrisch mit Hilfe der Software *Kodak ID Image Analysis* ausgewertet. Hierzu werden für jede Bande gleichgroße Messfelder verwendet, welche als Integral zum Hintergrund in % angegeben werden.

<u>Denaturierungspuffer</u>	10 mM	Tris, (pH 7.0)
	0,1%	Tritonx X-100
<u>Färbelösung</u>	0,1%	Methylenblau
	0,1%	KOH

2.3.7 Western Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (2.3.6) werden mit Hilfe des Western Blots auf eine Membran transferiert, um sie so immunochemischen Nachweismethoden zugänglich zu machen. Hierzu werden die Proteine in einem *Semi-Dry-Blotter* (Pegasus, PHASE, Lübeck, Deutschland) auf eine **Polyvinylidenfluorid (PVDF)**-Membran (Amersham, Freiburg, Deutschland) übertragen. Dazu wird das Proteingel nach Beendigung der Elektrophorese und Abtrennung des Sammelgeles für 10 min in 1x Blotpuffer geschwenkt. In der Zwischenzeit wird die PVDF-Membran für 15 sec in 100% Methanol inkubiert und anschließend für 5 min in bidestilliertem Wasser gewaschen. Danach wird die Membran für 10 min in Blotpuffer äquilibriert. Die Blotapparatur wird wie folgt zusammengebaut: Drei Lagen in 1x Blotpuffer getränkte Whatmanpapiere (Whatman, Dassel, Deutschland) werden tropfnass auf die Kathode gelegt. Darauf wird das Polyacrylamidgel positioniert und die Membran luftblasenfrei aufgelegt. Anschließend folgen erneut drei in 1x Blotpuffer befeuchtete Whatmanpapiere sowie die Anode. Nach dem Proteintransfer, der in Abhängigkeit der Größe der Proteine für eine Dauer von 15-50 min bei 12 V und 120 mA erfolgt, wird die Membran über Nacht bei 4°C in 20 ml Blockpuffer abgesättigt. Als Blockpuffer wurden in dieser Arbeit genutzt: 5% (w/v) Milchpulver in Tris-Puffer (*Tris-buffered saline*, TBS) mit 0,1% Tween 20 (TBS-T), 2% (w/v) Albumin Fraktion V in TBS-T oder 10% fötales Kälberserum (FKS) in TBS-T. Am nächsten Tag wird die Membran für die Proteindetektion eingesetzt oder in Folie eingeschweißt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

<u>10x Blotpuffer</u>	143 g/l	Glycin
	30 g/l	Tris
	10 g/l	SDS
<u>1x Blotpuffer</u>	100 ml	Blotpuffer (10x)
	200 ml	Methanol (100%)
	700 ml	MilliQ
<u>10x TBS</u>	100 mM	Tris-HCl, pH 8.8
	1,5 M	NaCl
<u>1x TBS-T</u>	100 ml	TBS (10x)
	1 ml	Tween 20
	899 ml	MilliQ

2.3.8 Immunofärbung und chemiluminometrische Detektion

Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit dem Blockpuffer (2.3.7) wird die PVDF-Membran zweimal für 10 min unter Schwenken mit 1x TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe des Primärantikörpers. In vorliegender Arbeit wurden folgende Primärantikörper verwendet: monoklonaler Anti-His₆-Tag-Antikörper aus der Maus (1:10.000 in TBS-T mit 10% FKS verdünnt; Dianova, Hamburg, Deutschland), polyklonaler Anti-RFP-Antikörper aus dem Kaninchen (Invitrogen, 1:10.000 verdünnt in TBS-T mit 10% FKS) und polyklonaler Anti-YmoA-Antikörper aus dem Kaninchen (Petra Dersch, Universität Braunschweig, Deutschland, 1:3.000 verdünnt in TBS-T mit 1% Albumin Fraktion V). Nach einem einstündigen Inkubationsschritt bei RT, währenddessen die Bindung des Primärantikörpers an das jeweilige Protein erfolgt, wird die PVDF-Membran erneut zweimal für 10 min unter Schwenken mit TBS-T gewaschen. Im nächsten Schritt folgt die Zugabe des Zweitantikörpers. Als Zweitantikörper wird ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen- (bei Verwendung von Anti-YmoA-Antikörper und Anti-RFP-Antikörper) bzw. Ziege-Anti-Maus-Antikörper (Anti-His₆-Tag-Antikörper) gebraucht. Die Zweitantikörper werden jeweils 1:10.000 in TBS-T mit 1% Albumin Fraktion V verdünnt eingesetzt. Nach 60 min bei RT wird der Sekundärantikörper wiederum gründlich mit TBS-T abgewaschen und die Membran für 2 min in alkalischem Phosphatase (AP)-Puffer äquilibriert. Zur kalorimetrischen Detektion spezifischer Bindungen werden die Entwickler Nitroblautetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat (BCIP) verwendet. Die Färbung erfolgt im Dunkeln. Ist die Färbung ausreichend, wird die Reaktion durch Zugabe von 3%iger TCA gestoppt und die Membran getrocknet. Zur Auswertung wird die Membran eingescannt und durch Densitometrie quantifiziert (*Kodak ID Image Analysis Software*).

Für die chemiluminometrische Nachweisreaktion werden 400 µl CDP-Star (Novagen) gleichmäßig auf einer Glasplatte verteilt und die vorher in AP-Puffer äquilibrierte Membran darin eingelegt. Nach 1 min Inkubation bei RT und Dunkelheit wird das Ganze in Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Detektion erfolgt mit Hilfe der IVIS-Kamera (2.2.11.1) bei einer Belichtungszeit von 1 min. Die Quantifizierung der Banden erfolgt anschließend mit der Funktion ROI (*region of interest*, Bereich von Interesse) des Programmes *Living Image*TM V. 4.01 (Igor Pro). Das Ergebnis der densitometrischen Auswertung, bei der für jede Bande gleichgroße Messfelder verwendet werden, wird als Integral zum Hintergrund in % angegeben.

<u>AP-Puffer</u>	100 mM	Tris-HCl, pH 9.5
	150 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
<u>Detektionslösung</u> (kalorimetrisch)	132 µl	BCIP (50 mg/ml in N,N-Dimethylformamid, DMF)
	66 µl	NBT (50 mg/ml in 70%igem DMF)
		in 10 ml AP-Puffer

2.3.9 Gelmobilitätsstudien

Zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen wurden in dieser Arbeit Gelmobilitätsstudien (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) durchgeführt. Die Methode beruht darauf, dass ungebundene DNA in einem nativen Gel eine höhere elektrophoretische Mobilität besitzt als proteingebundene DNA.

Die zu untersuchenden DNA-Sequenzen, z.B. Promotorregionen, werden mittels PCR amplifiziert (2.2.4.1) und nach Herstellerangaben mit dem *QIAQuick PCR Purification*-Kit aufgereinigt (2.2.4.3). 100 ng der jeweils zu untersuchenden DNA werden mit 4 µl 5x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer und 100 ng Kompetitor-DNA vermischt und mit steigenden Mengen an aufgereinigtem Protein versetzt. Die Ansätze werden abschließend mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht und 45 min bei der zu untersuchenden Temperatur inkubiert. Nach der Bindung des Proteins an die DNA werden die Proben mit 4 µl 6x *Orange Loading Dye* (Thermo Scientific) versetzt und auf ein 9,5%iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei einer Inkubationstemperatur von 4°C, 15°C oder 37°C und 120 V. Die Gele werden anschließend im GelRed-Bad (1x in 0,1M NaCl) gefärbt und die DNA-Banden bei 320 nm in einem *Image Master VDS* (Pharmacia Biotech) sichtbar gemacht. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante k_D wird das Gel eingescannt und die Banden werden densitometrisch mit Hilfe der *Kodak ID Image Analysis*-Software ausgewertet.

<u>5x TBE-Puffer</u>	54 g/l	Tris
	27,5 g	Borsäure
	20 ml	0,5 M EDTA, pH 8.0
<u>EMSA-Gel (für zwei Gele):</u>	4,8 ml	Acrylamidlösung (30%)
	3 ml	TBE (5x)
	7 ml	MilliQ
	150 µl	APS (10%)
	15 µl	TEMED

2.4 Invertebratenversuche

Als Infektionsmodell für *Y. enterocolitica* und die Untersuchung der Expression der *tc*-Gene *in vivo* wurde der Fadenwurm *C. elegans* verwendet.

2.4.1 Haltung von *C. elegans*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem *C. elegans*-Wildtypstamm (Bristol, N2) gearbeitet. Dieser wurde vom **Caenorhabditis Genetics Center** (CGC) von der Universität von Minnesota bezogen. Die Kultivierung von *C. elegans* erfolgt bei 20°C auf **Nematode Growth Medium** (NGM) mit dem *E. coli*-Stamm OP50 als einziger Nahrungsquelle. OP50 ist ein Uracil-auxotropher Stamm, dessen Wachstum durch die Menge an Uracil im Medium reguliert wird. Im NGM-Agar ist Uracil durch das beigefügte Pepton enthalten. Durch Variation des Peptongehaltes lässt sich die Dicke des Bakterienrasens beeinflussen. Für die Kultivierung von *C. elegans* werden 50 µl (6 cm Platten) bzw. 100 µl (9 cm Platten) einer OP50-üNK mittig auf dem NGM-Agar ausplattiert. Die Platten werden bei RT bis zur Entstehung eines konfluenten Bakterienrasens inkubiert. Anschließend können sie für die *C. elegans*-Kultivierung genutzt oder bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert werden.

<u>NGM-Agar</u>	3 g	NaCl
	2,5 g	Pepton (aus Casein)
	17 g	Agar (<i>high strength agar</i> von Serva)
		ad 1000 ml MilliQ
		autoklavieren (121°C, 20 min)
Zugabe nach dem Autoklavieren:	1 ml	Cholesterin (5 mg/ml in Ethanol)
	0,5 ml	1 M CaCl ₂
	1 ml	1 M MgSO ₄
	25 ml	KH ₂ PO ₄ , pH 6.0
	5 ml	Nystatin

Zur Stammhaltung von *C. elegans* kommt die sogenannte *chunk out*-Methode zum Einsatz. Dazu wird mit einem sterilen Skalpell ein kleines Agarstück aus einer alten Kultur herausgeschnitten und mit der Oberseite nach unten auf eine neue mit OP50 beimpfte NGM-Agarplatte übertragen. Durch eine regelmäßige Passage wird vermieden, dass sich aufgrund der hohen Populationsdichte und dem damit verbundenen Nahrungsmangel Dauerlarven ausbilden.

Die larvalen Stadien von *C. elegans* können bei -80 °C bis zu zehn Jahre gelagert werden. Dazu werden ausgehungerte L1- und L2-Larven von zwei großen Kulturplatten zweimal mit jeweils 5 ml M9-Puffer von der Platte gespült, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert (2 min bei 2.000 UpM und RT) und mit M9-Puffer gewaschen. Der Puffer wird bis auf etwa 1 ml von dem Nematodenpellet

abgenommen und mit 1 ml Einfriermedium versetzt. Anschließend werden jeweils 500 µl der Nematodensuspension in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen werden in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren. Zur Kontrolle wird nach einer Woche der Inhalt eines aufgetauten Kryoröhrchens auf mehrere NGM-Platten verteilt und die lebenden Würmer werden nach zwei Tagen gepickt.

<u>Einfriermedium</u>	20 ml	1 M NaCl
	10 ml	1 M KH ₂ PO ₄ (pH 6.0)
	60 ml	100% Glycerin
	110 ml	MilliQ autoklavieren (121°C, 20 min)
Zugabe nach dem Autoklavieren:	0,6 ml	0,1 M MgCl ₂

2.4.2 Synchronisation von *C. elegans*

Die Synchronisation von *C. elegans* erfolgt durch Bleichen. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass die Cuticula der *C. elegans*-Eier für längere Zeit resistent gegen eine 2%ige Hypochlorid-Lösung ist. Je nach erforderlicher Menge an Larven wird eine entsprechende Anzahl an 9 cm-Platten mit möglichst vielen graviden Würmern gewählt. Mit Hilfe einer Glaspasteurpipette werden diese mit 0,1% Triton X-100 versetzten M9-Puffer von den Platten gespült und in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Würmer werden für 2 min bei 2.000 UpM und RT pelletiert und der Überstand wird bis auf 2 ml abgenommen. Diese Behandlung wird dreimal wiederholt, um die Wurm suspension vollständig von Bakterien zu befreien. Nach dem letzten Waschschrift wird das Nematodenpelett in 3 ml M9-Puffer resuspendiert und mit 3 ml frischer Bleichlösung versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgefäß per Hand kräftig 3-4 min geschüttelt, bis die Hermaphroditen aufbrechen. Dieser Vorgang wird unter dem Binokular kontrolliert, damit die Hypochlorid-Lösung rechtzeitig abgewaschen werden kann, bevor die Eihülle angegriffen wird. Das Eipelett wird in Folge so lange mit M9-Puffer gewaschen, bis kein Chlorgeruch mehr wahrnehmbar ist (ca. 5-7 Waschgänge). Die so gewonnenen Eier werden über Nacht in M9-Puffer bei RT geschüttelt. Nach dem Schlüpfen bleiben die Tiere bei Nahrungsmangel am Ende der L1-Phase in ihrer Entwicklung stehen und setzen ihr Wachstum (über L2) erst nach Umsetzung auf OP50-Platten fort. Am nächsten Tag werden die L1-Larven daher erneut in M9-Puffer gewaschen und auf frische mit *E. coli* OP50 beimpfte NGM-Agarplatten überführt.

<u>Bleichlösung</u>	23,24 ml	steriles MilliQ
	1,25 ml	5 M KOH
	0,5 ml	NaOCl (12%)

2.4.3 Toxizitätstest mit *C. elegans*

Mit Hilfe eines Toxizitätstestes (*lifespan assay*), der auf der Messung der Lebensspanne von *C. elegans* beruht, wurde die nematodizide Wirkung von *Y. enterocolitica* W22703 und dessen Mutanten näher charakterisiert. Hierzu werden die zu testenden *Y. enterocolitica*-Stämme bei 30°C über Nacht angezogen und am nächsten Tag auf NGM-Agar ausplattiert (100 µl üNK auf 9 cm Platten). Die Platten werden für zwei Tage bei RT inkubiert und anschließend direkt für den Toxizitätstest verwendet. Für den Assay werden pro Stamm im Dreifachansatz je 40 L4-Larven mit Hilfe eines Wurm-Picks auf die Infektionsplatten gesetzt. Beim Wurm-Pick handelt es sich um einen in einer Pasteurpipettenspitze verschmolzenen Platindraht (\varnothing 0,2 mm), dessen Ende mit einer Flachzange plattgedrückt wurde. Die Infektion erfolgt für vier Stunden bei RT. Als Kontrolle für den Assay wird eine Infektionsplatte mit *E. coli* OP50 mitgeführt. Nach Ablauf der Infektionszeit werden die L4-Larven auf mit *E. coli* OP50 beimpfte NGM-Agarplatten überführt und bei 20°C inkubiert. Während der reproduktiven Phase werden die adulten Tiere täglich auf neue Platten transferiert, um das Verhungern der Würmer zu verhindern und um die adulten Tiere von der F2-Generation zu trennen. Danach erfolgt ein Plattenwechsel nur im Fall einer Verunreinigung oder bei Nahrungsknappheit. Es werden täglich der Bestand gezählt und tote Tiere entfernt. Als tot klassifiziert werden Würmer, die nicht mehr auf taktile Reize reagieren, beispielsweise auf Berührung durch den Wurm-Pick, und kein erkennbares Pharynxpumpen zeigen. In die Statistik werden ausschließlich Tiere aufgenommen, die an einem natürlichen Tod verstorben sind. So werden Würmer, die am Rand der Petrischale vertrocknen oder Probleme bei der Eiablage haben (*internal hatching*), nicht mitgezählt. Mit dem Programm R wird diejenige Zeit berechnet, bei der 50% der Population tot sind (*time of death*, TD_{50}) und zur bildlichen Darstellung eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung der für diese Arbeit essentiellen Vektoren

3.1.1 Konstruktion eines Reporterplasmides zur Analyse der Genexpression der *tc*-Gene der Tc-PAI_{Ye} in *Y. enterocolitica* W22703

Die Expression der Gene der insektiziden Pathogenitätsinsel Tc-PAI_{Ye} von *Y. enterocolitica* W22703 bei 15°C und 37°C sollte in vorliegender Arbeit mit Transkriptionsfusionsanalysen bestimmt werden. Hierzu musste zunächst ein geeigneter Vektor konstruiert werden, der die Integration der für Reportersysteme kodierenden Determinanten (*luxCDABE*, *gfp* oder *mCherry*) hinter die Promotoren der *tc*-Gene erlaubt. Während bei der episomalen Reporterengenfusion die Plasmide verloren gehen können und es zu Variationen in der Plasmidkopienzahl der Zellen einer zu analysierenden Population kommen kann, ermöglicht die hier verwendete Methode eine stabile chromosomale Integration des Reportergenes als Einzelkopie.

Als Grundgerüst für den zu konstruierenden Vektor wurde das Suizidplasmid pUT mini-Tn5 *luxCDABE* Km2 [Winson *et al.*, 1998] verwendet. Dieses weist eine Pir-abhängige oriR6K- und eine mobRP4-Region auf (siehe Anhang Abb. A 5). Als Klonierungs- und Konjugationsstamm wurde *E. coli* S17.1 λ *pir* genutzt. Dieser trägt die Gene *tra* und *pir*, die für den konjugativen Apparat bzw. für das Protein π , das essentiell für die Replikation des Suizidplasmides ist, kodieren. Ausgehend vom Suizidvektor pUT mini-Tn5 *luxCDABE* Km2 wurde der Vektor pUTs-*luxCDABE* (Cm^R) wie unter 2.2.8.2 beschrieben konstruiert. Um die Funktionsfähigkeit des Vektors zu testen, wurde aus chromosomaler DNA von *Y. enterocolitica* W22703 der Promotor des Kälteschockgenes *cspB* mittels PCR amplifiziert und über die artifiziellen Schnittstellen *KpnI* und *SacI* in den ebenfalls geschnittenen Vektor pUTs-*luxCDABE* (Cm^R) ligiert. Das rekombinante Plasmid wurde in elektrokompetente *E. coli* S17.1 λ *pir* transformiert, mittels PCR verifiziert und über Konjugation in den Rezipienten *Y. enterocolitica* W22703 transferiert. Das Plasmid kann aufgrund der Abwesenheit des *pir*-Genproduktes in dem Stamm nicht replizieren. Transkonjuganten, die eine Nalidixinsäure- und Chloramphenicol-Resistenz tragen, weisen eine Plasmidintegration in das Genom auf. Der resultierende Stamm W22703 P_{*cspB*}::*lux* wurde auf selektivem LB-Agar bei 15°C und 37°C inkubiert und anschließend unter der IVIS-Kamera analysiert. Bei 15°C konnte nach dreitägiger Inkubation eine starke Biolumineszenz detektiert werden. Diese war ca. 100-fach stärker ausgeprägt als bei 37°C (Abb. A 1). Diese Ergebnisse stimmen mit dem allgemein in der Literatur beschriebenen Expressionsverhalten von *cspB* in *Y. enterocolitica* überein [Bresolin *et al.*, 2006b], wodurch die Funktionsfähigkeit des Vektors bewiesen werden konnte.

Zur Untersuchung der transkriptionalen Aktivität der *tc*-Gene von *Y. enterocolitica* W22703 auf Einzelzellebene wurde die *luxCDABE*-Kassette des Suizidvektors pUTs-*luxCDABE* (Cm^R) wie unter 2.2.8.2 beschrieben durch die Fluoreszenz-Reportergene *gfp* bzw. *mCherry* ersetzt. Die resultierenden

Suizidplasmide pUTs-*gfp* bzw. pUTs-*mCherry* wurden analog zu pUTs-*luxCDABE* (Cm^R) auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Hierzu wurde der Promotorbereich von *tcaA* aus *Y. enterocolitica* W22703 vor die Reportergene kloniert und das rekombinante Plasmid via Konjugation in den Rezipienten transferiert. Die Integration des Suizidplasmides an die richtige Stelle im Genom von *Y. enterocolitica* W22703 wurde mittels PCR verifiziert und der Stamm W22703 P_{*tcaA*}::*gfp* bzw. W22703 P_{*tcaA*}::*mCherry* nach drei Tagen Inkubation bei 15°C unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Beide Stämmen zeigten eine starke Fluoreszenz im roten (W22703 P_{*tcaA*}::*mCherry*) bzw. grünen Bereich (W22703 P_{*tcaA*}::*gfp*), wodurch gezeigt werden konnte, dass die beiden Vektoren pUTs-*gfp* und pUTs-*mCherry* zur Untersuchung der transkriptionalen Aktivität auf Einzelzellebene geeignet sind (Abb. A 2).

3.1.2 Konstruktion eines Vektors für die Proteinexpression in *Y. enterocolitica*

Zur Überexpression einzelner Gene von *Y. enterocolitica* W22703 wurde in dieser Arbeit ein Expressionsvektor konstruiert. Hierzu wurde als Grundgerüst der Vektor pBAD/HisA von Invitrogen verwendet. Damit dieser Vektor auch in dem von Natur aus Ampicillin-resistenten *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 verwendet werden konnte, musste die Resistenzkassette gegen einen anderen Marker ausgetauscht werden. Die Ampicillin-Resistenzkassette von pBAD/HisA wurde mittels *NcoI* ausgeschnitten und durch die Tetrazyklin-Resistenzkassette, welche zuvor aus dem Vektor pACYC184 mittels PCR amplifiziert wurde, ersetzt. Der resultierende rekombinante Vektor wird im weiteren Verlauf der Arbeit als pBAD/HisA (Tet^R) bezeichnet. Im nächsten Schritt wurde das Überexpressionsplasmid auf seine Funktionsfähigkeit getestet. Dazu wurde *tcaR2* in pBAD/HisA (Tet^R) kloniert und der resultierende rekombinante Vektor pBAD-*tcaR2* in elektrokompente *Y. enterocolitica* W22703-Zellen transformiert. Anschließend wurden jeweils 10 ml Tetrazyklin-haltiges LB-Medium mit 1 ml ÜNK angeimpft, bei 30°C und 180 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und mit folgenden Arabinosekonzentrationen induziert: 0,0002%, 0,002%, 0,02%, 0,2% und 2%. Die Kulturen wurden nach drei Stunden Inkubation bei 30°C geerntet, in 100 µl 1x Laemmli-Puffer aufgenommen, 10 min bei 100°C erhitzt und im Western Blot analysiert. Im Western Blot wurde mit ca. 34 kDa eine Bande in Höhe des zu erwartenden His-markierten TcaR2-Proteins detektiert, deren Intensität mit steigender Arabinosekonzentration zunahm (Abb. A 3). Die stärkste Bande konnte bei einer eingesetzten Arabinosekonzentration von 2% detektiert werden. Die Funktionsfähigkeit des Überexpressionsvektors pBAD/HisA (Tet^R) konnte mit diesem Versuch gezeigt werden.

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die Expression eines rekombinanten Proteins in Bakterien extrem variabel ist. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit für jedes mit dem pBAD-System zu überexprimierende Protein die optimale Arabinosekonzentration sowie Inkubationszeit und -temperatur bestimmt.

3.2 Expression der *tc*-Gene in *Y. enterocolitica* W22703

In diesem Abschnitt wird die Expression und Regulation der *tc*-Gene der insektiziden Pathogenitätsinsel sowie von *tccC2*, welches außerhalb der Tc-PAI_{Ye} lokalisiert ist, näher betrachtet.

3.2.1 Expression von *tcaA*, *tcaB*, *tcaC*, *tccC1* und *tccC2* bei 15°C und 37°C

Die Promotoren der insektiziden Gene *tcaA*, *tcaB*, *tcaC*, *tccC1* und *tccC2* wurden mit einem *luxCDABE*-Reporter gen fusioniert. Anschließend wurden durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm sowie der Biolumineszenz bei 490 nm Expressionsprofile der resultierenden Stämme bei 15°C und 37°C erstellt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 4 zusammengefasst.

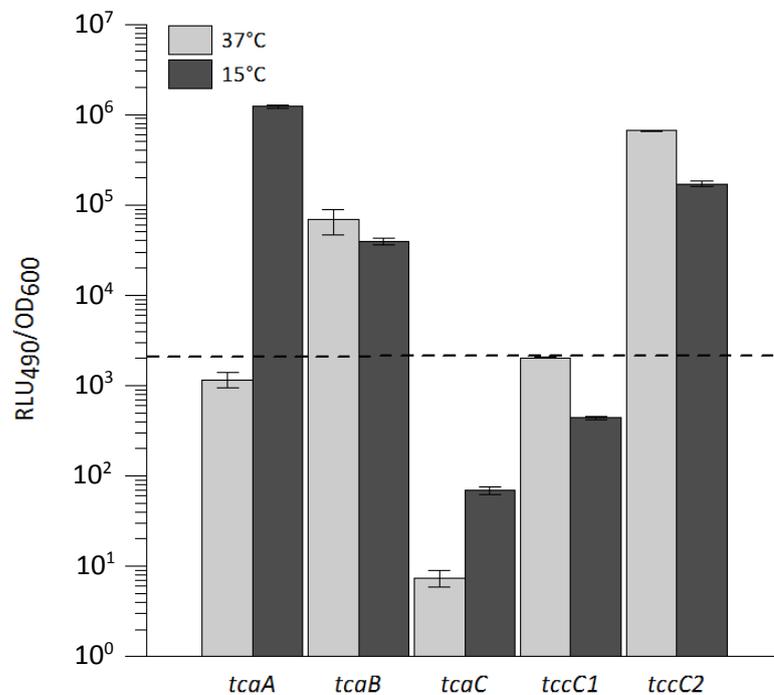


Abb. 4: Promotoraktivität von *tcaA*, *tcaB*, *tcaC*, *tccC1* und *tccC2* bei 15°C und 37°C in LB-Medium. Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Die gestrichelte Linie symbolisiert den Schwellenwert für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀), bestimmt durch die Messung einer S17.1 λ pir pUTs-P_{tcaA}::lux-Kultur.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht, zeigte der Promotor von *tcaA* bei 37°C keine Expression oberhalb des Schwellenwertes von 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀. Bei 15°C wurden dagegen sehr hohe Lumineszenzwerte von 1,2 × 10⁶ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ gemessen. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit dem von BRESOLIN beschriebenen Expressionsprofil von *tcaA* [Bresolin, 2004] und bestätigt nochmals die temperaturabhängige Expression des Toxingenes [Bresolin *et al.*, 2006b].

Die Promotoren von *tcaB* und *tccC2* wiesen bei 15°C und 37°C Biolumineszenzwerte oberhalb des Schwellenwertes von 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀ auf. Dabei sind die Werte für *tcaB* bei beiden Temperaturen nahezu identisch (15°C: $4,0 \times 10^4$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀; 37°C: $6,8 \times 10^4$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀). Für den Promotor von *tccC2* konnten ebenfalls vergleichbare Werte bei 15°C und 37°C ermittelt werden (15°C: $1,7 \times 10^5$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀; 37°C: $6,6 \times 10^5$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀). Für die Promotoren von *tcaC* und *tccC1* lagen die ermittelten Werte bei beiden Temperaturen nahe 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀, dem Schwellenwert für eine signifikante Transkription. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Promotoren der beiden insektiziden Gene unter den getesteten Bedingungen nicht aktiv sind.

In ihrer Dissertation konnte BRESOLIN eine Kälteinduktion von *tcaB* mit Hilfe der Transposonmutante W22703 *tcaB*(177)::*lux* zeigen [Bresolin, 2004]. Die Daten aus Abb. 4 gaben jedoch keinen Hinweis auf eine solche temperaturabhängige Expression dieses *tc*-Genes. Zur Aufklärung dieses Widerspruchs wurden daher Expressionsprofile der beiden Stämme W22703 P_{*tcaB*}::*lux* und W22703 *tcaB*(177)::*lux* bei 15°C und 37°C aufgenommen und miteinander verglichen. Als Kontrolle wurden die beiden Stämme W22703 P_{*tcaA*}::*lux* und W22703 *tcaA*(134)::*lux* mitgeführt.

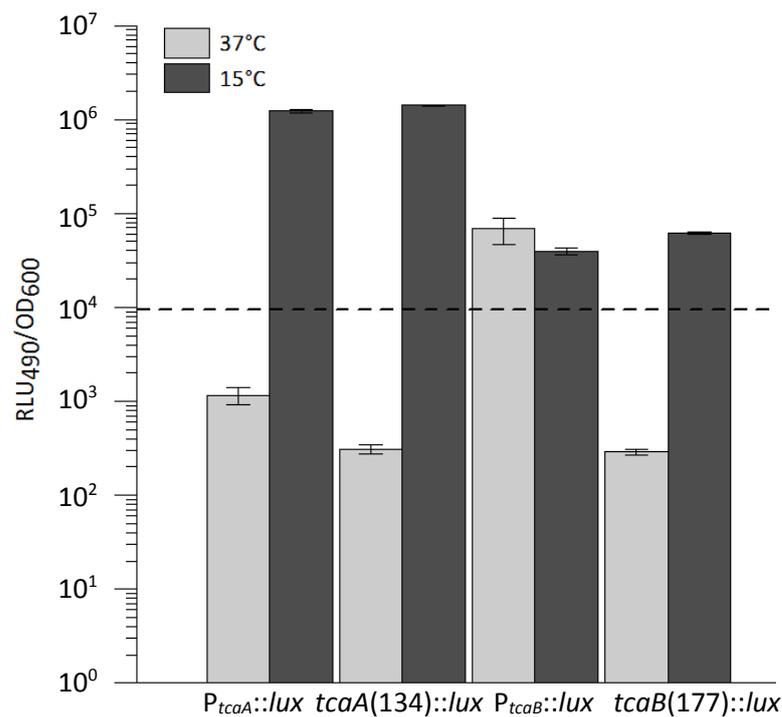


Abb. 5: Expression von *tcaA* und *tcaB* in den Stämmen W22703 P_{*tcaA*}::*lux*, W22703 *tcaA*(134)::*lux*, W22703 P_{*tcaB*}::*lux* und W22703 *tcaB*(177)::*lux* bei 15°C und 37°C in LB-Medium. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,8) und stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀), bestimmt durch die Messung einer S17.1 λ *pir* pUTs-P_{*tcaA*}::*lux*-Kultur.

Obwohl die Promotoraktivität von *tcaB* bei beiden getesteten Temperaturen nahezu identisch ist, konnte in der Transposonmutante W22703 *tcaB(177)::lux* nur bei 15°C Biolumineszenz oberhalb des Schwellenwertes von 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀ detektiert werden (Abb. 5). Die differente Expression der beiden Stämme könnte auf die unterschiedlichen Insertionsorte der Luciferase-Reportergene, direkt hinter dem Promotor von *tcaB* bzw. an Position +177 vom Translationsstart dieses Gens, zurückzuführen sein. Eine solche Beobachtung konnte bei den beiden Stämmen W22703 *P_{tcaA}::lux* und W22703 *tcaA(134)::lux* nicht gemacht werden. Während bei 15°C sehr hohe Biolumineszenzwerte von ca. $1,6 \times 10^6$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ detektiert werden können, übersteigen die Werte bei 37°C nicht den Schwellenwert für eine signifikante Transkription von 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich der Stamm W22703 *P_{tcaB}::lux* nicht zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität der A-Komponente des insektiziden Toxins eignet. In nachfolgenden Arbeiten wurde daher hauptsächlich mit dem Transposonstamm W22703 *tcaB(177)::lux* gearbeitet.

3.2.2 Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Expression der *tc*-Gene

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Promotoraktivität der verschiedenen *tc*-Gene untersucht. Hierzu wurden die einzelnen Reporterstämme auf LB-Agar sowie auf M9-Agar mit Arabinose, Saccharose oder Glucose als einziger Kohlenstoffquelle ausgestrichen und bei 15°C bzw. 37°C inkubiert. Die Biolumineszenz wurde nach 12 h (37°C) bzw. nach 48 h (15°C) mittels IVIS-Kamera bestimmt.

Tab. 7: Abhängigkeit der Promotoraktivität der einzelnen *tc*-Gene sowie von *tcaR1* und *tcaR2* von der Medienzusammensetzung bei 15°C und 37°C. Die einzelnen Reporterstämme wurden auf LB-Agar oder M9-Agar mit Glucose, Arabinose oder Saccharose ausgestrichen und bei 15°C bzw. 37°C inkubiert. Nach 12 h (37°C) bzw. 48 h (15°C) wurde die Biolumineszenz mit Hilfe der IVIS-Kamera bestimmt. U.S.= unterhalb des Schwellenwertes für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀)

RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀ bei 15°C							
Medium	<i>P_{tcaR1}</i>	<i>P_{tcaR2}</i>	<i>P_{tcaA}</i>	<i>P_{tcaB}</i>	<i>P_{tcaC}</i>	<i>P_{tccC1}</i>	<i>P_{tccC2}</i>
LB	440	u.S.	92.220	u.S.	u.S.	u.S.	26.350
M9 + Glucose	u.S.	u.S.	5.130	5130	u.S.	u.S.	2.280
M9 + Arabinose	u.S.	u.S.	1.580	u.S.	u.S.	u.S.	1.630
M9 + Saccharose	u.S.	u.S.	6.000	u.S.	u.S.	u.S.	u.S.
RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀ bei 37°C							
Medium	<i>P_{tcaR1}</i>	<i>P_{tcaR2}</i>	<i>P_{tcaA}</i>	<i>P_{tcaB}</i>	<i>P_{tcaC}</i>	<i>P_{tccC1}</i>	<i>P_{tccC2}</i>
LB	3.580	2.120	u.S.	6.300	u.S.	u.S.	60.370
M9 + Glucose	800	970	u.S.	3.680	u.S.	u.S.	2.380
M9 + Arabinose	1.710	1.590	u.S.	4.180	u.S.	u.S.	2.370
M9 + Saccharose	1.880	1.400	u.S.	4.760	u.S.	u.S.	1.030

Bei 15°C konnte nur für die Promotoren von *tcaA* und *tccC2* Biolumineszenz detektiert werden. Alle anderen Promotoren zeigten bei dieser Temperatur und den eingestellten Parametern keine Aktivität (Tab. 7). Bei 37°C wurde für den *tcaA*-Promotor dagegen keine Aktivität gemessen. Allerdings zeigen die ermittelten Biolumineszenzwerte aus Tab. 7, dass sich die IVIS-Kamera mit den verwendeten Einstellungen nicht für eine Quantifizierung der Biolumineszenz eignet. So werden bei 15°C beispielsweise für den Stamm W22703 $P_{tcaA}::lux$ im Victor Biolumineszenzwerte von 1×10^6 RLU/OD₆₀₀ gemessen, während mittels der IVIS-Kamera Werte von nur $9,3 \times 10^4$ RLU detektiert werden. Die IVIS-Kamera wurde daher im weiteren Verlauf der Arbeit nicht zur Quantifizierung der Stärke der Genexpression genutzt, sondern nur zu einem qualitativen Abgleich.

Die Promotoren von *tcaC* und *tccC1* zeigten bei 15°C und 37°C auf keinem der getesteten Medien eine Transkriptionsaktivität. Die Medienzusammensetzung scheint daher auf die Aktivität der beiden Promotoren keinen Einfluss zu haben. Dagegen wies der Promotor von *tcaB* bei 37°C deutlich höhere Biolumineszenzwerte auf als bei 15°C und bestätigt nochmals, dass sich Stamm W22703 $P_{tcaB}::lux$ nicht zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität der A-Komponente des insektiziden Toxins eignet (vgl. auch 3.2.1). Für die Promotoren der Gene *tcaR1*, *tcaR2*, *tcaB* und *tccC2* konnten die höchsten Biolumineszenzwerte auf LB-Agar detektiert werden, während sie auf M9-Agar ein um das 10 bis 20-fach schwächeres Signal aufwiesen. Dies deutet auf eine gewisse Abhängigkeit der Promotoraktivität der *tc*-Gene von dem Nährstoffangebot hin. Darüber hinaus konnte auf M9-Agar mit Arabinose als Kohlenstoffquelle bei 15°C und 37°C eine besondere Form des Wachstums festgestellt werden: Ein kleiner Teil der Population wuchs schneller als der Rest und bildete dadurch einzelne Kolonien auf einem dünnen Bakterienrasen (Abb. 6 A). Dieses Wachstumsverhalten ähnelt dem bistabilen Phänotyp von *Salmonella* Typhimurium 14028 auf *myo*-Inositol-Agar [Kröger *et al.*, 2011]. Da trotz des auffälligen Wachstumsverhaltens die Promotoren der verschiedenen Gene aktiv waren und eine vergleichbare Expression wie z.B. auf M9-Agar mit Glucose zeigten, wurde dieser Phänotyp nicht weiter untersucht.

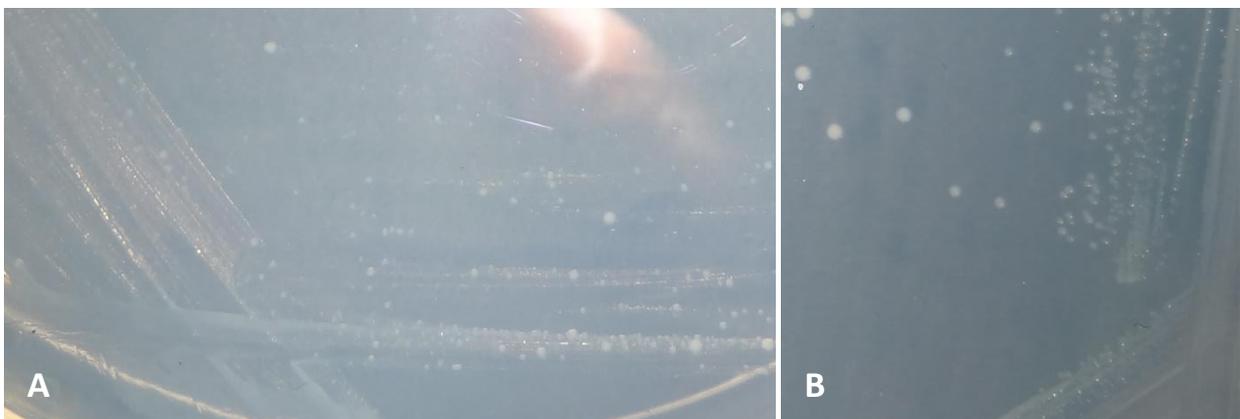


Abb. 6: Bistabiler Phänotyp auf M9-Agar mit Arabinose als Kohlenstoffquelle. *Y. enterocolitica* W22703 wurde auf M9-Agar mit Arabinose (A) oder Glucose (B) als einziger Kohlenstoffquelle ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert. (A) Auf M9-Agar mit Arabinose wuchsen vereinzelt Kolonien auf einem dünnen Bakterienrasen. (B) Ein solches Wachstumsverhalten wurde auf den anderen Medien nicht beobachtet.

3.3 Einfluss von TcaR1 und TcaR2 auf die Expression der *tc*-Gene

3.3.1 Bioinformatische Charakterisierung von TcaR1 und TcaR2

Den insektiziden Genen *tcaA*, *tcaB*, *tcaC* und *tccC1* sind die beiden Gene *tcaR1* und *tcaR2* vorangestellt. In ihrer Dissertation konnte BRESOLIN bereits zeigen, dass die beiden Genprodukte TcaR1 und TcaR2 eine signifikante Homologie zu Transkriptionsregulatoren der LysR-Familie aufweisen [Bresolin, 2004]. Die LysR-Familie ist weit verbreitet und besteht aus einer großen Vielzahl oftmals autoregulierter Transkriptionsregulatoren mit unterschiedlichsten Funktionen. Alle bisher bekannten Mitglieder der LTRs weisen mit 300 bis 350 Aminosäureresten eine vergleichbare Größe auf. Während die N-terminale DNA-Bindedomäne innerhalb der Regulator-Familie stark konserviert ist, führt das breite Funktionsspektrum der LTR zu einer stark variablen Effektorbindedomäne. Beide Domänen sind in der Regel durch eine Linker-Helix miteinander verbunden [Maddocks *et al.*, 2008].

TcaR1 besitzt eine Länge von 309 Aminosäureresten und verfügt damit über eine für LTR charakteristische Größe. Ein Homologievergleich des Regulators mit BLASTP in den Datenbanken des NCBI weist auf ein hochkonserviertes HTH-Motiv am N-Terminus hin. Hierbei sind vor allem die ersten 66 Aminosäuren stark konserviert. Es wird angenommen, dass die erste Helix des HTH-Motives von LTR eine stabilisierende Funktion übernimmt. Die zweite und dritte Helix sind durch eine Aminosäuresequenz ohne definierte Struktur miteinander verbunden und interagieren mit der DNA [Maddocks *et al.*, 2008]. Der C-Terminus von TcaR1 weist eine signifikante Homologie zu der Effektorbindedomäne des LTRs CrgA (*contact-regulated gene A*) von *Neisseria meningitidis* auf. Diese Effektorbindedomäne ist den Bindedomänen periplasmatischer Bindeproteine des Typs 2 zuzuordnen. Diese sind für die Aufnahme einer Vielzahl verschiedener Substrate, wie beispielsweise von Phosphat, Sulfat, Polysacchariden und Aminosäuren wie Histidin, Arnithin oder Lysin, zuständig. Auf Basis der vorhergesagten Strukturähnlichkeit zu CrgA ist in Abb. 7 A die modellierte Tertiärstruktur von TcaR1 dargestellt. Neben der großen Ähnlichkeit zu der Effektorbindedomäne von CrgA wurde für TcaR1 mittels 3D-Ligand eine putative Eisenbindestelle an den Aminosäureresten 117 und 118 vorhergesagt [Wass *et al.*, 2010]. Auf Proteinebene weist TcaR1 eine signifikante Homologie zu dem Virulenzregulator AphB aus *Vibrio cholera*, zu PtxR, dem transkriptionellen Regulator des Exotoxin A-Genes von *Pseudomonas aeruginosa*, und dem Transkriptionsregulator AaeR (*aromatic carboxylic acid efflux regulator*) auf. Der Regulator AaeR ist der Aktivator der Effluxpumpe AaeXAB, die durch 4-Hydroxybenzoesäure induziert wird und bei hohen Konzentrationen des lipophilen Substrates für einen schnellen und effizienten Efflux aus der Zelle sorgt [Van Dyk *et al.*, 2004]. Für AaeR aus *E. coli* (Identität zu TcaR1: 82%, E-Wert: $1 \times e^{-94}$) sind bereits Hinweise auf eine *Quorum sensing*-abhängige Regulation dieses LysR-ähnlichen Transkriptionsfaktors beschrieben worden [Sperandio *et al.*, 2002]. Aufgrund der hohen Homologie zu AaeR können TcaR1-Homologe in nahezu allen *Enterobacteriaceae*

gefunden werden. Auffällig hierbei ist, dass das Gen *aaeR* immer *tldD*, welches für eine DNA-Gyrase mit Proteaseaktivität kodiert, vorangestellt ist. Im *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 liegen die beiden Gene *tcaR1* (putativ *aaeR*) und *tldD* nicht in direkter Nachbarschaft vor. Sie sind durch die insektizide Pathogenitätsinsel Tc-PAI_{ve} voneinander getrennt. Dies unterstützt die Hypothese der Aufnahme der Pathogenitätsinsel über horizontalen Gentransfer (vgl. auch 1.2.3).

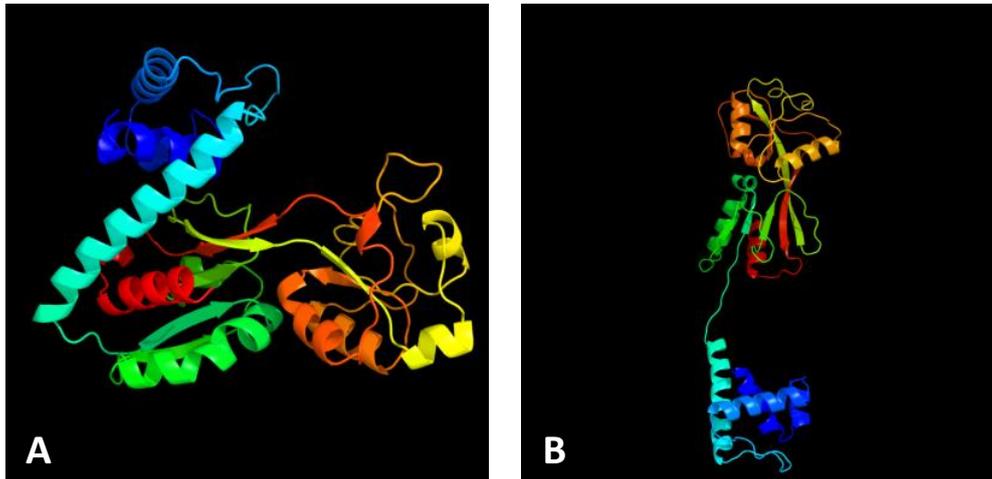


Abb. 7: 3D-Modell von TcaR1 und TcaR2. A) Die Struktur von TcaR1 wurde basierend auf einer 96%igen Homologie zur Sekundärstruktur von CrgA aus *N. meningitidis* erstellt. B) Modellierter Tertiärstruktur von TcaR2 auf Basis einer 95%igen Strukturähnlichkeit zu TsaR. Die Modelle sind gemäß dem Regenbogenfarbschema eingefärbt, wobei der N-Terminus gelb und der C-Terminus blau dargestellt ist. [Kelley *et al.*, 2009]

Für TcaR2 wurde ebenfalls eine Homologiesuche mit BLASTP in den Datenbanken des NCBI durchgeführt. TcaR2 besitzt ein HTH-Motiv am N-Terminus, wobei auch in diesem Fall die ersten 66 Aminosäuren hochkonserviert sind. Im Gegensatz zu TcaR1 weist TcaR2 jedoch keine konservierte Effektorbindedomäne auf. Ein mit Phyre2 erstelltes 3D-Modell von TcaR2 ist in Abb. 7 B dargestellt. Außerhalb der Gattung der *Yersinia* konnten keine TcaR2-Homologe gefunden werden. Ein Vergleich der *tcaR2*-Nukleotidsequenz mittels BLASTN blieb ebenfalls trefferlos. Einzig für die beiden *Yersinia*-Stämme *Y. enterocolitica* T83 (72% Identität, E-Wert: $1 \times e^{-121}$) und *Y. pestis* (69% Identität, E-Wert: $1 \times e^{-70}$) wurde jeweils ein Regulator gefunden, der eine signifikante Homologie zu TcaR2 aufweist. Dieser Regulator befindet sich in beiden Fällen unmittelbar hinter einem zweiten LTTR-kodierenden Gen und vor Genen, die für insektizide Toxin Komplexe kodieren.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die beiden Gene *tcaR1* und *tcaR2* vermutlich für Transkriptionsregulatoren der LysR-Familie kodieren. Beide Regulatoren weisen eine für LTTR charakteristische Größe auf (TcaR1: 309 AS; TcaR2: 288 AS), verfügen über ein hochkonserviertes HTH-Motiv am N-Terminus und besitzen einen hohen Anteil an α -Helices (TcaR1: 42%; TcaR2: 43%). Die unmittelbare Nachbarschaft der beiden Gene ist einzigartig und konnte nur im Zusammenhang mit insektiziden Genen beobachtet werden.

3.3.2 TcaR2 ist positiv autoreguliert

Viele LysR-ähnliche Regulatoren zeigen eine ausgeprägte Autoregulation und erhöhen somit ihre eigene Expression [Schell, 1993]. Um die Möglichkeit eines positiven oder negativen autoregulatorischen Effektes von TcaR1 bzw. TcaR2 zu untersuchen, wurde deren Promotoraktivität in Abhängigkeit ihrer Proteinkonzentration bestimmt. Hierzu wurde jeweils das Gen *tcaR1* bzw. *tcaR2* in das Überexpressionsplasmid pBAD/HisA (Tet^R) kloniert. Die beiden resultierenden Vektoren pBAD-*tcaR1* bzw. pBAD-*tcaR2* wurden in die Stämme W22703 *P_{tcaR1}::lux* bzw. W22703 *P_{tcaR2}::lux* transformiert und die jeweilige Promotoraktivität wurde wie unter 2.3.2.2 beschrieben in Gegenwart unterschiedlicher Arabinosekonzentrationen bei 15°C und bei 37°C untersucht.

Die gemessenen Lumineszenzwerte für den Promotor von *tcaR1* sind bei 15°C und 37°C nahezu identisch und bewegen sich unabhängig von der eingesetzten Arabinosekonzentration bei $4,5 \times 10^3$ bis $6,5 \times 10^3$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀. Eine Überproduktion von TcaR1 hatte demnach keinen signifikanten Einfluss auf die *tcaR1*-Promotoraktivität (Abb. 8 A). Diese Ergebnisse deuten auf eine konstitutive Expression von *tcaR1* hin und widerlegen eine mögliche Autoregulation dieses Regulators.

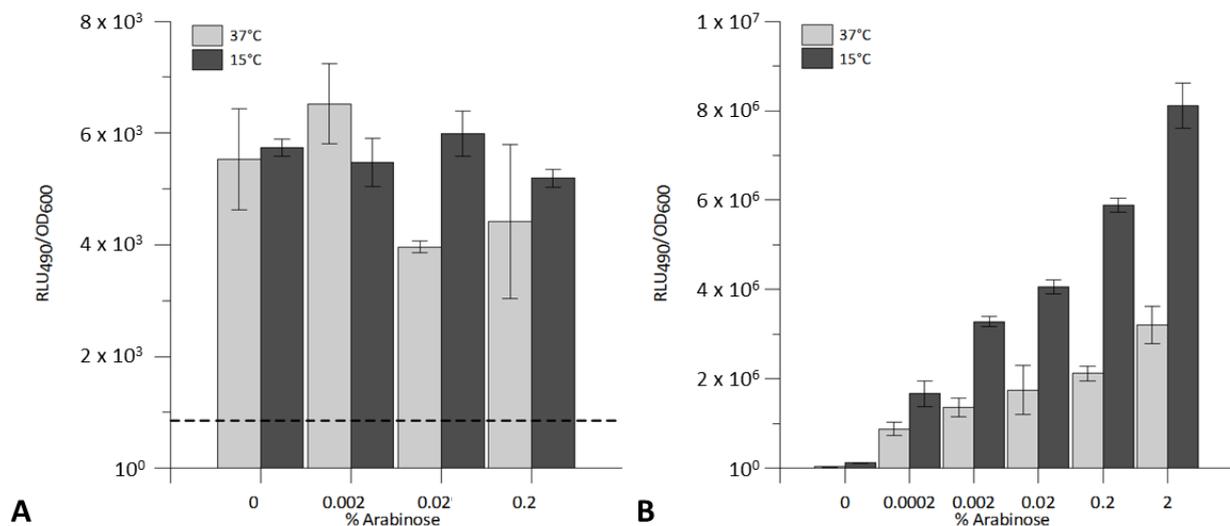


Abb. 8: Promotoraktivität von *tcaR1* und *tcaR2* in Abhängigkeit ihrer Proteinkonzentration bei 15°C und 37°C. Die beiden Stämme W22703 *P_{tcaR1}::lux* pBAD-*tcaR1* (A) und W22703 *P_{tcaR2}::lux* pBAD-*tcaR2* (B) wurden bei 15°C und 37°C in Abwesenheit von Arabinose oder mit logarithmisch ansteigenden Arabinosekonzentrationen in Mikrotiterplatten angezogen. Die Biolumineszenz und die optische Dichte wurden bei 15°C und 37°C gemessen. Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Die gestrichelte Linie symbolisiert den Schwellenwert für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀), bestimmt durch die Messung einer S17.1 *λpir* pUTs-*P_{tcaA}::lux*-Kultur.

Eine Überproduktion von TcaR2 im Stamm W22703 $P_{tcaR2}::lux$ resultierte dagegen in einer verstärkten Expression des *tcaR2*-Promotors, was eine Autoregulation nahelegt. Mit steigender Arabinosekonzentration, und damit mit steigender TcaR2-Konzentration, nimmt die Promotoraktivität von *tcaR2* nahezu linear zu. Hierbei ist der Anstieg bei 15°C signifikant höher als bei 37°C (Abb. 8 B). Nach Induktion mit Arabinose konnten bei 15°C maximale Lumineszenzwerte von $8,1 \times 10^6$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ detektiert werden. Dies entspricht einer 600-fachen Erhöhung der *tcaR2*-Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp ($1,3 \times 10^4$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀). Auch bei 37°C konnten nach der Überexpression von *tcaR2* hohe Lumineszenzwerte von maximal $3,2 \times 10^6$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ gemessen werden, was einer 4.000-fachen Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp ($4,1 \times 10^3$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀) entspricht. Diese Ergebnisse deuten auf eine temperaturabhängige, positive Autoregulation von *tcaR2* hin.

Die Bindung von TcaR2 an seinen eigenen Promotorbereich wurde im nächsten Schritt mittels Gelmobilitätsstudien näher charakterisiert. Hierzu wurde der LysR-ähnliche Regulator mit Hilfe des Überexpressionsvektors pBAD-*tcaR2* aus dem *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 aufgereinigt. Zur Produktion von TcaR2 wurden 400 ml LB-Medium mit einer Vorkultur von W22703 pBAD-*tcaR2* inokuliert und bei 30°C inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Überexpression von *tcaR2* durch Zugabe von 0,2% Arabinose gestartet. Die Proteinproduktion erfolgte bei 30°C und 180 UpM für eine Dauer von drei Stunden. Nach Aufschluss der geernteten Zellen mittels French Press und Sedimentation der unlöslichen Fraktion, konnte TcaR2 im Western Blot in der löslichen Fraktion detektiert werden. Da das mit dem pBAD-Expressionssystem produzierte Protein am N-Terminus mit einem His-Tag markiert ist, wurde das Fusionsprotein nach Herstellerangaben über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Eine höhere Proteinreinheit wurde durch den Zusatz von 40 mM Imidazol und 0,1% Triton-X-100 zum Waschpuffer erreicht. TcaR2 wurde mit 100 mM Imidazol in Fraktionen zu je 500 µl eluiert.

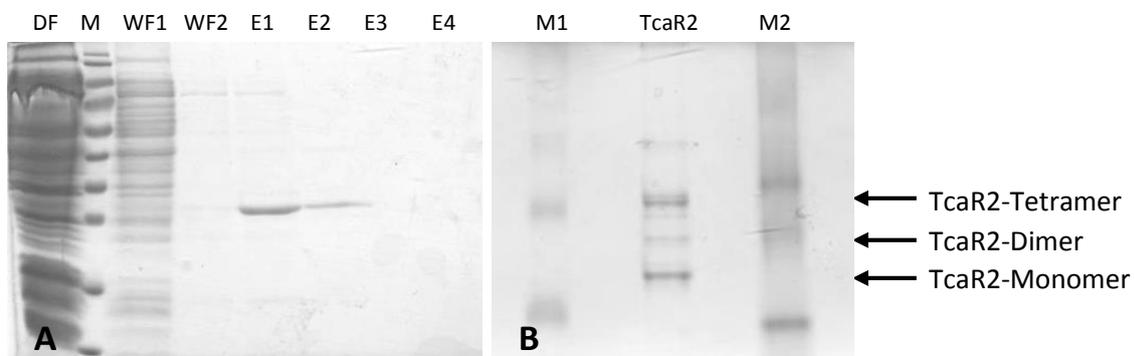


Abb. 9: Aufreinigung von TcaR2 aus *Y. enterocolitica* W22703. A) Analyse der Aufreinigung von TcaR2. M = Proteinmarker, DF = Durchfluss, W = Waschfraktion, E = Elution. Die Reinheit des aufgereinigten Regulators betrug in den Elutionen 1 und 2 ca. 95%. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12,5%igen SDS-Gel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht. B) Natives Polyacrylamidgel zur Untersuchung des Oligomerisationsgrades von TcaR2. Als Kontrolle wurden zwei Proteinmarker (M1) und (M2) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem nativen 8%igen Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Verlauf und Erfolg der Reinigung von TcaR2 wurden im SDS-Gel überprüft. Nach der Isolation stellte das 34 kDa große His-markierte Protein (TcaR2_{His6}) neben einer leichten Verunreinigung mit ca. 95% die Hauptbande im SDS-Gel dar (Abb. 9 A).

Transkriptionsregulatoren der LysR-Familie wurden meist als Di- oder Tetramere beschrieben [Schell, 1993]. Zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von reinem TcaR2 wurde daher eine native PAGE durchgeführt (Abb. 9 B). Hierbei sind im nativen Gel mehrere Banden sichtbar, wobei drei Banden dominant sind. Diese könnten der monomeren, der dimeren und der tetrameren Form des Regulators entsprechen. Die Regionen, welche in die Multimerisierung von LTTRs involviert sind, sind nicht klar definiert. Da eine Multimerisierung nur für native LTTR beobachtet werden kann [Schell, 1993], deutet das Auftreten von mehreren Banden im Polyacrylamidgel auf eine erfolgreiche, native Reinigung des TcaR2-Regulators hin.

Für die anschließend durchgeführten Gelmobilitätsstudien wurde ein Fragment, das 500 bp vor dem Translationsstart von *tcaR2* umfasst, mittels PCR amplifiziert. Die Inkubation des Promotorfragmentes erfolgte mit steigenden Mengen an TcaR2 bei 4°C. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives 284 bp langes intragenisches *tcaR1*-DNA-Fragment (*'tcaR1'*) hinzugegeben. Die Auftrennung im EMSA wurde bei 4°C durchgeführt und die DNA-Banden durch eine Färbung im GelRed-Bad sichtbar gemacht.

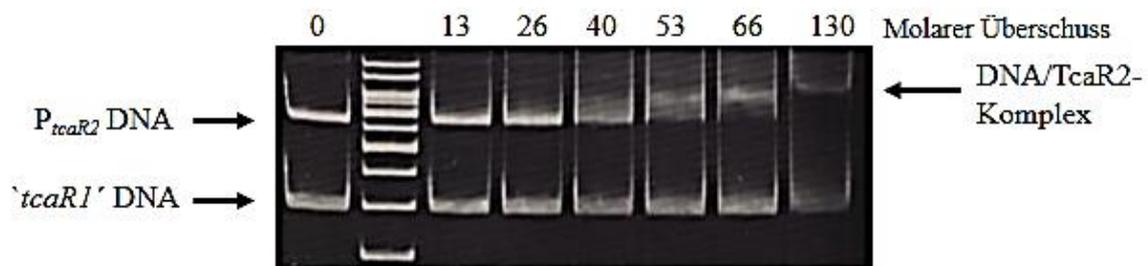


Abb. 10: Bindung von TcaR2 an den Promotor von *tcaR2*. EMSAs eines 500 bp langen *tcaR2*-Promotorfragmentes mit steigenden Mengen an gereinigtem TcaR2. Nach erfolgter Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt und die DNA-Banden anschließend mit GelRed angefärbt.

Die Zugabe von TcaR2 in einem molaren Überschuss gegenüber der DNA von 53 führte zur Bildung einer retardierten Bande, die den DNA-TcaR2-Komplex repräsentiert (Abb. 10). Eine Erhöhung der TcaR2-Menge auf einen molaren Überschuss von 130 führte zum vollständigen Verschwinden der freien Promotor-DNA. Mit diesem Befund konnten die Daten der Biolumineszenzmessungen bestätigt und es konnte eine Bindung von TcaR2 an seinen eigenen Promotor gezeigt werden.

3.3.3 TcaR1 fungiert als Repressor von *tcaR2*

In den unter 3.3.1 durchgeführten Homologievergleichen konnte eine direkte Nachbarschaft von zwei LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren nur im Zusammenhang mit einer insektiziden Pathogenitätsinsel innerhalb der Gattung *Yersinia* gefunden werden. Da LysR-ähnliche Transkriptionsregulatoren oftmals die ihnen nachgeschalteten Gene regulieren [Maddocks *et al.*, 2008], wurde im nächsten Schritt der Einfluss von TcaR1 auf die *tcaR2*-Expression untersucht. Hierzu wurde *tcaR1* zunächst mit Hilfe der Plasmid-basierten Methode nach KANIGA deletiert (2.2.8.3). In den resultierenden Stamm W22703 $\Delta tcaR1$ wurde das Suizidplasmid pUTs- $P_{tcaR2}::lux$ via Konjugation chromosomal eingebracht und es wurden Expressionsprofile von W22703 $\Delta tcaR1 P_{tcaR2}::lux$ bei 15°C und 37°C erstellt. Als Kontrolle diente der Stamm W22703 $P_{tcaR2}::lux$. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

Die Deletion von *tcaR1* führt zu einer deutlich erhöhten Promotoraktivität von *tcaR2*. Bei 15°C steigt die maximale Lumineszenz von $5,4 \times 10^3$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ im Wildtyp auf $1,2 \times 10^5$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ in der *tcaR1*-Deletionsmutante an. Dies entspricht einer circa 20-fachen Erhöhung der Promotoraktivität von *tcaR2*. Bei 37°C verhält es sich ähnlich. Hier führt die Deletion von *tcaR1* zu einer 16-fachen Steigerung der maximalen Lumineszenz (von $3,4 \times 10^3$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ im Stamm W22703 $P_{tcaR2}::lux$ auf $5,3 \times 10^4$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ im Stamm W22703 $\Delta tcaR1 P_{tcaR2}::lux$). Diese Daten deuten darauf hin, dass TcaR1 als Repressor von *tcaR2* fungiert.

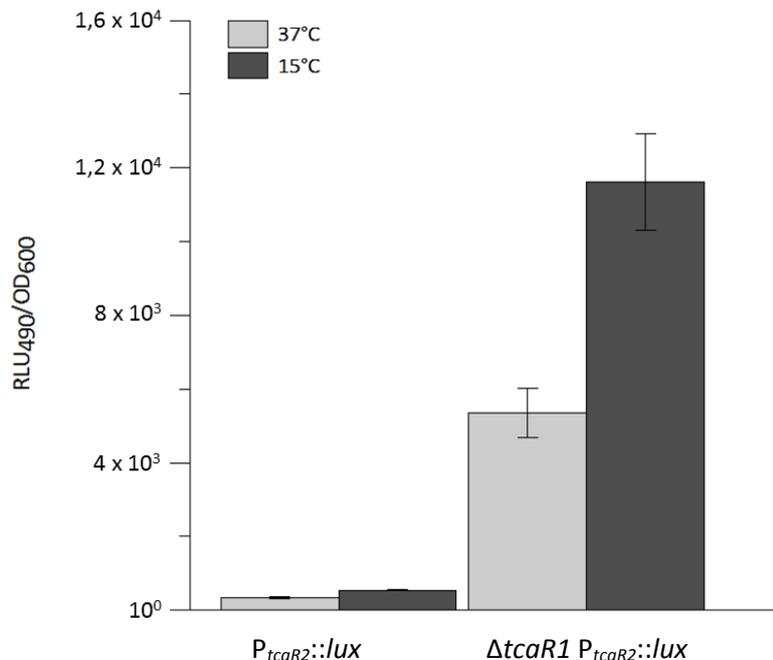


Abb. 11: TcaR1 fungiert als Repressor von *tcaR2*. Die Biolumineszenz sowie optische Dichte der Stämme W22703 $P_{tcaR2}::lux$ und W22703 $\Delta tcaR1 P_{tcaR2}::lux$ wurde bei 15°C und 37°C gemessen. Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung.

Die repressorische Funktion von TcaR1 auf die *tcaR2*-Expression wurde nochmals dadurch bestätigt, dass es bei einer Überexpression von TcaR1 im Stamm W22703 $P_{tcaR2}::lux$ zu einer deutlichen Erniedrigung der *tcaR2*-Promotoraktivität kam (Tab. 8). Bei 15°C führt die Überexpression von *tcaR1* zu einer 11-fachen Verringerung der *tcaR2*-Promotoraktivität. Bei 37°C konnte eine 4-fache Verminderung von $1,3 \times 10^4$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ auf $3,8 \times 10^3$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig die repressorische Funktion von TcaR1 auf *tcaR2*. Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss einer *tcaR2*-Deletion auf die *tcaR1*-Promotoraktivität beobachtet werden (vgl. Tab. A 7).

Tab. 8: Einfluss der TcaR1-Überexpression auf die Promotoraktivität von *tcaR2* in LB-Medium bei 15°C und 37°C. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3 wurde beiden Kulturen 0,2% Arabinose hinzugegeben. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,8) und stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (STABW) aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar.

Stamm	15°C		37°C	
	RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]	cRLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW[%]
W22703 $P_{tcaR2}::lux$ pBAD/HisA (Tet ^R)	$2,9 \times 10^4$	0,65	$1,3 \times 10^4$	4,32
W22703 $P_{tcaR2}::lux$ pBAD- <i>tcaR1</i>	$2,6 \times 10^3$	6,15	$3,8 \times 10^3$	21,55

3.3.4 Der Promotor von *tcaA* liegt in der kodierenden Region von *tcaR2*

Transkriptionsfaktoren der LysR-Familie sind oft stromaufwärts der von ihnen regulierten Gene oder Operons lokalisiert. In diesem Fall befinden sich zwischen dem Transkriptionsstartpunkt des LTTRs und dem der Ziel-DNA zwischen 25 bis 70 bp. Dadurch überlappt der Promotor vom Zielgen teilweise mit der kodierenden Region des Regulators [Schell, 1993]. Die direkte Nachbarschaft der Regulator-kodierenden Gene *tcaR1* und *tcaR2* zu den insektiziden Genen *tcaA*, *tcaB*, *tcaC* und *tccC1* ließ eine Regulation der Toxinexpression durch TcaR1 und TcaR2 vermuten. Um der Frage nachzugehen, ob die beiden Transkriptionsregulatoren in die Regulation der insektiziden Gene involviert sind, sollten diese einzeln deletiert (2.2.8.3) werden. Da der Promotor von durch LTTR gesteuerten Zielgenen jedoch oftmals in den kodierenden Bereich des Regulators hineinragt, wurde zunächst eine Analyse des Promotorbereiches von *tcaA* durchgeführt.

Mit Hilfe von BProm von Softberry wurde für *tcaA* eine -10 Box an Position -82 und eine -35 Box an Position -161 (ausgehend vom Translationsstart) vorausgesagt. Dieses Ergebnis verstärkte die Vermutung, dass sich die Promotorregion von *tcaA* teilweise mit der kodierenden Region von *tcaR2* überlappt. Dadurch wäre durch eine Deletion von *tcaR2* auch der Promotor von *tcaA* betroffen. Um diese Annahme letztendlich bestätigen zu können, wurde der Transkriptionsstart von *tcaA*, und zur Kontrolle auch für *tcaR2*, mittels 5'-RACE bestimmt.

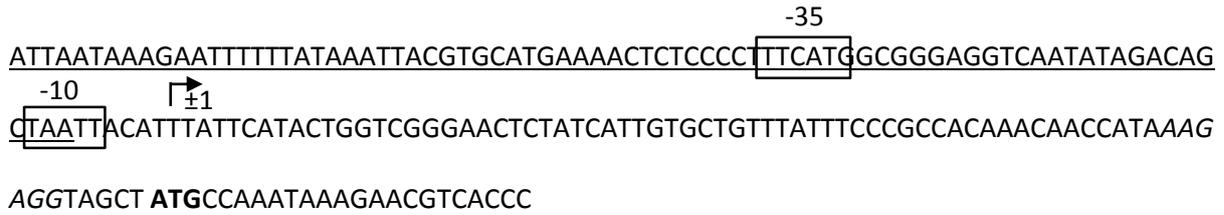


Abb. 12: Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des *tcaA*-Promotors. Dargestellt ist der *tcaA*-Promotor von Position -84 bis +96 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des Gens. Der über 5'-RACE ermittelte Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil und die Beschriftung ±1 markiert. Die potenziellen -35 und -10 Regionen sind durch Boxen und entsprechende Beschriftungen gekennzeichnet. Der Translationsstartpunkt von *tcaA* ist fett markiert, die mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz kursiv hinterlegt und die kodierende Region von *tcaR2* unterstrichen.

Der Transkriptionsstart von *tcaA* wurde an Position -73 in Bezug auf den Translationsstartpunkt des Gens identifiziert (Abb. 12). Es konnte jeweils eine stark konservierte -10 Box und -35 Box an den eingezeichneten Positionen identifiziert werden. Die -35 Box, und zum Teil auch die -10 Box, liegen damit in der kodierende Region von *tcaR2*. Eine Deletion von *tcaR2*, wie sie unter 2.2.8.3 beschrieben ist, würde damit auch die Deletion weiterer *tcaA*-Promotorbereiche zur Folge haben. Daher wurde eine verkürzte Deletion des Gens angefertigt. Diese umfasste die Nukleotide 19 bis 31 im 5'-Bereich, ließ jedoch den 3'-Bereich, und damit die Promotorregion von *tcaA*, intakt.

Der Transkriptionsstart von *tcaR2* wurde in Bezug auf den Translationsstartpunkt des Gens an Position -36 identifiziert. Da zwischen der kodierenden Region von *tcaR1* und dem *tcaR2*-Transkriptionsstartpunkt 212 bp liegen, wurde für *tcaR1* eine komplette Deletion wie unter 2.2.8.3 beschrieben angefertigt.

Der Einfluss der Deletion von *tcaR1* und *tcaR2* auf die Expression der *tc*-Gene wurde im nachfolgenden Abschnitt untersucht.

3.3.5 TcaR2 ist essentiell für die *tcaA*-Expression

Die Deletion von *tcaR1* bzw. *tcaR2* wurde zunächst in die *lux*-Transposonmutante W22703 *tcaA*(134)::*lux* eingebracht und anschließend wurden durch Messung der Biolumineszenz sowie der optischen Dichte Expressionsprofile bei 15°C und 37°C erstellt.

Für *tcaA* konnte bei 37°C keine Expression oberhalb des Schwellenwertes von 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀ detektiert werden. Dagegen wurden bei 15°C in der *lux*-Transposonmutante sehr hohe Lumineszenzwerte von 1,4 x 10⁶ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ gemessen. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit dem von BRESOLIN beschriebenen *tcaA*-Expressionsprofil [Bresolin, 2004] und bestätigt nochmals die bereits beschriebene temperaturabhängige Expression des Toxingenes [Bresolin *et al.*, 2006b].

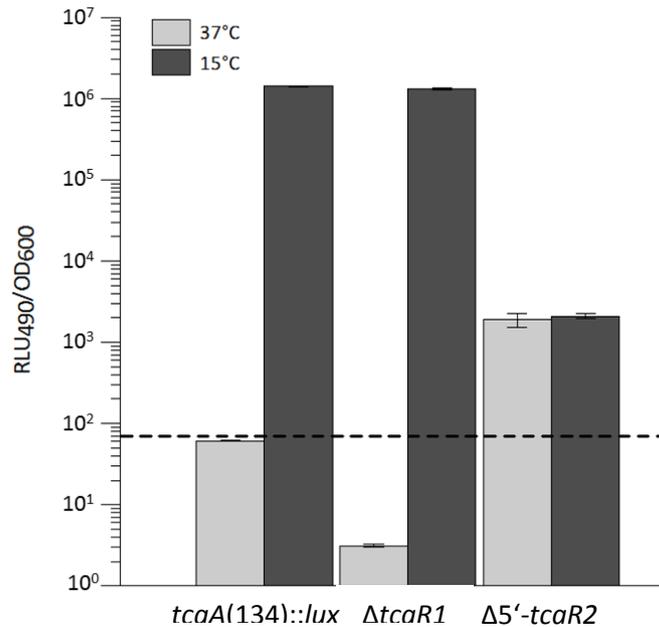


Abb. 13: Einfluss der Deletion der LysR-ähnlichen Regulatoren *tcaR1* und *tcaR2* auf die *tcaA*-Expression in LB-Medium bei 15°C und 37°C. Die Biolumineszenz sowie optische Dichte der Stämme W22703 *tcaA(134)::lux*, W22703 *tcaA(134)::lux* $\Delta tcaR1$ und W22703 *tcaA(134)::lux* $\Delta 5'-tcaR2$ wurde in LB-Medium bei 15°C und 37°C gemessen. Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Die gestrichelte Linie symbolisiert den Schwellenwert für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀), bestimmt durch die Messung einer S17.1 λ_{pir} pUTs-*P_{tcaA}::lux*-Kultur.

Die Deletion von *tcaR1* bzw. *tcaR2* hatte bei beiden untersuchten Temperaturen keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stämme (Abb. A 16). Darüber hinaus zeigte die Deletion von *tcaR1* keinen wesentlichen Einfluss auf die *tcaA*-Expression. Die Lumineszenzwerte von $1,4 \times 10^6$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ in der *lux*-Transposonmutante sind nahezu identisch mit den in der *tcaR1*-Deletionsmutante gemessenen ($1,3 \times 10^6$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀). Bei der partiellen Deletion von *tcaR2* gingen die Werte dagegen bei 15°C von $1,4 \times 10^6$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ im Wildtyp auf $7,8 \times 10^3$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ in der *tcaR2*-Deletionsmutante zurück. Das entspricht einer ca. 180-fachen Abnahme der detektierten *tcaA*-Expression. Bei 37°C konnte kein Einfluss der *tcaR2*-Deletion auf die *tcaA*-Expression beobachtet werden. Zur Verifizierung der mit dem *tcaR2*-Deletionsstamm erzielten Ergebnisse wurde *tcaR2* komplementiert. Hierzu wurde das Überexpressionsplasmid pBAD-*tcaR2* in den Stamm W22703 $\Delta 5'-tcaR2$ *tcaA(134)::lux* eingebracht. Die Biolumineszenz sowie optische Dichte wurden anschließend in Gegenwart und Abwesenheit von Arabinose gemessen.

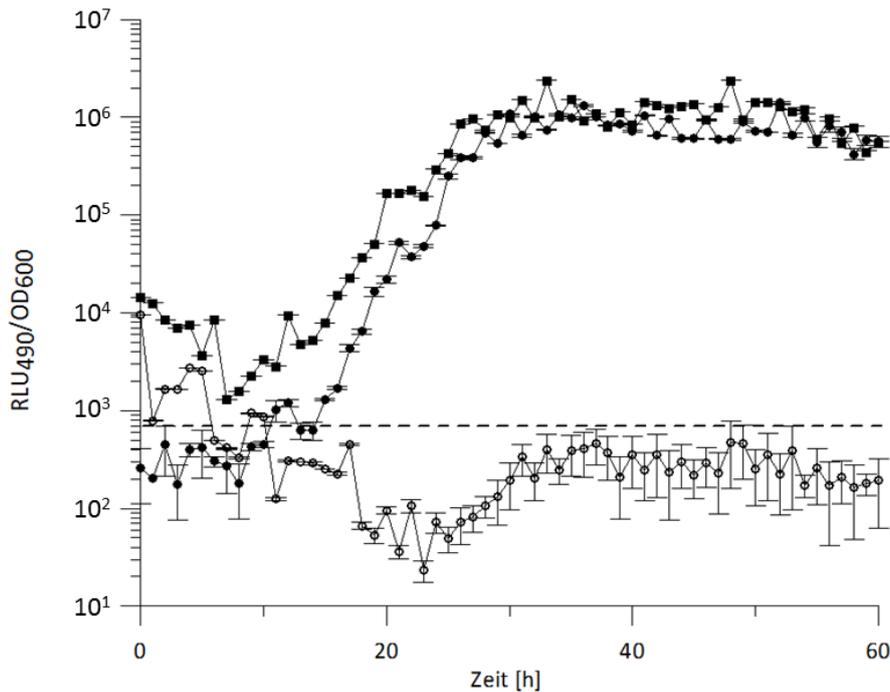


Abb. 14: Komplementation der *tcaR2*-Deletion in dem Stamm W22703 *tcaA(134)::lux Δ5'-tcaR2*. Die Biolumineszenz sowie optische Dichte der Stämme (■) W22703 *tcaA(134)::lux* pBAD/HisA (Tet^R), (○) W22703 *tcaA(134)::lux Δ5'-tcaR2* pBAD/HisA (Tet^R) und (●) W22703 *tcaA(134)::lux Δ5'-tcaR2* pBAD-*tcaR2* wurde in LB-Medium bei 15°C mit Zusatz von 0,2% Arabinose gemessen. Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Die gestrichelte Linie symbolisiert den Schwellenwert für eine signifikante Transkriptionsaktivität, bestimmt durch die Messung einer S17.1 λ pir pUTs-*P_{tcaA}::lux*-Kultur.

Bei 15°C führt die partielle Deletion von *tcaR2* zum Absinken der *tcaA*-Expression auf praktisch Null. Die Komplementation der partiellen Deletion mit dem Überexpressionsvektor pBAD-*tcaR2* stellte mit Biolumineszenzwerten von $1,5 \times 10^6$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ nahezu die wildtypische *tcaA*-Expression bei 15°C her. Bei 37°C konnte dagegen weder für die Deletion von *tcaR2* noch für die anschließende Komplementation eine *tcaA*-Expression detektiert werden (Tab. A 7).

Aufgrund der temperaturabhängigen *tcaA*-Expression in *Y. enterocolitica* W22703 wurde im nächsten Schritt die Bindung des Regulators an die Promotorregion des Toxingenes bei verschiedenen Temperaturen analysiert. Hierzu wurden EMSAs bei 4°C, 15°C und 37°C durchgeführt. Als Kontrolle wurde unter den gleichen Bedingungen die Bindung des Transkriptionsfaktors an seinen eigenen Promotorbereich untersucht. Die ermittelten Dissoziationskonstanten sind in Tab. 9 zusammengefasst und liegen alle in einem für LysR-ähnliche Regulatoren typischen Bereich von $6,3 \times 10^{-10}$ und $3,7 \times 10^{-11}$ Mol/l [Parsek *et al.*, 1994]. Die Bindung von TcaR2 wies für keinen der beiden untersuchten Promotorbereiche eine Temperaturabhängigkeit auf. Für den Promotor von *tcaR2* konnten im Allgemeinen niedrigere Dissoziationskonstanten als für den *tcaA*-Promotor ermittelt werden. Dies deutet darauf hin, dass TcaR2 eine höhere Affinität zu seinem eigenen Promotor als zu dem des Toxins besitzt.

Tab. 9: Bindung von TcaR2 an die Promotoren von *tcaA* und *tcaR2* bei 4°C, 15°C und 37°C. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D wurden die EMSA-Gele eingescannt und die Banden densitometrisch mit Hilfe der Kodak ID Image Analysis Software ausgewertet.

Promotor	Temperatur [°C]	Dissoziationskonstante K_D [Mol/l]
P_{tcaR2}	4	$2,1 \times 10^{-11}$
	15	$3,7 \times 10^{-11}$
	37	$2,3 \times 10^{-11}$
P_{tcaA}	4	$9,7 \times 10^{-10}$
	15	$6,3 \times 10^{-10}$
	37	$1,0 \times 10^{-11}$

Zur weiteren Charakterisierung der Bindung von TcaR2 an den *tcaA*-Promotor wurde eine 500 bp lange Sequenz vor dem *tcaA*-kodierenden Bereich in acht Fragmente unterteilt, die sich zum Teil überlappten. Diese Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und eine Bindung von TcaR2 an diese mittels EMSAs bei 4°C untersucht. Als Negativkontrolle wurde ein 134 bp langes Fragment innerhalb der *tcaA*-kodierenden Region mitgeführt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Abb. 15.

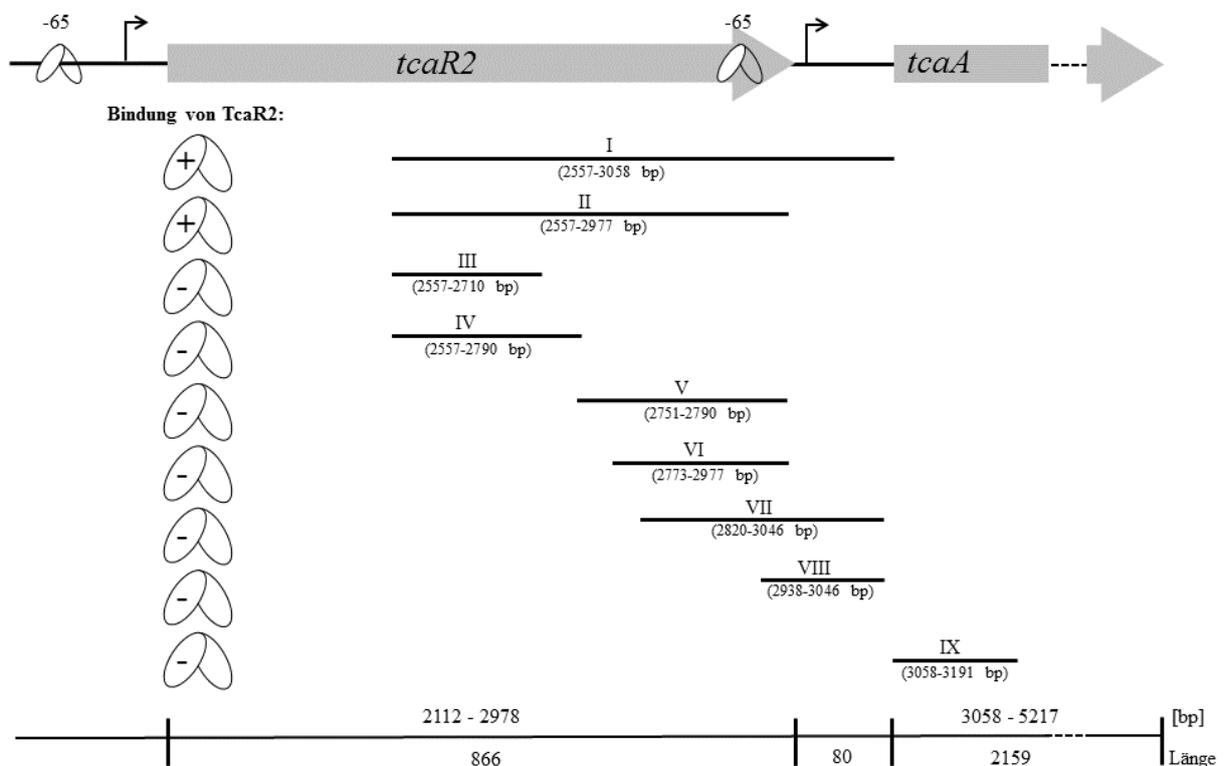


Abb. 15: Bindung von TcaR2 an die Promotorregion von *tcaA*. Der *tcaA*-Promotorbereich wurde in acht Fragmente unterteilt und die Bindung von TcaR2 (gezeigt als Dimer) an die unterschiedlichen Sequenzen mittels EMSAs untersucht. Als Negativkontrolle diente ein 134 bp langes Fragment in der kodierenden Region von *tcaA*. Die Pfeile stellen jeweils den Transkriptionsstart von *tcaR2* und *tcaA* dar. Die putativen Bindestellen des Regulators an die -65 Region der Promotoren von *tcaR2* und *tcaA* sind eingezeichnet.

Neben dem vollständigen Promotorbereich von *tcaA* (Fragment I) konnte lediglich für das Fragment II eine Bindung durch TcaR2 im EMSA beobachtet werden. Die Verwendung der Fragmente III bis VIII führte im EMSA zu keiner Ausbildung einer retardierten Bande. Dies deutet darauf hin, dass der Regulator mit einer Region innerhalb der letzten 420 bp des *tcaR2*-Genes interagiert.

Es ist bekannt, dass LTTRs an Bereiche von Promotoren ihrer Zielgene binden, die reich an Adenin (A) und Thymin (T) sind. Hierbei erfolgt die Bindung an eine Konsensussequenz mit der Basenabfolge T-N₁₁-A, die sich um den Bereich an Position -65 in Bezug auf den jeweiligen Transkriptionsstartpunkt des Zielgenes befindet. Eine solche Sequenz konnte sowohl für den Promotor von *tcaR2* (Position -64 bis -52) als auch für den von *tcaA* (-73 bis -61) gefunden werden (Abb. 15). Zusätzlich zur RBS interagieren LTTRs mit einer weiteren Stelle im Promotor, in der Nähe der -35 Region. Dies konnte für TcaR2 trotz Verwendung kürzerer EMSA-Fragmente (V-VII) nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Transkriptionsfaktor TcaR2 essentiell für die Expression von *tcaA* bei niedrigen Temperaturen ist. Da neben *tcaA* jedoch auch *tcaB* für die A-Komponente des Toxinkomplexes kodiert, wurde im nachfolgenden Abschnitt zunächst der Einfluss von TcaR1 und TcaR2 auf die *tcaB*-Expression untersucht.

3.3.6 Expression von *tcaB* ist abhängig von TcaR2

Zur Analyse des Einflusses von TcaR1 und TcaR2 auf die *tcaB*-Expression wurden zunächst *tcaR1* und *tcaR2* in dem Stamm W22703 *tcaB(177)::lux* deletiert. Von den resultierenden Stämmen wurden anschließend Expressionsprofile durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm und der Biolumineszenz bei 490 nm bei 15°C und 37°C aufgenommen.

Tab. 10: Einfluss der Deletionen von *tcaR1* und *tcaR2* auf die *tcaB*-Expression bei 15°C und 37°C in LB-Medium. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,8) und stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (STABW) aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. U.S.: unterhalb des Schwellenwertes für eine signifikante Transkription (700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀)

Stamm	15°C		37°C	
	RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]	cRLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]
W22703 <i>tcaB(177)::lux</i>	6,2 x 10 ⁴	3,3	2,9 x 10 ⁴	7,7
W22703 Δ <i>tcaR1</i> <i>tcaB(177)::lux</i>	2,8 x 10 ⁴	2,9	u.S.	
W22703 Δ 5'- <i>tcaR2</i> <i>tcaB(177)::lux</i>	2,5 x 10 ²	4,0	u.S.	

Die Deletion von *tcaR1* hat bei 15°C keinen signifikanten Einfluss auf die *tcaB*-Expression (Tab. 10). Die ermittelten RLU-Werte liegen mit $2,8 \times 10^4$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ im gleichen Bereich wie beim Wildtyp ($6,2 \times 10^4$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀). Bei 37°C kann sowohl im Wildtyp W22703 *tcaB*(177)::*lux* als auch in der *tcaR1*-Deletionsmutante keine *tcaB*-Expression detektiert werden. Die Werte befinden sich in beiden Fällen unterhalb des Schwellenwertes für eine signifikante Transkription (700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀). Die Deletion von *tcaR2* führt bei 15°C zu einer 250-fachen Abnahme der Biolumineszenz von $6,2 \times 10^4$ auf $2,5 \times 10^2$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ und damit zu einem Verlust der Transkriptionsaktivität von *tcaB*. Bei 37°C konnte für den Stamm W22703 $\Delta 5'$ -*tcaR2* *tcaB*(177)::*lux* erwartungsgemäß keine *tcaB*-Expression festgestellt werden.

Diese Ergebnisse deuten auf eine stringente Abhängigkeit der *tcaB*-Expression von TcaR2 hin. Zur Validierung der Resultate wurde die partielle *tcaR2*-Deletion mit Hilfe des Arabinose-induzierbaren Vektors pBAD-*tcaR2* komplementiert. Die Ergebnisse hierzu finden sich in Abb. 16.

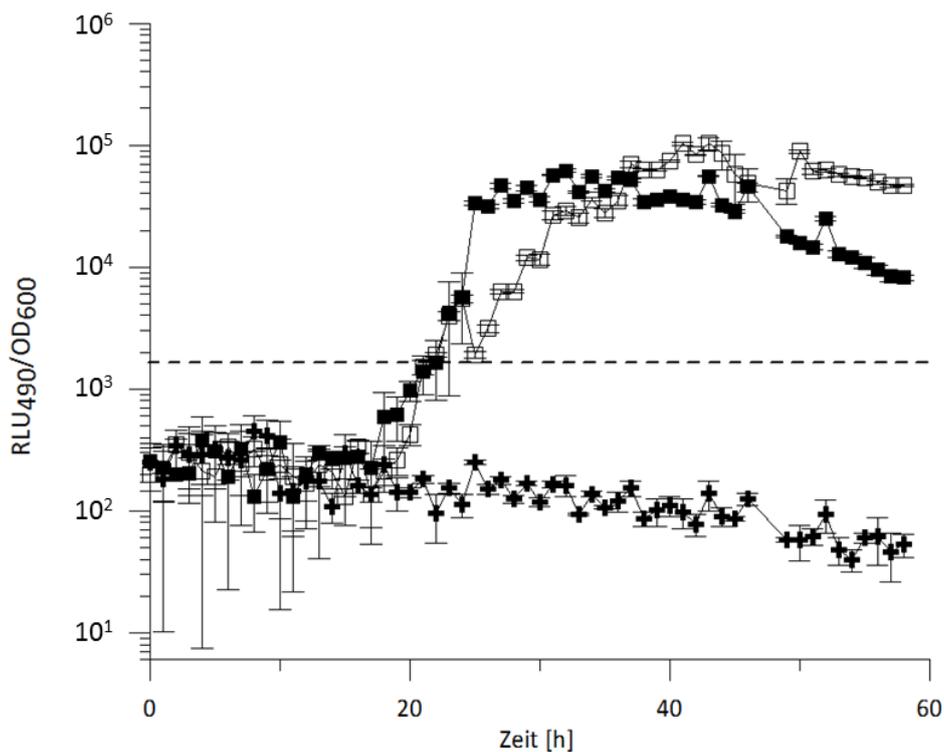


Abb. 16: Komplementierung der *tcaR2*-Deletion im Stamm W22703 $\Delta 5'$ -*tcaR2* *tcaB*(177)::*lux*. Die Biolumineszenz sowie optische Dichte der Stämme (■) W22703 *tcaB*(177)::*lux* pBAD/HisA (Tet^R), (+) W22703 $\Delta 5'$ -*tcaR2* *tcaB*(177)::*lux* pBAD/HisA (Tet^R) und (□) W22703 $\Delta 5'$ -*tcaR2* *tcaB*(177)::*lux* pBAD-*tcaR2* wurde in LB-Medium bei 15°C mit Zusatz von 0,2% Arabinose gemessen. Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Die gestrichelte Linie symbolisiert den Schwellenwert für eine signifikante Transkriptionsaktivität, bestimmt durch die Messung einer S17.1 λ *pir* pUTs-*P_{tcaA}::lux*-Kultur.

Mit Hilfe des Expressionsvektors pBAD-*tcaR2* konnte die partielle *tcaR2*-Deletion komplementiert werden. Mit $1,0 \times 10^5$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ wurde die wildtypische *tcaB*-Expression bei 15°C wiederhergestellt. Damit konnte bestätigt werden, dass TcaR2 für die *tcaB*-Expression essentiell ist.

Die Bindung des Transkriptionsregulators an den Promotorbereich von *tcaB* wurde nochmals über EMSAs verifiziert (siehe Abb. A 17). Hierbei wurde der Promotorbereich von *tcaB* (500 bp vor dem Translationsstart) bei einem molaren Überschuss an TcaR2 gegenüber der DNA von 28 vollständig gebunden. Zur Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen wurde dem Ansatz vorher ein repetitives intragenisches *tcaR1*-Fragment hinzugegeben.

Die Expression von *tcaB* bei 15°C sowie die vollständige Repression dieses Genes bei 37°C erinnern stark an das Expressionsprofil von *tcaA*. Darüber hinaus werden beide Gene bei 15°C durch den Transkriptionsfaktor TcaR2 induziert. Da *tcaA* und *tcaB* für die A-Untereinheit des insektiziden Toxincomplexes kodieren, war eine gemeinsame Regulation wahrscheinlich. Für die weiteren Untersuchungen zum Mechanismus der temperaturabhängigen Expression der insektiziden Gene wurde daher im Folgenden nur noch *tcaA* untersucht.

3.3.7 TcaR1- und TcaR2-unabhängige Expression von *tcaC*, *tccC1* und *tccC2*

Die unter 3.2 aufgeführten Ergebnisse zur Transkription von *tcaC*, *tccC1* und *tccC2* deuten darauf hin, dass die Regulation der Transkription dieser *tc*-Gene anders als bei *tcaA* und *tcaB* erfolgt. Im nächsten Schritt wurde die Expression von *tcaC*, *tccC1* und *tccC2* in einem *tcaR1*- bzw. *tcaR2*-negativen Stamm bei 15°C und 37°C vermessen. Die Ergebnisse hierzu finden sich in Tab. 11.

Der Promotor von *tcaC* wies bei 15°C und 37°C auch nach einer Deletion von *tcaR1* bzw. *tcaR2* keine Biolumineszenz oberhalb des Schwellenwertes auf. Damit zeigte das Gen unter keiner der getesteten Bedingungen eine Transkriptionsaktivität. Im Fall von *tccC1* konnte bei 15°C ebenfalls keine Expression festgestellt werden. Einzig bei 37°C wurde eine moderate Biolumineszenz von $2,7 \times 10^3$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ gemessen. Die Deletion von *tcaR1* bzw. *tcaR2* hatte keinen Einfluss auf die Transkription dieses Genes und führte zu nahezu identischen Biolumineszenzwerten (Tab. 11). Der Promotor von *tccC2* zeigte dagegen bei 15°C und 37°C eine starke Transkriptionsaktivität, wobei auch in diesem Fall keine Abhängigkeit von TcaR1 und TcaR2 festgestellt werden konnte. Die Biolumineszenz lag unter den getesteten Bedingungen in einem Bereich von $1,4 \times 10^5$ bis $6,6 \times 10^5$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀.

Tab. 11: Einfluss der Deletionen von *tcaR1* und *tcaR2* auf die (Promotor-) Aktivität von *tcaC*, *tccC1* und *tccC2* bei 15°C und 37°C in LB-Medium. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,8$) und stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (STABW) aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. U.S.: unterhalb des Schwellenwertes für eine signifikante Transkription ($700 \text{ RLU}_{490}/OD_{600}$)

Stamm	15°C		37°C	
	RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]	cRLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]
W22703 <i>P_{tcaC}::lux</i>		u.S.		u.S.
W22703 Δ <i>tcaR1</i> <i>P_{tcaC}::lux</i>		u.S.		u.S.
W22703 Δ 5'- <i>tcaR2</i> <i>P_{tcaC}::lux</i>		u.S.		u.S.
W22703 <i>tccC1::lux</i>		u.S.	$2,7 \times 10^3$	14,9
W22703 Δ <i>tcaR1</i> <i>tccC1::lux</i>		u.S.	$2,1 \times 10^3$	10,3
W22703 Δ 5'- <i>tcaR2</i> <i>tccC1::lux</i>		u.S.	$2,4 \times 10^3$	5,0
W22703 <i>P_{tccC2}::lux</i>	$1,7 \times 10^5$	7,6	$6,6 \times 10^5$	7,3
W22703 Δ <i>tcaR1</i> <i>P_{tccC2}::lux</i>	$1,4 \times 10^5$	1,5	$6,3 \times 10^5$	1,4
W22703 Δ 5'- <i>tcaR2</i> <i>P_{tccC2}::lux</i>	$2,1 \times 10^5$	2,4	$6,5 \times 10^5$	8,3

Diese Ergebnisse deuten zunächst auf eine TcaR1- und TcaR2-unabhängige Regulation dieser *tc*-Gene hin. Zur Verifizierung dieser Resultate wurde in weiterführenden Arbeiten die Expression o.g. Promotoren unter TcaR2-Überproduktion getestet. Die Ergebnisse hierzu deuten ebenfalls auf eine TcaR2-unabhängige Expression von zumindest *tcaC* hin [Starke *et al.*, 2013].

3.4 Mechanismus zur temperaturabhängigen Expression von *tcaA*

3.4.1 Fungiert TcaR2 als Thermosensor?

In den vorherigen Abschnitten konnte bereits gezeigt werden, dass TcaR2 essentiell für die *tcaA*- und *tcaB*-Expression ist. Die Bindung an die beiden Promotoren sowie an seinen eigenen Promotorbereich wies zwar keine Temperaturabhängigkeit auf (3.3.5), um jedoch eine temperaturinduzierte Konformationsänderung des Proteins vollständig ausschließen zu können, wurde der Regulator mittels CD-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurden CD-Spektren von 99% reinem TcaR2 (0,2 mg Protein/ml) bei 4°C, 20°C und 37°C aufgenommen.

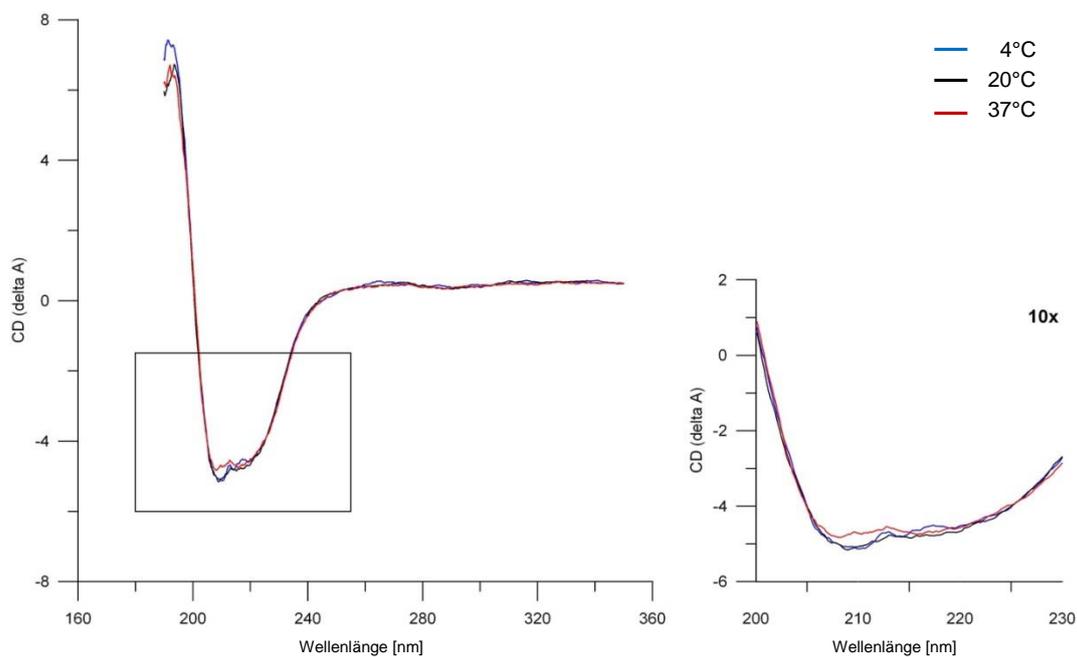


Abb. 17: CD-Spektren von TcaR2 bei unterschiedlichen Temperaturen. Die CD-Spektren wurden mit 0,2 mg Protein/ml in CD-Puffer (10 mM KH_2PO_4 , 50 mM K_2SO_4 , pH 7,6) aufgenommen. Die abgebildeten CD-Spektren entsprechen dem Mittelwert aus jeweils 16 Messungen und sind pufferkorrigiert.

Die CD-Spektren von TcaR2 weisen ein absolutes Minimum bei 209 nm und ein lokales Minimum bei 222 nm auf. Diese Minima sind charakteristisch für Proteine mit einem hohen α -helikalen Anteil. Im Gegensatz dazu besitzen Proteine mit einem hohen Anteil an β -Faltblättern ein einziges Minimum bei 217 nm. Diese Ergebnisse bestätigen die bioinformatischen Untersuchungen aus Abschnitt 3.3.1, welche für TcaR2 einen hohen Anteil an α -Helices vorhersagten.

Das CD-Spektrum von TcaR2 bei 4°C zeigt keine signifikante Änderung beim Erhitzen der Probe auf 20°C bzw. auf 37°C (Abb. 17). Dies schließt zwar nicht aus, dass die Temperatur keine konformationellen Änderungen bei TcaR2 hervorruft, jedoch beeinflusst sie offensichtlich nicht den Gehalt an α -Helices, β -Faltblättern und Schleifen.

3.4.2 TcaR2-induzierte *tcaA*-Expression in *E. coli*

Zur weiteren Charakterisierung der temperaturabhängigen *tcaA*-Expression wurde die Promotoraktivität des *tc*-Genes im heterologen System untersucht. Hierbei sollte zunächst geklärt werden, ob allein TcaR2 ausreichend ist, um den Promotor von *tcaA* in *E. coli* zu induzieren. Hierzu wurde der Promotorbereich des Toxingenes (500 bp vor dem *tcaA*-Translationsstart) in den Vektor pPROBE-NT kloniert. Dieser Vektor trägt ein promotorloses GFP als Reportersystem, weshalb sich anhand der Fluoreszenzstärke die Aktivität des eingeführten Promotors quantifizieren lässt. Zur Überprüfung des Systems wurden ebenfalls die Promotorbereiche von *tcaR1* und *tcaR2* (je 500 bp vor dem Translationsstart) in den Vektor pPROBE-NT kloniert. Die rekombinanten Vektoren pNT-P_{*tcaR1*}::*gfp*, pNT-P_{*tcaR2*}::*gfp* und pNT-P_{*tcaA*}::*gfp* wurden in *E. coli* DH5 α transformiert und auf Kanamycin-haltigem LB-Agar selektiert. Anschließend wurden die Promotoraktivitäten der einzelnen Gene bei verschiedenen Inkubationstemperaturen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes analysiert. Hierzu wurden die beiden Inkubationstemperaturen 25°C und 37°C gewählt, da der *E. coli*-Stamm DH5 α bei 15°C ein stark beeinträchtigt Wachstum aufzeigt. Der Stamm DH5 α pNT-P_{*tcaA*}::*gfp* wies bei keiner der untersuchten Temperaturen Fluoreszenz auf (Abb. 18 C). Dies war zu erwarten, da bereits mit Hilfe des Stammes S17.1 λ pir pUTs-P_{*tcaA*}::*lux* gezeigt werden konnte, dass der Promotor des Toxingenes im heterologen System nicht aktiv ist. Anders verhielt es sich dagegen bei dem Promotor von *tcaR1*. Der Stamm DH5 α pNT-P_{*tcaR1*}::*gfp* zeigt unter dem Fluoreszenzmikroskop bei beiden Temperaturen eine starke Fluoreszenz, was darauf schließen lässt, dass der Promotor von *tcaR1* im heterologen Host aktiv ist (Abb. 18 A). Im Gegensatz dazu konnte für den Stamm DH5 α pNT-P_{*tcaR2*}::*gfp* bei beiden Inkubationstemperaturen keine Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 18 B).

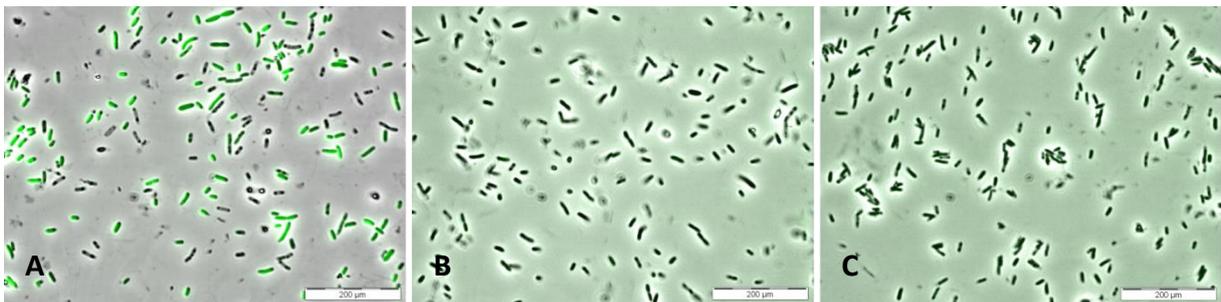


Abb. 18: Promotoraktivitäten von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* im heterologen Host. Mikroskopische Darstellung von DH5 α pNT-P_{*tcaR1*}::*gfp* (A), DH5 α pNT-P_{*tcaR2*}::*gfp* (B) und DH5 α pNT-P_{*tcaA*}::*gfp* (C) nach zweitägiger Inkubation bei 25°C. Gezeigt ist die Überlagerung von Phasenkontrast und Fluoreszenzkanal bei 100-facher Vergrößerung.

Wie bereits unter 3.3.1 gezeigt werden konnte, kommen keine TcaR2-Homologe außerhalb der insektiziden Pathogenitätsinsel vor. Darüber hinaus wurde unter 3.3.2 dargelegt, dass *tcaR2* positiv autoreguliert ist. Aus diesen Überlegungen heraus müsste eine Überexpression von *tcaR2* in dem *E. coli*-Stamm DH5 α pNT-P_{*tcaR2*}::*gfp* zu einer messbaren Promotoraktivität von *tcaR2* führen. Daher wurde in *E. coli* DH5 α pNT-P_{*tcaR2*}::*gfp* der Überexpressionsvektor pBAD-*tcaR2* transformiert. Der resultierende Stamm DH5 α pNT-P_{*tcaR2*}::*gfp* pBAD-*tcaR2* wurde unter Zusatz von 0,2% Arabinose bei 25°C und 37°C inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Erwartungsgemäß wiesen die untersuchten Zellen nach einer erfolgreichen TcaR2-Überproduktion bei beiden Inkubationstemperaturen eine starke Fluoreszenz auf (Abb. 19). Diese war bei 25°C höher als bei 37°C. Dieses Ergebnis bestätigt nochmals die Autoregulation von *tcaR2* und die Funktionsfähigkeit des Promotortestvektors pPROBE-NT.

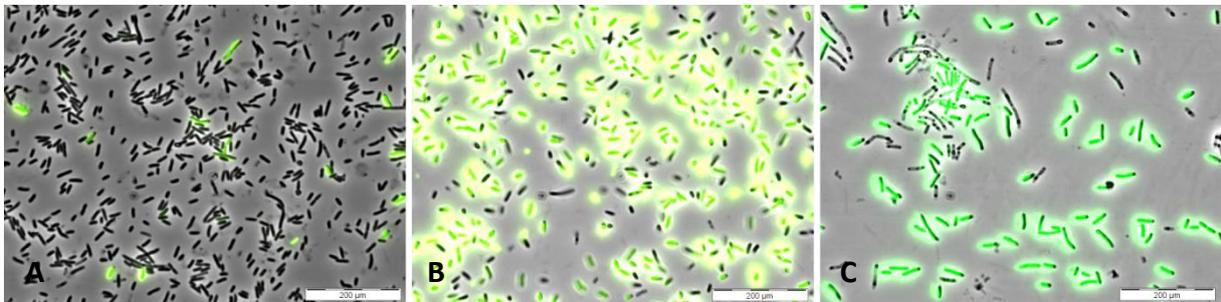


Abb. 19: Promotorstudien zu *tcaR2* im heterologen System *E. coli*. Mikroskopische Darstellung von DH5 α pNT-P_{*tcaR2*}::*gfp* pBAD-*tcaR2* bei 25°C ohne Induktion der *tcaR2*-Überexpression (A) und mit TcaR2-Überproduktion bei 25°C (B) und bei 37°C (C). Dargestellt ist die Überlagerung des Phasenkontrastes und des Fluoreszenzkanals bei einer 100-fachen Vergrößerung.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob sich der Promotor von *tcaA* bei TcaR2-Überproduktion im heterologen System ebenfalls induzieren lässt. Dazu wurde in *E. coli* DH5 α pNT-P_{*tcaA*}::*gfp* das Überexpressionsplasmid pBAD-*tcaR2* transformiert. Die Inkubation des resultierenden Stammes DH5 α pNT-P_{*tcaA*}::*gfp* pBAD-*tcaR2* erfolgte bei 25°C in Gegenwart und Abwesenheit von 0,2% Arabinose.

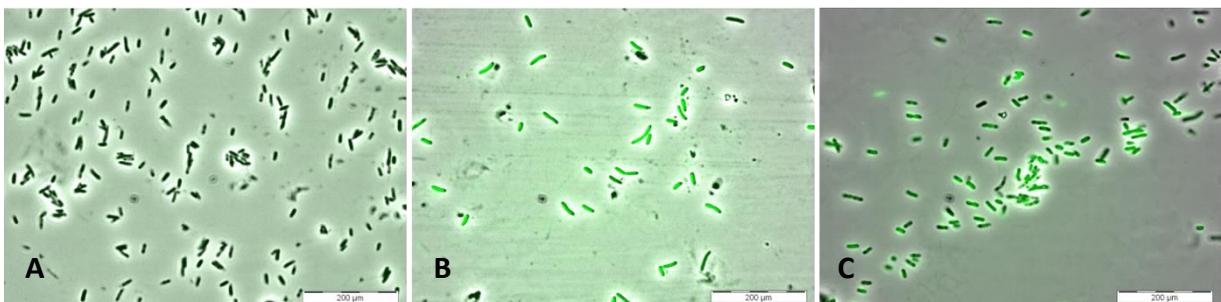


Abb. 20: Promotorstudien zu *tcaA* im heterologen Wirt *E. coli*. Mikroskopische Darstellung von DH5 α pNT-P_{*tcaA*}::*gfp* (A), DH5 α pNT-P_{*tcaA*}::*gfp* pBAD-*tcaR2*, nicht induziert (B) und induziert mit 0,2% Arabinose (C) bei 25°C. Dargestellt ist die Überlagerung des Phasenkontrastes und des Fluoreszenzkanals bei einer 100-fachen Vergrößerung.

Bereits nach dem bloßen Einbringen des *tcaR2*-Expressionsplasmides konnte im heterologen System Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 20 B). Nach der Induktion der TcaR2-Überproduktion nahm die Fluoreszenz, und damit die Promotoraktivität von *tcaA*, deutlich zu (Abb. 20 C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TcaR2 allein ausreichend ist, um den Promotor von *tcaA* im heterologen System zu induzieren. Ob *in vivo* ein zusätzlicher (*Yersinia*-spezifischer) Cofaktor für die *tcaA*-Expression erforderlich ist, lässt sich jedoch nicht sagen.

Da der rekombinante Vektor pNT-P_{*tcaA*}::*gfp* ausschließlich in Gegenwart von TcaR2 fluoreszierte, konnte dieser zur Analyse auf das Vorhandensein von TcaR2-Homologen in verschiedenen *Yersinia*-Spezies genutzt werden. Dazu wurde der Vektor in die beiden *Y. enterocolitica*-Stämme WA314 und 8081 (beide Biovar 1B, Serovar O:8), in *Y. pseudotuberculosis* IP32953, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. mollaretti* und *Y. ruckeri* transformiert. Fluoreszenz, und damit *tcaA*-Promotoraktivität, konnte lediglich für *Y. enterocolitica* WA314 und *Y. frederiksenii* beobachtet werden (vgl. Abb. A 18). Für die anderen *Yersinia*-Spezies wurde keine transkriptionale Aktivität des *tcaA*-Promotors detektiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Y. enterocolitica* WA314 und *Y. frederiksenii* einen TcaR2-homologen Regulator besitzen, der mit dem eingebrachten *tcaA*-Promotor von *Y. enterocolitica* W22703 interagiert.

3.4.3 Die Transkription von *tcaR2* und *tcaA* ist temperaturabhängig

Zur Aufklärung des Mechanismus, der der temperaturabhängigen *tcaA*-Expression zugrunde liegt, sollten die Biolumineszenzdaten aus 3.2 zunächst quantitativ bestätigt werden. Dazu wurde die Transkriptmenge von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* bei 15°C und 37°C bestimmt. Hierzu wurde RNA einer Kultur von *Y. enterocolitica* W22703 aus unterschiedlichen Wachstumsphasen (OD₆₀₀ = 0,6, 1,0 und 3,0) isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert (2.2.4.2). Die erhaltenen Expressionsdaten wurden gegen das *Housekeeping*-Gen 16S rRNA normalisiert [Falker *et al.*, 2006].

tcaR1 wird in allen Wachstumsphasen und bei beiden Temperaturen gleich stark exprimiert (Abb. 21). Dies deckt sich mit den Biolumineszenzdaten aus 3.3.2, welche bereits eine konstitutive Expression von *tcaR1* vermuten ließen. Dagegen kann bei der Expression von *tcaR2* und *tcaA* eine deutliche Temperaturabhängigkeit beobachtet werden. Im Vergleich zu 37°C ist bei 15°C die Transkription beider Gene in der exponentiellen Phase signifikant erhöht. Die maximale Transkription tritt am Ende der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 3,0) auf. Im Vergleich zu 37°C konnte bei 15°C bei einer OD₆₀₀ von 3,0 eine 8-fache Induktion von *tcaR2* und eine 4-fache Induktion von *tcaA* festgestellt werden. Mit diesen Ergebnissen konnten die Daten der Biolumineszenzmessungen hinsichtlich der temperaturabhängigen *tcaA*-Expression bestätigen werden.

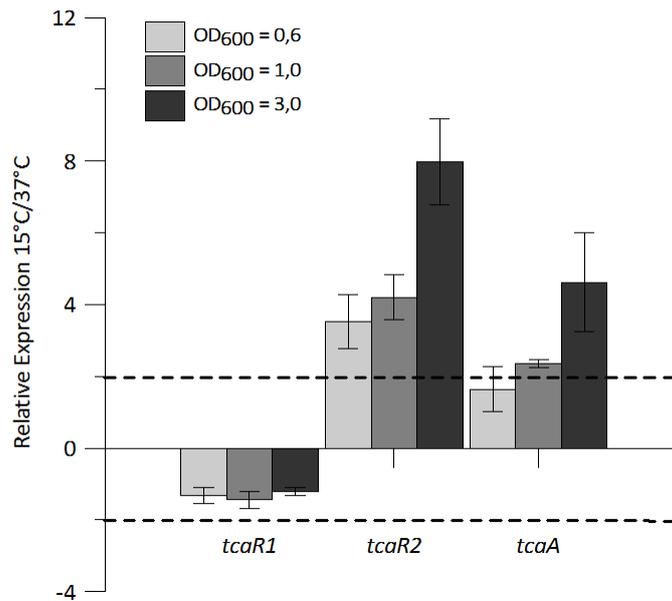


Abb. 21: Relative Expression von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* bei 15°C im Vergleich zu 37°C. Die Transkriptmenge von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* wurde in unterschiedlichen Wachstumsphasen mittels qRT-PCR bestimmt. Die erhaltenen Expressionsdaten wurden gegen das Gen 16S rRNA normalisiert. In der qRT-PCR wird ein Expressionsunterschied von mindestens zwei als signifikant betrachtet.

3.4.4 mRNA-Stabilität von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* bei 15°C und 37°C

Die Ergebnisse der qRT-PCR wiesen darauf hin, dass *tcaA* auf sehr niedrigem Niveau auch bei 37°C transkribiert wird. Dies ließ die Frage nach der Thermostabilität des *tcaA*-Transkriptes aufkommen. Um den Einfluss der Temperatur auf die Transkriptstabilität von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* zu untersuchen, wurden Kulturen von W22703 bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 inkubiert. Nachdem der Kultur 50 µg/ml Rifampicin, ein die bakterielle Transkription inhibierendes Antibiotikum, zugesetzt worden war, wurde die Kultur auf zwei Schottflaschen aufgeteilt. Von diesen Kulturen wurde je eine bei 15°C bzw. bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 5, 15 und 30 min nach der Inhibierung der Transkription) wurden Proben entnommen, aus welchen anschließend die Gesamt-RNA isoliert wurde. Zur Bestimmung der Stabilität der mRNA von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* wurden gleiche Mengen an Gesamt-RNA (5 µg) in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Die Transkriptionsmenge des jeweiligen Gens wurde relativ zum Zeitpunkt Null berechnet.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Stabilität der untersuchten Transkripte bei einer Temperatur von 37°C im Vergleich zu 15°C geringer ist, und lassen vermuten, dass bei der höheren Temperatur ein schnellerer Abbau der mRNA stattfindet. Dieser Effekt ist vor allem bei *tcaR1* deutlich ausgeprägt. Die Halbwertszeit der *tcaR1*-mRNA bei 15°C liegt bei 160 s, die bei 37°C dagegen nur bei 80 s. Die Halbwertszeit der mRNA von *tcaR2* und *tcaA* ist bei 37°C im Vergleich zu 15°C mit 192 s gegen 250 s (*tcaR2*) bzw. 250 s gegen 280 s (*tcaA*) nur geringfügig erniedrigt.

Die durchschnittliche Halbwertszeit bakterieller mRNA liegt im Bereich von 3 bis 8 min [Bernstein *et al.*, 2002]. Die für *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* ermittelten Halbwertszeiten liegen damit in diesem Bereich. Eine Regulation der temperaturabhängigen *tcaA*-Expression durch mRNA-Stabilität ist daher eher unwahrscheinlich.

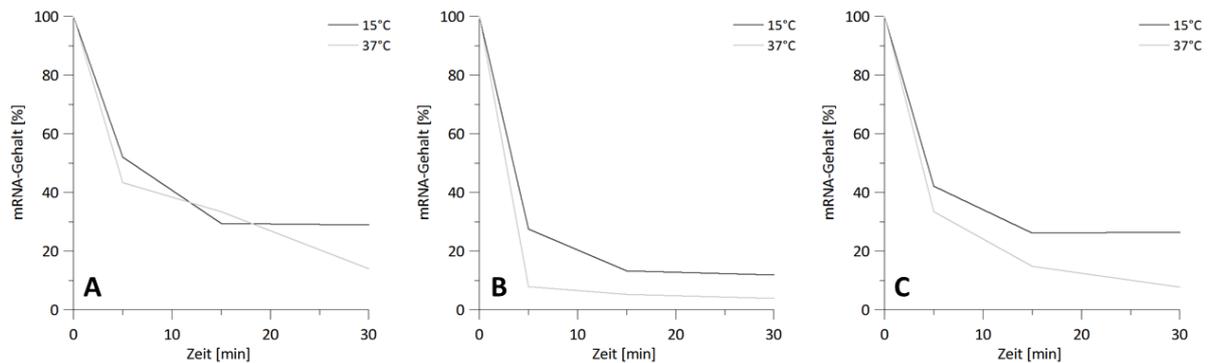


Abb. 22: Graphische Darstellung der Quantifizierung der Transkriptstabilität von *tcaR1* (A), *tcaR2* (B) und *tcaA* (C) bei 15°C und 37°C. W22703-Kulturen wurden bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 herangezogen, mit 50 µg/ml Rifampicin versetzt, in zwei Aliquots aufgeteilt und anschließend bei 15°C oder 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR durchgeführt. Die relative Menge an mRNA bezieht sich auf den höchsten gemessenen Wert (t = 0), der mit 100% definiert wurde. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen mit jeweils zwei Replikaten.

3.4.5 Untersuchungen zur mRNA-Sekundärstruktur von *tcaA*

Neben der mRNA-Stabilität kann auch die mRNA-Sekundärstruktur einen Einfluss auf die Translationseffizienz ausüben. Hierbei könnte die Initiation der Translation durch eine Maskierung der Ribosomenbindestelle verhindert werden. Um diese Möglichkeit in Bezug auf die temperaturabhängige *tcaA*-Expression auszuschließen, wurde die mRNA-Sekundärstruktur des *tcaA*-Promotorbereiches mit Hilfe von MFold untersucht [Zuker, 2003]. Dieses Programm beruht auf dem Prinzip der Energieminimierung, mit dem Ziel, die thermodynamisch optimale Sekundärstruktur einer gegebenen Nukleinsäuresequenz zu berechnen. Zur Ermittlung der mRNA-Sekundärstruktur von *tcaA* wurde MFold 2.3 genutzt. Diese Version des Programmes erlaubt die Vorhersage von Sekundärstrukturen nicht nur bei 37°C, sondern auch bei anderen Temperaturen.

Für 15°C wurden sieben mögliche Strukturen gefunden, welche alle eine ähnlich niedrige freie Enthalpie aufweisen. Für 37°C wurden dagegen nur zwei mögliche Strukturen berechnet. Die beiden vorhergesagten Sekundärstrukturen von *tcaA* (vom Transkriptionsstart bis zu Nukleotid 134 der kodierenden Region) mit der niedrigsten freien Enthalpie bei 15°C und 37°C sind in Abb. 23 dargestellt.

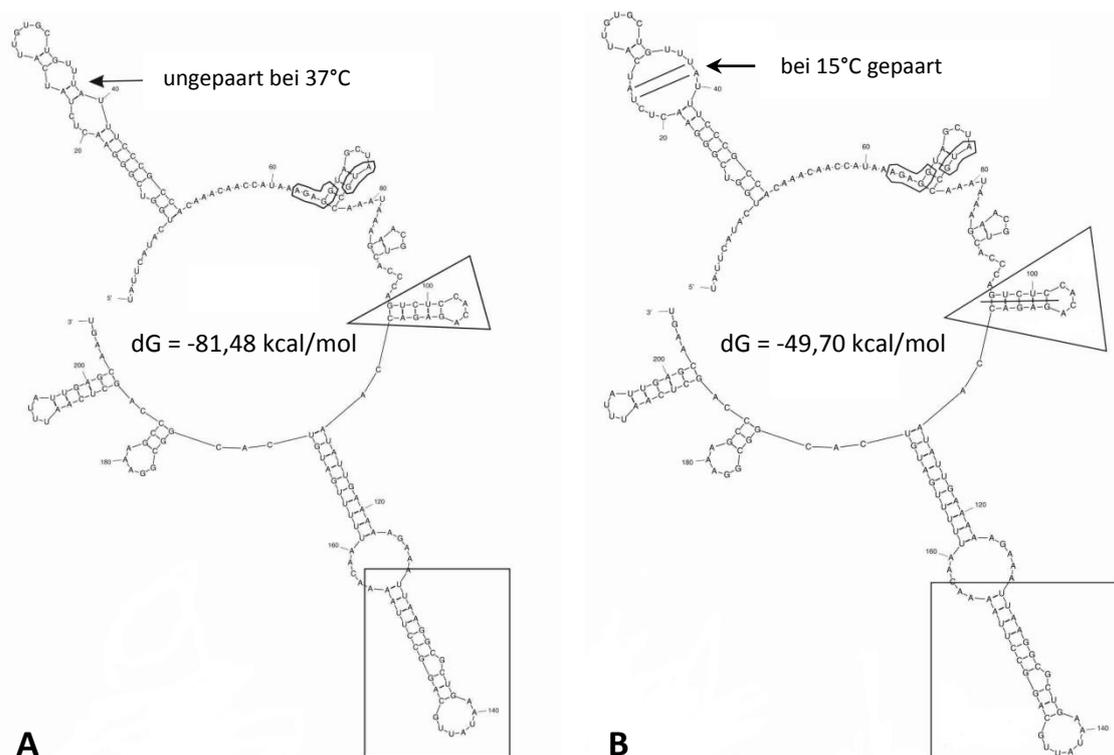


Abb. 23: mRNA-Sekundärstruktur von *tcaA* bei 15°C und 37°C. Dargestellt ist die mittels MFold generierte mRNA-Sekundärstruktur vom *tcaA*-Transkriptionsstart bis zu Nukleotid 134 der kodierenden Region bei 15°C (A) und bei 37°C. Von den möglichen Strukturen ist jeweils die mit der niedrigsten freien Enthalpie (dG) dargestellt. Markiert sind jeweils die Shine-Dalgarno-Sequenz, der Translationsstart sowie zwei Haarnadelstrukturen an Position 97 (Dreieck) und an Position 128 (Rechteck).

Beim Vergleich beider Strukturen fällt auf, dass diese nahezu identisch sind. Bei beiden Modellen bleibt die Haarnadelstruktur, die die Shine-Dalgarno-Sequenz enthält, erhalten. Des Weiteren befindet sich bei beiden Temperaturen an Position 97 bis 110 eine Formation, welche eine Shine-Dalgarno-ähnliche Sequenz enthält, die mit einer anti-Shine-Dalgarno-Sequenz gepaart ist [Li *et al.*, 2012]. Eine zweite Haarnadelstruktur, die bei beiden untersuchten Temperaturen auftritt, befindet sich an Position 128. Dieser Hairpin ist in allen vorhergesagten Modellen vorhanden und könnte eine Faktorbindestelle oder Aktionsplattform für die Translationstermination darstellen. Einzig an Position 23 ist ein Unterschied in den mRNA-Sekundärstrukturen von 15°C und 37°C festzustellen. Bei 15°C sind die Basen an Position 23 und 24 gepaart, bei 37°C sind die Basen an dieser Stelle dagegen ungepaart.

Die mittels MFold generierten Vorhersagen zur Sekundärstruktur von *tcaA* schließen eine Regulation der temperaturabhängigen Toxinexpression durch mRNA-Sekundärstrukturen zwar nicht gänzlich aus, geben jedoch keinen direkten Hinweis auf das Vorhandensein eines möglichen RNA-Thermometers. Dabei ist allerdings immer zu beachten, dass MFold die optimale Struktur mit der minimalen freien Energie berechnet. Im Gegensatz dazu können aber auch suboptimale Strukturen von biologischer Relevanz sein.

3.4.6 TcaR2 ist bei 37°C instabil

Die Frage nach dem Mechanismus, der der temperaturabhängigen *tcaA*-Expression zugrunde liegt, sollte im nächsten Schritt beantwortet werden. Da die Temperatur einen großen Einfluss auf den physikalischen und chemischen Zustand von Proteinen, Membranen sowie anderen Zellbestandteilen und Zellprozessen besitzt, ist es für Bakterien von besonderer Bedeutung, die Umgebungstemperatur stetig zu messen und temperaturabhängige Prozesse in der Zelle genau zu kontrollieren. Dazu stehen Bakterien drei verschiedene Makromoleküle zur Verfügung: DNA, RNA und Proteine [Hurme *et al.*, 1998]. Im Allgemeinen bewirkt eine Temperaturänderung bei diesen Molekülen eine Änderung ihrer Konformation oder ihrer Stabilität [Hurme *et al.*, 1998; Eriksson *et al.*, 2002]. So wird beispielsweise die Topologie der DNA durch Temperatur beeinflusst. Eine Temperaturänderung kann zur Modifikation des Spiralisierungsgrades der DNA und damit der Transkriptionseffizienz führen [Lopez-Garcia, 1999]. Die Biegung der DNA, etwa im Promotorbereich, ist ein weiterer Punkt, der durch die Temperatur beeinflusst wird. Der Einfluss der DNA-Topologie auf die *tcaA*-Expression konnte in vorliegender Arbeit allerdings nicht näher untersucht werden.

Durch die Entdeckung des sogenannten Riboswitches, einem RNA-Element in der untranslatierten Region der mRNA, das durch die Bindung niedermolekularer Metabolite die Genexpression reguliert, sowie weiterer RNA-basierter Kontrollelemente, wie sRNAs und RNA-Thermometer, konnte die Rolle von RNA-Molekülen in der temperaturabhängigen Genexpression gezeigt werden [Lai, 2003; Kortmann *et al.*, 2012]. Hierbei vermittelt die mRNA eine Temperaturänderung entweder durch ihre Stabilität oder durch Sekundärstrukturen. Für die mRNA von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* wurde gezeigt, dass sie eine durchschnittliche Halbwertszeit besitzt (3.4.4). Darüber hinaus konnte mit MFold kein klassisches RNA-Thermometer in der *tcaA*-Sekundärstruktur gefunden werden (3.4.5). Diese beiden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die temperaturabhängige *tcaA*-Expression nicht auf RNA-Ebene reguliert wird.

Proteine galten lange Zeit als die einzigen Moleküle, die sensorische und regulatorische Funktionen in der Zelle ausüben. Da die Temperatur einen großen Einfluss auf die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen hat, sind in der Literatur zahlreiche Beispiele für temperaturabhängige Proteinsensoren beschrieben worden [Kamp *et al.*, 2011; Sengupta *et al.*, 2013]. Die Konformation von TcaR2 bei verschiedenen Temperaturen wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht (3.4.1). Hierbei konnte keine Beeinflussung des Gehaltes an α -Helices, β -Faltblättern und Schleifen bei einer Temperaturerhöhung von 4°C auf 37°C festgestellt werden. Ein weiterer Hinweis, dass TcaR2 die *tcaA*-Expression nicht durch Konformationsänderungen reguliert, lieferten die EMSAs, die bei unterschiedlichen Temperaturen nahezu gleiche Bindungskonstanten von TcaR2 an den *tcaA*-Promotor aufwiesen (3.3.5). Proteine können allerdings nicht nur über konformationelle Änderungen die Genexpression beeinflussen, sondern auch durch ihre Stabilität [Digel *et al.*, 2008]. So wurde im nächsten Schritt die Proteinstabilität von TcaR2 bei 15°C und 37°C untersucht. Da jedoch kein TcaR2-

spezifischer Antikörper vorhanden war, wurde der Regulator artifiziell mittels pBAD-*tcaR2* in dem *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 überexprimiert und war so aufgrund des N-terminalen His-Tags im Western Blot unter Verwendung eines Anti-His-Tag-Antikörpers nachweisbar. Zur Untersuchung der Stabilität von TcaR2 wurde der *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 pBAD-*tcaR2* in Tetrazyklin-haltigem LB-Medium bei 30°C und 180 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Anschließend wurde die TcaR2-Überproduktion durch Zugabe von 0,2% Arabinose induziert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurde der Kultur Chloramphenicol, ein die bakterielle Proteinsynthese inhibierendes Antibiotikum, in einer Endkonzentration von 40 µg/ml hinzugegeben. Die Kultur wurde auf zwei Schottflaschen verteilt, von denen eine bei 15°C und die andere bei 37°C inkubiert wurde. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und im Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurden Kulturen mitgeführt, deren Proteintranslationsapparat nicht inhibiert wurde.

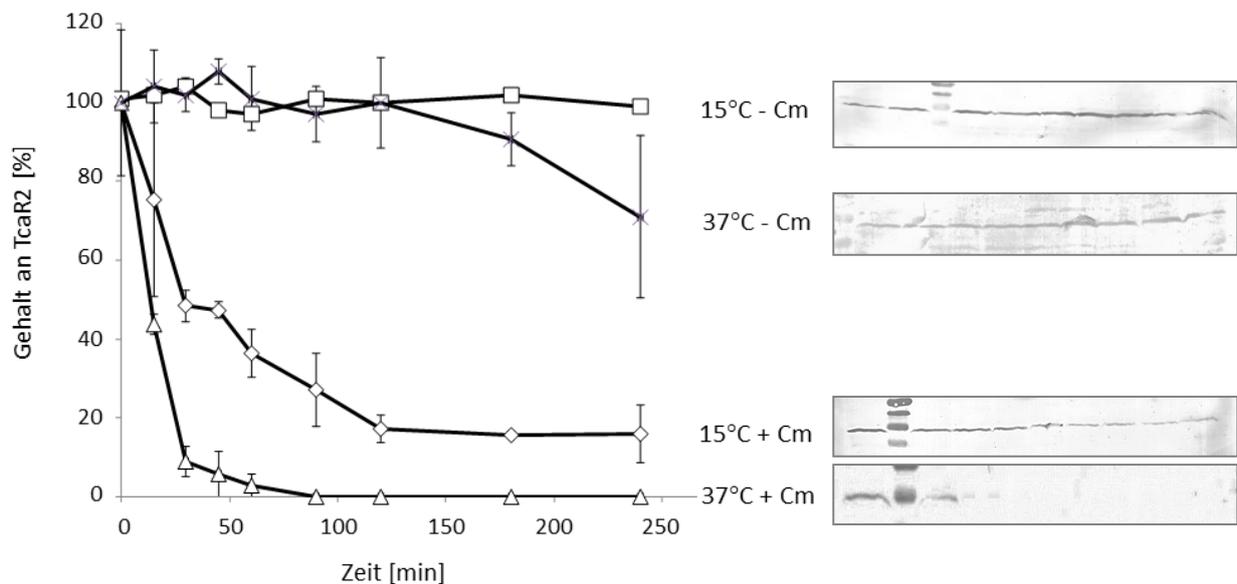


Abb. 24: Stabilität von TcaR2 bei 15°C und 37°C. Eine Kultur von W22703 pBAD-*tcaR2* wurde bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 herangezogen. Anschließend wurde die TcaR2-Überproduktion durch Zugabe von 0,2% Arabinose gestartet. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 30°C und 180 UpM wurde die Kultur mit 40 µg/ml Chloramphenicol versetzt, in zwei Aliquots aufgeteilt und bei 15°C bzw. 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Menge an TcaR2_{His6} wurde mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-His-Tag-Antikörpers als Primäranantikörper bestimmt. Die relative Menge an TcaR2 bezieht sich auf den gemessenen Wert zum Zeitpunkt t = 0, der mit 100% definiert wurde. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen mit jeweils zwei Replikaten. Als Kontrolle dienen Proben, bei denen die Proteintranslation nicht inhibiert wurde. Für jeden Ansatz ist ein repräsentativer Blot dargestellt.

Wie Abb. 24 entnommen werden kann, zeigt TcaR2 bei 15°C eine signifikant höhere Stabilität als bei 37°C. 240 min nach Inhibierung der Translation waren hier noch 20% der ursprünglichen TcaR2-Menge nachweisbar. Bei 37°C konnte dagegen bereits 90 min nach der Translationsinhibierung kein Protein mehr detektiert werden. Auch bei den beiden Proben denen kein Chloramphenicol hinzugegeben wurde, und TcaR2 durchgehend synthetisiert wurde, ist bei 37°C ein Abbau zu erkennen. Diese

Ergebnisse deuten allgemein auf eine raschere Proteolyse von TcaR2 bei 37°C als bei 15°C hin. Zum Nachweis des Abbaus von TcaR2 durch Proteasen bei 37°C, wurde der Versuch in Gegenwart von Chloramphenicol und dem Proteaseinhibitor PMSF wiederholt.

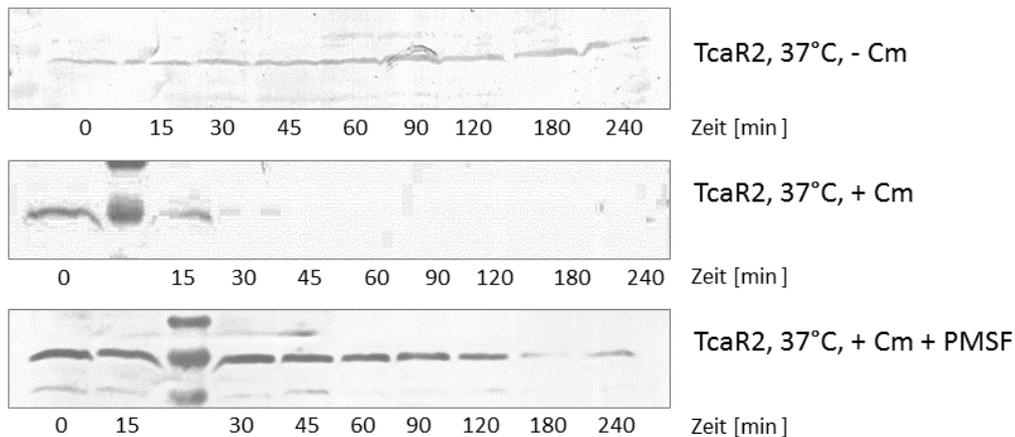


Abb. 25: Proteinstabilität von TcaR2 bei 37°C. Eine Kultur von W22703 pBAD-*tcaR2* wurde bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 herangezogen, mit 0,2% Arabinose versetzt und für weitere drei Stunden schüttelnd bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit 40 µg/ml Chloramphenicol (+Cm) versetzt und ein Aliquot wurde mit Chloramphenicol und zusätzlich mit 1 mM PMSF (+PMSF) behandelt. Beide Kulturen wurden bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Menge an TcaR2_{His6} mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-His-Tag-Antikörpers als Primärantikörper bestimmt. Als Kontrolle dienen Proben, bei denen die Proteintranslation nicht inhibiert wurde. Für jeden Ansatz ist ein repräsentativer Blot dargestellt.

Nachdem der Kultur PMSF hinzugegeben wurde, ist die Stabilität von TcaR2 vergleichbar mit der bei 15°C (vgl. Abb. 24 und Abb. 25). Selbst 240 min nach der Translationsinhibierung ist noch Protein detektierbar. Dieser Befund bestätigt den Abbau von TcaR2 durch Proteasen bei 37°C und weist auf eine höhere Stabilität des Proteins bei niedrigeren Temperaturen hin.

3.4.7 Menge an TcaR2 ist bei 15°C höher als bei 37°C

Die bisherigen Ergebnisse deuteten auf eine geringere Stabilität von TcaR2 bei 37°C im Vergleich zu niedrigeren Temperaturen hin. Daher sollte im nächsten Schritt die native Menge dieses Proteins bei 15°C und 37°C in *Y. enterocolitica* W22703 bestimmt werden. Da für TcaR2 jedoch kein spezifischer Antikörper verfügbar war, war eine translationale Fusion dieses Proteins mit einem einfach nachweisbaren Marker nötig. Aufgrund der hohen Sensitivität des Anti-RFP-Antikörpers von Invitrogen, fiel die Wahl auf das Fluoreszenzprotein mCherry [Gebrande, 2012]. Zur translationalen Fusion von TcaR2 mit mCherry wurden wie unter 2.2.8.2 beschrieben die letzten 500 bp der *tcaR2*-kodierenden Region in den Vektor pUTs-*mCherry* kloniert. Der resultierende rekombinante Vektor pUTs-*tcaR2::mCherry* wurde in S17.1 λ pir transformiert, mittels PCR und Sequenzierung verifiziert und

anschließend über Konjugation in *Y. enterocolitica* W22703 eingebracht. Die Integration des Vektors im Genom wurde mittels PCR überprüft. Der resultierende Stamm W22703 *tcaR2::mCherry* wurde in Chloramphenicol-haltigem LB-Medium bei 15°C und 37°C bei 180 UpM inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 1,4 und 2,8 wurden jeweils Proben entnommen, auf eine gleiche Zellzahl eingestellt, mit 100 µl 1x Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 100°C inkubiert. Anschließend wurde die Menge des TcaR2-mCherry-Fusionsproteins mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-RFP-Antikörpers als Primäntikörper und eines AP-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpers als Sekundär-Antikörper untersucht.

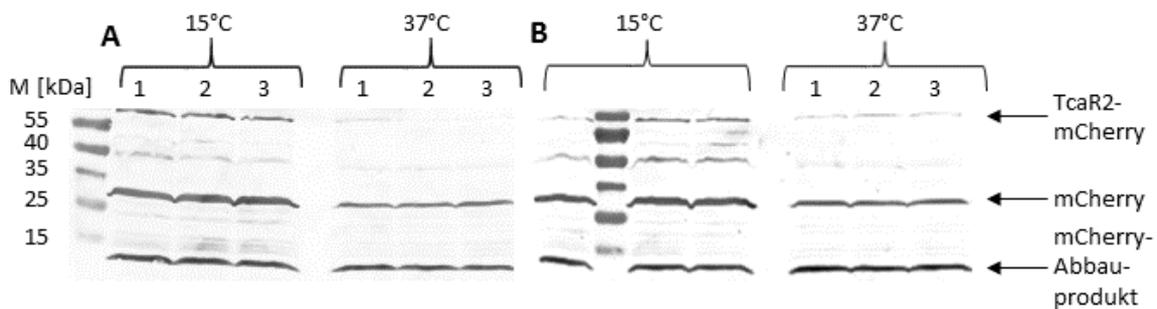


Abb. 26: Bestimmung der TcaR2-Menge in *Y. enterocolitica* W22703 bei 15°C und 37°C in verschiedenen Wachstumsphasen. Zur Bestimmung der nativen TcaR2-Konzentration wurde der Transkriptionsregulator translational mit mCherry fusioniert. Der resultierende Stamm W22703 *tcaR2::mCherry* wurde bei 15°C und 37°C inkubiert. Es wurden Proben bei einer OD₆₀₀ von 1,4 (exponentielle Phase, A) und 2,8 (Übergang zur stationären Phase, B) entnommen und auf die gleiche Zellzahl eingestellt. Die Menge des gebildeten Fusionsproteins TcaR2-mCherry wurde mittels Western Blot bestimmt. Die Proben 1-3 stellen jeweils drei unabhängige Versuche dar.

Im Western Blot konnten drei dominante Banden in Höhe von ca. 60 kDa, 30 kDa und 12 kDa detektiert werden. Das Fusionsprotein TcaR2-mCherry weist eine Größe von 61 kDa auf und entspricht damit der größten detektierten Bande im Blot. Diese Bande konnte bei 15°C in beiden untersuchten Wachstumsphasen nachgewiesen werden. Bei 37°C war diese Bande dagegen deutlich schwächer vorhanden. Zusätzlich zum Fusionsprotein konnte in allen Proben auch freies mCherry (27 kDa) sowie eine Degradationsbande bei ca. 12 kDa detektiert werden. Die Gesamtmenge des gebildeten TcaR2 bei 15°C und 37°C in unterschiedlichen Wachstumsphasen wurde densitometrisch bestimmt. Bei 15°C ist der Gehalt an TcaR2-mCherry in der exponentiellen Phase sowie im Übergang zur stationären Phase um ca. 1,5-fach höher als bei 37°C. Nur bei 15°C konnten in allen Proben größere Mengen des intakten TcaR2-mCherry-Fusionsproteins detektiert werden. Dieses machte ca. 17% des detektierten Gesamtproteins aus. Bei 37°C lag der Anteil des Fusionsproteins dagegen nur bei etwa 3%. Dieses Ergebnis bestärkt die bereits unter 3.4.6 beobachtete Instabilität von TcaR2 bei 37°C. Die Menge an nachgewiesenem TcaR2 ist im Allgemeinen im Übergang zur stationären Phase um ca. 20% höher als in der exponentiellen Phase. Mit dieser Beobachtung konnten die Expressionsdaten zu *tcaR2* auf Proteinebene bestätigt werden.

3.5 Einfluss weiterer *Yersinia*-Transkriptionsfaktoren auf die Expression der *tc*-Gene

In den vorherigen Abschnitten wurde die stringente Abhängigkeit der *tcaA*- und *tcaB*-Expression von TcaR2 gezeigt: Die A-Untereinheit des insektiziden Toxinkomplexes wird nur in Anwesenheit von TcaR2 produziert. Eine Überexpression von *tcaR2* bei 37°C führt jedoch zu keiner messbaren TcaA/TcaB-Synthese. Zum einen ist dies mit der in 3.4.6 gezeigten Instabilität von TcaR2 zu erklären, zum anderen deuten diese Ergebnisse auf einen zusätzlichen, repressorischen Faktor bei 37°C hin. Um diesen Faktor zu identifizieren, wurden in dem Transposonstamm W22703 *tcaA(134)::lux* die Gene folgender *Yersinia*-Transkriptionsfaktoren über Insertion bzw. Deletion inaktiviert: die beiden *Quorum sensing*-Synthasen LuxS und YenI, die Virulenzregulatoren RovA und YmoA, das Zweikomponentensystem KdpD und die an die Tc-PAI_{yc} angrenzende Protease TldD. Von den jeweiligen Mutanten wurden durch Messung der Biolumineszenz und optischen Dichte *tcaA*-Expressionsprofile bei 15°C und 37°C erstellt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 27 zusammengefasst.

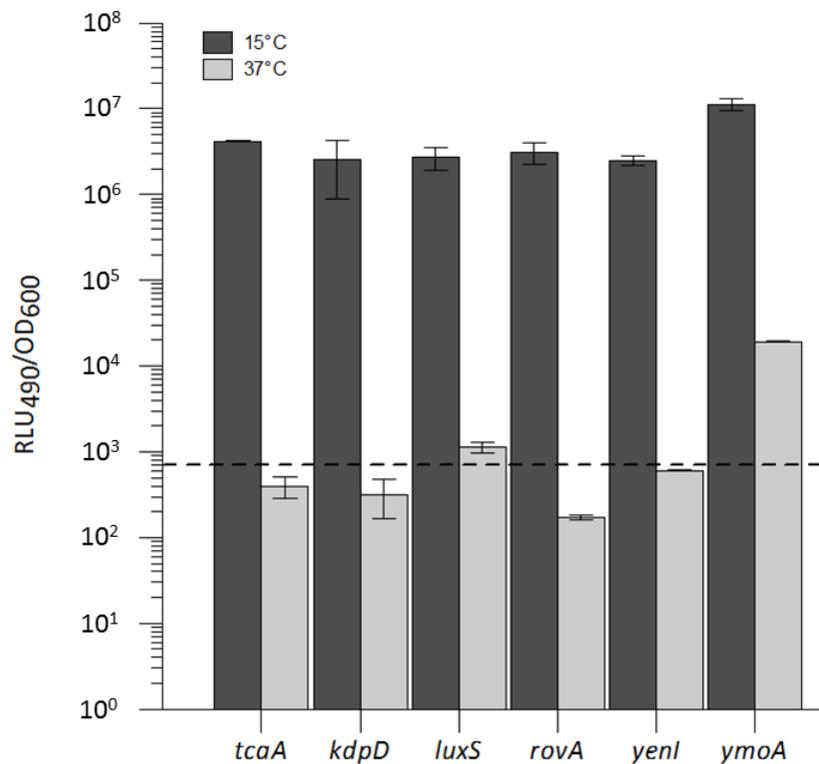


Abb. 27: Einfluss verschiedener *Yersinia*-Transkriptionsregulatoren auf die *tcaA*-Expression bei 15°C und 37°C. Folgende Gene wurden durch Insertion bzw. Deletion in der *lux*-Transposonmutante W22703 *tcaA(134)::lux* (*tcaA*) inaktiviert: *kdpD*, *luxS*, *rovA*, *yenI* und *ymoA*. Die Biolumineszenz und optische Dichte der resultierenden Stämme wurde in LB-Medium bei 15°C und 37°C gemessen. Dargestellt ist die maximale *tcaA*-Expression in der späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,8). Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken symbolisieren die jeweilige Standardabweichung. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀), bestimmt durch die Messung einer S17.1 λ *pir* pUTs-*P_{tcaA}::lux*-Kultur.

Bei 15°C wurden für alle getesteten Mutanten Biolumineszenzwerte in der Größenordnung von ca. 3×10^6 RLU₄₉₀/OD₆₀₀ gemessen. Einzig der Stamm W22703 *tcaA*(134)::*lux ymoA*::pKRG9 wies mit $1,1 \times 10^7$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ höhere Biolumineszenzwerte auf. Diese erhöhte *tcaA*-Expression spiegelte sich auch bei 37°C wieder, wobei erstmals bei dieser Temperatur eine Expression dieses Toxingenes oberhalb des Schwellenwertes von 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀ detektiert werden konnte. Das Ausschalten von *ymoA* führte bei 37°C zu einer etwa 50-fachen Steigerung der *tcaA*-Transkription von $4,0 \times 10^2$ auf $1,9 \times 10^5$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀.

Die Deletion des *Quorum sensing*-Systems *luxS* führte ebenfalls zu einer Biolumineszenz oberhalb des Schwellenwertes von 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀. Diese lag mit $1,2 \times 10^3$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ jedoch deutlich unter der gemessenen der *ymoA*-Insertionsmutante.

3.5.1 Der *Yersinia* Virulenz-Modulator YmoA

3.5.1.1 YmoA reprimiert die *tcaA*-Expression bei 37°C

Zur Validierung der Daten aus 3.5 wurde *ymoA* in der *lux*-Transposonmutante W22703 *tcaA*(134)::*lux* deletiert und die *tcaA*-Expression im resultierenden Stamm W22703 Δ *ymoA tcaA*(134)::*lux* bei 15°C und 37°C mit der im Stamm W22703 *tcaA*(134)::*lux* verglichen. Die Ergebnisse hierzu sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Tab. 12: Einfluss der *ymoA*-Deletion auf die *tcaA*-Expression in LB-Medium bei 15°C und 37°C. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,8) und stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (STABW) aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. U.S.= unterhalb des Schwellenwertes für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀)

Stamm	15°C		37°C	
	RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]	cRLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]
W22703 <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$1,4 \times 10^6$	1,8	u.S.	
W22703 Δ <i>ymoA tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$4,3 \times 10^6$	2,5	$3,0 \times 10^3$	30,2

Die Deletion von *ymoA*, welche bei beiden Temperaturen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten zeigt (Abb. A 16), wirkt sich signifikant auf die *tcaA*-Expression aus. In der *lux*-Transposonmutante W22703 *tcaA*(134)::*lux* führte die Deletion des Transkriptionsmodulators bei 37°C zu einer 50-fach und bei 15°C zu einer 4-fach erhöhten *tcaA*-Expression. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *ymoA* als Repressor von *tcaA* fungiert. Die repressorische Funktion scheint bei 37°C ausgeprägter zu sein als bei niedrigeren Temperaturen. Der Regulator könnte bei 37°C über eine Bindung im *tcaA*-Promotorbereich die Expression dieses Toxingenes verhindern. Im Folgenden wurde der Fokus daher auf YmoA gelegt.

3.5.1.2 Bioinformatische Charakterisierung von YmoA

Zunächst wurde eine bioinformatische Charakterisierung des Regulators YmoA durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Gen *ymoA* innerhalb der verschiedenen *Yersinia*-Spezies hoch konserviert ist. Durch einen Abgleich der Proteinsequenz mittels BLASTP wurden weitere YmoA-Homologe in einer Vielzahl von *Enterobacteriaceae* identifiziert. So können YmoA-Homologe beispielsweise in *P. luminescens* (Identität: 91%, E-Wert: $1 \times e^{-37}$), *S. marcescens* (Identität: 93%, E-Wert: $2 \times e^{-37}$) und *Providencia sneebia* (Identität: 93%, E-Wert: $2 \times e^{-37}$) gefunden werden. Diese zählen zur Klasse der Hha-Proteine, führen zu einer Veränderung der Hämolysinexpression und wurden erstmals im Zusammenhang mit der Herunterregulation der Genexpression in *Y. enterocolitica* und *E. coli* beschrieben [de la Cruz *et al.*, 1992]. Ein Charakteristikum dieser Familie ist die Nachahmung der Bindedomäne des Nukleoid-assoziierten Proteins H-NS. Dadurch kommt es oftmals zur Bildung von H-NS/Hha-Protein-Komplexen [Mikulskis *et al.*, 1994; McFeeters *et al.*, 2007]. Diese Komplexe können ebenfalls repressorisch auf die Genexpression in Gram-negativen Bakterien wirken. So wurde in der Literatur bereits die Repression von *invA* in *Y. pseudotuberculosis* durch einen YmoA/H-NS-Komplex beschrieben [Ellison *et al.*, 2003; Ellison *et al.*, 2006]. Im nächsten Schritt wurde daher die Interaktion von YmoA aus *Y. enterocolitica* W22703 mit H-NS näher untersucht.

3.5.1.3 Interaktion von YmoA mit H-NS

Um eine Interaktion von H-NS und YmoA in *Y. enterocolitica* W22703 nachzuweisen, wurden verschiedene Aufreinigungsstrategien von YmoA und H-NS durchgeführt. Zur Überexpression von YmoA wurde dessen Gen in den Vektor pBAD/HisA (Tet^R) kloniert und anschließend in den *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 transformiert. Gleichzeitig wurde das rekombinante Plasmid über Transformation in den *E. coli*-Stamm KB3 eingebracht. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine Deletion von *hns* und *stpA* aus [Böhme *et al.*, 2012]. Die Überexpression erfolgte durch Zugabe von 0,2% Arabinose bei 30°C (*Y. enterocolitica*) bzw. bei 37°C (*E. coli*). Nach drei Stunden Inkubation wurde das Protein wie unter 2.3.2 beschrieben aufgereinigt. Die Überproduktion und Aufreinigung von H-NS erfolgte analog aus dem *E. coli*-Stamm KB3 pET28b-*hns* (Start der Überexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG).

Die beiden gereinigten Fraktionen von YmoA aus *Y. enterocolitica* W22703 und *E. coli* KB3 wurden im Western Blot miteinander verglichen. Gleichzeitig wurden Zelllysate von dem *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 und der *ymoA*-Deletionsmutante W22703 $\Delta ymoA$ aufgetragen. Der Blot ist in Abb. 28 gezeigt.

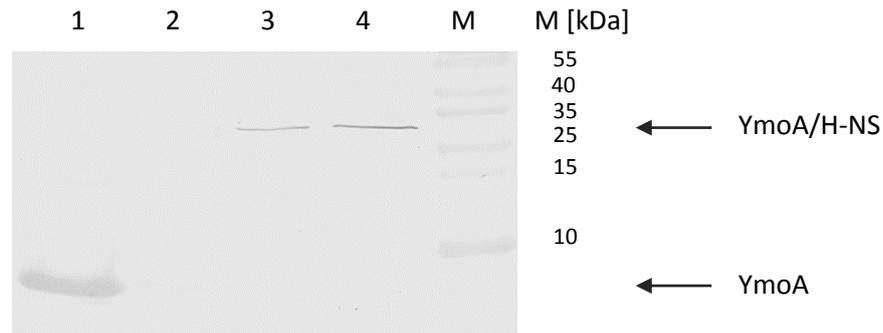


Abb. 28: Western Blot zur Aufreinigung von YmoA. 1) Aufgereinigtes YmoA aus dem *E. coli*-Stamm KB3, 2) Zellysate von W22703 $\Delta ymoA$, 3) Zellysate von W22703, 4) Aufgereinigtes YmoA aus W22703; M = Proteinmarker. Die Proteine wurden mit Hilfe eines 18%igen Tricin-Polyacrylamidgels aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran gebロットet. YmoA wurde mittels eines Anti-YmoA-Antikörpers als Primärantikörper und eines AP-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpers als Sekundärantikörper, unter Verwendung der chromogenen Substrate BCIP und NBT, detektiert.

Das aufgereinigte YmoA aus dem *E. coli*-Stamm KB3 wies mit ca. 9 kDa die zu erwartende Größe des His-markierten YmoA auf (Abb. 28). Aufgrund des Fehlens von *hns* und *stpA* in diesem Stamm ist eine Komplexierung von YmoA mit anderen Hha-Proteinen nicht möglich. Beim Zellysate des Stammes W22703 $\Delta ymoA$ (2. Spur im Western Blot) konnte keine Bande detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigte nochmals die erfolgreiche Deletion des Regulators. In der dritten und vierten Spur des Blots konnte eine Bande in Höhe von ca. 27 kDa ausgemacht werden. Diese Bande entspricht der Größe nach dem YmoA/H-NS-Komplex. Bereits NIETO *et al.* beschrieben in ihrer Veröffentlichung, dass es bei der nativen Reinigung von YmoA zu einer Coaufreinigung eines mit H-NS kontaminierten Komplexes kommt [Nieto *et al.*, 2002]. Das Auftreten der 27 kDa großen Bande im Zellysate von *Y. enterocolitica* W22703 deutet darauf hin, dass YmoA in der Zelle hauptsächlich als Komplex mit H-NS vorliegt. Dagegen lieferte die Aufreinigung von H-NS eine distinkte Bande in Höhe von ca. 16 kDa, was dem His-markierten Protein entspricht (siehe Abb. A 19).

Da im vorherigen Abschnitt bei 37°C bereits eine Zunahme der Toxinexpression in der *ymoA*-Deletionsmutante gezeigt werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass der zur Hha-Familie gehörende Regulator die *tcaA*-Expression bei höheren Temperaturen reprimiert. Ob dabei YmoA allein oder als YmoA/H-NS-Komplex an den Promotorbereich bindet, wurde im nächsten Schritt untersucht. Dazu wurde die Bindung des aufgereinigten YmoA aus dem *E. coli*-Stamm KB3 und des isolierten Proteins aus *Y. enterocolitica* W22703 mit dem *tcaA*-Promotorbereich (500 bp vor dem Translationsstart von *tcaA*) über EMSAs analysiert. Die Inkubation des Promotorfragmentes erfolgte mit steigenden Mengen an gereinigtem YmoA bzw. putativem YmoA/H-NS-Komplex bei 4°C. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives 284 bp langes intragenisches *tcaR1*-DNA-Fragment (*tcaR1'*) hinzugegeben. Zur Kontrolle wurde ein EMSA nur mit H-NS und ein EMSA mit gleichen Mengen an H-NS und YmoA durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen EMSAs sind in Abb. 29 dargestellt.

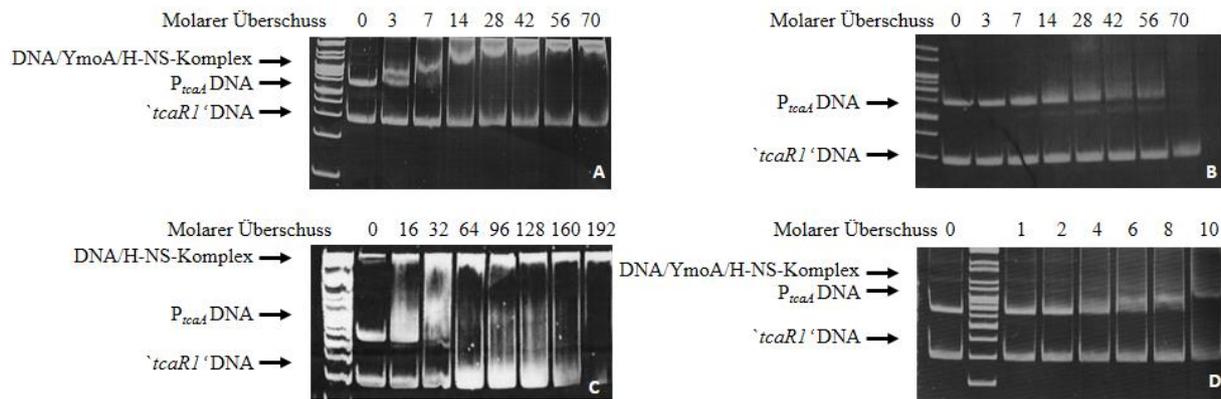


Abb. 29: Studie zur Bindung von YmoA an den Promotor von *tcaA*. EMSAs eines 500 bp langen *tcaA*-Promotorfragmentes mit steigenden Mengen an gereinigtem YmoA aus *Y. enterocolitica* W22703 (A), an isoliertem YmoA aus dem *E. coli*-Stamm KB3 (B), an H-NS (C) und gleichen Mengen von YmoA aus *E. coli* KB3 und H-NS (D). Nach erfolgter Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt.

Das gereinigte YmoA aus *Y. enterocolitica* W22703, und damit der putative YmoA/H-NS-Komplex, wies eine retardierte Bande bei einem molaren Überschuss von Protein zu DNA von 3 auf. Bei einer Erhöhung des molaren Überschusses an Protein auf 7 konnte kein freies *tcaA*-Promotorfragment mehr detektiert werden. Das isolierte YmoA aus dem *hns*- und *stpA*-defizienten *E. coli*-Stamm KB3 zeigte dagegen keine spezifische Bindung an die Promotor-DNA. Erst bei einem molaren Überschuss von Protein zu DNA von 70 verschwindet die freie *tcaA*-Promotor-DNA. Dies resultiert allerdings nicht in der Bildung eines DNA-Protein-Komplexes und deutet vielmehr auf eine unspezifische Bindung hin.

Eine Interaktion von H-NS mit der Promotor-DNA von *tcaA* sowie mit dem intragenischen Kontrollfragment konnte ebenfalls beobachtet werden (Abb. 29 C). In niedrigen molaren Verhältnissen zeigt H-NS eine spezifische Bindung an die *tcaA*-Promotorregion sowie an die Promotoren der restlichen *tc*-Gene (Abb. A 20). Bei einem hohen molaren Überschuss wird jedoch auch das Kontrollfragment unspezifisch gebunden. Wurde diese H-NS-Fraktion mit aufgereinigtem YmoA aus dem *hns*- und *stpA*-defizienten *E. coli*-Stamm KB3 in einem Verhältnis von 1:1 inkubiert, zeigte sich im anschließenden EMSA eine spezifische Bindung der *tcaA*-Promotor-DNA (Abb. 29 D). Bei einem molaren Überschuss beider Proteine gegenüber der DNA von 6 ist eine Bande, die den DNA-Protein-Komplex markiert, zu erkennen. Zwar scheint das Kontrollfragment bei einem molaren Überschuss von 10 ebenfalls gebunden zu werden, das ist aber vermutlich damit zu erklären, dass, bedingt durch die Bestimmung der Proteinkonzentration, wahrscheinlich nicht das ideale Verhältnis von YmoA zu H-NS erreicht wurde. Denkbar ist auch, dass noch freies H-NS enthalten war, welches unspezifisch an das Kontroll-Fragment gebunden hat.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass YmoA aus *Y. enterocolitica* W22703 nicht allein an DNA binden kann und eine Interaktion mit der DNA nur in Gegenwart von H-NS erfolgt. Dabei scheint YmoA die Bindung von H-NS zu modulieren.

3.5.1.4 YmoA reprimiert die Promotoraktivität von *tcaR1* und *tcaR2*

Der Einfluss von YmoA auf die Promotoraktivität von *tcaR1* und *tcaR2* wurde im nächsten Schritt untersucht. Hierzu wurden die Promotoren der beiden LysR-ähnlichen Regulatoren im Stamm W22703 $\Delta ymoA$ mit einer *luxCDABE*-Kassette fusioniert. Von den resultierenden Stämmen W22703 $\Delta ymoA$ $P_{tcaR1}::lux$ und W22703 $\Delta ymoA$ $P_{tcaR2}::lux$ wurden Expressionsprofile durch Messung der OD_{600} und der Biolumineszenz bei 15°C und 37°C aufgenommen. Da die Deletion von *ymoA* bei 37°C zu einer deutlich erhöhten Promotoraktivität führte, wurden die Daten über eine Komplementierung mit pBAD-*ymoA* validiert. Die Ergebnisse hierzu sind Abb. 30 zu entnehmen.

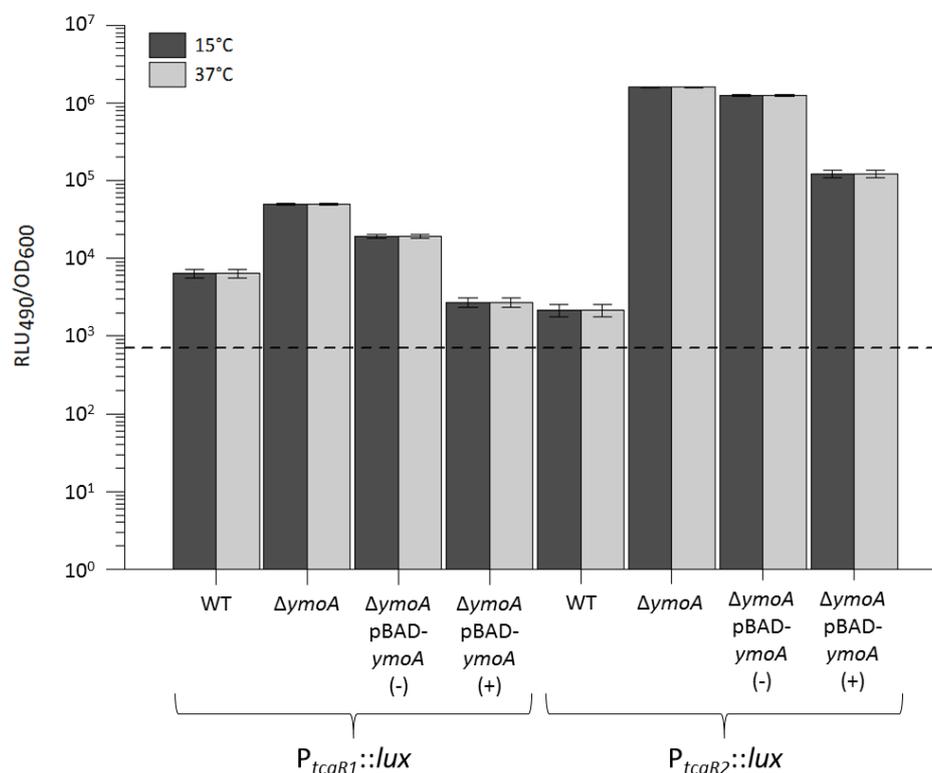


Abb. 30: Einfluss von YmoA auf die Promotoraktivität von *tcaR1* und *tcaR2* bei 15°C und 37°C. Die Biolumineszenz und optische Dichte der einzelnen Stämme wurde in LB-Medium mit (+) oder ohne (-) Zusatz von 0,2% Arabinose bei 15°C und 37°C gemessen. Die Zugabe der Arabinose erfolgte in der exponentiellen Phase bei einer OD_{600} von 0,3. Dargestellt ist die maximale Expression in der späten exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,8$). Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung.

Wie aus Abb. 30 ersichtlich ist, führt die Deletion von *ymoA* bei beiden Temperaturen zu einer deutlichen Erhöhung der Promotoraktivität der beiden LysR-ähnlichen Regulatoren. Bei 37°C steigt die *tcaR2*-Promotoraktivität in der *ymoA*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp nahezu um das 90-fache an, bei 15°C sogar um mehr als das 700-fache. Diese extreme Steigerung bei 15°C ist vermutlich auf die positive Autoregulation des Transkriptionsfaktors zurückzuführen. Bei 37°C zeigt sich wahrscheinlich die Instabilität von TcaR2 (3.4.6), weshalb hier die Deletion von *ymoA* einen geringeren

Einfluss auf die Promotoraktivität ausübt. Die Komplementation mit pBAD-*ymoA* in dem Stamm W22703 $\Delta ymoA$ $P_{tcaR2}::lux$ führt bei 37°C zur Wiederherstellung der wildtypischen *tcaR2*-Expression. Bei 15°C geht die Promotoraktivität des Regulators mit der Einführung von *ymoA* zwar stark zurück, ist mit $1,2 \times 10^5$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ aber immer noch um ca. das 60-fache höher als im Wildtyp ($2,3 \times 10^3$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀). Bei 15°C hatte die Deletion des Modulators YmoA keinen signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivität von *tcaR1*. Bei 37°C führte die Deletion dagegen zu einer ca. 30-fach gesteigerten Aktivität. Die Komplementation mit Hilfe des Arabinose-induzierbaren Überexpressionsvektors pBAD-*ymoA* stellte wieder die wildtypische *tcaR1*-Expression her.

In diesem Abschnitt konnte der Einfluss von YmoA auf die Promotoraktivität von *tcaR1* und *tcaR2* gezeigt werden. Die Deletion von *ymoA* führt bei 37°C zu einer Erhöhung der Promotoraktivität der beiden LysR-ähnlichen Regulatoren. Diese Daten deuten auf eine repressorische Funktion von YmoA bei 37°C hin.

Die gezeigte repressorische Funktion von YmoA auf die Promotoren von *tcaR1* und *tcaR2* sollte im nächsten Schritt mittels EMSAs validiert werden. Hierzu wurden die Promotoren mit steigenden Konzentrationen von gereinigtem YmoA/H-NS für 45 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Banden durch eine Färbung im GelRed-Bad sichtbar gemacht. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives intragenisches *tcaR1*-DNA-Fragment hinzugegeben.

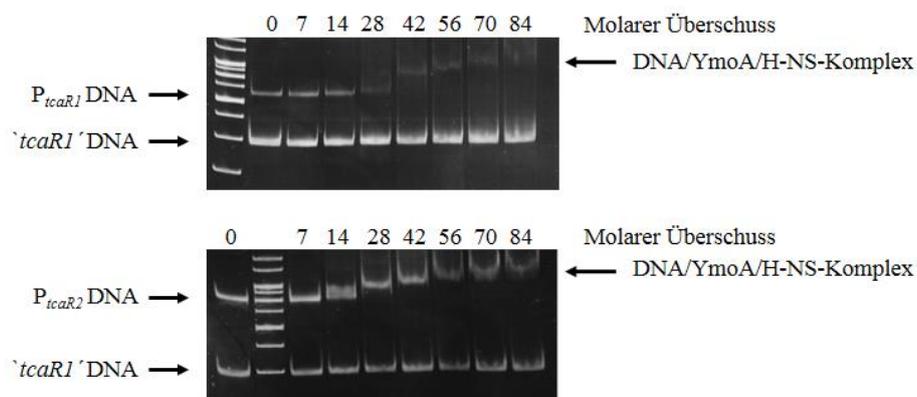


Abb. 31: Bindung von YmoA an die Promotoren von *tcaR1* und *tcaR2*. Es wurden EMSAs mit einem 500 bp langen *tcaR1*- bzw. *tcaR2*-Promotorfragment mit steigenden Mengen an gereinigtem YmoA/H-NS bei 4°C durchgeführt. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives intragenisches *tcaR1*-DNA-Fragment (*tcaR1'*) hinzugegeben. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt und die Banden durch eine Färbung im GelRed-Bad sichtbar gemacht.

Für die beiden Promotoren von *tcaR1* und *tcaR2* wurde eine Bindung durch den YmoA/H-NS-Komplex im EMSA beobachtet (Abb. 31). Bei einem molaren Überschuss des Proteinkomplexes zur DNA von 28 lag die komplette *tcaR2*-Promotor-DNA im gebundenen Zustand vor. Für *tcaR1* wurde erst bei einem

molaren Proteinüberschuss von 42 keine freie Promotor-DNA mehr detektiert. Der YmoA/H-NS-Komplex scheint daher eine größere Affinität gegenüber dem Promotor von *tcaR2* als zu dem von *tcaR1* aufzuweisen. Mit Hilfe der EMSAs konnte bestätigt werden, dass YmoA/H-NS an die beiden Promotoren von *tcaR1* und *tcaR2* bindet und dabei vermutlich als deren Repressor bei 37°C fungiert.

3.5.1.5 YmoA reprimiert die Expression aller *tc*-Gene sowie von *tccC2*

Unter 3.5.1.3 konnte eine Bindung des YmoA/H-NS-Komplexes an den Promotor von *tcaA* gezeigt werden. Zur Validierung dieses Ergebnisses wurde als nächstes der Einfluss der *ymoA*-Deletion auf die Promotoraktivität von *tcaA* untersucht. Darüber hinaus wurde die Abhängigkeit der Promotoraktivität der restlichen *tc*-Gene der Tc-PAI_{ye} sowie von *tccC2* von YmoA analysiert. Hierzu wurden in den Stamm W22703 $\Delta ymoA$ jeweils die Promotoren von *tcaA*, *tcaB*, *tcaC*, *tccC1* und *tccC2* über homologe Rekombination mit einer *luxCDABE*-Kassette fusioniert. Anschließend wurde die Expression der resultierenden Stämme mit derjenigen im Wildtyp verglichen.

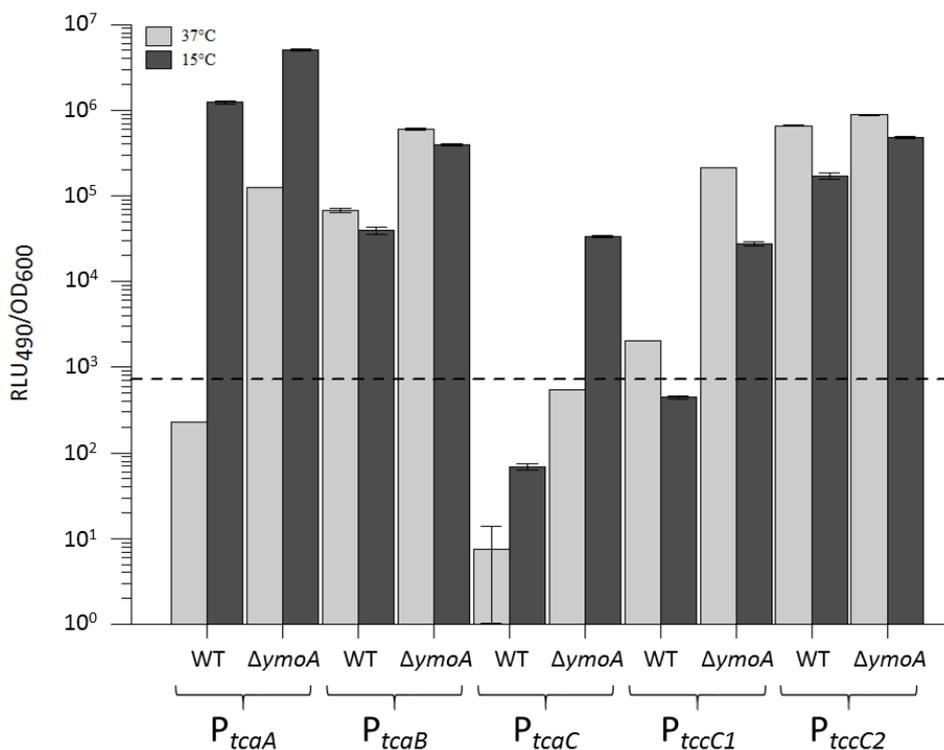


Abb. 32: Einfluss der Deletion von *ymoA* auf die Promotoraktivität der *tc*-Gene der Tc-PAI_{ye} sowie von *tccC2* bei 15°C und 37°C in LB-Medium. Dargestellt ist die maximale Expression in der späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,8). Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken symbolisieren die jeweilige Standardabweichung. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀), bestimmt durch die Messung einer S17.1 λpir pUTs-P_{tcaA}::*lux*-Kultur.

Die Deletion von *ymoA* führte in allen getesteten Konstrukten zu einer Zunahme der Biolumineszenz (Abb. 32). Insbesondere für den Promotor von *tcaA* konnte eine Steigerung der Aktivität um nahezu das 90-fache detektiert werden. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der erhöhten Expression von *tcaA* in der Transposonmutante W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA*(134)::*lux* (3.5.1.1).

Die Deletion von *ymoA* führte auch zu einem starken Anstieg der Promotoraktivität von *tcaB*. Bei beiden getesteten Temperaturen konnte eine 10-fache Zunahme der Biolumineszenz detektiert werden.

Für das unter den bisher getesteten Bedingungen nicht exprimierte Gen *tcaC* konnte nach der Deletion von *ymoA* bei 15°C erstmals eine Promotoraktivität detektiert werden. Die Lumineszenzwerte stiegen von 69 RLU₄₉₀/OD₆₀₀ im Wildtyp auf $3,4 \times 10^4$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ in der Deletionsmutante an. Bei 37°C konnte dagegen auch in dem *ymoA*-defizienten Stamm keine Biolumineszenz oberhalb des Schwellenwertes von 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀ gemessen werden.

Für das Gen *tccC1* wurde eine stark erhöhte Promotoraktivität in dem Stamm W22703 $\Delta ymoA$ P_{*tccC1*}::*lux* festgestellt. Bei 15°C nahm die Biolumineszenz im Vergleich zum Wildtyp um das ca. 60-fache zu, bei 37°C sogar um das 100-fache. Einzig der Promotor von *tccC2* zeigte keine so starke Repression durch YmoA. Bei beiden Temperaturen führte die Deletion des Repressors nur zu einer leichten Zunahme der *tccC2*-Promotoraktivität, was vermutlich damit zu begründen ist, dass der Promotor ohnehin auf einem sehr hohen Niveau exprimiert wird.

Für alle oben beschriebenen Promotoren sollte im nächsten Schritt eine Bindung des Transkriptionsfaktors mittels EMSAs bestätigt werden.

3.5.1.6 YmoA bindet an ein intragenisches *tcaA*-Fragment

Unter 3.5.1.3 wurde bereits gezeigt, dass YmoA nur mit H-NS komplexiert an DNA binden kann. In diesem Zusammenhang scheint YmoA dem Nukleoid-assoziierten Protein H-NS eine spezifische Bindung zu vermitteln. Lange Zeit war für H-NS nur bekannt, dass es bevorzugt an intrinsisch gekrümmte, AT-reiche Sequenzen bindet [Yamada *et al.*, 1990]. Erst kürzlich konnte eine spezifische Bindung an das AT-reiche (78% AT) DNA-Bindemotiv TCGATAAATT gezeigt werden [Lang *et al.*, 2007]. Daher wurde die kodierende DNA- sowie die Promotorsequenz von *tcaA* auf das Vorhandensein des H-NS-Bindemotives untersucht. Innerhalb der untersuchten Sequenz wurden vier hochkonservierte H-NS-Bindemotive gefunden. Diese sollten mit Hilfe von EMSAs bestätigt werden. Dazu wurde die Sequenz in neun Fragmente unterteilt (Abb. 33), mit denen EMSAs mit steigenden Konzentrationen an YmoA/H-NS durchgeführt wurden. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives DNA-Fragment hinzugegeben.

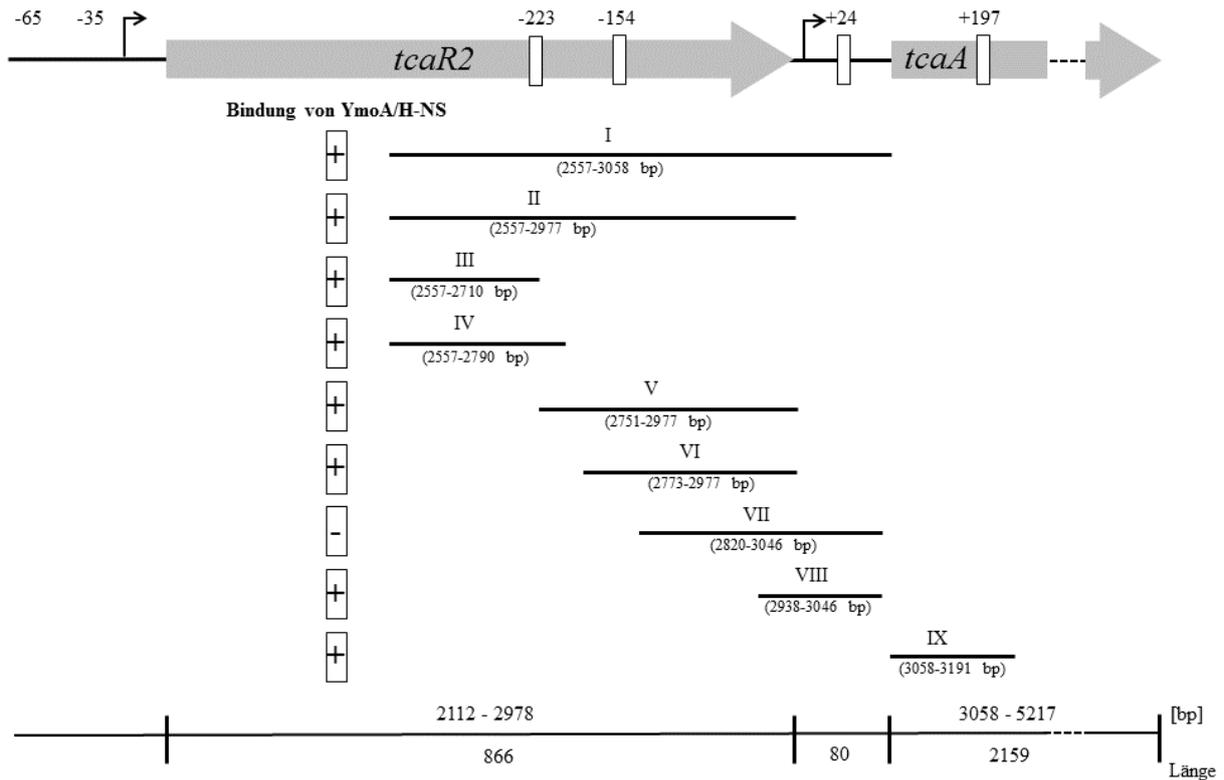


Abb. 33: Bindung von YmoA/H-NS an die DNA-Region von *tcaA*. Es wurden EMSAs mit YmoA/H-NS mit neun unterschiedlichen Fragmenten aus dem *tcaA*-Promotorbereich sowie aus der *tcaA*-kodierenden Region durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein intragenisches *tcaR1*-Fragment. Die Pfeile stellen jeweils den Transkriptionsstart von *tcaR2* und *tcaA* dar. Die mittels Clustal W prognostizierten H-NS-Bindestellen sind in Form eines Rechteckes eingezeichnet.

Für nahezu alle Fragmente konnte eine Bindung durch YmoA/H-NS beobachtet werden. Einzig Fragment VIII wurde durch den Komplex nicht gebunden (Abb. 33). Besonders auffällig ist die Bindung an das Fragment IX (*tcaA*₁₃₄, Abb. 34). Dieses liegt innerhalb der *tcaA*-kodierenden Region und wurde mit einer starken Affinität durch YmoA/H-NS gebunden. Eine Bindung durch TcaR2 konnte dagegen nicht detektiert werden (vgl. 3.3.5).

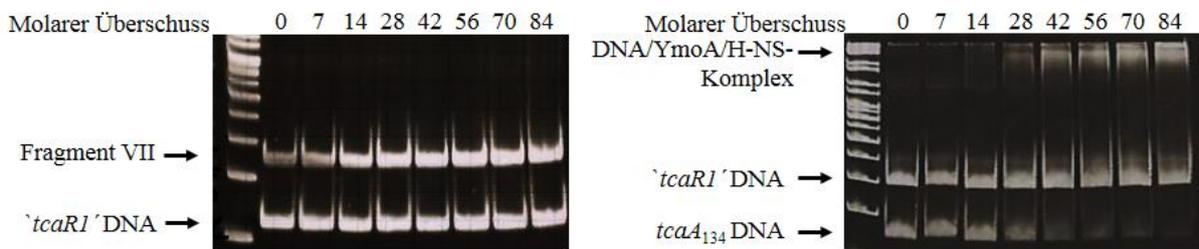


Abb. 34: Bindung von YmoA/H-NS an ein intragenisches *tcaA*-Fragment. EMSAs eines Kontroll- und eines intragenischen *tcaA*-Fragmentes (*tcaA*₁₃₄) mit steigenden Mengen an gereinigtem YmoA/H-NS. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives Fragment hinzugegeben. Nach einer 45 minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt und die DNA-Banden durch eine Färbung mit GelRed sichtbar gemacht.

In diesem Abschnitt wurden die von Clustal W vorhergesagten H-NS-Bindestellen mittels EMSAs validiert. Es wurde gezeigt, dass der YmoA/H-NS-Proteinkomplex nicht nur an den *tcaA*-Promotor, sondern auch an ein intragenisches *tcaA*-Fragment an Position +124 (ausgehend vom Translationsstart) bindet.

3.5.1.7 YmoA bindet an ein intragenisches *tcaB*-Fragment

Zur Bestätigung der *lux*-Daten, die auf eine Repression von *tcaB* durch YmoA hindeuteten (3.5.1.5), wurde die Bindung von YmoA/H-NS an den Promotor von *tcaB* mittels EMSAs näher untersucht. Neben dem Promotorbereich wurde ebenfalls die Bindung des YmoA/H-NS-Komplexes an zwei intragenische *tcaB*-Fragmente (*tcaB*₁₁₀ und *tcaB*₁₆₂) untersucht, da mittels Clustal W, ausgehend vom Translationsstart an Position +130, eine hochkonservierte H-NS-Bindestelle vorhergesagt wurde. Die EMSAs zu diesem Versuch sind in Abb. 35 dargestellt.

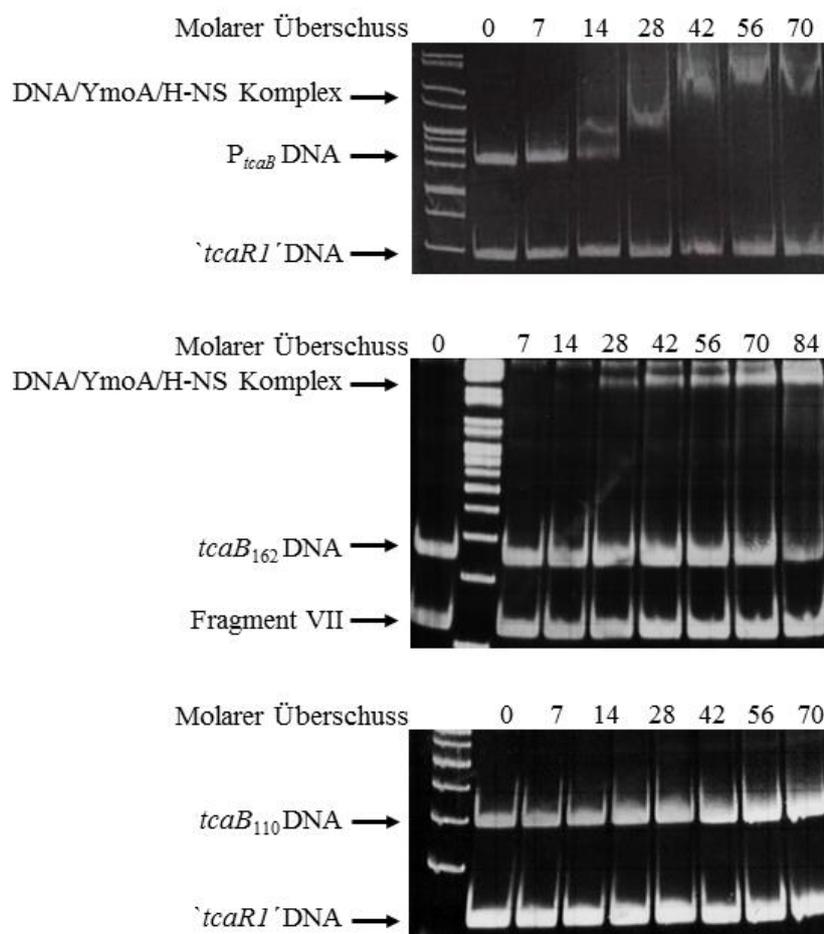


Abb. 35: Bindung von YmoA/H-NS an den Promotor von *tcaB* sowie an ein intragenisches *tcaB*-Fragment. Es wurden EMSAs mit einem 500 bp langen *tcaB*-Promotorfragment sowie zwei intragenischen *tcaB*-Fragmenten (*tcaB*₁₁₀ und *tcaB*₁₆₂) mit steigenden Mengen an gereinigtem YmoA/H-NS bei 4°C durchgeführt. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives Fragment ('*tcaR1*' bzw. Fragment VII) hinzugegeben. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt und anschließend die DNA-Banden durch Färbung mit GelRed sichtbar gemacht.

Für den Promotorbereich von *tcaB* wurde eine Bindung durch YmoA/H-NS beobachtet. Bei einem 28-fachen molaren Überschuss des Proteinkomplexes gegenüber der DNA wurde keine freie *tcaB*-Promotor-DNA mehr detektiert. Da mittels Clustal W eine hochkonservierte H-NS-Bindestelle an Position +130 (ausgehend vom Translationsstart) vorhergesagt wurde, wurden EMSAs mit zwei intragenischen *tcaB*-Fragmenten durchgeführt. Für das erste *tcaB*-Fragment, das die ersten 110 bp der kodierenden Region von *tcaB* umfasst, konnte keine Bindung durch YmoA/H-NS beobachtet werden. Für das zweite *tcaB*-Fragment, welches die ersten 162 bp der kodierenden Region von *tcaB* umfasst und damit die vorhergesagte H-NS-Bindestelle enthält, wurde eine Bindung durch YmoA/H-NS im EMSA detektiert. Diese Bindung fällt im Vergleich zu der des *tcaB*-Promotors schwächer aus. Bei der höchsten eingesetzten Menge an YmoA/H-NS, einem molaren Überschuss von 84, konnte noch ungebundene DNA detektiert werden.

Mit Hilfe von Reporterfusionen und EMSAs konnte bewiesen werden, dass die Transkription von *tcaB* durch YmoA/H-NS reprimiert wird. Hierbei bindet der repressorische Komplex sowohl im Promotorbereich von *tcaB* als auch intragenisch. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Transkription von *tcaB* nur bei Temperaturen unter 37°C stattfindet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die beiden insektiziden Gene *tcaA* und *tcaB* in ähnlicher Weise reguliert werden.

3.5.1.8 YmoA bindet an die Promotoren von *tcaC*, *tccC1* und *tccC2*

Die Bindung des YmoA/H-NS-Komplexes an die Promotoren von *tcaC*, *tccC1* und *tccC2* wurde ebenfalls mit Hilfe von EMSAs untersucht. Hierzu wurden 500 bp-Fragmente oberhalb des Translationsstartes des jeweiligen Genes mittels PCR amplifiziert und mit steigenden Mengen an YmoA/H-NS inkubiert. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives DNA-Fragment zugegeben.

Die Bindung des YmoA/H-NS-Komplexes an die Promotoren von *tcaC* und *tccC1* konnte bestätigt werden (Abb. 36). Darüber hinaus wurde eine Interaktion mit dem *tccC2*-Promotor beobachtet. Bei einem molaren Überschuss von Protein zu DNA von 56 konnte in allen drei EMSAs keine freie Promotor-DNA mehr detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass YmoA/H-NS die drei Promotoren mit einer vergleichbaren Affinität bindet.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus YmoA/H-NS an alle Promotoren der *tc*-Gene der insektiziden Pathogenitätsinsel Tc-PAI_{ye} sowie an *tccC2* bindet und dadurch die Expression dieser vor allem bei 37°C reprimiert. Darüber hinaus führte die Deletion von *ymoA* erstmals zu einer messbaren Promotoraktivität von *tcaC* und *tccC1*.

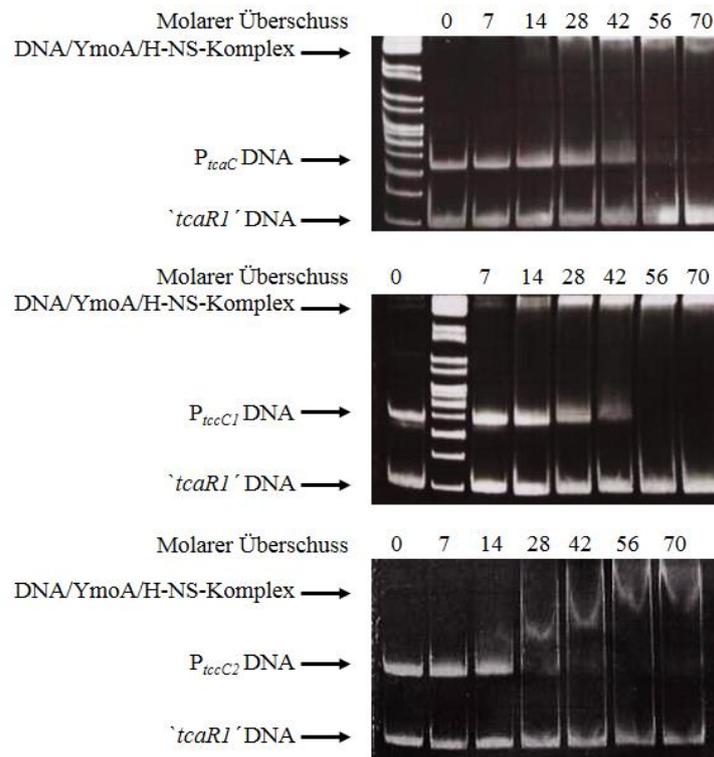


Abb. 36: Bindung von YmoA/H-NS an die Promotoren von *tcaC*, *tccC1* und *tccC2*. Es wurden EMSAs mit 500 bp langen Promotorfragmenten von *tcaC*, *tccC1* und *tccC2* mit steigenden Mengen an gereinigtem YmoA/H-NS bei 4°C durchgeführt. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives DNA-Fragment (*tcaR1'*) hinzugegeben. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt und die DNA-Banden mittels GelRed angefärbt.

3.5.1.9 Mechanismus zur YmoA/H-NS-abhängigen *tcaA*-Repression bei 37°C

Im klassischen Modell der Genrepression durch H-NS bindet das Nukleoid-assoziierte Protein oberhalb vom Promotor an eine gekrümmte, AT-reiche DNA-Sequenz. Durch die Wechselwirkung des gebundenen H-NS mit DNA unterhalb des Promotors bildet sich eine DNA-H-NS-DNA-Brücke aus. In der DNA-Schleife wird die RNA-Polymerase am Promotor eingeschlossen und die Transkription auf einer frühen Stufe gehemmt [Dorman, 2007]. Die Aufhebung der Blockade geschieht oftmals durch die Bindung eines Transkriptionsfaktors im Bereich des Promotors, wodurch der H-NS-DNA-Komplex aufgehoben wird [Lithgow *et al.*, 2007].

Ob dieses klassische Repressionsmodell von H-NS auch auf die *tcaA*-Repression bei 37°C zutrifft, wurde als nächstes untersucht. Hierzu wurde die Expression des Toxingenes in den Stämmen W22703 *P_{tcaA}::lux* und W22703 *tcaA(134)::lux* sowie in den jeweiligen *ymoA*-Deletionsmutanten bei TcaR2-Überproduktion getestet. In der *tcaA*-Promotorfusionsmutante sind die beiden YmoA/H-NS-Bindestellen an den Positionen -49 und +125 (ausgehend vom *tcaA*-Translationsstart) durch die Integration der *luxCDABE*-Kassette (Position -1) voneinander getrennt. Die Bildung einer DNA-Schleife, in der die RNA-Polymerase eingeschlossen ist, wird dadurch verhindert. In der Transposonmutante W22703 *tcaA(134)::lux* befindet sich das Reportergen an Position +134 und damit hinter den beiden

H-NS-Bindestellen, welche somit funktional bleiben. Eine Überproduktion von TcaR2 dürfte daher bei 37°C zu keiner signifikanten *tcaA*-Expression führen. Die Ergebnisse zu diesen Überlegungen finden sich in nachfolgender Tabelle.

Tab. 13: Einfluss der TcaR2-Überproduktion auf die *tcaA*-Expression in Gegenwart und Abwesenheit des Repressors YmoA in LB-Medium bei 15°C und 37°C. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,8$) und stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (STABW) aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. (+) pBAD-*tcaR2*. Die Induktion erfolgte durch den Zusatz von 0,2% Arabinose ins Medium. U.S.= unterhalb des Schwellenwertes für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀)

Stamm	15°C		37°C	
	RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]	cRLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]
W22703 <i>P_{tcaA}::lux</i>	1,2 x 10 ⁶	4,2	u.S.	
W22703 <i>P_{tcaA}::lux (+)</i>	2,7 x 10 ⁶	4,4	2,4 x 10 ⁶	0,9
W22703 $\Delta ymoA$ <i>P_{tcaA}::lux</i>	5,0 x 10 ⁶	2,8	1,3 x 10 ⁵	6,8
W22703 $\Delta ymoA$ <i>P_{tcaA}::lux (+)</i>	1,5 x 10 ⁵	8,9	8,4 x 10 ⁶	11,1
W22703 <i>tcaA(134)::lux</i>	1,4 x 10 ⁶	1,8	u.S.	
W22703 <i>tcaA(134)::lux (+)</i>	1,2 x 10 ⁶	5,5	3,7 x 10 ³	9,9
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA(134)::lux</i>	4,3 x 10 ⁶	2,5	3,0 x 10 ³	30,2
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA(134)::lux (+)</i>	5,8 x 10 ⁶	3,1	3,7 x 10 ⁶	6,9

Alle in Tab. 13 getesteten Stämme wiesen bei 15°C vergleichbare Lumineszenzwerte im Bereich von 1,5 x 10⁵ bis 5,8 x 10⁶ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ auf. Eine Überproduktion von TcaR2 bzw. die Deletion von *ymoA* hatte bei dieser Temperatur keinen signifikanten Einfluss auf die *tcaA*-(Promotor-)Aktivität. Dagegen führte die Überproduktion von TcaR2 in dem Stamm W22703 *P_{tcaA}::lux* bei 37°C zu einer deutlichen Zunahme der Toxin-Promotoraktivität. Die Biolumineszenzwerte stiegen nach der TcaR2-Synthese von 2,3 x 10² RLU₄₉₀/OD₆₀₀ auf 2,4 x 10⁵ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ an. Dies entspricht einer Zunahme um den Faktor 1.000. Im Gegensatz dazu führte eine Überproduktion von TcaR2 im Stamm W22703 *tcaA(134)::lux* zu keiner erhöhten *tcaA*-Expression. Trotz induzierbarer Promotoraktivität des Toxingenes durch den LysR-ähnlichen Regulator ist in diesem Konstrukt die *tcaA*-Transkription bei 37°C reprimiert. Die Deletion von *ymoA* hebt diese Repression zum Teil auf. Die Werte stiegen von 610 RLU₄₉₀/OD₆₀₀ im Stamm W22703 *tcaA(134)::lux* auf 3,7 x 10³ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ im Stamm W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA(134)::lux* an. Eine komplette Aufhebung der *tcaA*-Repression bei 37°C wurde jedoch erst durch eine TcaR2-Überproduktion im Stamm W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA(134)::lux* erreicht. Mit 3,7 x 10⁶ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ wurden Lumineszenzwerte detektiert, welche vergleichbar mit denen bei 15°C sind (Abb. 37).

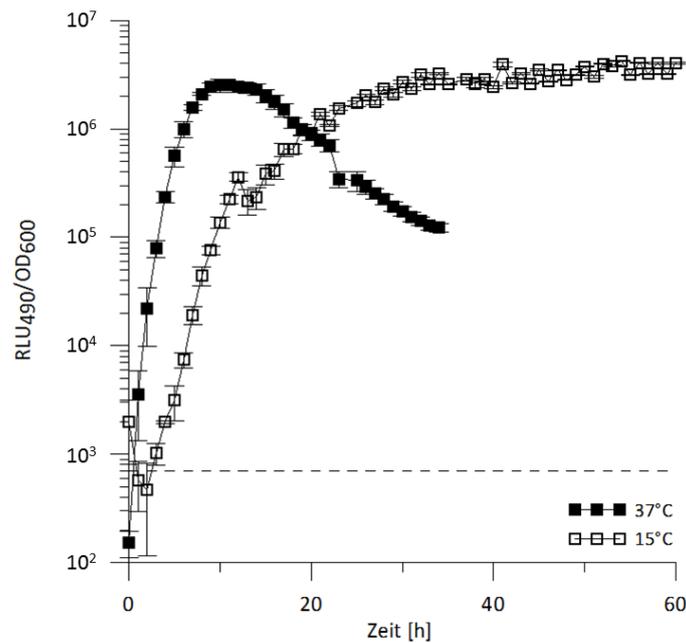


Abb. 37: Indirekter Hinweis auf die TcaR2-Stabilität bei 37°C. Die Biolumineszenz sowie optische Dichte des Stammes W22703 $\Delta ymoA tcaA(134)::lux$ pBAD-*tcaR2* wurde bei 15°C und 37°C in LB-Medium mit Zusatz von 0,2% Arabinose gemessen. Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken symbolisieren die jeweilige Standardabweichung. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀) bestimmt durch die Messung einer S17.1 λ_{pir} pUTs-P_{tcaA}::*lux*-Kultur.

Bei 15°C beginnt die *tcaA*-Expression in der exponentiellen Phase, erreicht im Übergang zur stationären Phase ihren Maximalwert und hält diesen über Stunden hinweg stabil (Abb. 37). Bei 37°C wird eine solche Genexpression nur durch die Deletion von *ymoA* und einer gleichzeitigen TcaR2-Überproduktion erreicht. Die Synthese von TcaR2 wird durch Zugabe von 0,2% Arabinose ins Medium gestartet. Nach Erreichen des Maximalwertes bei einer OD₆₀₀ von 0,8 fällt die Expression von *tcaA* rapide ab, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keine Zelllyse eingesetzt hat. Dies ist vermutlich durch das vollständige Verwerten der Arabinose, und damit der fehlenden Nachproduktion von TcaR2, zu erklären. Obwohl TcaR2 autoreguliert ist, reicht dessen Stabilität scheinbar nicht aus, um eine weitere Toxinproduktion bei 37°C zu gewährleisten.

In diesem Abschnitt wurde eine vollständige Aufhebung der *tcaA*-Repression bei 37°C erreicht. Durch die Deletion von *ymoA* und der gleichzeitigen Überproduktion von TcaR2 wurde erstmals eine *tcaA*-Expression bei Körpertemperatur beobachtet. Bei der Repression der *tcaA*-Transkription bei 37°C spielen sowohl die Instabilität des Induktors als auch das Vorhandensein des repressorischen YmoA/H-NS-Komplexes sowie dessen Bindestellen eine entscheidende Rolle.

3.5.1.10 YmoA ist thermostabil

In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass der YmoA/H-NS-Komplex durch Bindung ober- und unterhalb vom *tcaA*-Promotor eine Toxinexpression bei 37°C verhindert. Daher stellte sich als nächstes die Frage, wie die Repression von YmoA bei 15°C überwunden werden kann. Hierzu gab es folgende drei Möglichkeiten: 1.) Die Menge von funktionalem YmoA/H-NS ist bei 15°C geringer als bei 37°C. 2.) Der Komplex von YmoA/H-NS zeigt bei niedrigeren Temperaturen eine geringere Stabilität. 3.) TcaR2 ist bei 15°C in der Lage, den YmoA/H-NS-Komplex zu verdrängen.

Zur Beantwortung oben genannter Fragestellung wurde zunächst die Menge an YmoA bei 15°C und 37°C in verschiedenen Wachstumsphasen bestimmt. Hierzu wurden jeweils drei *Y. enterocolitica* W22703-Kulturen bei 15°C und 37°C angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 1,4 und 2,8 wurden jeweils 1 ml Probe entnommen, auf eine gleiche Zellzahl eingestellt und für 1 min bei 13,200 rpm und RT zentrifugiert. Die Proben wurden im Western Blot unter Verwendung eines polyklonalen Anti-YmoA-Antikörpers und eines AP-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpers analysiert.

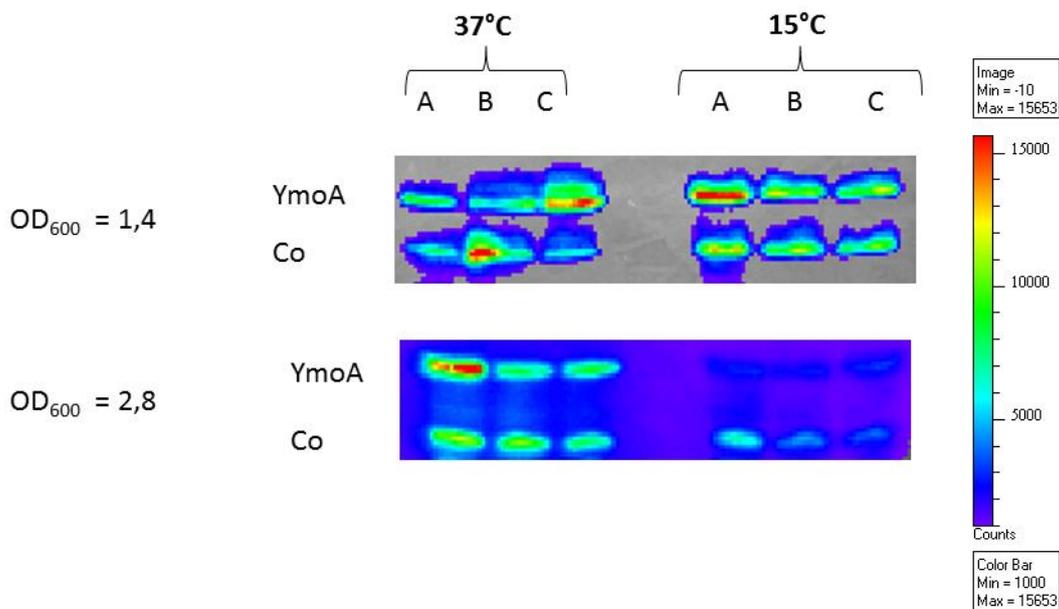


Abb. 38: Menge von YmoA in *Y. enterocolitica* W22703 während verschiedener Wachstumsphasen bei 15°C und 37°C. Die Menge von YmoA bei 15°C und 37°C in der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 1,4) und im Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase (OD₆₀₀ = 2,8) wurde mittels Western Blot bestimmt. Hierzu wurden ein polyklonaler Anti-YmoA-Antikörper und ein AP-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Funktion ROI des Programmes *Living Image*TM V. 4.01 (Igor Pro). Co = Kontrolle (ein durch den Anti-YmoA-Antikörper unspezifisch detektiertes Protein wurde als Ladekontrolle genutzt).

Die Menge an YmoA war in der exponentiellen Phase bei beiden getesteten Temperaturen nahezu identisch (Abb. 38). Dies ändert sich jedoch im Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase ($OD_{600} = 2,8$). Zu diesem Zeitpunkt wurde bei 37°C ein stärkeres Signal detektiert als bei 15°C. Die Quantifizierung mit Hilfe der Funktion ROI des Programmes *Living Image*TM V. 4.01 ergab, dass in dieser Wachstumsphase eine 4-fach höhere Konzentration von YmoA bei 37°C als bei 15°C vorliegt.

Als nächstes wurde daher die Proteinstabilität von YmoA bei beiden Temperaturen untersucht. Hierzu wurde eine *Y. enterocolitica* W22703-Kultur bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 1,0 angezogen. Der Kultur wurde zur Inhibierung des Translationsapparates 40 µg/ml Chloramphenicol hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz auf zwei Schottflaschen verteilt, von denen eine bei 15°C und die andere bei 37°C inkubiert wurde. Zu definierten Zeitpunkten, nämlich 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 240 min nach der Translationsinhibierung, wurden jeweils 1 ml entnommen, auf eine gleiche Zellzahl eingestellt und für den Western Blot vorbereitet. Als Kontrolle wurden Proben mitgeführt, denen kein Chloramphenicol hinzugegeben wurde. Die Analyse der Proteinstabilität von YmoA erfolgte im Western Blot unter Verwendung eines polyklonalen Anti-YmoA-Antikörpers sowie eines AP-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpers.

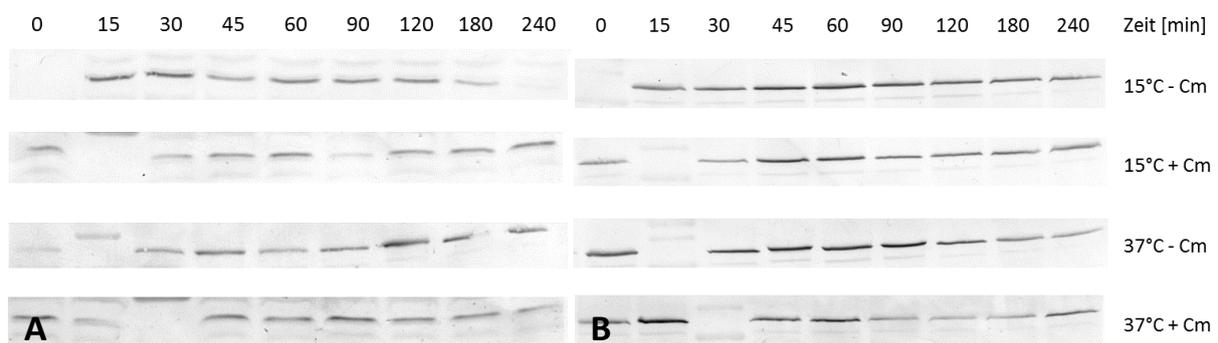


Abb. 39: Stabilität von YmoA bei 15°C und 37°C. Eine Kultur von *Y. enterocolitica* W22703 wurde bei 30°C und 180 UpM inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{600} von 1,0 wurde die Kultur mit 40 µg/ml Chloramphenicol (+ Cm) versetzt, in zwei Aliquots aufgeteilt und anschließend bei 15°C oder 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Menge an YmoA mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-YmoA-Antikörpers als Primärantikörper bestimmt. Als Kontrolle dienten Proben bei denen die Proteintranslation nicht inhibiert wurde (-Cm). Für jeden Ansatz ist ein repräsentativer Blot dargestellt. A) Detektierte Menge an YmoA. B) Kontrolle zur aufgetragenen Proteinmenge (ein durch den Primärantikörper unspezifisch detektiertes Protein).

Wie aus Abb. 39 A hervorgeht, konnte in allen Proben YmoA detektiert werden. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede in den Bandenintensitäten der einzelnen Versuchsansätze beobachtet. Die Kontrollansätze bei 15°C und 37°C wiesen zu jedem Zeitpunkt eine vergleichbare Bandenintensität und damit eine vergleichbare Menge an YmoA auf. Bei den mit Chloramphenicol versetzten Proben wurde auch 180 min nach Zugabe des Antibiotikums bei beiden Temperaturen eine ähnliche Menge an YmoA detektiert. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass YmoA in *Y. enterocolitica* W22703 bei 15°C und 37°C eine vergleichbare Stabilität besitzt.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die temperaturabhängige Expression von *tcaA* erklären: Bei 37°C reprimiert der YmoA/H-NS-Komplex die Transkription des Toxingenes durch die Bindung an den Promotor sowie an einen intragenischen Bereich. Dadurch kommt es vermutlich zur Ausbildung einer DNA-Schleife, in der die RNA-Polymerase gefangen ist und die Transkription wird auf einem frühen Level verhindert. Bei 15°C wird die Repression durch eine höhere Stabilität des autoregulierten Induktors TcaR2 sowie eine verminderte Anwesenheit des Repressors YmoA aufgehoben und das Toxin produziert. Ob TcaR2 dabei in der Lage ist, den Komplex aus YmoA und H-NS zu verdrängen, wurde im nächsten Schritt untersucht. Hierzu wurde *tcaR2* in den Expressionsvektor pACYC184 kloniert. Nach Einbringen des Plasmides in den Stamm W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA*(134)::*lux* stieg die Biolumineszenz bei 37°C von $3,1 \times 10^2$ auf $5,4 \times 10^5$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ und bei 15°C von $1,4 \times 10^6$ auf $4,3 \times 10^6$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ (Tab. 14) an. Dadurch konnte eine Funktionalität des Vektors gezeigt werden. Anschließend wurde das Plasmid pBAD-*ymoA* in diesen Stamm transformiert und es wurden Expressionsprofile bei 15°C und 37°C in Gegenwart oder Abwesenheit von Arabinose erstellt.

Tab. 14: YmoA/H-NS zeigt bei 15°C eine verminderte Funktionalität. Die Biolumineszenz und optische Dichte der einzelnen Stämme wurde in LB-Medium mit (+) oder ohne (-) Zusatz von 0,2% Arabinose bei 15°C und 37°C gemessen. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,8) und stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (STABW) aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. U.S.: unterhalb des Schwellenwertes für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀)

Stamm	15°C		37°C	
	RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]	RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]
W22703 <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$1,4 \times 10^6$	1,8	u.S.	
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$4,3 \times 10^6$	2,5	$1,5 \times 10^4$	30,2
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pACYC- <i>tcaR2</i>	$5,4 \times 10^6$	5,3	$5,4 \times 10^5$	20,5
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pACYC- <i>tcaR2</i> pBAD/HisA (Tet ^R) (+)	$8,3 \times 10^6$	2,8	$1,7 \times 10^5$	3,9
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pACYC- <i>tcaR2</i> pBAD- <i>ymoA</i> (-)	$3,6 \times 10^6$	4,8	$7,2 \times 10^5$	7,0
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pACYC- <i>tcaR2</i> pBAD- <i>ymoA</i> (+)	$6,2 \times 10^6$	2,0	$1,3 \times 10^3$	9,8

Trotz konstanter TcaR2-Synthese durch den Vektor pACYC-*tcaR2* ging die Biolumineszenz des Stammes W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA*(134)::*lux* pACYC-*tcaR2* pBAD-*ymoA* nach Induktion der YmoA-Produktion bei 37°C von $1,7 \times 10^5$ RLU₄₉₀/OD₆₀₀ auf nahezu den Schwellenwert zurück. Bei 15°C konnte ein solches Phänomen dagegen nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TcaR2 bei 37°C nicht in der Lage ist, den repressorischen YmoA/H-NS-Komplex zu verdrängen. Dagegen scheint YmoA/H-NS bei niedrigen Temperaturen nicht in der Lage zu sein, die durch den autoregulierten Transkriptionsfaktor TcaR2 induzierte Toxinexpression zu reprimieren.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass YmoA zusammen mit H-NS für die Repression der *tc*-Gene bei 37°C verantwortlich ist. Bei dieser Temperatur dominiert es über den Regulator TcaR2. Nimmt die Temperatur dagegen ab, steigt die Menge an autoreguliertem TcaR2, während gleichzeitig die Funktionalität von YmoA/H-NS absinkt. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes der beiden Antagonisten YmoA/H-NS und TcaR2 zu Gunsten des Aktivators.

3.5.2 Die *Quorum sensing*-Systeme LuxS und YenI

Wie unter 3.5 bereits gezeigt werden konnte, führte die Deletion des Genes *luxS* zu einer leichten Zunahme der *tcaA*-Expression oberhalb des Schwellenwertes von 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀.

Unter dem Begriff *Quorum sensing* wird die Fähigkeit von Bakterien verstanden, über chemische Signalmoleküle, sogenannten Autoinduktoren, die Zelldichte der Population messen zu können. Dadurch werden Prozesse kontrolliert, die ineffizient wären, würden sie nur von einzelnen Zellen durchgeführt. Außerdem erlaubt dieses System den Zellen bestimmte Gene nur dann zu aktivieren, wenn eine gewisse Zelldichte über- oder unterschritten wird. [Miller *et al.*, 2001]

Y. enterocolitica verfügt über zwei *Quorum sensing*-Systeme: einen Homoserin-Lakton-Autoinducer (Autoinducer 1, AI-1), welcher von *yenI* kodiert wird, und einen Furanosyl-Borat-Diester (Autoinducer 2, AI-2), welcher durch *luxS* kodiert wird [Atkinson *et al.*, 2006a; Atkinson *et al.*, 2006b]. Inwiefern diese beiden Systeme *in vitro* in der Expression des insektiziden Toxin-Komplexes beteiligt sind, wurde im nachfolgenden Abschnitt untersucht.

3.5.2.1 Die Expression von *tcaR2* ist *Quorum sensing*-abhängig

Die beiden Gene *luxS* und *yenI*, welche für *Quorum sensing*-Synthesen kodieren, wurden in dem *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 mittels Deletion bzw. Insertion ausgeschaltet. In den resultierenden Stämmen W22703 Δ *luxS* und W22703 *yenI*::Kan^R wurde der Promotor von *tcaR1* bzw. *tcaR2* mit einem *luxCDABE*-Reportergen fusioniert. Anschließend wurden von den Stämmen Expressionsprofile durch Messung der optischen Dichte und Biolumineszenz bei 15°C und 37°C erstellt. Die Ergebnisse hierzu sind in Tab. 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Einfluss der beiden *Quorum sensing*-Synthasen *YenI* und *LuxS* auf die Promotoraktivität von *tcaR1* und *tcaR2* in LB-Medium bei 15°C und 37°C. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,8) und stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (STABW) aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar.

Stamm	15°C		37°C	
	RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]	cRLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]
W22703 P _{tcaR1} :: <i>lux</i>	7,1 x 10 ³	11,0	9,0 x 10 ³	13,3
W22703 Δ <i>luxS</i> P _{tcaR1} :: <i>lux</i>	6,0 x 10 ³	7,3	8,8 x 10 ³	3,9
W22703 <i>yenI</i> ::Kan ^R P _{tcaR1} :: <i>lux</i>	1,2 x 10 ⁴	3,19	1,6 x 10 ⁴	4,6
W22703 P _{tcaR2} :: <i>lux</i>	3,2 x 10 ³	4,1	6,6 x 10 ³	6,7
W22703 Δ <i>luxS</i> P _{tcaR2} :: <i>lux</i>	1,6 x 10 ⁵	4,7	1,1 x 10 ⁵	6,5
W22703 <i>yenI</i> ::Kan ^R P _{tcaR2} :: <i>lux</i>	2,7 x 10 ⁵	3,8	1,5 x 10 ⁵	5,0

Die Inaktivierung von *luxS* und *yenI* hat keinen signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivität von *tcaR1*. Die Werte liegen bei beiden Temperaturen in einem Bereich von 6,0 x 10³ bis 1,6 x 10⁴ RLU₄₉₀/OD₆₀₀. Im Gegensatz dazu führt die Deletion von *luxS* bei 37°C zu einer 20-fachen Zunahme der Promotoraktivität von *tcaR2*. Bei 15°C konnte sogar eine 50-fache Steigerung der Biolumineszenz detektiert werden. *YenI* hatte einen vergleichbaren Einfluss auf die *tcaR2*-Promotoraktivität. Die Expression von *tcaR2* scheint somit abhängig vom *Quorum sensing*, und damit von der Zelldichte, zu sein.

3.5.2.2 Die externe Zugabe von HSL-Molekülen hat keinen Einfluss auf die *tcaA*-Expression

Es ist bekannt, dass *Y. enterocolitica* die beiden HSL-Moleküle 3-oxo-Hexanoyl- (3-oxo-C6-HSL) und N-Hexanoyl-HSL (C6-HSL) produziert [Atkinson *et al.*, 2006b]. Darüber hinaus weist der Stamm W22703 ein *luxS*-Ortholog auf, verfügt also auch über die Fähigkeit zur Produktion von Autoinducer 2 (AI-2). Zur Bestärkung der Ergebnisse aus dem Abschnitt 3.5.2.1 wurde die Promotoraktivität von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* nach externer Zugabe von HSL-Molekülen untersucht. Dabei ist die genaue physiologische Konzentration der Autoinducer nicht bekannt. Generell lässt sich jedoch festhalten, dass die Konzentration an produzierten HSL fast ausschließlich im unteren bis mittleren μM-Bereich liegt [Yates *et al.*, 2002]. Allerdings erfolgt die Induktion bestimmter Enzyme *in vitro* bereits in sehr viel geringeren Konzentrationen (nM). Daher wurden in vorliegender Arbeit verschiedene Konzentrationen (100 nM, 10 μM und 100 μM) von C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL und einem Gemisch beider getestet.

Tab. 16: Gemittelte RLU der Promotoraktivitäten von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* nach Zugabe von HSL-Molekülen bei 15°C und 37°C. Die Zugabe der HSL-Moleküle (Endkonzentration: 10 µM) erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,3. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,8) und stellen Mittelwerte aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. Die Standardabweichung lag in allen Fällen bei ±5%. K = Kontrolle, MeOH = Zugabe von 2% Methanol, Mix = Zugabe von je 10 µM C6-HSL und 3-oxo-C6-HSL. [Hellinckx, 2012]

15°C						
RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀						
Stamm	K	MeOH	3-oxo-C6-HSL	C6-HSL	Mix	
W22703 P _{tcaR1} ::lux	7,2 x 10 ³	7,8 x 10 ³	7,2 x 10 ³	8,0 x 10 ³	7,5 x 10 ³	
W22703 P _{tcaR2} ::lux	5,2 x 10 ³	5,7 x 10 ³	7,2 x 10 ³	6,1 x 10 ³	7,8 x 10 ³	
W22703 P _{tcaA} ::lux	2,1 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	
37°C						
RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀						
Stamm	K	MeOH	3-oxo-C6-HSL	C6-HSL	Mix	
W22703 P _{tcaR1} ::lux	8,7 x 10 ³	8,9 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴	9,2 x 10 ³	
W22703 P _{tcaR2} ::lux	7,6 x 10 ³	6,5 x 10 ³	6,4 x 10 ³	7,7 x 10 ³	8,3 x 10 ³	
W22703 P _{tcaA} ::lux	6,4 x 10 ²	5,7 x 10 ²	4,8 x 10 ²	4,6 x 10 ²	4,4 x 10 ²	

Wie aus Tab. 16 hervorgeht, konnte für keinen der drei getesteten Promotoren eine Änderung der Biolumineszenzwerte durch die externe Zugabe von HSL-Molekülen detektiert werden. Aufgrund dessen sollte im nächsten Schritt eine Positivkontrolle für das Testsystem etabliert werden. Hierfür wurden *luxCDABE*-Fusionen mit den Flagellengenen *fliB* und *fliF* verwendet. Diese bereits vorhandenen Konstrukte wurden eingesetzt, da in der Literatur bereits gezeigt werden konnte, dass die Beweglichkeit von *Y. enterocolitica* durch *Quorum sensing* reguliert wird [Atkinson *et al.*, 2006a]. Für die Etablierung der Positivkontrolle wurden HSL-Konzentrationen von 100 nM und 100 µM eingesetzt. Die Ergebnisse dazu sind in Tab. 17 aufgeführt.

Tab. 17: Gemittelte RLU der Expression von *fliB* und *fliF* nach Zugabe von HSL-Molekülen bei 30°C. Die Zugabe der HSL-Moleküle (Endkonzentration: 100 µM bzw. 100 nM) erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,3. Die angegebenen Werte wurden eine Stunde nach Zugabe der HSL-Moleküle bestimmt und stellen Mittelwerte aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. Die Standardabweichung lag in allen Fällen bei ±5%. K = Kontrolle, Mix = Zugabe von C6-HSL und 3-oxo-C6-HSL. [Hellinckx, 2012]

Stamm	100 µM					100 nM			
	RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀					RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀			
	K	3-oxo-C6-HSL	C6-HSL	Mix		K	3-oxo-C6-HSL	C6-HSL	Mix
W22703 <i>fliB</i> ::lux	2,6 x 10 ²	3,6 x 10 ²	4,6 x 10 ²	2,6 x 10 ²	2,4 x 10 ²	2,7 x 10 ²	1,3 x 10 ²	1,2 x 10 ²	
W22703 <i>fliF</i> ::lux	1,2 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	9,1 x 10 ³	7,9 x 10 ³	5,1 x 10 ³	4,4 x 10 ³	3,9 x 10 ³	3,3 x 10 ³	

Es konnte keine Abhängigkeit zwischen der Expression der Flagellenkonstrukte und der Anwesenheit extern hinzugegebener *Quorum sensing*-Moleküle beobachtet werden (Tab. 17). Die Biolumineszenzwerte der Kontrollen unterschieden sich kaum von denen der anderen Ansätze. Darüber hinaus wurden keine Unterschiede in der Biolumineszenz zwischen 100 nM und 100 µM eingesetztem Autoinducer detektiert.

In einem letzten Ansatz wurde die Expression der beiden Flagellenkonstrukte W22703 *fliB::lux* und W22703 *fliF::lux* in Überständen einer *Y. enterocolitica* W22703-Kultur getestet. Dazu wurde jeweils eine Kultur von *Y. enterocolitica* W22703 bei 15°C bzw. 37°C inkubiert. 50 ml des jeweiligen Ansatzes wurden in der exponentiellen Phase sowie bei Erreichen des Überganges von der exponentiellen zur stationären Phase abzentrifugiert. Die Überstände wurden sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Im nächsten Schritt wurden ÜNK der beiden Flagellenkonstrukte W22703 *fliB::lux* und W22703 *fliF::lux* abzentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde in einem der Überstände resuspendiert. Die Expression der Flagellengene wurde durch die Messung der optischen Dichte und Biolumineszenz bestimmt. Als Kontrollen dienten Kulturen, die in frischem LB-Medium resuspendiert wurden.

Tab. 18: Gemittelte RLU der Expression von *fliB* und *fliF* in Überständen einer *Y. enterocolitica*-Kultur bei 15°C und 37°C. Die verwendeten Überstände stammen von einer *Y. enterocolitica* W22703-Kultur aus der exponentiellen sowie aus dem Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase. Die angegebenen Werte sind die maximal gemessenen Biolumineszenzwerte und stellen Mittelwerte aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. Die Standardabweichung lag in allen Fällen bei ±5%. [Hellinckx, 2012]

Stamm	Überstand aus der exponentiellen Phase		Überstand aus dem Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase	
	15°C	37°C	15°C	37°C
W22703 <i>fliB::lux</i>	100	85	65	70
W22703 <i>fliF::lux</i>	105	85	73	73

Die beiden Flagellenkonstrukte W22703 *fliB::lux* und W22703 *fliF::lux* zeigten bei 15°C bzw. 37°C keine veränderte Expression in den Überständen aus den zwei verschiedenen Wachstumsphasen. Wie aus Tab. 18 hervorgeht, liegen die ermittelten Biolumineszenzwerte deutlich unter 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀, dem Schwellenwert für eine signifikante Transkriptionsaktivität. Damit befinden sich die Werte sichtlich unter denen aus Tab. 17. Die Etablierung einer Positivkontrolle für den *Quorum sensing*-Assay war somit nicht erfolgreich. Die *Quorum sensing*-abhängige Expression von *tcaR2* aus dem Abschnitt 3.5.2.1 konnte mit dieser Methode nicht bestätigt werden. In Zukunft sind daher weitere Versuche zur Bestimmung der Funktion der beiden *Quorum sensing*-Systeme in der Expression der insektiziden Proteine notwendig. Hierzu sollten zunächst höhere Konzentrationen an eingesetzten Autoinducern sowie unterschiedliche Zeitpunkte der exogenen Zugabe getestet werden. Auch ATKINSON *et al.*

konnten das Schwimm- bzw. Schwärmverhalten einer *yenI*-Deletionsmutante von *Y. enterocolitica* durch die exogene Zugabe verschiedener Signalmoleküle nicht wiederherstellen. Erst eine Plasmid-basierte Komplementation von *yenI* führte wieder zur Ausbildung des wildtypischen Phänotypen [Atkinson *et al.*, 2006a]. In zukünftigen Arbeiten sollte des Weiteren mit Hilfe von Biosensoren getestet werden, zu welchem Zeitpunkt und in welchem Ausmaß der *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 *in vitro* Autoinducer produziert. Diese bakteriellen Biosensoren produzieren selber keine Signalmoleküle, zeichnen sich aber durch eine phänotypische Nachweisreaktion in Gegenwart bestimmter Autoinducer aus. Diese Reaktion beruht auf dem Vorhandensein eines LuxR-homologen Proteins, welches bei Anwesenheit der gesuchten Signalmoleküle die Produktion eines Reportergenes wie beispielsweise *luxCDABE*-, *gfp*- oder *lacZ*, induziert [Wagner-Döbler *et al.*, 2005; Steindler *et al.*, 2007].

3.6 Charakterisierung der phagenverwandten Gene der Tc-PAI_{Ye}

Innerhalb der insektiziden Pathogenitätsinsel werden die Gene *tcaC* und *tccC1* durch vier offene Leserahmen voneinander getrennt. Diese vier ORFs kodieren für zwei phagenverwandte Proteine, vermutlich für ein Holin und Endolysin, sowie zwei putativ exportierte bzw. sekretierte Proteine [Bresolin *et al.*, 2006a]. Der evolutionäre Ursprung der Lysegene ist unbekannt. Die Anordnung entspricht jedoch einer klassischen Lysekassette, wie sie auch in Bakteriophagen zu finden ist. In ihrer Arbeit konnte REUTER zeigen, dass die phagenspezifischen Lysegene in vielen Tc-PAI hochkonserviert sind [Reuter, 2008]. Mittels Reverser Transkriptase-PCR konnte bereits belegt werden, dass die beiden putativen Gene Holin und Endolysin polycistronisch transkribiert werden und daher vermutlich einen gemeinsamen Promotor besitzen [Richter, 2008]. Da in Yersinien offenbar eine Transkription der beiden Lysegene stattfindet, wurden die phagenverwandten Gene bzw. deren Genprodukte in den nächsten Abschnitten näher charakterisiert und auf ihre Funktion hin geprüft.

3.6.1 Bioinformatische Vorhersage zu den phagenverwandten Genen

Die Lysekassette der insektiziden Pathogenitätsinsel von *Y. enterocolitica* W22703 wurde zunächst mit Hilfe einer Homologieanalyse näher charakterisiert. Mittels Nukleotid-BLAST wurde in *Y. enterocolitica* T83 (Biotyp 1A) ein Gen mit signifikanter Homologie (Identität: 77%; E-Wert: $3 \times e^{-54}$) zum putativen Holingen gefunden, welches ebenfalls in einer insektiziden PAI lokalisiert ist. Auch in anderen *Yersinia* spp. konnten Gene mit signifikanter Homologie detektiert werden, beispielsweise in *Y. pestis* (Identität: 71%; E-Wert: $6 \times e^{-26}$) und *Y. pseudotuberculosis* (Identität: 71%; E-Wert: $6 \times e^{-26}$). Diese Gene sind nicht weiter charakterisiert und lediglich als phagenspezifische Gene oder putative Holine annotiert. Auf Proteinbasis kann für das 103 AS große Protein aus *Y. enterocolitica* W22703 eine

signifikante Homologie zu dem Holin aus *Y. mollaretti* gefunden werden (Identität: 87%, E-Wert: 6×10^{-55}). Eine weitere große Ähnlichkeit findet sich zu dem Holin aus *P. luminescens* (Identität: 53%, E-Wert: 1×10^{-28}). Auffällig ist, dass die mittels BLAST gefundenen Hologene immer im Zusammenhang mit einer insektiziden Pathogenitätsinsel stehen und oftmals von einem Endolysin flankiert werden. Das 133 Aminosäure große Endolysin aus der PAI von *Y. enterocolitica* W22703 weist eine signifikante Ähnlichkeit zu einer M15-Peptidase aus *Y. pseudotuberculosis* auf (Identität: 77%, E-Wert: 1×10^{-73}). Diese als D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase klassifizierte Peptidase kann auch in anderen *Yersinia* spp., wie beispielsweise in *Y. enterocolitica* 8081 (Identität: 64%, E-Wert: 6×10^{-53}) und *Y. pestis* (Identität: 77%; E-Wert: 6×10^{-74}), gefunden werden. Hierbei ist vor allem der C-Terminus hoch konserviert. Das in *Y. enterocolitica* 8081 gefundene Endolysin wird ebenfalls von einem Holin flankiert. Dieses weist allerdings keine Ähnlichkeit zu dem Holin von *Y. enterocolitica* W22703 auf und ist auch nicht in einer Tc-PAI lokalisiert. Beide Lysegene von *Y. enterocolitica* 8081 werden noch von anderen phagenverwandten Genen flankiert. Sie sind möglicherweise Bestandteil eines ins Genom integrierten Prophagen.

Ein Nukleotidsequenzvergleich der zwei Gene der Lysekassette von *Y. enterocolitica* W22703, die für je ein putativ exportiertes bzw. sekretiertes Protein kodieren, führte nur zu wenigen Übereinstimmungen in der Datenbank des NCBI. Beide Gene treten nur im Zusammenhang mit einer insektiziden PAI auf. Ein Vergleich auf Proteinebene ergab, dass die zwei Proteine auch in anderen *Yersinia* spp. gefunden werden können. Das putativ exportierte Protein weist eine Homologie zu einem nicht weiter beschriebenen Protein aus *Y. mollaretti* (Identität: 87%, E-Wert: 2×10^{-58}) auf. Das putative sekretierte Protein besitzt eine Ähnlichkeit von 74% zu einem ebenfalls nicht annotierten Protein aus *Y. pestis* (E-Wert: 3×10^{-24}). Für beide Proteine konnten keine konservierten Domänen gefunden werden.

3.6.2 Expression der Lysegene innerhalb der Tc-PAI_{Ye}

Zur Studie der Transkriptionsaktivität von Holin und Endolysin wurde der gemeinsame Promotor beider Gene ($P_{hol/endo}$, *hol* = **H**olin, *endo* = **E**ndolysin), unter Verwendung des Suizidplasmides pUTs-*lux* (Cm^R), mit einer *luxCDABE*-Kassette fusioniert. Es wurden Expressionsprofile des resultierenden Stammes W22703 $P_{hol/endo}::lux$ bei 15°C und 37°C durch Messung der optischen Dichte und der Biolumineszenz erstellt. Für beide Temperaturen konnte im LB-Medium keine Biolumineszenz oberhalb des Schwellenwertes für signifikante Transkription (700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀) festgestellt werden (vgl. Tab. A 7). Als nächstes wurde der Stamm daher auf verschiedenen Medien ausgestrichen (LB-Agar, M9-Agar mit Glucose, Arabinose oder Saccharose als Kohlenstoffquelle) und erneut bei 15°C bzw. 37°C inkubiert. Nach 12 h (37°C) bzw. nach 48 h (15°C) wurde die *hol/endo*-Promotoraktivität durch Messung der Biolumineszenz unter der IVIS-Kamera bestimmt. Weder bei 15°C noch bei 37°C konnte

auf den getesteten Medien Biolumineszenz detektiert werden. Der Promotor der beiden Lysegene zeigte unter diesen Bedingungen keine Transkriptionsaktivität oberhalb des Schwellenwertes für signifikante Transkription.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die beiden LysR-ähnlichen Regulatoren TcaR1 und TcaR2 sowie der Transkriptionsfaktor YmoA einen repressorischen Effekt auf den Promotor von Holin/Endolysin ausüben. Hierzu wurde der Promotor der beiden Lysegene in den Stämmen W22703 $\Delta tcaR1$, W22703 $\Delta 5'-tcaR2$ und W22703 $\Delta ymoA$ mit einem *luxCDABE*-Reporter fusioniert. Von den resultierenden Stämmen wurde die Expression bei 15°C und 37°C bestimmt. Eine Übersicht über die Ergebnisse findet sich in Tab. 19.

Tab. 19: Einfluss der Deletionen von *tcaR1*, *tcaR2* und *ymoA* auf die Promotoraktivität von Holin/Endolysin bei 15°C und 37°C in LB-Medium. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,8$) und stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (STABW) aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. U.S.: Unterhalb des Schwellenwertes für signifikante Transkription ($700 \text{ RLU}_{490}/OD_{600}$)

Stamm	15°C		37°C	
	RLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]	cRLU ₄₉₀ /OD ₆₀₀	STABW [%]
W22703 <i>P_{hol/endo}::lux</i>	u.S.		u.S.	
W22703 $\Delta tcaR1$ <i>P_{hol/endo}::lux</i>	u.S.		u.S.	
W22703 $\Delta 5'-tcaR2$ <i>P_{hol/endo}::lux</i>	u.S.		u.S.	
W22703 $\Delta ymoA$ <i>P_{hol/endo}::lux</i>	$2,9 \times 10^4$	6,5	$2,9 \times 10^4$	3,5

Die Deletion von *tcaR1* und *tcaR2* führte zu keiner messbaren Promotoraktivität der Lysegene. Um eine Abhängigkeit des *hol/endo*-Promotors von TcaR1 und TcaR2 jedoch gänzlich ausschließen zu können, sollte in weiterführenden Arbeiten der Einfluss der Überexpression der beiden Regulatoren auf die Transkriptionsaktivität des Promotors der Lysegene getestet werden.

Dagegen führte die Deletion von *ymoA* zu einer deutlichen Promotoraktivität. Bei beiden untersuchten Temperaturen wurden Biolumineszenzwerte von $2,9 \times 10^4 \text{ RLU}_{490}/OD_{600}$ detektiert. Dies deutet darauf hin, dass YmoA die Lysegene reprimiert. Zur Validierung dieser Daten wurde die Deletion von *ymoA* mit Hilfe des Arabinose-induzierbaren Expressionsplasmides pBAD-*ymoA* komplementiert (Abb. 40). Hierbei konnte die Deletion von *ymoA* durch das Einbringen des Expressionsplasmides pBAD-*ymoA* komplementiert werden. Nach Zugabe von 0,2% Arabinose zum Medium wurde unter der IVIS-Kamera keine Biolumineszenz mehr detektiert (Abb. 40 C). Damit wurde die wildtypische Expression wiederhergestellt. Diese Ergebnisse bestätigen nochmals die Annahme, dass YmoA den gemeinsamen Promotor der beiden Lysegene reprimiert.

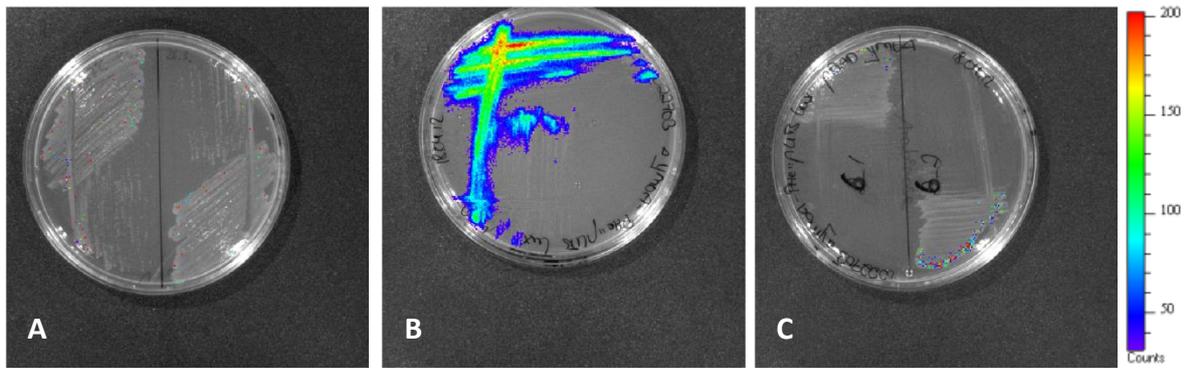


Abb. 40: Komplementation der Deletion von *ymoA* im Stamm W22703 $\Delta ymoA$ $P_{hol/endo}::lux$. Die beiden Stämme W22703 $\Delta ymoA$ $P_{hol/endo}::lux$ und W22703 $\Delta ymoA$ $P_{hol/endo}::lux$ pBAD-*tcaR2* wurden für 24 h bei 30°C auf LB-Agar mit 0,2% Arabinose inkubiert. Anschließend wurde die Biolumineszenz mit Hilfe der IVIS-Kamera (Belichtungszeit 1 s) visualisiert; A) W2270 $P_{hol/endo}::lux$, B) W22703 $\Delta ymoA$ $P_{hol/endo}::lux$, C) W22703 $\Delta ymoA$ $P_{hol/endo}::lux$ pBAD-*ymoA*

Die Bindung von YmoA/H-NS an den Promotor von Holin/Endolysin wurde anschließend mittels EMSAs untersucht. Hierzu wurde der Promotor (500 bp vor dem Translationsstart von Holin) der beiden Lysegene mittels PCR amplifiziert, aufgereinigt und mit steigenden Konzentrationen von YmoA/H-NS bei 4°C inkubiert.

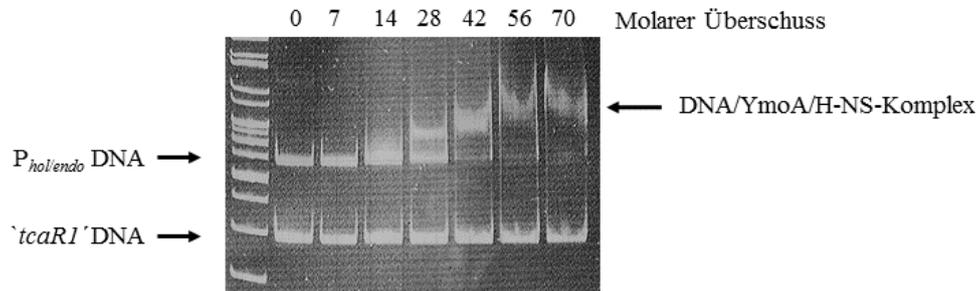


Abb. 41: Bindung von YmoA/H-NS an den Promotor von Holin/Endolysin. Es wurde ein EMSA mit einem 500 bp langen Promotorfragment von Holin/Endolysin ($P_{hol/endo}$) mit steigenden Mengen an gereinigtem YmoA/H-NS bei 4°C durchgeführt. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives Fragment (*tcaR1*) hinzugegeben. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt und die DNA-Banden mittels GelRed sichtbar gemacht.

Trotz der Zugabe eines repetitiven PCR-Fragmentes konnte im EMSA eine Bindung des Holin/Endolysin-Promotors durch YmoA/H-NS beobachtet werden. Bei einem 42-fachen molaren Überschuss von YmoA/H-NS war keine freie Promotor-DNA mehr detektierbar. Damit bindet der repressorische Komplex den gemeinsamen Promotor der Lysegene mit einer vergleichbaren Affinität wie die Promotoren der *tc*-Gene.

3.6.3 Holin und Endolysin aus der Tc-PAI_{ve} von *Y. enterocolitica* W22703 sind funktional

Bereits in ihrer Masterarbeit konnte REUTER zeigen, dass Holin und Endolysin funktional sind. Hierzu wurden die beiden Lysegene in den Vektor pBAD33 kloniert und in den *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 transformiert. Nach der Induktion der Proteinproduktion durch Zugabe von Arabinose in der exponentiellen Phase, konnte REUTER ein verzögertes Wachstum der Kultur bei 15°C und 30°C beobachten. Bei 37°C wurde sogar eine deutliche Lyse der Kultur verzeichnet [Reuter, 2008].

Holine gelten als relativ unspezifische Enzyme. Für ihre Funktionalität benötigen sie lediglich hydrophobe Transmembranhelices und die Fähigkeit, Oligomere zu bilden [Young *et al.*, 2000]. Dagegen sind Endolysine sehr spezifisch und richten sich gegen bestimmte konservierte Motive der Zellwand [Loessner *et al.*, 2002]. Zur näheren Charakterisierung der Substratspezifität von Endolysin aus *Y. enterocolitica* W22703 sollte dieses aufgereinigt werden, wozu zunächst ein passendes Überexpressionssystem gefunden werden musste. Getestet wurden entsprechende rekombinante Konstrukte in den beiden Stämmen *Y. enterocolitica* W22703 und *E. coli* BL21(DE3).

Die Überexpression von Endolysin in beiden Systemen wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 42 dargestellt.

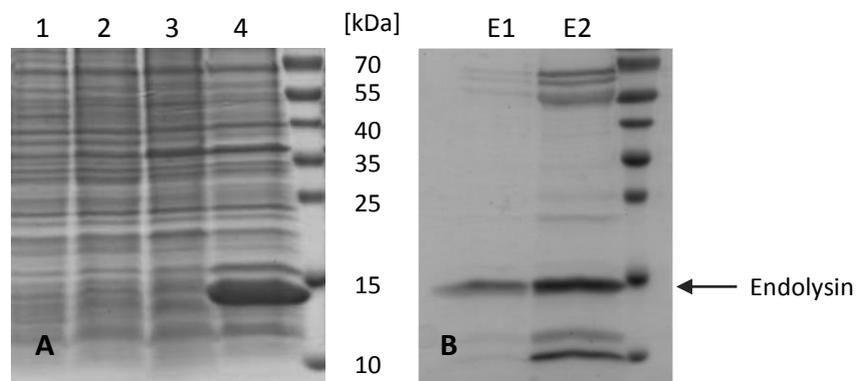


Abb. 42: Überexpression (A) und anschließende Aufreinigung (B) von Endolysin. 1) W22703 pBAD-*endo* vor der Induktion und 2) nach der Induktion mit 0,2% Arabinose; 3) BL21(DE3) pET28b-*endo* vor der Induktion und 4) nach der Induktion mit 1 mM IPTG. Die Reinheit des aufgereinigten Proteins in den Elutionen 1 (E1) und 2 (E2) wurde über eine SDS-PAGE bestimmt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12,5%igen SDS-Gel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Vor der Induktion konnte in keinem der beiden Stämme eine Bande detektiert werden, die dem überexprimierten Endolysin entspricht. Nach der Induktion wurde in dem Stamm BL21(DE3) pET28b-*endo* eine deutliche Bande in Höhe des His-markierten Endolysins (ca. 16 kDa) identifiziert (Abb. 42 A). Eine solche Bande konnte in dem Stamm W22703 pBAD-*endo* nicht detektiert werden. Zur Gewinnung von reinem Endolysin wurden 400 ml des Stammes BL21(DE3) pET28b-*endo*

wie unter 2.3.2.4 beschrieben angezogen und aufbereitet. Die Reinheit des Proteins wurde anschließend im SDS-Gel überprüft und betrug ca. 90% (Abb. 42 B).

Die Funktionalität des aufgereinigten Endolysins wurde über die Messung der OD₆₀₀ einer *Y. enterocolitica* W22703-Kultur nach Zugabe des aufgereinigten Endolysins photometrisch untersucht. Hierzu wurden Proben einer bei 30°C inkubierten *Y. enterocolitica* W22703-Kultur bei einer OD₆₀₀ von 1,0 entnommen, abzentrifugiert und das Pellet mit 100 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 7.5) gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml Puffer mit 50 mM EDTA und einer Endolysinkonzentration von 50 µg/ml resuspendiert und fortan die optische Dichte bei 600 nm kontrolliert. Zur Inhibierung des weiteren Wachstums wurden die Ansätze zusätzlich mit 50 µg/ml Kanamycin versetzt. Als Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die in gleicher Weise mit Lysozym behandelt wurden. Zusätzlich wurden Proben vermessen, die nur mit dem EDTA-haltigen Puffer versetzt wurden. Die Ergebnisse der einzelnen Messreihen sind in Abb. 43 dargestellt.

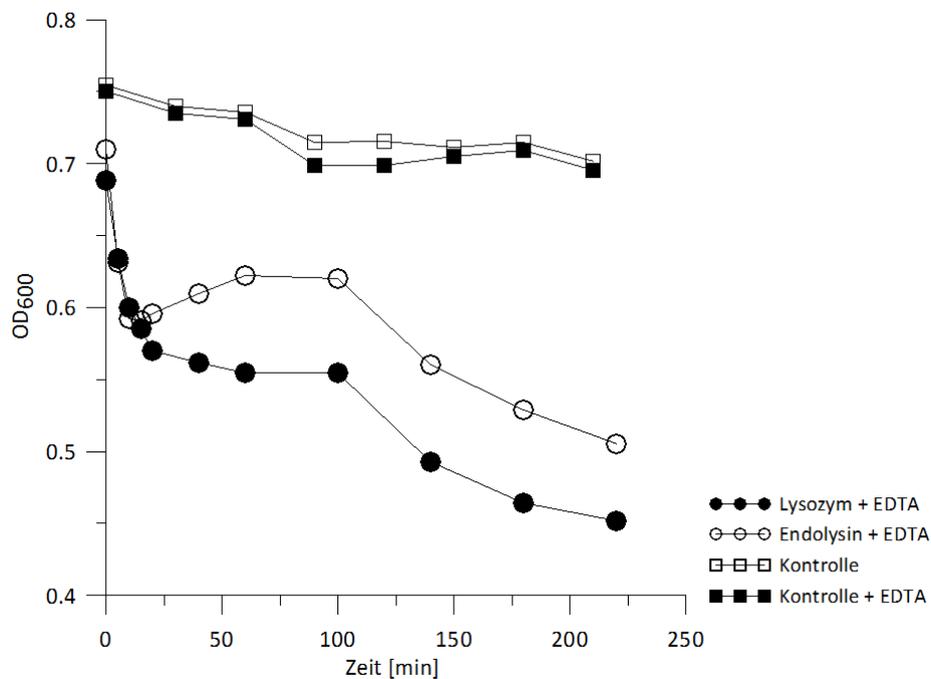


Abb. 43: Funktionalität des aufgereinigten Endolysins aus *Y. enterocolitica* W22703. Entwicklung der optischen Dichte einer sich in der exponentiellen Phase befindlichen *Y. enterocolitica* W22703-Kultur, die mit 50 µg/ml Endolysin und EDTA versetzt wurde. Als Kontrolle dienten Proben, die nur mit dem EDTA-haltigen Puffer behandelt wurden bzw. mit Lysozym (50 µg/ml) und EDTA.

Die Zellen, die nur in Kanamycin-haltigem Puffer resuspendiert wurden, zeigten nach 50 min einen leichten Abfall der OD₆₀₀ (Abb. 43, Kontrolle). Der gleiche Kurvenverlauf wurde auch für die Probe beobachtet, die nur in EDTA-haltigem Puffer inkubiert wurde (Abb. 43, Kontrolle + EDTA). Bei beiden Ansätzen war 240 min nach Versuchsbeginn die OD₆₀₀ von 0,75 auf 0,7 abgesunken. Dies entspricht einer Abnahme um ca. 7%. Der Verlauf der Probe, die mit EDTA und Lysozym behandelt wurde, zeigte

innerhalb der ersten 20 min einen raschen Abfall der OD₆₀₀ von 0,7 auf 0,55. Danach verläuft der Lyseprozess etwas langsamer. Am Ende des Versuches, 240 min nach Zugabe des Enzyms, war die OD₆₀₀ auf 0,45 zurückgegangen. Dies entspricht einer Abnahme der OD₆₀₀ um insgesamt 35%. Die Probe, die mit Endolysin und EDTA behandelt wurde, zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf. In den ersten 10 min wurde eine rasche Abnahme der OD₆₀₀ von 0,77 auf 0,64 verzeichnet. Danach konnte zunächst keine weitere Abnahme der Werte beobachtet werden. Zum Versuchsende war die OD₆₀₀ um insgesamt 30% von 0,77 auf 0,53 abgesunken. Damit zeigt Endolysin eine vergleichbare Aktivität wie Lysozym. EDTA, das zur Permeabilisierung der Außenmembran hinzugegeben wurde, war nicht verantwortlich für die beobachtete Zellyse. Eine Funktionalität des aufgereinigten Endolysins konnte daher gezeigt werden. Mit dem Enzym wurden anschließend Zymogramme zur Charakterisierung der Substratspezifität durchgeführt.

3.6.4 Substratspezifität des Endolysins aus *Y. enterocolitica* W22703

Die Substratspezifität des aufgereinigten Endolysins aus *Y. enterocolitica* W22703 wurde mittels Zymogrammen getestet. Hierbei handelt es sich um ein auf der SDS-PAGE basierendes Verfahren, bei dem ein Substrat für ein zu untersuchendes Enzym oder Proteingemisch ins Gel gegeben wird. Als Substrate dienten in dieser Arbeit verschiedene lyophilisierte Kulturen von *Yersinia* spp. sowie der *E. coli*-Stamm OP50 und der *S. Typhimurium*-Stamm 14028. Nach der elektrischen Auftrennung wird das Zymogramm in einen entsprechenden Puffer eingelegt und die im Gel enthaltenen lyophilisierten Zellen werden mittels Methylenblau angefärbt. Die proteolytische Aktivität des Endolysins zeigt sich im gefärbten Gel durch das Vorhandensein einer durchscheinenden Bande (= Abbau des Substrates). In Abb. 44 sind beispielhaft die Zymogramme mit *Y. enterocolitica* W22703 und *E. coli* OP50 als Substrat dargestellt. Die semi-quantitative Auswertung der Zymogramme erfolgte mit Hilfe der Kodak ID Image Analysis Software. Hierzu wurden für jede Bande gleichgroße Messfelder verwendet, welche als Integral zum Hintergrund in % angegeben werden (Abb. 44). Zur Kontrolle wurden Albumin Fraktion V (BSA) und Lysozym auf das Gel aufgetragen. In den Laufspuren von BSA konnte erwartungsgemäß in keinem der Zymogramme eine durchscheinende Bande detektiert werden. Dagegen zeigte sich bei der Verwendung von Lysozym in allen Zymogrammen eine deutlich durchscheinende Bande in Höhe von ca. 14 kDa. Dabei wurde der stärkste Abbau der Zellwand durch Lysozym im Zymogramm mit *Y. intermedia* als Substrat beobachtet (Tab. 20). Die geringste proteolytische Aktivität (32%) wies Lysozym gegen *Y. ruckeri* auf. Die enzymatische Aktivität von Lysozym gegen die restlichen Stämme lag in einem Bereich von 65% und 95%. Es wies dementsprechend keine hohe Substratspezifität auf und baute die Zellwand der verschiedenen Stämme mit vergleichbarer Affinität ab.

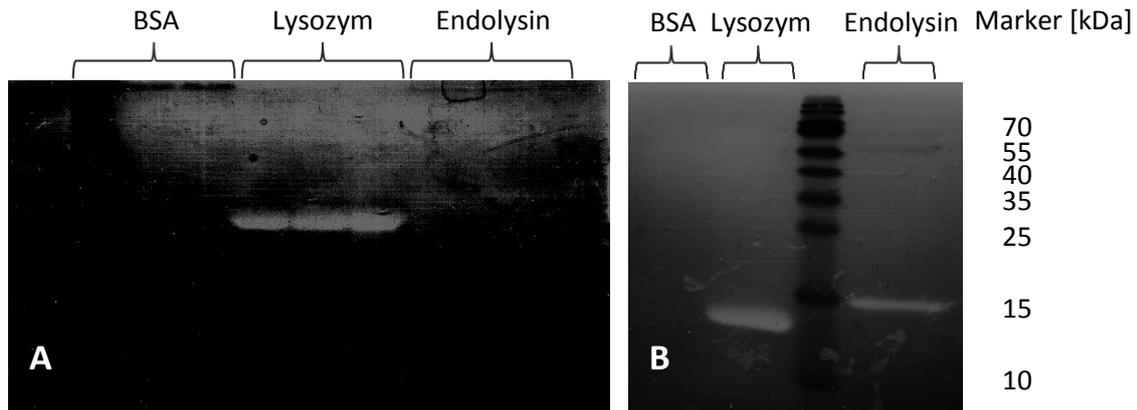


Abb. 44: Aktivität von Endolysin aus *Y. enterocolitica* W22703 gegen verschiedene Substrate im Zymogramm. Zymogramme mit *E. coli* OP50 (A) und *Y. enterocolitica* W22703 (B). Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Renaturierung der Proteine für 24 h bei 37°C. Die Gele wurden mit Methylenblau angefärbt. Enzymaktivität gegen die Zellwand der einzelnen Stämme kann als durchscheinende Bande im sonst gefärbten Gel gezeigt werden.

Eine zweite durchscheinende Bande konnte im Zymogramm in Höhe von ca. 16 kDa detektiert werden, was der Größe nach dem His-markierten Endolysin entspricht (Abb. 44 B). Endolysin zeigte eine große Variabilität in den ermittelten enzymatischen Aktivitäten. Die höchste Aktivität konnte bei der Verwendung von *Y. enterocolitica* W22703 als Substrat detektiert werden. Die geringste Aktivität wurde bei *E. coli* OP50 gemessen (ca. 5%). Die restlichen eingesetzten Substrate zeigten einen Abbau durch Endolysin in einem Bereich von 30-95%, was auf eine hohe Substratspezifität von Endolysin gegen *Y. enterocolitica* W22703 schließen lässt (Tab. 20).

Tab. 20: Substratspezifität von Endolysin aus *Y. enterocolitica* W22703. In den Zymogrammen wurden lyophilisierte *Yersinia* spp. sowie *E. coli* OP50 und *S. Typhimurium* 14028 als Substrat verwendet. Die Auswertung der Zymogramme erfolgte mit der Kodak ID Image Analysis Software. Hierzu wurde das Gel eingescannt und densitometrisch ausgewertet. Für jede Bande wurden gleichgroße Messfelder verwendet, die als Integral zum Hintergrund in % angegeben werden.

Stamm	Aktivität Lysozym [%]	Aktivität Endolysin [%]
<i>Y. enterocolitica</i> W22703	85	100
<i>Y. frederiksenii</i>	69	77
<i>Y. ruckeri</i>	32	32
<i>Y. mollaretti</i>	74	82
<i>Y. intermedia</i>	100	95
<i>E. coli</i> OP50	64	5
<i>S. Typhimurium</i> 14028	94	89

3.6.5 Funktion der Holin/Endolysin-Kassette in *Y. enterocolitica* W22703

Auch in anderen Genomen, wie beispielsweise in *P. luminescens* und *Y. pestis*, finden sich Lysegene [Waterfield *et al.*, 2001b; ffrench-Constant *et al.*, 2003]. Diese sind vor allem bei der Gattung *Yersinia* hoch konserviert und treten immer im Zusammenhang mit den *tc*-Genen auf. Das Vorhandensein einer funktionalen Lysekassette im Genom wirft die Frage nach der physiologischen Funktion dieser auf. Bereits FFRENCH-CONSTANT und WATERFIELD haben über eine mögliche Freisetzung der Tc-Proteine mit Hilfe der Lysekassette spekuliert [Waterfield *et al.*, 2001b]. Um eine solche Hypothese zu beweisen, muss zunächst die Expression dieser Gene unter physiologischen Bedingungen gezeigt werden. Mit Hilfe des *luxCDABE*-Reporters konnte jedoch keine Expression der detektiert werden (3.6.2). Auch die Fusion des gemeinsamen Promotors beider Gene mit dem Fluoreszenzreporter GFP wies unter dem Fluoreszenzmikroskop keine fluoreszierenden Zellen auf (Daten nicht gezeigt). Zum Nachweis der Expression beider Gene im Zusammenhang mit Zelllyse wurde daher ein ATP-Nachweis-Kit benutzt. Hiermit wurde der ATP-Gehalt in den Kulturüberständen von W22703 und W22703 $\Delta hol/endo$ aus verschiedenen Wachstumsphasen bestimmt und miteinander verglichen. Diesem Experiment lag folgende Überlegung zugrunde: sollten Holin und Endolysin physiologisch aktiv sein, so müssten sich im direkten Vergleich in einer *Y. enterocolitica*-Wildtypkultur mehr Zellen lysieren als in einer *hol/endo*-Deletionsmutante.

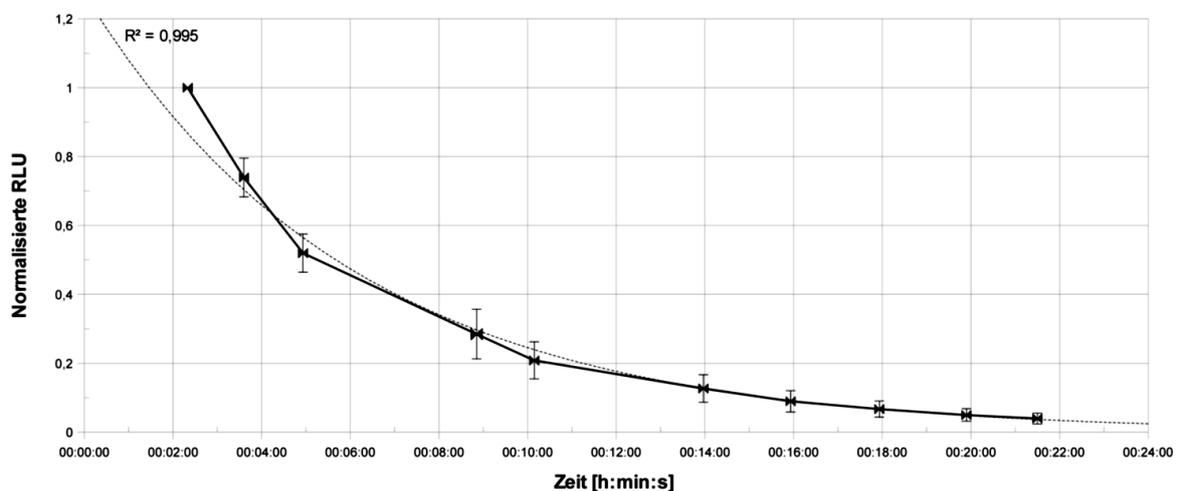


Abb. 45: Zeitliche Entwicklung des Biolumineszenzsignals des ATP Standards. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung der jeweils auf den ersten Messpunkt normalisierten RLU aller Konzentrationen (schwarze, durchgezogene Linie). Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. Der Trendlinie (schwarze, gestrichelte Linie) liegt eine Exponentialfunktion zugrunde. [Esselborn, 2010]

Zwar gelang eine Etablierung des Assays, aufgrund der geringen Stabilität des Biolumineszenzsignals über die Zeit konnten jedoch keine gesicherten Aussagen über den ATP-Gehalt in den einzelnen Proben getroffen werden. Laut Herstellerangaben sollte das Signal über insgesamt 30 min hinweg stabil sein. In vorliegender Arbeit konnte jedoch eine deutliche exponentielle Abnahme der Lumineszenz über die Zeit gezeigt werden (Abb. 45). Die Messung des Standards ergab, dass das Signal innerhalb der ersten 20 min auf weniger als ein Zehntel des Ausgangswertes gesunken war. Dies war insbesondere problematisch, da allein der Messvorgang pro Probe etwa 1 s dauert. Der ATP-Assay wurde daher verworfen und die physiologische Funktion von Holin und Endolysin sollte anderweitig aufgeklärt werden.

3.6.5.1 Rolle von Holin und Endolysin in der insektiziden Aktivität von *Y. enterocolitica* W22703

Eine mögliche Beteiligung der Lysekassette in der Freisetzung der Tc-Proteine sollte mit Hilfe eines Anti-TcaA-Antikörpers untersucht werden. Da die Produktion eines solchen Antikörpers jedoch nicht erfolgreich war (Daten nicht gezeigt), wurde TcaA mit einem leicht nachzuweisenden Protein-Marker fusioniert. Die Wahl fiel hierbei auf den Fluoreszenzreporter mCherry, da GEBRANDE bereits in ihrer Bachelorarbeit eine gute Detektion des Proteins mit Hilfe eines Anti-RFP-Antikörpers zeigen konnte [Gebrende, 2012]. Die translationale Fusion von TcaA und mCherry erfolgte in den *Y. enterocolitica*-Stämmen W22703, W22703 $\Delta ymoA$ und W22703 $\Delta hol/endo$ mit Hilfe des Suizidvektors pUTs-mCherry. Die einzelnen Stämme wurden bei 15°C und 37°C inkubiert und es wurden Proben aus der Latenz-, der exponentiellen und der stationären Phase entnommen. Der Gehalt an TcaA-mCherry-Fusionsprotein im Zellpellet sowie im Kulturüberstand wurde im Western Blot bestimmt.

Wie aus Abb. 46 hervorgeht, wies der Stamm W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA-mCherry* bei 15°C eine etwa 20-fach höhere TcaA-mCherry-Konzentration auf als bei 37°C. Auch für die beiden Stämme W22703 *tcaA::mCherry* und W22703 $\Delta hol/endo$ *tcaA::mCherry* wurde erwartungsgemäß bei 15°C ein höheres TcaA-Proteinlevel detektiert als bei 37°C. Diese Ergebnisse stützen die unter 3.2.1 gezeigten Expressionsdaten des kälteinduzierten Toxingenes. Bei 37°C wurden für alle drei Stämme nur geringe Konzentrationen des Fusionsproteins detektiert. Die Deletion der Lysegene Holin und Endolysin hatte keinen signifikanten Einfluss auf das TcaA-Level innerhalb der Zelle. Hier wurde vielmehr ein Einfluss auf die Freisetzung von TcaA und damit auf dessen Konzentration im Überstand postuliert, da Holin und Endolysin möglicherweise an der gerichteten Lyse der Zellen zur Freisetzung der Tc-Proteine beteiligt sind.

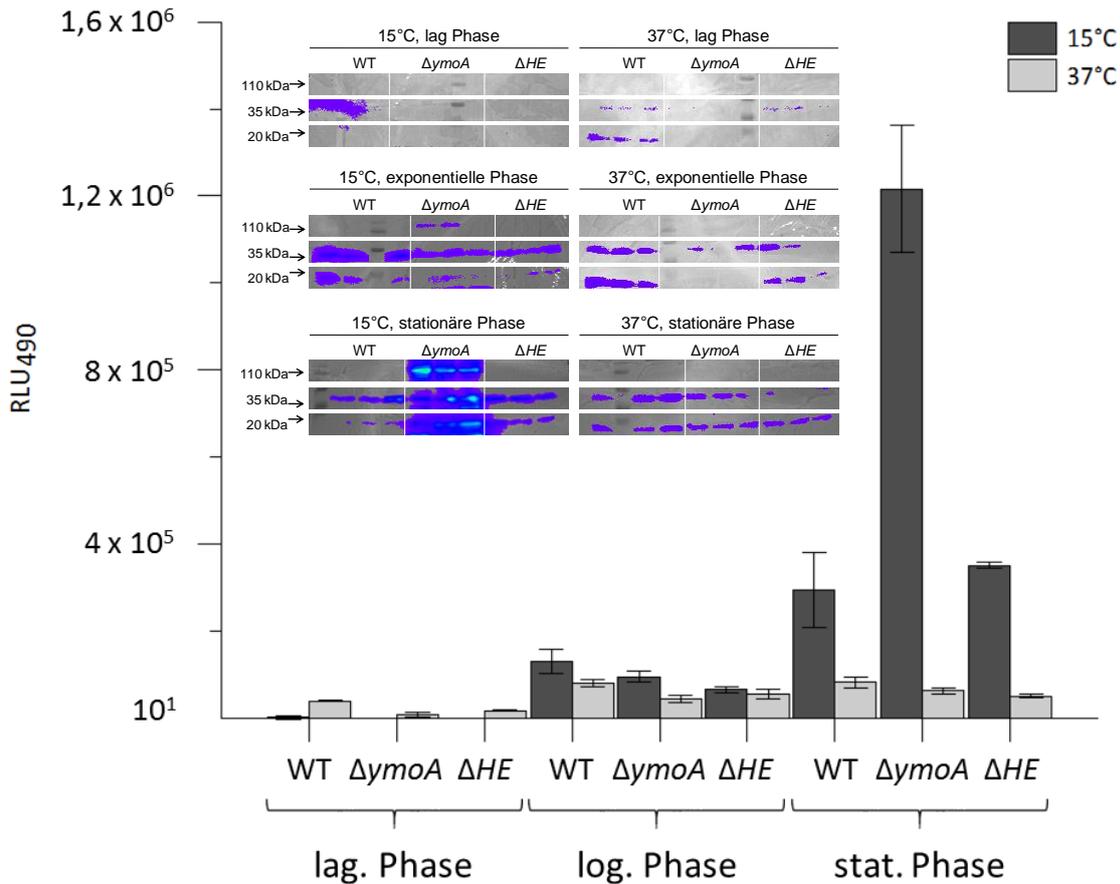


Abb. 46: Detektiertes TcaA-mCherry im Zellpellet von W22703 *tcaA-mCherry* (WT), W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA-mCherry* ($\Delta ymoA$) und W22703 $\Delta hol/endo$ *tcaA-mCherry* (ΔHE). Zu den angegebenen Wachstumsphasen wurden Proben entnommen und die Menge an TcaA-mCherry im Zellpellet mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-RFP-Antikörpers als Primärantikörper bestimmt. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen mit jeweils zwei Replikaten. Für jeden Ansatz ist ein repräsentativer Blot dargestellt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Funktion ROI des Programmes *Living Image*™ V. 4.01 (Igor Pro). Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. [Rausser, 2012]

Die Kulturüberstände der drei Stämme wurden nach Aufkonzentration der Proteine über eine TCA-Fällung mittels Western Blot untersucht. Hierbei lag die Konzentration von TcaA-mCherry in den Proben aus der Latenz- und der exponentiellen Phase unterhalb der Nachweisgrenze. Bei den Überstandsproben aus der stationären Phase konnte im Western Blot lediglich für den Stamm W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA::mCherry* ein Signal detektiert werden [Gebrande, 2012]. Bei den beiden Stämmen W22703 *tcaA::mCherry* und W22703 $\Delta hol/endo$ *tcaA::mCherry* wurde kein Fusionsprotein detektiert (Abb. A 21). Dadurch ist eine konkrete Auswertung der TcaA-Konzentration im Überstand nicht möglich und es kann keine abschließende Aussage darüber getroffen werden, ob TcaA *in vitro* tatsächlich freigesetzt wird und inwiefern das Holin/Endolysin-System daran beteiligt ist.

3.6.5.2 Funktion von Holin/Endolysin *in vivo*

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Y. enterocolitica* W22703 im Darm von *C. elegans* proliferiert und eine persistente Infektion hervorruft, was in einer erheblichen Verringerung der Überlebensrate der Nematoden resultiert [Spanier *et al.*, 2010]. Um Aussagen zur physiologischen Funktion der Lysekassette der Tc-PAI_{Ye} von *Y. enterocolitica* W22703 treffen zu können, wurde die nematozide Wirkung der beiden Stämme W22703 und W22703 Δ hol/endo in einem Toxizitätstest (= *Lifespan-Assay*) miteinander verglichen. Hierzu wurden die verschiedenen *Yersinia*-Stämme bei 30°C angezogen und auf NGM-Agar ausplattiert. Die Platten wurden für zwei Tage bei RT inkubiert und anschließend direkt für den Toxizitätstest verwendet. Die bewachsenen NGM-Platten wurden mit *C. elegans* im L4-Stadium besiedelt. Nach einer Infektionszeit von vier Stunden wurden die L4-Larven mit Hilfe eines Wurm-Picks auf OP50-Platten transferiert. Neben den beiden *Y. enterocolitica*-Stämmen W22703 und W22703 Δ hol/endo wurde zur Kontrolle die Lebensdauer von *C. elegans* auf folgenden Stämme im *Lifespan-Assay* ermittelt: W22703 Δ hol/endo pACYC184 und W22703 Δ hol/endo pACYC-hol/endo sowie *E. coli* OP50. In den Toxizitätstests wurde täglich der prozentuale Anteil der überlebenden Würmer von der Gesamtzahl der Tiere dokumentiert. Als tot klassifiziert wurden Würmer, die nicht mehr auf taktile Reize reagierten und kein erkennbares Pharynxpumpen zeigten. In Abb. 47 sind die Kaplan-Meier Überlebenskurven zu den einzelnen Toxizitätstests dargestellt. Die berechneten TD₅₀ sind in Tab. 21 zusammengefasst.

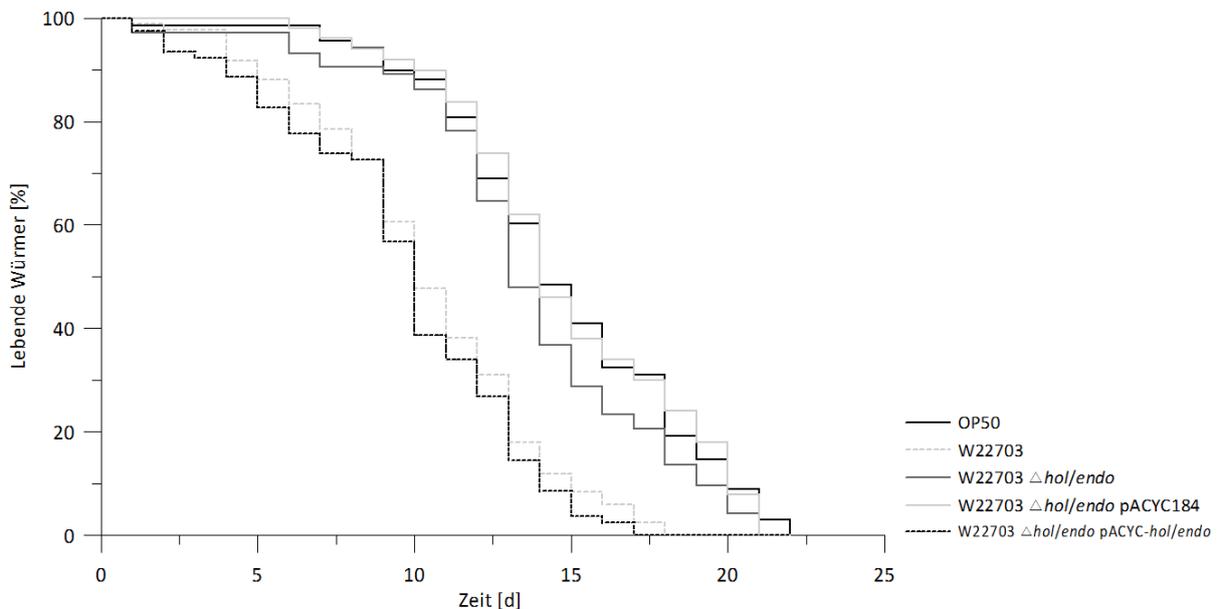


Abb. 47: Einfluss des Holin/Endolysin-Systems auf die Lebensdauer von *C. elegans*. Dargestellt sind die Kaplan-Meier Überlebenskurven von *C. elegans* nach der Infektion mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen. Als Kontrolle wurde eine Testreihe mit dem Futterstamm *E. coli* OP50 durchgeführt. *Y. enterocolitica* W22703 führt zu einer deutlichen Verringerung der Lebensspanne von *C. elegans*. Die Deletion der Lysegene Holin/Endolysin (Δ hol/endo) hebt diesen Phänotypen auf und es kommt zu einem ähnlichen Kurvenverlauf wie mit OP50. Die Komplementierung der Deletion mit Hilfe des Plasmides pACYC-hol/endo stellt die nematozide Wirkung des Stammes wieder her.

Aufgrund der Abhängigkeit der Lebensdauer von *C. elegans* von der Temperatur, können in der Literatur unterschiedliche Angaben für die jeweiligen TD_{50} gefunden werden. Im Vergleich zu 25°C ist die Lebenserwartung bei niedrigen Temperaturen (15-20°C) deutlich erhöht [Gershon *et al.*, 2002]. Für 20°C werden eine TD_{50} von ca. 13 Tagen sowie eine Lebensdauer von ca. 21 Tagen angegeben. Die Nematoden, welche permanent auf OP50 kultiviert wurden, wiesen eine TD_{50} von ca. 14 Tagen und eine maximale Lebensspanne von 23 Tagen auf. Die mit dem *Y. enterocolitica*-Wildtyp W22703 infizierten Nematoden starben wesentlich früher. Ihre TD_{50} lag bei 9 Tagen und ihre Lebensspanne war signifikant verkürzt (16 Tage). Damit konnte die bereits beschriebene nematozide Wirkung von *Y. enterocolitica* W22703 bestätigt werden [Spanier *et al.*, 2010]. Die Infektion der Würmer mit dem Stamm W22703 $\Delta hol/endo$ zeigte dagegen den gleichen Kurvenverlauf wie mit OP50. Die TD_{50} lag bei 13 Tagen und die Lebensdauer bei 22 Tagen. Durch die Deletion der Lysegene ist die nematozide Wirkung von *Y. enterocolitica* W22703 nahezu aufgehoben. Eine Komplementation der Deletion mit dem Plasmid pACYC-*hol/endo* stellte den wildtypischen Infektionsverlauf wieder her (TD_{50} = 9 Tage). Daraus resultiert, dass das Vorhandensein der beiden Lysegene die Lebenserwartung von *C. elegans* deutlich verringert. Ein Vergleich der berechneten TD_{50} -Werte von W22703 und W22703 $\Delta hol/endo$ in der Studentischen t-Verteilung ergibt einen p-Wert von 0,005. Damit können die Unterschiede in den ermittelten TD_{50} als höchst signifikant erachtet werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine physiologische Funktion der Lysekassette hin, möglicherweise durch eine Beteiligung in der Freisetzung der Tc-Proteine oder anderer gewebschädigender Moleküle.

Tab. 21: Einfluss von Holin und Endolysin auf die nematozide Wirkung von *Y. enterocolitica*. Übersicht zu den ermittelten TD_{50} -Werten der *Lifespan*-Versuche in dieser Arbeit. Die aufgeführten Werte stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (STABW) aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Stamm	$TD_{50} \pm$ STABW	p-Wert (im Vergleich zu OP50)
OP50	13,97 \pm 0,11	-
W22703	9,63 \pm 0,14	0,014
W22703 $\Delta hol/endo$	13,05 \pm 0,13	0,150
W22703 $\Delta hol/endo$ pACYC184	14,1 \pm 0,13	0,059
W22703 $\Delta hol/endo$ pACYC- <i>hol/endo</i>	9,1 \pm 0,2	0,006

Während der Infektion von *C. elegans* mit dem *Y. enterocolitica*-Wildtypstamm W22703 wurden außerdem folgende Beobachtungen gemacht: Während der ersten sieben Tage der Infektion verlangsamten sich deutlich die Pumpfrequenz des Pharynx der Nematoden sowie deren Kriechbewegung. Die Würmer bewegten sich häufig nur, wenn sie mit dem Wurm-Pick angestoßen wurden. Im späteren Verlauf der Infektion wurde oftmals nur noch der Kopf bewegt. Darüber hinaus

trat der sogenannte Ei-Ablage-Defekt auf. Hierbei können adulte Würmer ihre Eier nicht mehr ablegen. Stattdessen schlüpfen die Larven im Nematoden, der daraufhin stirbt. Zeitgleich konnte eine deutliche Erweiterung des Darmes verzeichnet werden. Hierbei war der Darm oft so stark erweitert, dass er über die Vulva nach außen trat. Dieser für *Y. enterocolitica* typische Phänotyp wurde bei der Infektion von *C. elegans* mit *E. coli* OP50 und *Y. enterocolitica* W22703 Δ *hol/endo* nicht beobachtet. Um den zeitlichen Verlauf des Auftretens der verschiedenen Phänotypen mit der fortschreitenden Kolonisation des Verdauungstraktes von *C. elegans* durch *Y. enterocolitica* korrelieren zu können, wurden L4-Larven wie unter 2.4.3 beschrieben mit dem Stamm W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ infiziert. Die Fluoreszenz, und damit einhergehend die Proliferation der Bakterien, wurde täglich unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

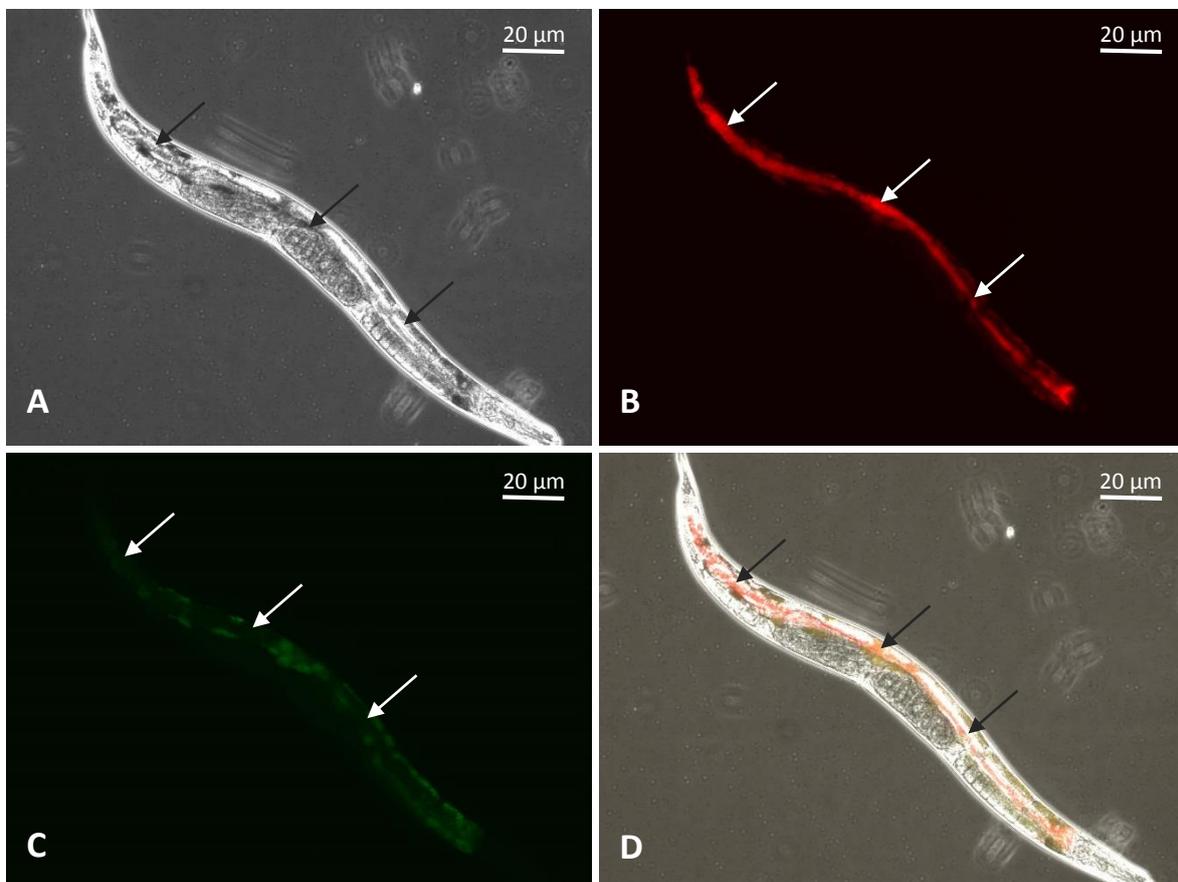


Abb. 48: Mikroskopische Darstellung eines mit W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ infizierten Wurmes. L4-Nematoden wurden mit W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ bei RT infiziert. Dargestellt sind die mikroskopischen Aufnahmen vier Tage nach der Infektion. Die Kolonisation von *C. elegans* mit *Y. enterocolitica* erstreckt sich über den gesamten Gastrointestinaltrakt. Besonders stark von der Infektion ist der Mitteldarm betroffen (mit Pfeilen markiert). Es ist bereits eine erste Dehnung des Darmes zu verzeichnen. A) Phasenkontrast, B) roter Fluoreszenzkanal, C) grüner Fluoreszenzkanal (Autofluoreszenz), D) Überlagerung der drei Kanäle.

Vier Tage nach der Infektion wies nahezu der komplette Gastrointestinaltrakt der mit W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ infizierten Nematoden eine starke rote Fluoreszenz auf (Abb. 48 B). Der Verdauungstrakt von *C. elegans* war zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig mit *Y. enterocolitica* besiedelt. Die Stärke der Fluoreszenz, und damit die Bakteriendichte, nahm noch weitere drei Tage zu. Während dieser Zeit konnte eine ständige Erweiterung des Darmes beobachtet werden. Nach etwa zehn Tagen wurden keine weiteren Veränderungen verzeichnet. Damit konnte der zeitliche Verlauf des Auftretens der verschiedenen Phänotypen mit der fortschreitenden Kolonisation des Verdauungstraktes von *C. elegans* durch *Y. enterocolitica* korreliert werden. Hierbei werden vermutlich die Tc-Toxine und andere, gewebeschädigende Moleküle, freigesetzt, die die Lebensspanne von *C. elegans* signifikant verkürzen. Inwiefern Holin und Endolysin in der Freisetzung dieser Moleküle involviert sind, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Der signifikante Rückgang der nematoziden Aktivität von *Y. enterocolitica* nach Deletion der beiden Lysegene lässt jedoch vermuten, dass dieses System in der Freisetzung der Tc-Proteine eine Rolle spielt.

3.7 Bistabile Produktion des insektiziden Toxinkomplexes

3.7.1 Heterogene *tcaA*-Expression in *Y. enterocolitica* W22703

Zur Untersuchung der *tcaA*-Expression auf Einzelzellebene sowie zum Vergleich der Transkriptionsdaten aus 3.2.1 mit Translationsdaten wurde die TcaA-Produktion in dem Stamm W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ näher untersucht. Hierzu wurde der Stamm auf selektivem LB-Agar bei 15°C bzw. 37°C inkubiert und anschließend unter der IVIS-Kamera auf Fluoreszenz hin analysiert.

Zur Ermittlung der Hintergrundfluoreszenz wurde der Stamm S17.1 λ_{pir} pUTs- $P_{tcaA}::mCherry$ für einen Tag bei 37°C inkubiert. In diesem Stamm konnte bereits gezeigt werden, dass der Promotor von *tcaA* nicht aktiv ist. Nach einem Tag Inkubation bei 37°C lag die durchschnittliche Fluoreszenz bei 1719 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU, *relative fluorescence units*). Dieser Wert wurde daraufhin als Schwellenwert für eine signifikante Translation gesetzt.

Die unter der IVIS-Kamera detektierte Fluoreszenz des Stammes W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ war nach einem Tag Inkubation bei 37°C mit 1875 RFU nur geringfügig oberhalb des ermittelten Schwellenwertes. Das Fluoreszenzsignal der 37°C-Kulturen von W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ wurde daher als nicht signifikant eingestuft. Die 15°C-Kulturen von W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ wurden wegen des verlangsamten Wachstums erst nach dreitägiger Anzucht analysiert. Nach drei Tagen Inkubation bei 15°C konnten auf der Platte mit bloßem Auge vereinzelt rote Kolonien beobachtet werden (Abb. 49 A). Unter der IVIS-Kamera wiesen diese Kolonien im Vergleich zu den anderen eine deutlich stärkere Fluoreszenz auf (Abb. 49 B).

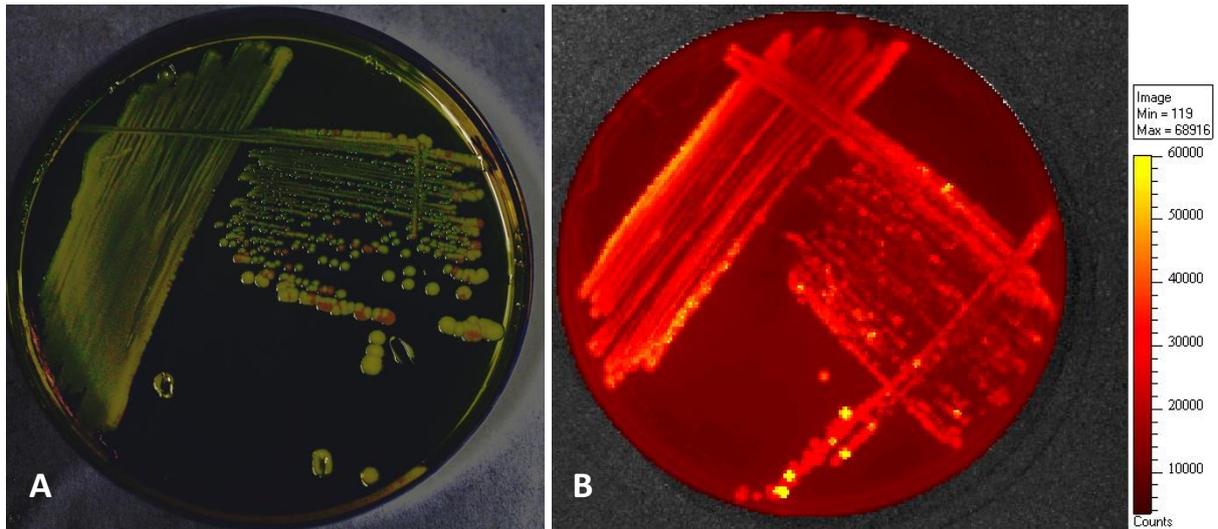


Abb. 49: Heterogene Expression von *tcaA* in dem Stamm W22703 $P_{tcaA}::mCherry$. A) Wachstum von W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ nach dreitägiger Inkubation bei 15°C; B) Aufnahme der Fluoreszenz von W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ nach dreitägiger Inkubation bei 15°C mit Hilfe der IVIS-Kamera. Die roten Kolonien (A) erscheinen unter der IVIS-Kamera im Vergleich zu den anderen Kolonien gelb und weisen damit eine deutlich stärkere Fluoreszenz auf (B).

Daraufhin wurden die Zellen je einer fluoreszierenden und einer nicht-fluoreszierenden Kolonie mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops analysiert. Hierbei wiesen die Zellen der fluoreszierenden Kolonie eine Besonderheit auf: nur bei ca. 1% der Zellen konnte eine Fluoreszenz detektiert werden. Für die restlichen Zellen konnte keine Fluoreszenz und damit keine Promotoraktivität von *tcaA* beobachtet werden (Abb. 50 A).

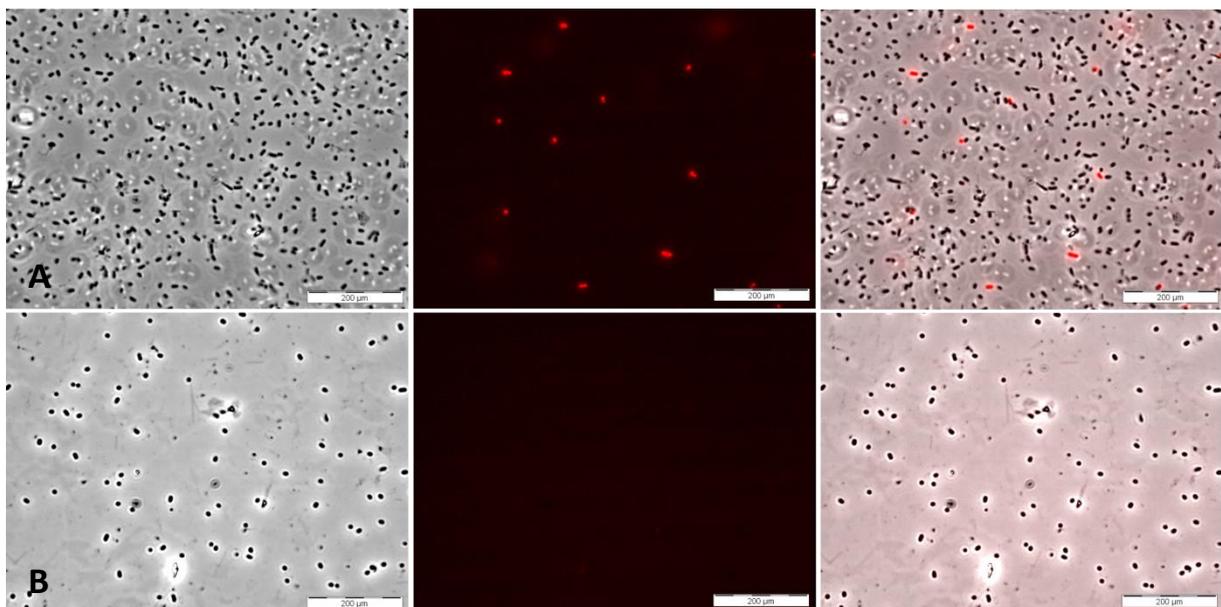


Abb. 50: Untersuchung der Expression des *tcaA*-Promotors auf Einzelzellebene. Mikroskopische Darstellung von W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ bei 100-facher Vergrößerung nach dreitägiger Inkubation bei 15°C. A) Präparat einer fluoreszierenden bzw. B) einer nicht-fluoreszierenden Kolonie (von links nach rechts: Phasenkontrast, Fluoreszenzkanal, Überlagerung beider Kanäle)

Der Prozentsatz der fluoreszierenden Zellen nahm mit steigender Inkubationszeit bei 15°C zu. Am fünften Tag wiesen bereits 3% der Zellen eine Fluoreszenz auf. Am Tag 9 stieg die Zahl der rot leuchtenden Zellen auf 11% an. Im Gegensatz dazu konnten im Präparat der nicht-fluoreszierenden Kolonie keine fluoreszierenden Zellen detektiert werden (Abb. 50).

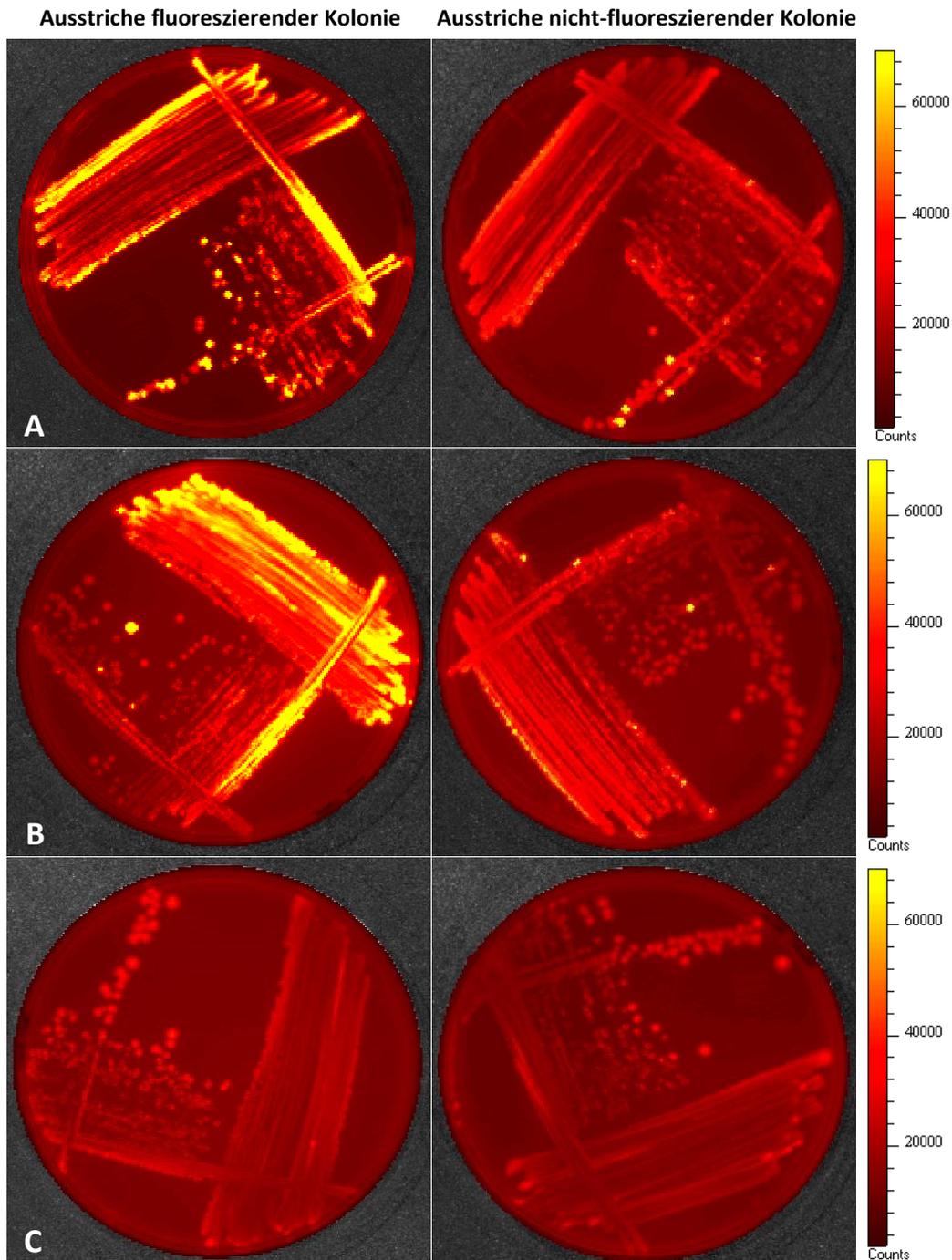


Abb. 51: Entwicklung der Bistabilität des *tcaA*-Promotors bei verschiedenen Temperaturen. Aufnahme der Fluoreszenz der Ausstriche einer fluoreszierenden Kolonie (linke Spalte) bzw. nicht-fluoreszierenden Kolonie (rechte Spalte) von W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ bei einer Inkubationstemperatur von A) 15°C, B) 30°C und C) 37°C.

Im nächsten Schritt wurde das Auftreten dieses heterogenen Phänotypes näher untersucht. Hierzu wurden je eine fluoreszierende und eine nicht-fluoreszierende Kolonie auf LB-Agar ausgestrichen und bei 15°C, 30°C bzw. 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde nach einem Tag (30°C und 37°C) bzw. nach drei Tagen Inkubation (15°C) unter der IVIS-Kamera untersucht. Die Ausstriche der fluoreszierenden, auf der Platte rot erscheinenden Kolonie zeigten unter der IVIS-Kamera bei 15°C als auch bei 30°C eine deutliche Fluoreszenz im gesamten Bereich (Abb. 51). Diese war nun nicht mehr auf einzelne Kolonien begrenzt, sondern nahezu auf der gesamten Platte detektierbar. Bei 37°C konnten dagegen im gesamten Ausstrich keine RFU-Werte oberhalb der Hintergrundfluoreszenz detektiert werden (Abb. 51 C). Die Ausstriche der nicht-fluoreszierenden Kolonie wiesen bei 15°C und 30°C wieder eine deutliche Aufteilung in einzelne stark fluoreszierende Kolonien sowie in weite Bereiche mit Fluoreszenzwerten unterhalb der Hintergrundfluoreszenz auf (rechte Spalte Abb. 51). Auch hier war der Promotor von *tcaA* bei 37°C reprimiert.

Dieses Ergebnis, welche die Heterogenität einer genetisch identischen Population unter denselben Umweltbedingungen beschreibt, deutet darauf hin, dass die Expression von *tcaA* möglicherweise auf Bistabilität zurückzuführen ist.

3.7.2 Aufhebung des heterogenen Expressionsverhaltens von *tcaA* nach der Deletion von *ymoA*

Bistabilität ist die Aufspaltung einer Population genetisch identischer Zellen, die bei homogenen und gleichen Bedingungen gewachsen sind, in zwei Subpopulationen [Dubnau *et al.*, 2006]. Dabei ist die Heterogenität der Population nicht durch eine Neuordnung des Genoms oder durch Mutationen bedingt und die Zellen können zwischen den physiologischen Stadien reversibel wechseln [Graumann, 2006]. Dadurch wird in vielen biologischen Systemen eine Schalterfunktion mit Hysterese oder ein Vergangenheitsspeicher realisiert. Hierbei beschreibt Hysterese eine Situation, bei der die Ausgangsgröße nicht allein von der Eingangsgröße abhängig ist, sondern auch von dem vorherigen Zustand dieser [Laurent *et al.*, 2005].

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die *tcaA*-Expression innerhalb einer Population heterogen erfolgt (3.7.1). Weiterhin wurde die Ausbildung von Hysterese beobachtet: *tcaA*-exprimierende Zellen verbleiben bei Temperaturen unter 37°C auch nach Überführung auf frischen LB-Agar im induzierten Zustand.

Zur weiteren Charakterisierung der Bistabilität der *tcaA*-Expression wurde der Promotor von *tcaA* in der *ymoA*-Deletionsmutante mit *mCherry* fusioniert. Im Abschnitt 3.5.1.1 konnte bereits gezeigt werden, dass das Fehlen des Repressors zu einer erhöhten *tcaA*-Expression führt. Der resultierende Stamm W22703 $\Delta ymoA$ -P_{*tcaA*}::*mCherry* wurde daraufhin auf selektivem LB-Agar bei 15°C inkubiert und

nach dreitägigem Wachstum unter der IVIS-Kamera und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Bereits mit bloßem Auge konnte eine einheitliche Rotfärbung des gesamten Ausstriches beobachtet werden. Unter der IVIS-Kamera wies der komplette Ausstrich eine starke Fluoreszenz auf (Abb. A 22). Auf Einzelzellebene konnte eine drastische Erhöhung des Anteils von fluoreszierenden Zellen beobachtet werden. Der Anteil fluoreszierender Zellen belief sich nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei 15°C auf ca. 84% (Abb. 52).

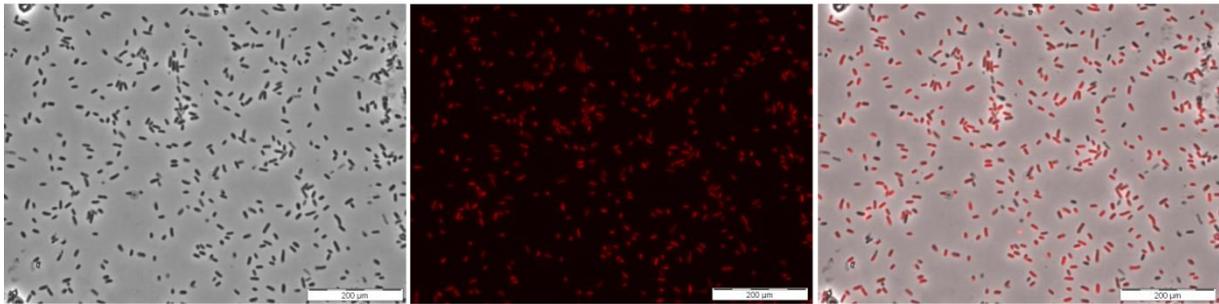


Abb. 52: Aufhebung des heterogenen Expressionsverhaltens von P_{tcaA} nach der Deletion von $ymoA$. Mikroskopische Darstellung von W22703 $\Delta ymoA$ - $P_{tcaA}::mCherry$ bei 100-facher Vergrößerung nach dreitägiger Inkubation bei 15°C (von links nach rechts: Phasenkontrast, Fluoreszenzkanal, Überlagerung beider Kanäle).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass YmoA die bistabile Expression von *tcaA* vermittelt. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Deletion von *ymoA* nicht nur zu einer Aktivierung des *tcaA*-Promotors, sondern auch in einer verstärkten Bildung dieses Proteins resultiert. Zu diesem Zweck wurde TcaA mit dem Fluoreszenzprotein mCherry fusioniert. Durch die translationale Fusion von TcaA mit mCherry geht eine Produktion von mCherry immer mit der Bildung von TcaA einher. Dadurch können Rückschlüsse auf die Expressionsrate und Translationseffizienz sowie auf die zeitliche und räumliche Lokalisierung der Toxinkomponente in der Zelle gezogen werden. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pUTs *tcaA::mCherry* über Konjugation in den Stamm W22703 eingebracht. Der resultierende Stamm W22703 *tcaA::mCherry* wurde auf selektivem LB-Agar ausgestrichen und bei 15°C bzw. 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz mit Hilfe der IVIS-Kamera und des Fluoreszenzmikroskops untersucht. Nach einem Tag Inkubation bei 37°C konnte mit Hilfe der IVIS-Kamera keine Fluoreszenz oberhalb der Hintergrundfluoreszenz detektiert werden. Dieses Ergebnis konnte qualitativ auf Einzelzellebene bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnten nach einer dreitägigen Inkubation des Stammes bei 15°C vereinzelt rot fluoreszierende Bakterien detektiert werden. Etwa 1% der untersuchten Zellen wiesen eine rote Fluoreszenz auf (Abb. 53 A). Dieser Prozentsatz stimmt gut mit dem beobachteten Wert der Zellen überein, deren *tcaA*-Promotor unter diesen Bedingungen aktiv ist.

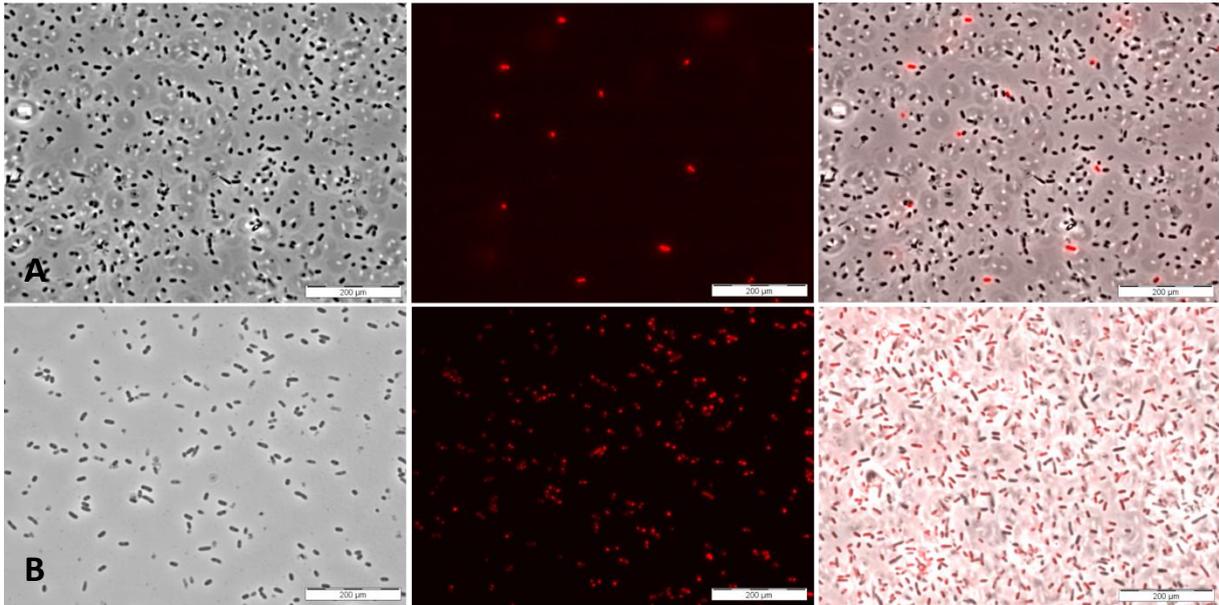


Abb. 53: Die Produktion von TcaA erfolgt nur in einem kleinen Teil der Population. Mikroskopische Darstellung von W22703 *tcaA::mCherry* (A) und W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA::mCherry* (B) bei 100-facher Vergrößerung nach dreitägiger Inkubation bei 15°C (von links nach rechts: Phasenkontrast, Fluoreszenzkanal, Überlagerung beider Kanäle).

Eine Deletion von *ymoA* führte zu einer deutlichen Erhöhung des Anteils *tcaA*-exprimierender Zellen. Der Prozentsatz der Toxin-produzierenden Zellen stieg von 1% auf ca. 84% der Zellen an (Abb. 53 B). Diese Beobachtung korreliert mit der erhöhten Promotoraktivität von *tcaA* im Stamm W22703 $\Delta ymoA$ $P_{tcaA}::mCherry$.

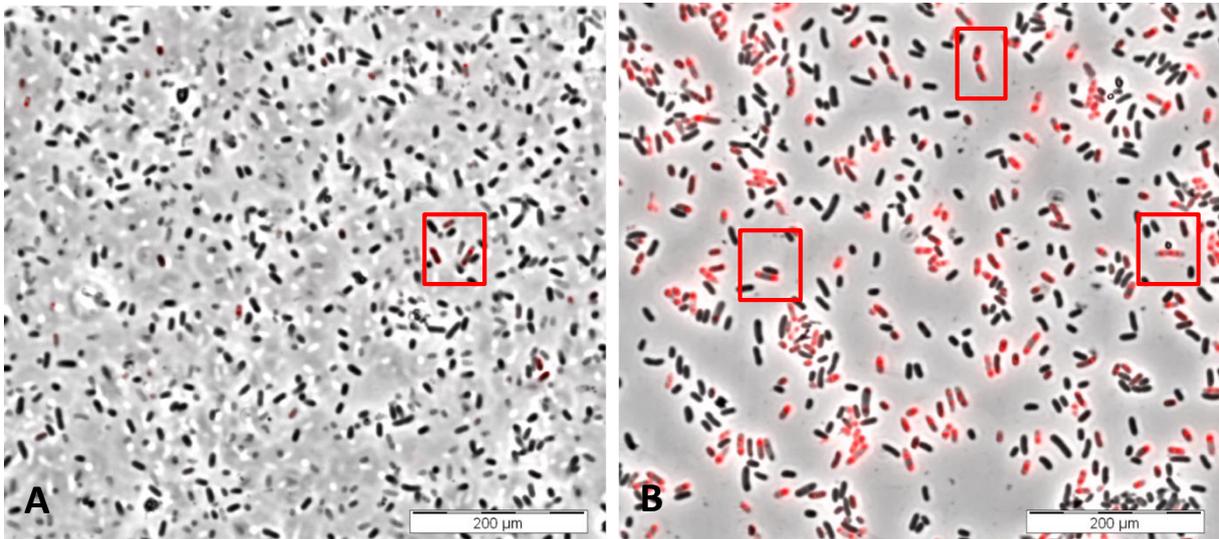


Abb. 54: Lokalisierung des TcaA-mCherry-Fusionsproteins an den Zellpolen. Mikroskopische Darstellung von W22703 *tcaA::mCherry* (A) und W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA::mCherry* (B) bei 100-facher Vergrößerung nach dreitägiger Inkubation bei 15°C; Überlagerung von Phasenkontrast und Fluoreszenzkanal; rotes Rechteck: Beispiele für die Lokalisierung des TcaA-mCherry-Fusionsproteins an den Zellpolen

Auffällig bei den beiden Stämmen W22703 *tcaA::mCherry* und W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA::mCherry* ist die Ansammlung des TcaA-mCherry-Fusionsproteins an den Zellpolen (Abb. 54). Eine solche spezifische Lokalisierung des Fluoreszenzproteins konnte bei der Promotorfusion nicht beobachtet werden und ist einzigartig für die Toxin-mCherry-Fusion.

3.7.3 TcaR2 vermittelt die heterogene Expression von *tcaA*

In vorherigen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass YmoA als Repressor von *tcaR2* und *tcaA* fungiert (3.5). Da die Deletion von *ymoA* zu einer starken Erhöhung des Anteils der *tcaA*-exprimierenden Zellen führt (von 1% im Wildtyp auf 84% in der *ymoA*-Deletionsmutante), sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob diese Erhöhung auf YmoA oder auf TcaR2 zurückzuführen ist. Hierzu wurde in den Stamm W22703 *P_{tcaA}::mCherry* der Überexpressionsvektor pBAD-*tcaR2* transformiert. W22703 *P_{tcaA}::mCherry* pBAD-*tcaR2* wurde sowohl bei 15°C als auch bei 37°C in Gegenwart und Abwesenheit von Arabinose inkubiert. Exemplarisch sind in Abb. 55 die mikroskopischen Aufnahmen der 15°C-Kultur gezeigt. Das Einbringen des Vektors pBAD-*tcaR2* führte bereits zu einer leichten Zunahme des Anteils fluoreszierender Zellen (Abb. 55 A). Nach Induktion der TcaR2-Überproduktion leuchteten ca. 90% der Zellen (Abb. 55 B). Bei 37°C konnte nach Einbringen des Vektors pBAD-*tcaR2* und Induktion der TcaR2-Überproduktion ebenfalls eine starke Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. A 23).

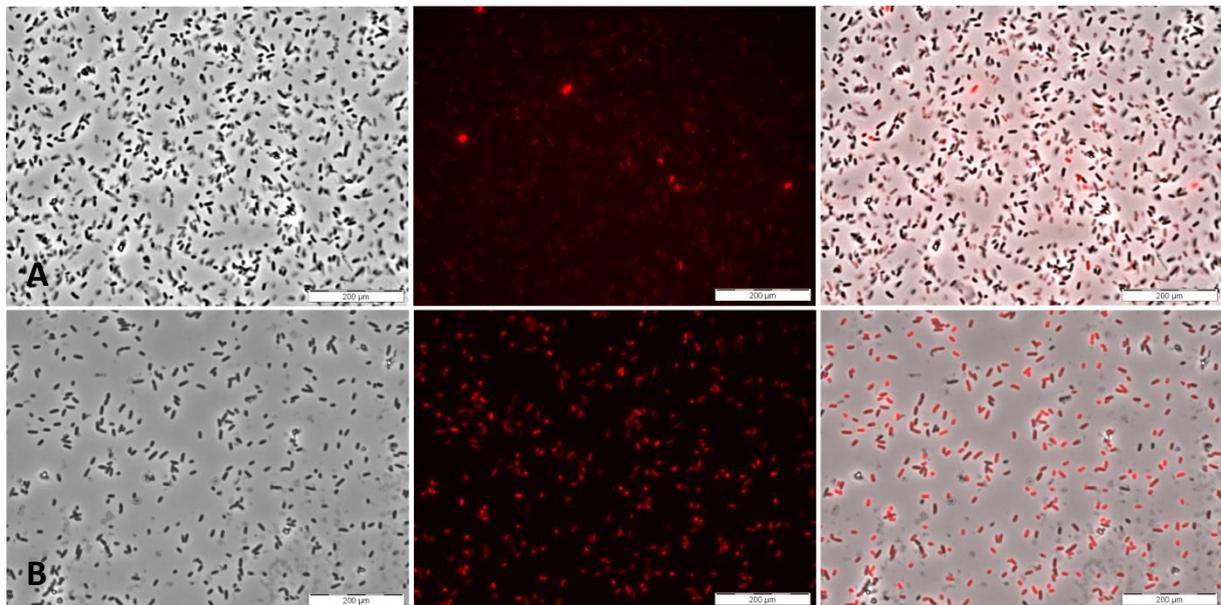


Abb. 55: Überexpression von TcaR2 hebt die Bistabilität des *tcaA*-Promotors auf. Mikroskopische Darstellung von W22703 *P_{tcaA}::mCherry* pBAD-*tcaR2* A) nicht induziert, B) induziert mit 0,2% Arabinose bei 100-facher Vergrößerung nach dreitägiger Inkubation bei 15°C; von links nach rechts: Phasenkontrast, Fluoreszenzkanal, Überlagerung beider Kanäle

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von TcaR2 auf den Prozentsatz der *tcaA*-exprimierenden Zellen untersucht. Hierzu wurde der Arabinose-induzierbare Vektor pBAD-*tcaR2* in den Stamm W22703 *tcaA::mCherry* transformiert. Obwohl nach der Überexpression von *tcaR2* in der *tcaA*-Promotorfusion nahezu alle Zellen fluoreszierten (Abb. 55), führte die Überproduktion von TcaR2 in der TcaA-mCherry-Fusion bei 15°C zu keiner signifikanten Erhöhung der Anzahl rot fluoreszierender Zellen (Abb. 56). Bei 37°C konnte keine Fluoreszenz detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

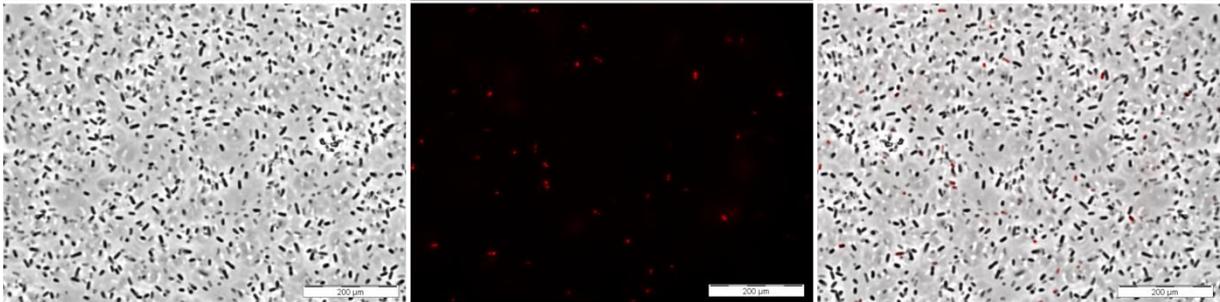


Abb. 56: Einfluss von TcaR2 auf die bistabile *tcaA*-Expression. Mikroskopische Darstellung von W22703 *tcaA::mCherry* pBAD-*tcaR2* induziert mit 0,2% Arabinose bei 100-facher Vergrößerung nach dreitägiger Inkubation bei 15°C; von links nach rechts: Phasenkontrast, Fluoreszenzkanal, Überlagerung beider Kanäle

Ein ähnliches Phänomen konnte bereits für die verschiedenen *lux*-Konstrukte beobachtet werden. Im Abschnitt 3.5.1.9 konnte gezeigt werden, dass die beiden YmoA/H-NS-Bindestellen an den Positionen -49 und +125 (ausgehend vom *tcaA*-Translationsstart) durch die Integration eines Reportergens hinter den *tcaA*-Promotor (Position -1) voneinander getrennt werden. Die Bildung einer DNA-Schleife, in der die RNA-Polymerase eingeschlossen ist, wird dadurch verhindert und die Repression durch YmoA/H-NS wird aufgehoben, wodurch sich eine Aktivität des *tcaA*-Promotors nach Überproduktion von TcaR2 in dem Konstrukt W228703 *P_{tcaA}::mCherry* sowohl bei 15°C als auch bei 37°C induzieren lässt. In dem Stamm W22703 *tcaA::mCherry* befindet sich das Reportergen dagegen an Position +2156 und damit hinter den beiden H-NS-Bindestellen, welche somit funktional bleiben. Die Repression der *tcaA*-Expression durch YmoA/H-NS bleibt in diesem Fall selbst nach TcaR2-Überproduktion erhalten. Damit scheint der Komplex aus YmoA und H-NS zu verhindern, dass ein zu großer Teil der Bakterienpopulation das insektizide Toxin produziert.

3.7.4 Die Bildung des LysR-ähnlichen Regulators TcaR2 ist bistabil

Im nächsten Schritt wurde der LysR-ähnliche Regulator TcaR2 mit dem Fluoreszenzprotein mCherry fusioniert. Hierzu wurde der Suizidvektor pUTs-*tcaR2::mCherry* via Konjugation in *Y. enterocolitica* W22703 eingebracht. Der resultierende Stamm W22703 *tcaR2::mCherry* wurde auf selektivem LB-Agar bei 15°C und RT inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Nach zwei Tagen Inkubation bei RT konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop vereinzelt rot fluoreszierende Zellen detektiert werden (Abb. 57 A). Obwohl das Expressionsmuster stark an die bistabile Expression von *tcaA* erinnert, liegt die Zahl der *tcaR2*-exprimierenden Zellen mit 0,1% deutlich unter der Zahl TcaA-produzierender Zellen (vgl. 3.7.1). Nach drei Tagen Inkubation des Stammes W22703 *tcaR2::mCherry* bei 15°C konnte bereits bei 1% der Zellen eine rote Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 57 B). Eine erneute Erniedrigung der Inkubationstemperatur auf 4°C führte zu einer weiteren Erhöhung des Prozentsatzes an *tcaR2*-exprimierenden Zellen. Nach 7 Tagen Inkubation bei 4°C konnte für 4% der Zellen eine TcaR2-mCherry-Produktion detektiert werden.

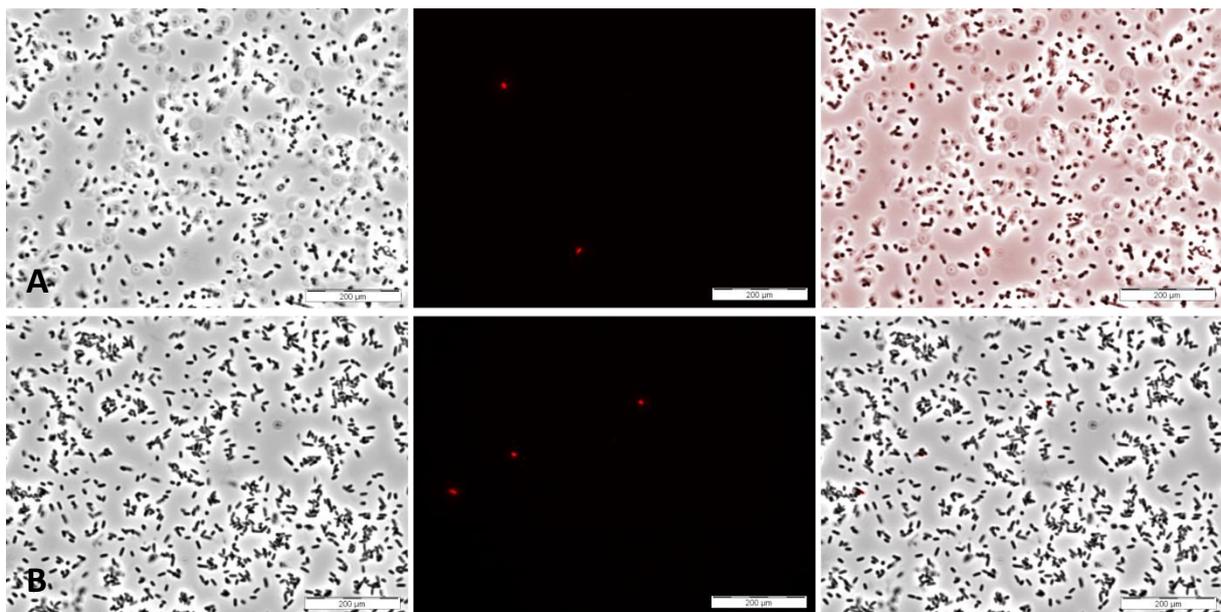


Abb. 57: Die TcaR2-Produktion erfolgt nur in einem kleinen Teil der Population. Mikroskopische Darstellung von W22703 *tcaR2::mCherry* bei 100-facher Vergrößerung nach zweitägiger Inkubation bei RT (A) und nach dreitägiger Inkubation bei 15°C (B); von links nach rechts: Phasenkontrast, Fluoreszenzkanal, Überlagerung beider Kanäle

Wie bereits unter 3.3.2 gezeigt werden konnte ist TcaR2 positiv autoreguliert. Ob sich die Autoregulation nicht nur auf der transkriptionalen, sondern auch auf der translationalen Ebene widerspiegelt, wurde mit dem Konstrukt W22703 *tcaR2::mCherry* pBAD-*tcaR2* untersucht. Der Stamm wurde bei 15°C in Gegenwart und Abwesenheit von 0,2% Arabinose inkubiert und nach drei Tagen Inkubation bei 15°C unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Bereits das Einbringen des Überexpressionsplasmides pBAD-*tcaR2* führte zu einer leichten Erhöhung des Prozentsatzes an *tcaR2*-

exprimierenden Zellen (Abb. 58 A). Nach Induktion der TcaR2-Produktion durch 0,2% Arabinose erhöhte sich die Zahl fluoreszierender Zellen von 1% auf ca. 30% (Abb. 58 B). Damit konnte die positive Autoregulation dieses Regulators auch auf Proteinebene bestätigt werden.

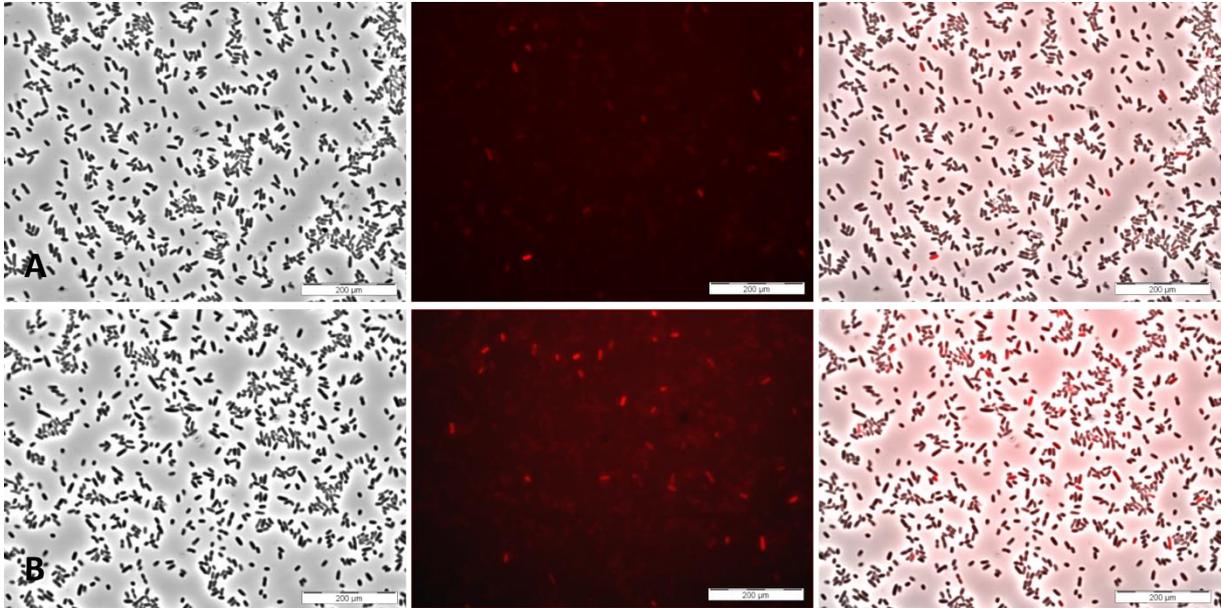


Abb. 58: Die Expression von *tcaR2* ist positiv autoreguliert. Mikroskopische Darstellung von W22703 *tcaR2::mCherry* pBAD-*tcaR2* A) nicht induziert, B) induziert mit 0,2% Arabinose bei 100-facher Vergrößerung nach dreitägiger Inkubation bei 15°C; von links nach rechts: Phasenkontrast, Fluoreszenzkanal, Überlagerung beider Kanäle

Anhand der oben beschriebenen Versuche konnte gezeigt werden, dass *tcaR2* bistabil exprimiert wird. Bei 15°C produzieren 0,1% bis maximal 1% der Zellen TcaR2. Die positive Autoregulation von TcaR2 konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Eine Überexpression von *tcaR2* führt zu einer deutlichen Erhöhung der Zahl an TcaR2-produzierenden Zellen. Neben der bistabilen Expression von *tcaR2* konnte in vorliegender Arbeit ebenfalls eine bistabile Expression von *tcaA* beobachtet werden.

3.8 Regulationsnetzwerk zur Expression der *tca*-Gene

Vorliegende Arbeit untersuchte die Expression und Regulation der insektiziden Toxingene innerhalb der Tc-PAI_{ve} von *Y. enterocolitica* W22703. Die Pathogenitätsinsel ist zwischen den beiden Genen YE3797 (*tcaR1*) und YE3798 (*tldD*) lokalisiert und besteht aus den Genen *tcaR2*, *tcaA*, *tcaB*, *tcaC*, *tccC* sowie vier phagenverwandten Genen zwischen *tcaC* und *tccC*. Bereits in ihrer Doktorarbeit konnte BRESOLIN zeigen, dass die Expression von *tcaA* nur bei niedrigen Temperaturen erfolgt. Bei einer Temperatur von 37°C ist die Expression dagegen vollständig reprimiert. Ziel dieser Arbeit war es daher den der temperaturabhängigen Expression von *tcaA* zugrunde liegenden Mechanismus aufzuklären. Eine Übersicht über das komplexe Regulationsnetzwerk von *tcaA* findet sich in nachfolgender Abbildung. In vorliegender Arbeit konnten YmoA sowie TcaR2 als Hauptantagonisten identifiziert werden. Bei niedrigen Temperaturen ist TcaR2 positiv autoregulierte und induziert die Expression der insektiziden Toxingene. Bei 37°C zeigt dieser Regulator dagegen eine geringe Proteinstabilität und wird durch Proteasen abgebaut. Darüber hinaus reprimiert der YmoA/H-NS-Komplex bei dieser Temperatur die Expression des Transkriptionsregulators sowie der insektiziden Gene. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die *tcaR2*-Expression durch *Quorum sensing* beeinflusst wird. So führt die Deletion der beiden *Quorum sensing*-Synthasen kodierenden Gene *luxS* und *yenI* zu einer deutlich erhöhten Expression. Zum Schluss konnte gezeigt werden, dass die Expression von *tcaA* *in vitro* bistabil erfolgt. Ein zusammenfassendes Modell zur heterogenen *tcaA*-Expression bei 15°C sowie zur Repression bei 37°C kann dem Abschnitt 4.5 entnommen werden.

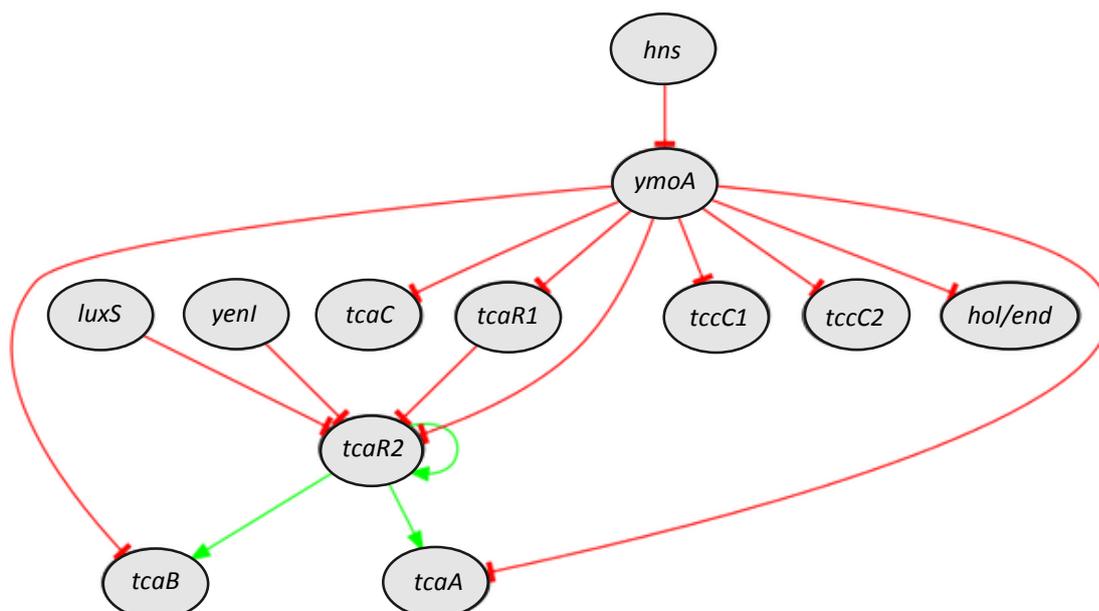


Abb. 59: Regulationsnetzwerk zur Temperaturabhängigen *tcaA*-Expression. Mit Hilfe der Online-Software GeNGe wurden Gene mit bekannter Beziehung in ein dynamisches Netzwerk eingeordnet. Rot steht hierbei für eine reduzierte Expression, während grün eine erhöhte Expression anzeigt. (<http://genge.molgen.mpg.de/>)

4 Diskussion und Ausblick

Die insektizide Pathogenitätsinsel Tc-PAI_{ve} von *Y. enterocolitica* W22703 umfasst ca. 19 kb und ist zwischen den Genen YE3797 (*tcaR1*) und YE3798 (*tldD*) lokalisiert. Die gefundenen ORFs wurden entsprechend ihrer Ähnlichkeit zu den *tc*-Genen aus *P. luminescens* benannt und umfassen die Gene *tcaA*, *tcaB*, *tcaC* sowie *tccC1*. *tcaC* und *tccC1* werden dabei von vier phagenverwandten Genen voneinander getrennt, welche vermutlich für ein Holin und Endolysin sowie für je ein putativ exportiertes und sekretiertes Protein kodieren. Dem Gen *tcaA* sind *tcaR1* und *tcaR2* vorangestellt, deren Genprodukte für Transkriptionsregulatoren der LTTR-Familie kodieren. Hierbei zählt *tcaR1* nicht zur eigentlichen Pathogenitätsinsel, da es im Genom aller beschriebenen *Yersinia* spp. gefunden werden kann [Bresolin *et al.*, 2006a]. In vorliegender Arbeit wurde neben der Expression und Regulation der *tc*-Gene von *Y. enterocolitica* W22703 auch die Funktion der Phagenproteine Holin und Endolysin untersucht. Die im Kapitel 3 beschriebenen Ergebnisse werden in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert.

4.1 Expression der *tc*-Gene in *Y. enterocolitica* W22703

Seit der ersten Beschreibung der *tc*-Gene in *P. luminescens* wurden weitere Homologe in einer Vielzahl verschiedener Bakterien gefunden. Darunter befinden sich nicht nur Insekten-assoziierte Mikroorganismen, wie *X. nematophila* und *S. entomophila*, sondern auch Bakterien, deren Lebensweise bisher keine bekannte Assoziation mit Insekten beinhaltet, wie beispielsweise *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens* und *Fibrobacter succinogenes* [French-Constant *et al.*, 2007]. *tc*-Gene können auch in einer Vielzahl von *Yersinia* spp., wie in *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. mollaretti*, gefunden werden, wobei diese immer in Form einer Pathogenitätsinsel angeordnet sind [Waterfield *et al.*, 2007]. Diese ist in den verschiedenen *Yersinia* spp. in einem hoch konservierten Bereich des Genoms, zwischen den Genen YE3797 (*tcaR1*) und YE3798 (*tldD*), lokalisiert und zeigt in der Regel die gleiche strukturelle Organisation: Auf das Gen *tcaR2*, welches für einen LysR-ähnlichen Regulator kodiert, folgen die *tc*-Gene *tcaA*, *tcaB*, *tcaC* und *tccC2*. Zwischen den beiden Genen *tcaC* und *tccC1* sind vier phagenverwandte Gene lokalisiert [Waterfield *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2008]. Einzige bisher beschriebene Ausnahme innerhalb der Gattung der *Yersinia* bildet *Y. entomophagous*. Die Pathogenitätsinsel dieser Spezies befindet sich nicht nur in einer anderen Region im Genom, sondern weist auch einen anderen Aufbau auf und enthält neben den *tc*-Genen Gene, die für Chitinasen kodieren [Hurst *et al.*, 2010]. Obwohl die Pathogenitätsinsel innerhalb der *Yersinia* spp. hoch konserviert ist, können erhebliche Unterschiede in

der Expression der *tc*-Gene beobachtet werden. Während für *Y. enterocolitica* T83 und *Y. pseudotuberculosis* IP32953 die Expression der *tc*-Gene *tcaA* und *tcaB* bei 37°C beschrieben wurde [Tennant *et al.*, 2005; Hares *et al.*, 2008], konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass bei dieser Temperatur keine Transkription der beiden *tc*-Gene *tcaA* und *tcaB* von *Y. enterocolitica* W22703 stattfindet. Auch für *Y. pestis* wurde eine solche temperaturabhängige Expression der *tc*-Gene beschrieben. In diesem Organismus zeigen die *tc*-Gene bei 21-26°C eine deutlich stärkere Transkription als bei 37°C [Motin *et al.*, 2004; Gendlina *et al.*, 2007]. Obwohl die Expression der *tc*-Gene in *Y. pestis* stark an die in *Y. enterocolitica* W22703 erinnert, gibt es auch hier signifikante Unterschiede. So konnte beispielsweise RICHTER in ihrer Diplomarbeit zeigen, dass die *tc*-Gene von *Y. enterocolitica* W22703 je monocistronisch transkribiert werden [Richter, 2008; Starke *et al.*, 2013], während die Gene *tcaA*, *tcaB* und *tcaC* sowie *tccC1* und *tccC2* in *Y. pestis* jeweils eine Transkriptionseinheit bilden [Gendlina *et al.*, 2007]. Auch in anderen Organismen, wie beispielsweise in *X. nematophilus* [Sergeant *et al.*, 2003], in *S. entomophila* sowie in *Y. frederiksenii* [Dodd *et al.*, 2006], werden die *tc*-Gene polycistronisch transkribiert. Obwohl für die beiden Gene *tcaA* und *tcaB* von *Y. enterocolitica* W22703 eine Expression bei 15°C nachgewiesen werden konnte, wiesen die beiden Gene *tcaC* und *tccC1* unter keiner der getesteten Bedingungen eine Transkriptionsaktivität auf. Für *tccC*-Gene wurde bereits in verschiedenen Organismen, wie beispielsweise in *Y. pseudotuberculosis* [Waterfield *et al.*, 2007] und *P. luminescens* [Münch *et al.*, 2008], beschrieben, dass sie unabhängig von anderen *tc*-Genen transkribiert werden. So weisen die Gene *tcaA* und *tcaB* aus *Y. pseudotuberculosis* nur bei Temperaturen oberhalb von 30°C eine Expression auf. Unabhängig davon wird *tccC* in diesem Organismus auch bei niedrigeren Temperaturen (15°C) exprimiert [Waterfield *et al.*, 2007]. *tccC*-Gene können, unabhängig des Vorhandenseins anderer *tc*-Gene, in einer Vielzahl unterschiedlicher Bakterien gefunden werden. Aufgrund dessen sowie aufgrund der oftmals konstitutiven Expression dieser Gene wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass die TccC-Proteine eine allgemeine zelluläre Funktion in der Zelle einnehmen und z.B. als Chaperone fungieren [Hinchliffe *et al.*, 2010]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die TccC-Proteine die eigentliche toxische Komponente innerhalb des nativen Tc-Komplexes darstellen [Lang *et al.*, 2010]. So führte z.B. die alleinige Überexpression von *tccC1* aus *X. nematophila* in *E. coli* zu einer starken Zunahme der Toxizität gegenüber Larven von *G. mellonella* [Joo Lee *et al.*, 2004].

Während *P. luminescens* gegen eine Vielzahl verschiedener Insekten aktiv ist [Bowen *et al.*, 1998b], wirken die Tc-Proteine aus *S. entomophila* spezifisch gegen den Engerling *Costelytra zealandica* [Hurst *et al.*, 2000]. Dies könnte auf die unterschiedliche Anzahl von *tccC*-homologen Genen in beiden Genomen zurückzuführen sein. Während *S. entomophila* nur ein *tccC*-Gen besitzt [Hurst *et al.*, 2000], können im Genom von *P. luminescens* TT01 sieben verschiedene *tccC*-Gene gefunden werden [Münch *et al.*, 2008]. Es wird vermutet, dass diese für die Infektion verschiedener Insekten und/oder

Gewebe verantwortlich sind. Dies wird dadurch bekräftigt, dass bei einer Infektion von *G. mellonella* mit *P. luminescens* W14 nur der Promotor von *tccC1* stark hochreguliert ist [Münch *et al.*, 2008]. Tatsächlich konnte für die zwei TcC-Proteine TccC3 und TccC5 aus *P. luminescens* eine unterschiedliche Wirkungsweise gezeigt werden [Aktories *et al.*, 2014]. So ist TccC3 z.B. in der Modifikation von Aktin involviert. Dies entzieht sich dadurch der Kontrolle des Regulatorproteins Thymosin und es kommt zur Polymerisation. Obwohl TccC5 ebenfalls zur Polymerisation des Aktins führt, ist seine Wirkungsweise eine andere. Es verändert das Verhalten der Rho-Proteine, welche in der Organisation und dem Umbau des Aktinzytoskeletts involviert sind. Durch die permanente Aktivierung der Proteine kommt es ebenfalls zur Aggregation des Aktins [Lang *et al.*, 2010]. Die beiden *tccC*-Gene von *Y. enterocolitica* W22703 könnten gleichermaßen nur bei der Infektion bestimmter Insekten exprimiert werden. Da in dieser Arbeit jedoch nur für das außerhalb der Tc-PAI_{ve} lokalisierte *tccC2* eine konstitutive Expression in LB-Medium detektiert werden konnte, könnte auch nur dieses Gen für den aktiven TcC-Komplex kodieren. So konnte z.B. für *P. luminescens* gezeigt werden, dass für die Ausbildung eines aktiven Toxinkomplexes keine physikalische Verlinkung der *tcdAB*-Gene mit dem *tccC*-Gen notwendig ist, das heißt, dass die Gene nicht in direkter Nachbarschaft in einem Gencluster angeordnet sein müssen. Die Überexpression der *tcdAB*-Gene von *P. luminescens* W14 in *P. luminescens* K122 vermittelte diesem Stamm eine orale insektizide Aktivität gegen *M. sexta* [Waterfield *et al.*, 2001a]. Die orale Toxizität kommt in der Regel nur zustande, wenn die drei Tc-Komplexe A, B und C vorhanden sind [Marokhazi *et al.*, 2003]. So verfügt *P. luminescens* K122 in seinem Genom über mehrere *tccC*-homologe Gene, welche, eventuell abhängig vom Wirt, in der Lage zu sein scheinen, den Tc-Komplex zu vervollständigen [Waterfield *et al.*, 2001a].

Lange Zeit waren weder die Wirkungsweise noch der molekulare Aufbau der nativen Tc-Toxine bekannt. Erst 2013 konnten GATSOGIANNIS *et al.* mit Hilfe von Kryo-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse die Struktur des funktionalen Toxinkomplexes von *P. luminescens* entschlüsseln [Gatsogiannis *et al.*, 2013]. Hierbei bilden die B- und C-Komponente einen heterodimeren Komplex, der eine hohle Struktur ausbildet und damit an einen Kokon erinnert. Im Inneren des Komplexes befindet sich die C-terminale Region von TcC, welche die toxische Komponente darstellt. Der C-Terminus wird autoproteolytisch durch eine interne Aspartatprotease von TcC abgespalten und liegt wahrscheinlich ungefaltet im Inneren des Kokons vor. Der Komplex bindet anschließend an die A-Komponente, die aus fünf Untereinheiten besteht und 20 Rezeptorbindedomänen aufweist, und für die Bindung des Toxinkomplexes an die Wirtszelle verantwortlich ist. Kommt es zur Änderung des pH-Wertes, öffnet sich die äußere Hülle des Toxins und ein Kanal wird freigegeben, durch welchen die toxische Komponente in die Wirtszelle transportiert wird [Gatsogiannis *et al.*, 2013; Meusch *et al.*, 2014]. Eine solche Konformationsänderung der Pore wird lediglich bei pH-Werten unterhalb von 4 und oberhalb von 11 induziert. Solche extremen pH-Werte kommen nur bei der

Ansäuerung von Endosomen im endolysosomalen Weg [Jensen *et al.*, 1973] als auch im Intestinaltrakt der Insekten vor [Dow, 1984]. Die Tc-Toxine von *P. luminescens* sowie von *Y. enterocolitica* W22703 weisen eine orale Toxizität auf [Bowen *et al.*, 1998a; Spanier *et al.*, 2010]. Dadurch könnte das Tc-Toxin die apikale Seite der Darmwand des Insektes penetrieren und die C-Untereinheit in die Wirtszelle übertragen werden, wo es nun seine tödliche Wirkung in der Zelle entfalten kann. Die C-Untereinheit weist zwar eine hoch konservierte N-terminale Region auf, ihr C-terminaler Bereich ist jedoch nicht konserviert und wird als hypervariable Region bezeichnet [Waterfield *et al.*, 2001b; Waterfield *et al.*, 2005]. Eine strukturbasierte Vorhersage aller bisher beschriebenen TcC-Proteine lässt vermuten, dass die C-terminale Region immer eine enzymatische Aktivität aufweist [Waterfield *et al.*, 2001b]. So ist diese Region im Fall von TccC3 und TccC5 von *P. luminescens* für die ADP-Ribosylierung der Zielproteine zuständig, was aufgrund ihrer veränderten Funktion zum Zusammenbruch des Zytoskeletts und letztendlich zum Zelltod führt [Lang *et al.*, 2010].

Homologe der Gene, die für die B- und C-Komponente kodieren, kommen in einer Vielzahl von verschiedenen Bakterien vor, oftmals auch in Abwesenheit der A-Komponente. So lassen sich in der Literatur viele Beispiele finden, in denen die B- und C-Komponenten weit voneinander entfernt vorliegen und trotzdem einen funktionalen Tc-Toxinkomplex ausbilden. Dadurch wird eine Austauschbarkeit einzelner Toxinkomponenten ermöglicht, was wiederum in einer erhöhten Flexibilität und Effektivität der Toxine gegen verschiedenen Gewebe und/oder Insekten resultieren könnte [Yang *et al.*, 2013]. In den beiden Humanpathogenen *Burkholderia rhizoxinica* und *Burkholderia pseudomallei* liegen die B- und C-Komponente dagegen als genetische Fusion in nur einem ORF vor. Auch in Prokaryoten der Gattung *Pseudomonas*, *Ralstonia* oder *Rhodococcus* bilden die B- und C-Komponente eine funktionelle Einheit [Waterfield *et al.*, 2007; Hinchliffe *et al.*, 2010]. Damit könnte diesen beiden Proteinen eine weitaus größere Rolle zukommen als nur in der Toxizität gegenüber Insekten. So stellt die C-Komponente einen evolutionären Angriffspunkt für die Erschließung neuer Wirte dar. Aktories *et al.* beschreiben beispielsweise, dass sich aufgrund der Ähnlichkeiten in der Sequenz oder in der dreidimensionalen Struktur bestimmter Zielproteine ein bakterielles Toxin schnell von einem Insekten- zu einem Humantoxin weiterentwickeln kann [Aktories *et al.*, 2011]. Ebenfalls eine große Rolle in der evolutionären Erschließung neuer Wirte könnte die A-Komponente mit ihren Rezeptorbindedomänen, die für die Wirts- oder Zellspezifität von großer Bedeutung zu sein scheinen, spielen. Hierbei ähnelt eine dieser Domänen sogenannten Neuraminidasen, Enzyme, die bei Viren, Bakterien und Säugetieren vorkommen und Sialinsäure-Reste abspalten können [Gatsogiannis *et al.*, 2013]. Im Vermehrungszyklus verschiedener Influenza-Viren spielt diese Abspaltung von Sialinsäure-Resten aus Glykoproteinen der Wirtszelloberfläche eine wichtige Rolle, sowohl bei der Infektion einer Zelle durch einen Virus als auch bei der anschließenden Freisetzung der Viren [Laver *et al.*, 1969]. Insbesondere die Identifizierung potenzieller Rezeptoren an

der Oberfläche der Wirtszelle sowie die Aufklärung ihrer Interaktion mit dem Toxin könnte neue Einblicke in die evolutionäre Entwicklung von Yersinien von einem Human- zu einem Insektenpathogen geben [Lang *et al.*, 2010].

Trotz erheblicher Unterschiede in der Expression der *tc*-Gene zwischen *Y. enterocolitica* W22703 und *P. luminescens* ist ihnen der Zeitpunkt der maximalen Transkription gemeinsam [Daborn *et al.*, 2001]. Für die beiden Gene *tcaA* und *tcaB* aus *Y. enterocolitica* W22703 konnte dies nicht nur mit Hilfe von Biolumineszenzmessungen, sondern auch mittels qRT-PCR gezeigt werden (3.4.3). Die Expression der *tc*-Gene in der späten exponentiellen Phase ließ in *P. luminescens* bereits die Frage aufkommen, ob das *Quorum sensing*-System an der Steuerung beteiligt ist [Daborn *et al.*, 2001]. Erste Hinweise dazu erbrachten KRIN *et al.*, die einen Einfluss der LuxS-Synthase auf die Expression der beiden *tc*-Gene *tcdA1* und *tccC1* zeigen konnten [Krin *et al.*, 2006] (vgl. auch 4.2.3). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *tc*-Gene von verschiedenen Bakterien eine große Diversität hinsichtlich des Aufbaus der PAI, der Anzahl der *tccC*-Gene, der Wirkungsweise und der Expression zeigen. Die verstärkte Expression der *tc*-Gene von *Y. enterocolitica* W22703 bei niedrigen Temperaturen scheint eine Anpassung an den Insektenwirt darzustellen. Es ist durchaus denkbar, dass die *tc*-Gene anderer Insektenpathogener, wie beispielsweise von *P. luminescens* und *S. entomophila*, bei Temperaturen unter 30°C stärker exprimiert werden. Die Expression der *tc*-Gene von *P. luminescens* wurde in der Literatur jedoch nur in einem Temperaturbereich von 28-30°C hinreichend untersucht [Bowen *et al.*, 1998a]. Es ist daher ungewiss, wie sich die Expression der insektiziden Gene in diesem Bakterium bei niedrigen Temperaturen (10-20°C) verhält. *tc*-Gene, deren Proteine eine toxische Aktivität gegen humane Zellen aber nicht gegen Insektenzellen besitzen, wie beispielsweise aus *Y. enterocolitica* T83 [Tennant *et al.*, 2005] und *Y. pseudotuberculosis* [Hares *et al.*, 2008], haben sich in ihrer Expression ebenfalls an den Wirt angepasst und werden zwischen 30-37°C maximal exprimiert. Aufgrund der hohen Konservierung der A-, B- und C-Komponente des Tc-Toxins in insekten- und humanpathogenen Bakterien ist ein genereller Mechanismus der Translokation des Tc-Komplexes wahrscheinlich.

4.2 Regulation der Expression der *tc*-Gene von *Y. enterocolitica* W22703

4.2.1 Rolle der beiden LysR-ähnlichen Regulatoren in der Expression der *tc*-Gene

Mit Hilfe von Protein-BLAST konnte gezeigt werden, dass die beiden Regulatoren TcaR1 und TcaR2 zu der Familie der LTTR gehören (3.3). Mittels Homologievergleich von TcaR2 über BLASTP in den Datenbanken des NCBI wurden außerhalb der Gattung der *Yersinia* keine weiteren Homologe gefunden. TcaR1 dagegen weist signifikante Homologien zu AaeR, dem Aktivator der Effluxpumpe AaeXAB in *E. coli* [Ogura *et al.*, 2009] sowie zu den Regulatoren CrgA von *N. meningitidis*, AphB von *Vibrio cholerae* und PtxR von *P. aeruginosa* auf, welche alle in der Regulation von Virulenzfaktoren eine große Rolle spielen. TcaR1 zeigt im Vergleich zu TcaR2 eine weitaus geringere Variabilität im C-terminalen Bereich und es konnte mittels der Software Ligand 3 eine putative Eisenbindestelle in der Linker-Region des Proteins vorhergesagt werden (siehe auch 4.5). Der geringe Grad an Konservierung im C-terminalen Bereich von LTTR ist wahrscheinlich darin begründet, dass verschiedene Regulatoren verschiedene Effektoren und somit auch zugehörige unterschiedliche Effektorbindedomänen für ihre Aktivität benötigen [Schell, 1993]. LTTR liegen häufig benachbart zum Zielgen und werden meist divergent dazu transkribiert [Schell, 1993]. Durch diese Organisation erfolgt oft eine negative Autorregulation des Transkriptionsregulators [Schell, 1993]. Im Fall der Tc-PAI_{Y_e} von *Y. enterocolitica* W22703 werden die beiden Regulator-kodierenden Gene *tcaR1* und *tcaR2* nicht divergent zu *tcaA* transkribiert. Die direkte Nachbarschaft der beiden Gene zu dem insektiziden Gen *tcaA* sowie die Tatsache, dass zwischen den kodierenden Regionen von *tcaA* und *tcaR2* nur 78 bp liegen, ließ eine Überlappung des *tcaA*-Promotors mit der kodierenden Region von *tcaR2* vermuten. Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *tcaA* mittels 5'-RACE bestätigte diese Vermutung und führte im weiteren Verlauf der Arbeit dazu, dass nur noch mit einer 5'-Teildeletion von *tcaR2* gearbeitet wurde (siehe auch 3.3.4). Der Transkriptionsstartpunkt von verschiedenen LTTR ist sehr variabel und kann bis zu mehreren 100 bp vor dem Translationsstart liegen. Beispiele hierfür sind *virR* aus *Rhodococcus equi* [Russell *et al.*, 2004] und *lcrF* aus *Y. pseudotuberculosis* [Böhme *et al.*, 2012]. Hierbei könnte eine lange 5'-UTR in der Stabilisierung der RNA beteiligt sein oder, wie bei *prfA* von *Listeria monocytogenes*, ein RNA-Thermometer darstellen [Johansson *et al.*, 2002]. Ein weiteres Charakteristikum von LTTR ist, dass sie monocistronisch transkribiert werden [Raskin *et al.*, 2003]. Für *tcaR1* und *tcaR2* konnte dies mit Hilfe von Reverser Transkriptase-PCR ebenfalls gezeigt werden [Starke *et al.*, 2013]. Die meisten LTTR sind autoregulatorisch und reprimieren ihre eigene Expression [Tropel *et al.*, 2004]. Der Promotor von *tcaR2* zeigt eine starke Abhängigkeit von der TcaR2-Proteinkonzentration, was auf eine positive Autoregulation von *tcaR2* hindeutet. Für TcaR1 konnte eine solche Abhängigkeit dagegen nicht beobachtet werden (3.3.2). Nach der nativen Aufreinigung von TcaR2 lag das Protein hauptsächlich als Di- und Tetramer in Lösung vor (3.3.2). LTTR fungieren oftmals als Tetramere, wodurch es ihnen

möglich ist lange DNA-Sequenzen zu überspannen [Hryniewicz *et al.*, 1994]. Mit Hilfe von EMSAs konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass TcaR2 an die Promotoren von *tcaR2*, *tcaA* und *tcaB* bindet (3.3.5). Die Bindung an den Promotor von *tcaA* wurde näher untersucht und es konnte eine DNA-Region von 420 bp identifiziert werden, an die TcaR2 bindet. Ausgehend vom Transkriptionsstart von *tcaA* konnte eine AT-reiche Sequenz mit der Konsensussequenz T-N₁₁-A an der Position -71 bis -59 identifiziert werden. Diese Region könnte die Erkennungsbindestelle von TcaR2 darstellen. Unklar ist jedoch, ob TcaR2 auch an die ABS bindet. LTTR binden außerdem in Abwesenheit des Effektors an die RBS, nicht jedoch an die ABS. Für TcaR2 konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Effektor identifiziert werden. Dies könnte folgende Ursache haben: durch die native Aufreinigung von TcaR2 lag dieses Protein bereits im Effektor-gebundenen Zustand vor. Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, dass für denaturierend aufgereinigtes TcaR2 auch nach seiner Rückfaltung keine Bindung an die Promotoren von *tcaR2* und *tcaA* im EMSA beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Zur Klärung der Frage, ob TcaR2 einen Effektor zur Aktivierung der Transkription benötigt oder nicht, könnten Kristallisationsanalysen durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Durchführung von EMSAs mit Zellextrakten [Elewaut *et al.*, 1999; Ellermeier *et al.*, 2003]. In diesen sollte TcaR2 im Effektor-gebundenen Zustand vorliegen und durch die Bindung an die RBS und die ABS im EMSA zur Ausbildung von zwei DNA-Protein-Komplexen mit unterschiedlicher Größe führen. Bislang konnten nicht für alle LTTR die zugehörigen Effektoren identifiziert werden. So ist beispielsweise der Effektor für BlaA aus *Streptomyces* spp., dem Regulator der Gene für eine β -Lactamase, nicht bekannt [Raskin *et al.*, 2003]. Es gibt aber auch LTTR die keinen Effektor zur Aktivierung benötigen. Das bekannteste Beispiel hierfür ist OxyR aus *E. coli*. OxyR reguliert die Expression des Peroxid-Stimulons, dessen Produkte oxidativen Stress in Form von H₂O₂ eliminieren [Farr *et al.*, 1991]. Die Aktivierung von OxyR erfolgt nicht über einen Effektor, sondern durch Bildung einer Disulfidbrücke innerhalb des Proteins durch Oxidation eines Cystein-Restes [Schell, 1993; Zheng *et al.*, 1998]. Für den positiv autoregulierten LysR-ähnlichen Regulator YtxR aus *Y. enterocolitica* konnte ebenfalls noch kein Koinduktor identifiziert werden. YtxR induziert die Expression des *ytxAB*-Lokus, welcher für ein putatives ADP-ribosylierendes Toxin kodiert [Axler-Diperte *et al.*, 2006]. Auch für andere positiv autoregulierende LTTR, wie beispielsweise LrhA von *E. coli*, HexA und PecT von *Erwinia* spp., konnte noch kein Effektor identifiziert werden [Gibson *et al.*, 1999]. Alle drei Regulatoren kontrollieren die Expression von Genen die in der Flagellenbildung, Mobilität oder Chemotaxis beteiligt sind. Wie die Regulatoren induziert werden ist noch unklar, sie scheinen jedoch zusammen mit YtxR aus *Y. enterocolitica* eine neue Gruppe von LTTR darzustellen, welche positiv autoreguliert sind und deren Expression effektorunabhängig zu sein scheint [Maddocks *et al.*, 2008]. Mit TcaR2 könnte in vorliegender Arbeit ein weiteres Mitglied dieser Gruppe identifiziert worden sein.

In vorliegender Arbeit wurde der Einfluss der beiden LysR-ähnlichen Regulatoren TcaR1 und TcaR2 auf die Promotoraktivität der in der Tc-PAI_{ve} lokalisierten Gene untersucht. Hierbei führte die Deletion von *tcaR1* bei 15°C und 37°C zu einer stark erhöhten Expression von *tcaR2* (3.3.3). Auf die Aktivität der anderen Promotoren hatte die Deletion von *tcaR1* bei beiden Temperaturen jedoch keinen signifikanten Einfluss. Nur für *tcaA* und *tcaB* konnte bei 15°C eine leichte Steigerung der Biolumineszenzwerte detektiert werden. Die Überexpression von TcaR1 führte wiederum zu einer deutlichen Minderung der *tcaR2*-Promotoraktivität sowie zu einer leichten Abnahme der gemessenen Biolumineszenzwerte von *tcaA* und *tcaB* bei 15°C. TcaR1 fungiert demnach als Repressor von TcaR2 (3.3.3).

Die Deletion von *tcaR2* führte bei 15°C zu einem vollständigen Verlust der *tcaA*- und *tcaB*-Transkriptionsaktivität. Damit ist TcaR2 essentiell für die Expression der beiden Gene. Da *tcaA* und *tcaB* beide für die Toxinkomponente A kodieren, ist eine gemeinsame Regulation zu erwarten gewesen. Auf die restlichen Gene der Pathogenitätsinsel sowie auf *tccC2* hatte die Deletion von *tcaR2* jedoch keinen Einfluss (3.3.7). In nachfolgenden Arbeiten sollte TcaR2 mit Hilfe des Arabinose-induzierbaren Vektors pBAD in den beiden Stämmen W22703 P_{tcaC}::*lux* und W22703 P_{tccC1}::*lux* überexprimiert werden, um eine TcaR2-unabhängige Regulation dieser Gene bestätigen oder widerlegen zu können. Für eine vollständige insektizide Aktivität sind alle drei Komponenten des nativen Toxinkomplexes erforderlich [Marokhazi *et al.*, 2003]. Daher ist eine gemeinsame Regulation der *tc*-Gene durch TcaR2 in diesem Zusammenhang wahrscheinlich. Da Transkriptionsfaktoren in der Regel in sehr geringen Konzentrationen in der Zelle vorkommen [Veening *et al.*, 2008], wäre es interessant zu wissen, ob sich die beiden Promotoren von *tcaC* und *tccC1* durch eine TcaR2-Überproduktion induzieren lassen. Darüber hinaus sollte auch die TcaR2-Abhängigkeit von *tccC2* untersucht werden. Dieses Gen, das außerhalb der Tc-PAI_{ve} lokalisiert ist, weist eine konstitutive Expression bei 15°C und 37°C auf, weshalb eine TcaR2-unabhängige Expression in Betracht gezogen werden sollte.

In dieser Studie führte eine Überexpression von TcaR2 zu einer deutlichen Erhöhung der *tcaR2*-Promotoraktivität bei 15°C und bei 37°C (3.3.2). Die *tcaR2*-Expression ist damit positiv autoreguliert. Obwohl TcaR1 und TcaR2 die Expression der ihnen benachbarten Gene regulieren, erfolgt dies nicht wie für LTTR typisch in einer divergenten Art und Weise [Schell, 1993]. Wie mit Hilfe von qRT-PCR und Promotor-Reportergen-Fusionen gezeigt werden konnte, ist die Expression von *tcaR2*, *tcaA* und *tcaB* kälteinduziert und abhängig von TcaR2. Offen bleibt die Frage, wie die Induktion durch die Temperatur erfolgt. Auf dem Weg von einem auf der DNA kodierten Gen, über ein RNA-Molekül zum Protein gibt es zahlreiche Stationen, an denen die Genexpression kontrolliert werden kann. Die temperaturabhängige Regulation kann durch Konformationsänderungen und Stabilität der DNA, RNA und Proteine ausgeführt werden [Hurme *et al.*, 1998].

Die direkte Wahrnehmung von Umweltfaktoren durch die mRNA hilft der Zelle Zeit und Energie zu sparen, in dem die Synthese von nicht benötigten Proteinen bereits in einem frühen Stadium gestoppt wird [Serganov *et al.*, 2007]. Hierbei können Temperaturänderungen direkt von der mRNA wahrgenommen werden. Das Prinzip von sogenannten RNA-Thermometern ist dabei vergleichsweise einfach und kommt ohne Beteiligung zusätzlicher Faktoren aus [Narberhaus *et al.*, 2006]. Daher wurde zunächst die mRNA von *tcaR2* und, repräsentativ für die A-Toxinkomponente, von *tcaA* mittels MFold auf eventuelle Konformationsänderungen bei 15°C und 37°C untersucht [Zuker, 2003]. Die mittels Mfold generierten Strukturen für *tcaR2* und *tcaA* wiesen bei 15°C und 37°C keine signifikanten Unterschiede auf (3.4.5). In der Literatur beschriebene Beispiele von RNA-Thermometern wie *rpoH* aus *E. coli* [Morita *et al.*, 1999a; Morita *et al.*, 1999b], welches für die Hitzeschockantwort kodiert, sowie die an der Virulenzantwort beteiligten mRNAs von *prfA* aus *L. monocytogenes* [Narberhaus *et al.*, 2006] sowie *IcrF* aus *Y. pseudotuberculosis* [Böhme *et al.*, 2012] verhindern die Translation der Gene bei niedrigen Temperaturen. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu der Expression von *tcaR2* und *tcaA*, welche ihr Maximum bei 15°C aufweist. In der Literatur ist bis jetzt nur ein Beispiel beschrieben, in dem ein RNA-Thermometer bei niedrigeren Temperaturen aktiv ist. Dieses stammt aus dem Phagen Lambda und kodiert für das CIII-Protein, welches darüber entscheidet, ob der Phage in den lytischen oder lysogenen Zyklus eintritt. Bei physiologischen Temperaturen liegt die Ribosomenbindestelle des *cIII*-Genes des Phagen Lambda frei vor. Das Protein wird synthetisiert und der Phage tritt in den lysogenen Zyklus ein. Bei höheren Temperaturen wird eine RNA-Sekundärstruktur ausgebildet, in welcher die Ribosomenbindestelle und das Startcodon blockiert vorliegen. Aufgrund des Fehlens des CIII-Proteins wird der lytische Zyklus eingeleitet [Altuvia *et al.*, 1986; Altuvia *et al.*, 1989; Altuvia *et al.*, 1991]. Nach dem die Ergebnisse von Mfold nicht auf ein *tcaR2*-/*tcaA*-RNA-Thermometer hindeuteten, wurde die Stabilität der mRNA von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* untersucht. Entscheidend für die Stabilität der mRNA ist die Ausbildung von Haarnadelstrukturen an ihren Enden [Brawerman, 1990]. Diese Sekundärstrukturen können als Stabilisatoren dienen und die mRNA vor 3' 5'-Exonukleasen oder das 5'-Ende vor Endonukleasen wie RNase E schützen [Rauhut *et al.*, 1999]. Die Transkripte von *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* zeigen bei 15°C untereinander ähnliche Halbwertszeiten und damit eine vergleichbare Stabilität (3.4.4). Bei 37°C sind die Halbwertszeiten leicht verkürzt, was auf eine höhere Aktivität der mRNA-abbauenden Enzyme zurückzuführen sein könnte [Arrhenius, 1889]. Am Abbau der mRNA sind mindestens sechs verschiedene Enzyme beteiligt, welche zusammen einen Komplex und damit das Degradosom bilden [Coburn *et al.*, 1999; Rauhut *et al.*, 1999]. Die Halbwertszeit durchschnittlicher bakterieller mRNA liegt im Bereich von wenigen Minuten. Für *E. coli* wurde eine Halbwertszeit der mRNA zwischen 40 s und 20 min beschrieben. Die durchschnittliche Halbwertszeit beträgt drei bis fünf Minuten [Pedersen *et al.*, 1978] und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die für *tcaR1*, *tcaR2* und *tcaA* bestimmten Halbwertszeiten bei 15°C und 37°C. Diese auf den ersten Blick kurzen Zeiten

erlauben der Bakterienzelle eine größere Flexibilität und eine raschere Umstellung der Genexpression bei veränderten Umweltbedingungen. Diese Ergebnisse schließen eine Regulation der kälteinduzierten Expression der insektiziden Gene *tcaA* und *tcaB* auf mRNA-Ebene zwar nicht aus, da die Stabilität bzw. die Struktur der mRNA und damit die Genexpression zusätzlich durch die Bindung von Ribosomen, Proteinen, anderen Nukleinsäuren oder kleinen Liganden wie Metall-Ionen oder organischen Molekülen beeinflusst werden kann [DiMari *et al.*, 1993; Agaisse *et al.*, 1996; Waters *et al.*, 2009], im nächsten Schritt wurde jedoch der Fokus auf die proteinbiochemischen Eigenschaften von TcaR2 gelegt.

Von Proteinen ist bereits länger bekannt, dass sie sensorische und regulatorische Funktionen auf die Zelle ausüben. Es gibt zahlreiche Beispiele für Proteinthermosensoren, da die Temperatur einen großen Einfluss auf die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen ausübt [Klinkert *et al.*, 2009]. Eines der bekanntesten Beispiele ist das TlpA-Protein von *S. enterica*. Dieses Protein, welches vermutlich in der Virulenz von Salmonellen beteiligt ist, wurde als autoregulatorischer Repressor beschrieben, der sowohl in monomerer als auch in dimerer Form vorliegen kann. Das Gleichgewicht ist von der Temperatur und von der Konzentration abhängig. Bei niedrigen Temperaturen bildet TlpA in seiner dimeren Form sogenannte „coiled-coil“-Domänen aus. Darüber kann es an seinen eigenen Promotor binden und eine Unterdrückung der Transkription von *tlpA* bewirken. Bei 37°C wird das Gleichgewicht zwischen monomerer und dimerer Form auf die Seite der inaktiven, ungefalteten monomeren Form verschoben, wodurch es zur verstärkten Transkription von *tlpA* kommt [Hurme *et al.*, 1996; Hurme *et al.*, 1997]. Ob TcaR2 bei 37°C ebenfalls einer Konformationsänderung ausgesetzt ist, welche die Bindung an die Promotoren von *tcaR2* sowie *tcaA* und *tcaB* bei dieser Temperatur verhindert, wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Diese Methode nutzt die Tatsache, dass chirale Moleküle, wie z.B. Proteine, rechts- und linkshändig zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Reine α -helikale Polypeptide, wie beispielsweise Poly-L-Lysin bei einem pH-Wert unter 10, besitzen zwei starke negative Banden mit Minima bei 208 und 222 nm. Dagegen liegt in reinen β -Faltblättern ein schwächeres Signal bei 215 nm vor. Beide Sekundärstrukturen heben sich damit deutlich vom CD-Spektrum ungeordneter Strukturen (*random coil*) ab. Da in Proteinen oftmals mehrere Sekundärstrukturen nebeneinander vorliegen, kommt es allerdings zu einer Überlagerung der einzelnen CD-Effekte [Johnson, 1990]. Das CD-Spektrum von TcaR2 besitzt ein absolutes Minimum bei 208 nm sowie ein lokales Minimum bei 222 nm. Beide Minima weisen auf einen erhöhten α -helikalen Anteil, wie er für LTTR charakteristisch ist, hin [Schell, 1993]. Die CD-Spektren von TcaR2 in einem Temperaturbereich von 4°C bis 37°C verhalten sich stabil und weisen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf (3.4.1). Dies schließt zwar nicht aus, dass die Temperatur bei 37°C keine konformationellen Änderungen bei TcaR2 hervorruft, jedoch beeinflusst sie offensichtlich nicht den Gehalt an α -Helices, β -Faltblätter und Schleifen. Um zu testen, ob die Temperatur einen Einfluss auf

das Bindeverhalten von TcaR2 an die Promotoren von *tcaR2* und *tcaA* hat, wurden EMSAs bei 4°C, 15°C und 37°C durchgeführt und die entsprechenden Bindungskonstanten ermittelt (3.3.5). Es konnte zwar gezeigt werden, dass TcaR2 eine höhere Bindeaffinität zu seinem eigenen Promotor als zu *tcaA* aufweist, jedoch ist die Bindung unabhängig von der Temperatur. Generell liegen die ermittelten K_D -Werte mit ca. 10^{-7} mol/l in einem für LTTR typischen Bereich. So können für LysR-ähnliche Regulatoren aus *P. putida* und *Comamonas testosteroni* in der Literatur Angaben von 7×10^{-11} mol/l [Parsek *et al.*, 1994] bis $0,9 \times 10^{-6}$ mol/l [Tralau *et al.*, 2003] gefunden werden. Neben Konformationsänderungen können Proteinthermosensoren die Genexpression auch durch ihre Stabilität beeinflussen [Schumann, 2007]. Hierbei wird die Halbwertszeit von Proteinen, und damit ihre Stabilität, von der Abbaurate durch Proteasen bestimmt. Unter 3.4.6 konnte gezeigt werden, dass TcaR2 bei 37°C deutlich instabiler ist als bei 15°C und bei dieser Temperatur verstärkt durch Proteasen abgebaut wird. Hierbei können jedoch keine Aussagen dazu getroffen werden, welche Proteasen in den Abbau von TcaR2 involviert sind. In dem Genom von *Y. enterocolitica* W22703 können mindestens 18 Gene gefunden werden, welche für mögliche Proteasen kodieren [Fuchs *et al.*, 2011]. Darunter findet sich unter anderem das Gen *tldD*, welches für eine putative Peptidase mit DNA-Gyrase-Aktivität kodiert und direkt an die insektizide Pathogenitätsinsel angrenzt. Eine Deletion von *tldD* zeigte jedoch keinen Einfluss auf die *tcaA*-Expression, was indirekt dafür spricht, dass TldD nicht in den Abbau von TcaR2 involviert ist (3.5). Eine häufig in Mikroorganismen vorkommende Protease ist die zytoplasmatische, ATP-abhängige Lon-Protease. Lon-Proteasen sind oftmals mit der Virulenz von pathogenen Bakterien assoziiert [Lee *et al.*, 2008]. So konnte beispielsweise für *S. typhimurium* gezeigt werden, dass die Lon-Protease essentiell für das intrazelluläre Überleben der Bakterien in Epithelzellen ist [Boddicker *et al.*, 2004]. In *Brucella abortus* ist eine Lon-defiziente Mutante im Mausmodell attenuiert [Robertson *et al.*, 2000] und in *P. aeruginosa* ist die Lon-Protease für Motilität und Biofilmbildung von Bedeutung [Marr *et al.*, 2007]. In Yersinien ist dieses Enzym bei 37°C für den Abbau des Proteinthermometers RovA verantwortlich. Bei einer Temperaturveränderung zwischen 25°C und 37°C kommt es in RovA zu einer reversiblen Konformationsänderung, welche die DNA-Bindung des Regulators reduziert und ihn dadurch sensitiver gegenüber der Proteolyse durch die Lon-Protease macht [Herbst *et al.*, 2009]. Neben der Lon-Protease spielt die ClpXP-Protease eine wichtige Rolle im kontrollierten Abbau von Proteinen [Gottesman *et al.*, 1998]. Auch diese Protease scheint in die Regulation der Virulenz vieler Pathogener, wie *L. monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* und *S. aureus*, involviert zu sein [Gaillot *et al.*, 2000; Frees *et al.*, 2003; Butler *et al.*, 2006]. Daneben katalysieren die Lon- und ClpXP-Protease den Abbau von fehlgefalteten oder aggregierten Proteinen und fungieren als ein Protein-Qualitätskontrollsystem [Gottesman, 2003]. Damit stellen die Lon- und die ClpXP-Protease geeignete Kandidaten für den Abbau von TcaR2 bei 37°C dar. In zukünftigen

Arbeiten sollte daher der Einfluss einer *lon*- und *clpXP*-Deletion auf die Stabilität von TcaR2 getestet werden.

Neben der hohen Instabilität von TcaR2 bei 37°C deuten die Biolumineszenzmessungen sowie die Daten aus der qRT-PCR auf eine stärkere Expression von *tcaR2* bei niedrigeren Temperaturen hin (3.3.2 und 3.4.3). Inwiefern sich das in dem nativen TcaR2-Protein-Gehalt der Zelle widerspiegelt, wurde mittels translationaler Fusion von TcaR2 mit mCherry überprüft (3.4.7). Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei 15°C der Gehalt an TcaR2-mCherry um ca. 1,5-fach höher ist als bei 37°C. Nur bei 15°C konnten größere Mengen des intakten Fusionsproteins detektiert werden. Bei 37°C wurden im Western Blot dagegen vor allem Abbauprodukte beobachtet. Dies, zusammen mit der Instabilität von TcaR2 bei 37°C, führt zu folgendem Regulationsmodell von *tcaA* und *tcaB*: Bei 15°C wird *tcaR2* verstärkt exprimiert. Aufgrund der positiven Autoregulation erhöht sich die TcaR2-Konzentration in der Zelle, es bindet an die Promotoren von *tcaA* und *tcaB* und führt zu deren Expression. Bei 37°C wird gebildetes TcaR2 dagegen durch Proteasen abgebaut, wodurch *tcaA* und *tcaB* nicht exprimiert werden können. Dieses Modell erklärt jedoch nicht folgenden Sachverhalt: Wird TcaR2 bei 37°C überexprimiert, kommt es zwar zu einer starken Induktion des Promotors von *tcaA*, die Transposonmutante W22703 *tcaA*(134)::*lux* zeigte unter diesen Umständen jedoch keine Transkription (3.5.1.9). Das ließ nur einen Schluss zu: Bei 37°C muss es noch einen weiteren, bis dahin unbekanntem Repressor geben.

4.2.2 Ein Komplex aus YmoA und H-NS reprimiert die Expression aller *tc*-Gene bei 37°C

Zur Identifizierung des repressorischen Faktors bei 37°C wurde der Einfluss verschiedener globaler *Yersinia*-Regulatoren auf die *tcaA*-Expression getestet (3.5). Hierbei führte die Deletion von *ymoA* zu einer moderaten *tcaA*-Expression bei 37°C. YmoA wurde erstmals 1991 von CORNELIS *et al.* in Verbindung mit der Expression des Enterotoxins Yst beschrieben [Cornelis *et al.*, 1991]. Da YmoA zwar das Expressionslevel von *yst* modulierte, nicht aber das Gen selbst regulierte, wählten CORNELIS *et al.* die Bezeichnung *Yersinia modulator A*, kurz YmoA. Heute wird YmoA allgemein als 8 kDa-großes Protein beschrieben, welches zur Familie der Hha-YmoA-Regulatoren zählt und einen Schlüsselfaktor in der Regulation diverser Virulenzgene von *Y. enterocolitica* in Abhängigkeit von biologischen Bedingungen wie Temperatur und Osmolarität spielt [Madrid *et al.*, 2007a]. YmoA weist eine 82%ige Homologie zu dem Modulator Hha des α -Hämolytins aus *E. coli* auf [de la Cruz *et al.*, 1992]. Die nahe Verwandtschaft beider Proteine zeigt sich auch dadurch, dass YmoA die Deletion von *hha* in *E. coli* komplementieren kann [Mikulskis *et al.*, 1994]. Weitere Mitglieder der Hha-YmoA-Familie können in einer Vielzahl von Enterobakterien, wie beispielsweise *Salmonella* spp. oder *P. luminescens*, gefunden werden [Madrid *et al.*, 2007b].

NIETO *et al.* beschrieben eine Koaufrreinigung von YmoA aus *Y. enterocolitica* mit H-NS und postulierten eine direkte Interaktion beider Proteine miteinander [Nieto *et al.*, 2002]. Da eine Deletion von *hns* in *Yersinia* spp. vermutlich letal ist [Heroven *et al.*, 2004; Ellison *et al.*, 2006], blieb die Deletion von *hns* in *Y. enterocolitica* W22703 ebenfalls erfolglos (Daten nicht gezeigt). Eine direkte Interaktion von YmoA und H-NS in diesem Stamm wurde daher mittels EMSAs gezeigt. So war homodimeres YmoA nicht in der Lage an den Promotor von *tcaA* zu binden (3.5.1.3). Bei der nativen Reinigung von YmoA aus *Y. enterocolitica* W22703 kam es, wie von NIETO *et al.* bereits beschrieben, zu einer Koaufrreinigung von YmoA mit H-NS [Nieto *et al.*, 2002]. Der H-NS/YmoA-Komplex war nunmehr in der Lage spezifisch an die Promotoren der *tc*-Gene zu binden (3.5.1.8).

H-NS gehört zur Familie der Nukleoid-assoziierten Proteine und fungiert als globaler Repressor in Enterobakterien [Spassky *et al.*, 1984; Spurio *et al.*, 1992]. Es bindet an mehr als 250 verschiedene Loci von *E. coli*, welche insgesamt etwa 1.000 Gene umfassen, und beeinflusst damit ca. 5% des Gesamtgenoms [Oshima *et al.*, 2006]. Neben der Rolle als globaler Repressor ist es, zusammen mit anderen NAPs wie Fis, Lrp und HU, an der Gliederung des Genoms in höhere Organisationseinheiten beteiligt [Dame, 2005]. Mit 20.000 Molekülen pro Zelle ist es das zweithäufigste NAP und könnte damit die chromosomale DNA in einem Abstand von 200 bp bedecken [Spassky *et al.*, 1984]. Obwohl das bakterielle Genom über wenige nicht-kodierende Regionen verfügt und daher nicht so rigide als Chromatin strukturiert ist, ist es in Schleifen, sogenannten Topodomänen, organisiert und erlangt somit eine gewisse Kompaktheit [Luijsterburg *et al.*, 2006]. H-NS ist ein insgesamt neutrales Protein mit einer molaren Masse von 15,6 kDa und besteht aus einer C-terminalen DNA-Bindedomäne sowie einer N-terminalen Dimerisierungsdomäne. Verbunden sind beide Bereiche durch einen flexiblen Linker, der für die Oligomerisierung notwendig ist [Shindo *et al.*, 1995]. Die N-terminale Dimerisierungsdomäne erlaubt neben homodimeren und oligomeren Strukturen außerdem die Ausbildung heteromerer Komplexe mit Proteinen der Hha-YmoA-Familie, was zu einer verstärkten Repression mancher Loci führt [Madrid *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2008]. Die Ausbildung von Heteromeren wird dadurch ermöglicht, dass der N-Terminus der Hha-YmoA-Proteine eine signifikante Ähnlichkeit zu der N-terminalen Dimerisierungsdomäne von H-NS aufweist [Nieto *et al.*, 2002; Ellison *et al.*, 2006]. Da diesen Proteinen jedoch eine C-terminale DNA-Bindedomäne fehlt, kommt es zur Ausbildung eines Heterodimers mit veränderten Bindeeigenschaften [Garcia *et al.*, 2006; Madrid *et al.*, 2007b; McFeeters *et al.*, 2007].

Lange Zeit wurde angenommen, dass H-NS unspezifisch an intrinsisch gekrümmte, AT-reiche DNA bindet [Yamada *et al.*, 1991]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass H-NS eine höhere Affinität zu DNA mit der Konsensussequenz TCGATATATT aufweist [Bouffartigues *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2007]. Obwohl H-NS mit großer Affinität an diese 10 bp Region bindet, bindet es mit geringerer Affinität auch an andere Stellen in der Promotorregion und der DNA [Fang *et al.*, 2008]. In der Literatur wird davon

ausgegangen, dass jeder Promotor der durch H-NS reprimiert wird, mehr als eine Bindestelle besitzt. So weist beispielsweise der Promotor von *bgl* mehr als zehn potenzielle H-NS-Bindestellen auf [Fang *et al.*, 2008].

Zum besseren Verständnis der repressorischen Wirkung von YmoA/H-NS auf die *tcaA*-Expression bei 37°C wurde die *tcaA*-Promotorregion sowie die kodierende Sequenz mittels ClustalW auf potenzielle H-NS-Bindestellen untersucht [Larkin *et al.*, 2007]. Es konnten vier DNA-Regionen gefunden werden, die eine hoch konservierte H-NS-Konsensussequenz enthalten [Starke *et al.*, 2014]. Davon sind drei in der Promotorregion lokalisiert und eine in den ersten 130 bp der kodierenden Sequenz (3.5.1.6). Die Bindung des YmoA/H-NS-Komplexes an diese DNA-Regionen wurde mittels EMSAs bestätigt. Zusammen mit den Biolumineszenzmessungen konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass YmoA, in Interaktion mit H-NS, die Expression von *tcaA* bei 37°C reprimiert.

Die durch H-NS vermittelte Repression kann auf mindestens drei verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. In der Literatur am häufigsten beschrieben ist der sogenannte „*Bridging*“-Zustand. Hierbei bindet H-NS sowohl vor als auch hinter dem Promotor, wodurch sich eine DNA-H-NS-DNA-Brücke ausbildet, in deren Schleife die RNA-Polymerase gefangen ist [Dame *et al.*, 2002]. Im zweiten Modell, dem sogenannten „*Stiffening*“-Zustand, liegt die H-NS-Bindestelle in relativer Nähe zum Transkriptionsstartpunkt. Durch Oligomerisierung von H-NS entlang der Promotorregion wird die RNA-Polymerase-Bindestelle besetzt und bereits gebundene RNA-Polymerase von der DNA verdrängt, wodurch die Transkription verhindert wird [Liu *et al.*, 2010]. In ihrer Veröffentlichung von 2010 konnten Liu *et al.* nachweisen, dass H-NS unter physiologischen Bedingungen polymerisiert an der DNA vorliegt, also im *Stiffening*-Zustand. Da dieser Zustand anfällig gegenüber Temperatur- und pH-Wert-Änderungen ist, könnte diesem eine größere Bedeutung in der Repression der Genexpression zukommen als zunächst gedacht. Das *Bridging*, welches stabil gegenüber Änderungen in der Temperatur und im pH-Wert ist, könnte dagegen bei der Verdichtung des Genoms eine Rolle spielen [Liu *et al.*, 2010]. Dem dritten Modell zufolge führt die Bindung von H-NS an die Promotor-DNA zu einer starken Veränderung der DNA-Topologie, wodurch die Bindung der RNA-Polymerase verhindert wird [Williams *et al.*, 1996]. Nach welchem Mechanismus die Repression der *tcaA*-Expression bei 37°C erfolgt ist unklar. Bei 37°C könnte durch die Bindung von YmoA/H-NS stromaufwärts vom *tcaA*-Promotor und an eine DNA-Sequenz innerhalb der kodierenden Region ein Nukleoprotein-Komplex gebildet werden, in dem die RNA-Polymerase eingeschlossen vorliegt und die Transkription auf einer frühen Stufe gehemmt wird. Denkbar ist allerdings auch, ausgehend von einer promotornahen Region, eine Repression durch Oligomerisierung des YmoA/H-NS-Komplexes entlang der DNA. Dies könnte zur Ausbildung eines Komplexes führen, der den Promotor für RNA-Polymerasen unzugänglich macht und somit die Transkriptionsinitiation von *tcaA* bei physiologischen Temperaturen verhindert. Warum die repressorische Wirkung dieses Komplexes bei 15°C nahezu aufgehoben ist, kann zum Teil mit dem

allgemeinen Oligomerisierungszustand von H-NS erklärt werden. Obwohl H-NS in Lösung als Di- und Tetramer vorkommt, wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass Tetramere die überwiegend physiologisch vorliegende und damit die aktive Form darstellen. Der Grad der Oligomerisierung ist dabei unter anderem von der Temperatur und der Osmolarität abhängig. STELLA *et al.* haben 2006 gezeigt, dass der Oligomerisierungsgrad bei Temperaturen unter 25°C deutlich geringer ist als bei 37°C [Stella *et al.*, 2006]. Neben der verminderten Oligomerisierung von H-NS spielt vermutlich auch die Menge von YmoA eine Rolle. Mit Hilfe von Western Blots konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass die Menge an YmoA im Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase bei 37°C etwa vierfach höher ist als bei 15°C. In der exponentiellen Phase ist die Menge dagegen bei beiden Temperaturen gleich.

BAÑOS *et al.* konnten eine Repression von *ymoA* durch H-NS in *Y. enterocolitica* W22703 zeigen [Baños *et al.*, 2008]. Hierbei führte die Überexpression von *hns* zu einer verminderten *ymoA*-Transkription. Eine ähnliche Beobachtung machten HOMMAIS *et al.* bereits für *hha* in *E. coli* [Hommais *et al.*, 2001]. Nachdem die Transkription von *hns* in der exponentiellen Phase stark reprimiert ist, steigt die intrazelluläre Konzentration von H-NS in der stationären Phase an und erreicht ca. 20.000 Moleküle pro Zelle [Spassky *et al.*, 1984; Ueguchi *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1996]. Dadurch nimmt die Menge von YmoA in der stationären Phase ab, während die Expression von *tcaR2* und der *tc*-Gene *tcaA* und *tcaB* zunimmt. Mit Hilfe von Western Blots wurde in vorliegender Arbeit gezeigt, dass bis dahin gebildetes YmoA stabil in der Zelle verbleibt (3.5.1.10). Dies steht im Gegensatz zu der für *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* beschriebenen Instabilität dieses Modulators bei 37°C. Ein Sequenzvergleich der YmoA-Proteine aus den unterschiedlichen *Yersinia* spp. zeigte eine 100%ige Übereinstimmung und erklärt damit nicht die unterschiedliche Abbaurate. Die Stabilität von YmoA in *Y. enterocolitica* W22703 könnte jedoch durch H-NS vermittelt werden. So wurde bereits für StpA beschrieben, dass es als Homomer bei 37°C von Lon-Proteasen abgebaut wird. Als Heteromer mit H-NS ist es jedoch vor dem Abbau geschützt [Johansson *et al.*, 1999]. Allgemein liegen Hha-YmoA-Proteine in der Zelle in einer viel geringeren Konzentration als H-NS vor, weswegen davon auszugehen ist, dass sie hauptsächlich als Heteromere mit H-NS vorkommen [Madrid *et al.*, 2007b]. Die durchgeführten Stabilitätsversuche zu YmoA wurden mittels SDS-Page und anschließendem Western Blot ausgewertet. Es ist daher nicht mehr unterscheidbar, ob YmoA im homo- oder heteromeren Zustand in der Zelle vorlag. Daher sollten die Stabilitätsversuche im Western Blot mit einer vorgeschalteten nativen Page wiederholt werden. Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedliche Stabilität von YmoA in *Y. enterocolitica* und *Y. pestis* könnte die Evolution und Entwicklung neuer regulatorischer Netzwerke durch YmoA sein. Eine ähnliche Beobachtung machten STOEDEL *et al.* für RovA, dem Regulator der Invasinexpression [Stoebel *et al.*, 2008]. Obwohl RovA in *Y. enterocolitica* und *Y. pestis* hoch konserviert ist, zeigen beide Spezies nur eine geringe

Übereinstimmung der Gene, welche durch RovA reguliert werden. STOESEL *et al.* führen dies auf das Fehlen von orthologen, RovA-abhängigen Genen zurück. Gene, die durch RovA reguliert werden und in beiden Spezies vorhanden sind, zeigen oftmals stark divergierende Promotorregionen. Gene, welche bekanntermaßen durch YmoA reguliert werden, sind in der Virulenz von *Yersinia* spp. gegenüber Säugetieren involviert. Als Beispiel kann an dieser Stelle *Icrf* genannt werden. Dieses Gen, welches auf dem pYV lokalisiert ist, fehlt im Genom von *Y. enterocolitica* W22703 jedoch vollständig. In diesem Insektenpathogen könnte YmoA daher eine andere Funktion übernommen haben, die unter anderem in Interaktion mit H-NS, die Repression der Expression der *tc*-Gene bei 37°C beinhaltet.

Obwohl in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Deletion von *ymoA* zu einer *tcaA*-Expression bei 37°C führt, war diese immer noch um den Faktor 1.000 niedriger als bei 15°C. Viele Gene, die durch H-NS reprimiert werden, sind in einem *hns*-defizienten Stamm auch weiterhin reprimiert [Fang *et al.*, 2008]. Oftmals bedarf es eines genspezifischen Transkriptionsfaktors der die Expression aktiviert. Dies ermöglicht es dem Organismus, einzelne Komponenten des weitläufigen H-NS-Regulons gezielt und in Abhängigkeit von unterschiedlichen Stimuli zu aktivieren [Stoebel *et al.*, 2008]. Im Fall von *tcaA* und *tcaB* in *Y. enterocolitica* W22703 ist dieser spezifische Transkriptionsfaktor TcaR2. Wurde bei 37°C in dem *ymoA*-defizienten Stamm W22703 $\Delta ymoA$ gleichzeitig *tcaR2* überexprimiert, war die *tcaA*-Expression mit der bei 15°C vergleichbar (3.5.1.9). Für *tcaA* konnten vier H-NS-Bindestellen identifiziert werden. Diese befinden sich relativ zum Transkriptionsstartpunkt an den Positionen -123, -154, +24 und +197 (3.5.1.6). Für TcaR2 wurde die RBS-Bindestelle an Position -71 vorhergesagt. Damit scheinen sich die Bindestellen von TcaR2 und H-NS nicht zu überlappen. Dies schließt eine gleichzeitige Bindung beider jedoch nicht aus, da für H-NS neben der Konsensussequenz noch weitere Bindestellen mit geringerer Affinität beobachtet werden können [Fang *et al.*, 2008]. Obwohl in der Literatur beschrieben wurde, dass die Bindung von H-NS an DNA verhältnismäßig schwach ist [Dame *et al.*, 2006], ist TcaR2 bei 37°C in Gegenwart des funktionalen YmoA/H-NS-Komplexes nicht in der Lage diesen zu verdrängen. Dies kann vermutlich zum Teil auf den raschen Abbau von TcaR2 durch Proteasen zurückgeführt werden. Bei 15°C nimmt die repressorische Wirkung des YmoA/H-NS-Komplexes aufgrund der geringeren Menge von YmoA sowie der verminderten Fähigkeit von H-NS zur Oligomerisierung ab. TcaR2 wird verstärkt gebildet und bindet an die Promotoren von *tcaA* und *tcaB*. YmoA/H-NS könnte dadurch verdrängt werden, wodurch es zur Aufhebung des repressorischen Komplexes kommt und die Transkription der *tc*-Gene initiiert wird.

Neben *tcaA* und *tcaB* reprimiert der Komplex aus YmoA und H-NS die Expression aller Gene der insektiziden Pathogenitätsinsel sowie die Expression von *tcaR1* und *tccC2*. So führte die Deletion von *ymoA* erstmalig zu einer messbaren Expression von *tcaC*, *tccC1* sowie des Holin/Endolysin-Promotors. Erst kürzlich fanden BAÑOS *et al.* heraus, dass horizontal erworbene Gene nicht allein von H-NS reprimiert werden, sondern in erster Linie durch einen Komplex aus H-NS mit einem Protein der Hha-

Familie, wie beispielsweise YmoA [Baños *et al.*, 2009]. Sie konnten in ihrer Veröffentlichung von 2009 zeigen, dass H-NS in Kooperation mit YmoA bzw. Hha spezifisch an horizontal erworbene Gene bindet, nicht jedoch an Gene des Kerngenoms [Baños *et al.*, 2009; Aznar *et al.*, 2013]. Bereits zwei Jahre zuvor beschrieben MADRID *et al.* das Vorkommen einer sogenannten Hha-Signatur, einer sieben Aminosäure langen Sequenz innerhalb des H-NS-Proteins von Enterobacteriaceae, welche vermutlich den Interaktionspunkt der beiden Proteine darstellt [Madrid *et al.*, 2007b].

Evolutionär gesehen, könnte sich folgendes Szenario abgespielt haben: Nach der Integration der Tc-PAI_{ye} im Genom von *Y. enterocolitica* W22703, ist die neu erworbene DNA durch einen unterschiedlichen G+C-Gehalt vom Kerngenom unterscheidbar. Der Komplex aus H-NS/YmoA erkennt diesen Bereich, bindet an die AT-reichen Promotoren und reprimiert dadurch die Gene der PAI. Bringt die neu erworbene PAI dem Mikroorganismus einen Selektionsvorteil, so muss die Repression jedoch unter bestimmten Bedingungen aufgehoben werden. Bereits bei moderaten Temperaturen von ca. 20°C ist der Oligomerisierungsgrad von H-NS geringer als bei 37°C [Stella *et al.*, 2006]. Es könnte daher zu einer geringfügigen Expression der *tc*-Gene unter diesen Bedingungen gekommen sein. Diese war vermutlich jedoch noch nicht ausreichend, um dem Organismus einen wirklichen Selektionsvorteil zu verschaffen. Dies wurde erst durch eine stärkere Expression, wie sie nur in Gegenwart von TcaR2 erfolgt, erreicht. DORMAN *et al.* postulieren, dass die Transkriptionsfaktoren, die zu einer Aufhebung der Repression durch H-NS führen, bereits mit der PAI ins Genom aufgenommen werden [Dorman, 2007]. Davon ausgehend wären also auch *tcaR1* und *tcaR2* bereits von Anfang an in der PAI vorhanden gewesen. Dies würde erklären, warum die Expression beider Gene durch YmoA/H-NS reprimiert wird. Erst später entwickelte sich ein Mechanismus, bei der die Repression bei moderaten Temperaturen durch TcaR2 aufgehoben wird. In einem anderen denkbaren Szenario bestand die PAI nur aus den *tc*-Genen. Durch die Integration der PAI hinter *tcaR1* und einem anschließenden Verdopplungsschritt des Regulator-kodierenden Genes könnte *tcaR2* entstanden sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Ähnlichkeit beider Proteine zueinander (ca. 47%). Die Duplikation von einzelnen Genen stellt in der Evolution eine wichtige Quelle dar, durch die neue Genfunktionen entstehen können [Wollenberg *et al.*, 2001]. Ist das Gen einmal verdoppelt, kann sich eine der beiden Genkopien spezialisieren, während die andere weiterhin die ursprüngliche Funktion erfüllt. So postulieren beispielsweise OHNO *et al.*, dass bei einer Genverdopplung das Duplikat in einen Ruhezustand versetzt wird. Es entsteht ein sogenanntes Pseudogen, welches ohne Selektionsdruck mutieren kann, unter günstigen Umständen die Selektion überdauert und irgendwann aktiv wird [Soukup, 1974]. Durch Mutationen könnte sich TcaR2 somit im Laufe der Zeit zu einem Induktor der *tc*-Gene und damit zu einem Antagonist von YmoA/H-NS entwickelt haben.

4.2.3 Die Expression von *tcaR2* ist abhängig von der Zelldichte

H-NS und YmoA werden als Teil eines Netzwerkes von vielen Faktoren reguliert und nehmen damit auch auf viele Regulationswege Einfluss. Mehrere Faktoren, die auf verschiedenen Ebenen und Zeitpunkten in die Regulation eingreifen, erlauben eine feiner abgestimmte Expression. Neben der Temperatur und der Menge von YmoA/H-NS spielt auch die Wachstumsphase in der Expression von *tcaR2* eine Rolle. Erst im Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase wird *tcaR2*, und in direkter Folge die *tc*-Gene *tcaA* und *tcaB*, exprimiert. Diese Ergebnisse deuten auf eine Abhängigkeit der Expression vom sogenannten *Quorum sensing* hin. *Quorum sensing* bezeichnet die Fähigkeit von Mikroorganismen die Zelldichte der Population mit Hilfe von chemischen Signalmolekülen zu messen [Waters *et al.*, 2005]. Diese Signalmoleküle, die als Autoinduktoren wirken, werden von Bakterien kontinuierlich produziert und in ihre Umgebung abgegeben. Überschreitet die Konzentration der extrazellulären Autoinduktoren einen bestimmten Schwellenwert, so binden diese an spezifische Rezeptoren, die die Transkription verschiedener Gene aktivieren. Dadurch werden Prozesse kontrolliert, die ineffizient wären, würden sie nur von einzelnen Zellen durchgeführt. Zu diesen Prozessen gehören unter anderem die Expression von Virulenzfaktoren, Bildung von Biofilmen, Sekretion von Antibiotika oder Sporulation [Miller *et al.*, 2001].

Quorum Sensing-Systeme können in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt werden: Systeme vom LuxI/LuxR-Typ Gram-negativer Bakterien, Systeme vom Oligopeptid-Typ, wie er bei Gram-positiven Bakterien vorkommt und ein unter Bakterien jeglicher Art weit verbreitetes LuxS/AI-2-System [Federle *et al.*, 2003]. Im Genom von *Y. enterocolitica* W22703 können zwei *Quorum sensing*-Systeme gefunden werden: YenI/YenR sowie LuxS/LuxR [Throup *et al.*, 1995]. Hierbei wird das 24,6 kDa große Protein YenI, das eine 20%ige Identität zur LuxI-Familie aufweist und für die Synthese von C6-HSL und 3-oxo-C6-HSL zuständig ist, von *yenI* kodiert. Ist die Schwellenkonzentration der HSL erreicht, akkumulieren sie und können durch YenR, welches eine signifikante Homologie zur LuxR-Familie der transkriptionalen Aktivatoren zeigt, detektiert werden. Der Komplex aus Rezeptor und HSL bindet anschließend an spezifische Promotorsequenzen und leitet dadurch die Transkription der Zielgene ein [Fuqua *et al.*, 1996]. So zeigt beispielsweise eine *yenI*-Mutante in *Y. enterocolitica* ein verändertes Schwimm- sowie Schwärmverhalten. ATKINSON *et al.* konnten 2006 zeigen, dass der *yenI*-Mutante von *Y. enterocolitica* das 45 kDa große Flagellenprotein FleB fehlt. Mittels qRT-PCR konnten sie weiterhin belegen, dass die Deletion von *yenI* zwar keinen direkten Einfluss auf die Expression der Flagellengene *flhDC* oder *fliA* besitzt, *fleB* jedoch in diesem Stamm stark runterreguliert vorliegt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Motilität von *Y. enterocolitica* auf Ebene der *fleB*-Transkription zumindest teilweise *Quorum sensing*-abhängig ist [Atkinson *et al.*, 2006a].

Der zweite in dieser Arbeit untersuchte *Quorum sensing*-Typ ist das LuxS/AI-2-System. Bei dem extrazellulären Signalmolekül AI-2 handelt es sich um ein Furanosyl-Borat-Diester, dessen Synthese

durch das Protein LuxS gesteuert wird. Über Sequenzhomologievergleiche konnte das Vorkommen des *luxS*-Gens in einer Vielzahl Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien gezeigt werden, wobei der genaue Wirkungsmechanismus der AI-2-Moleküle in den meisten Fällen noch nicht geklärt ist [Federle *et al.*, 2003]. Aufgrund der weiten Verbreitung unter den Bakterien scheint das AI-2-Signalmolekül weniger speziesspezifisch zu sein. Es könnte daher auch von anderen Bakterien detektiert werden und so der interspezifischen Kommunikation dienen.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen *Quorum sensing*-Systemen können im Genom von *Y. enterocolitica* W22703 elf Gene gefunden werden, welche für weitere LuxR-Regulatoren kodieren [Heermann *et al.*, 2008]. Da diesen jedoch jeweils eine zugehörige Synthase fehlt, gehören diese Proteine zur Familie der LuxR-Solos und wurden in vorliegender Arbeit nicht weiter untersucht. In *P. luminescens* spielen diese Regulatoren vermutlich in der Kommunikation von Bakterien untereinander sowie mit eukaryotischen Organismen eine Rolle. Zwei der insgesamt 39 LuxR-Solos haben hierbei eine klassische HSL-Signalbindedomäne, während 35 dieser Regulatoren eine sogenannte PAS4-Domäne besitzen [Heermann *et al.*, 2008]. Die Struktur dieser Rezeptoren ist den das Juvenilhormon bindenden PAS3-Domänen in Regulatoren der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ähnlich, weshalb in der Literatur davon ausgegangen wird, dass die PAS4-Rezeptoren eukaryotische Signalmoleküle wie Hormone detektieren [Shemshedini *et al.*, 1990].

Obwohl in vorliegender Arbeit eine Abhängigkeit der *tcaR2*-Expression vom *Quorum sensing* gezeigt werden konnte, führte eine externe Zugabe von HSL-Molekülen zu keinem veränderten Expressionsprofil von *tcaR1*, *tcaR2* bzw. *tcaA*. Versuche zur Etablierung einer Positivkontrolle schlugen ebenfalls fehl (3.5.2.2). Dies könnte folgende Ursachen haben: Trotz dem in dieser Arbeit ein Konzentrationsbereich der HSL von 100 nM bis 100 µM getestet wurde, ist die genaue physiologische Konzentration dieser nicht bekannt. Die Konzentration an produzierten HSL liegt vermutlich im unteren bis mittleren µM-Bereich, die Induktion bestimmter Enzyme *in vitro* setzt jedoch bereits in sehr viel geringeren Konzentrationen (nM) ein [Yates *et al.*, 2002]. Darüber hinaus ist für den *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 nicht bekannt, ob neben C6-HSL und 3-oxo-C6-HSL noch weitere Autoinduktoren produziert werden. So wurden z.B. für *Y. pseudotuberculosis* multiple LuxR/LuxI-Module beschrieben, welche unabhängig voneinander funktionieren und neben C6-HSL und 3-oxo-C6-HSL zur Produktion von 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL und 3-oxo-C14-HSL befähigt sind [Atkinson *et al.*, 1999]. Bereits ATKINSON *et al.* versuchten sich an einer Wiederherstellung des wildtypischen Phänotypen der *yenI*-Mutante in *Y. enterocolitica* mittels exogener Zugabe von HSL. Eine exogene Zugabe der verschiedenen HSL-Moleküle konnte das Schwimm- bzw. Schwärmverhalten jedoch nicht wiederherstellen. Erst eine Plasmid-basierte Komplementation von *yenI* führte wieder zur Ausbildung des wildtypischen Phänotypen [Atkinson *et al.*, 2006a].

Da sowohl der Knockout von *luxS* als auch von *yenI* zu einer signifikanten Erhöhung der *tcaR2*-Expression in *Y. enterocolitica* W22703 führt, ist auch eine Regulation der Zielgene aus einem Gemisch beider Signalmoleküle denkbar. Für den Insektenpathogen *P. luminescens* konnte bereits gezeigt werden, dass mehr als 300 Gene durch das AI-2-System reguliert werden [Krin *et al.*, 2006]. Die durch AI-2 regulierten Gene sind in verschiedenen Stoffwechselwegen, in der Stressantwort und in der Pathogenität von *P. luminescens* beteiligt. Auch die Expression der insektiziden Gene *tcdA1* und *tccC1* sowie von *mcf2* (*makes caterpillars floppy*) ist *luxS*-abhängig [Krin *et al.*, 2006; Münch *et al.*, 2008]. Eine Beteiligung des *Quorum sensing*-Systems in der Insektenpathogenität von *Y. enterocolitica* war daher naheliegend und konnte in vorliegender Arbeit erstmals gezeigt werden. Der genaue Mechanismus der *Quorum sensing*-abhängigen Expression von *tcaR2* bleibt jedoch noch zu klären. Im nächsten Schritt sollte zunächst untersucht werden, welches *Quorum sensing*-System für die Expression von *tcaR2* verantwortlich ist. Hierzu könnten Transkriptom-Analysen eines *luxS*- bzw. *yenI*-defizienten *Y. enterocolitica*-Stammes miteinander verglichen werden. Ein solches Vorgehen wurde bereits für *Y. pestis* beschrieben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das AI-2-*Quorum sensing*-System mit verschiedenen Stoffwechselwegen sowie oxidativem Stress assoziiert ist. Es wird daher vermutet, dass es eine essentielle Rolle im Überleben von *Y. pestis* bei Wirtstemperaturen (37°C) einnimmt [Yu *et al.*, 2013]. Im Gegensatz dazu induziert das HSL-abhängige *Quorum sensing*-System die Expression von Genen, deren Genprodukte in der Vergärung von Maltose und dem Glyoxylat-Stoffwechselweg involviert sind. Da diese Beobachtungen bei einer Temperatur von 30°C gemacht wurden, deuten diese Ergebnisse auf eine mögliche Beteiligung des *Quorum sensing*-Systems in der Regulation von Stoffwechselwegen hin, die außerhalb des Wirts, und damit bei moderaten Temperaturen, eine wichtige Rolle spielen [LaRock *et al.*, 2013].

Alternativ könnte mittels Hochdruckflüssigchromatographie gezeigt werden, welche HSL-Moleküle von dem *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 produziert werden [Throup *et al.*, 1995]. In einem nächsten Schritt könnte dann die Kommunikation zwischen den *Yersinia*-Zellen über die Zugabe von *Quorum quenching*-Molekülen, wie beispielsweise der HSL-Laktonase AiiA, unterbrochen werden. Findet in diesem Fall dennoch eine Expression der *tc*-Gene statt, so wäre, vorausgesetzt beide *Quorum sensing*-Systeme können sich nicht gegenseitig komplementieren, das LuxS/AI-2-System für die Produktion des insektiziden Toxinkomplexes verantwortlich.

In vorliegender Arbeit konnte erstmals eine Beteiligung der beiden *Quorum sensing*-Systeme von *Y. enterocolitica* W22703 in der *tcaR2*-Expression und damit in der Expression der *tc*-Gene gezeigt werden. Ein Wegfall der beiden Synthesen-kodierenden Gene *yenI* bzw. *luxS* führte zu einer stark erhöhten *tcaR2*-Promotoraktivität, wobei der Effekt bei 15°C höher war als bei 37°C, eine Abhängigkeit der *tc*-Genexpression von der Temperatur also immer noch bestand. Dieses Szenario erinnert an die *Quorum sensing*-abhängige Expression der Flagellengene in *Y. pseudotuberculosis*. Im Unterschied zu

Y. enterocolitica werden von *Y. pseudotuberculosis* zwei LuxR/LuxI-Homologe, namentlich YpsR/YpsI und YtbR/Ytbl, hergestellt. Ytbl synthetisiert C6-HSL und N-Octanoyl-L-Homoserin-Lakton (C8-HSL), wohingegen YpsI für die Produktion von C6-HSL sowie von 3-oxo-C6-HSL verantwortlich ist. In einer *ypsI*-negativen Mutante ist Ytbl in der Lage, bei 37°C und 22°C alle drei HSL zu synthetisieren, während 3-oxo-C6-HSL einzig bei 28°C nicht hergestellt wird. In der *ypsR*-Mutante findet sich bei 22°C dagegen kein C8-HSL. Phänotypisch kommt es hier zu einer Verklumpung sowie zu einer verstärkten Produktion einer Flagellinuntereinheit. Zusätzlich führt die Deletion von *ypsR* und *ypsI* zu einer erhöhten Motilität der Bakterien. Diese Phänotypen sind temperaturabhängig und konsistent mit einer hierarchisch aufgebauten *Quorum sensing*-Kaskade. [Atkinson *et al.*, 1999] Da für die *tcaR2*-Expression von *Y. enterocolitica* W22703 auch nach der Deletion der beiden *Quorum sensing*-Synthasenkodierenden Gene *yenI* und *luxS* eine Temperaturabhängigkeit beobachtet werden konnte, deuten diese Ergebnisse auf eine reziproke Regulation durch das *Quorum sensing*, beispielsweise über einen Repressor, hin. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von *tcaR2* durch TcaR1 und YmoA/H-NS reprimiert wird. Da die *tcaR1*-Promotoraktivität durch die Deletion von *yenI* bzw. *luxS* nicht beeinflusst wird, sollte in weiteren Arbeiten eine Abhängigkeit von *ymoA* und/oder *hns* durch YenR bzw. LuxS näher untersucht werden.

4.3 Yersinien zeigen einen bistabilen Phänotypen

4.3.1 Die Expression von *tcaR2* und *tcaA* erfolgt nur in einem kleinen Teil der Population

Bei 15°C zeigten nur etwa 5% der Zellen einer *Y. enterocolitica* W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ -Kultur eine rote Fluoreszenz (3.7.1). Die Expression von *tcaA* erfolgt demnach nur in einem geringen Teil der Population. Dieses Verhalten wird in der Biologie als Bistabilität bezeichnet und beschreibt allgemein die Aufspaltung einer Population genetisch identischer Zellen, die bei homogenen und identischen Bedingungen gewachsen sind, in zwei Subpopulationen [Dubnau *et al.*, 2006]. In diesem Fall in eine kleinere Subpopulation, die *tcaA* exprimiert und in eine größere, die es nicht exprimiert.

Bakterielles Wachstum wird als das Ergebnis einer (symmetrischen) Zellteilung betrachtet, welches zu identischen Tochterzellen führt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass in einer isogenen Kultur Zellen ein phänotypisch unterschiedliches Verhalten annehmen können [Veening *et al.*, 2008]. Solche phänotypischen Variationen können das Ergebnis von Unterschieden in der Mikroumgebung, des Zellzyklus oder von Mutationen sein. Variationen in der Genexpression eines bestimmten Genes können aber auch auf die zufällige Fluktuation biochemischer Reaktionen in der Zelle zurückzuführen sein [Dubnau *et al.*, 2006]. Bakterielle Populationen weisen aufgrund von Fluktuationen in der Transkription, Translation oder des Abbaus eines Genproduktes eine unimodale Streuung in der

Genexpression auf [Kaern *et al.*, 2005]. Diese Streuung wird als Rauschen oder auch als *Noise* bezeichnet. Überschreitet die Genexpression einen gewissen Schwellenwert, so werden quantitative Unterschiede auch qualitativ sichtbar, z.B. in Form von neuen Expressionsmustern: Die Zellen unterteilen sich in unterschiedliche Subpopulationen und es kann eine heterogene Genexpression beobachtet werden [Dubnau *et al.*, 2006]. Dabei besitzt das bimodale System zwei stabile Zustände, wohingegen intermediäre Zustände nicht vorkommen. In welchem Zustand sich das (biologische) System befindet, hängt vom Eingangssignal ab. Auch der Wechsel von einem Zustand in den anderen kann nur durch das Eingangssignal erfolgen [Smits *et al.*, 2008]. Obwohl das erste bistabile System, die Verwertung von Laktose in *E. coli*, bereits 1961 von JACOB und MONOD beschrieben wurde [Jacob *et al.*, 1961], konnte der vollständige Mechanismus erst 2004 aufgeklärt werden [Yildirim *et al.*, 2004]. Seitdem wurde die bistabile Expression in einer Vielzahl von Bakterien und natürlichen Prozessen beobachtet, beispielsweise in der Biofilmbildung von *B. subtilis* [Chai *et al.*, 2008], der Persistenz gegen Antibiotika in *Mycobacterium tuberculosis* und *E. coli* [Balaban *et al.*, 2004], dem Wachstum von *S. Typhimurium* 14028 auf *myo*-Inositol-Agar [Kröger *et al.*, 2011] sowie der Freisetzung von Pneumolysin durch *S. pneumoniae* [Paton, 1996]. In vorliegender Arbeit konnte ein weiteres Beispiel für eine bimodale Expression beschrieben werden: die Expression des insektiziden Gens *tcaA* von *Y. enterocolitica* W22703.

Eine bimodale Genexpression kann auf zwei unterschiedlichen Wegen amplifiziert werden: durch eine doppelt negative oder durch eine positive kooperative Rückkopplung [Dubnau *et al.*, 2006]. Letztere ist durch eine positive Autoregulation sowie durch Nichtlinearität gekennzeichnet. Da TcaR2 diese Anforderungen erfüllt und essentiell für die *tcaA*-Expression ist, wurde dessen Transkription mit Hilfe einer translationalen Fusion mit dem Fluoreszenzprotein mCherry bei 15°C und RT näher untersucht (3.7.4). In beiden Fällen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop nur vereinzelt rot fluoreszierende Zellen detektiert werden. Obwohl das Expressionsmuster stark an die bistabile Expression von *tcaA* erinnerte, lag die Zahl der *tcaR2*-exprimierenden Zellen mit 0,1% (RT) bzw. 1% (15°C) deutlich unter der Zahl TcaA-produzierender Zellen. Nach Einführen des Arabinose-induzierbaren Plasmides pBAD-*tcaR2* erhöhte sich zwar der Anteil an *tcaR2*-exprimierenden Zellen bei 15°C von 1% auf 30%, eine Erhöhung des Anteils *tcaA*-exprimierender Zellen in dem Konstrukt W22703 *tcaA::mCherry* konnte jedoch nicht beobachtet werden. Erst die Deletion von *ymoA* führte zu einer Aufhebung der *tcaA*-Repression in diesem Konstrukt (3.7.2). Grund für die Repression ist die Bindung eines YmoA/H-NS-Komplexes an eine intragenische Bindestelle in *tcaA* (siehe auch 4.2.2). Auf Einzelzellebene konnte diese Beobachtung ebenfalls bestätigt werden. In dem Stamm W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA::mCherry* stieg der Anteil rot fluoreszierender Zellen von 5% auf 84% an. Die Deletion von *ymoA* führte daher nahezu zu einer vollständigen Aufhebung des bistabilen Phänotypes.

4.3.2 Modell zur bistabilen Expression von *tcaA* in *Y. enterocolitica* W22703

Eine notwendige Voraussetzung für Bistabilität ist das Vorhandensein einer positiven Rückkopplungsschleife im entsprechenden System. Dies kann durch zwei verschiedene Mechanismen realisiert werden. In dem ersten Modell wird die Bistabilität von einem positiven autoregulatorischen Schalter gesteuert, bei dem der Regulator die Transkription seines eigenen Gens sowie weiterer Zielgene stimuliert [Dubnau *et al.*, 2006]. Der zweite Mechanismus erfordert die Gegenwart eines sich gegenseitig inhibierenden Repressor-Paares (Toggle-Switch). Wird der Repressor R2 inaktiviert, beispielsweise durch einen Induktor, wird der Repressor R1 exprimiert und damit die Synthese von R2 eingestellt [Gardner *et al.*, 2000]. Dieser Mechanismus kommt der positiven Autoregulation gleich und kann ebenfalls zur Bistabilität führen [Dubnau *et al.*, 2006]. Eine weitere Notwendigkeit für das Auftreten von Bistabilität ist eine nichtlineare Antwort des Regulators auf seine eigene Transkription. Dies wird beispielsweise durch Oligomerisierung, Phosphorylierung oder kooperative Bindung an die DNA realisiert [Ferrell, 2002]. TcaR2 erfüllt alle Bedingungen für eine bistabile Expression seiner Zielgene: Der LysR-ähnliche Regulator ist positiv autoreguliert, ruft Nichtlinearität durch die Bildung von Tetrameren hervor und steuert die Expression der ihm nachgeschalteten Gene *tcaA* und *tcaB*. Mit Hilfe von translationalen Studien konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass die Konzentration von TcaR2 limitierend auf den Anteil *tcaR2*-exprimierender Zellen und damit in einem gewissen Maß auf die *tcaA*-Expression wirkt. Bei 15°C exprimieren nur etwa 1% der Zellen *tcaR2* (3.7.4 und 4.3.1). Allgemein ist die Menge eines Transkriptionsfaktors in der Zelle sehr gering [Veening *et al.*, 2008]. Erst durch ein Eingangssignal wird die Transkription des Regulators aktiviert. Im Fall von TcaR2 könnte die Temperatur der ausschlaggebende Faktor für die Aktivierung der *tcaR2*-Expression durch Bindung eines TcaR2-Tetramers darstellen. Eine andere Möglichkeit für das Eingangssignal ist das *Quorum sensing*, bei welchem erst bei Erreichen einer gewissen Bakteriendichte die Expression von *tcaR2* und infolgedessen der *tc*-Gene induziert wird. So lange die TcaR2-Konzentration unterhalb eines Schwellenwertes liegt, ist die Expressionsrate von *tcaR2*, und damit die von *tcaA* und *tcaB*, eher gering. Sobald der Schwellenwert überschritten wird, greift die positive Rückkopplung, und die Expression von *tcaR2* wird um ein Vielfaches erhöht, wodurch einzelne Zellen die insektiziden Gene *tcaA* und *tcaB* exprimieren. Dieses Modell kann anhand der *tcaA*-Promotorfusion mit mCherry bestätigt werden. Auf translationaler Ebene scheint TcaR2 jedoch nicht der einzige Faktor zu sein, der für die bimodale Expression der insektiziden Gene verantwortlich ist. Erst mit dem Wegfall von *ymoA* zeigt die Population auf Einzelzellebene ein nahezu einheitliches Expressionsprofil bei 15°C (3.7.2). Damit ist die bistabile Expression von *tcaA* in *Y. enterocolitica* W22703 das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels der beiden Antagonisten TcaR2 und YmoA. Dabei ist unklar, wodurch die Bistabilität genau zustande kommt. YmoA scheint zu verhindern, dass ein zu großer Teil der Population die insektiziden Toxine produziert. Dies kann mehrere Gründe haben: Zum einen ist die Produktion der

hochmolekularen insektiziden Toxine sehr energieaufwendig, zum anderen konnte für *P. luminescens* gezeigt werden, dass es nur weniger Moleküle bedarf, um einen toxischen Effekt auf das Insekt auszuüben [French-Constant *et al.*, 1999]. Neben der Repression von *tcaA* und *tcaB* spielt YmoA auch in der Repression von *tcaR2* eine große Rolle (vgl. auch 4.2.2). Damit könnte es die Menge an TcaR2 regulieren und dadurch direkt oder indirekt die Anzahl an *tcaA*-exprimierenden Zellen steuern. Dabei muss berücksichtigt werden, dass sämtliche Daten zur Bistabilität der *tcaA*-Expression *in vitro* aufgenommen wurden. Als nächstes sollte daher die Expression der insektiziden Gene auf Einzelzellebene *in vivo*, beispielsweise in *C. elegans*, untersucht werden. Obwohl nicht direkt als Bistabilität deklariert, konnten PÉCHY-TARR *et al.* 2013 zeigen, dass das insektizide Toxin FitD von *P. aeruginosa* *in vitro* nur von einem geringen Prozentsatz gebildet wird [Pechy-Tarr *et al.*, 2013]. *In vivo* produzieren dagegen alle Zellen dieses Toxin, welches verwandt zu Mcf aus *P. luminescens* ist. Ähnlich wie für *tcaA* konnte gezeigt werden, dass die Expression von *fliD* durch die Menge des LysR-ähnlichen Regulators FitG gesteuert wird. FitG ist, wie auch TcaR2, positiv autoreguliert und seine Expression wird zusätzlich von einem zweiten Regulator, FitH, gesteuert [Pechy-Tarr *et al.*, 2013]. Im Unterschied zu dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell, deuten die Daten von PÉCHY-TARR *et al.* jedoch auf keinen zusätzlichen Repressor hin.

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren der LTTR-Familie in die Expression von insektiziden Genen involviert sind. Beispiele hierfür sind HcaR in *P. luminescens* [Chalabaev *et al.*, 2007] und HexA in *X. nematophila* [Joyce *et al.*, 2003]. Die Deletion beider LysR-ähnlicher Regulatoren führt zu einer stark verminderten Virulenz von *P. luminescens* bzw. *X. nematophila* gegenüber Insekten aufgrund einer geringeren Expression der *tc*-Gene. In beiden Fällen wurde von den Autoren jedoch keine bistabile Expression der *tc*-Gene beschrieben. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es bis dato nur wenige Arbeiten gibt, in denen bakterielle Toxine durch eine translationale Fusion visualisiert wurden. Die meisten Studien arbeiten mit qRT-PCR, Western Blotting oder mit Promotorfusionen [Pechy-Tarr *et al.*, 2013]. Ein Beispiel für die bistabile Expression eines LysR-ähnlichen Regulators und infolgedessen des Virulenzfaktors AprA, einer Alkalinen Protease, ist BexR in *P. aeruginosa* [Turner *et al.*, 2009]. TURNER *et al.* konnten 2009 zeigen, dass es aufgrund starker Fluktuationen in der positiven Autoregulation von BexR zu einer Aufspaltung der Population in *aprA*-exprimierende und nicht-exprimierende Zellen kommt [Turner *et al.*, 2009]. Dieses Modell erinnert stark an die bistabile Expression von *tcaA*. Aber auch in dieser Studie gab es keine Hinweise auf zusätzliche repressorische Faktoren. Welche einzigartige Rolle der repressorische Komplex aus YmoA und H-NS in der *tcaA*-Expression *in vivo* spielt, sollte daher in nachfolgenden Versuchen geklärt werden.

Abschließend ist festzuhalten, dass die bistabile Genexpression einen wichtigen Faktor darstellt, um in Bakterien Zelldifferenzierung auszulösen [Tiwari *et al.*, 2011]. Nur durch stochastische Fluktuationen in der Genexpression der Hauptregulatoren können in verschiedenen Zellen innerhalb einer Population trotz gleicher Umweltbedingungen unterschiedliche Differenzierungsprogramme gestartet werden [Hermsen *et al.*, 2011]. Die bimodale Expression stellt einen *Bet hedging*-Mechanismus und damit eine Risikostreuung an sich rasch ändernde Umweltbedingungen dar [de Jong *et al.*, 2011]. Hierbei sind die Nachkommen zwar genetisch identisch, unterscheiden sich aber in ihrer Anpassung an die jeweilige Umwelt. Dabei sind einige Nachkommen an die bestehenden Umweltbedingungen optimal angepasst, während andere bei einer schnellen und dramatischen Änderung der Umgebung von Vorteil sein können und dadurch das Überleben der Art sichern [Kuwahara *et al.*, 2012]. *Y. enterocolitica*-Zellen, die die *tc*-Gene bereits außerhalb des Insektes exprimieren, könnten damit eine schnelle Überwindung des Insektenimmunsystems sowie eine schnelle Erschließung von Nährstoffen garantieren.

4.4 Funktion von Holin und Endolysin in *Y. enterocolitica* W22703

Obwohl die Tc-Proteine bereits seit ca. 20 Jahren bekannt sind, konnte bislang nicht vollständig geklärt werden, wie diese hochmolekularen Proteine von der Bakterienzelle freigesetzt werden. Den einzigen Hinweis auf einen gerichteten Transport der Toxine erbrachten GENDLINA *et al* 2007. Sie postulierten, dass die Translokation der insektiziden Proteine von *Y. pestis* mit Hilfe des Ysc-Yop-T3SS erfolgt [Gendlina *et al.*, 2007]. Das T3SS kommt vor allem bei Gram-negativen, meist pathogenen, Bakterien vor und dient der Sekretion bakterieller Proteine in eukaryotische Zellen [Hueck, 1998]. Es besteht aus insgesamt etwa 30 unterschiedlichen Proteinen und stellt damit ein sehr komplexes Transportsystem dar. Seine Struktur ist denen von Flagellen sehr ähnlich und erinnert an eine Injektionsnadel [Blocker *et al.*, 2003]. Das bisher am besten untersuchte T3SS ist das plasmidkodierte der Gattung *Yersinia*, welches zur Translokation von Effektorproteinen in Wirtszellen dient, um diese zu paralysieren und der angeborenen Immunantwort zu entgehen [Cornelis, 2002a]. Obwohl GENDLINA *et al.* in ihrer Veröffentlichung zeigen konnten, dass die beiden N-Termini der Toxinkomponenten YitA und YitB mittels T3SS aus der Zelle transportiert werden, bleiben einige Fragen offen: Warum können zwar die beiden Proteine YitA und YitB im Überstand gefunden werden, nicht jedoch das für ein funktionsfähiges Toxin notwendige YitC? Weshalb haben die Autoren zusätzlich ein plasmidkodierte T3SS in *Y. pestis* eingebracht? Und wieso wurde der Versuch in der exponentiellen Phase durchgeführt, wenn doch die maximale Expression der *tc*-Gene im Übergang zur stationären Phase stattfindet? Aufgrund der vielen offenen Fragen wird die Translokation der Tc-Proteine mit Hilfe eines T3SS in der Literatur kontrovers diskutiert. So führen beispielsweise HINCHLIFFE *et al.* an, dass die *tc*-Gene von

Y. pestis maximal bei Temperaturen unter 30°C transkribiert werden, währenddessen das T3SS nur bei 37°C exprimiert wird [Hinchliffe *et al.*, 2010]. Darüber hinaus können in anderen insektiziden Toxinproduzierenden Bakterien, wie beispielsweise in *Xenorhabdus* spp., nicht immer plasmidkodierte T3SS gefunden werden.

Für *Y. enterocolitica* Biovar 1B wurde in der Literatur neben dem plasmidkodierten T3SS noch ein chromosomal kodiertes T3SS beschrieben [Haller *et al.*, 2000]. Dieses als Ysa bezeichnete Sekretionssystem ist *in vitro* unter niedrigen Temperaturen und hohen Salzkonzentrationen aktiv [Foultier *et al.*, 2003] und wurde daher bereits als ein alternatives Sekretionssystem für die Tc-Proteine diskutiert [Matsumoto *et al.*, 2009]. Die Sequenzierung der Genome von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* hat darüber hinaus das Vorhandensein eines weiteren chromosomal kodierten T3SS hervorgebracht, welches keine signifikanten Ähnlichkeiten zu den T3SS Ysc-Yop und Ysa aufweist [Parkhill *et al.*, 2001; Chain *et al.*, 2004]. Dieses System erinnert an das T3SS Ssa von *S. enterica* [Troisfontaines *et al.*, 2005]. Ähnliche chromosomal kodierte T3SS können auch in einigen *Y. enterocolitica*-Stämmen des Serotypen O:3 gefunden werden [Golubov *et al.*, 2003]. Darüber hinaus fanden FUCHS *et al.* 2011 in *Y. enterocolitica* W22703 ein neuartiges T3SS, welches jedoch noch nicht weiter charakterisiert ist [Fuchs *et al.*, 2011]. Da T3SS in der Virulenz von Yersinien oftmals eine große Rolle spielen, ist die Sekretion der Tc-Proteine über ein chromosomal kodiertes T3SS von *Y. enterocolitica* W22703 nicht auszuschließen. Betrachtet man die Größe des funktionalen Toxin-Komplexes, so ist eine Sekretion mittels T3SS jedoch unwahrscheinlich und würde bedeuten, dass jede Toxin-Komponente einzeln nach Außen transportiert werden müsste. Erst außerhalb der Bakterienzelle würden sich die einzelnen Komponenten zu einem funktionalen Komplex zusammenfügen [Hinchliffe *et al.*, 2010]. Dies steht jedoch im Gegensatz zu der Tatsache, dass im heterologen System die beiden Toxin-Komponenten XtpB1 und XtpC1 von *X. nematophilus* in der gleichen Zelle exprimiert werden müssen, um eine orale Aktivität gegen *Pieris brassicae* zu erzielen. Werden die Überstände, welche alle drei Proteinkomponenten einzeln enthalten, miteinander vermischt, so zeigt dieses Lysat keine Toxizität gegenüber dem Großen Kohlweißling [Sergeant *et al.*, 2003]. Diese Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass die insektiziden Toxine bereits vollständig gefaltet im Zytoplasma vorliegen müssen. Native Tc-Proteine aus *P. luminescens* und *Y. pseudotuberculosis*, die direkt auf Zellen in der Zellkultur gegeben werden, führen zum Tod dieser [Hares *et al.*, 2008]. Das heißt sie müssen nicht über ein T3SS in die Zelle injiziert werden um aktiv zu sein. Erst kürzlich konnten SPINNER *et al.* zeigen, dass die Tc-Proteine *Y. pestis* eine erhöhte Resistenz gegenüber der Phagozytose durch polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten verleihen. Diese Resistenz ist unabhängig vom T3SS, weshalb die Autoren keine T3SS-abhängige Sekretion des nativen Tc-Komplexes detektieren konnten. Damit widerlegen sie die von GENDLINA *et al.* 2007 aufgestellte Hypothese der Freisetzung des nativen insektiziden Toxin-Komplexes mit Hilfe eines T3SS.

YANG *et al.* konnten in früheren Arbeiten zeigen, dass die C-Komponente des Tc-Toxins in *P. luminescens* post-translational reguliert wird [Yang *et al.*, 2012]. Hierbei erfolgt eine Translation der *tccC*-mRNA erst zum Zeitpunkt der Sekretion. Die Sekretion des Toxins ist mit der äußeren Membran des Bakteriums assoziiert, wobei einige *P. luminescens*-Stämme für die Sekretion des Toxinkomplexes die Lipase Pdl benötigen [Yang *et al.*, 2012]. In ihrer Veröffentlichung von 2013 konnten YANG *et al.* zeigen, dass für eine vollständige Sekretion des nativen Tc-Toxins die beiden N-terminalen Regionen der B- und C-Komponente essentiell sind. Hierbei ist der N-terminale Bereich der C-Komponente für die Translokation des Tc-Komplexes durch die innere Membran zuständig, während die N-terminale Region der B-Komponente die Sekretion durch die äußere Membran vorantreibt [Yang *et al.*, 2013]. Der N-Terminus von TcB weist eine große Ähnlichkeit zu dem SpvB-Protein aus *Salmonella* auf. Bei diesem Protein sind die ersten 229 Aminosäuren ausreichend, um die Sekretion des gesamten Toxinkomplexes ins extrazelluläre Milieu zu gewährleisten [Gotoh *et al.*, 2003]. Allerdings besitzt die B-Komponente im Gegensatz zu SpvB keine Sec-Signalsequenz. Wie TcB durch die innere Membran sekretiert wird bleibt demnach noch zu klären. Da der in der Arbeit von YANG *et al.* verwendete *E. coli*-Stamm die korrekte Synthese und Sekretion des insektiziden Toxins nur von seinem Cosmid aus bewerkstelligt, verstärkt dies die Vermutung, dass alle Sequenzen die für die Synthese und Sekretion des nativen Tc-Toxins notwendig sind, bereits mit den *tc*-Genen assoziiert vorliegen oder dass die Tc-Proteine mit einem bisher nicht identifizierten Exportsystem interagieren, das auch in *E. coli*-Laborstämmen vorkommt [Yang *et al.*, 2013].

Die insektiziden Pathogenitätsinseln von *P. luminescens* sowie verschiedener *Yersinia* spp. sind oftmals mit den Lysegenen Holin und Endolysin assoziiert [French-Constant *et al.*, 2003; Waterfield *et al.*, 2007]. WATERFIELD *et al.* warfen daher die Frage auf, ob deren Genprodukte in der Freisetzung der hochmolekularen Toxine involviert sein könnten [Waterfield *et al.*, 2007]. Da der *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 innerhalb der Tc-PAI_{ve} ebenfalls für ein Holin und Endolysin kodiert, wurde die Rolle dieser Lysekassette bei der Freisetzung der Tc-Proteine *in vivo* mit Hilfe des Invertebraten-Modells *C. elegans* getestet. Die Infektion von *C. elegans* mit *Y. enterocolitica* W22703 führt zur Ausbildung einer intestinalen persistenten Infektion sowie zu einer starken Verkürzung der Lebensspanne des Wurmes [Spanier *et al.*, 2010]. Im Gegensatz zu *C. elegans*, die permanent auf OP50 kultiviert wurden, weisen Nematoden, die mit dem *Y. enterocolitica*-Wildtyp infiziert wurden, eine TD₅₀ von zehn Tagen auf. Die Infektion ist durch eine starke Verlangsamung der Pumpfrequenz des Pharynx sowie der Kriechbewegung des Nematoden und durch eine deutliche Erweiterung des Darmes gekennzeichnet. Dieser ausgeprägte Phänotyp ist bei der Verwendung der Holin/Endolysin-Deletionsmutante nicht so stark ausgeprägt. Darüber hinaus zeigt die Infektion mit diesem Stamm mit 14 Tagen die gleiche TD₅₀ sowie den gleichen Kurvenverlauf wie mit OP50 (3.6.5.2). Trotz dieser Ergebnisse, die auf eine wichtige Rolle der Lysekassette in der Virulenz von *Y. enterocolitica* W22703

gegen *C. elegans* hindeuten, konnte in vorliegender Arbeit keine Promotoraktivität von Holin/Endolysin detektiert werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Da die Expression der *tc*-Gene *in vitro* bistabil ist, erfolgt die Zelllyse zur Freisetzung der Tc-Proteine vermutlich auch nur in einem geringen Teil der Population. Nur etwa 1-5% der Zellen exprimieren *tcaA* und produzieren daher vermutlich den vollständigen Toxinkomplex. Würde dieser Teil der Population das insektizide Toxin mit Hilfe von Holin und Endolysin freisetzen, müssten sich diese Zellen wiederum zumindest zum Teil lysieren. Dies wirft die Frage auf, ob die beiden verwendeten Reportersysteme *luxCDABE* und *gfp* sensitiv genug sind, um die Promotoraktivität von Holin/Endolysin zu detektieren. Bei der Verwendung von GFP muss eine zytoplasmatische Konzentration von 1 μ M überstiegen werden, um eine Unterscheidung zur Autofluoreszenz zu ermöglichen [Niswender *et al.*, 1995]. Für eine durchschnittliche große Bakterienzelle sind demnach $1,1 \times 10^3$ Moleküle GFP nötig. Zu dem Zeitpunkt der Zelllyse befinden sich etwa 4×10^3 Holin-Moleküle in der Zelle [Young *et al.*, 1995]. Obwohl sich die Anzahl der Moleküle für Zelllyse und Fluoreszenz in derselben Größenordnung bewegt, ist es möglich, dass die Zelllyse eintritt, bevor eine ausreichende Menge von GFP in der Zelle vorliegt. Auch bei der Untersuchung der Promotoraktivität von Holin/Endolysin mit Hilfe des Luciferase-Operons *luxCDABE* konnte keine Biolumineszenz oberhalb des Schwellenwertes von 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀ detektiert werden (3.6.2). Obwohl dieses Reportersystem aufgrund der katalytischen Aktivität der Luciferase deutlich sensitiver ist als eine Detektion mit dem Fluoreszenzprotein GFP [Hakkila *et al.*, 2002; Sagi *et al.*, 2003], geben diese Ergebnisse keine Hinweise auf eine Aktivität der Lysekassette *in vitro*. Auch ein Nachweis der Zelllyse mit Hilfe der Messung der extrazellulären ATP-Konzentration war ohne Erfolg (3.6.5). Aufgrund der geringen gemessenen Biolumineszenzwerte sowie der Instabilität des Signals über die Zeit, ist die Etablierung einer stabilen und ausreichend sensitiven Messmethode primäres Ziel für weitere Untersuchungen. Alternativen stellen beispielsweise die Messung anderer intrazellulärer Proteine im Überstand, wie beispielsweise GroEL und Ail [Gendlina *et al.*, 2007; Spinner *et al.*, 2012], sowie die Messung der Transkriptmenge von Holin/Endolysin mittels qRT-PCR dar.

Obwohl die Transkription von Holin/Endolysin *in vitro* in vorliegender Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, konnte die Funktionalität des Endolysins mittels Zymogrammen gezeigt werden. Hierbei weist das Endolysin aus *Y. enterocolitica* W22703 zwar eine geringere Aktivität als das Kontrollprotein Lysozym auf, besitzt allerdings eine weitaus höhere Spezifität (3.6.4). Die höchste Aktivität zeigt das Endolysin gegen den *Y. enterocolitica*-Wildtyp W22703. Diese Beobachtung, zusammen mit den Ergebnissen aus den *in vivo* Experimenten, deuten auf eine Rolle der Lysekassette in der insektiziden und nematoziden Aktivität von *Y. enterocolitica* W22703 hin. In der Literatur gibt es einige Beispiele, in denen bakterielle Toxine mit den beiden Lysegenen Holin und Endolysin assoziiert vorliegen. Neben den beiden Toxinen TcdA und TcdB kodiert das Genom von *C. difficile* für TcdE, ein Holin-ähnliches Protein [Tan *et al.*, 2001]. Die Überexpression von *tcdE* in *E. coli* führte unabhängig des

Nährstoffangebotes und der Inkubationstemperatur zur Lyse der Bakterienzellen, was einen eindeutigen Hinweis auf die Funktion des Proteins in der Sekretion von Proteinen darstellt. Da den beiden Toxinen TcdA und TcdB eine Signalsequenz fehlt, wie sie beispielsweise für den Transport mittels Sec-System oder T3SS notwendig ist, postulieren TAN *et al.* eine Freisetzung der Proteine über Zelllyse. Diese Annahme wird dadurch bekräftigt, dass die drei Gene *tcdA*, *tcdE* und *tcdB* als polycistronisches Transkript abgelesen werden und damit vermutlich einer gemeinsamen Regulation unterliegen [Govind *et al.*, 2012]. Einen direkten Nachweis für die Freisetzung der Toxine über Zelllyse konnten GOVIND *et al.* jedoch nicht liefern. Die Messung von zytosolischen Markern sowie FACS und Lebend-Tot-Färbung erbrachte keinen Unterschied zwischen dem *C. difficile*-Wildtyp und der *tcdE*-Deletionsmutante [Govind *et al.*, 2012]. Die Konzentration von TcdA und TcdB in den Überständen waren in beiden Stämmen zwar ähnlich, eventuell jedoch zu gering um einen Unterschied feststellen zu können. Interessanterweise führte jedoch die Deletion der beiden Gene *tcdA* und *tcdB* zu einem starken Anstieg in der Zelllyse. GOVIND *et al.* postulieren daher, dass die beiden Proteine als eine Art Stopfen in der Zellmembran fungieren. Holine schaffen Poren mit einem Durchmesser von 15 Å (Pinholine) [Pang *et al.*, 2009] bis zu 1 µm [Dewey *et al.*, 2010]. Werden die Toxine ungefaltet aus dem Zytosol nach Außen transportiert, dann reicht bereits ein kleiner Kanal, wodurch das Ausscheiden anderer Proteine verhindert wird. Zur Sekretion der vollständig gefalteten Proteine bedarf es jedoch einer größeren Pore. Dies birgt allerdings auch die Gefahr, dass andere Substanzen und Proteine ebenfalls nach Außen gelangen. Eine Funktion der Toxine TcdA und TcdB als Stopfen würde dies verhindern und die Zelle vor der vollständigen Lyse beschützen [Govind *et al.*, 2012]. Ein ähnliches Szenario ist auch für die Freisetzung der insektiziden Toxine von *Y. enterocolitica* W22703 denkbar. Obwohl GOVIND *et al.* argumentieren, dass die Sekretion der Proteine physiologisch sinnvoller ist, wenn sich die Bakterienzelle dabei nicht lysiert, gibt es in der Literatur einige Beispiele bei denen ein sich aufopferndes Verhalten zum Wohle der Allgemeinheit beschrieben wurde. So exprimiert beispielsweise nur ein geringer Teil (etwa 15%) der Population von *S. typhimurium* das SPI-T3SS und die Flagellengene, welche für eine erfolgreiche Invasion des Darmes des Wirtes notwendig sind [Ackermann *et al.*, 2008]. Diese Zellen werden ins Darmgewebe eingeschleust und lösen dort eine Entzündungsreaktion aus. Die restlichen *S. typhimurium*-Zellen profitieren vom Tod ihrer Geschwisterzellen und können sich ungehindert vermehren. Obwohl beide Zelltypen genetisch identisch sind, beginnen die Salmonellen die ins Darmgewebe eindringen einen selbstzerstörerischen Akt und verbessern dadurch die Lebenssituation der restlichen Population. Wären die Zellen dagegen genetisch unterschiedlich, so würde sich der aufopfernde Typ sehr schnell selbst auslöschen [Ackermann *et al.*, 2008]. Ein weiteres Beispiel für ein solches aufopferndes Verhalten ist die Freisetzung von Pneumolysin durch *S. pneumoniae*. Erreicht die *S. pneumoniae*-Kultur die stationäre Phase kommt es zur Autolyse und damit zur Freisetzung des Toxins [Martner *et al.*, 2008]. Erst kürzlich

konnten HODAK *et al.* für *S. Typhi* einen neuartigen Sekretionsmechanismus für das Typhus-Toxin beschreiben [Hodak *et al.*, 2013]. Hierbei werden die Typhus-Toxinkomponenten PtIA, PtIB und CdtB mit Hilfe des Sec-Systems in das Periplasma transportiert. Dort lagern sich die einzelnen Komponenten zu dem vollständigen Typhus-Toxinkomplex zusammen. TstA, welches Ähnlichkeiten zu phagenverwandten Endolysinen aufweist, gelangt ebenfalls in das Periplasma, wo es die Zellwand abbaut und damit die Freisetzung des Typhus-Toxins ermöglicht [Hodak *et al.*, 2013]. TstA besitzt jedoch keine Sec-Signalsequenz, daher bleibt noch die Frage offen, wie diese Muramidase in das Periplasma gelangt. Im Genom von *S. Typhus* können verschiedene Gene gefunden werden, welche für ein putatives Holin kodieren. Obwohl die beiden Lysegene Holin und Endolysin meist in direkter Nachbarschaft lokalisiert sind, ist dies nicht zwingend erforderlich [Wang *et al.*, 2000]. Daher postulieren HODAK *et al.*, dass ein bisher noch nicht identifiziertes Holin für den Transport von TstA in das Periplasma zuständig ist [Hodak *et al.*, 2013].

Obwohl in vorliegender Arbeit keine befriedigende Antwort auf die Frage wie die Translokation der Tc-Proteine in *Y. enterocolitica* W22703 erfolgt gegeben werden kann, deuten die *in vivo* Versuche mit *C. elegans* auf eine Beteiligung der beiden Gene Holin/Endolysin in der Virulenz von *Y. enterocolitica* sowie in der Freisetzung der Tc-Proteine hin. Obwohl einige Beispiele in der Literatur bekannt sind, in denen die Freisetzung von Toxinen über (partielle) Lyse erfolgt, sollte in künftigen Arbeiten auch eine Sekretion über andere Transportmechanismen, wie dem neuartigen chromosomal kodierten T3SS, in Betracht gezogen werden. Hierzu wäre es zunächst interessant zu klären, ob dieses überhaupt unter den Toxin-produzierenden Bedingungen exprimiert wird.

4.5 Modell zur temperaturabhängigen Expression der *tc*-Gene in *Y. enterocolitica*

Auf den ersten Blick erinnert die Regulation der Expression der *tc*-Gene stark an die Expression von *rovA* in *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*. *RovA* reguliert die Expression von Invasin. Diese ist, vergleichbar zur *tcaA*-Expression, abhängig von der Temperatur, der Wachstumsphase sowie vom pH-Wert. Die maximale *inv*-Expression erfolgt bei 26°C, wohingegen sie bei 37°C vollständig reprimiert wird [Pepe *et al.*, 1994]. Die Repression von *inv* bei 37°C wird durch einen Komplex aus *YmoA*/H-NS vermittelt [Ellison *et al.*, 2003] und stellt damit einen Unterschied zu sonst durch H-NS regulierte Virulenzgene dar [Heroven *et al.*, 2004]. Obwohl der repressorische Komplex aus *YmoA* und H-NS bei 26°C und 37°C vorhanden ist, ist *RovA* nur bei moderaten Temperaturen in der Lage, diesen zu verdrängen [Ellison *et al.*, 2006]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass *RovA* als Proteinthermometer fungiert und bei niedrigen Temperaturen einem Konformationswechsel unterliegt [Herbst *et al.*, 2009]. Im Unterschied dazu konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass *TcaR2* keine konformationellen Änderungen bei 37°C eingeht. Zusammen mit den intrinsischen H-NS-Bindestellen ergibt sich für die Repression der *tc*-Gene bei 37°C ein bis dahin noch nicht beschriebener Regulationsmechanismus, bei welchem *TcaR2* sowie *YmoA*/H-NS als Antagonisten fungieren. Bei niedrigen Temperaturen, im Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase der Bakterien, wird *TcaR2* aufgrund seiner positiven Autoregulation vermehrt gebildet und induziert infolgedessen die Expression der beiden Toxingene *tcaA* und *tcaB*. Für das *in vivo* Geschehen ergibt sich somit folgendes Modell: Gelangen die *Y. enterocolitica*-Zellen in das Insekt, beispielsweise durch die orale Aufnahme, so kommt es zunächst zu einer drastischen Änderung der Umgebungsbedingungen. Für eine erfolgreiche Infektion muss *Y. enterocolitica* die neuen Bedingungen detektieren und zu einem pathogenen Lebensstil wechseln. Hierbei ist die Pathogenese durch das Umgehen der Immunantwort des Insektes sowie durch den Tod des Wirtes durch die Produktion von Toxinen charakterisiert. Wundheilung, Melanisierung, Einkapselung, Phagozytose und Nodulation sind die Hauptkomponenten des zellulären Immunsystems von Insekten [Beutler, 2004]. Zelluläre Abwehrmechanismen sind durch die direkte Interaktion der Haemozyten mit den Eindringlingen (Pathogene) gekennzeichnet. Hierbei erkennt das Insektenimmunsystem Eindringlinge wie Pilze und Bakterien als „Fremdkörper“ und löst eine Reihe unterschiedlicher Reaktionen aus. So werden die Erreger von Plasmozyten und granulären Zellen durch Phagozytose aufgenommen und anschließend intrazellulär verdaut. Ist die Anzahl an Bakterien zu groß, kommt es zur sogenannten Knötchenbildung. Dabei werden die Pathogene in einem Koagulum aus Hämozyten und Hämolymphekomponenten verklumpt und unschädlich gemacht. Sind die eingedrungenen Erreger für die phagozytierenden Zellen zu groß, werden sie eingekapselt. Diese Reaktion wird oftmals von einer

Melaninbildung begleitet, die durch das Enzym Phenoloxidase katalysiert wird [Smith, 2001]. Zusätzlich zur zellulären Abwehrreaktion gibt es die humorale Immunantwort, an deren Ende antimikrobielle Peptide entstehen. Diese bewirken Änderungen in der Permeabilität von Membranzellwänden und/oder Ionen, inhibieren die Zellwandsynthese eingedrungener Mikroorganismen oder verursachen die Zellwandlyse bei Gram-positiven Bakterien [Engelmann *et al.*, 2010]. Wie *Y. enterocolitica* die Immunantwort des Wirtes umgeht ist noch unklar. Zur Ermittlung möglicher Gene, die für die erfolgreiche Infektion des Insektenwirtes eine Rolle spielen, führten HEERMANN *et al.* einen Vergleich der beiden Genome von *Y. enterocolitica* und *P. luminescens* durch [Heermann *et al.*, 2008]. Zu den ermittelten Kandidatengenen gehören Gene, die für verschiedene Zwei-Komponentensysteme kodieren, wie beispielsweise PhoP, das einen wichtigen Regulator in der Virulenz von Gram-negativen Bakterien darstellt, Gene, die für *Quorum sensing*-Systeme wie beispielsweise YenI und YenR kodieren sowie Gene, deren Produkte in der universellen Stressantwort involviert sind, wie z.B. UspA und UspB [Heermann *et al.*, 2008; Erickson *et al.*, 2011]. Zur erfolgreichen Kolonisation und Penetration von Epithelzellen sowie zur Umgehung der Immunantwort der Insekten werden von *Y. enterocolitica* Proteasen und Lipasen produziert. Ein weiterer wichtiger Faktor der bei der Infektion von Insekten durch *Y. pestis* identifiziert wurde, ist OxyR, welches den Bakterienzellen eine Resistenz gegen reaktive Sauerstoffspezies, die beispielsweise während der Melaninbildung entstehen, vermittelt [Erickson *et al.*, 2011]. Nach dem sich der Stoffwechsel der Pathogene an die neue Umgebung angepasst hat, werden unterschiedliche Virulenzfaktoren gebildet, die die Erschließung des Insektes als neue Nährstoffquelle ermöglichen sollen. Hierzu gehören beispielsweise verschiedene Hämolsine, *Repeats-in-toxin*-Toxine sowie die Tc-Toxine. Letztere werden erst gebildet, wenn die Bakteriendichte einen gewissen Schwellenwert erreicht hat und sich die Population im Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase befindet. So wird über die beiden *Quorum sensing*-Systeme YenI und LuxS zunächst die Expression von *tcaR2* und infolgedessen von *tcaA* und *tcaB* induziert. Die Expression von *tcaR2* und *tcaA* erfolgt *in vitro* nur in einem kleinen Teil der Population. Dadurch wird einerseits die energieaufwendige Produktion des Tc-Toxins auf ein Minimum reduziert. Andererseits erfolgt die Expression der *tc*-Gene erst, wenn eine ausreichend hohe Anzahl an Bakterien vorhanden ist. Bereits für *P. luminescens* konnte gezeigt werden, dass bereits geringste Mengen des Tc-Komplexes für eine toxische Wirkung ausreichend ist [Blackburn *et al.*, 1998]. Eine Feinsteuerung der Expression der *tc*-Gene wird zusätzlich durch den Komplex aus YmoA und H-NS gewährleistet. Die Frage, ob die Expression von *tcaA in vivo* ebenfalls bistabil erfolgt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Das Tc-Toxin in *Y. enterocolitica* ist anscheinend an den Zellpolen lokalisiert. Die Translokation des Komplexes erfolgt vermutlich in einer ähnlichen Art und Weise wie bei *P. luminescens*. So vermittelt die A-Komponente, bestehend aus TcaA und TcaB, wahrscheinlich die Bindung an die Rezeptorzellen des Insektendarmes. Aufgrund des hohen pH-Wertes (>11) im Darm kommt es zur

Konformationsänderung des Toxinkomplexes und TccC2, die toxische Komponente des Toxins, gelangt in die Wirtszelle und führt dort zum Zusammenbrechen des Zytoskeletts und damit zum Zelltod. Als Folge der Zerstörung des Darmepithels können die *Y. enterocolitica*-Zellen in die Hämolymphe eindringen. Bei der Lyse des Darmes wird eine große Menge an Eisen freigesetzt. Dieses könnte wiederum an die mittels Ligand3 vorhergesagte putative Eisenbindestelle von TcaR1 binden, das nun seinerseits die weitere Expression von *tcaR2* und damit die weitere Produktion des Tc-Toxins verhindern könnte. Eine solche Eisenabhängigkeit wurde bereits für eine Vielzahl von Toxinen in Bakterien beschrieben. So wird beispielsweise die Produktion des Shiga-Toxins von *E. coli*, des Diphtherietoxins von *C. diphtheriae* und des Exotoxins A von *P. aeruginosa* bei Eisenmangel induziert [Litwin *et al.*, 1993]. Für Pathogene ist Eisen ein essentieller und oftmals limitierter Faktor, sodass sie eine Vielzahl verschiedener Mechanismen entwickelt haben, um an das Eisen des Wirtes zu gelangen. Der größte Teil des Eisens liegt im Insekt als Serum-Transferrin und als Ferritin in der Hämolymphe vor. Ein zweites Eisenreservoir findet sich in den Enterozyten des Mitteldarmes [Nichol *et al.*, 2002]. Gelangen die *Y. enterocolitica*-Zellen nun in die Hämolymphe, besteht keine weitere Notwendigkeit die Tc-Toxine zu produzieren, weshalb durch Hämolysine freigesetztes Eisen an TcaR1 binden könnte, das nun seinerseits die Produktion des Tc-Toxins durch eine Repression von *tcaR2* verhindert könnte. Nach dem Tod des Insektes steht der Kadaver den *Y. enterocolitica*-Zellen als Nährstoffquelle zur Verfügung.

Bei 37°C kommt es dagegen vermutlich aufgrund des höheren Oligomerisierungsgrades des YmoA/H-NS-Komplexes sowie des verstärkten Abbaus von TcaR2 durch Proteasen zu einer Repression der Expression der insektiziden Toxingene, wodurch die Bildung des nativen Toxins optimal an den Insektenwirt angepasst ist. Dadurch unterliegt die Expression der *tc*-Gene einem hochkomplexen regulatorischem Netzwerk, welches eine energieaufwendige Bildung des Toxins bei zu geringer Zelldichte und/oder Temperaturen von >30°C verhindert. In vorliegender Arbeit konnte zwar der genaue Mechanismus, welcher der Freisetzung des hochmolekularen Toxinkomplexes aus der Zelle zugrunde liegt nicht geklärt werden, das *in vivo* Modell *C. elegans* sowie die Bildung des Toxins in nur einem kleinen Teil der Population liefert jedoch erste Hinweise auf eine Beteiligung der Lysegene Holin und Endolysin. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit aufgeklärten Zusammenhänge findet sich in Abb. 60.

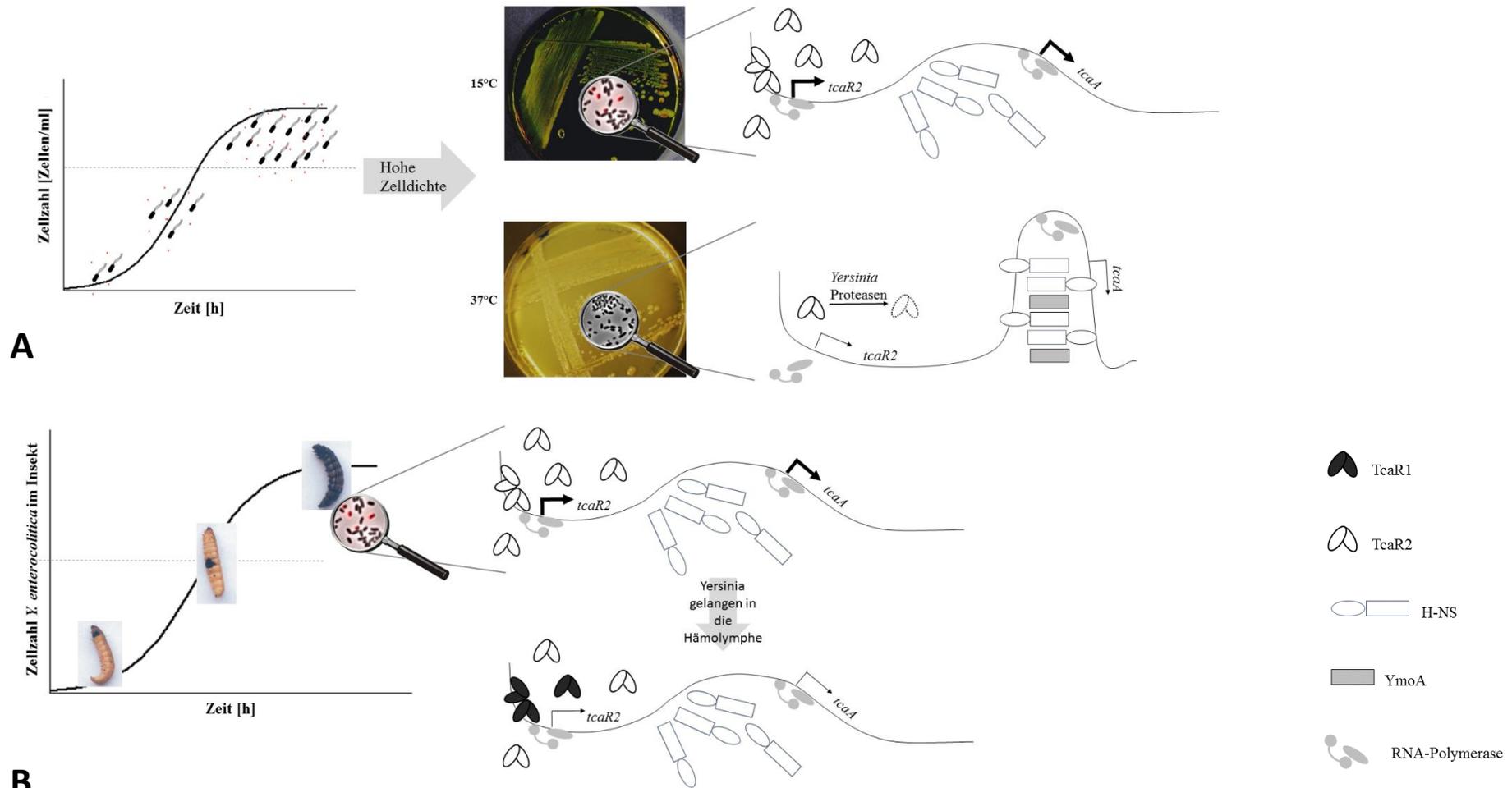


Abb. 60: Modell zur Expression der *tc*-Gene *in vitro* und *in vivo*. A) *in vitro* Expression der *tc*-Gene: Bei 15°C, im Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase, exprimiert ein kleiner Teil der Population *tcaR2* und infolgedessen die *tc*-Gene. Bei 37°C kommt es aufgrund des Abbaus von TcaR2 durch Proteasen sowie durch die Bindung von YmoA/H-NS stromaufwärts vom *tcaA*-Promotor und an eine DNA-Sequenz innerhalb der kodierenden Region zur Bildung eines Nukleoproteinkomplexes, in dem die RNA-Polymerase eingeschlossen vorliegt und die Transkription auf einer frühen Stufe gehemmt wird. B) *in vivo* Expression: Nach der Infektion des Insektes mit *Y. enterocolitica* W22703 kommt es zur Proliferation der Bakterien im Darm. Ein kleiner Teil der Population exprimiert *tcaR2* und infolgedessen die *tc*-Gene. Durch die Produktion der Tc-Proteine sowie weiterer gewebschädigender Moleküle könnte es zur Auflösung des Darmepithels kommen und *Y. enterocolitica* könnte in die Hämolymphe des Insektes gelangen. Freies Eisen in Form von Fe³⁺ könnte an TcaR1 binden, welches nun die weitere Expression von *tcaR2* und infolgedessen der *tc*-Gene verhindert.

5 Literaturverzeichnis

- ACKERMANN, M., B. STECHER, N. E. FREED, P. SONGHET, W. D. HARDT AND M. DOEBELI (2008). "Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise." Nature **454**(7207): 987-990.
- AEPFELBACHER, M., C. TRASAK AND K. RUCKDESCHEL (2007). "Effector functions of pathogenic *Yersinia* species." Thromb Haemost **98**(3): 521-529.
- AGAISSE, H. AND D. LERECLUS (1996). "STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability." Mol Microbiol **20**(3): 633-643.
- AKTORIES, K., A. E. LANG, C. SCHWAN AND H. G. MANNHERZ (2011). "Actin as target for modification by bacterial protein toxins." Febs j **278**(23): 4526-4543.
- AKTORIES, K., G. SCHMIDT AND A. LANG (2014). *Photorhabdus luminescens* Toxins TccC3 and TccC5: Insecticidal ADP-Ribosyltransferases that Modify Threonine and Glutamine, Springer Berlin Heidelberg: 1-15.
- ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS AND J. WATSON (1994). "The membrane structure." Molecular biology of the cell **3**: 477-506.
- ALEKSIĆ, S. (1995). "Occurrence of *Y. enterocolitica* antigens O:3, O:9 and O:8 in different *Yersinia* species, their corresponding H antigens and origin." Contrib Microbiol Immunol **13**: 89-92.
- ALEKSIC, S. AND J. BOCKEMUHL (1990). "Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections." Immun Infekt **18**(6): 178-185.
- ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHAFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER AND D. J. LIPMAN (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-3402.
- ALTUVIA, S., D. KORNITZER, S. KOBI AND A. B. OPPENHEIM (1991). "Functional and structural elements of the mRNA of the *cIII* gene of bacteriophage lambda." J Mol Biol **218**(4): 723-733.
- ALTUVIA, S., D. KORNITZER, D. TEFF AND A. B. OPPENHEIM (1989). "Alternative mRNA structures of the *cIII* gene of bacteriophage lambda determine the rate of its translation initiation." J Mol Biol **210**(2): 265-280.
- ALTUVIA, S. AND A. B. OPPENHEIM (1986). "Translational regulatory signals within the coding region of the bacteriophage lambda *cIII* gene." J Bacteriol **167**(1): 415-419.
- ARAVIND, L., V. ANANTHARAMAN, S. BALAJI, M. M. BABU AND L. M. IYER (2005). "The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond." FEMS Microbiol Rev **29**(2): 231-262.
- ARRHENIUS, S. (1889). "Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren." Zeitschrift für Physikalische Chemie **4**: 226-248.
- ARVASTSON, B., K. DAMGAARD AND W. S. (1971). "Clinical symptoms of infection with *Yersinia enterocolitica*." Scand. J. Infect. Dis. **3**: 137-140.
- ATKINSON, S., C. Y. CHANG, R. E. SOCKETT, M. CAMARA AND P. WILLIAMS (2006a). "Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility." J Bacteriol **188**(4): 1451-1461.
- ATKINSON, S., R. E. SOCKETT, M. CAMARA AND P. WILLIAMS (2006b). "Quorum sensing and the lifestyle of *Yersinia*." Curr Issues Mol Biol **8**(1): 1-10.
- ATKINSON, S., J. P. THROUP, G. S. STEWART AND P. WILLIAMS (1999). "A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping." Mol Microbiol **33**(6): 1267-1277.

- AXLER-DIPERTE, G. L., V. L. MILLER AND A. J. DARWIN (2006). "YtxR, a conserved LysR-like regulator that induces expression of genes encoding a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue in *Yersinia enterocolitica*." J Bacteriol **188**(23): 8033-8043.
- AZNAR, S., S. PAYTUBI AND A. JUAREZ (2013). "The Hha protein facilitates incorporation of horizontally acquired DNA in enteric bacteria." Microbiology **159**(Pt 3): 545-554.
- BALABAN, N. Q., J. MERRIN, R. CHAIT, L. KOWALIK AND S. LEIBLER (2004). "Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch." Science **305**(5690): 1622-1625.
- BAÑOS, R. C., J. I. PONS, C. MADRID AND A. JUAREZ (2008). "A global modulatory role for the *Yersinia enterocolitica* H-NS protein." Microbiology **154**(Pt 5): 1281-1289.
- BAÑOS, R. C., A. VIVERO, S. AZNAR, J. GARCÍA, M. PONS, C. MADRID AND A. JUÁREZ (2009). "Differential Regulation of Horizontally Acquired and Core Genome Genes by the Bacterial Modulator H-NS." PLoS Genet **5**(6): e1000513.
- BATES, S. L., J.-Z. ZHAO, R. T. ROUSH AND A. M. SHELTON (2005). "Insect resistance management in GM crops: past, present and future." Nat Biotech **23**(1): 57-62.
- BERGANN, T., J. KLEEMANN AND D. SOHR (1995). "Model studies of psychrotrophia in *Yersinia enterocolitica*." Zentralbl Veterinarmed B **42**(9): 523-531.
- BERNSTEIN, J. A., A. B. KHODURSKY, P. H. LIN, S. LIN-CHAO AND S. N. COHEN (2002). "Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9697-9702.
- BERTANI, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **62**(3): 293-300.
- BEUTLER, B. (2004). "Innate immunity: an overview." Mol Immunol **40**(12): 845-859.
- BIRMINGHAM, C. L. S., ADAM C.; BAKOWSKI, MALINA A.; YOSHIMORI, TAMOTSU AND BRUMELL, JOHN H. (2006). "Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole." J. Biol. Chem. **281**(16): 11374-11383.
- BLACK, R. E., R. J. JACKSON, T. TSAI, M. MEDVESKY, M. SHAYEGANI, J. C. FEELEY, K. I. MACLEOD AND A. M. WAKELEE (1978). "Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk." N Engl J Med **298**(2): 76-79.
- BLACKBURN, M., E. GOLUBEVA, D. BOWEN AND R. H. FFRENCH-CONSTANT (1998). "A novel insecticidal toxin from *Photobacterium luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *manduca sexta*." Appl Environ Microbiol **64**(8): 3036-3041.
- BLASI, U. AND R. YOUNG (1996). "Two beginnings for a single purpose: the dual-start holins in the regulation of phage lysis." Mol Microbiol **21**(4): 675-682.
- 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**(8): 3561-3565.
- BLOCKER, A., K. KOMORIYA AND S.-I. AIZAWA (2003). "Type III secretion systems and bacterial flagella: Insights into their function from structural similarities." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(6): 3027-3030.
- BODDICKER, J. D. AND B. D. JONES (2004). "Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells." Infect Immun **72**(4): 2002-2013.
- BÖHME, K., R. STEINMANN, J. KORTMANN, S. SEEKIRCHER, A. K. HEROVEN, E. BERGER, F. PISANO, T. THIERMANN, H. WOLF-WATZ, F. NARBERHAUS AND P. DERSCH (2012). "Concerted actions of a thermo-labile

- regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence." PLoS Pathog **8**(2): e1002518.
- BORYSOWSKI, J., B. WEBER-DABROWSKA AND A. GORSKI (2006). "Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents." Exp Biol Med (Maywood) **231**(4): 366-377.
- BOTTONE, E. J. (1977). "*Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism." CRC Crit Rev Microbiol **5**(2): 211-241.
- BOTTONE, E. J. (1997). "*Yersinia enterocolitica*: the charisma continues." Clin Microbiol Rev **10**(2): 257-276.
- BOTTONE, E. J. (1999). "*Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates." Microbes Infect **1**(4): 323-333.
- BOTZLER, R. (1987). "Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Y. frederiksenii* from forest soil, Federal Republic of Germany." Journal of wildlife diseases **23**(2): 311-313.
- BOUFFARTIGUES, E., M. BUCKLE, C. BADAUT, A. TRAVERS AND S. RIMSKY (2007). "H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing." Nat Struct Mol Biol **14**(5): 441-448.
- BOWEN, D., T. A. ROCHELEAU, M. BLACKBURN, O. ANDREEV, E. GOLUBEVA, R. BHARTIA AND R. H. FRENCH-CONSTANT (1998a). "Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*." Science **280**(5372): 2129-2132.
- BOWEN, D. J. AND J. C. ENSIGN (1998b). "Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*." Appl Environ Microbiol **64**(8): 3029-3035.
- BRADFORD, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- BRAMUCCI, M. G. AND V. NAGARAJAN (1996). "Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality." Appl Environ Microbiol **62**(11): 3948-3953.
- BRAWERMAN, G. (1990). "Mechanisms of mRNA decay." Trends Biotechnol **8**(7): 171-174.
- BRENNER, D. J. (1979). "Speciation in *Yersinia*." Contrib Microbiol Immunol **5**: 33-43.
- BRENNER, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**(1): 71-94.
- BRESOLIN, G. (2004). Charakterisierung des Kälteadaptations-Stimulons von *Yersinia enterocolitica* durch transposongestützte Genomanalyse. Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie. München, Technische Universität München.
- BRESOLIN, G., J. A. MORGAN, D. ILGEN, S. SCHERER AND T. M. FUCHS (2006a). "Low temperature-induced insecticidal activity of *Yersinia enterocolitica*." Mol Microbiol **59**(2): 503-512.
- BRESOLIN, G., K. NEUHAUS, S. SCHERER AND T. M. FUCHS (2006b). "Transcriptional analysis of long-term adaptation of *Yersinia enterocolitica* to low-temperature growth." J Bacteriol **188**(8): 2945-2958.
- BRESOLIN, G., J. TRCEK, S. SCHERER AND T. M. FUCHS (2008). "Presence of a functional flagellar cluster Flag-2 and low-temperature expression of flagellar genes in *Yersinia enterocolitica* W22703." Microbiology **154**(Pt 1): 196-206.
- BUTLER, S. M., R. A. FESTA, M. J. PEARCE AND K. H. DARWIN (2006). "Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis." Mol Microbiol **60**(3): 553-562.

- CAMBRONNE, E. D., L. W. CHENG AND O. SCHNEEWIND (2000). "LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia yop* virulon, are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism." Mol Microbiol **37**(2): 263-273.
- CHAI, Y., F. CHU, R. KOLTER AND R. LOSICK (2008). "Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **67**(2): 254-263.
- CHAIN, P. S., E. CARNIEL, F. W. LARIMER, J. LAMERDIN, P. O. STOUTLAND, W. M. REGALA, A. M. GEORGESCU, L. M. VERGEZ, M. L. LAND, V. L. MOTIN, R. R. BRUBAKER, J. FOWLER, J. HINNEBUSCH, M. MARCEAU, C. MEDIGUE, M. SIMONET, V. CHENAL-FRANCISQUE, B. SOUZA, D. DACHEUX, J. M. ELLIOTT, A. DERBISE, L. J. HAUSER AND E. GARCIA (2004). "Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13826-13831.
- CHALABAEV, S., E. TURLIN, J. F. CHARLES, A. NAMANE, S. PAGES, A. GIVAUDAN, E. BRITO-FRAVALLO, A. DANCHIN AND F. BIVILLE (2007). "The HcaR regulatory protein of *Photobacterium luminescens* affects the production of proteins involved in oxidative stress and toxemia." Proteomics **7**(24): 4499-4510.
- CHEETHAM, B. F. AND M. E. KATZ (1995). "A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants." Mol Microbiol **18**(2): 201-208.
- CHEN, P. E., C. COOK, A. C. STEWART, N. NAGARAJAN, D. D. SOMMER, M. POP, B. THOMASON, M. P. THOMASON, S. LENTZ, N. NOLAN, S. SOZHAMANNAN, A. SULAKVELIDZE, A. MATECZUN, L. DU, M. E. ZWICK AND T. D. READ (2010). "Genomic characterization of the *Yersinia* genus." Genome Biol **11**(1): R1.
- CHUGANI, S. A., M. R. PARSEK AND A. M. CHAKRABARTY (1998). "Transcriptional repression mediated by LysR-type regulator CatR bound at multiple binding sites." J Bacteriol **180**(9): 2367-2372.
- CICHE, T. A. AND J. C. ENSIGN (2003). "For the insect pathogen *Photobacterium luminescens*, which end of a nematode is out?" Appl Environ Microbiol **69**(4): 1890-1897.
- CLARKE, D. J. (2008). "*Photobacterium*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism." Cell Microbiol **10**(11): 2159-2167.
- COBURN, G. A. AND G. A. MACKIE (1999). "Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **62**: 55-108.
- COOK, S. M. AND J. D. MCARTHUR (2013). "Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens." Virulence **4**(5): 350-353.
- CORNELIS, G. AND C. COLSON (1975). "Restriction of DNA in *Yersinia enterocolitica* detected by recipient ability for a derepressed R factor from *Escherichia coli*." J Gen Microbiol **87**(2): 285-291.
- CORNELIS, G., C. SLUITERS, C. L. DE ROUVROIT AND T. MICHIELS (1989). "Homology between VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator." J Bacteriol **171**(1): 254-262.
- CORNELIS, G. R. (2002a). "*Yersinia* type III secretion: send in the effectors." J Cell Biol **158**(3): 401-408.
- CORNELIS, G. R. (2002b). "The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10): 742-752.
- CORNELIS, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." Nat Rev Micro **4**(11): 811-825.
- CORNELIS, G. R., C. SLUITERS, I. DELOR, D. GEIB, K. KANIGA, C. LAMBERT DE ROUVROIT, M. P. SORY, J. C. VANOOTEGHEM AND T. MICHIELS (1991). "*ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions." Mol Microbiol **5**(5): 1023-1034.
- COVER, T. L. AND R. C. ABER (1989). "*Yersinia enterocolitica*." New England journal of medicine **321**: 16-24.

- DABORN, P. J., N. WATERFIELD, M. A. BLIGHT AND R. H. FRENCH-CONSTANT (2001). "Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photobacterium luminescens* in culture and during insect infection." J Bacteriol **183**(20): 5834-5839.
- DAME, R. T. (2005). "The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin." Mol Microbiol **56**(4): 858-870.
- DAME, R. T., M. C. NOOM AND G. J. WUITE (2006). "Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation." Nature **444**(7117): 387-390.
- DAME, R. T., C. WYMAN, R. WURM, R. WAGNER AND N. GOOSEN (2002). "Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1." J Biol Chem **277**(3): 2146-2150.
- DATSENKO, K. A. AND B. L. WANNER (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-6645.
- DE JONG, I. G., P. HACCOU AND O. P. KUIPERS (2011). "Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies." Bioessays **33**(3): 215-223.
- DE LA CRUZ, F., M. CARMONA AND A. JUAREZ (1992). "The Hha protein from *Escherichia coli* is highly homologous to the YmoA protein from *Yersinia enterocolitica*." Mol Microbiol **6**(22): 3451-3452.
- DE WET, J. R., K. V. WOOD, M. DELUCA, D. R. HELINSKI AND S. SUBRAMANI (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol **7**(2): 725-737.
- DELOR, I. AND G. R. CORNELIS (1992). "Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits." Infect Immun **60**(10): 4269-4277.
- DEWEY, J. S., C. G. SAVVA, R. L. WHITE, S. VITHA, A. HOLZENBURG AND R. YOUNG (2010). "Micron-scale holes terminate the phage infection cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(5): 2219-2223.
- DIAZ, E., R. LOPEZ AND J. L. GARCIA (1991). "Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits." J Biol Chem **266**(9): 5464-5471.
- DIGEL, I., P. KAYSER AND G. M. ARTMANN (2008). "Molecular Processes in Biological Thermosensation." Journal of Biophysics **2008**.
- DIMARI, J. F. AND D. H. BECHHOFFER (1993). "Initiation of mRNA decay in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **7**(5): 705-717.
- DOBRINDT, U., B. HOCHHUT, U. HENTSCHEL AND J. HACKER (2004). "Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms." Nat Rev Microbiol **2**(5): 414-424.
- DODD, S. J., M. R. HURST, T. R. GLARE, M. O'CALLAGHAN AND C. W. RONSON (2006). "Occurrence of *sep* insecticidal toxin complex genes in *Serratia* spp. and *Yersinia frederiksenii*." Appl Environ Microbiol **72**(10): 6584-6592.
- DON, J. B., B. HERVÉ, U. JAN, A. JEAN MICHEL, G. S. ARNOLD, G. R. FANNING, P. C. GERALDINE AND H. H. MOLLARET "Yersinia intermedia: A new species of enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains (formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like)." Current Microbiology.
- DORMAN, C. J. (2007). "H-NS, the genome sentinel." Nat Rev Microbiol **5**(2): 157-161.
- DOW, J. A. (1984). "Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport." Am J Physiol **246**(4 Pt 2): R633-636.
- DUBNAU, D. AND R. LOSICK (2006). "Bistability in bacteria." Mol Microbiol **61**(3): 564-572.

- DUCHAUD, E., C. RUSNIOK, L. FRANGEUL, C. BUCHRIESER, A. GIVAUDAN, S. TAOURIT, S. BOCS, C. BOURSAUX-EUDE, M. CHANDLER, J. F. CHARLES, E. DASSA, R. DEROSE, S. DERZELLE, G. FREYSSINET, S. GAUDRIALT, C. MEDIGUE, A. LANOIS, K. POWELL, P. SIGUIER, R. VINCENT, V. WINGATE, M. ZOUINE, P. GLASER, N. BOEMARE, A. DANCHIN AND F. KUNST (2003). "The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*." Nat Biotechnol **21**(11): 1307-1313.
- DULBECCO, R. AND M. VOGT (1954). "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses." J Exp Med **99**(2): 167-182.
- EDMONDS, T. G., H. DING, X. YUAN, Q. WEI, K. S. SMITH, J. A. CONWAY, L. WIECZOREK, B. BROWN, V. POLONIS, J. T. WEST, D. C. MONTEFIORI, J. C. KAPPES AND C. OCHSENBAUER (2010). "Replication competent molecular clones of HIV-1 expressing *Renilla* luciferase facilitate the analysis of antibody inhibition in PBMC." Virology **408**(1): 1-13.
- ELEWAUT, D., J. A. DIDONATO, J. MOGG KIM, F. TRUONG, L. ECKMANN AND M. F. KAGNOFF (1999). "NF- κ B Is a Central Regulator of the Intestinal Epithelial Cell Innate Immune Response Induced by Infection with Enteroinvasive Bacteria." The Journal of Immunology **163**(3): 1457-1466.
- ELLERMEIER, C. D. AND J. M. SLAUCH (2003). "RtsA and RtsB Coordinately Regulate Expression of the Invasion and Flagellar Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium." J Bacteriol **185**(17): 5096-5108.
- ELLISON, D. W., M. B. LAWRENZ AND V. L. MILLER (2004). "Invasin and beyond: regulation of *Yersinia* virulence by RovA." Trends Microbiol **12**(6): 296-300.
- ELLISON, D. W. AND V. L. MILLER (2006). "H-NS represses *inv* transcription in *Yersinia enterocolitica* through competition with RovA and interaction with YmoA." J Bacteriol **188**(14): 5101-5112.
- ELLISON, D. W., B. YOUNG, K. NELSON AND V. L. MILLER (2003). "YmoA negatively regulates expression of invasin from *Yersinia enterocolitica*." J Bacteriol **185**(24): 7153-7159.
- ENGELMANN, I. AND N. PUJOL (2010). "Innate immunity in *C. elegans*." Adv Exp Med Biol **708**: 105-121.
- ERICKSON, D. L., C. W. RUSSELL, K. L. JOHNSON, T. HILEMAN AND R. M. STEWART (2011). "PhoP and OxyR transcriptional regulators contribute to *Yersinia pestis* virulence and survival within *Galleria mellonella*." Microb Pathog **51**(6): 389-395.
- ERIKSSON, S., R. HURME AND M. RHEN (2002). "Low-temperature sensors in bacteria." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1423): 887-893.
- ESSELBORN, J. (2010). Untersuchung des Holin-Endolysin-Systems innerhalb der *tc*-PAI_{ve} von *Yersinia enterocolitica* W22703. Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie. München, Technische Universität München.
- EWING, W. H., A. J. ROSS, D. J. BRENNER AND G. R. FANNING (1978). "*Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **28**(1): 37-44.
- FALKER, S., M. A. SCHMIDT AND G. HEUSIPP (2006). "Altered Ca²⁺ regulation of Yop secretion in *Yersinia enterocolitica* after DNA adenine methyltransferase overproduction is mediated by Clp-dependent degradation of LcrG." J Bacteriol **188**(20): 7072-7081.
- FANG, F. C. AND S. RIMSKY (2008). "New Insights into Transcriptional Regulation by H-NS." Curr Opin Microbiol **11**: 113-120.
- FARR, S. B. AND T. KOGOMA (1991). "Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." Microbiol Rev **55**(4): 561-585.
- FEDERLE, M. J. AND B. L. BASSLER (2003). "Interspecies communication in bacteria." J Clin Invest **112**(9): 1291-1299.

- FERRELL, J. E., JR. (2002). "Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability." Curr Opin Cell Biol **14**(2): 140-148.
- FFRENCH-CONSTANT, R. AND D. BOWEN (1999). "*Photorhabdus* toxins: novel biological insecticides." Curr Opin Microbiol **2**(3): 284-288.
- FFRENCH-CONSTANT, R., N. WATERFIELD, P. DABORN, S. JOYCE, H. BENNETT, C. AU, A. DOWLING, S. BOUNDY, S. REYNOLDS AND D. CLARKE (2003). "*Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen." FEMS Microbiol Rev **26**(5): 433-456.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H., A. DOWLING AND N. R. WATERFIELD (2007). "Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture." Toxicon **49**(4): 436-451.
- FFRENCH-CONSTANT, R. AND N. WATERFIELD (2005). An ABC Guide to the Bacterial Toxin Complexes. Advances in Applied Microbiology. J. W. B. G. M. G. Allen I. Laskin and S. Sima, Academic Press. **Volume 58**: 169-183.
- FISCHETTI, V. A. (2005). "Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives." Trends Microbiol **13**(10): 491-496.
- FOULTIER, B., P. TROISFONTAINES, D. VERTOMMEN, M. N. MARENNE, M. RIDER, C. PARSOT AND G. R. CORNELIS (2003). "Identification of substrates and chaperone from the *Yersinia enterocolitica* 1B Ysa type III secretion system." Infect Immun **71**(1): 242-253.
- FREES, D., S. N. QAZI, P. J. HILL AND H. INGMER (2003). "Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence." Mol Microbiol **48**(6): 1565-1578.
- FUCHS, T., K. BRANDT, M. STARKE AND T. RATTEI (2011). "Shotgun sequencing of *Yersinia enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O:9): genomic evidence for oscillation between invertebrates and mammals." BMC Genomics **12**(1): 168.
- FUCHS, T. M., G. BRESOLIN, L. MARCINOWSKI, J. SCHACHTNER AND S. SCHERER (2008). "Insecticidal genes of *Yersinia* spp.: taxonomical distribution, contribution to toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution." BMC Microbiol **8**(1): 214.
- FUQUA, C., S. C. WINANS AND E. P. GREENBERG (1996). "Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators." Annu Rev Microbiol **50**: 727-751.
- GAILLOT, O., E. PELLEGRINI, S. BREGENHOLT, S. NAIR AND P. BERCHE (2000). "The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*." Mol Microbiol **35**(6): 1286-1294.
- GALINDO, C. L., J. A. ROSENZWEIG, M. L. KIRTLEY AND A. K. CHOPRA (2011). "Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis." Journal of Pathogens **2011**: 16.
- GALLEGOS, M. T., R. SCHLEIF, A. BAIROCH, K. HOFMANN AND J. L. RAMOS (1997). "Arac/XylS family of transcriptional regulators." Microbiol Mol Biol Rev **61**(4): 393-410.
- GARCIA, J., C. MADRID, A. JUAREZ AND M. PONS (2006). "New roles for key residues in helices H1 and H2 of the *Escherichia coli* H-NS N-terminal domain: H-NS dimer stabilization and Hha binding." J Mol Biol **359**(3): 679-689.
- GARDNER, T. S., C. R. CANTOR AND J. J. COLLINS (2000). "Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*." Nature **403**(6767): 339-342.
- GATSOGIANNIS, C., A. E. LANG, D. MEUSCH, V. PFAUMANN, O. HOFNAGEL, R. BENZ, K. AKTORIES AND S. RAUNSER (2013). "A syringe-like injection mechanism in *Photorhabdus luminescens* toxins." Nature **495**(7442): 520-523.

- GEBRANDE, C. (2012). Untersuchungen zur Freisetzung der toxischen Komponente TcaA der insektiziden Pathogenitätsinsel Tc-PAI_{ye} in *Yersinia enterocolitica* W22703. Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie. München, Technische Universität München.
- GEMSKI, P., J. R. LAZERE AND T. CASEY (1980). "Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*." Infect Immun **27**(2): 682-685.
- GENDLINA, I., K. G. HELD, S. S. BARTRA, B. M. GALLIS, C. E. DONEANU, D. R. GOODLETT, G. V. PLANO AND C. M. COLLINS (2007). "Identification and type III-dependent secretion of the *Yersinia pestis* insecticidal-like proteins." Mol Microbiol **64**(5): 1214-1227.
- GERSHON, H. AND D. GERSHON (2002). "*Caenorhabditis elegans* - a paradigm for aging research: advantages and limitations." Mech Ageing Dev **123**(4): 261-274.
- GIBSON, K. E. AND T. J. SILHAVY (1999). "The LysR homolog LrhA promotes RpoS degradation by modulating activity of the response regulator sprE." J Bacteriol **181**(2): 563-571.
- GIRARDIN, S. E., P. J. SANSONETTI AND D. J. PHILPOTT (2002). "Intracellular vs extracellular recognition of pathogens - common concepts in mammals and flies." Trends Microbiol **10**(4): 193-199.
- GOLUBOV, A., J. HESEEMANN AND A. RAKIN (2003). "Uncovering genomic differences in human pathogenic *Yersinia enterocolitica*." FEMS Immunol Med Microbiol **38**(2): 107-111.
- GOODRICH-BLAIR, H. AND D. J. CLARKE (2007). "Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination." Mol Microbiol **64**(2): 260-268.
- GOTOH, H., N. OKADA, Y. G. KIM, K. SHIRAIISHI, N. HIRAMI, T. HANEDA, A. KURITA, Y. KIKUCHI AND H. DANBARA (2003). "Extracellular secretion of the virulence plasmid-encoded ADP-ribosyltransferase SpvB in *Salmonella*." Microb Pathog **34**(5): 227-238.
- GOTTESMAN, S. (2003). "Proteolysis in bacterial regulatory circuits." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 565-587.
- GOTTESMAN, S., E. ROCHE, Y. ZHOU AND R. T. SAUER (1998). "The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system." Genes Dev **12**(9): 1338-1347.
- GOVERDE, R. L., J. G. KUSTERS AND J. H. HUIS IN 'T VELD (1994). "Growth rate and physiology of *Yersinia enterocolitica*; influence of temperature and presence of the virulence plasmid." J Appl Bacteriol **77**(1): 96-104.
- GOVIND, R. AND B. DUPUY (2012). "Secretion of *Clostridium difficile* Toxins A and B Requires the Holin-like Protein TcdE." PLoS Pathog **8**(6): e1002727.
- GRAU, R. AND D. DE MENDOZA (1993). "Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **8**(3): 535-542.
- GRAUMANN, P. L. (2006). "Different genetic programmes within identical bacteria under identical conditions: the phenomenon of bistability greatly modifies our view on bacterial populations." Mol Microbiol **61**(3): 560-563.
- GRÜNDLING, A., M. D. MANSON AND R. YOUNG (2001). "Holins kill without warning." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9348-9352.
- GUNSALUS, R. P. AND S.-J. PARK (1994). "Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons." Research in Microbiology **145**(5-6): 437-450.
- HAAG, H., K. HANTKE, H. DRECHSEL, I. STOJILJKOVIC, G. JUNG AND H. ZAHNER (1993). "Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*." J Gen Microbiol **139**(9): 2159-2165.

- HACKER, J., G. BLUM-ÖHLER, I. MÜHLDOERFER AND H. TSCHAPE (1997). "Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution." *Mol Microbiol* **23**(6): 1089-1097.
- HACKER, J. AND E. CARNIEL (2001). "Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes." *EMBO Rep* **2**(5): 376-381.
- HAKKILA, K., M. MAKSIMOW, M. KARP AND M. VIRTA (2002). "Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors." *Anal Biochem* **301**(2): 235-242.
- HALLER, J. C., S. CARLSON, K. J. PEDERSON AND D. E. PIERSON (2000). "A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence." *Mol Microbiol* **36**(6): 1436-1446.
- HANAHAH, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- HARES, M. C., S. J. HINCHLIFFE, P. C. STRONG, I. ELEFThERIANOS, A. J. DOWLING, R. H. FFRENCH-CONSTANT AND N. WATERFIELD (2008). "The *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* toxin complex is active against cultured mammalian cells." *Microbiology* **154**(Pt 11): 3503-3517.
- HEERMANN, R. AND T. M. FUCHS (2008). "Comparative analysis of the *Photobacterium luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity." *BMC Genomics* **9**(1): 40.
- HEESEMANN, J., B. ALGERMISSEN AND R. LAUFS (1984). "Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*." *Infect Immun* **46**(1): 105-110.
- HEESEMANN, J. AND L. GRÜTER (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**(1): 37-41.
- HEESEMANN, J., C. KELLER, R. MORAWA, N. SCHMIDT, H. J. SIEMENS AND R. LAUFS (1983). "Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis." *J Infect Dis* **147**(1): 107-115.
- HELLINCKX, J. (2012). Untersuchung der temperaturabhängigen Transkriptionsaktivität insektizider Gene von *Yersinia enterocolitica* W22703. *Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie*. München, Technische Universität München.
- HENIKOFF, S., G. W. HAUGHN, J. M. CALVO AND J. C. WALLACE (1988). "A large family of bacterial activator proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18): 6602-6606.
- HERBST, K., M. BUJARA, A. K. HEROVEN, W. OPITZ, M. WEICHERT, A. ZIMMERMANN AND P. DERSCH (2009). "Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA." *PLoS Pathog* **5**(5): e1000435.
- HERMSEN, R., D. W. ERICKSON AND T. HWA (2011). "Speed, sensitivity, and bistability in auto-activating signaling circuits." *PLoS Comput Biol* **7**(11): e1002265.
- HEROVEN, A. K., G. NAGEL, H. J. TRAN, S. PARR AND P. DERSCH (2004). "RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*." *Mol Microbiol* **53**(3): 871-888.
- HINCHLIFFE, S. J., M. C. HARES, A. J. DOWLING AND R. H. FFRENCH-CONSTANT (2010). "Insecticidal Toxins from the *Photobacterium* and *Xenorhabdus* Bacteria " *The open Toxinology Journal* **3**: 101-118.
- HINCHLIFFE, S. J., K. E. ISHERWOOD, R. A. STABLER, M. B. PRENTICE, A. RAKIN, R. A. NICHOLS, P. C. OYSTON, J. HINDS, R. W. TITBALL AND B. W. WREN (2003). "Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*." *Genome Res* **13**(9): 2018-2029.

- HODAK, H. AND J. E. GALAN (2013). "A *Salmonella* Typhi homologue of bacteriophage muramidases controls typhoid toxin secretion." EMBO Rep **14**(1): 95-102.
- HOMMAIS, F., E. KRIN, C. LAURENT-WINTER, O. SOUTOURINA, A. MALPERTUY, J. P. LE CAER, A. DANCHIN AND P. BERTIN (2001). "Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS." Mol Microbiol **40**(1): 20-36.
- HORNE, S. M. AND B. M. PRÜSS (2006). "Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid-encoded virulence genes." Arch Microbiol **185**(2): 115-126.
- HRYNIEWICZ, M. M. AND N. M. KREDICH (1994). "Stoichiometry of binding of CysB to the *cysJH*, *cysK*, and *cysP* promoter regions of *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **176**(12): 3673-3682.
- HUECK, C. J. (1998). "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 379-433.
- HURME, R., K. D. BERNDT, E. NAMORK AND M. RHEN (1996). "DNA binding exerted by a bacterial gene regulator with an extensive coiled-coil domain." J Biol Chem **271**(21): 12626-12631.
- HURME, R., K. D. BERNDT, S. J. NORMARK AND M. RHEN (1997). "A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*." Cell **90**(1): 55-64.
- HURME, R. AND M. RHEN (1998). "Temperature sensing in bacterial gene regulation - what it all boils down to." Mol Microbiol **30**(1): 1-6.
- HURST, M. R., S. A. BECHER, S. D. YOUNG, T. L. NELSON AND T. R. GLARE (2010). "*Yersinia entomophaga* sp. nov. isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*." Int J Syst Evol Microbiol.
- HURST, M. R., T. R. GLARE, T. A. JACKSON AND C. W. RONSON (2000). "Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photobacterium luminescens*." J Bacteriol **182**(18): 5127-5138.
- IWAMA, A., J. PAN, P. ZHANG, W. REITH, B. MACH, D. G. TENEN AND Z. SUN (1999). "Dimeric RFX Proteins Contribute to the Activity and Lineage Specificity of the Interleukin-5 Receptor α Promoter through Activation and Repression Domains." Mol Cell Biol **19**(6): 3940-3950.
- JACOB, F. AND J. MONOD (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." J Mol Biol **3**: 318-356.
- JAKOB, K., P. SATORHELYI, C. LANGE, V. F. WENDISCH, B. SILAKOWSKI, S. SCHERER AND K. NEUHAUS (2007). "Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation." J Bacteriol **189**(15): 5582-5590.
- JANSOHN, M. AND S. ROTHÄMEL (2012). Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor, Springer.
- JANSSON, P. E., A. A. LINDBERG, B. LINDBERG AND R. WOLLIN (1981). "Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from Enterobacteriaceae." Eur J Biochem **115**(3): 571-577.
- JENSEN, M. S. AND D. F. BAINTON (1973). "Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophilic leukocyte." J Cell Biol **56**(2): 379-388.
- JIANG, W., Y. HOU AND M. INOUE (1997). "CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone." J Biol Chem **272**(1): 196-202.
- JOHANSSON, J., P. MANDIN, A. RENZONI, C. CHIARUTTINI, M. SPRINGER AND P. COSSART (2002). "An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*." Cell **110**(5): 551-561.

- JOHANSSON, J. AND B. E. UHLIN (1999). "Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10776-10781.
- JOHNSON, W. C., JR. (1990). "Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide." Proteins **7**(3): 205-214.
- JONG, H. D., C. RANQUET, D. ROPERS, C. PINEL AND J. GEISELMANN (2010). "Experimental and computational validation of models of fluorescent and luminescent reporter genes in bacteria." BMC Systems Biology.
- JOO LEE, P., J. Y. AHN, Y. H. KIM, S. WOOK KIM, J. Y. KIM, J. S. PARK AND J. LEE (2004). "Cloning and heterologous expression of a novel insecticidal gene (*tccC1*) from *Xenorhabdus nematophilus* strain." Biochem Biophys Res Commun **319**(4): 1110-1116.
- JOYCE, S. A. AND D. J. CLARKE (2003). "A hexA homologue from *Photorhabdus* regulates pathogenicity, symbiosis and phenotypic variation." Mol Microbiol **47**(5): 1445-1457.
- JUNQUEIRA, J. C. (2012). "*Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives." Virulence **3**(6): 474-476.
- KAERN, M., T. C. ELSTON, W. J. BLAKE AND J. J. COLLINS (2005). "Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes." Nat Rev Genet **6**(6): 451-464.
- KAIN, S. R., M. ADAMS, A. KONDEPUDI, T. T. YANG, W. W. WARD AND P. KITTS (1995). "Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization." Biotechniques **19**(4): 650-655.
- KAMP, H. D. AND D. E. HIGGINS (2011). "A Protein Thermometer Controls Temperature-Dependent Transcription of Flagellar Motility Genes in *Listeria monocytogenes*." PLoS Pathog **7**(8): e1002153.
- KANIGA, K., I. DELOR AND G. R. CORNELIS (1991). "A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*." Gene **109**(1): 137-141.
- KANNAN, K., K. L. JANİYANI, S. SHIVAJI AND M. K. RAY (1998). "Histidine utilisation operon (*hut*) is upregulated at low temperature in the antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*." FEMS Microbiol Lett **161**(1): 7-14.
- KAPATRAL, V., J. W. OLSON, J. C. PEPE, V. L. MILLER AND S. A. MINNICH (1996). "Temperature-dependent regulation of *Yersinia enterocolitica* Class III flagellar genes." Mol Microbiol **19**(5): 1061-1071.
- KELLEY, L. A. AND M. J. STERNBERG (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." Nat Protoc **4**(3): 363-371.
- KLINKERT, B. AND F. NARBERHAUS (2009). "Microbial thermosensors." Cell Mol Life Sci **66**(16): 2661-2676.
- KNAPP, G. S. AND J. C. HU (2010). "Specificity of the *E. coli* LysR-type transcriptional regulators." PLoS one **5**(12): e15189.
- KNAPP, S., J. HACKER, T. JARCHAU AND W. GOEBEL (1986). "Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536." J Bacteriol **168**(1): 22-30.
- KORTMANN, J. AND F. NARBERHAUS (2012). "Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches." Nat Rev Microbiol **10**(4): 255-265.
- KRIN, E., N. CHAKROUN, E. TURLIN, A. GIVAUDAN, F. GABORIAU, I. BONNE, J. C. ROUSSELLE, L. FRANGEUL, C. LACROIX, M. F. HULLO, L. MARISA, A. DANCHIN AND S. DERZELLE (2006). "Pleiotropic role of quorum-sensing autoinducer 2 in *Photorhabdus luminescens*." Appl Environ Microbiol **72**(10): 6439-6451.

- KRÖGER, C., S. SRIKUMAR, J. ELLWART AND T. M. FUCHS (2011). "Bistability in *myo*-inositol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." J Bacteriol **193**(6): 1427-1435.
- KUBORI, T., Y. MATSUSHIMA, D. NAKAMURA, J. URALIL, M. LARA-TEJERO, A. SUKHAN, J. E. GALÁN AND S.-I. AIZAWA (1998). "Supramolecular Structure of the *Salmonella typhimurium* Type III Protein Secretion System." Science **280**(5363): 602-605.
- KUWAHARA, H. AND O. S. SOYER (2012). "Bistability in feedback circuits as a byproduct of evolution of evolvability." Mol Syst Biol **8**: 564.
- LA TEANA, A., A. BRANDI, M. FALCONI, R. SPURIO, C. L. PON AND C. O. GUALERZI (1991). "Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10907-10911.
- LAEMMLI, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- LAI, E. C. (2003). "RNA sensors and riboswitches: self-regulating messages." Curr Biol **13**(7): R285-291.
- LANG, A. E., G. SCHMIDT, A. SCHLOSSER, T. D. HEY, I. M. LARRINUA, J. J. SHEETS, H. G. MANNHERZ AND K. AKTORIES (2010). "*Photobacterium luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering." Science **327**(5969): 1139-1142.
- LANG, B., N. BLOT, E. BOUFFARTIGUES, M. BUCKLE, M. GEERTZ, C. O. GUALERZI, R. MAVATHUR, G. MUSKHELISHVILI, C. L. PON, S. RIMSKY, S. STELLA, M. M. BABU AND A. TRAVERS (2007). "High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes." Nucleic Acids Res **35**(18): 6330-6337.
- LARKIN, M. A., G. BLACKSHIELDS, N. P. BROWN, R. CHENNA, P. A. MCGETTIGAN, H. MCWILLIAM, F. VALENTIN, I. M. WALLACE, A. WILM, R. LOPEZ, J. D. THOMPSON, T. J. GIBSON AND D. G. HIGGINS (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.
- LAROCK, C. N., J. YU, A. R. HORSWILL, M. R. PARSEK AND F. C. MINION (2013). "Transcriptome Analysis of Acetyl-Homoserine Lactone-Based Quorum Sensing Regulation in *Yersinia pestis*." PloS one **8**(4): e62337.
- LAURENT, M., G. CHARVIN AND J. GUESPIN-MICHEL (2005). "Bistability and hysteresis in epigenetic regulation of the lactose operon. Since Delbruck, a long series of ignored models." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **51**(7): 583-594.
- LAVER, W. G. AND R. C. VALENTINE (1969). "Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus." Virology **38**(1): 105-119.
- LEE, I. AND C. K. SUZUKI (2008). "Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease - lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates." Biochim Biophys Acta **1784**(5): 727-735.
- LESIC, B. AND E. CARNIEL (2005). "Horizontal Transfer of the High-Pathogenicity Island of *Yersinia pseudotuberculosis*." J Bacteriol **187**(10): 3352-3358.
- LI, G.-W., E. OH AND J. S. WEISSMAN (2012). "The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria." Nature **484**(7395): 538-541.
- LITHGOW, J. K., F. HAIDER, I. S. ROBERTS AND J. GREEN (2007). "Alternate SlyA and H-NS nucleoprotein complexes control hlyE expression in *Escherichia coli* K-12." Mol Microbiol **66**(3): 685-698.
- LITWIN, C. M. AND S. B. CALDERWOOD (1993). "Role of iron in regulation of virulence genes." Clin Microbiol Rev **6**(2): 137-149.
- LIU, Y., H. CHEN, L. J. KENNEY AND J. YAN (2010). "A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes." Genes Dev **24**(4): 339-344.

- LIVAK, K. J. AND T. D. SCHMITTGEN (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- LOESSNER, M. J. (2005). "Bacteriophage endolysins - current state of research and applications." Curr Opin Microbiol **8**(4): 480-487.
- LOESSNER, M. J., K. KRAMER, F. EBEL AND S. SCHERER (2002). "C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates." Mol Microbiol **44**(2): 335-349.
- LOESSNER, M. J., G. WENDLINGER AND S. SCHERER (1995). "Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes." Mol Microbiol **16**(6): 1231-1241.
- LOPEZ-GARCIA, P. (1999). "DNA supercoiling and temperature adaptation: A clue to early diversification of life?" J Mol Evol **49**(4): 439-452.
- LUIJSTERBURG, M. S., M. C. NOOM, G. J. WUITE AND R. T. DAME (2006). "The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective." J Struct Biol **156**(2): 262-272.
- MADDOCKS, S. E. AND P. C. OYSTON (2008). "Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins." Microbiology **154**(Pt 12): 3609-3623.
- MADRID, C., C. BALSALOBRE, J. GARCIA AND A. JUAREZ (2007a). "The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins." Mol Microbiol **63**(1): 7-14.
- MADRID, C., J. GARCIA, M. PONS AND A. JUAREZ (2007b). "Molecular evolution of the H-NS protein: interaction with Hha-like proteins is restricted to Enterobacteriaceae." J Bacteriol **189**(1): 265-268.
- MADRID, C., J. M. NIETO AND A. JUAREZ (2002). "Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors." Int J Med Microbiol **291**(6-7): 425-432.
- MARCEAU, M. (2005). "Transcriptional regulation in *Yersinia*: an update." Curr Issues Mol Biol **7**(2): 151-177.
- MARCHLER-BAUER, A., J. B. ANDERSON, F. CHITSAZ, M. K. DERBYSHIRE, C. DEWEESE-SCOTT, J. H. FONG, L. Y. GEER, R. C. GEER, N. R. GONZALES, M. GWADZ, S. HE, D. I. HURWITZ, J. D. JACKSON, Z. KE, C. J. LANCZYCKI, C. A. LIEBERT, C. LIU, F. LU, S. LU, G. H. MARCHLER, M. MULLOKANDOV, J. S. SONG, A. TASNEEM, N. THANKI, R. A. YAMASHITA, D. ZHANG, N. ZHANG AND S. H. BRYANT (2009). "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D205-210.
- MAROKHAZI, J., N. WATERFIELD, G. LEGOFF, E. FEIL, R. STABLER, J. HINDS, A. FODOR AND R. H. FFRENCH-CONSTANT (2003). "Using a DNA microarray to investigate the distribution of insect virulence factors in strains of *Photobacterium* bacteria." J Bacteriol **185**(15): 4648-4656.
- MARR, A. K., J. OVERHAGE, M. BAINS AND R. E. HANCOCK (2007). "The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility." Microbiology **153**(Pt 2): 474-482.
- MARTNER, A., C. DAHLGREN, J. C. PATON AND A. E. WOLD (2008). "Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils." Infect Immun **76**(9): 4079-4087.
- MATA, J., S. MARGUERAT AND J. BAHLER (2005). "Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective." Trends Biochem Sci **30**(9): 506-514.

- MATSUMOTO, H. AND G. M. YOUNG (2009). "Translocated effectors of *Yersinia*." Curr Opin Microbiol **12**(1): 94-100.
- MCCARTHY, J. E. G. AND C. GUALERZI (1990). "Translational control of prokaryotic gene expression." Trends in Genetics **6**(0): 78-85.
- McFALL, S. M., S. A. CHUGANI AND A. M. CHAKRABARTY (1998). "Transcriptional activation of the catechol and chlorocatechol operons: variations on a theme." Gene **223**(1-2): 257-267.
- MCFEETERS, R. L., A. S. ALTIERI, S. CHERRY, J. E. TROPEA, D. S. WAUGH AND R. A. BYRD (2007). "The high-precision solution structure of *Yersinia* modulating protein YmoA provides insight into interaction with H-NS." Biochemistry **46**(49): 13975-13982.
- MEKALANOS, J. J. (1992). "Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria." J Bacteriol **174**(1): 1-7.
- MEUSCH, D., C. GATSOGIANNIS, R. G. EFREMOV, A. E. LANG, O. HOFNAGEL, I. R. VETTER, K. AKTORIES AND S. RAUNSER (2014). "Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail." Nature **508**(7494): 61-65.
- MICHIELS, T., P. WATTIAU, R. BRASSEUR, J. M. RUYSSCHAERT AND G. CORNELIS (1990). "Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*." Infect Immun **58**(9): 2840-2849.
- MIKULSKIS, A. V. AND G. R. CORNELIS (1994). "A new class of proteins regulating gene expression in enterobacteria." Mol Microbiol **11**(1): 77-86.
- MILLER, M. B. AND B. L. BASSLER (2001). "Quorum sensing in bacteria." Annu Rev Microbiol **55**(1): 165-199.
- MILLER, V. L., J. J. FARMER, 3RD, W. E. HILL AND S. FALKOW (1989). "The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease." Infect Immun **57**(1): 121-131.
- MILLER, W. G., J. H. LEVEAU AND S. E. LINDOW (2000). "Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors." Mol Plant Microbe Interact **13**(11): 1243-1250.
- MORITA, M., M. KANEMORI, H. YANAGI AND T. YURA (1999a). "Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure." J Bacteriol **181**(2): 401-410.
- MORITA, M. T., Y. TANAKA, T. S. KODAMA, Y. KYOGOKU, H. YANAGI AND T. YURA (1999b). "Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor." Genes Dev **13**(6): 655-665.
- MOTIN, V. L., A. M. GEORGESCU, J. P. FITCH, P. P. GU, D. O. NELSON, S. L. MABERY, J. B. GARNHAM, B. A. SOKHANSANJ, L. L. OTT, M. A. COLEMAN, J. M. ELLIOTT, L. M. KEGELMEYER, A. J. WYROBEK, T. R. SLEZAK, R. R. BRUBAKER AND E. GARCIA (2004). "Temporal global changes in gene expression during temperature transition in *Yersinia pestis*." J Bacteriol **186**(18): 6298-6305.
- MULDER, B., T. MICHIELS, M. SIMONET, M. P. SORY AND G. CORNELIS (1989). "Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227." Infect Immun **57**(8): 2534-2541.
- MÜNCH, A., L. STINGL, K. JUNG AND R. HEERMANN (2008). "*Photorhabdus luminescens* genes induced upon insect infection." BMC Genomics **9**: 229.
- MURROS-KONTIAINEN, A. E., M. FREDRIKSSON-AHOMAA, H. KORKEALA, P. JOHANSSON, R. RAHKILA AND J. BJORKROTH (2010a). "*Yersinia nurmii* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol.
- MURROS-KONTIAINEN, A. E., P. JOHANSSON, T. NISKANEN, M. FREDRIKSSON-AHOMAA, H. KORKEALA AND J. BJORKROTH (2010b). "*Yersinia pekkanenii* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol.

- NAGEL, G., A. LAHRZ AND P. DERSCH (2001). "Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family." Mol Microbiol **41**(6): 1249-1269.
- NARBERHAUS, F., T. WALDMINGHAUS AND S. CHOWDHURY (2006). "RNA thermometers." FEMS Microbiol Rev **30**(1): 3-16.
- NAVARRE, W. W., S. PORWOLLIK, Y. WANG, M. MCCLELLAND, H. ROSEN, S. J. LIBBY AND F. C. FANG (2006). "Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*." Science **313**(5784): 236-238.
- NELSON, K. M., G. M. YOUNG AND V. L. MILLER (2001). "Identification of a locus involved in systemic dissemination of *Yersinia enterocolitica*." Infect Immun **69**(10): 6201-6208.
- NEUHAUS, K. (2000). Characterization of major cold shock protein genes of the psychrotolerant food pathogens *Bacillus weihenstephaniensis* and *Yersinia enterocolitica*. Mikrobielle Ökologie. München, Technische Universität München: 91.
- NICHOL, H., J. H. LAW AND J. J. WINZERLING (2002). "Iron metabolism in insects." Annu Rev Entomol **47**: 535-559.
- NIELSEN-LEROUX, C., S. GAUDRIALT, N. RAMARAO, D. LERECLUS AND A. GIVAUDAN (2012). "How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts." Curr Opin Microbiol **15**(3): 220-231.
- NIETO, J. M., C. MADRID, E. MIQUELAY, J. L. PARRA, S. RODRIGUEZ AND A. JUAREZ (2002). "Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins." J Bacteriol **184**(3): 629-635.
- NILEHN, B. (2007). "Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. 1969." APMIS **115**(5): 578-588; discussion 589-591.
- NISWENDER, K. D., S. M. BLACKMAN, L. ROHDE, M. A. MAGNUSON AND D. W. PISTON (1995). "Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits." J Microsc **180**(Pt 2): 109-116.
- O'SHEA, Y. A. AND E. F. BOYD (2002). "Mobilization of the *Vibrio* pathogenicity island between *Vibrio cholerae* isolates mediated by CP-T1 generalized transduction." FEMS Microbiol Lett **214**(2): 153-157.
- OGURA, Y., T. OOKA, A. IGUCHI, H. TOH, M. ASADULGHANI, K. OSHIMA, T. KODAMA, H. ABE, K. NAKAYAMA, K. KUROKAWA, T. TOBE, M. HATTORI AND T. HAYASHI (2009). "Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17939-17944.
- OLIVEIRA, H., L. D. MELO, S. B. SANTOS, F. L. NOBREGA, E. C. FERREIRA, N. CERCA, J. AZEREDO AND L. D. KLUSKENS (2013). "Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins." J Virol **87**(8): 4558-4570.
- OSHIMA, T., S. ISHIKAWA, K. KUROKAWA, H. AIBA AND N. OGASAWARA (2006). "*Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase." DNA Res **13**(4): 141-153.
- PAI, C. H. AND V. MORS (1978). "Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*." Infect Immun **19**: 908-911.
- PANG, T., C. G. SAVVA, K. G. FLEMING, D. K. STRUCK AND R. YOUNG (2009). "Structure of the lethal phage pinhole." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(45): 18966-18971.

- PARKHILL, J., B. W. WREN, N. R. THOMSON, R. W. TITBALL, M. T. HOLDEN, M. B. PRENTICE, M. SEBAIHIA, K. D. JAMES, C. CHURCHER, K. L. MUNGALL, S. BAKER, D. BASHAM, S. D. BENTLEY, K. BROOKS, A. M. CERDENO-TARRAGA, T. CHILLINGWORTH, A. CRONIN, R. M. DAVIES, P. DAVIS, G. DOUGAN, T. FELTWELL, N. HAMLIN, S. HOLROYD, K. JAGELS, A. V. KARLYSHEV, S. LEATHER, S. MOULE, P. C. OYSTON, M. QUAIL, K. RUTHERFORD, M. SIMMONDS, J. SKELTON, K. STEVENS, S. WHITEHEAD AND B. G. BARRELL (2001). "Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague." Nature **413**(6855): 523-527.
- PARSEK, M. R., R. W. YE, P. PUN AND A. M. CHAKRABARTY (1994). "Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. *catBC* promoter activation by CatR." J Biol Chem **269**(15): 11279-11284.
- PATON, J. C. (1996). "The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*." Trends Microbiol **4**(3): 103-106.
- PECHY-TARR, M., N. BOREL, P. KUPFERSCHMIED, V. TURNER, O. BINGGELI, D. RADOVANOVIC, M. MAURHOFER AND C. KEEL (2013). "Control and host-dependent activation of insect toxin expression in a root-associated biocontrol pseudomonad." Environ Microbiol **15**(3): 736-750.
- PEDERSEN, S. AND S. REEH (1978). "Functional mRNA half lives in *E. coli*." Mol Gen Genet **166**(3): 329-336.
- PEPE, J. C., J. L. BADGER AND V. L. MILLER (1994). "Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica inv* gene." Mol Microbiol **11**(1): 123-135.
- PEPE, J. C. AND V. L. MILLER (1993a). "The biological role of invasin during a *Yersinia enterocolitica* infection." Infect Agents Dis **2**(4): 236-241.
- PEPE, J. C. AND V. L. MILLER (1993b). "*Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6473-6477.
- PERRY, R. D., P. B. BALBO, H. A. JONES, J. D. FETHERSTON AND E. DEMOLL (1999). "Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation." Microbiology **145 (Pt 5)**: 1181-1190.
- PERRY, R. D. AND J. D. FETHERSTON (1997). "*Yersinia pestis* - etiologic agent of plague." Clin Microbiol Rev **10**(1): 35-66.
- PFAFFL, M. W., G. W. HORGAN AND L. DEMPFLER (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36.
- PIERSON, D. E. AND S. FALKOW (1993). "The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing." Infect Immun **61**(5): 1846-1852.
- PINHEIRO, V. B. AND D. J. ELLAR (2007). "Expression and insecticidal activity of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Photorhabdus luminescens* toxin complex proteins." Cell Microbiol **9**(10): 2372-2380.
- PLATT, T. (1986). "Transcription Termination and the Regulation of Gene Expression." Annual Review of Biochemistry **55**(1): 339-372.
- PORTNOY, D. A. AND R. J. MARTINEZ (1985). "Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species." Curr Top Microbiol Immunol **118**: 29-51.
- PORTNOY, D. A., S. L. MOSELEY AND S. FALKOW (1981). "Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis." Infect Immun **31**(2): 775-782.
- RASKIN, C., C. GERARD, S. DONFUT, E. GIANNOTTA, G. VAN DRIESSCHE, J. VAN BEEUMEN AND J. DUSART (2003). "BlaB, a protein involved in the regulation of *Streptomyces cacaoi* beta-lactamases, is a penicillin-binding protein." Cell Mol Life Sci **60**(7): 1460-1469.
- RAUHUT, R. AND G. KLUG (1999). "mRNA degradation in bacteria." FEMS Microbiol Rev **23**(3): 353-370.

- RAUSER, B. (2012). Analyse des Temperatureinflusses bei der Expressionskontrolle von *tcaA*. Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie. München, Technische Universität München.
- REITER, W.-D., P. PALM AND S. YEATS (1989). "Transfer RNA genes frequently serve as integration sites for prokaryotic genetic elements." Nucleic Acids Res **17**(5): 1907-1914.
- REUTER, S. (2008). Funktion und Regulation der Lyse-Gene der *tc-PAI^{Ye}* in *Yersinia enterocolitica*. Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie. München, Technische Universität München.
- RICHTER, M. (2008). Regulation insektizider Gene von *Yersinia enterocolitica*. Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie. München, Technische Universität München.
- ROBERTKOCH-INSTITUT (2014). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2013. Berlin.
- ROBERTSON, G. T., M. E. KOVACH, C. A. ALLEN, T. A. FICHT AND R. M. ROOP, 2ND (2000). "The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice." Mol Microbiol **35**(3): 577-588.
- ROHDE, J. R., J. M. FOX AND S. A. MINNICH (1994). "Thermoregulation in *Yersinia enterocolitica* is coincident with changes in DNA supercoiling." Mol Microbiol **12**(2): 187-199.
- ROLLE, M., A. MAYR, H.-J. SELBITZ, U. TRUYEN AND P. VALENTIN-WEIGAND (2011). Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart, Enke.
- ROSQVIST, R., A. FORSBERG, M. RIMPILAINEN, T. BERGMAN AND H. WOLF-WATZ (1990). "The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence." Mol Microbiol **4**(4): 657-667.
- 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**(3): 724-733.
- RUSSELL, D. A., G. A. BYRNE, E. P. O'CONNELL, C. A. BOLAND AND W. G. MEIJER (2004). "The LysR-type transcriptional regulator VirR is required for expression of the virulence gene *vapA* of *Rhodococcus equi* ATCC 33701." J Bacteriol **186**(17): 5576-5584.
- RUZIN, A., J. LINDSAY AND R. P. NOVICK (2001). "Molecular genetics of SaPI1 - a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*." Mol Microbiol **41**(2): 365-377.
- SAGI, E., N. HEVER, R. ROSEN, A. J. BARTOLOME, J. RAJAN PREMKUMAR, R. ULBER, O. LEV, T. SCHEPER AND S. BELKIN (2003). "Fluorescence and bioluminescence reporter functions in genetically modified bacterial sensor strains." Sensors and Actuators B: Chemical **90**(1): 2-8.
- SAMBROOK, J. AND D. W. RUSSELL (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory **3rd ed.**
- SHELL, M. A. (1993). "Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators." Annu Rev Microbiol **47**: 597-626.
- SCHLEHUBER, S. AND A. SKERRA (2002). "Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant - a so-called 'anticalin' - using a molecular random approach." Biophys Chem **96**(2-3): 213-228.
- SCHUMANN, W. (2007). "Thermosensors in eubacteria: role and evolution." J Biosci **32**(3): 549-557.
- SENGUPTA, P. AND P. GARRITY (2013). "Sensing temperature." Curr Biol **23**(8): R304-307.
- SERGANOV, A. AND D. J. PATEL (2007). "Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins." Nat Rev Genet **8**(10): 776-790.

- SERGEANT, M., P. JARRETT, M. OUSLEY AND J. A. MORGAN (2003). "Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296." Appl Environ Microbiol **69**(6): 3344-3349.
- SHEMSHEDINI, L. AND T. G. WILSON (1990). "Resistance to juvenile hormone and an insect growth regulator in *Drosophila* is associated with an altered cytosolic juvenile hormone-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(6): 2072-2076.
- SHINDO, H., T. IWAKI, R. IEDA, H. KURUMIZAKA, C. UEGUCHI, T. MIZUNO, S. MORIKAWA, H. NAKAMURA AND H. KUBONIWA (1995). "Solution structure of the DNA binding domain of a nucleoid-associated protein, H-NS, from *Escherichia coli*." FEBS Lett **360**(2): 125-131.
- SIMON, N. C., K. AKTORIES AND J. T. BARBIERI (2014). "Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function." Nat Rev Micro **12**(9): 599-611.
- SIMON, R., U. PRIEFER AND A. PÜHLER (1983). "A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria." Biotechnology **1**: 784-791.
- SMITH, V. J. (2001). Immunology of Invertebrates: Cellular. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.
- SMITS, W., J.-W. VEENING AND O. KUIPERS (2008). Phenotypic Variation and Bistable Switching in Bacteria. Bacterial Physiology. W. El-Sharoud, Springer Berlin Heidelberg: 339-365.
- SOUKUP, S. W. (1974). "Evolution by gene duplication." Teratology **9**(2): 250-251.
- SOUZA, R. A., D. P. FALCAO AND J. P. FALCAO (2011). "Emended description of *Yersinia massiliensis*." Int J Syst Evol Microbiol **61**(Pt 5): 1094-1097.
- SPANIER, B., M. STARKE, F. HIGEL, S. SCHERER AND T. M. FUCHS (2010). "*Yersinia enterocolitica* infection and *tcaA*-dependent killing of *Caenorhabditis elegans*." Appl Environ Microbiol **76**(18): 6277-6285.
- SPASSKY, A., S. RIMSKY, H. GARREAU AND H. BUC (1984). "H1a, an *E. coli* DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA *in vitro*." Nucleic Acids Res **12**(13): 5321-5340.
- SPERANDIO, V., C. C. LI AND J. B. KAPER (2002). "Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*." Infect Immun **70**(6): 3085-3093.
- SPINNER, J., C. JARRETT, D. LAROCK, S. MILLER, C. COLLINS AND B. J. HINNEBUSCH (2012). "*Yersinia pestis* insecticidal-like toxin complex (Tc) family proteins: characterization of expression, subcellular localization, and potential role in infection of the flea vector." BMC Microbiology **12**(1): 296.
- SPURIO, R., M. DURRENBERGER, M. FALCONI, A. LA TEANA, C. L. PON AND C. O. GUALERZI (1992). "Lethal overproduction of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy." Mol Gen Genet **231**(2): 201-211.
- STAINIER, I., M. IRIARTE AND G. R. CORNELIS (1997). "YscM1 and YscM2, two *Yersinia enterocolitica* proteins causing downregulation of *yop* transcription." Mol Microbiol **26**(4): 833-843.
- STARKE, M. AND T. M. FUCHS (2014). "YmoA negatively controls the expression of insecticidal genes in *Yersinia enterocolitica*." Mol Microbiol **92**(2): 287-301.
- STARKE, M., M. RICHTER AND T. M. FUCHS (2013). "The insecticidal toxin genes of *Yersinia enterocolitica* are activated by the thermolabile LTTR-like regulator TcaR2 at low temperatures." Mol Microbiol: n/a-n/a.
- STEINDLER, L. AND V. VENTURI (2007). "Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors." FEMS Microbiol Lett **266**(1): 1-9.

- STELLA, S., M. FALCONI, M. LAMMI, C. O. GUALERZI AND C. L. PON (2006). "Environmental control of the *in vivo* oligomerization of nucleoid protein H-NS." J Mol Biol **355**(2): 169-174.
- STOEBEL, D. M., A. FREE AND C. J. DORMAN (2008). "Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria." Microbiology **154**(Pt 9): 2533-2545.
- STRAGIER, P., F. RICHAUD, F. BORNE AND J. C. PATTE (1983). "Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. I. Identification of a *lysR* gene encoding an activator of the *lysA* gene." J Mol Biol **168**(2): 307-320.
- STRALEY, S. C. AND R. R. BRUBAKER (1981). "Cytoplasmic and membrane proteins of yersiniae cultivated under conditions simulating mammalian intracellular environment." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 1224-1228.
- STRALEY, S. C. AND R. D. PERRY (1995). "Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*." Trends Microbiol **3**(8): 310-317.
- STRALEY, S. C., G. V. PLANO, E. SKRZYPEK, P. L. HADDIX AND K. A. FIELDS (1993). "Regulation by Ca²⁺ in the *Yersinia* low-Ca²⁺ response." Mol Microbiol **8**(6): 1005-1010.
- STUCKI, G., T. A. JACKSON AND M. J. NOONAN (1984). "Isolation and characterisation of *Serratia* strains pathogenic for larvae of the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*." New Zealand Journal of Science **27**: 255-260.
- STUDIER, F. W. AND B. A. MOFFATT (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.
- SUTHERLAND, J. P. AND A. J. BAYLISS (1994). "Predictive modelling of growth of *Yersinia enterocolitica*: the effects of temperature, pH and sodium chloride." Int J Food Microbiol **21**(3): 197-215.
- TAN, K. S., B. Y. WEE AND K. P. SONG (2001). "Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*." J Med Microbiol **50**(7): 613-619.
- TENNANT, S. M., N. A. SKINNER, A. JOE AND R. M. ROBINS-BROWNE (2003). "*Yersinia enterocolitica* biotype 1A: not as harmless as you think." Adv Exp Med Biol **529**: 125-128.
- TENNANT, S. M., N. A. SKINNER, A. JOE AND R. M. ROBINS-BROWNE (2005). "Homologues of insecticidal toxin complex genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and their contribution to virulence." Infect Immun **73**(10): 6860-6867.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS AND T. J. GIBSON (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-4680.
- THOMSON, N. R., S. HOWARD, B. W. WREN, M. T. HOLDEN, L. CROSSMAN, G. L. CHALLIS, C. CHURCHER, K. MUNGALL, K. BROOKS, T. CHILLINGWORTH, T. FELTWELL, Z. ABDELLAH, H. HAUSER, K. JAGELS, M. MADDISON, S. MOULE, M. SANDERS, S. WHITEHEAD, M. A. QUAIL, G. DOUGAN, J. PARKHILL AND M. B. PRENTICE (2006). "The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081." PLoS Genet **2**(12): e206.
- THROUP, J. P., M. CAMARA, G. S. BRIGGS, M. K. WINSON, S. R. CHHABRA, B. W. BYCROFT, P. WILLIAMS AND G. S. STEWART (1995). "Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules." Mol Microbiol **17**(2): 345-356.
- TIWARI, A., J. C. RAY, J. NARULA AND O. A. IGOSHIN (2011). "Bistable responses in bacterial genetic networks: designs and dynamical consequences." Math Biosci **231**(1): 76-89.
- TO, K. H., J. DEWEY, J. WEAVER, T. PARK AND R. YOUNG (2013). "Functional analysis of a class I holin, P2 Y." J Bacteriol **195**(6): 1346-1355.

- TRALAU, T., J. MAMPEL, A. M. COOK AND J. RUFF (2003). "Characterization of TsaR, an oxygen-sensitive LysR-type regulator for the degradation of *p*-toluenesulfonate in *Comamonas testosteroni* T-2." Appl Environ Microbiol **69**(4): 2298-2305.
- TRAN, T. A., D. K. STRUCK AND R. YOUNG (2005). "Periplasmic domains define holin-antiholin interactions in t4 lysis inhibition." J Bacteriol **187**(19): 6631-6640.
- TRCEK, J., T. M. FUCHS AND K. TRULZSCH (2010). "Analysis of *Yersinia enterocolitica* invasin expression *in vitro* and *in vivo* using a novel *luxCDABE* reporter system." Microbiology **156**(Pt 9): 2734-2745.
- TROISFONTAINES, P. AND G. R. CORNELIS (2005). "Type III secretion: more systems than you think." Physiology (Bethesda) **20**: 326-339.
- TROPEL, D. AND J. R. VAN DER MEER (2004). "Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds." Microbiol Mol Biol Rev **68**(3): 474-500.
- TURNER, K. H., I. VALLET-GELY AND S. L. DOVE (2009). "Epigenetic Control of Virulence Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* by a LysR-Type Transcription Regulator." PLoS Genet **5**(12): e1000779.
- UEGUCHI, C., M. KAKEDA AND T. MIZUNO (1993). "Autoregulatory expression of the *Escherichia coli* *hns* gene encoding a nucleoid protein: H-NS functions as a repressor of its own transcription." Mol Gen Genet **236**(2-3): 171-178.
- URSING, J., J. BRENNERT, H. BERCOVIER, G. RICHARD FANNING, A. STEIGERWALT, J. BRAULT AND H. H. MOLLARET (1980). "*Yersinia frederiksenii*: A new species of enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-Like)." Current Microbiology **4**(4): 213-217.
- VAN DYK, T. K., L. J. TEMPLETON, K. A. CANTERA, P. L. SHARPE AND F. S. SARIASLANI (2004). "Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve?" J Bacteriol **186**(21): 7196-7204.
- VAN ROESSEL, P. AND A. H. BRAND (2002). "Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins." Nat Cell Biol **4**(1): E15-E20.
- VANTRAPPEN, G., E. PONETTE, K. GEBOES AND P. BERTRAND (1977). "*Yersinia enterocolitica* and *enterocolitica*: gastroenterological aspects." Gastroenterology **72**(2): 220-227.
- VEENING, J. W., W. K. SMITS AND O. P. KUIPERS (2008). "Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria." Annu Rev Microbiol **62**: 193-210.
- WAGNER-DÖBLER, I., V. THIEL, L. EBERL, M. ALLGAIER, A. BODOR, S. MEYER, S. EBNER, A. HENNIG, R. PUKALL AND S. SCHULZ (2005). "Discovery of Complex Mixtures of Novel Long-Chain Quorum Sensing Signals in Free-Living and Host-Associated Marine Alphaproteobacteria." ChemBioChem **6**(12): 2195-2206.
- WALDOR, M. K. AND J. J. MEKALANOS (1996). "Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin." Science **272**(5270): 1910-1914.
- WANG, I. N. (2006). "Lysis timing and bacteriophage fitness." Genetics **172**(1): 17-26.
- WANG, I. N., D. L. SMITH AND R. YOUNG (2000). "Holins: the protein clocks of bacteriophage infections." Annu Rev Microbiol **54**: 799-825.
- WASS, M. N., L. A. KELLEY AND M. J. STERNBERG (2010). "3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures." Nucleic Acids Res **38**(Web Server issue): W469-473.
- WATERFIELD, N., A. DOWLING, S. SHARMA, P. J. DABORN, U. POTTER AND R. H. FRENCH-CONSTANT (2001a). "Oral toxicity of *Photobacterium luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **67**(11): 5017-5024.

- WATERFIELD, N., M. HARES, S. HINCHLIFFE, B. WREN AND R. FFRENCH-CONSTANT (2007). "The insect toxin complex of *Yersinia*." Adv Exp Med Biol **603**: 247-257.
- WATERFIELD, N., M. HARES, G. YANG, A. DOWLING AND R. FFRENCH-CONSTANT (2005). "Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal Toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria." Cell Microbiol **7**(3): 373-382.
- WATERFIELD, N. R., D. J. BOWEN, J. D. FETHERSTON, R. D. PERRY AND R. H. FFRENCH-CONSTANT (2001b). "The *tc* genes of *Photorhabdus*: a growing family." Trends Microbiol **9**(4): 185-191.
- WATERFIELD, N. R., P. J. DABORN AND R. H. FFRENCH-CONSTANT (2002). "Genomic islands in *Photorhabdus*." Trends Microbiol **10**(12): 541-545.
- WATERFIELD, N. R., B. W. WREN AND R. H. FFRENCH-CONSTANT (2004). "Invertebrates as a source of emerging human pathogens." Nat Rev Microbiol **2**(10): 833-841.
- WATERS, C. M. AND B. L. BASSLER (2005). "Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 319-346.
- WATERS, L. S. AND G. STORZ (2009). "Regulatory RNAs in bacteria." Cell **136**(4): 615-628.
- WAUTERS, G. (1979). "Carriage of *Yersinia enterocolitica* serotype 3 by pigs as a source of human infection." Contrib Microbiol Immunol **5**: 249-252.
- WAUTERS, G., S. ALEKSIC, J. CHARLIER AND G. SCHULZE (1991). "Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species." Contrib Microbiol Immunol **12**: 239-243.
- WAUTERS, G., M. JANSSENS, A. G. STEIGERWALT AND D. J. BRENNER (1988). "*Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., Formerly Called *Yersinia enterocolitica* Biogroups 3A and 3B." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **38**(4): 424-429.
- WAUTERS, G., K. KANDOLO AND M. JANSSENS (1987). "Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*." Contrib Microbiol Immunol **9**: 14-21.
- WEBER, M. H. AND M. A. MARAHIEL (2002). "Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1423): 895-907.
- WEBER, M. H. AND M. A. MARAHIEL (2003). "Bacterial cold shock responses." Sci Prog **86**(Pt 1-2): 9-75.
- WHITE, R., S. CHIBA, T. PANG, J. S. DEWEY, C. G. SAVVA, A. HOLZENBURG, K. POGLIANO AND R. YOUNG (2011). "Holin triggering in real time." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(2): 798-803.
- WILKINSON, P., N. WATERFIELD, L. CROSSMAN, C. CORTON, M. SANCHEZ-CONTRERAS, I. VLISIDOU, A. BARRON, A. BIGNELL, L. CLARK, D. ORMOND, M. MAYHO, N. BASON, F. SMITH, M. SIMMONDS, C. CHURCHER, D. HARRIS, N. THOMPSON, M. QUAIL, J. PARKHILL AND R. FFRENCH-CONSTANT (2009). "Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*." BMC Genomics **10**(1): 302.
- WILLIAMS, K. P. (2002). "Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies." Nucleic Acids Res **30**(4): 866-875.
- WILLIAMS, R. M., S. RIMSKY AND H. BUC (1996). "Probing the structure, function, and interactions of the *Escherichia coli* H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives." J Bacteriol **178**(15): 4335-4343.
- WINSON, M. K., S. SWIFT, P. J. HILL, C. M. SIMS, G. GRIESMAYR, B. W. BYCROFT, P. WILLIAMS AND G. S. STEWART (1998). "Engineering the *luxCDABE* genes from *Photorhabdus luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs." FEMS Microbiol Lett **163**(2): 193-202.

- WOLFENBARGER, L. L., PHIFER AND P. R. (2000). "The Ecological Risks and Benefits of Genetically Engineered Plants." Science **290**(5499): 2088-2093.
- WOLLENBERG, K. AND J. C. SWAFFIELD (2001). "Evolution of proteasomal ATPases." Mol Biol Evol **18**(6): 962-974.
- YAMADA, H., S. MURAMATSU AND T. MIZUNO (1990). "An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA." J Biochem **108**(3): 420-425.
- YAMADA, H., T. YOSHIDA, K. TANAKA, C. SASAKAWA AND T. MIZUNO (1991). "Molecular analysis of the *Escherichia coli hns* gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences." Mol Gen Genet **230**(1-2): 332-336.
- YANG, G., A. J. DOWLING, U. GERIKE, R. H. FFRENCH-CONSTANT AND N. R. WATERFIELD (2006). "*Photorhabdus* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth." J Bacteriol **188**(6): 2254-2261.
- YANG, G., C. S. HERNANDEZ-RODRIGUEZ, M. L. BEETON, P. WILKINSON, R. H. FFRENCH-CONSTANT AND N. R. WATERFIELD (2012). "Pdl1 is a putative lipase that enhances *Photorhabdus* toxin complex secretion." PLoS Pathog **8**(5): e1002692.
- YANG, G. AND N. R. WATERFIELD (2013). "The Role of TcdB and TccC Subunits in Secretion of the *Photorhabdus* Tcd Toxin Complex." PLoS Pathog **9**(10): e1003644.
- YATES, E. A., B. PHILIPP, C. BUCKLEY, S. ATKINSON, S. R. CHHABRA, R. E. SOCKETT, M. GOLDNER, Y. DESSAUX, M. CAMARA, H. SMITH AND P. WILLIAMS (2002). "N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*." Infect Immun **70**(10): 5635-5646.
- YILDIRIM, N., M. SANTILLAN, D. HORIKE AND M. C. MACKEY (2004). "Dynamics and bistability in a reduced model of the *lac* operon." Chaos **14**(2): 279-292.
- YOUNG, I., I. WANG AND W. D. ROOF (2000). "Phages will out: strategies of host cell lysis." Trends Microbiol **8**(3): 120-128.
- YOUNG, R. (1992). "Bacteriophage lysis: mechanism and regulation." Microbiol Rev **56**(3): 430-481.
- YOUNG, R. AND U. BLASI (1995). "Holins: form and function in bacteriophage lysis." FEMS Microbiol Rev **17**(1-2): 191-205.
- YOUNG, R. AND I. WANG (2006). "Phage lysis." The bacteriophages **2**: 104-126.
- YU, J., M. L. MADSEN, M. D. CARRUTHERS, G. J. PHILLIPS, J. S. KAVANAUGH, J. M. BOYD, A. R. HORSWILL AND F. C. MINION (2013). "Analysis of autoinducer-2 quorum sensing in *Yersinia pestis*." Infect Immun **81**(11): 4053-4062.
- ZHANG, L., J. RADZIEJEWSKA-LEBRECHT, D. KRAJEWSKA-PIETRASIK, P. TOIVANEN AND M. SKURNIK (1997). "Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8." Mol Microbiol **23**(1): 63-76.
- ZHANG, N. AND R. YOUNG (1999). "Complementation and characterization of the nested Rz and Rz1 reading frames in the genome of bacteriophage lambda." Mol Gen Genet **262**(4-5): 659-667.
- ZHENG, M., F. ASLUND AND G. STORZ (1998). "Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation." Science **279**(5357): 1718-1721.
- ZUKER, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res **31**(13): 3406-3415.

6 Anhang

Tab. A 1: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	chemische Formel	Hersteller
Aceton	C_3H_6O	Roth
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)		Roth
Adenosintriphosphat-Di-Natriumsalz (ATP)	$C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3 \times H_2O$	Sigma-Aldrich
Agar		GibcoBRL
Agar (<i>high strength</i>)		Serva
Agarose		Biozym
Ammoniumchlorid	NH_4Cl	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Roth
L(+)-Arabinose	$C_6H_{10}O_5$	Roth
L-Arginin	$C_6H_{14}N_4O_2$	Sigma
Borsäure	H_3BO_3	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP)	$C_{15}H_{15}N_2O_4BrClP$	Roth
Bromphenolblau	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Merck
Calciumchlorid	$CaCl_2$	Merck-Rühl
Chloroform	$CHCl_3$	Roth
Cholesterin	$C_{27}H_{46}O$	Roth
N,N-Dimethylformamid (DMF)	C_3H_7NO	Sigma-Aldrich
1,4-Dithiothreitol (DTT)	$(C_2H_2OHSH)_2$	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	VWR
Essigsäure (100%, Eisessig)	CH_3COOH	Roth
Ethanol	C_2H_6O	Baker
Fetales Kälberserum (FKS)		Perbio
D(+)-Glucose-Monohydrat	$C_6H_{12}O_6 \times H_2O$	Fluka
Glycerin	$C_3H_8O_3$	Merck
Hefeextrakt		Oxoid
N-Hexanoyl-DL-Homoserin-Lakton	$C_{10}H_{17}NO_3$	Sigma-Aldrich
Imidazol	$C_3H_4N_2$	Sigma-Aldrich
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	$C_9H_{18}O_5S$	AppliChem
Kaliumchlorid	KCl	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Roth
Kaliumhydroxid	KOH	Merck
Kaliumsulfat	K_2SO_4	Roth
N-(β-Ketocaproyl)-L-Homoserin-Lakton	$C_{10}H_{15}NO_4$	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	$MgCl_2 \times 6 H_2O$	Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	Merck
Milchpulver		Oxoid
2-Mercaptoethanol	C_2H_6OS	Merck
Methanol	CH_4O	Roth
Methylenblau		Merck
Natriumchlorid	NaCl	Roth

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Fluka
Natriumhydroxid	NaOH	Fluka
Natriumhypochlorit	NaClO	Roth
p-Nitrotetrazoliumblausäure	C ₄₀ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀ O ₆	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	C ₇ H ₇ FO ₂ S	Fluka
ortho-Phosphorsäure, 85%	H ₃ PO ₄	Roth
2-Propanol	C ₃ H ₈ O	Roth
Roti®-Blue 5x Konzentrat		Roth
Roti®-Quant		Roth
D(+)-Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Fluka
Salzsäure	HCl	Merck
SDS	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	(CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	Fluka
Trichloressigsäure (TCA)	C ₂ HCl ₃ O ₂	Fluka
Tris	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Roth
Triton X-100		Serva
Trizol		Invitrogen
Trypton (aus Casein)		Oxoid
Tween 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Promega

Tab. A 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp/relevante Eigenschaften	Referenz/ Herkunft
<u><i>Yersinia</i> spp.</u>		
<i>Y. enterocolitica</i>	Biotyp 1B, Serotyp O:8; NaI ^R , Stamm: WA314	[Ruckdeschel <i>et al.</i> , 1996]
<i>Y. enterocolitica</i>	Biotyp 1B, Serotyp O:8, Stamm: 8081 (AM286415)	[Portnoy <i>et al.</i> , 1981; Thomson <i>et al.</i> , 2006]
<i>Y. intermedia</i>	Stamm 3490	[Don <i>et al.</i>]
<i>Y. frederiksenii</i>	Stamm 3489 (ATCC 33641)	[Ursing <i>et al.</i> , 1980]
<i>Y. mollaretti</i>	Stamm WAIP204 (CIP 103324)	[Wauters <i>et al.</i> , 1988]
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Serotyp I, Stamm IP32953	[Chain <i>et al.</i> , 2004]
<i>Y. ruckeri</i>	Stamm 3492 (CIP 82.80)	[Ewing <i>et al.</i> , 1978]
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm</i> (DE3)	[Studier <i>et al.</i> , 1986]
KB3	BL21(DE3) Δ <i>stpA</i> Δ <i>hns</i>	[Böhme <i>et al.</i> , 2012]
DH5 α	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
Top10	<i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> (<i>del</i>)M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Sm ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
SM10 λ <i>pir</i>	F-, Km ^R , Tra ^R , λ <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>recA1</i> , <i>tonA21</i> , <i>lacY1</i> , <i>supE44</i> , [RP4-2(Tc::Mu)], (<i>Muc+</i>) λ -	[Simon <i>et al.</i> , 1983]
S17.1 λ <i>pir</i>	λ - <i>pir</i> lysogen of S17.1 (Tp ^R Sm ^R <i>thi pro hsdR-M⁺ recA</i> RP4::2-Tc::Mu-Km::Tn7)	[Simon <i>et al.</i> , 1983]
OP50	OP50 <i>ura</i>	[Brenner, 1974]

Andere

S. enterica serovar
Typhimurium

Wildtyp Stamm ATCC 14028

Yersinia enterocolitica W22703

W22703	Nal ^R , Res ⁻ Mod ⁺ , pYV ⁻ , Biotyp 2, Serotyp O:9 chromosomale Fusion von <i>luxCDABE</i> mit den Promotoren von <i>tcaR1</i> , <i>tcaR2</i> , <i>tcaA</i> , <i>tcaB</i> , <i>tcaC</i> , <i>tccC1</i> oder <i>tccC2</i> mit Hilfe von pUTs-P _{tccX} :: <i>lux</i> über homologe Rekombination	[Cornelis <i>et al.</i> , 1975]
P _{tccX} :: <i>lux</i>	chromosomale Fusion von <i>mCherry</i> mit dem Promotor von <i>tcaA</i> mit Hilfe von pUTs- P _{tcaA} :: <i>mCherry</i> über homologe Rekombination	Diese Arbeit
P _{tcaA} :: <i>mCherry</i>	Translationale Fusion von TcaR2 mit mCherry mit Hilfe von pUTs- <i>tcaR2</i> :: <i>mCherry</i> über homologe Rekombination	Diese Arbeit
<i>tcaR2</i> :: <i>mCherry</i>	Km ^R , Insertion von Tn5 <i>luxCDABE</i> Km2 in <i>tcaA</i> an Nukleotidposition 134	[Bresolin, 2004]
<i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	Translationale Fusion von TcaA mit mCherry mit Hilfe von pUTs- <i>tcaA</i> :: <i>mCherry</i> über homologe Rekombination	Diese Arbeit
<i>tcaA</i> :: <i>mCherry</i>	Km ^R , Insertion von Tn5 <i>luxCDABE</i> Km2 in <i>tcaB</i> an Nukleotidposition 177	[Bresolin, 2004]
<i>tcaB</i> (177):: <i>lux</i>	chromosomale Fusion von <i>luxCDABE</i> mit dem Promotor von <i>Holin/Endolysin</i> mit Hilfe von pUTs-P- <i>HE</i> :: <i>lux</i> über homologe Rekombination	Diese Arbeit
P _{HE} :: <i>lux</i>	in-frame Deletion des <i>tcaR1</i> -Genes	Diese Arbeit
Δ <i>tcaR1</i>	partielle Deletion von <i>tcaR1</i> (19-394 bp)	Diese Arbeit
Δ <i>tcaR1v</i>	in-frame Deletion des <i>tcaR2</i> -Genes	Diese Arbeit
Δ <i>tcaR2</i>	partielle Deletion von <i>tcaR2</i> (19-355 bp)	Diese Arbeit
Δ <i>tcaR2v</i>	in-frame Deletion der <i>Holin/Endolysin</i> -Kassette	Diese Arbeit
Δ <i>HE</i>	in-frame Deletion des <i>luxS</i> -Genes	Diese Arbeit
Δ <i>luxS</i>	in-frame Deletion des <i>tcaA</i> -Genes	Diese Arbeit
Δ <i>tcaA</i>	in-frame Deletion des <i>ymoA</i> -Genes	Diese Arbeit
Δ <i>ymoA</i>	Austausch des Genes <i>yenI</i> mit Km ^R	Diese Arbeit
<i>yenI</i> :: <i>KanR</i>	Transposonmutante W22703 <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> mit insertionalem Knockout von <i>kdpD</i>	Diese Arbeit
<i>kdpD</i> ::pKRG9	wie oben mit insertionalem Knockout von <i>rovA</i>	Diese Arbeit
<i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	wie oben mit insertionalem Knockout von <i>tldD</i>	Diese Arbeit
<i>rovA</i> ::pKRG9		
<i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>		
<i>tldD</i> ::pKRG9		
<i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>		

Tab. A 3: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	chemische Formel	Hersteller
Ampicillin-Natriumsalz	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	Roth
Chloramphenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	USB
Kanamycinsulfat	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \times H_2SO_4$	Roth
Nalidixinsäure	$C_{12}H_{12}N_2O_3$	Fluka
Nystatin	$C_{47}H_{75}NO_{17}$	Sigma-Aldrich
Rifampicin	$C_{43}H_{58}N_4O_{12}$	Sigma-Aldrich
Streptomycin	$C_{21}H_{39}N_7O_{12}$	Sigma-Aldrich
Tetrazyklin-Hydrochlorid	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \times HCl$	Sigma-Aldrich

Tab. A 4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren.

Plasmide	Genotyp/relevante Eigenschaften	Referenz/ Herkunft
pUT mini-Tn5luxCDABE Km2	Suizidvektor, R6K <i>ori</i> , mini-Tn5 Km2 <i>luxCDABE</i> Transposon, <i>oriT</i> (RP4), Amp ^R , Km ^R	[Winson <i>et al.</i> , 1998]
pUTs-lux (Cm ^R)	Suizidvektor, Transposase-negatives Derivat von pUT mini-Tn5luxCDABE Km2, Austausch von Km ^R gegen Cm ^R aus pKRG9	Diese Arbeit
pUTs-P _{tcaX} ::lux	Klonierung des Promotorbereiches (500 bp) von <i>tcaR1</i> , <i>tcaR2</i> , <i>tcaA</i> , <i>tcaB</i> , <i>tcaC</i> , <i>tccC1</i> oder <i>tccC2</i> vor <i>luxCDABE</i> (mit <i>KpnI</i> und <i>SacI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-P _{hol/endo} ::lux	Klonierung des Promotorbereiches (500 bp) von <i>Holin/Endolysin</i> vor <i>luxCDABE</i> (mit <i>KpnI</i> und <i>SacI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-mCherry (Cm ^R)	Austausch der <i>luxCDABE</i> -Kassette in pUTs-lux (Cm ^R) gegen <i>mCherry</i> aus pBR322-mCherry mit <i>KpnI</i> und <i>XhoI</i>	Diese Arbeit
pUTs-gfp (Cm ^R)	Austausch der <i>luxCDABE</i> -Kassette in pUTs-lux (Cm ^R) gegen <i>gfp</i> aus pPROBE-NT mit <i>KpnI</i> und <i>XhoI</i>	Diese Arbeit
pUTs-P _{tcaA} ::mCherry	Klonierung des Promotorfragments von <i>tcaA</i> (500 bp) vor <i>mCherry</i> (mit <i>KpnI</i> und <i>SacI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-tcaR2::mCherry	Klonierung der letzten 500 bp von <i>tcaR2</i> vor <i>mCherry</i> (mit <i>KpnI</i> und <i>SacI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-tcaA::mCherry	Klonierung der letzten 500 bp von <i>tcaA</i> vor <i>mCherry</i> (mit <i>KpnI</i> und <i>SacI</i>)	Diese Arbeit
pUTs-P _{hol/endo} ::gfp	Klonierung des Promotorfragments von <i>Holin/Endolysin</i> (500 bp) vor <i>gfp</i> (mit <i>KpnI</i> und <i>SacI</i>)	Diese Arbeit
pKRG9	Suizidvektor, R6K <i>ori</i> , <i>mob+</i> (RP4), Cm ^R	Creatogen AG, Potsdam, Deutschland
pKRG9-kdpD	Klonierung von 500 bp von <i>kdpD</i> zum insertionalen Knockout (mit <i>XbaI</i> und <i>SacI</i>)	Diese Arbeit
pKRG9-rovA	Klonierung von 500 bp von <i>rovA</i> zum insertionalen Knockout (mit <i>XbaI</i> und <i>SacI</i>)	Diese Arbeit
pKRG9-tldD	Klonierung von 500 bp von <i>tldD</i> zum insertionalen Knockout (mit <i>XbaI</i> und <i>SacI</i>)	Diese Arbeit
pKD4	<i>pir</i> -abhängig, Kan ^R , FRT-Erkennungsschnittstellen	[Datsenko <i>et al.</i> , 2000]
pKD119	Lambda-Red-Helfer-Plasmid, Tet ^R	
pCP20	FLP-Rekombinase-Plasmid; Cm ^R , Amp ^R	[Datsenko <i>et al.</i> , 2000]
pKNG101	Suizidvektor; R6K <i>ori</i> , <i>sacB</i> , IS1 <i>insB</i> , RK2/RP4 Replikon, Strep ^R	[Kaniga <i>et al.</i> , 1991]

pBR322- <i>mCherry</i>	pBR322 mit <i>mCherry</i> , Amp ^R , Tet ^R	[Birmingham, 2006]
pPROBE-NT	Promotortestvektor; <i>gfp</i> -Reporter, Km ^R , pBBR1 Replikon	[Miller <i>et al.</i> , 2000]
pBAD/HisA	Expressionsvektor; N-terminaler Polyhistidin- sowie AntiExpress-Tag, <i>araBAD</i> Promotor, <i>araC</i> , Amp ^R , pBR322 <i>origin</i>	Invitrogen
pBAD/HisA (Tet ^R)	Wie oben, Austausch von Amp ^R gegen Tet ^R aus pACYC184 mit <i>NcoI</i>	Diese Arbeit
pBAD- <i>tcaR1</i>	Konstrukt für TcaR1 _{His} -Produktion, <i>tcaR1</i> wurde mit Hilfe von <i>SacI</i> in den Vektor pBAD/HisA (Tet ^R) kloniert	Diese Arbeit
pBAD- <i>tcaR2</i>	Konstrukt für TcaR2 _{His} -Produktion, <i>tcaR2</i> wurde mit Hilfe von <i>SacI</i> in den Vektor pBAD/HisA (Tet ^R) kloniert	Diese Arbeit
pBAD- <i>ymoA</i>	Konstrukt für YmoA _{His} -Produktion, <i>ymoA</i> wurde mit Hilfe von <i>XhoI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pBAD/HisA (Tet ^R) kloniert	Diese Arbeit
pBAD33	Expressionsvektor; <i>araBAD</i> Promotor, <i>araC</i> , Cam ^R , pBR322 <i>origin</i>	Invitrogen
pBAD- <i>endo</i>	Konstrukt für die Produktion von His-markiertem Endolysin, <i>endo</i> wurde mit Hilfe von <i>XhoI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pBAD/HisA (Tet ^R) kloniert	Diese Arbeit
pBAD33- <i>ymoA</i>	Konstrukt für YmoA-Produktion, <i>ymoA</i> wurde mit Hilfe von <i>KpnI</i> und <i>SalI</i> in den Vektor pBAD33 kloniert	Diese Arbeit
pACYC184	P15A <i>ori</i> , Cm ^R , Tet ^R	Invitrogen
pACYC184- <i>tcaR2</i>	Konstrukt für TcaR2-Expression, <i>tcaR2</i> wurde mit Hilfe von <i>EcoRI</i> in den Vektor pACYC184 kloniert	Diese Arbeit
pET28b	Expressionsvektor; T7 Promotor, N- und C-terminaler Polyhistidin-Tag, Kan ^R , pBR322 <i>origin</i>	Novagen
pET28b- <i>endo</i>	Konstrukt für die Endolysin-Produktion, Endolysin wurde mit <i>NcoI</i> und <i>XhoI</i> in den Vektor pET28b kloniert	Diese Arbeit
pET28n- <i>hns</i>	Konstrukt für H-NS _{His} -Produktion, <i>hns</i> wurde mit Hilfe von <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i> in den Vektor pET28b kloniert	Diese Arbeit

Tab. A 5: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphotase	Thermo Scientific
DNase I	Promega
T4-DNA-Ligase	Invitrogen
Lysozym	Sigma
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Thermo Scientific
terminale Desoxynucleotidyl-Transferase	Thermo Scientific
Proteinase K	Roche
RNase A	Sigma-Aldrich

Tab. A 6: In dieser Arbeit verwendete Primer.

interne Primer-Nr.	5'-3'-Sequenz	Modifikation	Target
Klonierung Vektoren			
<i>pUTs-lux</i> (Cm ^R)			
3547	GCGCTCGAGCAGTAAGTTGGCAGCATCAC	<i>Xho</i> I	Cm ^R aus pKRG9
3548	GAGCGATCGGAGCGCAGAAGTGGTC	<i>Pvu</i> II	~
<i>pUTs-gfp</i> (Cm ^R)			
3656	CGGGGTACCGAGCTCGAATTC	<i>Kpn</i> I	<i>gfp</i> aus pPROBE-NT
3657	CCGCTCGAGATTACGCCAAGCGCGC	<i>Xho</i> I	~
<i>pUTs-mCherry</i> (Cm ^R)			
3694	CCGGGTACCGGCCAGGATCCCCCG	<i>Kpn</i> I	<i>mCherry</i> aus pBR322- <i>mCherry</i>
3695	CCGCTCGAGGAGGCCCTTTCGTCTTC	<i>Xho</i> I	~
pBAD/HisA (Tet ^R)			
3174	CATGCCATGGCTCATGTTTGACAGC	<i>Nco</i> I	Tet ^R aus pACYC184
3175	CATGCCATGGGGTGATTCACTCTGC	<i>Nco</i> I	~
Generierung der pUTs-Konstrukte			
3591	CGATGAGCTCAGCAATACAACGCGG	<i>Sac</i> I	P _{tcaR1}
3592	CGGGGTACCAATCCCTCCGGATTG	<i>Kpn</i> I	~
3618	CGATGAGCTCGACTAACGACTCGCAAACC	<i>Sac</i> I	P _{tcaR2}
3619	CGGGGTACCATGCACCACTTTGGTTTTTAAATG	<i>Kpn</i> I	~
3620	CGATGAGCTCTGGCGAGTTGCAAGGC	<i>Sac</i> I	P _{tcaA}
3621	CGGGGTACCAGCTACCTCTTATGGTTG	<i>Kpn</i> I	~
3624	CGATGAGCTCGGATCACCATAGATGAGG	<i>Sac</i> I	P _{tcaB}
3625	CGGGGTACCTATTATATCCTGTAAAGTTTG	<i>Kpn</i> I	~
3593	CGATGAGCTCGCACCGGCTCGGAC	<i>Sac</i> I	P _{tcaC}
3594	CGGGGTACCAATGGACTCCTGTCAG	<i>Kpn</i> I	~
3598	CGATGAGCTCCCTCATGCCATGACCG	<i>Sac</i> I	P _{HE}
3590	CGGGGTACCTTTGTTTACCTATCATTGTTG	<i>Kpn</i> I	~
3595	CGATGAGCTCTGGCCAAAAGTGGCTG	<i>Sac</i> I	P _{tccC1}
3596	CGGGGTACCGTAATTTTCTTAATCTATTG	<i>Kpn</i> I	~
3889	CGATGAGCTCGAAAACAGCGAGGTAG	<i>Sac</i> I	tccC1
3890	CGGGGTACCCTAATTTAATAAGTGCGGG	<i>Kpn</i> I	~
3864	CGATGAGCTCCAGGGTGAGATTATCTGG	<i>Sac</i> I	P _{tccC2}
3865	CGGGGTACCAAAATACTCCTGAGTAGATG	<i>Kpn</i> I	~
3866	CGATGAGCTCCAACAGCAGGTTAAAGTGC	<i>Sac</i> I	tcaA
3867	CGGGGTACCTCTGTATTTTTTTGTTTTTATTGTTATTTG	<i>Kpn</i> I	~
3893	CGATGAGCTCGTTCTTAGACTCAGATAACTACAAC	<i>Sac</i> I	tcaR2
3894	CGGGGTACCCGCTGTCTATATTGACCTCC	<i>Kpn</i> I	~
Nachweis der pUTs-Konstrukte			
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		<i>mcs</i> pUTs
3697	CAGGTATTTATTCGGCGC		~

Nachweis der chromosomalen Integration der pUTs-Konstrukte

3212	CGGTGAAAAAGATAGGCC		$P_{tcaR1}::lux$
3545	GATTGCACTAAATCATCACTTTCCGG		~
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		~
3238	CCGTTTGGCTTATCGACG		~
3184	GCATGAGCAACTCTATGC		$P_{tcaR2}::lux$
3545	GATTGCACTAAATCATCACTTTCCGG		~
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		~
3252	AGCGATCCTTCCTGAACC		~
3129	GGT <u>GAGCT</u> CATGGAAAGATTA AAAACGG	<i>SacI</i>	$P_{tcaA}::luxE$
3545	GATTGCACTAAATCATCACTTTCCGG		~
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		~
3269	GCTCAGTTTAGTGATACC		~
3262	GCAGTGAAGAACCGCTGC		$P_{tcaB}::lux$
3545	GATTGCACTAAATCATCACTTTCCGG		~
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		~
3221	GGTGTTGACTTCAGCACC		~
3185	CGTTAATCCTGCGCATCG		$P_{tcaC}::lux$
3545	GATTGCACTAAATCATCACTTTCCGG		~
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		~
3225	CATCGCGGCATCATAGC		~
3188	TCATTATGAGCGCATCCC		$P_{HE}::lux$
3545	GATTGCACTAAATCATCACTTTCCGG		~
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		~
3242	CCGAGGATTAAGAAGTCC		~
3202	CAGTTAGTTCGCAATGGC		$P_{tccC1}::lux$
3545	GATTGCACTAAATCATCACTTTCCGG		~
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		~
3250	CAGCGTTATAGCGGTTGC		~
3891	AATCGGCTCCAGTTTATTAG		$tccC1::lux$
3545	GATTGCACTAAATCATCACTTTCCGG		~
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		~
3890	CGGGGTACCCTAATTTAATAAGTGCGGG	<i>KpnI</i>	~
3868	CGAAAAGATCTCAAAGGG		$P_{tccC2}::lux$
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		~
3568	GCTTCATGGCTAACGTA		$tcaA::mCherry$
3235	CCGGAATTCGTAAGGTTTGTATA	<i>EcoRI</i>	~
3262	GCAGTGAAGAACCGCTGC		~
3697	CAGGTATTTATTCGGCGC		~
3130	GGT <u>GAGCT</u> CATGTTTATATCAAAAACTTGC	<i>SacI</i>	$tcaR2::mCherry$
3545	GATTGCACTAAATCATCACTTTCCGG		~
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		~
3621	CGGGGTACCAGCTACCTCTTATGGTTG	<i>KpnI</i>	~

Deletionsmutanten

3355	GGCTTCAGCCAACGC		<i>tcaR1</i>
3356	CCGGAATTC CCGTTTTAATCTTTCCATAATC	<i>EcoRI</i>	~
3357	CCGGAATTC AAACGGGTTGCCGAGAT	<i>EcoRI</i>	~
3358	AGATGTT CATCTTTGTTGGG		~
3363	GCA TGTCGACACGCTTGTTGATAGCGC	<i>Sall</i>	ligiertes PCR-Produkt
3364	GCA TGTCGACGCCTTGCAACTCGCC	<i>Sall</i>	~
3355	GGCTTCAGCCAACGC		<i>tcaR1</i> verkürzt
3356	CCGGAATTC CCGTTTTAATCTTTCCATAATC	<i>EcoRI</i>	~
3786	CCGGAATTC CGGACTTGATTGCTGACGG	<i>EcoRI</i>	~
3358	AGATGTT CATCTTTGTTGGG		~
3819	CGGGAT CCCCACACTTTGAAAACAGC	<i>BamHI</i>	ligiertes PCR-Produkt
3820	CGGGAT CCTATTTATCCACAAATAAATTAAG	<i>BamHI</i>	~
3360	GCGTTACAAGATTCAGGG		<i>tcaR2</i>
3359	CCGGAATTC GTTTTTTGATATAAACATATGCAC	<i>EcoRI</i>	~
3361	CCGGAATTC CCCCCTTTCATGGCGG	<i>EcoRI</i>	~
3362	GTTCTTG CACCAATGCG		~
3365	GCA TGTCGACGCCTTGTTCTATGCC	<i>Sall</i>	ligiertes PCR-Produkt
3366	GCA TGTCGACCGTGAGGGCCACTGC	<i>Sall</i>	~
3360	GCGTTACAAGATTCAGGG		<i>tcaR2</i> verkürzt
3359	CCGGAATTC GTTTTTTGATATAAACATATGCAC	<i>EcoRI</i>	~
3788	CCGGAATTC CCTCAGATAACTACAACATTG	<i>EcoRI</i>	~
3269	GCTCAGTTT AGTGATACC		~
3821	CGGGAT CCCTCGCGCCGCTTGG	<i>BamHI</i>	ligiertes PCR-Produkt
3822	CGGGAT CCTCAATAAATTGAGCTGGGC	<i>BamHI</i>	~
3335	CAGCCGTACGACCGC		<i>tcaA</i>
3336	GAGAATTC ACGTTCTTTATTTGGCATAGCTAC	<i>EcoRI</i>	~
3337	GAGAATTC TTACAAATAACAATAAAAAAC	<i>EcoRI</i>	~
3338	ACTGCATTCTCAGTGAG		~
3339	CGGGAT CCTTAAATTAAGTATAGAG	<i>BamHI</i>	ligiertes PCR-Produkt
3340	CGGGAT CCAATATAGTCGGCCGC	<i>BamHI</i>	~
3477	CAGAACTTCAGGATGGC		HE
3478	GAGAATTC GAGGATTAAGAAGTCCATTT	<i>EcoRI</i>	~
3485	GAGAATTC CCCCTATTTGAATTACCCA	<i>EcoRI</i>	~
3486	GCTGGCAATCAGTTGC		~
3481	CGGGAT CCGCACTGAGGTACAACG	<i>BamHI</i>	ligiertes PCR-Produkt
3488	CGGGAT CCGCGTTATAGCGGTTGC	<i>BamHI</i>	~
3849	CTTGATATTTCCGCTTTGAAAG		<i>ymoA</i>
3848	CCGGAATTC GTAGTCAGTTTTGTCATGGTG	<i>EcoRI</i>	~
3850	CCGGAATTC TGGCAACATGTGAAATAGTC	<i>EcoRI</i>	~
3851	GAACCACCTGGGCAAG		~
3852	CCAGGAT CCCCTGTTTGGATATCAACAC	<i>BamHI</i>	ligiertes PCR-Produkt

3853	CCAGGATCCTTAGCGCGTGTGTCTTG	<i>Bam</i> HI	~
3638	TTAATTAATAACTTTGGTTTTTATTATGTTAAACTCTT TAACGTAAAT:CATATGAATATCCTCCTTA		<i>yenI</i>
3728	ATCGGCCAGGTTTCGAGAGTTTTGGTTCAACTTGATGT ACTCTCAGTATT:GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		~
3639	TAAAAATTATTTTTTATGAGGAGGTAATAATGCCAT TATTGGATAGC:GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		<i>luxS</i>
3640	TCGACAACTGAAAAGTAGATATGTAATTCAGTCAGTTTT TCTTCGGCAA:CATATGAATATCCTCCTTA		~
Nachweis der Deletionsplasmide			
3402	CAGCGACTGAATACGG		<i>mcs</i> pKNG101
3401	GTGCCCTGAATGAACTGC		~
Nachweis der Deletion			
3129	GGTGAGCTCATGGAAAGATTAACCGG	<i>SacI</i>	<i>tcaR1</i>
3132	GGTGAGCTCTCAACGATAACCCTG	<i>SacI</i>	~
3203	GCGATGTCGACCCTTCTGTTATTGGG	<i>SalI</i>	~
3232	GGTGAGCTCTCAACGATAACCCTG	<i>SacI</i>	~
3130	GGTGAGCTCATGTTTATATCAAAAACTTGC	<i>SacI</i>	<i>tcaR2</i>
3131	GGTGAGCTCTTAGCTGTCTATATTGACC	<i>SacI</i>	~
3190	GCGATGTCGACTATTAACATGCC	<i>SalI</i>	~
3131	GGTGAGCTCTTAGCTGTCTATATTGACC	<i>SacI</i>	~
3183	ACTCTCCCCTTTCATGGC		<i>tcaA</i>
3239	GTAAGAGCTCCTACTGTATTTTTTTG	<i>SacI</i>	~
3199	AGAGGAGCTCATGCCAAATAAAG	<i>SacI</i>	~
3221	GGTGTTGACTTCAGCACC		~
3189	AGGATGAAAACGACACCG		HE
3250	CAGCGTTATAGCGGTTGC		~
3854	TGTTTAGCAGTTACGGAATC		<i>ymoA</i>
3855	ATACTCTGATAACGCATTGG		~
3641	AGTGCGCTAAGATACTAG		<i>yenI</i>
3642	CTGCGGTCCACGTCAG		~
3643	TCCGAAGAGGGTGACG		<i>luxS</i>
3644	CTGGTCACTCCCTATCG		~
Insertionaler Knockout mittels pKRG9			
3801	GCGATCTAGACGATTAGTTCGCGTTTGG	<i>XbaI</i>	<i>rovA</i>
3802	CGATGAGCTCCTCTCAAGCTGTCAATCAAACCAG	<i>SacI</i>	~
3803	GCGATCTAGAACAGCCGACTTACTGG	<i>XbaI</i>	<i>kdpD</i>
3804	CGATGAGCTCCTCATCAAACATATGGTCA	<i>SacI</i>	~
3805	GCGATCTAGAGGTATTCTGAAAGGTTACATGC	<i>XbaI</i>	<i>tldD</i>
3806	CGATGAGCTCTTGCCGAAACTCCGAC	<i>SacI</i>	~
Überexpressionsvektoren			
3129	GGTGAGCTCATGGAAAGATTAACCGG	<i>SacI</i>	<i>tcaR1</i>
3132	GGTGAGCTCTCAACGATAACCCTG	<i>SacI</i>	~
3130	GGTGAGCTCATGTTTATATCAAAAACTTGC	<i>SacI</i>	<i>tcaR2</i>
3131	GGTGAGCTCTTAGCTGTCTATATTGACC	<i>SacI</i>	~
3357	CCGGAATCAAACGGGTTGCCGAGAT	<i>EcoRI</i>	~

3326	CCGGAATTCATGGTTGTTTGTGG	<i>EcoRI</i>	~
3856	CGATCCATGGATGCAAATGACAGCCCTCAG	<i>NcoI</i>	HE
3857	CCGCTCGAGTGGGTAGACCTCTCTGGGTA	<i>XhoI</i>	~
3860	CGATCCATGGATGAGCGAAGCGTTAAAG	<i>NcoI</i>	<i>hns</i>
3861	CCCAGCTTCAGGAAATCATCCAGTGATTTAC	<i>HindIII</i>	~
3839	CCGCTCGAGATGACAAAACTGACTAC	<i>XhoI</i>	<i>ymoA</i>
3840	CATGGGTACCCTATTTACATGTTGCC	<i>KpnI</i>	~
3869	CGGGGTACCATGACAAAACTGACTACC	<i>KpnI</i>	~
3870	GTGTGTCGACCTATTTACATGTTGCCA	<i>Sall</i>	~
Nachweis der Überexpressionsplasmide			
3399	CGTCACACTTTGCTATGC		<i>mcs</i> pBAD
3400	CCAGTCTTTGACTGAGC		~
3139	GGTATCACTCCAGAGCG		~
3140	ACCAGACCGTTCAGCTGG		~
3790	GCTAGTTATTGCTCAGCGG		<i>mcs</i> pET28b
qRT-PCR			
3759	ACACTACGAATCGGTTGTTC		cDNA <i>tcaR1</i>
3760	ACATCTAAACCGTCAGCAAT		~
3761	GCTGGCCTTAAATTAAGTAT		cDNA <i>tcaR2</i>
3762	GATTTCAATTGGTGAGTTC		~
3763	CCACCTAAAATTGAGTGGTT		~
3764	ATCGTATTTAGTCCATTAACAGC		~
3765	AATGCCAAAACTCAGTCAG		cDNA <i>tcaA</i>
3766	CAGTAAACGCAGTGATGAGA		~
3767	CTACACACGTGCTACAATGG		~
3768	TTACTAGCGATTCCGACTTC		~
3841	CCCCTAAATCATAGAGGTC		cDNA Endolysin
3842	GCACGATCAACACTAAGTC		~
3891	AATCGGCTCCAGTTTATTAG		cDNA <i>tccC1</i>
3892	CGGTTTTATATTTGGCTTCT		~
5'-RACE			
3781	TGTTCCAGATCGATTAATCGAGC		cDNA <i>tcaR2</i>
3782	ATCAGTTAATTTAAGGCCAGC		~
3252	AGCGATCCTCCTGAACC		~
3736	GTCATCGCCAGATTTAGC		cDNA <i>tcaA</i>
3737	CCATCATGCAGCTCTTG		~
3738	CAGGGATTTTGCAGATGC		~
3750	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG		AAP
3751	GGCCACGCGTCGACTAGTAC		AUAP
EMSA			
3591	CGATGAGCTCAGCAATACAACGCGG	<i>SacI</i>	P_{tcaR1}
3592	CGGGGTACCAATCCCTCCGGATTG	<i>KpnI</i>	~
3124	GCGATCTAGAGGATCCTTTACCG	<i>XbaI</i>	<i>tcaR1</i>
3217	CGATGAGCTCCGTCATGGTTGCC	<i>SacI</i>	~
3618	CGATGAGCTCGACTAACGACTCGCAAACC	<i>SacI</i>	P_{tcaR2}
3619	CGGGGTACCATGCACCACTTTGGTTTTTAAATG	<i>KpnI</i>	~

3220	CCACTCAATTTTAGGTGGTC		<i>tcaR2</i>
3887	CGATGAGCTCGATGAACATCTGAAAAAAC	<i>SacI</i>	~
3265	CTATAGATAGTCCAGCACC		~
3268	GTGCTGGACTATCTATAGC		~
3764	ATCGTATTTAGTCCATTAACAGC		~
3182	ATCTATAACATATCGAGCCTC		~
3183	ACTCTCCCCTTTCATGGC		~
3131	GGT <u>GAGCTC</u> TTAGCTGTCTATATTGACC	<i>SacI</i>	~
3620	CGATGAGCTCTGGCGAGTTGCAAGGC	<i>SacI</i>	P _{<i>tcaA</i>}
3233	CCGGAATTCATGGTTGTTTGTGG	<i>EcoRI</i>	~
3829	CCAGGATCCCACCTTGCTCAATAAATTGAGCT	<i>BamHI</i>	<i>tcaA</i>
3621	CGGGGTACCAGCTACCTCTTTATGGTTG	<i>KpnI</i>	~
3624	CGATGAGCTCGGATCACCATAGATGAGG	<i>SacI</i>	P _{<i>tcaB</i>}
3625	CGGGGTACCTATTATATCCTGTAAGGTTTG	<i>KpnI</i>	~
3200	ATATGAGCTCATGTCTAATGCTATC	<i>SacI</i>	<i>tcaB</i>
3896	TCGTCAGCACTTTCGATTC		~
3897	AGTGCTGACGAGTTATATC		~
3898	TTCAGCCACTGGGGAG		~
3593	CGATGAGCTCGCACC GGCTCGGAC	<i>SacI</i>	P _{<i>tcaC</i>}
3594	CGGGGTACCAATGGACTCCTGTCAG	<i>KpnI</i>	~
3598	CGATGAGCTCCCTCATGCCATGACCG	<i>SacI</i>	P _{HE}
3590	CGGGGTACCTTTGTTTACCTATCATTGTTG	<i>KpnI</i>	~
3595	CGATGAGCTCTGGCCAAAAGTGGCTG	<i>SacI</i>	P _{<i>tccC1</i>}
3596	CGGGGTACCGTAATTTTCCTTAATCTATTG	<i>KpnI</i>	~
3597	CGATGAGCTCCAGGGTGAGATTATCTGG	<i>SacI</i>	P _{<i>tccC2</i>}
3598	CGGGGTACCAAAAATACTCCTGAGTAGATG	<i>KpnI</i>	~

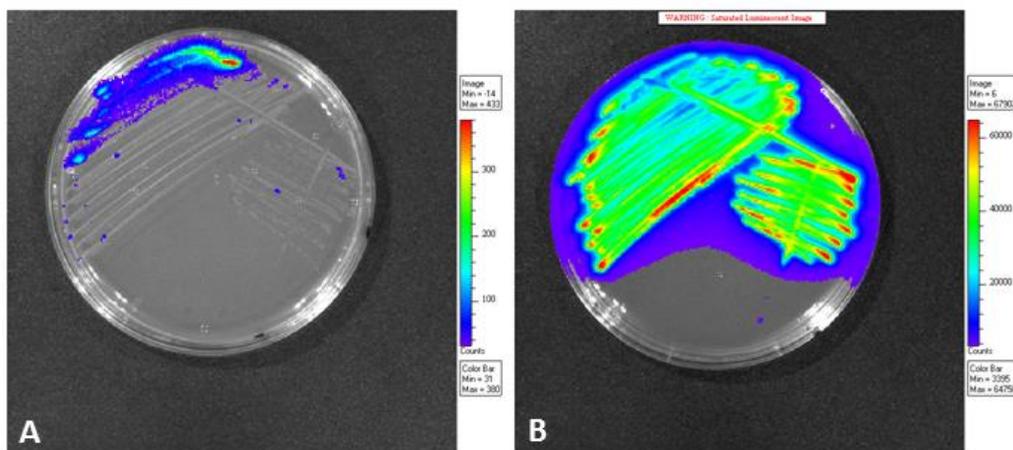


Abb. A 1: Funktionsfähigkeit des Vektors pUTs-*luxCDABE* (Cm^R). Aus chromosomaler DNA von *Y. enterocolitica* W22703 wurde der Promotor des Kälteschockgenes *cspB* mittels PCR amplifiziert und über die artifiziellen Schnittstellen *KpnI* und *SacI* in den ebenfalls geschnittenen Vektor pUTs-*luxCDABE* (Cm^R) ligiert. Das rekombinante Plasmid wurde in elektrokompente *E. coli* S17.1 λ pir transformiert, mittels PCR verifiziert und über Konjugation in den Rezipienten *Y. enterocolitica* W22703 transferiert. Der resultierende Stamm W22703 P_{*cspB*}::*lux* wurde auf selektivem LB-Agar bei 37°C (A) und 15°C (B) inkubiert und anschließend unter der IVIS-Kamera analysiert.

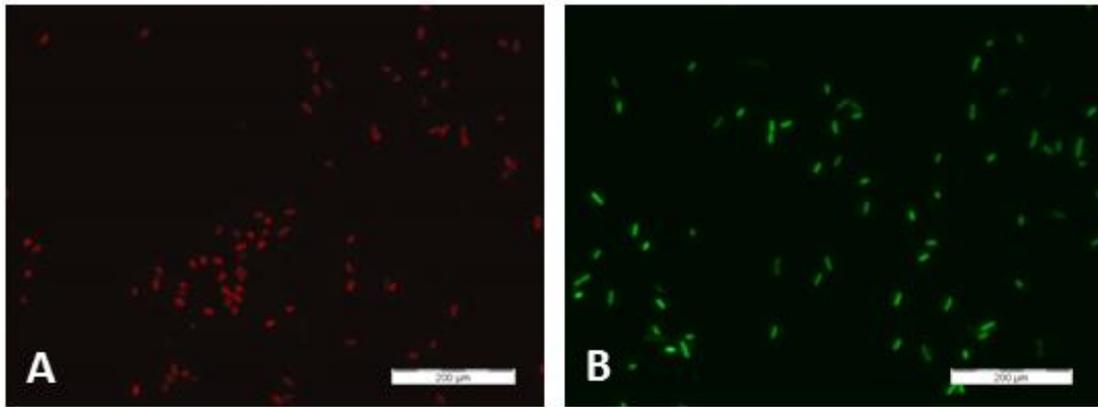


Abb. A 2: Funktionsfähigkeit der Vektoren pUTs- *mCherry* und pUTs-*gfp*. Der Promotorbereich von *tcaA* aus *Y. enterocolitica* W22703 wurde vor die beiden Reportergene *mCherry* bzw. *gfp* kloniert und die entsprechenden rekombinanten Plasmide wurden via Konjugation in den Rezipienten transferiert. Nach drei Tagen Inkubation bei 15°C wurden die beiden Stämme W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ (A) bzw. W22703 $P_{tcaA}::gfp$ (B) unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dargestellt ist die jeweilige Fluoreszenzaufnahme bei einer 100x Vergrößerung.

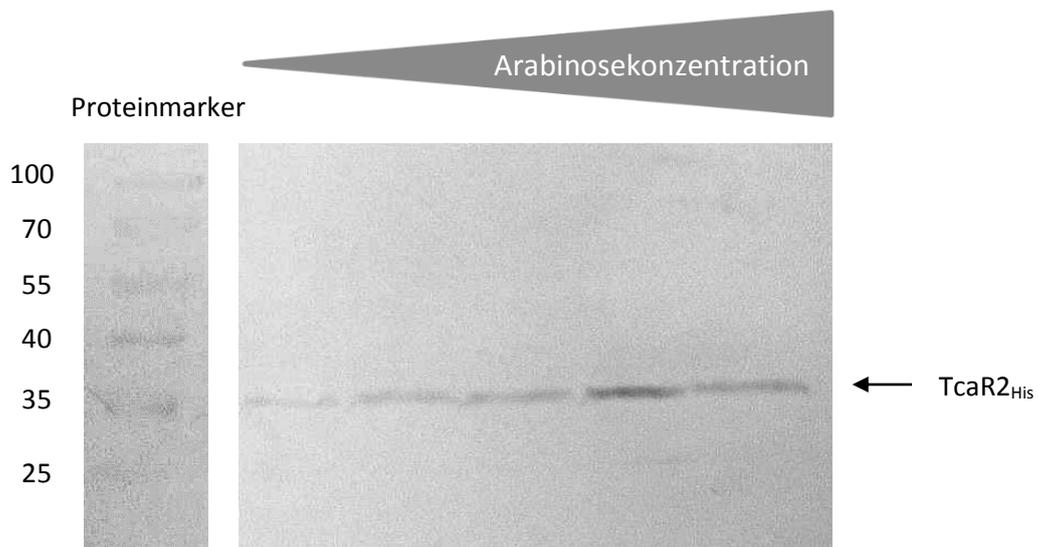
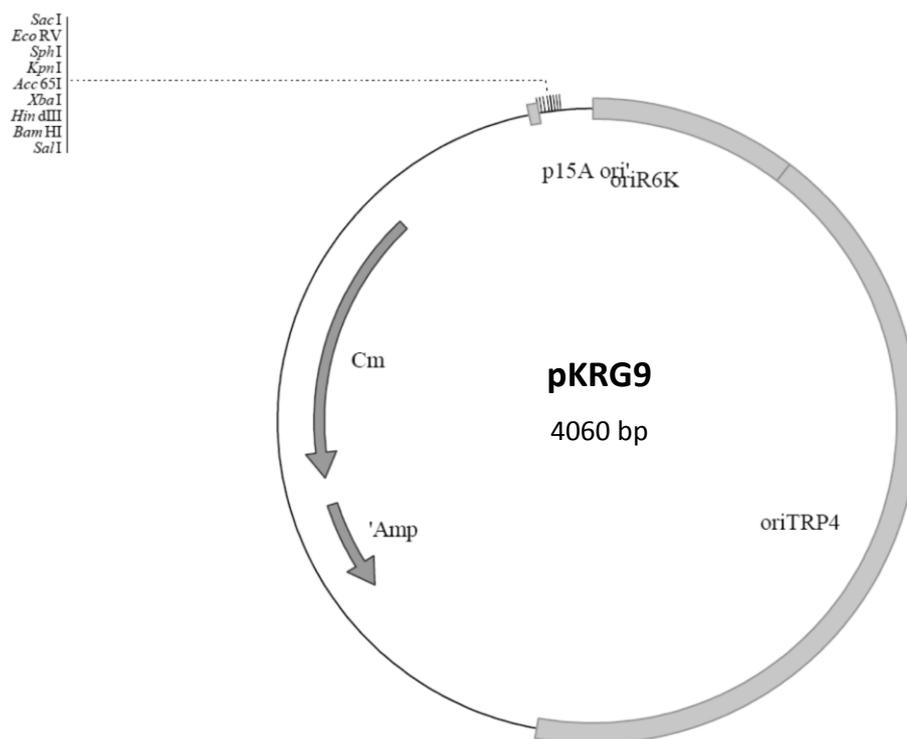


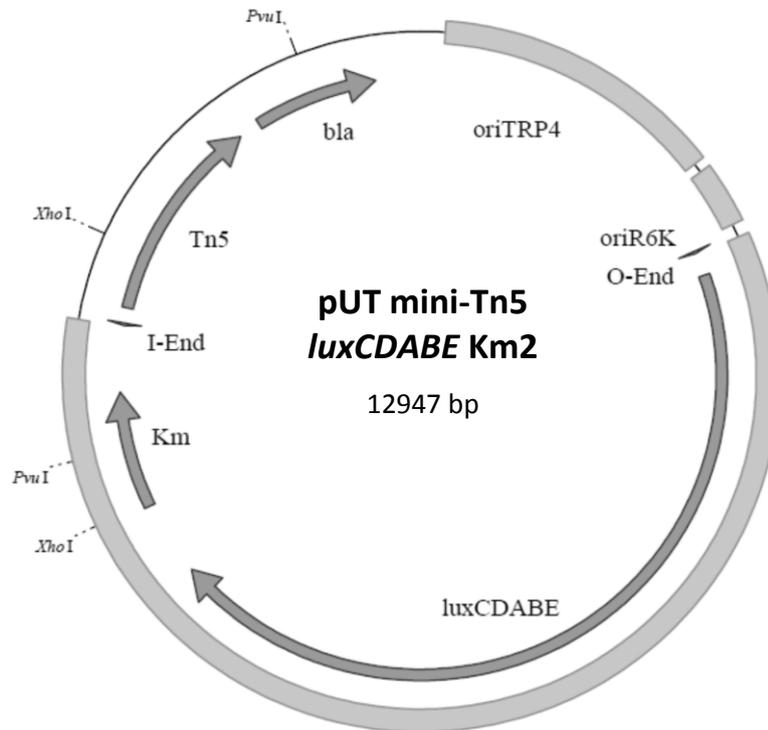
Abb. A 3: Abhängigkeit der TcaR2-Produktion mittels pBAD-*tcaR2* von der eingesetzten Arabinosekonzentration. Die Überexpression von TcaR2 in dem *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 pBAD-*tcaR2* wurde bei einer OD_{600} von 0,5 mit unterschiedlichen Arabinosekonzentrationen induziert (von links nach rechts: Induktion mit 0,0002%, 0,002%, 0,02%, 0,2% und 2% Arabinose). Die Kulturen wurden nach drei Stunden geerntet, in 100 µl 1x Laemmli-Puffer aufgenommen, 10 min bei 100°C erhitzt und anschließend im Western Blot analysiert.

Abb. A 4: Plasmidkarte und Eigenschaften des Suizidvektors pKRG9. Die Position und Orientierung der Gene sind durch Blockpfeile dargestellt.



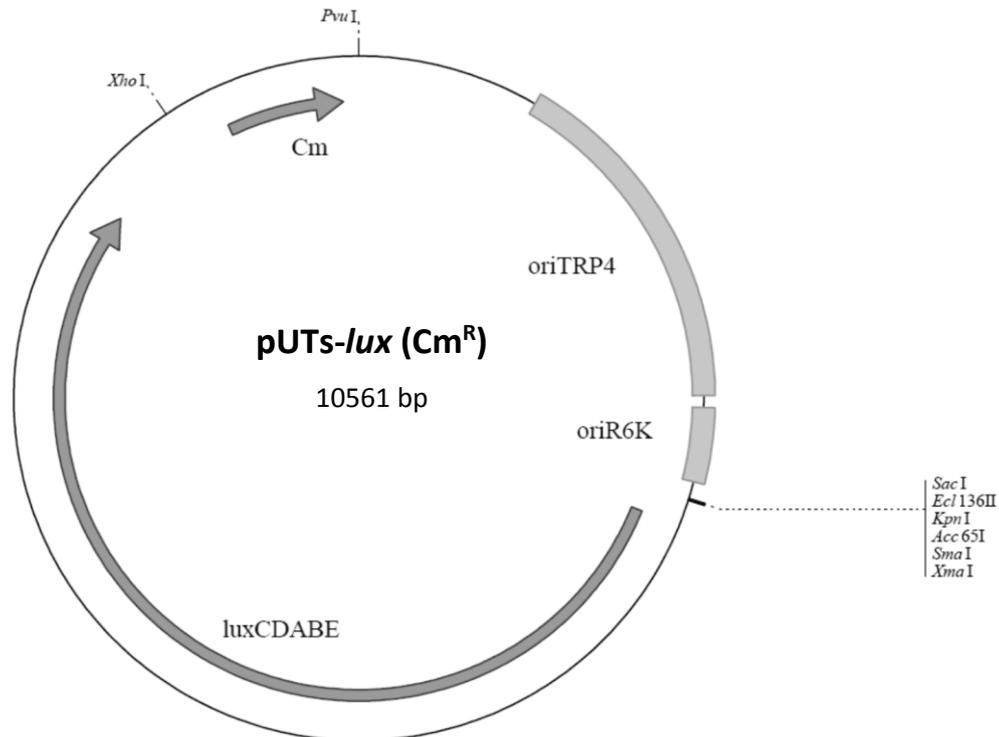
Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
1	421	<i>oriR6K</i>	<i>oriR6K</i> Replikationsursprung
421	2145	<i>oriTRP4</i>	Mobilitätsregion
2843	2625	'Amp	Ampicillin-Resistenzgen (defekt)
3567	2908	Cm	Chloramphenicol-Resistenzgen
3932	4000		<i>multiple cloning site</i> (<i>NheI</i> → <i>SacI</i>)

Abb. A 5: Plasmidkarte und Eigenschaften des Suizidvektors pUT mini-Tn5 *luxCDABE* Km2 [Winson *et al.*, 1998]. Die Position und Orientierung der Gene sind durch Blockpfeile dargestellt.



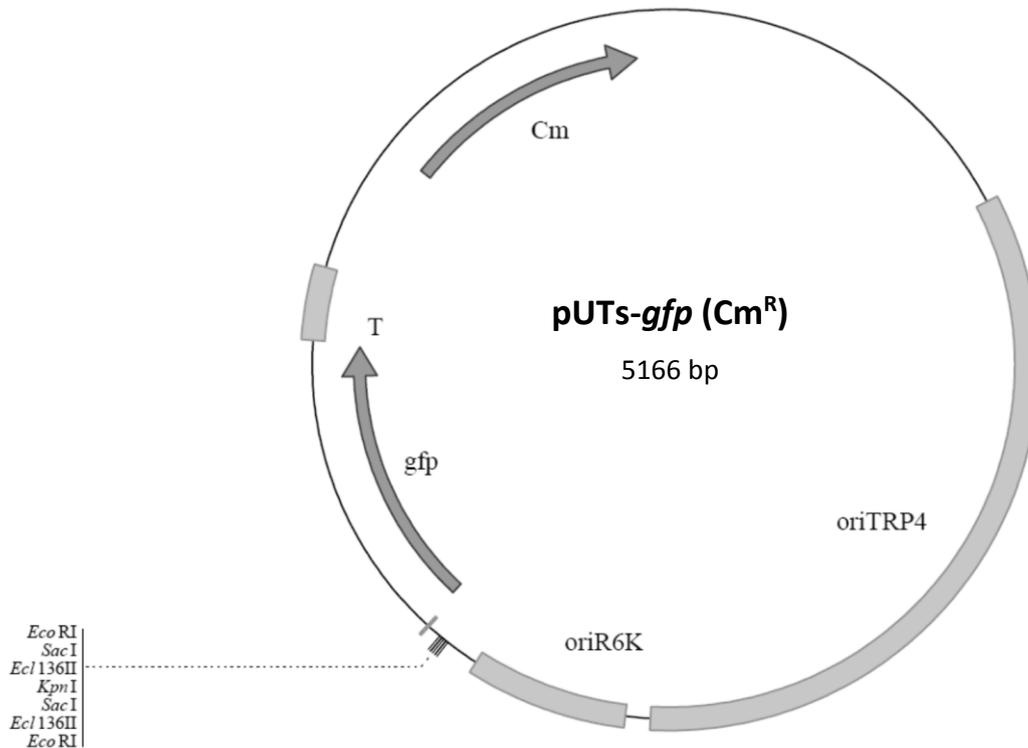
Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
146	1873	<i>oriTRP4</i>	Mobilitätsregion
1931	2300	<i>oriR6K</i>	Replikationsursprung
2350	2368	O-Ende	Äußere Transposase-Erkennungssequenz
2528	8260	<i>luxCDABE</i>	promotorloses Luciferase-Operon
8782	9599	<i>Km</i>	Kanamycin-Resistenzgen
10077	10059	<i>I-End</i>	Innere Transposase-Erkennungssequenz
10183	11625	<i>Tn5</i>	Tn5 Transposase
11777	12637	<i>bla</i>	β -Lactamase-Gen

Abb. A 6: Plasmidkarte und Eigenschaften des Suizidvektors pUTs-*lux* (Cm^R) [Starke *et al.*, 2013]. Aus dem Vektor pUT mini-Tn5 *luxCDABE* [Winson *et al.*, 1998] wurde die Transposonkassette mittels *Xho*I und *Pvu*I herausgeschnitten. Das entstandene Fragment wurde mit einer Chloramphenicolkassette ligiert, welche zuvor mittels PCR aus dem Vektor pKRG9 amplifiziert und ebenfalls mit *Pvu*I und *Xho*I geschnitten wurde. Die Position und Orientierung der Gene des resultierenden Vektors pUT-*lux* (Cm^R) sind durch Blockpfeile dargestellt.



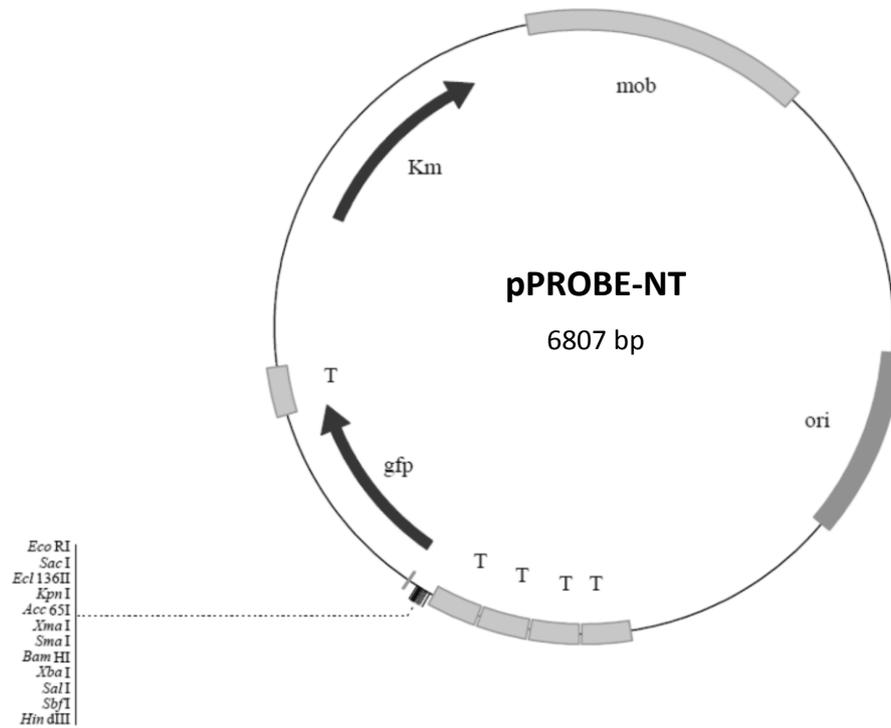
Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
900	2627	<i>oriTRP4</i>	Mobilitätsregion
2685	3054	<i>oriR6K</i>	Replikationsursprung
3282	9014	<i>luxCDABE</i>	promotorloses Luciferase-Operon
7408	7423		<i>multiple cloning site</i> (<i>Xma</i> I → <i>Sac</i> I)
9816	10475	Cm	Chloramphenicol-Resistenzgen

Abb. A 7: Plasmidkarte und Eigenschaften des Suizidvektors pUTs-*gfp* (Cm^R) Aus dem Vektor pUTs-*lux* (Cm^R) wurde die *luxCDABE*-Kassette mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Xho*I und *Kpn*I entfernt und durch *gfp* substituiert. Das Fragment für den Fluoreszenzreporter wurde mittels PCR aus dem Vektor pProbe-NT amplifiziert, mit Hilfe des *PCR Purification*-Kits aufgereinigt, mit *Xho*I und *Kpn*I verdaut und in den bereits geschnittenen Vektor ligiert. Die Position und Orientierung der Gene des resultierenden Vektors pUT-*gfp* (Cm^R) sind durch Blockpfeile dargestellt.



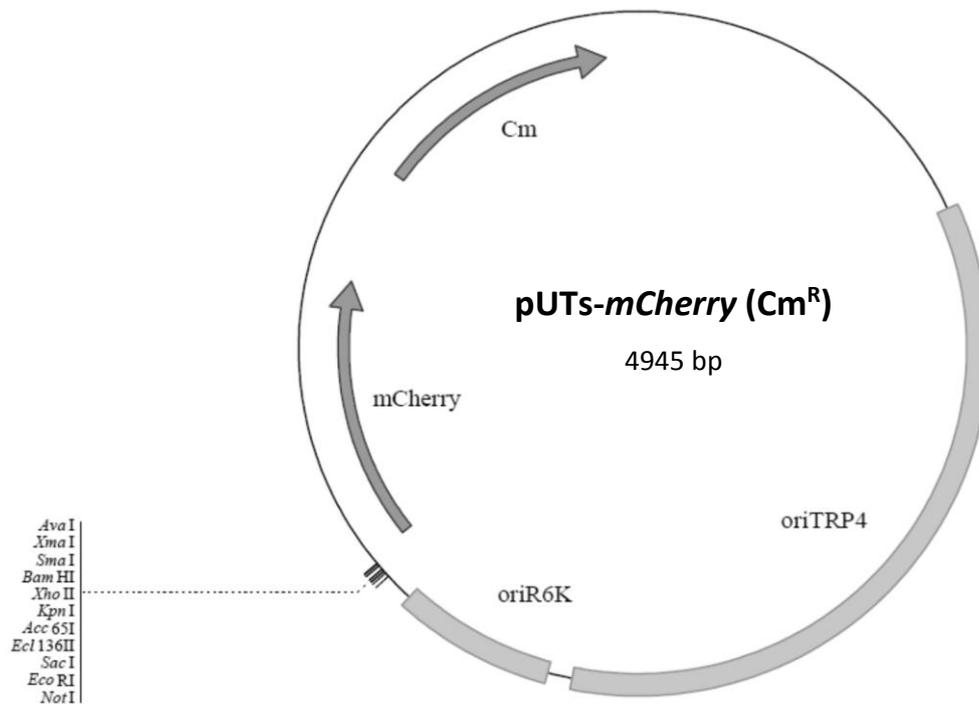
Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
900	2627	<i>oriTRP4</i>	Mobilitätsregion
2685	3054	<i>oriR6K</i>	Replikationsursprung
3150	3162		<i>multiple cloning site</i> (<i>Hind</i> III → <i>Eco</i> RI)
3190	3195		Ribosomenbindestelle
3204	3920	<i>gfp</i>	Gen für grün fluoreszierendes Protein
3930	4102	T	T1 <i>rrnB</i> Terminator
4421	5080	Cm	Chloramphenicol-Resistenzgen

Abb. A 8: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pPROBE-NT [Miller *et al.*, 2000]. Die Position und Orientierung der einzelnen Gene sind durch Blockpfeile dargestellt.



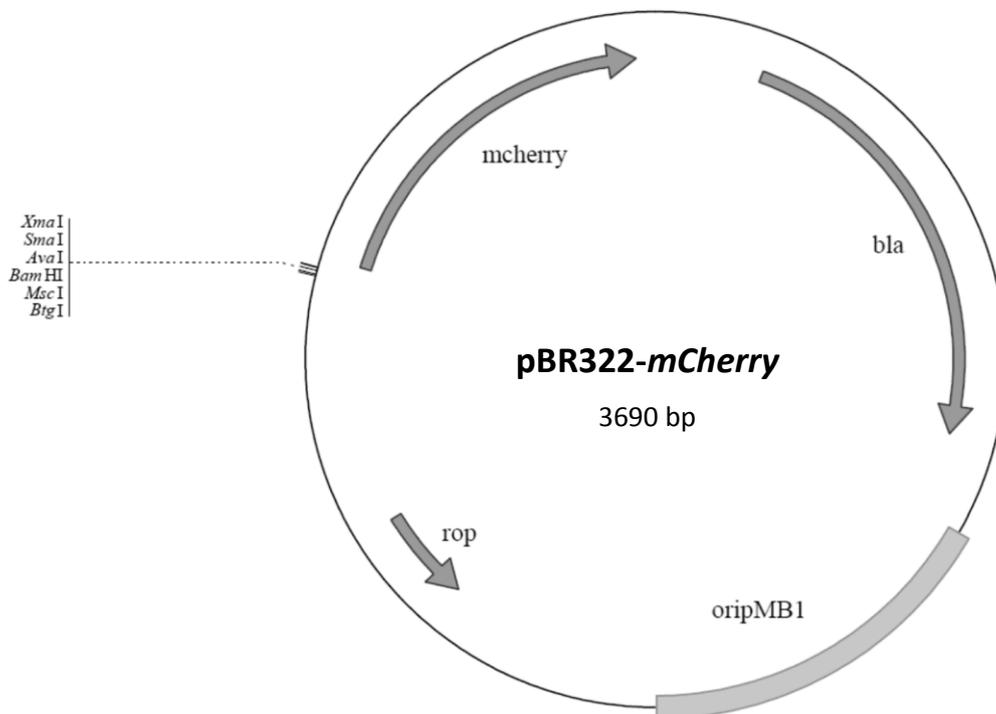
Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
1793	2455	<i>ori</i>	Replikationsursprung
3239	3411	T	T1 <i>rrnB</i> Terminator
3420	3592	T	T1 <i>rrnB</i> Terminator
3601	3773	T	T1 <i>rrnB</i> Terminator
3782	3954	T	T1 <i>rrnB</i> Terminator
3968	4024		<i>multiple cloning site (HindIII → EcoRI)</i>
4052	4057		Ribosomenbindestelle
4066	4782	<i>gfp</i>	Gen für grün fluoreszierendes Protein
4792	4964	T	T1 <i>rrnB</i> Terminator
5556	6350	Km	Kanamycin-Resistenzkassette
6608	799	<i>mob</i>	Mobilitätsregion

Abb. A 9: Plasmidkarte und Eigenschaften des Suizidvektors pUTs-*mCherry* (Cm^R). Aus dem Vektor pUTs-*lux* (Cm^R) wurde die *luxCDABE*-Kassette mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Xho*I und *Kpn*I entfernt und durch *mCherry* substituiert. Das Fragment für den Fluoreszenzreporter wurde mittels PCR aus dem Vektor pBR322-*mCherry* amplifiziert, mit Hilfe des *PCR Purification-Kits* aufgereinigt, mit *Xho*I und *Kpn*I verdaut und in den bereits geschnittenen Vektor ligiert. Die Position und Orientierung der Gene des resultierenden Vektors pUT-*mCherry* (Cm^R) sind durch Blockpfeile dargestellt.



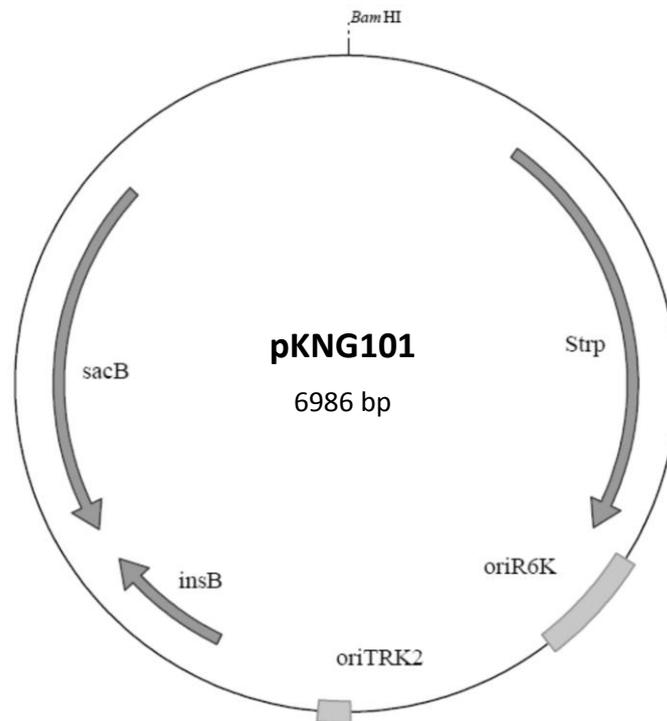
Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
900	2627	<i>oriTRP4</i>	Mobilitätsregion
2685	3054	<i>oriR6K</i>	Replikationsursprung
3183	3890	<i>mCherry</i>	Gen für rot fluoreszierendes mCherry-Protein
4200	4859	Cm	Chloramphenicol-Resistenzgen

Abb. A 10: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors **pBR322-mCherry** [Birmingham, 2006]. Die Position und Orientierung der einzelnen Gene sind durch Blockpfeile dargestellt.



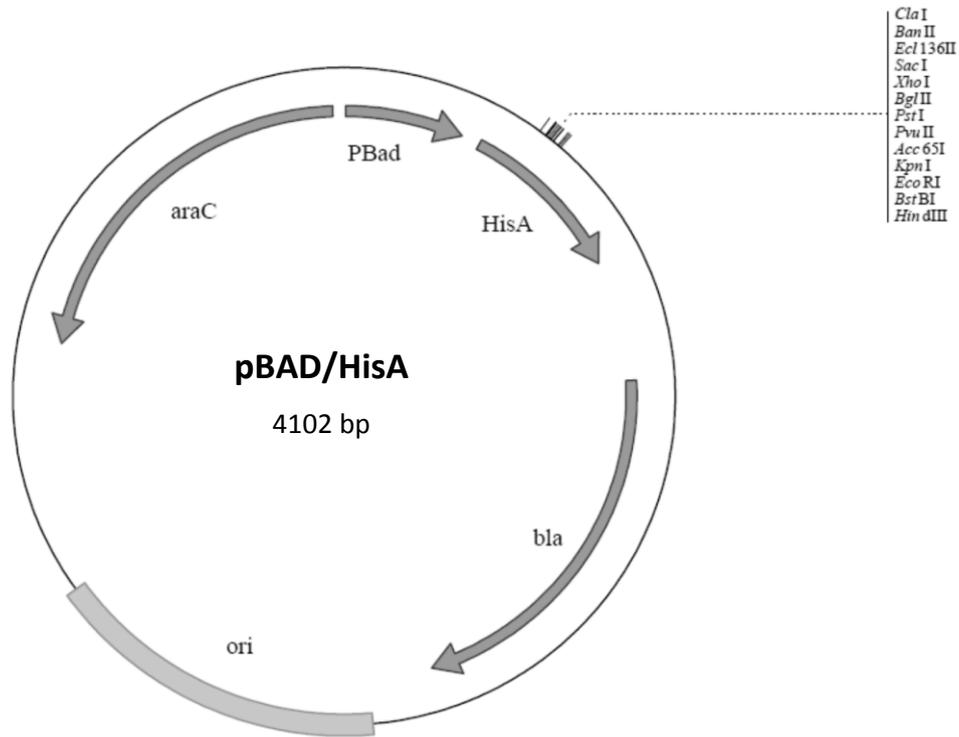
Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
209	1069	<i>bla</i>	β -Lactamase-Gen
1843	1229	<i>ori</i> MB1	Replikationsursprung
2446	2259	<i>rop</i>	Gen für Rop-Protein
2910	2925		<i>multiple cloning site</i> (<i>Bt</i> gl \rightarrow <i>X</i> mal)
2946	3653	<i>mCherry</i>	Gen für rot fluoreszierendes mCherry-Protein

Abb. A 11: Plasmidkarte und Eigenschaften des Suizidvektors pKNG101 [Kaniga *et al.*, 1991]. Die Position und Orientierung der einzelnen Gene sind durch Blockpfeile dargestellt.



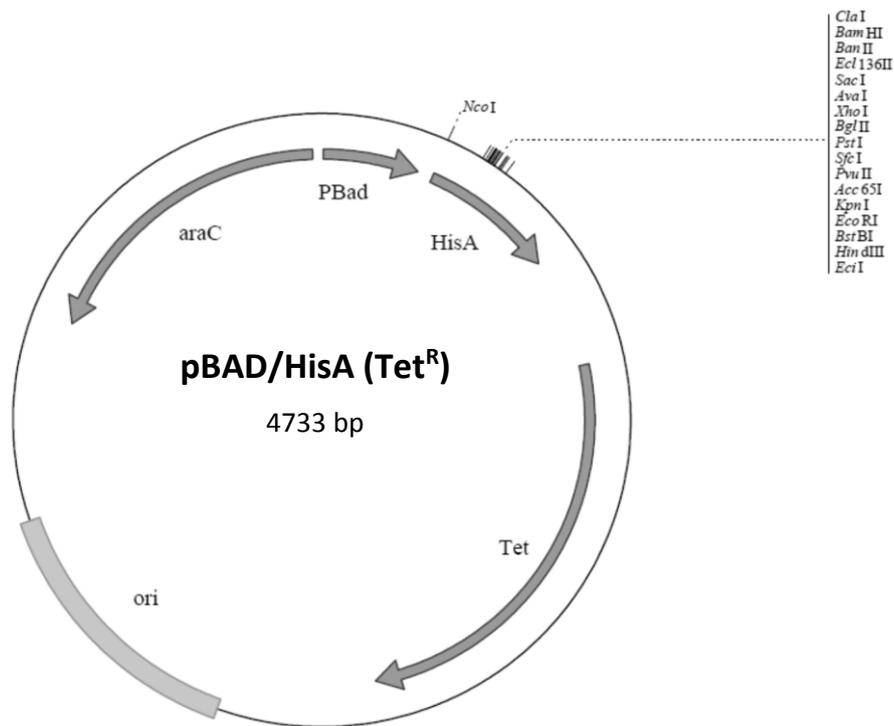
Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
696	2335	Strp	Streptomycin-Phosphotransferase
2373	2760	oriR6K	Replikationsursprung
3477	3587	oriTRK2	Mobilitätsregion
4001	4504	insB	Insertionssequenz IS1 <i>insB</i> aus <i>E. coli</i>
6063	4642	sacB	Gen für Levansucrase aus <i>B. subtilis</i>

Abb. A 12: Plasmidkarte und Eigenschaften des Überexpressionsvektors pBAD/HisA von Invitrogen. Die Position und Orientierung der einzelnen Gene sind durch Blockpfeile dargestellt.



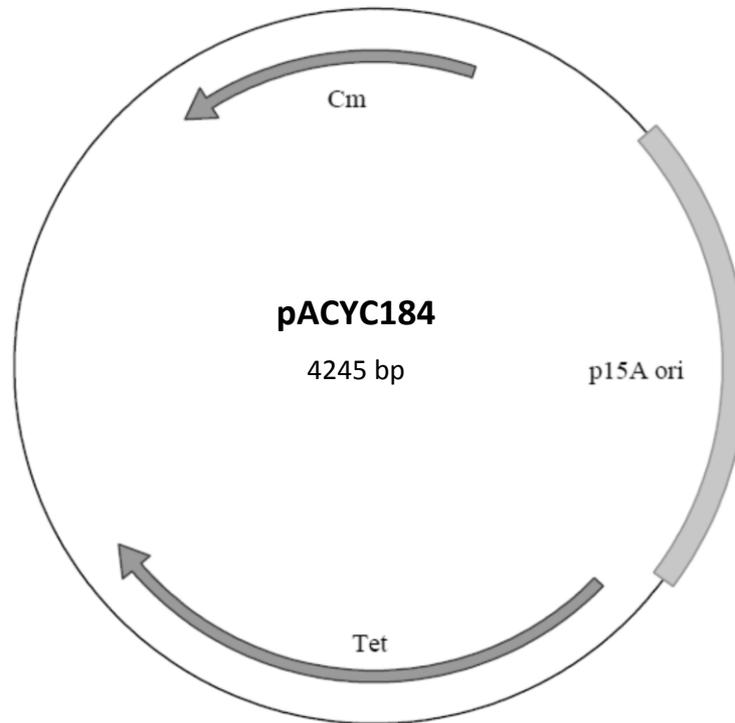
Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
4	276	pBAD	<i>araBAD</i> Promotor
319	321	HisA	Startcodon
331	348	HisA	N-terminaler Polyhistidin-Tag
388	411	HisA	Anti-Xpress-Epitop
394	411	HisA	Enterokinase-Schnittstelle
430	470	HisA	<i>multiple cloning site</i> (<i>Cla</i> I → <i>Hin</i> dIII)
553	710	HisA	T1 <i>rrnB</i> Terminator
989	1849	<i>bla</i>	β -Lactamase-Gen
1994	2667	<i>ori</i>	Replikationsursprung
4076	3198	<i>araC</i>	Gen für AraC-Protein

Abb. A 13: Plasmidkarte und Eigenschaften des Überexpressionsvektors pBAD/HisA (Tet^R) [Starke *et al.*, 2013]. Aus dem Vektor pBAD/HisA wurde mittels *Nco*I das β -Lactamase-Gen entfernt und durch ein Tetrazyklin-Resistenzgen substituiert. Das Fragment für die Resistenzkassette wurde mittels PCR aus dem Vektor pACYC184 amplifiziert, mit Hilfe des *PCR Purification*-Kits aufgereinigt, mit *Nco*I verdaut und in den bereits geschnittenen Vektor ligiert. Die Position und Orientierung der Gene des resultierenden Vektors pBAD/HisA (Tet^R) sind durch Blockpfeile dargestellt.



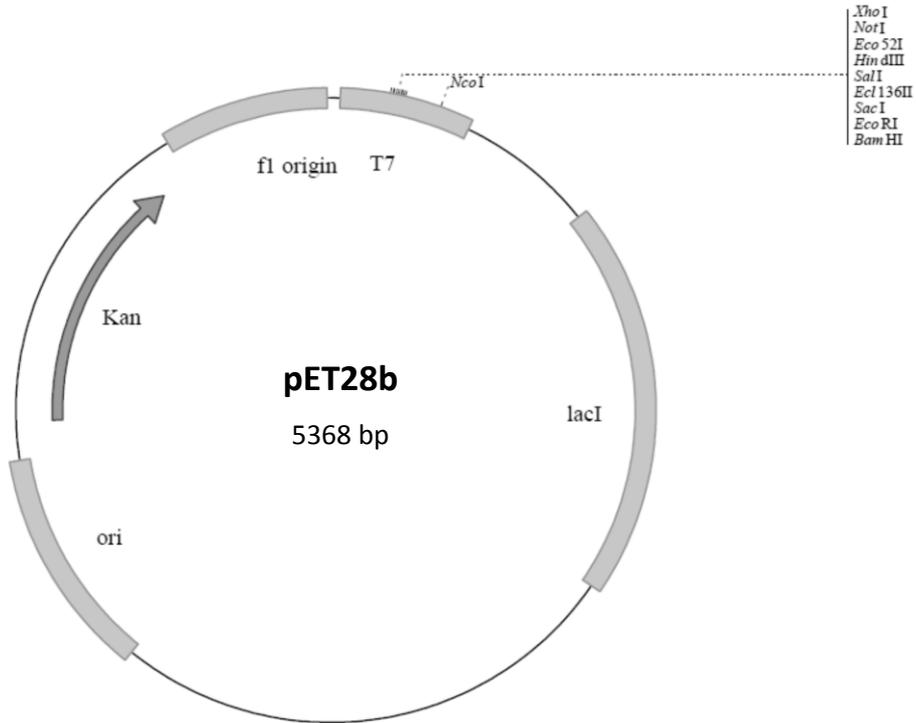
Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
4	276	pBAD	<i>ara</i> BAD Promotor
319	321	HisA	Startcodon
331	348	HisA	N-terminaler Polyhistidin-Tag
388	411	HisA	Anti-Xpress-Epitop
394	411	HisA	Enterokinase-Schnittstelle
430	470	HisA	multiple cloning site (<i>Cla</i> I → <i>Hind</i> III)
553	710	HisA	T1 <i>rrnB</i> Terminator
1025	2215	Tet	Tetrazyklin-Resistenzgen
2627	3298	<i>ori</i>	Replikationsursprung
4707	3829	<i>araC</i>	Gen für AraC-Protein

Abb. A 14: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pACYC184 von Invitrogen. Die Position und Orientierung der einzelnen Gene sind durch Blockpfeile dargestellt.



Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
219	3805	Cm	Chloramphenicol-Resistenzgen
581	1493	p15A <i>ori</i>	Replikationsursprung
1581	2771	Tet	Tetrazyklin-Resistenzgen

Abb. A 15: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pET28b von Novagen. Die Position und Orientierung der einzelnen Gene sind durch Blockpfeile dargestellt.



Start	Stopp	Bezeichnung	Beschreibung
26	72	T7	T7 Terminator
140	157	T7	C-terminaler Polyhistidin-Tag
158	203	T7	multiple cloning site (<i>Bam</i> HI → <i>Xho</i> I)
207	239	T7	T7-Tag
270	287	T7	N-terminaler Polyhistidin-Tag
340	367	T7	Gen für Operator LacO
370	386	T7	T7-Promotor
773	1852	<i>lacI</i>	Gen für Repressor LacI
3286	3888	<i>ori</i>	Replikationsursprung
3995	4807	Km	Kanamycin-Resistenzgen
4903	5358	<i>f1 origin</i>	Replikationsursprung für ssDNA

Tab. A 7: Transkriptionsaktivität von Genen aus *Y. enterocolitica* W22703 bei 15°C und 37°C in LB-Medium. Die angegebenen Werte entsprechen der späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,8) und stellen Mittelwerte sowie deren Standardabweichung (STABW) aus drei Versuchen mit vier Parallelmessungen dar. U.S.= unterhalb des Schwellenwertes für eine signifikante Transkriptionsaktivität (ca. 700 RLU₄₉₀/OD₆₀₀). N.i.: nicht induziert. I.: Induziert mit 0,2% Arabinose.

Stamm	15°C		37°C	
	RLU/OD ₆₀₀	STABW [%]	cRLU/OD ₆₀₀	STABW [%]
<i>tcaR1</i>				
W22703 P _{tcaR1} ::pUTs <i>lux</i>	6,4 x 10 ³	12,7	6,4 x 10 ³	12,7
W22703 P _{tcaR1} ::pUTs <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR1</i> (n.i.)	5,7 x 10 ³	2,6	5,5 x 10 ³	16,3
W22703 P _{tcaR1} ::pUTs <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR1</i> (i.)	5,2 x 10 ³	3,0	4,4 x 10 ³	31,3
W22703 Δ <i>tcaR1</i> P _{tcaR1} ::pUTs <i>lux</i>	1,2 x 10 ⁴	2,8	1,8 x 10 ⁴	3,6
W22703 Δ <i>tcaR2</i> P _{tcaR1} ::pUTs <i>lux</i>	5,3 x 10 ³	32,0	6,5 x 10 ³	11,5
W22703 Δ <i>ymoA</i> P _{tcaR1} ::pUTs <i>lux</i>	5,0 x 10 ⁴	2,5	1,3 x 10 ⁵	10,2
W22703 Δ <i>ymoA</i> P _{tcaR1} ::pUTs <i>lux</i> pBAD- <i>ymoA</i> (n.i.)	1,9 x 10 ⁴	5,7	6,9 x 10 ⁴	2,9
W22703 Δ <i>ymoA</i> P _{tcaR1} ::pUTs <i>lux</i> pBAD- <i>ymoA</i> (i.)	2,7 x 10 ³	15,0	2,0 x 10 ⁴	16,8
W22703 Δ <i>luxS</i> P _{tcaR1} ::pUTs <i>lux</i>	6,0 x 10 ³	7,3	8,8 x 10 ³	3,9
W22703 <i>yenI</i> :: <i>KanR</i> P _{tcaR1} ::pUTs <i>lux</i>	1,2 x 10 ⁴	3,2	1,6 x 10 ⁴	4,6
<i>tcaR2</i>				
W22703 P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i>	2,2 x 10 ³	18,5	4,2 x 10 ³	19,0
W22703 P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR2</i> (n.i.)	1,2 x 10 ⁵	5,6	4,0 x 10 ⁴	21,5
W22703 P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR2</i> (i.)	5,9 x 10 ⁶	2,6	2,1 x 10 ⁶	7,8
W22703 P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR1</i> (n.i.)	5,4 x 10 ³	2,5	u.S.	
W22703 P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR1</i> (i.)	2,6 x 10 ³	6,2	3,8 x 10 ³	21,5
W22703 Δ <i>tcaR1</i> P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i>	1,2 x 10 ⁵	6,9	2,7 x 10 ⁵	19,6
W22703 Δ5'- <i>tcaR2</i> P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i>	3,6 x 10 ³	16,3	7,2 x 10 ³	6,3
W22703 Δ <i>ymoA</i> P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i>	1,6 x 10 ⁶	1,3	1,6 x 10 ⁶	1,3
W22703 Δ <i>ymoA</i> P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i> pBAD- <i>ymoA</i> (n.i.)	1,2 x 10 ⁶	3,1	1,2 x 10 ⁶	3,1
W22703 Δ <i>ymoA</i> P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i> pBAD- <i>ymoA</i> (i.)	1,2 x 10 ⁵	11,2	1,2 x 10 ⁵	11,2
W22703 Δ <i>luxS</i> P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i>	1,6 x 10 ⁵	4,7	1,1 x 10 ⁵	6,5
W22703 <i>yenI</i> :: <i>KanR</i> P _{tcaR2} ::pUTs <i>lux</i>	2,7 x 10 ⁵	3,7	1,5 x 10 ⁵	5,0
<i>tcaA</i>				
W22703 P _{tcaA} ::pUTs <i>lux</i>	1,2 x 10 ⁶	4,2	u.S.	
W22703 P _{tcaA} ::pUTs <i>lux</i> pBAD <i>tcaR2</i> i.	4,4 x 10 ⁶	3,7	2,4 x 10 ⁶	0,9
W22703 Δ5'- <i>tcaR2</i> P _{tcaA} :: <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR2</i> (n.i.)	2,4 x 10 ³	6,5	1,3 x 10 ³	1,7
W22703 Δ5'- <i>tcaR2</i> P _{tcaA} :: <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR2</i> (i.)	2,9 x 10 ⁵	2,9	1,8 x 10 ⁵	7,3

Stamm	15°C		37°C	
	RLU/OD ₆₀₀	STABW [%]	cRLU/OD ₆₀₀	STABW [%]
W22703 $\Delta ymoA$ $P_{tcaA}::lux$	$5,0 \times 10^6$	2,8	$6,4 \times 10^5$	6,7
W22703 $\Delta ymoA$ $P_{tcaA}::lux$ pBAD/HisA (Tet ^R) (i.)	$4,4 \times 10^6$	0,8	$5,0 \times 10^5$	5,8
W22703 $\Delta ymoA$ $P_{tcaA}::lux$ pBAD/HisA (Tet ^R) (n.i.)	$7,1 \times 10^6$	7,4	$6,1 \times 10^5$	5,7
W22703 $\Delta ymoA$ $P_{tcaA}::lux$ pBAD- <i>tcaR2</i> (n.i.)	$4,8 \times 10^6$	2,7	$5,7 \times 10^5$	11,2
W22703 $\Delta ymoA$ $P_{tcaA}::lux$ pBAD- <i>tcaR2</i> (i.)	$8,4 \times 10^6$	11,1	$7,5 \times 10^5$	8,9
W22703 <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$1,4 \times 10^6$	1,8	u.S.	
W22703 <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR2</i> (i.)	$1,2 \times 10^6$	5,5	$1,9 \times 10^5$	9,9
W22703 $\Delta tcaR1$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$1,7 \times 10^6$	4,4	u.S.	
W22703 $\Delta tcaR1$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR1</i> (n.i.)	$1,3 \times 10^6$	1,3	u.S.	
W22703 $\Delta tcaR1$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR1</i> (i.)	$9,5 \times 10^5$	3,2	u.S.	
W22703 $\Delta 5'-tcaR2$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$2,1 \times 10^3$	6,7	u.S.	
W22703 $\Delta 5'-tcaR2$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD/HisA (Tet ^R) (i.)		u.S.	u.S.	
W22703 $\Delta 5'-tcaR2$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR2</i> (n.i.)	$1,9 \times 10^3$	6,8	u.S.	
W22703 $\Delta 5'-tcaR2$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR2</i> (i.)	$2,7 \times 10^5$	4,3	$1,9 \times 10^4$	12,0
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$4,3 \times 10^6$	2,5	$1,5 \times 10^4$	30,2
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD- <i>ymoA</i> (n.i.)	$5,6 \times 10^6$	3,3	$3,8 \times 10^4$	7,1
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD- <i>ymoA</i> (i.)	$3,4 \times 10^6$	6,2	u.S.	
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD/HisA (Tet ^R) (n.i.)	$4,9 \times 10^6$	2,7	$3,5 \times 10^4$	1,2
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD/HisA (Tet ^R) (i.)	$7,6 \times 10^6$	3,1	$3,3 \times 10^4$	2,7
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR2</i> (n.i.)	$5,1 \times 10^6$	1,8	$4,0 \times 10^6$	3,7
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pBAD- <i>tcaR2</i> (i.)	$5,8 \times 10^6$	3,1	$1,9 \times 10^7$	6,9
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pACYC184	$5,1 \times 10^6$	3,7	$3,2 \times 10^4$	3,2
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pACYC- <i>tcaR2</i>	$5,4 \times 10^6$	5,3	$5,4 \times 10^5$	20,5
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pACYC- <i>tcaR2</i> pBAD/HisA (Tet ^R) (n.i.)	$4,2 \times 10^6$	1,5	$1,7 \times 10^5$	22,2
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pACYC- <i>tcaR2</i> pBAD/HisA (Tet ^R) (i.)	$8,3 \times 10^6$	2,8	$4,2 \times 10^4$	3,9
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pACYC- <i>tcaR2</i> pBAD- <i>ymoA</i> (n.i.)	$3,6 \times 10^6$	4,8	$7,3 \times 10^4$	7,0
W22703 $\Delta ymoA$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i> pACYC- <i>tcaR2</i> pBAD- <i>ymoA</i> (i.)	$6,2 \times 10^6$	2,0	$1,3 \times 10^3$	9,8
W22703 <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$4,1 \times 10^6$	1,5	u.S.	
W22703 <i>kdpD</i> ::pKRG9 <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$2,6 \times 10^6$	66,0	u.S.	
W22703 $\Delta luxS$ <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$2,7 \times 10^6$	30,7	u.S.	
W22703 <i>rovA</i> ::pKRG9 <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$3,1 \times 10^6$	28,2	u.S.	
W22703 <i>yenI</i> :: <i>KanR</i> <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$2,5 \times 10^6$	12,4	u.S.	
W22703 <i>ymoA</i> ::pKRG9 <i>tcaA</i> (134):: <i>lux</i>	$1,1 \times 10^7$	15,2	$1,9 \times 10^4$	2,3

Stamm	15°C		37°C	
	RLU/OD ₆₀₀	STABW [%]	cRLU/OD ₆₀₀	STABW [%]
tcaB				
W22703 P _{tcaB} ::pUTs lux	4,0 x 10 ⁴	9,7	6,8 x 10 ⁴	31,9
W22703 ΔtcaR1 P _{tcaB} ::pUTs lux	9,1 x 10 ⁴	13,0	8,1 x 10 ⁴	39,3
W22703 Δ5'-tcaR2 P _{tcaB} ::pUTs lux	2,2 x 10 ⁴	5,9	4,8 x 10 ⁴	6,3
W22703 ΔymoA P _{tcaB} ::pUTs lux	4,0 x 10 ⁵	3,4	6,0 x 10 ⁵	4,2
W22703 Δ5'-tcaR2 P _{tcaB} ::pUTs lux pBAD-tcaR2 (n.i.)	6,5 x 10 ⁴	10,1	5,3 x 10 ⁴	14,3
W22703 Δ5'-tcaR2 P _{tcaB} ::pUTs lux pBAD-tcaR2 (i.)	6,1 x 10 ⁴	1,4	3,6 x 10 ⁴	10,1
W22703 tcaB(177)::lux	6,2 x 10 ⁴	3,3		u.S.
W22703 ΔtcaR1 tcaB(177)::lux	2,8 x 10 ⁴	2,9		u.S.
W22703 Δ5'-tcaR2 tcaB(177)::lux		u.S.		u.S.
W22703 Δ5'-tcaR2 tcaB(177)::lux pBAD-tcaR2 (n.i.)		u.S.		u.S.
W22703 Δ5'-tcaR2 tcaB(177)::lux pBAD-tcaR2 (i.)	1,0 x 10 ⁵	2,8	2,3 x 10 ⁴	2,8
tcaC				
W22703 P _{tcaC} ::lux		u.S.		u.S.
W22703 ΔtcaR1- P _{tcaC} ::lux		u.S.		u.S.
W22703 ΔtcaR2v- P _{tcaC} ::lux		u.S.		u.S.
W22703 ΔymoA- P _{tcaC} ::lux	3,4 x 10 ⁴	2,4		u.S.
tccC1				
W22703 P _{tccC1} ::pUTs lux		u.S.	2,7 x 10 ³	14,9
W22703 ΔtcaR1 P _{tccC1} ::pUTs lux		u.S.	2,1 x 10 ³	10,3
W22703 Δ5'-tcaR2 P _{tccC1} ::pUTs lux		u.S.	2,4 x 10 ³	5,0
W22703 ΔymoA P _{tccC1} ::pUTs lux	6,4 x 10 ³	4,6	1,8 x 10 ⁵	8,0
tccC2				
W22703 P _{tccC2} ::lux	1,7 x 10 ⁵	7,6	6,6 x 10 ⁵	7,3
W22703 ΔtcaR1- P _{tccC2} ::lux	1,4 x 10 ⁵	1,5	6,3 x 10 ⁵	1,4
W22703 Δ5'-tcaR2 P _{tccC2} ::lux	2,1 x 10 ⁵	2,3	6,5 x 10 ⁵	8,3
W22703 ΔymoA- P _{tccC2} ::lux	4,8 x 10 ⁵	2,3	8,8 x 10 ⁵	10,2
hol/endo				
W22703 P _{hol/endo} ::pUTs lux		u.S.		u.S.
W22703 ΔtcaR1 P _{hol/endo} ::pUTs lux		u.S.		u.S.
W22703 Δ5'-tcaR2 P _{hol/endo} ::pUTs lux		u.S.		u.S.
W22703 ΔymoA P _{hol/endo} ::pUTs lux	2,8 x 10 ⁴	6,5	2,9 x 10 ⁴	3,5
W22703 ΔymoA P _{hol/endo} ::pUTs lux pBAD-yoA (n.i.)	1,7 x 10 ⁴	6,6	2,2 x 10 ⁴	2,4
W22703 ΔymoA P _{hol/endo} ::pUTs lux pBAD-yoA (i.)		u.S.		u.S.

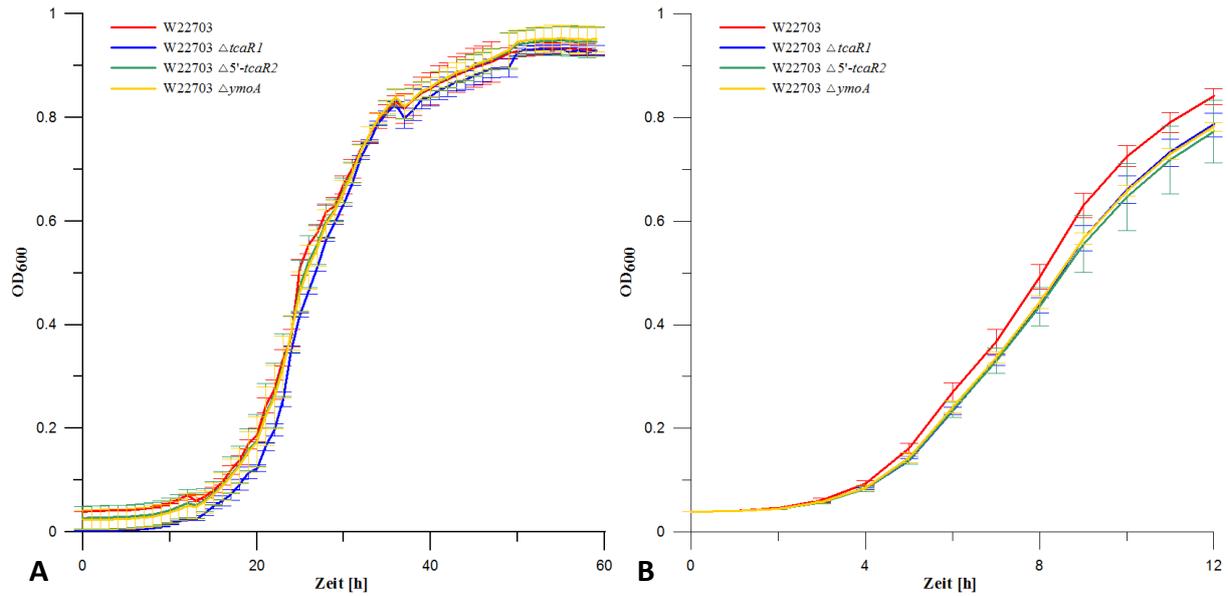


Abb. A 16: Einfluss der Deletion von *tcaR1*, *tcaR2* und *ymoA* auf das Wachstumsverhalten von *Y. enterocolitica* W22703 bei 15°C und 37°C. Die optische Dichte der Stämme W22703, W22703 $\Delta tcaR1$, W22703 $\Delta 5'$ -*tcaR2* und W22703 $\Delta ymoA$ wurde in LB-Medium bei 15°C (A) und 37°C (B) gemessen. Alle Graphen beruhen auf normalisierten Werten und stellen die Mittelwerte aus Vierfachmessungen von drei Parallelansätzen dar. Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung.

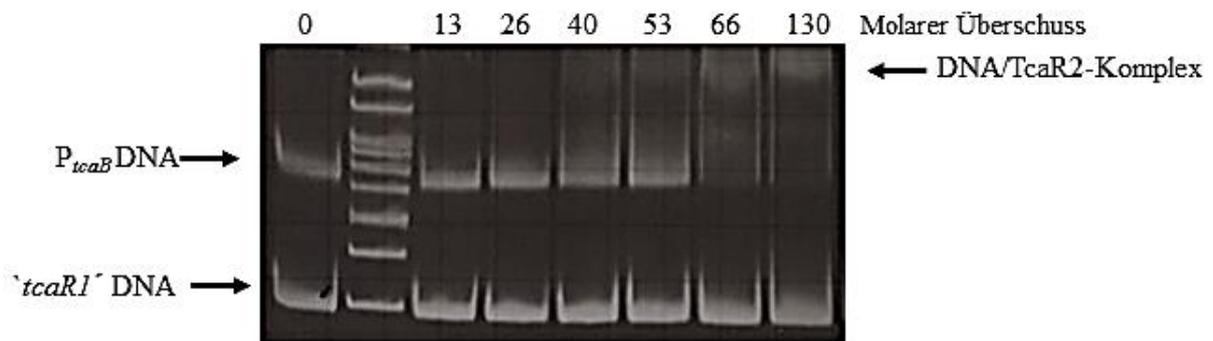


Abb. A 17: Bindung von TcaR2 an den Promotor von *tcaB*. Es wurden EMSAs mit einem 500 bp langen *tcaB*-Promotorfragment mit steigenden Mengen an gereinigtem TcaR2 bei 4°C durchgeführt. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives Fragment (*tcaR1*) hinzugegeben. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt und die DNA-Banden mit GelRed angefärbt.

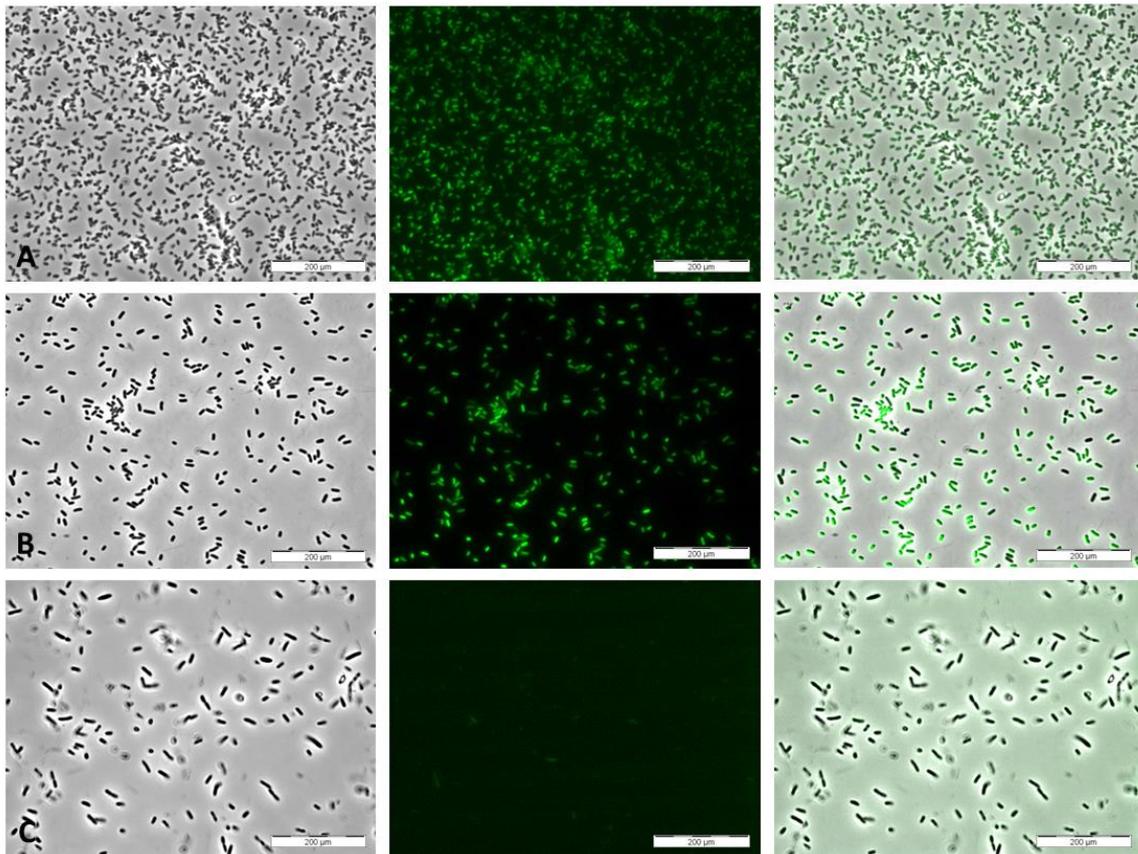


Abb. A 18: Untersuchungen zur Expression des *tcaA*-Promotors in anderen *Yersinia* spp. Mikroskopische Darstellung von *Y. frederiksenii* pNT- $P_{tcaA}::gfp$ (A), *Y. enterocolitica* WA314 pNT- $P_{tcaA}::gfp$ (B) und *Y. enterocolitica* 8081 pNT- $P_{tcaA}::gfp$ (C) bei 100-facher Vergrößerung nach zweitägiger Inkubation bei RT. Von links nach rechts: Phasenkontrast, Fluoreszenzkanal, Überlagerung beider Kanäle

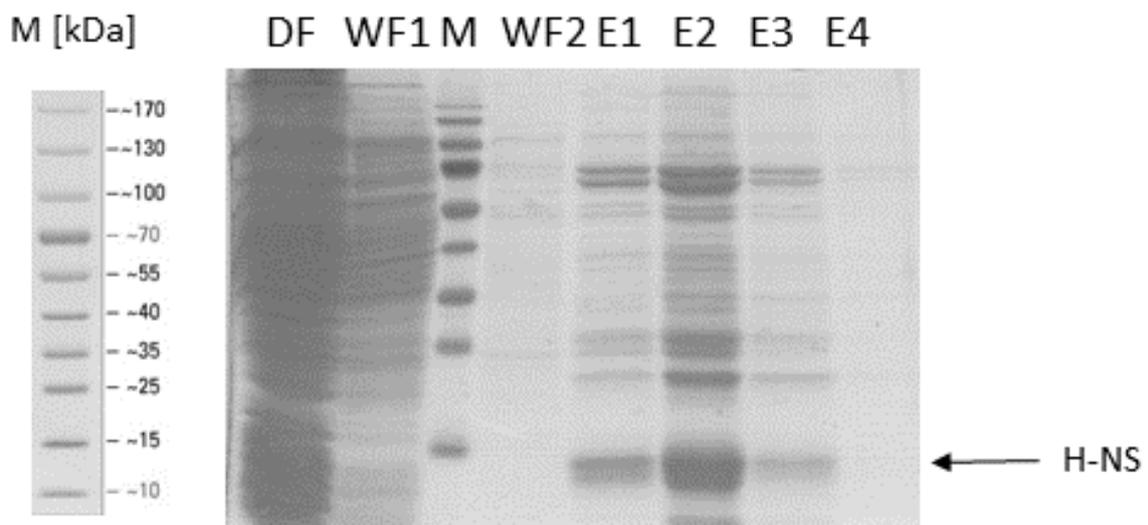


Abb. A 19: Analyse zur Aufreinigung von H-NS. M = Proteinmarker, DF = Durchfluss, WF = Waschfraktion, E = Elution. Die Reinheit des aufgereinigten Regulators betrug in den Elutionen 1 und 2 ca. 75%. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12,5%igen SDS-Gel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

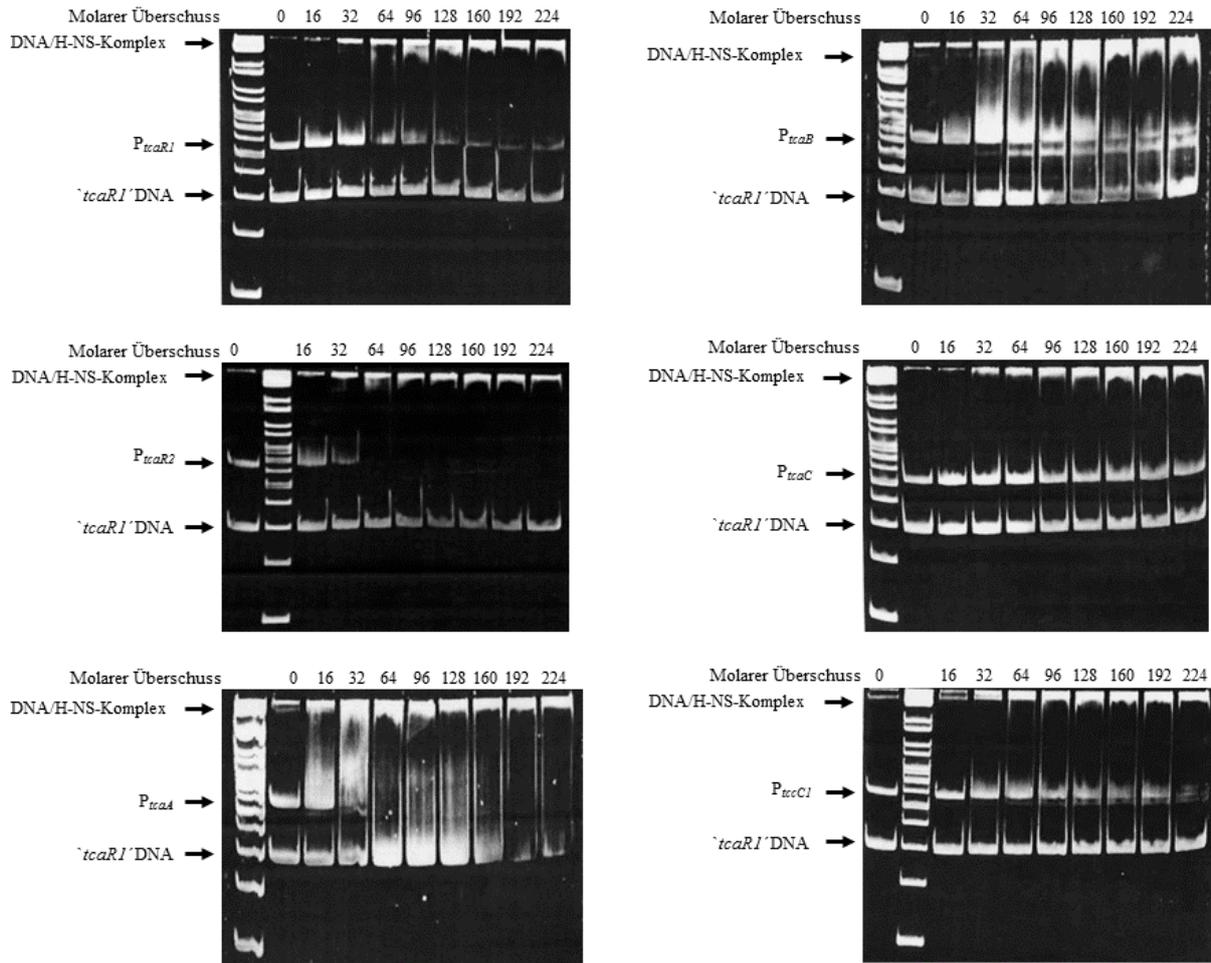


Abb. A 20: Bindung von H-NS an die Promotoren der *tc*-Gene der *Tc-PAI_{ye}*. Es wurden EMSAs mit 500 bp langen Promotorfragmenten der *tc*-Gene mit steigenden Mengen an gereinigtem H-NS bei 4°C durchgeführt. Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen wurde den Ansätzen ein repetitives intragenisches *tcaR1*-DNA-Fragment ($'tcaR1'$) hinzugegeben. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 1x TBE-Puffer aufgetrennt und die DNA-Banden mit GelRed angefärbt.

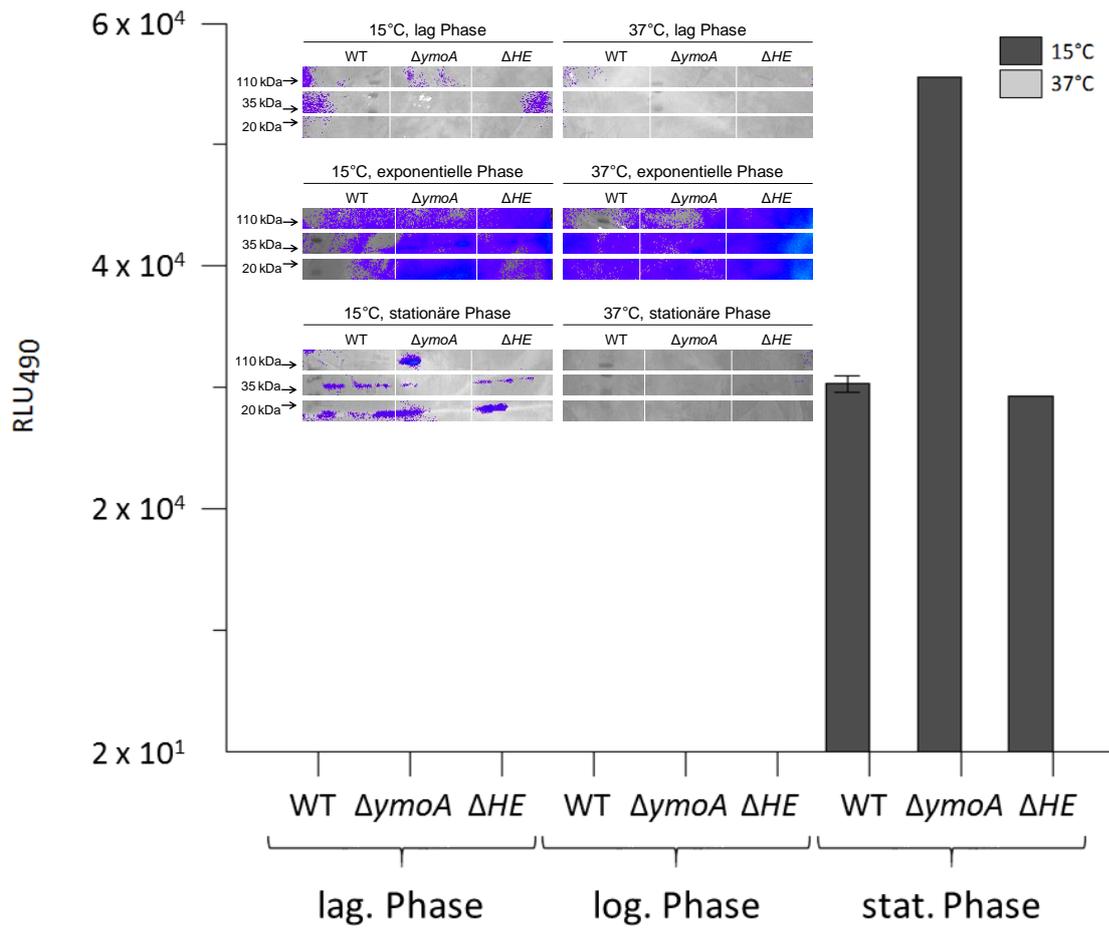


Abb. A 21: Detektiertes TcaA-mCherry im Überstand von W22703 *tcaA-mCherry* (WT), W22703 $\Delta ymoA$ *tcaA::mCherry* ($\Delta ymoA$) und W22703 $\Delta hol/endo$ *tcaA-mCherry* (ΔHE). Zu den angegebenen Wachstumsphasen wurden Proben entnommen und die Menge an TcaA-mCherry im Überstand mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-RFP-Antikörpers als Primäntikörper bestimmt. Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen mit jeweils zwei Replikaten. Für jeden Ansatz ist ein repräsentativer Blot dargestellt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Funktion ROI des Programmes *Living Image*TM V. 4.01 (Igor Pro). Die Fehlerbalken markieren die jeweilige Standardabweichung. [Rauser, 2012]

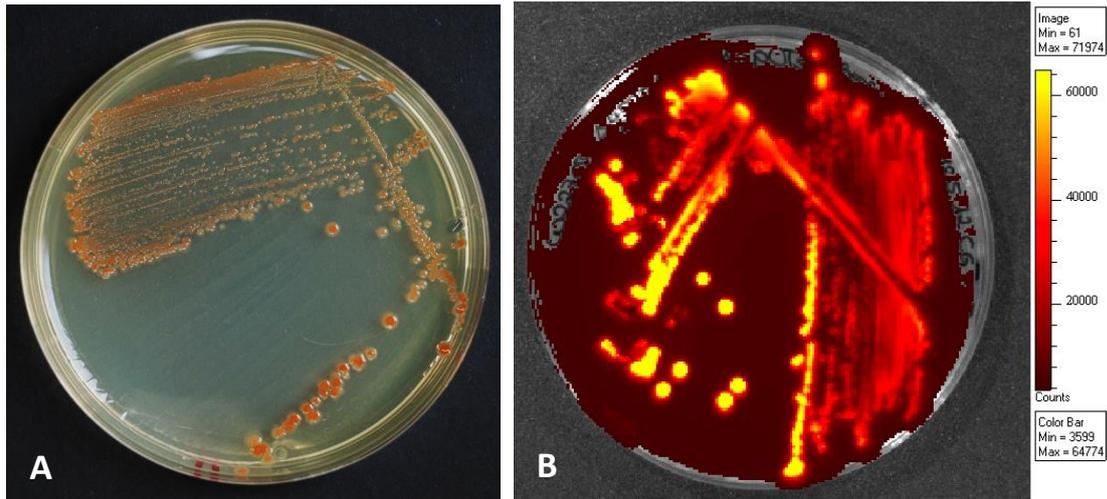


Abb. A 22: **Aufhebung der Bistabilität von *tcaA* nach der Deletion von *ymoA*.** A) Wachstum von W22703 $\Delta ymoA$ - $P_{tcaA}::mCherry$ nach dreitägiger Inkubation bei 15°C; B) Aufnahme der Fluoreszenz von W22703 $\Delta ymoA$ - $P_{tcaA}::mCherry$ nach dreitägiger Inkubation bei 15°C mit Hilfe der IVIS-Kamera.

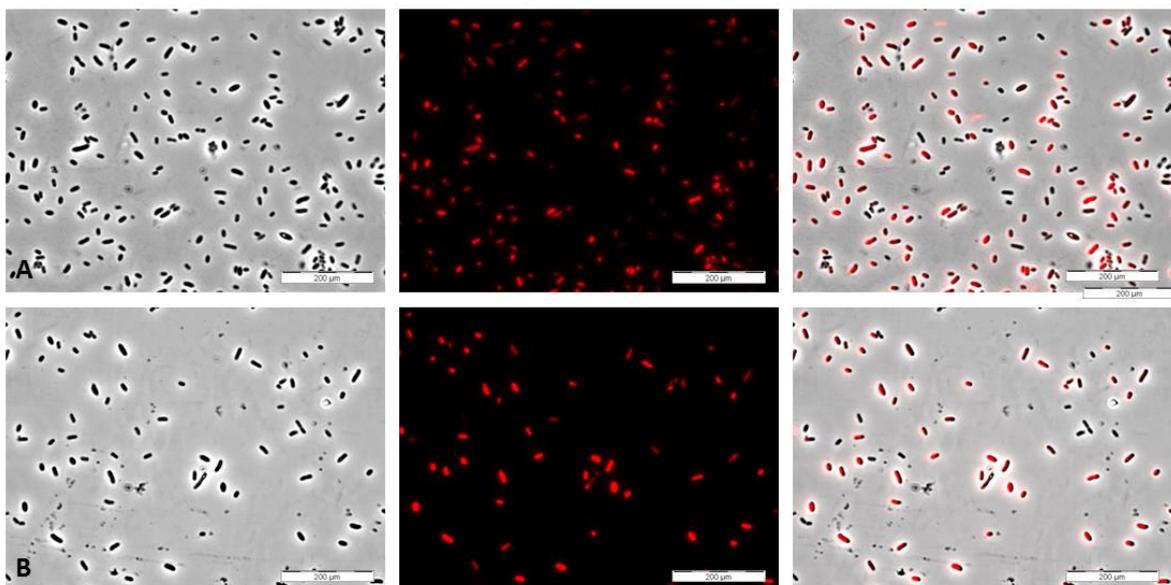


Abb. A 23: **Überexpression von TcaR2 hebt die Bistabilität des *tcaA*-Promotors auf.** Mikroskopische Darstellung von W22703 $P_{tcaA}::mCherry$ pBAD-*tcaR2* A) nicht induziert, B) induziert mit 0,2% Arabinose bei 100-facher Vergrößerung nach einem Tag Inkubation bei 37°C; Von links nach rechts: Phasenkontrast, Fluoreszenzkanal, Überlagerung beider Kanäle.

Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mich begleitet und unterstützt haben:

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Thilo M. Fuchs für all die Arbeit und Mühe, die er mir und meiner Arbeit in seiner Rolle als mein Betreuer widmete. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm intensiv, professionell und warmherzig begleitet. Besonders bedanken will ich mich für die Freiheit, die er mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte, was maßgeblich zum guten Gelingen dieser Arbeit beitrug. Sein kompetenter Rat und seine Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bei ihm bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Siegfried Scherer, Leiter des Lehrstuhls für Mikrobielle Ökologie, Department für Grundlagen der Biowissenschaften, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, für seine jederzeit gewährte Unterstützung sowohl in fachlicher als auch organisatorischer Hinsicht.

Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Martin Hofrichter.

Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung des Projektes, in dessen Rahmen diese Arbeit entstand.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Institutes für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wäre ohne Eure Hilfe nicht möglich gewesen, weshalb ich mich bei allen herzlich bedanken will. Danken möchte ich an dieser Stelle vor allem:

Frau Dr. Kristina Schauer, welche mir mit Rat und Tat bei inhaltlichen sowie methodischen Fragen vor allem zu Beginn meiner Arbeit zur Seite stand.

Johannes Rothhardt und Tanja Kern für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die angenehme Atmosphäre in unserem Büro und die daraus entstandene Freundschaft.

Lena Staib für die unvergessliche Zeit unserer Zusammenarbeit im „Yersinien-Labor“ und die daraus entstandene, für mich sehr wichtige Freundschaft sowie Daniela Kaspar für ihre freundschaftliche Aufnahme im Institut und darüber hinaus.

Jeder der in einem Labor arbeitet weiß, welche enorme Bedeutung den technischen Mitarbeitern zukommt. Daher bedanke ich mich bei Hildegard Maier, die in der Spülküche wie auch am Autoklaven, das Herz des Institutes am Schlagen hält und Patrick Schiwiek für die technische Unterstützung. An dieser Stelle extra erwähnt sei Angela Felsl, der ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, und für ihre hervorragende technische sowie menschliche Unterstützung danken möchte!

Unseren beiden Sekretärinnen Brigitte Stable und Maria Thole danke ich für ihre hilfreiche Unterstützung beim Bewältigen der Universitätsbürokratie und ihre Motivationshilfen, wenn es mal nicht so gut lief.

„Meinen Praktikanten“ Dominik Alterauge, Fabian Bergkemper, Julian Esselborn, Clara Gebrande, Jessica Hellinckx, Nicolas Jäger, Benedict Rauser, Christoph Schanzenbach, Lisa Schuster, Gwen Zwingenberger und Anika Veser danke ich für ihr gezeigtes Engagement und für ihr Durchhaltevermögen mich als Betreuer zu ertragen. Ich hoffe ich konnte Euch allen etwas beibringen. Meiner neuen/ ehemaligen Teileinheit, der TE020, danke ich für die Motivationshilfen, die Arbeit trotz neuer Beschäftigung zu Ende zu bringen. Hier sind insbesondere Melli, Karo, Martin, Josh, Sabine und Gerhard zu nennen.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Dr. Kerstin Wackwitz, die mir in schwierigen Situationen ein Stück von Ihrer Lebenserfahrung mit auf den Weg gegeben hat.

Für die unermüdliche Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit möchte ich an dieser Stelle meinen zukünftigen Schwiegereltern Ute und Uwe danken. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

Außerdem möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die ich in letzter Zeit sehr vernachlässigt habe, die aber immer zu mir gestanden haben und mich immer wieder zum Durchhalten ermutigt haben.

Nicht zuletzt danke ich meinen viel zu früh verstorbenen Großeltern für ihre langjährige Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Zum Schluss möchte ich für die Unterstützung danken, die mir von meinem Verlobten Marcus zuteilwurde, ein Dank, der nur schwer in Worte zu fassen ist. Danke, dass Du stets für mich da bist, meine Launen erträgst und es verstehst, mir immer wieder Selbstvertrauen zu geben.

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Lehrstuhles für Mikrobielle Ökologie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Starke, M., and Fuchs TM (2014). YmoA negatively controls the expression of insecticidal genes in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 92(2):287-30, 2014.

Starke, M., Fuchs, T.M. (2013). The insecticidal toxin genes of *Yersinia enterocolitica* are activated by the thermolabile LTTR-like regulator TcaR2 at low temperatures. *Mol. Microbiol.* 89:596-611

Fuchs, T. M., Brandt, K., Starke, M., Rattei, T. (2011). Shotgun sequencing of *Yersinia enterocolitica* strain W22703 (biovar 2, serovar O:9): genomic evidence for oscillation between invertebrates and mammals. *BMC Genomics* 12:168.

Spanier, B., Starke, M., Higel, F., Scherer, S., Fuchs, T.M. (2010). *Yersinia enterocolitica* infection and *tcaA*-dependent killing of *Caenorhabditis elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6277-6285.

Tagungsbeiträge

Starke, M., Fuchs, T. M.: Regulation of the expression of *tcaA* in the insecticidal pathogenicity island TC-PAI^{Ye} of *Yersinia enterocolitica*. Federation of European Microbiological Societies: 4th Congress of European Microbiologists: *FEMS 2011*. 26 – 30 June 2011, Geneva

Starke, M., Fuchs, T. M., Scherer, S.: The regulation of the low temperature-induced pathogenicity island TC-PAI^{Ye} of *Yersinia enterocolitica*. 2nd National *Yersinia*-Meeting. 17 – 18 September 2010, Herrsching

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Fakultät, dem Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel

Regulation und Freisetzung des insektiziden Komplexes in *Yersinia enterocolitica*

im Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Department für Grundlagen der Biowissenschaften unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Thilo M. Fuchs ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich einverstanden.

Neubiberg, den

.....
Mandy Starke

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name Mandy Starke
 Geburtsdatum und -ort 08.05.1986 in 02763 Zittau
 Familienstand ledig

Akademische Karriere

Seit 10/2013 **Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, Abteilung für Virologie und Rickettsiologie**
Wissenschaftliche Angestellte/ Projektmanagerin zum „Aufbau eines deutsch-tansanischen Netzwerkes zur Diagnostik und Surveillance potentieller B-Agenzien“

12/2009 - 05/2013 **Technische Universität München, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Weihenstephan, Abteilung für Mikrobielle Ökologie**
Wissenschaftliche Angestellte
Promotion zum Thema „Regulation und Freisetzung des insektiziden Toxinkomplexes von Yersinia enterocolitica“

12/2009 – 05/2013 Mitglied im Doktorandenkolleg für „Nachhaltigkeit und Umweltmanagement“ DotoratUM

01/2010 - 05/2011 Mentorin im E-Mentoring-Programm CyberMentor des Bundesministeriums für Bildung und Forschung

10/2007 - 11/2009 **Internationales Hochschulinstitut (IHI) Zittau**
Masterstudium „Biotechnologie und Angewandte Ökologie“
Vertiefung Umweltwissenschaften und Biotechnologie
 Abschluss: Master of Science (Note 1,0)

Helmholtz Zentrum München, Institut für Ökologische Chemie
Masterarbeit: „Immunochemische Analytik von Homoserinlactonen (HSL)“

10/2004 - 09/2007 **Hochschule Zittau/Görlitz (FH)**
Bachelorstudium „Biotechnologie“ mit technischer Vertiefung
 Abschluss: Bachelor of Science (Note 1,5)

IHI Zittau, Lehrstuhl für Biotechnologie und Angewandte Ökologie
Bachelorarbeit: „Biochemische und physiologische Untersuchungen zur Funktion der extrazellulären Peroxygenase AaP des Ständerpilzes Agrocybe aegerita“

08/1996 - 06/2004 **Oberland-Gymnasium, Seiffhennersdorf**
 Abschluss: Abitur (Note 1,7)