



Technische Universität München

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Struktur-Funktionsanalyse der Kopfregion des Yersinia Adhäsins YadA von enteropathogenen Yersinien hinsichtlich Pathogenität und der Bindung an extrazelluläre Matrix-Proteine

Nicolas Jäger

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

Doktorgrades der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. Siegfried Scherer
Prüfer der Dissertation:	1.: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Liebl
	2.: Univ.-Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann, Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 30.11.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.03.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Ehrenwörtliche Versicherung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
Zusammenfassung	XIII
Summary	XV
1 Einleitung	1
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i>	1
1.2 Enteropathogene Yersinien.....	2
1.2.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	3
1.2.2 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	5
1.3 Virulenzfaktoren enteropathogener Yersinien.....	6
1.3.1 Attachment Invasion Locus (Ail).....	6
1.3.2 Die „High Pathogenicity Island“ (HPI) und Yersiniabactin (Ybt).....	7
1.3.3 <i>Yersinia</i> Typ-3-Sekretionssystem (Ysc-T-III-SS)	7
1.3.3.1 <i>Yersinia</i> Outer Protein (Yop) Effektoren	8
1.3.4 Autotransporter-Adhäsine	10
1.3.4.1 Invasin (InvA).....	11
1.3.4.2 <i>Yersinia</i> Adhesin A (YadA)	12
1.4 Extrazelluläre Matrix-Proteine	18
1.4.1 Kollagen	20
1.4.2 Fibronectin	22
1.4.3 Laminin	24
1.4.4 ECM und bakterielle Infektionen.....	26
1.5 Ziel der Arbeit	28

2	Material	30
2.1	Verwendete Stämme	30
2.2	Verwendete Plasmide	31
2.3	Bakteriophile Nährmedien.....	33
2.4	Verwendete Antibiotika.....	34
2.5	Geräte.....	35
2.6	Chemikalien.....	36
2.7	Enzyme	37
2.8	Proteine und Peptide	38
2.9	Antikörper.....	39
2.10	Primer.....	40
2.11	Molekularbiologische „Kits“	41
2.12	Puffer und Lösungen.....	41
3	Methoden.....	46
3.1	Mikrobiologische Methoden.....	46
3.1.1	Kultivierung von Bakterien	46
3.1.2	Stammhaltung.....	46
3.1.3	Plasmidisolierung	46
3.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
3.1.5	Agarosegelelektrophorese	47
3.1.6	Aufreinigung von DNS	48
3.1.7	Bestimmung der DNS-Konzentration	48
3.1.8	DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen.....	48
3.1.9	Ligation von DNS-Fragmenten.....	49
3.1.10	DNS-Sequenzanalyse	49
3.1.11	Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	49
3.1.12	Transformation elektrokompenter Bakterien	49

3.1.13	Herstellung Ca ²⁺ -kompetenter Bakterien	50
3.1.14	Transformation Ca ²⁺ -kompetenter Bakterien	50
3.1.15	Konjugation	50
3.1.16	Konstruktion von pGS-Plasmiden	51
3.1.17	Herstellung der diversen <i>Y. enterocolitica</i> Stämme mit modifiziertem pYV	52
3.1.18	Bestimmung der Oberflächenhydrophilie von <i>Y. enterocolitica</i> Varianten	52
3.1.19	Autoagglutination nach Laird & Cavanaugh	53
3.2	Proteinchemische Methoden	53
3.2.1	Präparation von Außenmembranproteinen	53
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	54
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
3.2.4	Coomassie-blau-Färbung	55
3.2.5	Westernblot (Immunoblot)	56
3.2.6	Markierung von Kollagen Typ I mit Alexa488	57
3.3	Mikroskopie	57
3.3.1	Nachweis von YadA mit Fluoreszenzmikroskopie	57
3.3.2	Nachweis der Bindung an Fibronectin mit Fluoreszenzmikroskopie	58
3.4	Enzyme-Linked Immunosorbend Assay (ELISA)	59
3.4.1	Nachweis der Bindung von YadA-positiven Yersinien an immobilisierte ECM-Proteine mittels ELISA	59
3.4.2	Analyse der kompetitiven (POG) ₁₀ -/ECM-Proteinbindung an <i>Yersinia</i> mittels ELISA	60
3.5	Durchflusszytometrie	60
3.5.1	Nachweis der Autoagglutination von YadA-positiven Bakterien im Durchflusszytometer	60
3.5.2	Bindung von Kollagen Typ I und (POG) ₁₀ an YadA	60
3.5.3	Messung der kompetitiven Hemmung der <i>Yersinia</i> -ECM-Proteinbindung im Durchflusszytometer	61

3.6	Mausinfektionsversuche	61
3.6.1	Mauspassage.....	61
3.6.2	Perorale Mausinfektionen	62
3.6.3	Intraperitoneale (ip) Mausinfektionen.....	62
3.7	Auswertung.....	63
3.7.1	Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten.....	63
3.7.2	Statistische Auswertung	63
4	Ergebnisse	65
4.1	Verwendete <i>Yersinia</i> -Stämme	65
4.2	Herstellung von <i>yadA</i> -Genvarianten	66
4.3	Herstellung und Charakterisierung von <i>Yersinia</i> WA(pYVO8-x)-Stämmen mit <i>YadA</i> -Varianten	69
4.4	Verteilung <i>yadA</i> -exprimierender Stämme in einem Dextran-PEG-Biphasensystem	73
4.5	Quantifizierung der <i>Yersinia</i> -Bindung an immobilisierte ECM-Proteine mittels ELISA.....	77
4.5.1	<i>Yersinia</i> -Bindung an immobilisiertes Kollagen Typ I und IV	77
4.5.2	<i>Yersinia</i> -Bindung an immobilisiertes Laminin	79
4.5.3	<i>Yersinia</i> -Bindung an immobilisiertes Fibronectin und immobilisierte Fibronectin-Fragmente.....	80
4.5.4	Versuche zur Inhibierung der <i>Yersinia</i> -Bindung an immobilisierte ECM-Proteine durch (POG) ₁₀	83
4.6	Durchflusszytometrie.....	86
4.6.1	Autoagglutinationsverhalten von WA(pYVO8-x)-Stämmen.....	86
4.6.2	Kollagenbindungskapazität von <i>YadA</i> -Varianten in <i>Yersinia</i> WA(pYVO8-x)-Stämmen in Suspension	90
4.6.3	(POG) ₁₀ Bindungskapazität von <i>YadA</i> -Varianten in <i>Yersinia</i> WA(pYVO8-x)-Stämmen in Suspension	97
4.6.4	Inhibierung der Kollagenbindung von <i>YadA</i> -Varianten in <i>Yersinia</i> WA(pYVO8-x)-Stämmen durch (POG) ₁₀	103

4.7	Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Fibronectinbindung an Yersinien..	108
4.8	Rolle der YadA-NTTD-Verkürzung für die <i>Yersinia</i> -Mausvirulenz	110
4.8.1	Orale Mausinfektionsversuche	110
4.8.2	Intraperitoneale (ip) Mausinfektionen.....	113
5	Diskussion	120
5.1	Herstellung und Charakterisierung der YadA-Varianten in WA(pYVO8-x).....	121
5.2	in vitro vermittelte YadA-Bindung an ECM-Proteine	125
5.2.1	Yersinien-Bindung an immobilisierten Kollagen und gelöstes Kollagen	125
5.2.2	Bindung von (POG) ₁₀ an YadA und Inhibierung der Kollagenbindung durch (POG) ₁₀ in Suspension	129
5.2.3	Bindung von Yersinien an immobilisiertes Laminin	134
5.2.4	Bindung von Yersinien an Fibronectin und Fibronectinfragmente	134
5.3	Rolle von YadA im Mausinfektionsmodell.....	140
5.3.1	Perorales Mausinfektionsmodell	140
5.3.2	Intraperitoneales Mausinfektionsmodell	141
	Literaturverzeichnis.....	143
	Anhang	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Veröffentlichungen.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Danksagung	160

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des Ysc-T-III-SS. Aufbau des Ysc-T-III-SS aus Basalkörper, Proteinnadel und Translokatorcomplex.....	8
Abbildung 1.2: Typ V Autotransporter. Einteilung und schematischer Aufbau der Typ V Autotransporter (T-Vc-SS: YadA; T-Ve-SS: Invasin).....	11
Abbildung 1.3: Diskutierter Transportmechanismus von YadA über die innere und äußere Membran in den extrazellulären Raum.	14
Abbildung 1.4: Struktur, Aufbau und Struktur-Funktionsbeziehung von YadA.....	16
Abbildung 1.5: Aufbau der Basallamina.....	20
Abbildung 1.6: Kollagensekretion und Entstehung der Kollagenfibrillen.....	22
Abbildung 1.7: Schematischer Aufbau von Fibronectin.....	24
Abbildung 1.8: Schematischer Aufbau von Laminin.....	26
Abbildung 3.1: Graphische Darstellung der Auswertung der Autoagglutination nach Laird & Cavanaugh.....	53
Abbildung 4.1: Aminosäuresequenzvergleich von WA 314 YadA (YadA ^e) und YPIII YadA (YadA ^p).....	66
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der hergestellten und untersuchten YadA-Varianten.....	68
Abbildung 4.3: SDS-PAGE zum Nachweis der Lokalisation der YadA ^e - und YadA ^p -Varianten in den WA(pYXO8-x)-Stämmen in Außenmembranproteinpräparationen.....	70
Abbildung 4.4: Immunoblot zum Nachweis der Lokalisation der YadA ^e - und YadA ^p -Varianten in den WA(pYXO8-x)-Stämmen in Außenmembranproteinpräparationen.....	71
Abbildung 4.5: Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von YadA der WA(pYVO8-x)-Stämme.....	72
Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der drei Phasen des biphasischen PEG-Dextran-Gemisches.....	73
Abbildung 4.7: Relative Verteilung <i>yadA</i> -produzierender WA(pYVO8-x) Stämme in einem biphasischen PEG-Dextran System.....	75
Abbildung 4.8: Hydropathie-Plots nach Kyte & Doolittle für YadA ^e AS25-333 (A) und YadA ^p AS25-345 (B).....	76

Abbildung 4.9: Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisiertes Kollagen Typ I (A) und Kollagen Typ IV (B).	79
Abbildung 4.10: Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisiertes Laminin.	80
Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der modularen Strukturen von Plasmafibronektin (pFn) und pFn-Fragmenten.	81
Abbildung 4.12: Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisiertes pFn (A) und immobilisierte FN-III7-10-Fragmente (B).	82
Abbildung 4.13: Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisierte FN-II-9- (A) und FN-II-5-Fragmente (B).	83
Abbildung 4.14: Inhibierung der Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisiertes Kollagen Typ I (A) und (POG) ₁₀ (B) durch Vorinkubation der Yersinien mit ansteigender Konzentration von FN-II-5.	84
Abbildung 4.15: Inhibierung der Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisiertes FN-II-5 durch Vorinkubation der Yersinien ansteigender Konzentration von Kollagen Typ I (A) und (POG) ₁₀ (B).	85
Abbildung 4.16: Histogramme der Autoagglutinate der WA(pYVO8-x)-Stämme.	88
Abbildung 4.17: FSC-Mittelwert der WA(pYVO8-x)-Stämme.	89
Abbildung 4.18: Diagramm des „gatings“ der Einzelbakterien und der kollagenbindenden Einzelbakterien Anhand der Stämme YadA ^e -0, YadA ^e und YadA ^e -HY.	92
Abbildung 4.19: Repräsentative durchflusszytometrische Diagramme von WA(pYVO8-x) der Alexa488-konjugten Kollagen Typ-I Bindung.	94
Abbildung 4.20: Prozentuelle Angabe aller kollagenbindenden Einzelbakterien der WA(pYVO8-x)-Stämme.	95
Abbildung 4.21: MFI der Einzelbakterien (A) bzw. der kollagenbindenden Einzelbakterien (B).	96
Abbildung 4.22: Darstellung der Dy647-(POG) ₁₀ -Bindung (0,1 µg/ml) im Durchflusszytometer und des „gatings“.	99
Abbildung 4.23: Darstellung der Dy647-(POG) ₁₀ -Bindung (10 µg/ml) im Durchflusszytometer und des „gatings“.	100
Abbildung 4.24: Prozentuelle Angabe aller Dy647-(POG) ₁₀ -bindenden Einzelbakterien im Durchflusszytometer.	101
Abbildung 4.25: Prozentuale MFI-Werte der Einzelbakterien für die Bindung von Dy647-(POG) ₁₀	102
Abbildung 4.26: Vergleich der MFI der Einzelbakterien bei der Bindung von Dy647-(POG) ₁₀	103

Abbildung 4.27: Prozentuelle Angabe aller kollagenbindenden Einzelbakterien im Durchflusszytometer.	104
Abbildung 4.28: Repräsentative Diagramme der MFI-Werte mittels Durchflusszytometer in Bezug auf die Alexa488-Kollagenbindungskapazität bei zunehmender (POG) ₁₀ -Konzentration.	106
Abbildung 4.29: MFI-Werte aller Alexa488-Kollagen-bindenden Einzelbakterien bei der Inhibierung der Kollagenbindungskapazität durch (POG) ₁₀	107
Abbildung 4.30: Darstellung der Bindung von pFn und cFn an unterschiedliche WA(pYVO8-x)-Stämme in Suspension im Fluoreszenzmikroskop.	109
Abbildung 4.31: CFU ausgewählter Organe vier Tage nach oraler Infektion von Balb/C-Mäusen.	113
Abbildung 4.32: Median der CFU-Werte von Leber und Milz 72 Stunden nach ip Infektion von Balb/C-Mäusen mit WA(pYVO8-x)-Stämmen.	115
Abbildung 4.33: Durchschnitt der CFU-Werte von Leber und Milz 72 Stunden nach ip Infektion von Balb/C-Mäusen mit WA(pYVO8-x)-Stämmen.	116
Abbildung 4.34: Gewichtsverlust der Versuchstiere nach ip Infektion.	119
Abbildung 5.1: Vergleich der ersten 90 AS der YadA-Varianten YadA ^e , YadA ^e ₃₈ , YadA ^e ₄₇ , YadA ^e ₅₇ , YadA ^e ₈₁ und YadA ^e ₁₈₈	122
Abbildung 5.2: Vergleich der ersten 120 AS der YadA-Varianten YadA ^p , YadA ^p ₄₄ , YadA ^p ₈₅ und YadA ^p ₉₅	123
Abbildung 5.3: Grafische Darstellung der Bindung zweier Yersinien mittels YadA (modifiziert nach (Hoiczky et al, 2000). Nicht-maßstabsgetreue Darstellung.	125
Abbildung 5.4: Drei mögliche Bindemodelle an immobilisiertes Kollagen (ECM-Protein) im ELISA-Aufbau.	126
Abbildung 5.5: Sequenzvergleich der CBD von YadA ^e (AS58-188, oben) und YadA ^p (AS96-226, unten).	127
Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der verschiedenen, potentiellen Bindungsstellen für Kollagen Typ I in YadA.	133
Abbildung 5.7: Aminosäuresequenzvergleich der AS26-57 (NTTD) von YadA zweier <i>Y. enterocolitica</i> O:8 Stämme.	136
Abbildung 5.8: Schematische Darstellung der Bindungsstellen für Fibronektin und Laminin in YadA.	139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Einteilung von <i>Y. enterocolitica</i> in Subspezies und Biovare	4
Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	30
Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete <i>Yersinia</i> Stämme.....	30
Tabelle 2.3: In dieser Arbeit erstellte und verwendete Stämme.....	31
Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika	34
Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete Geräte.....	35
Tabelle 2.6: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.....	36
Tabelle 2.7: In dieser Arbeit verwendete Enzyme	37
Tabelle 2.8: In dieser Arbeit verwendete Proteine und Peptide.....	38
Tabelle 2.9: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.....	39
Tabelle 2.10: In dieser Arbeit erstellte und verwendete Primer (SacI-Schnittstelle ist unterstrichen).....	40
Tabelle 2.11: In dieser Arbeit verwendete molekularbiologische Kits	41
Tabelle 3.1: PCR-Reaktionsprogramm für die DreamTaq-Polymerase.....	47
Tabelle 3.2: PCR Reaktionsprogramm für die Phusion Flash High Fidelity Polymerase	47
Tabelle 3.3: Verwendete Puffer und Lösungen für die Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	55
Tabelle 4.1: Errechnetes Molekulargewicht der YadA-Varianten. Die untersuchten Stämme sind in Kurzform YadA ^c _i bzw. YadA ^p _i gekennzeichnet.....	69
Tabelle 4.2: Relative Verteilung der untersuchten Stämme in einem biphasischen PEG-Dextran-System und errechneter pI-Wert und Gravy-Index.....	74
Tabelle 4.3: Modifizierter Aggregationstest nach Laird & Cavanaugh (1980) der WA(pYVO8-x)-Stämme und Stamm WAc.	87
Tabelle 4.4: Prozentuelle Angabe aller Einzelbakterien bei der Messung der Alexa488-Kollagenbindung von Yersinien im Durchflusszytometer.....	97
Tabelle 4.5: Alexa488-Kollagen-bindende Einzelbakterien und MFI-Werte der Alexa488-Kollagen-bindenden Einzelbakterien bezogen auf den MFI-Wert von Stamm YadA ^c	105
Tabelle 4.6: Median der CFU von fünf Versuchstieren von Dünndarminhalt, PP und Milz vier Tage nach oraler Infektion mit 10 ⁹ Bakterien.	111
Tabelle 4.7: CFU/g in Leber und Milz 72 Stunden nach ip Infektion mit 5 x 10 ⁴ Bakterien.	114

Tabelle 4.8: Veränderung des Körpergewichts der BALB/c-Mäuse nach ip Infektion über die gesamte Versuchsdauer von 72 Stunden.....	118
---	-----

Abkürzungsverzeichnis

488-Koll I	Alexa Fluor 488-markiertes Kollagen Typ I
Ail	Attachment invasion locus
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
C4bP	C4-Binde-Protein
C-terminal	Carboxy-terminal
Cb	Carbenicillin
CBD	Collagen-Binding-Domain (Kollagenbindedomäne)
CFU	Colony forming unit
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
dest.	destiliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eib	<i>Escherichia coli</i> immunoglobulin-binding protein
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	Et alteri: und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales bovines Serum
FH	Komplement-Faktor H
FSC	Forward-scatter
FITC	Fluorescein Thiocyanat
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	Guanidine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GTPase	Guanosintriphosphat-Phosphatase
HPI	High pathogenicity island
Ig	Immunoglobulin
Inv	Invasin
	XI

Abkürzungsverzeichnis

kb	Kilobasenpaare
Kn	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOI	Multiplicity of infection
Myf	Mucoid <i>Yersinia</i> factor
N-terminal	Amino-terminal
NTTD	N-terminale Tip-Domäne
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Pondus hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration in einer wässrigen Lösung
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PP	Peyersche Plaques
pYV	<i>Yersinia</i> virulence plasmid
R	resistent
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Dünndarm (Englisch: small intestine)
Sp	Spectinomycin
sp.	spezies
SSC	Side Scatter
T-III-SS	Typ-III-Sekretionssystem
T-V-SS	Typ-V-Sekretionssystem
TAA	Trimere Autotransporter-Adhäsine
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
Usp	Ubiquitous surface protein
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsine A
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
YpkA	<i>Yersinia</i> protein kinase
Ysc	Yop secretion
Yst	<i>Yersinia</i> stable toxin

Zusammenfassung

Yersinia enterocolitica und *Yersinia pseudotuberculosis* sind zwei humanpathogene *Yersinia*-Arten, welche hauptsächlich durch orale Aufnahme Infektionen des Darmtrakts beim Menschen und Nagern verursachen. Ein entscheidender Pathogenitätsfaktor für die orale Infektion von *Y. enterocolitica* im Mausmodell ist das *Yersinia* Adhesin A (YadA). YadA ist ein multifunktionelles Protein, das neben Serumresistenz und Autoagglutination auch für die Bindung an Extrazelluläre-Matrix-Proteine (ECM-Proteine) und Zellen verantwortlich ist. Die Bindung von ECM-Proteinen im Kontext bakterieller Pathogenität ist seit vielen Jahren bereits Bestandteil der mikrobiologischen Forschung, da vor allem pathogene Bakterien häufig mit ECM-Proteinen interagieren. Auch die Bindung von Kollagen, Fibronectin und Laminin durch YadA wurde in dieser Hinsicht bereits untersucht. Dabei konnte die Kopfdomäne von YadA als entscheidend für die Interaktion mit diesen ECM-Proteinen festgestellt werden. Jedoch konnten bisher weder ein genaues Aminosäuresequenzmotiv für die ECM-Bindung identifiziert noch der Zusammenhang zwischen ECM-Bindung und Virulenz gezeigt werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bindestellen für und das Bindevverhalten von ECM-Proteinen (Kollagen, Fibronectin und Laminin) bei YadA im Bereich der N-terminalen Tip-Domäne (NTTD) von *Y. enterocolitica* WA314 (YadA^c) und *Y. pseudotuberculosis* YPIII (YadA^p) näher zu charakterisieren und einen Zusammenhang zur Virulenz im Mausmodell zu untersuchen.

Um diese Zielsetzung zu erreichen, wurden verschieden große Deletionen im NTTD Kopfbereich von YadA^c und YadA^p durchgeführt und über homologe Rekombination in den WA314 $\Delta yadA$ (WA(pYVO8-x)) Hintergrundstamm eingeführt. Die Produktion und korrekte Lokalisation der YadA-Varianten wurde in allen Stämmen überprüft. Der Einfluss, der YadA-Varianten auf die Autoagglutination und die Oberflächenhydrophilie in den WA(pYVO8-x) Stämmen, wurde mittels Verteilung der Bakteriensuspension im PEG-Dextran-Biphasensystem untersucht und die unterschiedlichen Stämme näher charakterisiert. Anschließend wurden mit immobilisiertem Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und definierten Fibronectinfragmenten die unterschiedlichen YadA-Varianten-Stämme auf ihre Bindungsfähigkeit hin untersucht. N-terminale Deletionen im Bereich der NTTD Kopfdomäne führten bei YadA^c und YadA^p zu einem veränderten Bindungsverhalten für ECM-Proteine. Um die Bindungskapazität für Kollagen Typ I und das synthetische

Kollagen-Mimetikum (POG)₁₀ zu untersuchen, wurden die YadA-Varianten-Stämme in Suspension mit fluoreszenzmarkierten ECM-Proteinen inkubiert und die gemittelten Fluoreszenzintensitäten der Einzelbakterien mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Deletionen im Bereich der NTTD die Bindungskapazität beeinflussen. Um die Bindestellen für Kollagen im Kopfbereich von YadA näher zu bestimmen, wurden zudem Inhibierungsversuche mit (POG)₁₀ und fluoreszenzmarkiertem Kollagen Typ I im Durchflusszytometer durchgeführt. Aus den Versuchen zur Bindungsfähigkeit und den Versuchen zur Bindungskapazität konnten die Bindestellen für Kollagen Typ I, (POG)₁₀, Laminin und Fibronectin im Kopfbereich von YadA^e und YadA^p näher charakterisiert und bestimmte N-terminale Regionen für diese Bindestellen identifiziert werden.

In Mausvirulenzversuchen konnte nachgewiesen werden, dass eine Verkürzung der NTTD bei YadA^e zu einer sukzessiven Attenuierung der Mausvirulenz führt. Bei YadA^p führten kurze Deletionen im Bereich der NTTD ebenfalls zu einer Attenuierung, während größere Deletionen der NTTD zu einer zum Wildtyp vergleichbaren Virulenz führten.

Eine Korrelation zwischen der Bindungsfähigkeit und -kapazität von Kollagen Typ I bzw. Fibronectin und dem Virulenzgrad der YadA-Varianten ist nicht feststellbar. Im Vergleich dazu korreliert die Lamininbindungsfähigkeit bei Deletionen der NTTD Region von YadA^e mit dem Mausvirulenzpotential: Verlust der Lamininbindung führt zur Attenuierung. Bei YadA^p oder YadA^e-HY gilt dies nicht.

Summary

Yersinia enterocolitica and *Yersinia pseudotuberculosis* are two pathogenic species of the *Yersinia* family which are able to infect the gastrointestinal tract of humans and rodents. The normal route of infection is via ingestion of contaminated food. One particularly important virulence factor for oral infections in mice is the protein known as *Yersinia* Adhesin A (YadA). YadA is a multifunctional protein responsible for serum resistance, autoaggregation and binding of the bacterium to extracellular-matrix-proteins (ECM-proteins) and cells. The connection between ECM-protein binding and bacterial pathogenicity has remained an important field of microbiological research for many years, due to the fact that a number of pathogenic bacteria interact with ECM-proteins. To expand upon these observations also the interaction of YadA with different ECM-proteins such as collagen, fibronectin and laminin was examined, and it was found that the head domain of YadA is responsible for binding of ECM-proteins. However the exact aminoacid-motif for this interaction is still unknown, and the connection between ECM-binding and virulence remains unclear. The aim of this work was therefore to identify the binding sites for collagen, fibronectin and laminin in the N-terminal tip-domain (NTTD) of the YadA head of *Y. enterocolitica* WA314 (YadA^e) and *Y. pseudotuberculosis* YPIII (YadA^p) and to clarify the connection between ECM-binding and virulence with the help of a mouse infection model.

To achieve this aim different deletion mutants of YadA^e and YadA^p were generated and integrated into a WA314 $\Delta yadA$ background via homologous recombination. The production and correct localization of the YadA-variants was verified and the influence of the YadA-variants on autoaggregation and surface hydrophobicity was investigated in a PEG-Dextran two-phase system. The characterization of the YadA-variant strains' ability to bind to immobilized collagen, fibronectin and laminin indicated that deletions in the NTTD and head domain caused significantly weaker binding in the YadA^e-variants to immobilized ECM-proteins, in contrast to the improved binding found in the YadA^p-variants. To expand upon this, the binding capacity of soluble collagen and the collagen mimetic (POG)₁₀ was examined. The fluorescence intensity of individual bacteria treated with fluorescently labelled ECM-proteins was determined in this experiment, and indicated that deletions in the NTTD have an impact on the binding capacity of collagen and (POG)₁₀. Further binding experiments

with immobilized and soluble ECM-proteins were performed and allowed the identification of the YadA head domain binding sites for collagen, fibronectin, laminin and (POG)₁₀.

Mouse infection experiments were performed and showed that shortening of the YadA^e NTTD led to a gradual attenuation of mouse virulence. While deletion of the first part of the YadA^p NTTD also led to strong virulence attenuation, further deletions of the YadA^p NTTD restored virulence to the level of wild-type YadA^p.

No direct link between the binding of collagen type I or fibronectin and the yadA-variants virulence in a mouse model of infection could be shown. In contrast a potential link between YadA^e laminin binding and virulence was observed: loss of laminin binding causes attenuation. However, this does not apply for YadA^p or YadA^e-HY.

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Yersinien sind fakultativ anaerobe, stäbchenförmige, Gram-negative Bakterien mit einem Durchmesser von 0,5-0,8 µm und einer Länge von 1-3 µm. Außer *Y. pestis* sind alle Yersinienarten bei 22-30°C beweglich, nicht jedoch bei 37°C. Die Gattung *Yersinia* umfasst derzeit 18 Arten (Hurst et al, 2011; Murray PR, 1999; Murros-Konttiainen et al, 2011a; Murros-Konttiainen et al, 2011b; Savin et al, 2014; Sedgwick & Tilton, 1971). Von diesen sind *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* humanpathogen (Wren, 2003). Schleifstein und Coleman isolierten und charakterisierten 1938 zum ersten Mal *Y. enterocolitica*. *Y. pseudotuberculosis* wurde bereits 1883 beschrieben, 1889 isoliert und die ersten humanen Infektionen durch *Y. pseudotuberculosis* 1910 von Albrecht beschrieben (Brandis H., 1994). Die Einteilung der *Yersinia* Arten erfolgte zunächst auf biochemischer und später auf molekularbiologischer Grundlage (r-RNS-Sequenz Phylogenie) (Bottone, 1997). Darüber hinaus wurde durch Genomsequenzierung die genetische Verwandtschaft verglichen (Duan et al, 2014). Enteropathogene Yersinien sind im Temperaturbereich zwischen 4°C und 42°C vermehrungsfähig (Konkel & Tilly, 2000; Yehualaeshet et al, 2013).

Während *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* fast ausschließlich Infektionen des Darms nach oraler Aufnahme von kontaminierten Lebensmittel verursachen (Gastroenteritis), wird *Y. pestis* meist durch Flohbisse übertragen und verursacht schwere, systemische Infektionen. Diese können sich in Form einer Beulenpest oder der Lungenpest manifestieren. Dabei dient der Floh jedoch nur als Übertragungsvektor von Nagetieren, die das eigentliche Reservoir für *Y. pestis* darstellen (Bhunia, 2008; Perry & Fetherston, 1997; Wren, 2003). Im starken Gegensatz zur klinischen Manifestation steht die enge genetische Verwandtschaft zwischen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, nicht jedoch *Y. enterocolitica*. Die phylogenetische Aufzweigung von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* geschah wahrscheinlich bereits vor mehr als 40 Millionen Jahren, während *Y. pestis* sich erst vor ca. 40 000 Jahren aus *Y. pseudotuberculosis* entwickelte (Achtman et al, 1999; Schubert et al, 2004). *Y. pestis* entwickelte sich dabei aus dem *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O:1B. Die Gene für die Glykosyltransferasen zur Biosynthese des O-Antigens sind bei *Y. pestis* defekt, so dass *Y. pestis* nur „Rauh-LPS“ (Lipid plus Kernpolysaccharid) produzieren kann (Skurnik

et al, 2000). Typisch für pathogene Yersinien ist ihre extrazelluläre Vermehrung und Persistenz im infizierten Gewebe.

Die Gattung *Yersinia* bildet einen kohärenten Cluster in der Gamma-Unterabteilung der Proteobacteria und spaltet sich in fünf Sublinien auf. Die erste Sublinie, gebildet von *Y. enterocolitica*, trennt sich dabei noch einmal in zwei Untergruppen auf (*Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* und *Y. enterocolitica* subsp. *paleoartica*). *Y. pseudotuberculosis* bildet mit *Y. pestis* und *Y. frederiksenii* die zweite Sublinie. Die übrigen Sublinien werden von nicht humanpathogenen Yersinien gebildet (Duan et al, 2014; Ibrahim et al, 1993). Die humanpathogenen Arten haben sich nicht aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt, sondern nach ihrer Trennung gleiche oder ähnliche Virulenzfaktoren parallel aufgenommen. Dies zeigt sich auch darin, dass alle humanpathogenen Yersinien die chromosomalen Gene für Ail und Inv sowie extrachromosomal das pYV-Plasmid erworben haben (Reuter et al, 2014).

1.2 Enteropathogene Yersinien

Unter dem Begriff „enteropathogene Yersinien“ werden *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* zusammengefasst, da beide Arten in der Lage sind über die Infektion des Darms Gastroenteritis, Ileitis und/oder mesenteriale Lymphadenitis zu verursachen. Diese Krankheitsbilder werden als Yersiniose bezeichnet. Enterale Yersiniosen können sich in intestinaler und/oder extraintestinaler Form manifestieren: (1) Gastroenteritis, terminale Ileitis oder mesenteriale Lymphadenitis mit möglichen Symptomen einer Pseudoappendizitis oder (2) Septikämie mit lokalen Abszessen in Leber und Milz. Häufig wässrige und selten blutige Stühle können bei *Y. enterocolitica* beobachtet werden. Bei *Y. pseudotuberculosis* kommt dies nur selten vor. Die Inkubationszeit bei enteropathogenen Yersinien beträgt zwischen drei und sieben Tagen. Die Dauer der Symptome beträgt im Durchschnitt zehn Tage. Neben dem akuten Krankheitsbild können auch postinfektiös Manifestationen wie eine reaktive Arthritis oder eine Erythema nodosum auftreten. Das Krankheitsbild der Yersinien-induzierten Arthritis kommt gehäuft bei Patienten mit der HLA-B27-Genvariante vor (80%) (Bhunia, 2008; Bockemühl & Roggentin, 2004; Bottone, 1997; Bottone, 1999; Rosner et al, 2013; Tsubokura et al, 1989; Wren, 2003).

Yersiniosen gehören in Deutschland zu den meldepflichtigen Erkrankungen und alle Fälle müssen dem Robert-Koch-Institut übermittelt werden. Die Zahl der gemeldeten Fälle in den

letzten Jahren ist mit Ausnahme des Jahres 2011 stetig rückläufig. 2013 wurden gemäß Referenzdefinition insgesamt 2590 Erkrankungen übermittelt. Bei der geografischen Verteilung sind vor allem Thüringen, Sachsen und Sachsen-Anhalt hervorzuheben. 55% der Betroffenen sind männlich. Es ist eine starke altersspezifische Inzidenz bei Kleinkindern im Alter von ein bis drei Jahren festzustellen. Mit zunehmendem Alter geht die Inzidenz zurück und bleibt im Erwachsenenalter auf einem niedrigen Niveau. Die höchste Infektionsrate weisen männliche Kleinkinder mit einem Lebensalter von einem Jahr auf (RKI, 2014).

Kontaminierte Lebensmittel und Wasser bildet dabei die häufigste Ansteckungsquelle. Vereinzelt kann es auch zu Übertragungen durch Bluttransfusionen kommen. So konnte *Y. enterocolitica* bereits in Blutspenden nachgewiesen werden und führte über diesen Weg auch zu Infektionen, welche fatal verliefen. In seltenen Fällen kommt es auch zu Infektionen von Mensch zu Mensch (Bockemühl & Roggentin, 2004; Bottone, 1999; Leclercq et al, 2005; Stenhouse & Milner, 1982; Strobel et al, 2000). Enteropathogene Yersinien besitzen einen biphasischen Lebenszyklus und exprimieren unterschiedliche Virulenzfaktoren bei unterschiedlichen Temperaturen ($37^{\circ}\text{C}/>30^{\circ}\text{C}$). Sie sind häufiger in der Umwelt zu finden und können auch Infektionen bei unterschiedlichen Tierarten (z.B. Nagetiere oder Vögel) auslösen (Bockemühl & Roggentin, 2004; Straley & Perry, 1995; Wren, 2003). Entscheidend für die Pathogenität ist das Vorhandensein des Yersinien-Virulenzplasmids pYV, das für ein Typ-III-Sekretionssystem (T-III-SS, Injektosom) sowie zahlreiche T-III-SS-injizierbaren Effektorproteine kodiert (siehe 1.3).

1.2.1 *Yersinia enterocolitica*

Die klassische Einteilung der enteropathogenen Yersinien erfolgt durch Sero- und Biotypisierung. Einen hohen Differenzierungsgrad hat die Serotypisierung der hitzestabilen O-Antigene (im wesentlichen Lipopolysaccharid oder LPS), veraltet ist dagegen die Serotypisierung der hitzelabilen H-Antigene (im wesentlichen Flagellenantigen). Neben der Einteilung in über 57 verschiedene Serotypen wird *Y. enterocolitica* auch in sechs Biovare aufgeteilt. Dabei gibt es nichtpathogene *Y. enterocolitica* der Biovarietät 1A, die mäßig mauspathogenen Biovare 2, 3, 4 und 5 und die für Mäuse hochpathogenen Yersinien der Biovarietät 1B. Für die Mausvirulenz verantwortlich ist die „High Pathogenicity-Island“ (HPI), die für Biosynthese und Transport des Siderophors Yersiniabactin kodiert (Heesemann et al, 1993). Die wichtigste Determinante für die Pathogenität ist das pYV-Plasmid (siehe

Tabelle 1.1). Die Differenzierung nach biochemischen Eigenschaften geben auch einen Hinweis auf die Pathogenität. Bakterien des Biovars 1A sind in der Lage Salicin und Äskulin umzusetzen, Yersinien der Biovare 1B und 2-5 können dies hingegen nicht. (Bottone, 1999; Bottone & Mollaret, 1977). 2000 wurde *Y. enterocolitica* zudem in zwei Subspezies (ssp) *Y. enterocolitica* ssp *enterocolitica* und *Y. enterocolitica* ssp *paleoartica* aufgeteilt (Ibrahim et al, 1993; Neubauer et al, 2000).

Tabelle 1.1: Einteilung von *Y. enterocolitica* in Subspezies und Biovare

<i>Y. enterocolitica</i> Subspezies	Biovar	Pathogenität für Säugetiere	Virulenzfaktoren
<i>paleoartica</i>	Biovar 1A	nicht pathogen	pYV-negativ, Yersiniabactin-negativ
	Biovar 2, 3, 4 und 5	mäßig pathogen	pYV-positiv, Yersiniabactin-negativ
<i>enterocolitica</i>	Biovar 1B	mäßig-stark pathogen, letal für Mäuse	pYV-positiv, Yersiniabactin-positiv

Während die meisten Infektionen in den USA von Bakterien des Serotyps O:8 (Biovar 1B) verursacht werden, wird in Europa, Kanada und Japan der Großteil (80-90%) aller *Y. enterocolitica* Infektionen durch den Serotyp O:3 (Biovar 4) verursacht. Im Jahr 2003 konnte aber auch erstmals in Deutschland eine Infektion mit dem Serotyp O:8 bei einem Patienten mit Leberabszess nachgewiesen werden (Schubert et al, 2003). Die zweithäufigsten *Y. enterocolitica* Isolate gehören den Serotypen O:9 und O:5,27 an. Die Infektionen, die durch Serotyp O:8 ausgelöst werden, zeigen in der Regel etwas schwerere Verläufe als die Infektionen, welche durch Yersinien der Biovare 2-5 verursacht werden (Bottone, 1997; Bottone, 1999; Doyle et al, 1981; Schubert et al, 2003). Die Hauptinfektionsquelle ist kontaminiertes Schweinefleisch (z.B. Thüringer Mett). *Y. enterocolitica* konnte jedoch auch in Schafen, Kühen, Vögeln und *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 auch in Hunden nachgewiesen werden. Auch Wasser und Milch oder zum Beispiel Sandkästen können Infektionsquellen für *Y. enterocolitica* sein (Bottone, 1997; Fàbrega & Vila, 2012; Fredriksson-Ahomaa et al, 2006; Lee et al, 1990; McNally et al, 2004).

Die übliche Infektionsroute von *Y. enterocolitica* verläuft gewöhnlich nach oraler Aufnahme über den Darm und anschließend in die Peyerschen Plaques (PP) (Bottone, 1997). Die Invasion der M-Zellen („micro-fold cells“), spezielle Darmepithelzellen der PP, beginnt im peroralen Mausinfektionsmodell bereits wenige Stunden nach der Aufnahme der Yersinien und wird hauptsächlich durch den chromosomal-kodierten Virulenzfaktor Invasin vermittelt (Hanski et al, 1989a; Schulte et al, 2000). Nach wenigen Tagen ist das Gewebe der PP auf Grund der schnellen Bakterienvermehrung stark geschädigt (Autenrieth & Firsching, 1996; Hanski et al, 1989b). Auch pYV-negative *Y. enterocolitica* gelangen in die PP, werden aber anschließend schnell eliminiert, so dass es zu keiner signifikanten Vermehrung kommt (Grützkau et al, 1993; Hanski et al, 1989a; Lian et al, 1987).

1.2.2 *Yersinia pseudotuberculosis*

Die Differenzierung von *Y. pseudotuberculosis* ist ebenfalls anhand des O-Antigens möglich (Serotypisierung). Insgesamt werden hier 21 Serotypen unterschieden. Bei 26°C wird jedoch nur ein kurzes O-Antigen gebildet und bei 37°C gehen sie in Rauhstämmen über (Brubaker, 1991; Wren, 2003). Die phylogenetische Unterscheidung von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* auf der Basis der r-RNS-Sequenzen ist nicht möglich, da *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* fast identische r-RNS-Sequenzen haben. Jedoch kann *Y. pseudotuberculosis* biochemisch von *Y. pestis* unterschieden werden. Ebenso kann *Y. enterocolitica* von *Y. pseudotuberculosis* über die unterschiedlichen biochemischen Leistungen (Bunte Reihe) differenziert werden (Brubaker, 1991; Sedgwick & Tilton, 1971). Histologische Untersuchungen zeigen, dass Infektionen von *Y. pseudotuberculosis* seltener eine Enterocolitis oder terminale Ileitis verursachen hingegen häufiger eine mesenteriale Lymphadenitis (Donadini & Fields, 2007). Dabei wird, wie auch bei *Y. enterocolitica*, bei *Y. pseudotuberculosis* eine Invasin vermittelte Aufnahme über die M-Zellen der PP und eine anschließende Verbreitung in die mesenterialen Lymphknoten beobachtet. Die systemische Verbreitung ist davon jedoch nicht abhängig. Zudem gibt es bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* noch zwei weitere Adhäsine (Ail und pH6/Myf), welche die Bindung an Epithelzellen vermitteln und eine Rolle in der oralen Infektionsroute spielen sollen (Barnes et al, 2006; Marra & Isberg, 1996; Marra & Isberg, 1997).

1.3 Virulenzfaktoren enteropathogener Yersinien

Enteropathogene Yersinien besitzen ein breites Arsenal an Virulenzfaktoren, um die angeborene Immunantwort des menschlichen Körpers zu umgehen oder direkt auszuschalten. Die Gene für diese Virulenzfaktoren sind chromosomal und extrachromosomal (Virulenzplasmid pYV) lokalisiert. Neben den enteropathogenen Yersinien trägt auch *Y. pestis* dieses 70 kb große Virulenzplasmid, welches in *Y. pestis* auch als pCD1 bezeichnet wird (Heesemann & Laufs, 1983; Mikula et al, 2012; Reuter et al, 2014). Aufgrund der Vielzahl von Virulenzfaktoren werden im Weiteren nur die wichtigsten kurz angesprochen. Dagegen wird auf das pYV-kodierte Yersinia Adhäsion YadA detaillierter eingegangen, da dieser Virulenzfaktor im Mittelpunkt dieser Doktorarbeit steht.

1.3.1 Attachment Invasion Locus (Ail)

Ein chromosomal kodiertes, nicht-fimbrielles Adhäsion, welches alle enteropathogenen Yersinien besitzen, ist Ail (Gen: *ail*). Das 17 kDa große Außenmembranprotein zeigt jedoch eine höhere Zellspezifität (Rezeptor unbekannt) als Invasin (siehe 1.3.4.1) und wird für systemische Infektionen im Mausmodell nicht benötigt (Miller et al, 1990; Miller & Falkow, 1988; Miller et al, 1989; Wachtel & Miller, 1995). Ail kann über die Bindung des Komplement-Faktors H (FH) und dem C4-Bindeprotein (C4bP) Serumresistenz vermitteln (Inhibierung der Komplementaktivierung). Dafür darf Ail jedoch nicht von langkettigem Lipopolysaccharid (LPS, O-Antigen) verdeckt sein, was in *Y. enterocolitica* jedoch auf Grund der geringen Größe der extrazellulären Domänen von Ail die Regel ist. Die für die Serumresistenz und Invasion benötigten Bereiche von Ail liegen in den gleichen exponierten „loops“, umfassen jedoch größtenteils unterschiedliche Aminosäuresequenzen (Biedzka-Sarek et al, 2008a; Biedzka-Sarek et al, 2005; Bliska & Falkow, 1992; Kirjavainen et al, 2008; Miller et al, 2001). Obwohl Ail in *Y. enterocolitica* und *Y. pestis* nur eine partielle Homologie aufweist, vermittelt Ail in beiden dieselben Funktionen und ist in den entscheidenden Bereichen (exponierte „loops“) stark konserviert. Ail dürfte in *Y. pestis* jedoch aufgrund des rauhen LPS und der inaktivierten Gene für Invasin und YadA (keine Maskierung von Ail) weitaus wichtiger sein. Zudem vermittelt Ail in *Y. pestis* auch Bindung an Laminin und Fibronectin (Kolodziejek et al, 2012; Yamashita et al, 2011). In der logarithmischen Wachstumsphase wird *ail* optimal bei 30°C exprimiert. Dies ändert sich beim Eintritt in die stationäre Phase, in der die *ail*-Expression ein Maximum bei 37°C erreicht (Pierson & Falkow, 1993).

1.3.2 Die „High Pathogenicity Island“ (HPI) und Yersiniabactin (Ybt)

Bei der HPI handelt es sich um eine übertragbare, genomische Insel, die Gene für die Regulierung, Synthese und zum Transport des heterozyklischen Siderophors Ybt (MW: 482 Da) trägt. Die HPI, welche in *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* O:8 vorkommt, ist notwendig für Mausvirulenz und systemische Infektionen beim Menschen. Auch in anderen Enterobakterien wurde eine HPI nachgewiesen (Bach et al, 2000; Carniel, 2001; Carniel et al, 1992; Haag et al, 1993; Olsson et al, 2003; Schubert et al, 1998). Die Größe der HPI ist variabel. Diese umfasst bei *Y. enterocolitica* 38-43 kb, bei *Y. pestis/Y. pseudotuberculosis* hingegen mehr als 100 kb. Hier scheint jedoch nur ein ca. 35 kb großes Teilstück für die Eisenaufnahme verantwortlich zu sein. Diese Kernregion der HPI ist bei allen drei Arten hochkonserviert (Bach et al, 2000; Buchrieser et al, 1998; Carniel, 2001; Carniel et al, 1996; Perry et al, 1999; Rakin et al, 1999). Die Gene *irp1* bis *irp5* und *irp9*, welche für die Synthese von Ybt zuständig sind und durch Fur reguliert werden, befinden sich ebenso in dieser Kernregion wie das Gen für den Oberflächenrezeptor FyuA (zuständig für die Aufnahme von Ybt in die Zelle, TonB-abhängig) und *irp6* und *irp7* (Zuständig für den Export von Ybt) (Heesemann et al, 1993; Pelludat et al, 1998; Rakin et al, 1994).

1.3.3 Yersinia Typ-3-Sekretionssystem (Ysc-T-III-SS)

Viele pflanzen- und tierpathogene Bakterien besitzen ein T-III-SS zur Injektion von Effektorproteinen in die Zellen des Wirts (Bliska et al, 2013). Mehr als zwölf unterschiedliche Proteine sind am Aufbau dieses Ysc-Injektionsapparats in Yersinien beteiligt (siehe Abbildung 1.1). In humanpathogenen Yersinien werden über das Ysc-T-III-SS unterschiedliche „Yersinia outer protein“ (Yop) Effektoren (siehe 1.3.3.1) in vitro sezerniert (Heesemann et al, 1984; Heesemann et al, 1986a) und in vivo in die Wirtszelle injiziert, was zu einer Umprogrammierung der Zelle zu Gunsten des Erregers führt (Cornelis, 2002a; Cornelis, 2002b; Cornelis, 2006; Forsberg et al, 1994; Galan & Wolf-Watz, 2006; Rosqvist et al, 1991). Die „Injektionsnadel“ des Ysc-T-III-SS besteht aus einer „Proteinnadel“ und dem Translokatorkomplex (YopB/YopD), der die Nadel mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle verbindet. Der Kontakt mit der Wirtszelle löst die Injektion der Yop-Effektoren in die Wirtszelle aus (Dewoody et al, 2013a; Dewoody et al, 2013b; Galan & Wolf-Watz, 2006; Håkansson et al, 1993; Heesemann et al, 1986a; Mueller et al, 2005; Pettersson et al, 1999; Pettersson et al, 1996; Rosqvist et al, 1994). Die „Proteinnadel“ wird aus 200-300 Einheiten des Proteins YscF gebildet, ist ca. 60 nm lang und hat einen äußeren Durchmesser von 6-7

nm. Der innere Durchmesser der Nadel, welche vom Basalkörper bis ins extrazelluläre Milieu reicht, beträgt etwa 2 nm (Diepold et al, 2012; Hoiczky & Blobel, 2001).

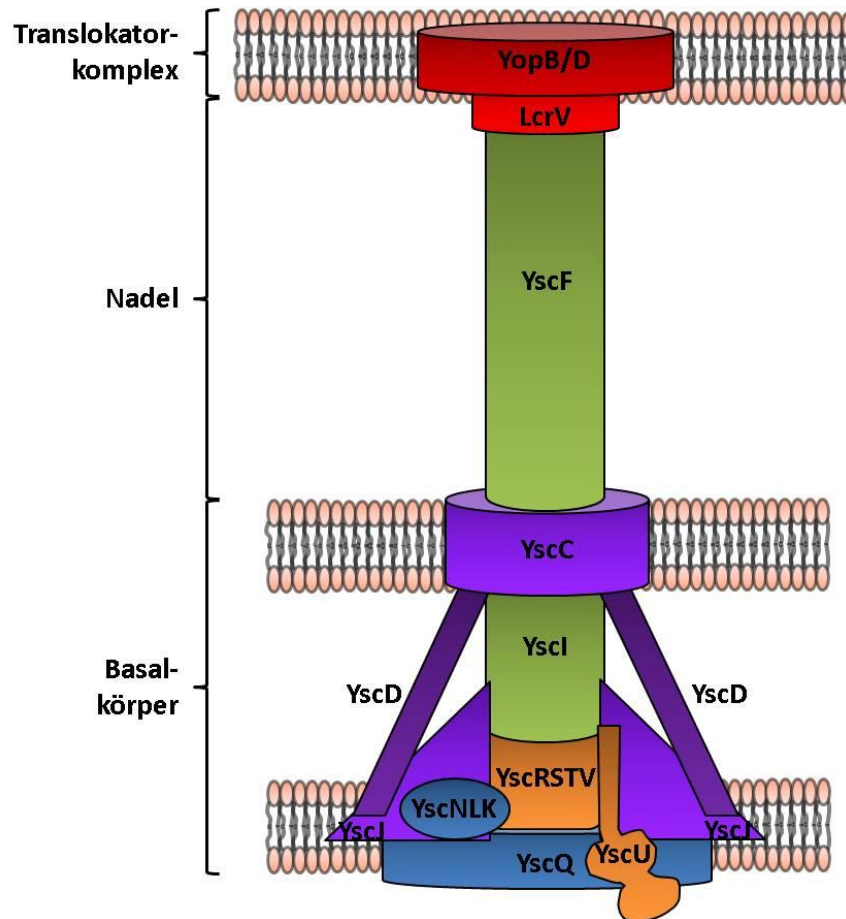


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau des Ysc-T-III-SS. Aufbau des Ysc-T-III-SS aus Basalkörper, Proteinnadel und Translokatorkomplex. Dabei reicht das Ysc-T-III-SS von der inneren Membran des Bakteriums durch die äußere Membran (Basalkörper) durch den extrazellulären Raum (Nadel) bis zur Membran der Wirtszelle (Translokatorkomplex). Durch den Injektionsapparat können die Yop-Effektoren in die Wirtszelle injiziert werden.

1.3.3.1 Yersinia Outer Protein (Yop) Effektoren

Wie bereits erwähnt, werden die Yop-Effektoren über das Ysc-T-III-SS in die Wirtszelle injiziert und stören auf unterschiedlichste Art die Erregerabwehr des Körpers (Cornelis, 2002b). Im nachfolgenden werden kurz die Grundfunktionen der sieben Yop-Effektoren beschrieben.

YopE ist ein 23 kDa großes, GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für Rho-GTP-bindende Proteine und besitzt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu eukaryotischen GAPs. Es hat einen

„Arginin-Finger“, welcher essentiell für die GAP-Aktivität ist. In vitro konnte eine Aktivierung der GTPasen RhoA, RhoG, Rac1 und Cdc42 nachgewiesen werden (Andor et al, 2001; Black & Bliska, 2000; Evdokimov et al, 2002; Roppenser et al, 2009; Scheffzek et al, 1998; Von Pawel-Rammingen et al, 2000). YopE trägt zur Inhibition der Phagozytose von Yersinien durch Makrophagen, Neutrophile und Epithelzellen bei (Grosdent et al, 2002; Ruckdeschel et al, 1996). Wenn YopE an der Innenseite der bakteriellen Zellmembran lokalisiert ist, soll YopE auch an der Regulation der Translokation von Yops beteiligt sein (Aili et al, 2008; Krall et al, 2004). **YopH** ist eine hochaktive Phosphotyrosine-Phosphatase mit einer Größe von 50 kDa (Juris et al, 2002). Durch die Dephosphorylierung unterschiedlicher Proteine in verschiedenen Zelltypen wird die Interaktion von ECM-bindenden Integrinen mit dem Aktinzytoskelett gestört (Aepfelbacher et al, 2007). Darüber hinaus unterbindet YopH die Induktion der NADPH-abhängige Produktion von „reaktiven Sauerstoffverbindungen“ (ROS, „oxidativer burst“) Makrophagen und Neutrophilen und verhindert die Expression von MCP-1, eines Makrophagen-Chemokins (Sauvonnet et al, 2002; Viboud & Bliska, 2005). Das Molekulargewicht von **YopM** variiert je nach Stamm und liegt im Bereich von 47-67 kDa (Heesemann et al, 1986b). YopM interagiert im Nucleus mit RSK1 („ribosomal s6 kinase“) und verhindert die Dephosphorylierung von RSK1, was zu einer dauerhaften Aktivierung von RSK1 führt (Hentschke et al, 2010). **YopO** (**YpkA**, für *Yersinia* protein kinase A, in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, 80 kDa) gehört zu den Serin-/Threonin-Kinasen (Galyov et al, 1993). Es besitzt eine Rac1-bindende Domäne, welche strukturell und funktionell den von GDIs (Proteine, die die Dissoziierung von GDP von GTP-bindenden Proteinen inhibieren) von Rho-GTPasen gleicht. Diese Domäne verhindert den Austausch von Nucleotiden (GDP zu GTP) in RhoA und Rac1 (Prehna et al, 2006). Die Aktivierung von YopO erfolgt durch die Bindung von monomerem G-Aktin, nicht jedoch durch fibrilläres F-Aktin (Trasak et al, 2007). Unabhängig von der Fähigkeit der Aktin-Depolymerisierung induziert YpkA Apoptose in Epithel- und Immunzellen (Park et al, 2007). Das 32,5 kDa große **YopP** (*Y. enterocolitica*) bzw. **YopJ** (*Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*) hat eine anti-inflammatorische Wirkung und fördert die Apoptose in Makrophagen (Orth, 2002). YopJ wirkt als Acetyltransferase, wobei bevorzugt Ser/Thr-Reste in MAPKKs und IKKs acetyliert werden, was zur Blockierung der Ser/Thr-Phosphorylierung führt (Mittal et al, 2006; Mukherjee et al, 2006). **YopK** (in *Y. pestis*/*Y. pseudotuberculosis* bzw. **YopQ** in *Y. enterocolitica*) reguliert die Translokation der Yops in die Wirtszelle und hat eine präventive Wirkung auf die Aktivierung des Inflammasoms (Brodsky et al, 2010; Dewoody et al, 2013b; Holmstrom et al, 1997). **YopT** (MW: 36 kDa) ist eine Cystein-Protease, die von

membranständigen, prenylierten RhoGTPasen das C-terminale prenylierte Cystein abspaltet. Dadurch wird der Aufbau des Aktinzytoskeletts gestört (Iriarte & Cornelis, 1998). Die Rho-GTPasen verlieren dadurch ihre Membranständigkeit (Shao & Dixon, 2003; Shao et al, 2002). Wahrscheinlich wirkt *Y. enterocolitica* YopT bevorzugt auf RhoA (Aepfelbacher et al, 2003).

1.3.4 Autotransporter-Adhäsine

Eine Subgruppe der nicht-fimbriellen Adhäsine bei Gram-negativen Bakterien bilden Monomere oder Trimere, die in der äußeren Membran über einen Porin-ähnlichen Anker inseriert sind. Dieser Anker ist auch für die Translokation und Oberflächenexposition der Adhäsindomäne verantwortlich. Aufgrund dieses speziellen „Autotransports“ wurde der Begriff Typ 5 Sekretionssystem (T-V-SS) eingeführt. Inzwischen wurden monomere und trimere Autotransporter beschrieben, die entweder über den C-Terminus oder den N-Terminus in der äußeren Membran verankert sind (siehe Abbildung 1.2). Deshalb wurden die T-V-SS in die Untergruppen von T-Va-SS bis T-Ve-SS eingeteilt. T-Va-SS bildet die Subgruppe der klassischen, monomären Autotransporter, welche einen C-terminalen Membrananker haben. Typ VeSS sind ebenfalls monomere Autotransporter, die jedoch N-Terminus in der Membran verankert sind (z.B. Invasin). Die Zwei-Partner-Sekretionssysteme und die fusionierten Zwei-Partner-Sekretionssysteme bilden die Subgruppe T-Vb-SS bzw. T-Vd-SS. Der Subgruppe T-Vc-SS werden die Trimeren-Autotransporter-Proteine (TAAs) zugeordnet (siehe 1.3.4.2) (Linke et al, 2006).

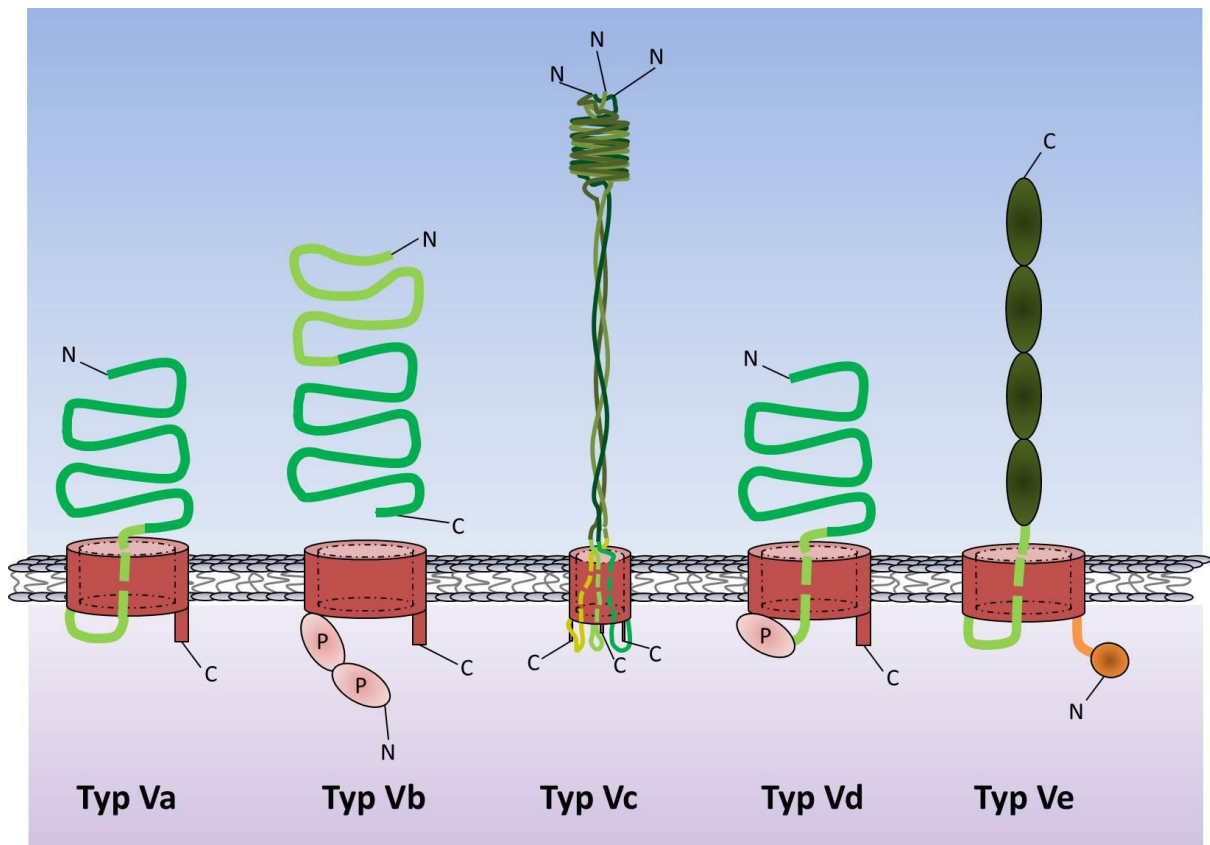


Abbildung 1.2: Typ V Autotransporter. Einteilung und schematischer Aufbau der Typ V Autotransporter (T-Vc-SS: YadA; T-Ve-SS: Invasin). Die Membranankerdomäne ist in braun dargestellt, die Linkerregion in hellem grün, die extrazellulären Domänen in dunklem grün und die intrazellulären Domänen in orange.

1.3.4.1 Invasin (InvA)

Invasin ist ein chromosomal kodiertes Adhäsins, welches an $\beta 1$ - jedoch nicht an $\beta 2$ - oder $\beta 3$ -Integrine bindet. Die Bindestelle liegt im C-terminalen Bereich, welcher sich durch Trypsin leicht von der Oberfläche abspalten lässt (Isberg & Leong, 1990; Isberg et al, 1987; Leo et al, 2012; Leong et al, 1990; Young et al, 1990). Die Sequenzen des Invasins von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind zu 77% identisch. Während das Invasin von *Y. pseudotuberculosis* (103 kDa) fünf globuläre Domänen exponiert, exponiert das Invasin von *Y. enterocolitica* (92 kDa) nur vier. Die zusätzliche Domäne D2 bei *Y. pseudotuberculosis* fördert die Homodimerisierung von Invasin und führt dadurch zu einer stärkeren Adhäsion und Invasion von Epithelzellen. Die durch Invasin vermittelte Bindung führt zu einer Dimerisierung der Integrine auf der Zelloberfläche und löst dadurch eine Signalkaskade aus, die eine Neuordnung des Aktinzytoskeletts bewirkt (Dersch & Isberg, 1999; Dersch & Isberg, 2000; Hamburger et al, 1999; Pepe & Miller, 1990). Reguliert wird die Transkription des *invA*-Gens durch das „Histone-like nucleotide structuring“-Protein (H-NS), welches als

Repressor fungiert und den Derepressor RovA. Zwischen *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* bestehen hierbei kaum Unterschiede. Die Expression des *invA*-Gens ist dabei hauptsächlich von der im Bakterium vorhandenen Menge an RovA abhängig, welches kompetitiv zu H-NS in der Promotorregion bindet (Ellison et al, 2004; Ellison & Miller, 2006; Nagel et al, 2001). Da *rovA* in vitro stärker bei 25°C exprimiert wird, ist auch die Expression von *invA* bei dieser Temperatur höher. Neben der Temperatur haben auch der pH-Wert und der Serotyp einen starken Einfluss auf die *rovA*-Expression (Pepe et al, 1994). In *Y. enterocolitica* O:3 kommt es durch eine zusätzliche Bindestelle in der Promotorregion von *invA* und einen Aminosäureaustausch in RovA zu einer konstitutiven Expression von Invasin, welche auch bei 37°C stabil bleibt (Uliczka et al, 2011). Während eine Deletion von *invA* zwar einen starken Einfluss auf die Besiedlung der PP zeigte, konnte für die Letale Dosis (LD₅₀) für Mäuse kein Unterschied zwischen Wildtyp und Deletionsmutante gezeigt werden (Pepe & Miller, 1993). Bei einer Deletion von RovA zeigt sich jedoch ein deutlicher Anstieg in der LD₅₀-Dosis in Mäusen (Revell & Miller, 2000).

1.3.4.2 *Yersinia* Adhesin A (YadA)

Da YadA zentral für die vorliegende Doktorarbeit ist, wird dieser Virulenzfaktor im folgenden Abschnitt ausführlicher beschrieben. Das Adhäsins kann in den enteropathogenen *Yersinia*-Arten *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* gefunden werden. In *Y. pestis* wird YadA auf Grund einer „frame shift“-Mutation (Deletion einer Base) nicht produziert (Skurnik & Wolf-Watz, 1989). YadA (früher Yop1 bzw. P1) vermittelt neben der Adhärenz an extrazelluläre Matrix-Proteine noch Autoagglutination und Serumresistenz. Des Weiteren stellt YadA den Kontakt zu Wirtszellen her, so dass eine Injektion der Yops über das Ysc-T-III-SS erfolgen kann. YadA ist der Prototyp der Typ Vc Sekretionssysteme (Heesemann et al, 1987; Hoiczky et al, 2000; Mikula et al, 2012).

Typ Vc Sekretionssysteme

Typ Vc Sekretionssysteme (siehe 1.3.4), welche auch „Trimeric Autotransporter Adhesins“ (TAAs) genannt werden und stets Homotrimere bilden, sind in Gram-negativen, pathogenen Bakterien weit verbreitet. Neben YadA gehören dieser Subgruppe zum Beispiel auch BadA von *Bartonella henselae*, Hia und Hsf von *Haemophilus influenzae* und UspA1 und UspA2

von *Moraxella catharralis* an. TAAs sind häufig Adhäsine und können Autoagglutination vermitteln, besitzen jedoch nie enzymatische Funktion. (Cotter et al, 2005; Hoiczky et al, 2000; Leo et al, 2012; Linke et al, 2006; Riess et al, 2004; St. Geme & Cutter, 2000).

Der Aufbau von TAAs ist stets gleich: C-terminal befindet sich ein Membrananker bestehend aus je vier β -Faltblättern der drei Monomere, welcher in einen „Stiel“ aus drei α -Helices („coiled-coil“-Struktur) und N-terminal in einen Konnektor übergeht und abschließend in der Kopfstruktur endet, welche Adhäsion und Autoagglutination vermittelt. Die Länge der unterschiedlichen TAAs kann dabei je nach Anzahl und Größe der Stiel- und Kopfelemente stark variieren. Stiel- und Kopfreion bleiben auch nach der Translokation über die äußere Membran in das extrazelluläre Milieu stets kovalent an den Membrananker gebunden. Die C-terminale Membrananker-Domäne charakterisiert die TAAs, da sie auch bei unterschiedlichen Bakteriengattungen hochkonserviert sind. Im Gegensatz dazu zeigen sich starke Unterschiede in den Aminosäuresequenzen (AS-Sequenzen) der unterschiedlichen TAAs im N-terminalen Kopfbereich (Biedzka-Sarek et al, 2008b; Hoiczky et al, 2000; Leo & Skurnik, 2011; Linke et al, 2006; Szczesny & Lupas, 2008).

Der zurzeit diskutierte Mechanismus zum Transport zur und Einbau in die äußere Membran der TAAs umfasst drei Schritte (siehe Abbildung 1.3): (I.) Zunächst wird das nicht gefaltete Protein mittels des Sec-Systems aus dem Zytosol über die innere Membran in das Periplasma transportiert. Dafür besitzen alle TAAs eine Sec-abhängige N-terminale Signalsequenz, welche nach dem Transport abgespalten wird. (II.) Im Periplasma werden die Proteine mit Hilfe von Chaperonen (SurA, Skp, DegP) in einem ungefalteten Zustand gehalten bis das C-terminale Ende des Monomers mit dem sich in der äußeren Membran befindenden Bam-Komplex interagiert, wobei die POTRA-Domänen eine „Pilotfunktion“ haben. Auch bestimmte Strukturen im Stiel helfen dabei die Proteine in einem löslichen, Transport-kompetenten Stadium zu halten. Der Bam-Komplex, bestehend aus BamA-E, löst anschließend die Trimerisierung aus und hilft dabei die β -„Faltblattpore“ in der Außenmembran herzustellen. (III.) Im letzten Schritt wird dann der ungefaltete N-terminale Teil des Homotrimers durch die Pore transportiert und nimmt abschließend im extrazellulären Raum seine natürliche Quartärstruktur an (Hartmann et al, 2009; Lehr et al, 2010; Leo et al, 2012).

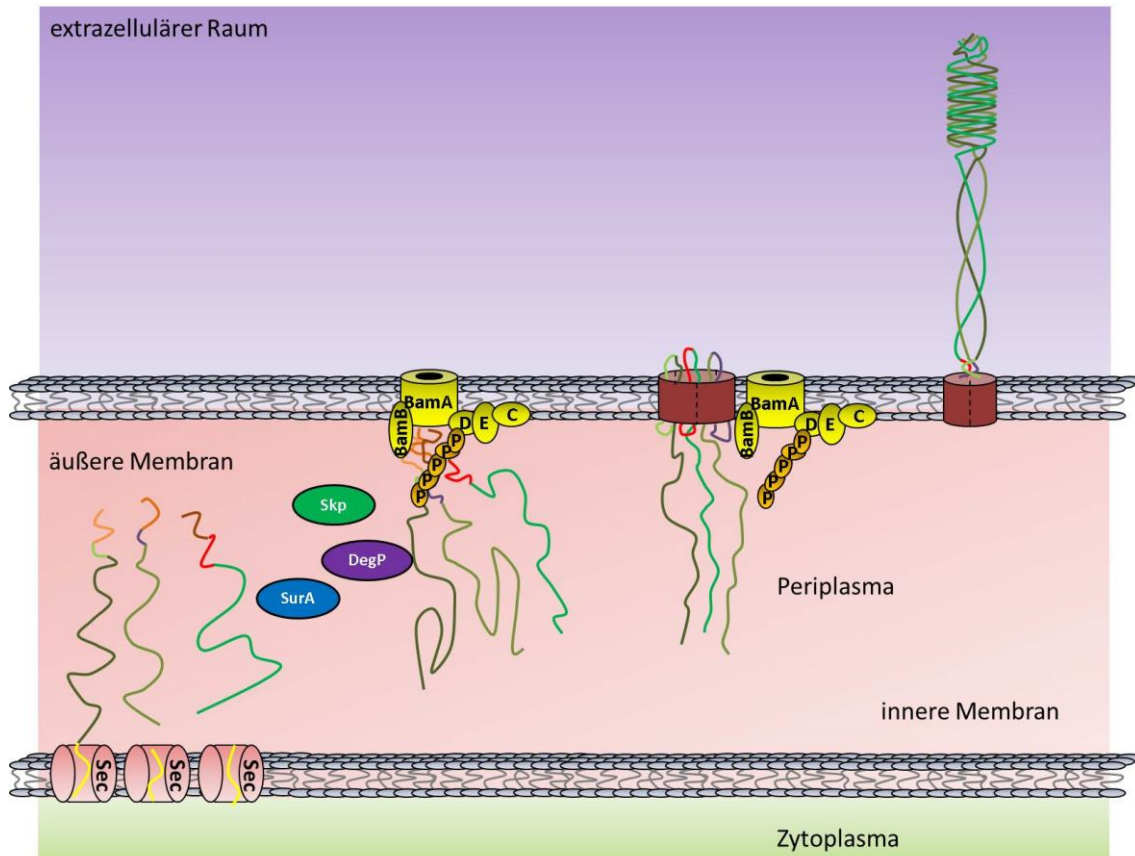


Abbildung 1.3: Diskutierter Transportmechanismus von YadA über die innere und äußere Membran in den extrazellulären Raum. Dargestellt sind die einzelnen Schritte des YadA-Transports über die innere Membran mit Hilfe des Sec-Apparats, die Trimerisierung und posttranslationale Modifikationen im Periplasma. Die Verankerung in der äußeren Membran und der Transport in den extrazellulären Raum stellen die abschließenden Schritte dar. P: POTRA-Domäne

Struktur von YadA

YadA variiert in seiner Größe Serotyp- und Speziesabhängig zwischen 422 und 455 AS. Die N-terminale Signalsequenz, welche bei allen *Yersinien* identisch ist und 25 AS umfasst, wird nach dem Transport über die innere Membran proteolytisch abgespalten (Signalpeptidasen). Es ergibt sich somit eine ungefähre Größe von 45 kDa (SDS-PAGE) für das YadA-Monomer (El Tahir & Skurnik, 2001). Das Trimer von YadA ist nach SDS-PAGE ohne vorherige Hitze-Denaturierung der solubilisierten Proben je nach Konzentration des Gels als Bande in einem Bereich von 150 bis 240 kDa anfärbbar. Das Trimer besitzt eine sehr hohe Stabilität. So ist es selbst nach kochen oder einer Behandlung mit gesättigter Harnstofflösung der solubilisierten Proben nur partiell dissoziiert (Trimere, Dimere, Monomere). Eine Änderung des pH-Wertes zwischen 5 und 10 hat keinen Einfluss auf die Stabilität des Trimers (Mack et al, 1994; Mack et al, 1991; Skurnik et al, 1984). Die Spaltung von YadA durch Proteasen ist von Serotyp zu

Serotyp unterschiedlich. Während YadA von Serotyp O:8 z.B. sensitiv gegenüber Proteinase K ist, scheinen YadA von O:3 und O:9 stabil zu sein. Mit der *S. aureus* Protease V8 lassen sich jedoch alle YadA-Serotypen proteolytisch spalten (Emödy et al, 1989).

YadA bildet eine homotrimere „Lollipop-ähnliche“ Struktur mit einer Gesamtlänge von ungefähr 23 nm (siehe Abbildung 1.4). Der 5 nm lange „Kopf“ besteht pro Monomer aus einer linksgängigen, neunfach gewundenen, parallelen β -Faltblattstruktur („ β -roll“) und ist am N-terminalen Ende (N-terminale Tip-Domäne oder NTTD) teilweise ungeordnet. C-terminal vom Kopf befindet sich eine „Halsstruktur“, welche in den Stiel übergeht. Der Stiel, welcher aus einer rechtsgängigen, trimeren „coiled-coil“-Struktur besteht, hat zusammen mit dem Halsabschnitt eine Länge von 18 nm. Er wird aus „15mer repeats“ gebildet, die sich je nach Serotyp zwischen sechs- und neunmal wiederholen (Hoiczky et al, 2000; Nummelin et al, 2004). C-terminal knüpft sich an den Stiel die sogenannte Linkerregion (α -Helix) an. Diese α -Helix verknüpft den Stiel mit der Membranankerdomäne und verschließt die Pore, die durch die insgesamt 12 β -Faltblätter der Membranankerdomäne des Trimers in der äußeren Membran entsteht. Die Membranankerdomäne ist hochkonserviert. Sie ist stark hydrophob und zeigt eine außergewöhnlich hohe Stabilität gegenüber denaturierenden Bedingungen (Tamm et al, 1993; Wollmann et al, 2006). Eine Deletion dieser Region führt zum Verlust der Fähigkeit zur Trimerisierung und somit auch zum Einbau in die Außenmembran der Bakterien. Es konnte gezeigt werden, dass die Membranankerdomäne unterschiedlicher TAAs untereinander ausgetauscht werden können, ohne deren Transporteigenschaften zu beeinträchtigen (Ackermann et al, 2008; Tamm et al, 1993; Wollmann et al, 2006).

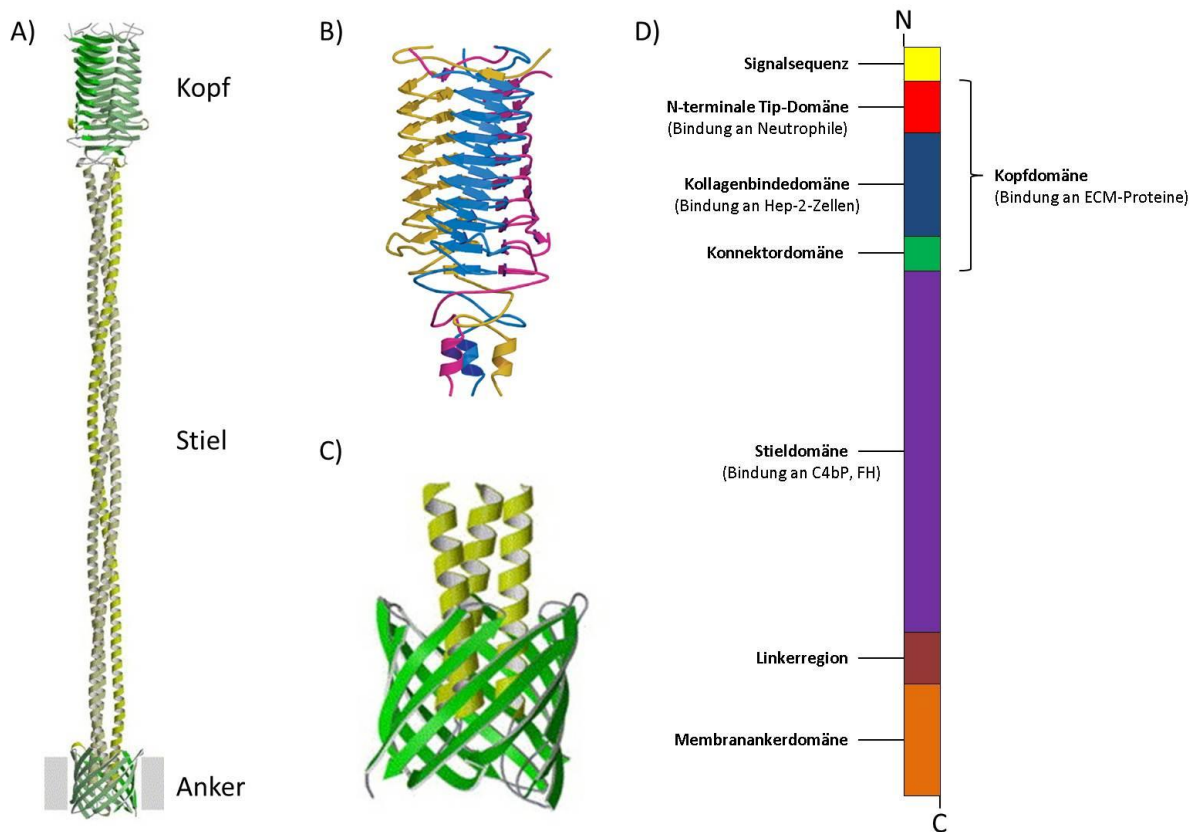


Abbildung 1.4: Struktur, Aufbau und Struktur-Funktionsbeziehung von YadA A) Modell des YadA-Trimers nach Einbau in die äußere Membran; B) Struktur des Kopfes, der Halsdomäne und des N-terminalen Teils der Stieldomäne; C) Struktur der C-terminalen Membranankerdomäne und der durch die Pore führenden Linkerregion; D) Typischer struktureller Aufbau eines YadA-Monomers (Koretke et al, 2006; Nummelin et al, 2004).

Regulation des *yadA*-Gens

Das *yadA*-Gen, welches sich auf dem 70 kb großen pYV-Plasmid befindet, wird durch Temperatur reguliert. Die m-RNA des Regulationsfaktors VirF fungiert als Thermosensor. VirF selbst ist der Regulationsfaktor der *yadA*-Genexpression. So kann bereits wenige Minuten nach Erhöhung der Temperatur von 25°C auf 37°C eine deutliche Expression von *yadA* nachgewiesen werden. Anders als die *yop*-Gene, welche sich auch auf dem pYV-Plasmid befinden und teilweise durch VirF reguliert werden, ist bei YadA keine Ca^{2+} konzentrationsabhängige Expression nachweisbar (Bolin et al, 1982; de Rouvroit et al, 1992; El Tahir & Skurnik, 2001; Skurnik & Toivanen, 1992; Zaleska et al, 1985).

Vor dem *yadA*-Gen befindet sich ein σ^{70} -Promotor, welcher in allen drei humanpathogenen Yersinienarten identisch und aktiv ist. Die Termination findet rho-unabhängig statt (Rosqvist et al, 1988; Skurnik & Wolf-Watz, 1989).

Funktionen von YadA

YadA ist ein multifunktionelles Protein (siehe Abbildung 1.4). Neben der für Adhäsine üblichen Funktion, an Zellen binden zu können, vermittelt YadA auch Serumresistenz, Autoagglutination und Bindung an extrazelluläre Matrix (ECM)-Proteine (Skurnik et al, 1984; Tamm et al, 1993; Zaleska et al, 1985).

Neben der Autoagglutination (AA) wird auch die Bindung an Kollagen vom Kopfbereich von YadA vermittelt. Deletionen in diesem Bereich führen zu einem Verlust beider Funktionen (Tamm et al, 1993). Zunächst wurde vermutet, dass die Kollagenbindung über eine spezifische AS-Sequenz im Kollagen, welche nicht durch Kollagenase beeinträchtigt wird, zustande kommt (Schulze-Koops et al, 1995). Dies wurde jedoch in einer späteren Studie wieder in Frage gestellt. Hier wurde gezeigt, dass die Trimer-Helix Struktur des Kollagens ausreichend ist, um an YadA zu binden (Leo et al, 2008). Essentiell für die Bindung von Kollagen an YadA scheint jedoch das NSVAIGXXS-Sequenzmotiv in der Kopfdomäne des YadA zu sein, welche sich achtmal wiederholt (Emödy et al, 1989; Leo et al, 2008; Schulze-Koops et al, 1995; Schulze-Koops et al, 1992; Tahir et al, 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Kopfdomäne mit der Konnektordomäne eine Funktionseinheit für die Kollagenbindung bildet (Roggenkamp et al, 2003). In einer weiteren Studie konnte zudem durch den Austausch zweier Histidinreste gegen Tyrosin im Kopfbereich (H156Y/H159Y) des YadA von *Y. enterocolitica* O:8 ein Verlust der Kollagenbindung hervorgerufen werden (Roggenkamp et al, 1995).

Die Kopfdomäne bindet neben verschiedenen Kollagen-Typen auch Laminin 1/2 und Fibronectin (Flügel et al, 1994; Heise & Dersch, 2006; Tamm et al, 1993). Auffällig bei der Bindung an Fibronectin ist, dass in Lösung zwar zelluläres Fibronectin (cFn) von YadA gebunden wird, nicht jedoch Plasmafibronectin (pFn). Bei pFn konnte stets nur die Bindung an immobilisiertes pFn, jedoch nie an pFn in Lösung nachgewiesen werden (Schulze-Koops et al, 1993; Terti et al, 1992). YadA von *Y. enterocolitica* zeigt eine schwächere Bindung an immobilisiertes pFn als YadA von *Y. pseudotuberculosis*. Dieser Unterschied wird durch eine 32 AS lange Sequenz verursacht, welche im N-terminalen Bereich des YadA von *Y. pseudotuberculosis*, nicht jedoch im YadA von *Y. enterocolitica* vorhanden ist (siehe Abbildung 4.1) (Heise & Dersch, 2006).

Die wahrscheinlich wichtigste Funktion von YadA ist die Zell-Adhäsion. Durch den YadA-vermittelten Kontakt können über das Ysc-T-III-SS Yops in die Zellen injiziert werden und

die Yersinien somit ihre volle Virulenz entfalten (Chatterjee et al, 2013; Mota et al, 2005). Die am besten untersuchte Bindung ist jene an die epitheliale Hep2-Zelllinie (Bukholm et al, 1990; Heesemann & Grüter, 1987). Während man von einer direkten Bindung an Membranrezeptoren von Hep2-Zellen ausgeht, gibt es jedoch auch Hinweise, dass die YadA-Bindung über Zell-assoziierte ECM-Proteine (Kollagen, Fibronectin) vermittelt wird (Bliska et al, 1993; Eitel & Dersch, 2002; Roggenkamp et al, 1995). Für die Bindung an polymorphonukleäre Leukozyten (PMNs, Neutrophile), welche eine wichtige Rolle in der bakteriellen Infektabwehr (angeborenes Immunsystem) spielen, ist der N-Terminus des YadA-Kopfes essentiell. Es konnte eine *Y. enterocolitica* O:8-Varinante mit einem um 81 AS N-terminal verkürzten YadA hergestellt werden, die eine stark verminderte Bindung an PMNs zeigt. Dies führt zu einer starken Attenuierung in der Mausvirulenz im Vergleich zum Wildtyp-YadA Stamm (Roggenkamp et al, 1996).

Eine weitere YadA-vermittelte Funktion ist die Serumresistenz (Balligand et al, 1985). Mehrere unterschiedliche Bereiche in der Stiel- und der Membranankerdomäne sind für die Serumresistenz verantwortlich. So führten Deletionen großer Teile des Stiels oder der Austausch des C-terminalen Bereichs des YadA zum Verlust der Serumresistenz und einer Abschwächung der Mausvirulenz von *Y. enterocolitica* Serotyp O:8. Deletionen im Kopfbereich hingegen hatten keinen Einfluss auf die Serumresistenz der Bakterien (Ackermann et al, 2008; Roggenkamp et al, 2003; Tamm et al, 1993). Durch die Bindung der Komplementinhibitoren FH und C4bP wird die Aktivierung des Komplementsystem (sowohl der klassische als auch der alternative Weg) inhibiert. Dies schützt die Bakterien vor Komplementlyse (Biedzka-Sarek et al, 2008a; Biedzka-Sarek et al, 2008b; Kirjavainen et al, 2008).

YadA ist somit ein multifunktionales nicht-fimbrielles Adhäsion und essentiell für die Mausvirulenz bei *Y. enterocolitica*. Anders ist dies jedoch bei *Y. pseudotuberculosis*. Hier führte eine Deletion des vollständigen *yadA*-Gens zu keinem signifikanten Unterschied in der Mausvirulenz (Bottone, 1997; Han & Miller, 1997; Pepe et al, 1995; Rosqvist et al, 1988).

1.4 Extrazelluläre Matrix-Proteine

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist aus unterschiedlichen Verbundstrukturen zusammengesetzt, die die für jedes Organ spezifische histologische Struktur bestimmen. Zudem dienen ECM-Proteine als mechanische Stütze und Gerüst für Adhäsion und Migration.

Die pleiotrope Wirkung der ECM beruht auf ihrer dynamischen Änderungen der molekularen Zusammensetzung und der Eigenschaft der Remodellierung, um effektiv biologische Vorgänge beeinflussen zu können. Kollagen, Fibronectin und Laminin sind die drei wichtigsten Komponenten verschiedenster ECM-Strukturen (Kostourou & Papalazarou, 2014). Die zellspezifische Expression von ECM-Genen bestimmt die normale Entwicklung des Körpers. Deshalb ist es auch nicht verwunderlich, dass Mutationen in den Genen von ECM-Molekülen zu schwerwiegenden Komplikationen in der embryonalen Entwicklung und nach der Geburt zu fatalen Erkrankungen führen können (Bateman et al, 2009). ECM-Proteine bestehen zumeist aus unterschiedlichen Domänen, welche glykosyliert sind und häufig auch Glykosaminoglykanketten enthalten. Diese Ketten sind häufig mit Sulfatresten versehen, welche eine negative Ladung des Proteins und somit der ECM zur Folge haben (Sorokin, 2010). Eine hochspezialisierte und wichtige ECM-Struktur ist die Basalmembran, welche als unterstützendes fibrilläres Netz für das Wachstum von Endothel- und Epithelzellen dient und Muskel- und Fettzellen umgibt. Die Basalmembran setzt sich aus der Basallamina und der Lamina fibroreticularis zusammen. Die Basallamina besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ IV, Lamininen, Nidogen und Perlecan (siehe Abbildung 1.5). Neben diesen vier Hauptproteinen finden sich jedoch noch über 50 weitere Glykoproteine in Basalmembranen, je nach Funktion und Ort der Basalmembran. So hat die Zusammensetzung unter anderem Einfluss auf die Einwanderung von T-Zellen, Monozyten und Neutrophilen in entzündetes Gewebe. (Paulsson, 1992; Sorokin, 2010).

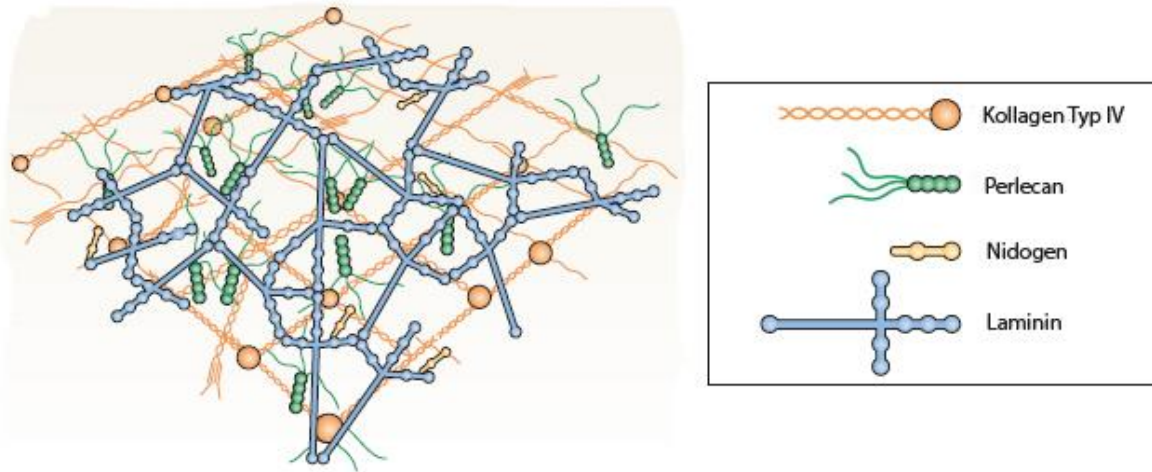


Abbildung 1.5: Aufbau der Basallamina. Die Basallamina besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ IV, Perlecan, Nidogen und unterschiedlichen Lamininen. Beim Aufbau der Basallamina vernetzen sich die unterschiedlichen ECM-Proteine und bilden somit ein dichtes Netzwerk, mit einer durchschnittlichen Dicke von 50-100 nm (Sorokin, 2010).

1.4.1 Kollagen

Mit knapp 30 % ist Kollagen das am häufigsten vorkommende Protein im menschlichen Körper. Es gibt fibrilläres, lineares Kollagen und netzförmiges Kollagen (z.B. Typ IV). Bis heute sind 46 unterschiedliche α -Ketten bekannt und die Bildung von Homo- als auch Heterotrimere sind möglich. Die Kombination der α -Ketten bestimmt den Kollagentyp. Die sezernierten und prozessierten Tripelhelices werden als Tropokollagen bezeichnet. 28 unterschiedliche Tropokollagene sind bekannt, die nach ihrem Entdeckungsdatum mit fortlaufenden, römischen Nummer versehen wurden. Aus einzelnen Tropokollagenen formen sich Fibrillen, welche im Gewebe, Knochen oder Gelenkknorpeln Netzwerke bilden (siehe Abbildung 1.6). Kollagene können sich jedoch auch in anderen Strukturen wie Netzwerken formieren. Sie dienen als Strukturproteine und können darüber hinaus noch das Zellwachstum, die Zellmodellierung und -form beeinflussen. Zudem haben sie starken Einfluss auf die Gewebedifferenzierung (Jain et al, 2014; Shoulders & Raines, 2009). Das bestuntersuchte Kollagen ist Kollagen Typ I. Die Fasern von Kollagen Typ I sind bis zu einem Zentimeter lang und ca. 500 nm dick. Eine einzelne Tripel-Helix misst weniger als zwei Nanometer im Durchmesser und ist ca. 300 nm lang (Craig et al, 1989). Ein sich häufig wiederholendes Motiv im Kollagen ist Gly-X-Y. Am häufigsten finden sich Prolin (Pro) an der X-Position und Hydroxyprolin (Hyp) an der Y-Position. Das Gly-Pro-Hyp-Motiv erhöht die thermische Stabilität von Kollagenfibrillen und ist nicht homogen über die Fibrillen verteilt (Brazel et al, 1987; Brinckmann, 2005; Ramshaw et al, 1998). 1955 wurde ein

Strukturmodell von Kollagen veröffentlicht, das bis heute Bestand hat. Dieses Modell wurde durch hochauflösende Aufnahmen von einer Kollagen-ähnlichen Tripel-Helix-Struktur 1994 bestätigt (Bella et al, 1994; Cowan et al, 1955; Rich & Crick, 1955). Die Tripelhelices falten sich im Endoplasmatischen Retikulum und Golgiapparat vom C-Terminus hin zum N-terminalen Ende. Die jeweiligen Enden dienen dabei als Erkennungsstellen für andere α -Ketten (Khoshnoodi et al, 2006). Die α -Ketten variieren in ihrer Länge zwischen 662 und 3152 AS. Durch alternatives Splicing wird die Anzahl der Ketten zudem erhöht. Des Weiteren haben auch unterschiedliche Promotoren und die proteolytische Spaltung durch Kollagenasen, die die Exposition unterschiedlicher Motive in verschiedenen Situationen erkennen, Einfluss auf die Bildung und Funktion unterschiedlicher Kollagene (Ricard-Blum, 2011). Kollagenasen sind Matrix-Metalloproteasen (MMP) und gehören zu den Zn^{2+} -Proteasen. Sie besitzen ein hochkonserviertes aktives Zentrum. Zu den Kollagenasen gehören MMP-1, -2, -8, -9 und -13. Durch die unterschiedliche Zusammensetzung aus verschiedenen α -Ketten erkennen einzelne Kollagenasen auch nur bestimmte Kollagen-Typen (Han et al, 2010; Klein & Bischoff, 2011). Kollagene binden an viele unterschiedliche Zellrezeptoren wie Integrine, „Leukocyte-associated Ig-like“-Rezeptoren 1 und 2 (LAIR-1/LAIR-2) oder „Discoidin domain“-Rezeptoren 1 und 2 (DDR1/DDR2). Die Bindung kann Rezeptorfamilien (oligo-spezifisch) oder ein bestimmtes Rezeptormitglied (mono-spezifisch) einbeziehen, je nachdem welches Motiv vom jeweiligen Rezeptor erkannt wird. Entsprechend unterschiedlich sind auch die Wirkungen, die durch die Bindung ausgelöst werden. Sie reichen von Angiogenese über Matrixremodellierung und Inflammation bis zur Proliferation mesenterialer Zellen. Kollagene spielen auch eine wichtige Rolle bei einigen Autoimmunerkrankungen als Autoantigene (Flynn et al, 2010; Heino, 2007; Ricard-Blum, 2011).

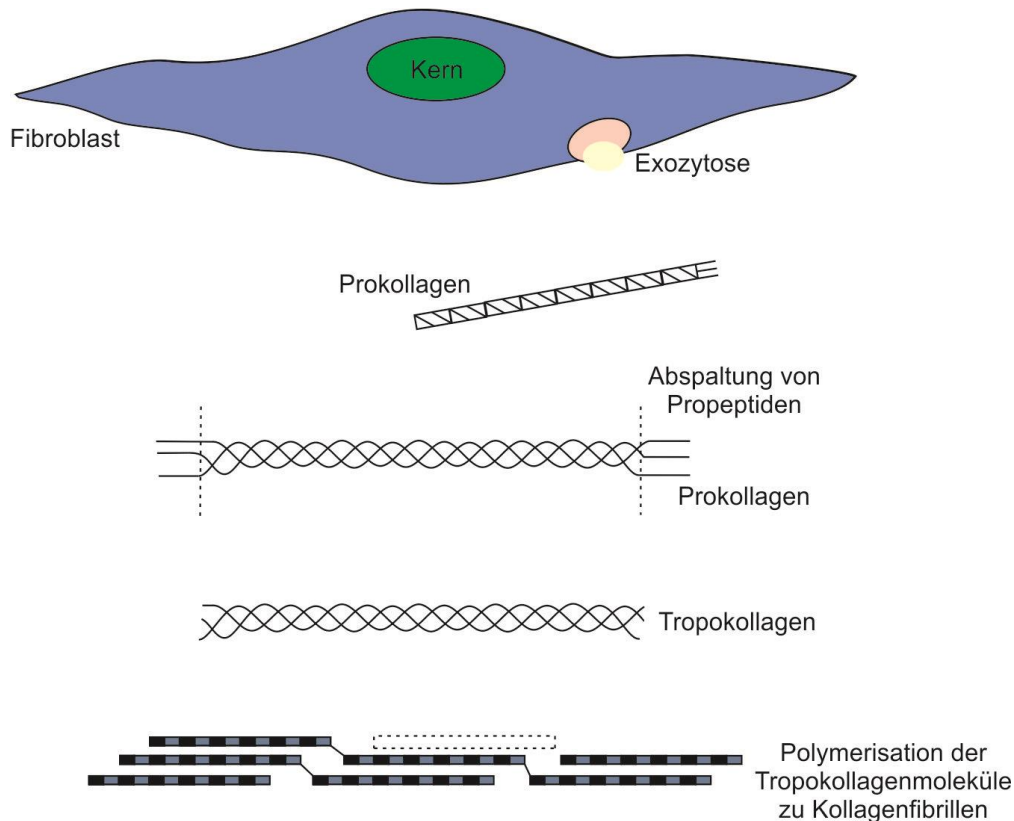


Abbildung 1.6: Kollagensekretion und Entstehung der Kollagenfibrillen. Prokollagen wird von Fibroblasten sekretiert und extrazellulär modifiziert. Anschließend erfolgt der Aufbau der Kollagenfibrillen durch Polymerisation der Tropokollagenmoleküle.

1.4.2 Fibronektin

Fibronektin, welches nur in Vertebraten vorkommt, wird in zwei Formen von Zellen sekretiert: Plasmafibronektin (pFn, produziert von Hepatozyten) und zelluläres Fibronektin (cFn, produziert z.B. von Fibroblasten). Fibronektin wird stets als Dimer sekretiert, wobei jedes Monomer 220-250 kDa groß ist (siehe Abbildung 1.7). Die Monomere werden durch zwei Disulfidbrücken am C-terminalen Ende zusammengehalten und liegen anti-parallel zueinander (Hynes, 1990; Hynes & Zhao, 2000; Mosher, 1989; Potts & Campbell, 1994; Whittaker et al, 2006). Fibronektin besitzt eine multimoduläre Struktur, welche sich hauptsächlich aus drei sich wiederholenden Domänen (FN-I, FN-II und FN-III) zusammensetzt. Dabei stellen die 15 Wiederholungen von FN-III den größten Teil des Proteins. Obwohl FN-III-Module untereinander zwar nur eine 20-40%ige Sequenzhomologie aufweisen, sind sie strukturell sehr homolog. Da die Fibronektin-mRNA nur von einem Gen transkribiert wird, welches aus 47 Exons besteht und über 90 kb groß ist, entstehen die unterschiedlichen Isoformen von Fibronektin durch alternatives Splicing (Hynes, 1990; Potts & Campbell, 1994; White et al, 2008). cFn unterscheidet sich von pFn durch das Vorkommen

des EDA- und EDB-Moduls. Fibronectin, welches EDA und EDB enthält, spielt eine wichtige Rolle während der kardiovaskulären Entwicklung im embryonal Stadium (Astrof et al, 2007). Zudem besitzt Fibronectin ein weiteres durch alternatives Splicing verursachtes IIICS-Modul („type-III connectin segment“). Es kann in einer von fünf verschiedenen Varianten (V0, V64, V89, V59 oder V120) in das Protein eingebaut werden. Die unterschiedlichen Varianten können durch verschiedene Bindestellen Aufgaben in unterschiedlichen Bereichen wahrnehmen. So haben die beiden Varianten V89 und V120 z.B. eine Bindestelle für $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, wodurch sie eine wichtige Funktion in der Hämatopoese einnehmen (Freire-de-Lima, 2014; Schofield & Humphries, 1999). Während cFn als gestreckte Fibrillen in der ECM vorkommt, ist pFn ein lösliches Dimer in der Blutzirkulation und wird von Hepatozyten sekretiert. Unter physiologischen Bedingungen nimmt pFn eine kompakte, asymmetrische Konformation an, die bei extremen pH-Bedingungen oder hohen Ionenkonzentrationen instabil wird. Diese Struktur wird durch hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb des Proteins zusammengehalten (Hynes, 1990; Lai et al, 1993; Mosher, 1989; Tamkun & Hynes, 1983). Fibronectin bindet an mindestens zwölf verschiedene Integrine. Dabei binden unterschiedliche Motive in Fibronectin an die zellulären Oberflächenrezeptoren. Das wohl am besten untersuchte Motiv ist die RGD-Bindedomäne, welches nicht nur in Fibronectin sondern in mehr als 100 weiteren Proteinen, wie dem von-Willebrand-Faktor oder Fibrinogen, vorkommt (D'Souza et al, 1991). Zudem bindet Fibronectin an weitere Moleküle wie Heparin, Kollagen/Gelatine oder Fibrin. Durch diese Bindungen spielt Fibronectin eine wichtige Rolle in der Wundheilung. Jedoch hat Fibronectin nicht nur unter physiologischen Bedingungen, sondern auch unter pathologischen Bedingungen eine essentielle Rolle in der Zelladhärenz und -migration (z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen) (Franz et al, 2010; Pankov & Yamada, 2002; White et al, 2008).

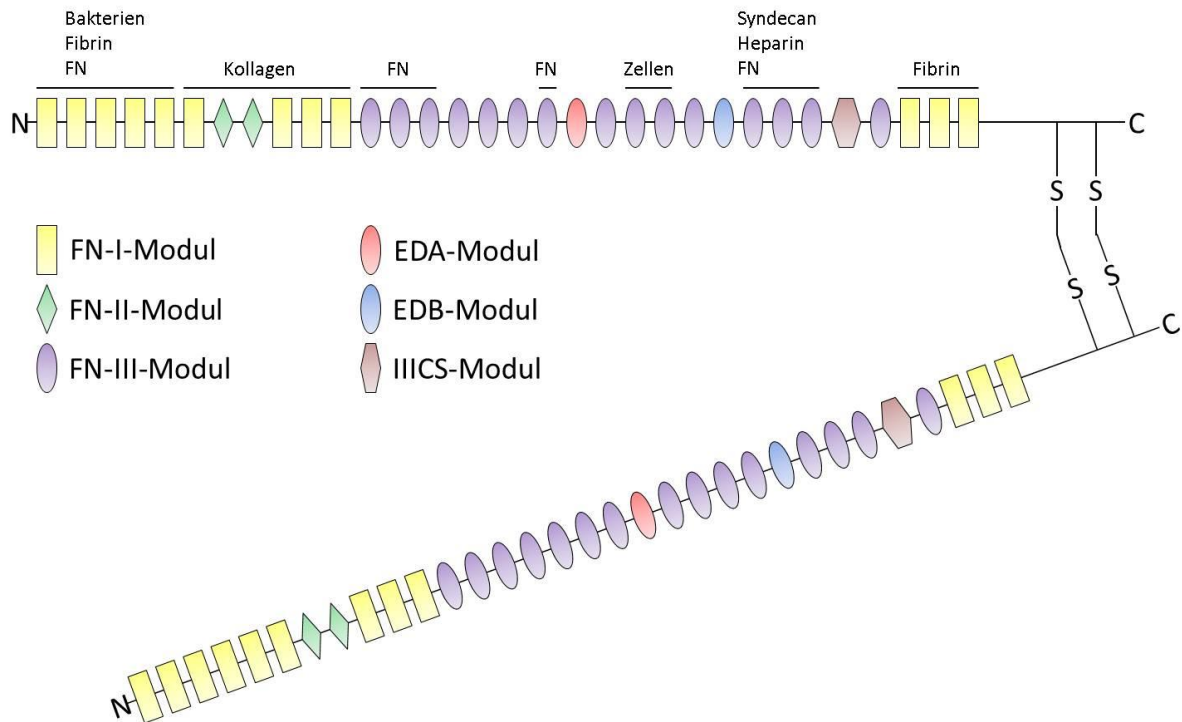


Abbildung 1.7: Schematischer Aufbau von Fibronectin. Neben den einzelnen Modulen sind auch die wichtigsten Bindestellen für ECM-Proteine, Bakterien und humane Zellen gekennzeichnet. Die für die Interaktion mit Integrin-Oberflächenrezeptoren wichtige RGD-Bindestelle findet sich im FN-III10-Modul. Beide FN-Stränge sind über Disulfidbrücken am C-Terminus miteinander verknüpft und liegen (ungleich der vereinfachten Darstellung) antiparallel zu einander.

1.4.3 Laminin

Laminine sind T- bzw. Kreuz-förmige Heterotrimere, die aus drei Ketten aufgebaut sind: einer α -Kette, einer β -Kette und einer γ -Kette (siehe Abbildung 1.8). Bisher sind fünf α -Ketten und je drei β - und γ -Ketten in Wirbeltieren bekannt. Von den rein theoretisch möglichen 45 Lamininkombinationen wurden jedoch bis heute nur 18 gefunden und beschrieben. Die einzelnen Ketten werden durch Disulfidbrücken zusammengehalten und bilden diskontinuierliche „coiled-coil“-Strukturen. Laminine haben eine Größe von 400 bis 900 kDa (Durbeej, 2010; Kostourou & Papalazarou, 2014; Tzu & Marinkovich, 2008). Kommerziell wird vor allem das aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Zelllinien gewonnene Laminin verwendet. Dieser „Lamininmix“ besteht zum Großteil aus der Isoform Laminin-111 (Hayashi et al, 2004). Laminine sind in der Regel glykosyliert und können nach Sekretion extrazellulär proteolytisch modifiziert werden, bevor sie ihre endgültige Form annehmen. Die Glykosylierung trägt stark zu ihrer Stabilisierung bei und schützt sie vor Degradation. Dabei hängt das Ausmaß der Glykosylierungen stark von der Anzahl der N-terminalen Glykosylierungsstellen ab (Champlaud et al, 2000; Durbeej, 2010; Morita et al, 1985).

Laminine besitzen mehrere Bindedomänen, welche unterschiedliche Funktionen erfüllen. Je nach verbauter Kette fallen die Domänen unterschiedlich aus. Die N-terminal gelegenen LN-Domänen sind dabei für die Verknüpfungen der Laminine untereinander verantwortlich, darüber hinaus können die LN-Domänen auch noch andere Funktionen übernehmen. Die fünf Module der LG-Domäne, welche stets aus dem C-terminalen Ende der α -Kette gebildet werden, sind für die Bindung an andere ECM-Proteine essentiell. Aber auch die Bindung an unterschiedliche Zellrezeptoren, wie z.B. Integrine, wird über diese Domäne vermittelt. Neben Integrinen gibt es drei Gruppen von Nicht-Integrin-Zellrezeptoren, an die Laminin binden kann: Dystroglycan, Syndecane und B-CAMs (Durbeej, 2010; Miner, 2008; Timpl et al, 2000). Zwar werden Laminine von einer Vielzahl von Zellen gebildet, jedoch ist die Expression und Synthese der α -Kette sehr zell- und gewebespezifisch, wodurch bestimmte Laminine nur in bestimmten Körperregionen produziert werden. Dabei können Deletionen in Laminin-Genen oder fehlerhafte Expression zu schweren Erkrankungen führen. Nur bei der Deletion des Gens der $\gamma 3$ -Kette konnte kein Phänotyp in Mäusen gezeigt werden. Laminin spielt eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung und Architektur der Basalmembran. Die Lamina densa, ein Teil der Basalmembran, besteht hauptsächlich aus Laminin und Kollagen. Des Weiteren haben Laminine Einfluss auf die zelluläre Differenzierung, Adhäsion und Migration von Zellen in Wirbeltieren (Dènes et al, 2007; Kostourou & Papalazarou, 2014; Patarroyo et al, 2002; Tzu & Marinkovich, 2008).

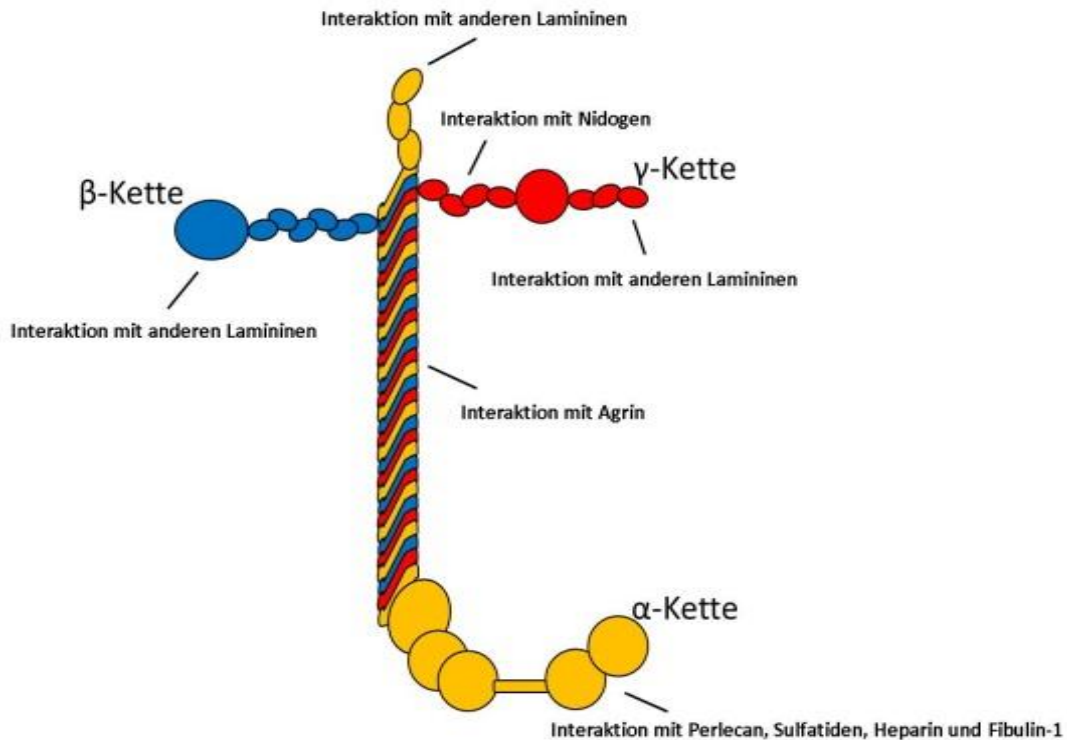


Abbildung 1.8: Schematischer Aufbau von Laminin. Ein Laminin-Molekül baut sich aus einer α -Kette, einer β -Kette und einer γ -Kette auf, die im mittleren Teil des Proteins eine „coiled-coil“-Struktur bilden. Die Seitenarme der jeweiligen Ketten können unterschiedliche Länge annehmen und haben je nach Kettenzusammensetzung unterschiedliche Funktionen.

1.4.4 ECM und bakterielle Infektionen

Die Bindung von diversen Gram-positiven und Gram-negativen pathogenen und apathogenen Bakterien an ECM-Proteinen wird seit einigen Dekaden erforscht, ohne dass im Detail die ECM-Bindung im Kontext der Pathogenität klargelegt wurde. Im nachfolgenden wird ausschließlich auf Gram-negative Bakterien und deren ECM-Bindungsfähigkeit eingegangen werden.

Neben enteropathogenen Yersinien gibt es noch weitere humanpathogene, Gram-negative Bakterien, deren Proteine eine Bindung an ECM-Proteine wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen herstellen können. Zu diesen zählen auch die enteropathogenen *E. coli* (EPEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC). Beide gehören zu den sechs traditionellen Pathotypen der humanpathogenen *E. coli*. In Entwicklungsländern gehören EPEC zu den häufigsten Auslösern von Durchfallerkrankungen bei Neugeborenen, welche unbehandelt einen fatalen Verlauf nehmen können. EHEC können neben blutigen Durchfällen auch das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) auslösen, welches zu akutem Nierenversagen und Tod führen kann (Clements et al, 2012; Nataro & Kaper, 1998; Razzaq, 2006). Bei EPEC konnte für das

H6-Flagellum Bindung für ECM-Proteine nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass das H6-Flagellum sowohl an Kollagen als auch Laminin und Fibronectin binden kann. Dem H7-Flagellum aus EHEC fehlt diese Eigenschaft (Erdem et al, 2007). In EHEC wurden jedoch eine Reihe anderer Außenmembranproteine identifiziert, wie z.B. das „Long polar fimbriae-1“-Protein (Lpf-1), die an ECM-Moleküle binden können. So konnte gezeigt werden, dass Lpf1 Kollagen, Laminin und Fibronectin bindet (Farfan et al, 2011). Auch zwei Trimere-Autotransporter, welche in EHEC produziert werden, können an ECM-Proteine binden. Während EhaB nur mit Laminin und Kollagen interagiert, bindet EhaG sowohl Kollagen, Laminin als auch Fibronectin (Totsika et al, 2012; Wells et al, 2009).

Helicobacter pylori ist ein weiteres Beispiel eines humanpathogenen Bakteriums, welches an ECM-Proteine binden kann (Übersicht: Singh et al, 2012). *H. pylori* besiedelt die Mucosa des Magens und kann Gastritis beim Menschen verursachen. Zudem ist *H. pylori* mit Magenkarzinomen assoziiert (Noto et al, 2013; Singh et al, 2012). Unter anderem produziert *H. pylori* ein 25-kDa großes Außenmembranprotein, für welches eine Bindung an Laminin gezeigt wurde (Moran et al, 2005). AlpA und AlpB vermitteln ebenfalls Lamininbindung in *H. pylori* (Senkovich et al, 2011).

1.5 Ziel der Arbeit

Die Interaktion von Bakterien mit verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix ist bereits seit Jahrzehnten Bestandteil der infektionsbiologischen Forschung. Dabei zeigte sich, dass vor allem pathogene Erreger mit Kollagen, Fibronectin und/oder Laminin interagieren können (Henderson et al, 2011; Singh et al, 2012). Auch für die enteropathogenen Yersinienarten wurde bereits vor mehr als 20 Jahren eine Bindung an diese ECM-Proteine gezeigt. Eine wichtige Rolle spielt dabei das Trimere-Autotransporteradhäsın YadA. Jedoch konnten bis heute keine exakten Bindestellen für diese ECM-Proteine in der YadA-Kopfdomäne definiert werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Bindung von YadA an Kollagen, Fibronectin und Laminin sowohl in vitro als auch in vivo näher zu charakterisieren und mögliche Bindestellen zu identifizieren. Darüber hinaus sollte der Beitrag der ECM-Bindungsfähigkeit für die Mausvirulenz näher untersucht werden. Folgende Strategien wurden angewendet, um diese Fragen zu beantworten:

1.) Im Fokus dieser Arbeit stand die N-terminale Tip Domäne (NTTD) von YadA (AS 25 bis 57 bei *Y. enterocolitica* und AS 25 bis 95 bei *Y. pseudotuberculosis*). Bei den NTTD von *Y. enterocolitica* O:8 (YadA^e) und *Y. pseudotuberculosis* SerotypIII (YadA^p) wurden schrittweise Kodondeletionen im *yadA*-Gen durchgeführt. Diese Deletionsvarianten wurden anschließend in einen YadA-negativen *Y. enterocolitica* O:8 Stamm (WA(pYVO8-YadA^e-0)) kloniert, so dass alle Versuche im selben Yersinien-Stammhintergrund durchgeführt werden konnten. In den Versuchen wurden auch die YadA-Wildtyp-Varianten WA(pYVO8-YadA^e) und WA(pYVO8-YadA^p), die YadA-Deletionsmutante WA(pYVO8-YadA^e-0) und eine *Y. enterocolitica* O:8 YadA-Mutante, bei der zwei Histidine gegen Tyrosine ausgetauscht sind (WA(pYVO8-YadA^e-HY) und welche die Bindungsfähigkeit an Kollagen verloren hat (Roggenkamp et al, 1995), verwendet.

2.) Mit den verschiedenen *Y. enterocolitica* YadA-Deletionsvarianten WA(pYVO8-YadA^e_i) (i = 38, 47, 57, 81 und 188 deletierte AS) und den *Y. pseudotuberculosis* YadA-Varianten WA(pYVO8-YadA^p_i) (i = 44, 85 und 95 deletierte AS) wurden vergleichende in vitro ECM-Bindungsexperimente (ECM-Bindungsfähigkeit/ECM-Bindungskapazität) durchgeführt. Bei den in vitro Experimenten kamen unterschiedlichste Methoden wie ELISA, Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie zum Einsatz, um sowohl die Fragestellung der Bindungsfähigkeit an immobilisierte ECM-Proteine als auch die Bindungskapazität von ECM-Proteinen von Yersinien-Suspensionen bearbeiten zu können.

3.) Abschließend wurden in zwei Mausinfektionsmodellen (in vivo Experimente) die Virulenzveränderung der YadA-Varinaten bestimmt. Dabei wurde die Virulenz sowohl nach oraler als auch intraperitonealer Infektion untersucht.

2 Material

2.1 Verwendete Stämme

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme

Stamm (<i>E. coli</i>)	Beschreibung	Referenz
DH5 α	<i>E. coli endA1 supE44 hsdR17 (r_k⁺m_k⁺) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 (ϕ80lacZΔM15)</i>	Hanahan (1983)
SM10 λ pir	<i>thi-1 thr leu tonA lacy supE recA::RP4-2-TC::Mu-Kan(λpir), Km^r</i>	Miller and Mekalanos (1988)
K12 ER2925	<i>Ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xyl-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>	New England Biolabs (Ipswich, USA)

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete *Yersinia* Stämme

Stamm (<i>Yersinia</i>)	Beschreibung	Referenz
<i>Y. enterocolitica</i> WA314	Klinisches Isolat des Serotyps O:8; Biovar 1B; trägt das Virulenzplasmids pYVO8, WA(pYVO8)	Heesemann and Laufs (1983)
<i>Y. enterocolitica</i> WA-c	<i>Y. enterocolitica</i> WA-314 ohne pYV O:8-Plasmid	Heesemann and Laufs (1983)
<i>Y. pseudotuberculosis</i> YP III (pIB1)	Serotyp III; Träger des Virulenzplasmids pIB1 (pYVOIII)	Bolin et al (1982)

2.2 Verwendete Plasmide

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit erstellte und verwendete Stämme

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pGPS:SS	pGP704 mit WA314 YadA Signalsequenz bis bp 87 und WA314 YadA Terminatorsequenz; Spectinomycinresistenzkassette aus dem Plasmid R100.1 (Prentki & Krisch, 1984)	Nägele (2010)
pYVO8	Virulenzplasmid von <i>Y. enterocolitica</i> WA 314; <i>yadA^e</i> codiert für YadA ^e	Heesemann and Laufs (1983)
pYVOIII (pIB1)	Virulenzplasmid von <i>Y. pseudotuberculosis</i> YPIII (pIB1); <i>yadA^p</i> codiert für YadA ^p	Bolin et al (1982)
pGPS-YadA ^e ₃₈	pGPS:SS mit <i>yadA^e</i> mit Deletion der Kodons 31-38 von <i>yadA^e</i> ; kodiert für YadA ^e ₃₈	diese Arbeit
pGPS-YadA ^e ₄₇	pGPS:SS mit <i>yadA^e</i> mit Deletion der Kodons 31-47 von <i>yadA^e</i> ; kodiert für YadA ^e ₄₇	diese Arbeit
pGPS-YadA ^e ₅₇	pGPS:SS mit <i>yadA^e</i> mit Deletion der Kodons 31-57 von <i>yadA^e</i> ; kodiert für YadA ^e ₅₇	diese Arbeit
pGPS-YadA ^p ₄₄	pGPS:SS mit <i>yadA^p</i> mit Deletion der Kodons 31-44 von <i>yadA^p</i> ; kodiert für YadA ^p ₄₄	diese Arbeit
pGPS-YadA ^p ₈₅	pGPS:SS mit <i>yadA^p</i> mit Deletion der Kodons 31-85 von <i>yadA^p</i> ; kodiert für YadA ^p ₈₅	diese Arbeit
pGPS-YadA ^p ₉₅	pGPS:SS mit <i>yadA^p</i> mit Deletion der Kodons 31-95 von <i>yadA^p</i> ; kodiert für YadA ^p ₉₅	diese Arbeit
pYVO8-YadA ^e -0	pYVO8, $\Delta yadA^e$, Kanamycin-Kassette inseriert in die PstI Schnittstelle des <i>yadA^e</i> durch homologe Rekombination	Roggenkamp et al (1995)
pYVO8-YadA ^e	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA^e</i> , Komplementationsmutante von Wildtyp <i>yadA^e</i> ; kodiert für YadA ^e	Roggenkamp et al (1995)

pYVO8-YadA ^e -HY	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA</i> ^{e-2} ; kodiert für YadA ^{e-2} ; Austausch zweier Histidine gegen Tyrosin an Position 156 und 159	Roggenkamp et al (1995)
pYVO8-YadA ^e ₃₈	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA</i> ^{e₃₈} ; kodiert für YadA ^{e₃₈} (YadA ^{e_{Δ31-38}})	diese Arbeit
pYVO8-YadA ^e ₄₇	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA</i> ^{e₄₇} ; kodiert für YadA ^{e₄₇} (YadA ^{e_{Δ31-47}})	diese Arbeit
pYVO8-YadA ^e ₅₇	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA</i> ^{e₅₇} ; kodiert für YadA ^{e₅₇} (YadA ^{e_{Δ31-57}})	diese Arbeit
pYVO8-YadA ^e ₈₁	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA</i> ^{e₈₁} ; kodiert für YadA ^{e₈₁} (YadA ^{e_{Δ31-81}})	Roggenkamp et al (1996)
pYVO8-YadA ^e ₁₈₈	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA</i> ^{e₁₈₈} ; kodiert für YadA ^{e₁₈₈} (YadA ^{e_{Δ31-188}}),	Roggenkamp et al (2003)
pYVO8-YadA ^p	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA</i> ^p , Komplementationsmutante von Wildtyp <i>yadA</i> ^p ; kodiert für YadA ^p	(Untiet, 2013)
pYVO8-YadA ^p ₄₄	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA</i> ^{e₄₄} ; kodiert für YadA ^{e₄₄} (YadA ^{p_{Δ31-44}})	diese Arbeit
pYVO8-YadA ^p ₈₅	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA</i> ^{p₈₅} ; kodiert für YadA ^{p₈₅} (YadA ^{p_{Δ31-85}})	diese Arbeit
pYVO8-YadA ^p ₉₅	pYVO8-YadA ^e -0 mit integriertem <i>yadA</i> ^{p₉₅} ; kodiert für YadA ^{p₉₅} (YadA ^{p_{Δ31-95}})	diese Arbeit

2.3 Bakteriophile Nährmedien

LB-Medium:	10 g	Natriumchlorid
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Trypton, pH 7,4-7,5
ad	1000 ml	H ₂ O _{dest}

Medium wurde bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

LB-Agar:	15 g	Agar
ad	1000 ml	LB-Medium

Medium wurde bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

Einfriermedium:	30 ml	Glycerin (sterilfiltriert)
	70 ml	LB-Medium (steril)

SOB-Medium:	20 g	Trypton, pH 7,4-7,5
	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	Natriumchlorid
	250 mM	Kaliumchlorid
ad	1000 ml	H ₂ O _{dest}

Medium wurde bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

SOC-Medium:	20 mM	Glucose (sterilfiltriert)
ad	1000 ml	SOB-Medium (steril)
BHI-Medium:	37 g	Brain-Heart-Infusion (BHI)
ad	1000 ml	H ₂ O _{dest}
RPMI 1640		Invitrogen, Karlsruhe

2.4 Verwendete Antibiotika

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Lösungsmittel
Ampicilin	10 mg/ml	100 µg/ml	H ₂ O _{dest}
Chloramphenicol	2 mg/ml	20 µg/ml	70 % Ethanol
Kanamycin	5 mg/ml	50 µg/ml	H ₂ O _{dest}
Nalidixinsäure	6 mg/ml	60 µg/ml	0,5 m NaOH
Spectinomycin	5 mg/ml	50 µg/ml	H ₂ O _{dest}
Tetrazyclin	2 mg/ml	20 µg/ml	70 % Ethanol

2.5 Geräte

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius 1801	DWS (Elk Grove, USA)
Blotdokumentationsgerät	GelDoc XR+ System	Bio-Rad (München)
Brutschrank	Typ B-20	Hereaus (Hanau)
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	BD Bioscience (Heidelberg)
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (München)
Elektroporationsgerät	MicroPulser	Bio-Rad (München)
Feinwaage	440-35N	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Fluoreszenzmikroskop	BX61	Olympus (Tokyo, Japan)
Geldokumentationsgerät	GelDoc EQ	Bio-Rad (München)
Kühlzentrifuge	3K30	Sigma (Osterode)
Nano-Drop	ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB (Erlangen)
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved 0,1 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter	DIGITAL pH-Meter	Bachofer (Reutlingen)
Photometer	Ultrospec 3000	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Plattenphotometer	SUNRISE	TECAN (Männedorf, Schweiz)
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	B. Braun Biotech international
Schwingmühle	MM2000	Retsch (Haan)
Semi-Dry Blot-Apparatur	Trans Blot SD	Bio-Rad (München)
Stromquelle	Power Pac 200	Bio-Rad (München)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschall-Applikator	Sonifier 250	Branson (Danbury, USA)
Ultrazentrifuge	Optima TL Ultracentrifuge	Beckman Coulter (Pesadena, USA)

2.6 Chemikalien

Tabelle 2.6: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Chemikalie	Quelle/Firma
1 kb Plus DNS-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
1,2-Phenylenediamin Dihydrochlorid (OPD, 2 HCl) Tabletten	Dako (Glostrup)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid-N, N-Methylen-Bisacrylamid	Serva (Heidelberg)
Agar	BD Bioscience (Heidelberg)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Alexa488 Succinimidyl Ester	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammonium-Persulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
BD FACS Clean	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Flow	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Shutdown solution	BD Bioscience (Heidelberg)
Blutagarplatten	Oxoid (Hampshire, UK)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
BSA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Coomassie Brilliant Blue™ R250	Merck (Darmstadt)
DAPI	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dextran (<i>Leuconostoc</i> spp.) M _r 450,000-650,000	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
ECL Western Blotting Reagenz	GE Healthcare (Freiburg)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FCS	Invitrogen (Karlsruhe)
Folin-Ciocalteu's Reagenz	Fluka (Neu-Ulm)
Gentamicin	AppliChem (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Hefe-Extrakt	MP Biomedical (Ohio, USA)

Immersionsöl	Zeis (Jena)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Polyethylenglykol PEG 6000	Serva (Heidelberg)
SDS	Serva (Heidelberg)
Spectinomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TEMED	BIOMOL (Hamburg)
Tetracyclin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tween 20	Serva (Heidelberg)
VectaShield (DAPI-Mounting Medium)	Vector laboratories (Burlingame, USA)

2.7 Enzyme

Tabelle 2.7: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzym	Verwendung	Quelle/Firma
alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP)	Dephosphorylierung von DNA	Thermo Scientific (Waltham, USA)
DreamTaq DNA Polymerase	Amplifizierung von DNA	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Phusion Flash II DNA Polymerase	Amplifizierung von DNA	Thermo Scientific (Waltham, USA)
SacI-Restriktionsenzym	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten mit einer SacI-Schnittstelle	Thermo Scientific (Waltham, USA)
T4-Ligase	Ligation von DNA-Fragmenten	Thermo Scientific (Waltham, USA)

2.8 Proteine und Peptide

Tabelle 2.8: In dieser Arbeit verwendete Proteine und Peptide

Protein	Quelle/Firma
Kollagen Typ I	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kollagen Typ IV	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Laminin aus Basalmembran von Engelbreth-Holm-Swarm murinen Sarkom	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Fibronectin aus humanem Plasma (pFn)	Calbiochem, Merk Millipore (Darmstadt)
zelluläres Fibronectin von humanen Vorhaut-Fibroblasten (cFn)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
bovines Kollagen Typ I (Purecol)	Advanced Biomatrix (San Diego, USA)
bovines Alexa488-konjugiertes Kollagen Typ I (Alexa488-konjugiertes Kollagen Typ I)	diese Arbeit
(Pro-Hyp-Gly) ₁₀ , (POG) ₁₀	Genaxxon bioscience (Ulm)
Dy647-konjugiertes (POG) ₁₀ (Dy647-(POG) ₁₀)	Peptides&elephants (Potsdam)
Fibronectinfragment FN-I1-5	Ohashi and Erickson (2005)
Fibronectinfragment FN-I1-9	Ohashi and Erickson (2005)
Fibronectinfragment FN-III7-10	Takahashi et al (2007)
Fibronectinfragment FN-III7-10RGE	Takahashi et al (2007)
Fibronectinfragment FN-III7-10ΔRGD	Takahashi et al (2007)

2.9 Antikörper

Tabelle 2.9: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Quelle/Firma
Anti-YadA-Antikörper 8D1 (monoklonal, Maus)	WB (1:10000), ELISA (1:10000), IFM (1:500)	Roggenkamp et al (2003)
Anti-FN-Antikörper F3648 (Kaninchen)	IFM (1:200)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Anti-Laminin-Antikörper Z0097 (Kaninchen)	IFM (1:40)	Dako (Glostrup, Dänemark)
Anti-Kollagen-TypI-Antikörper 234167 (Kaninchen)	IFM (1:40)	Merck Millipore (Billerica, USA)
Alexa488-anti-Kaninchen- Antikörper (Ziege)	IFM (1:400)	Merck Millipore (Billerica, USA)
Peroxidase-anti-Maus-IgG- Antikörper A8924 (Kaninchen)	WB (1:5000), ELISA (1:10000)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Alexa488-anti-Maus-Antikörper (Ziege)	IFM (1:300)	Life Technologies (Darmstadt)

2.10 Primer

Tabelle 2.10: In dieser Arbeit erstellte und verwendete Primer (SacI-Schnittstelle ist unterstrichen)

Bezeichnung	5' → 3' Sequenz	T _M [°C]	Verwendungszweck
A-1296-SacI-r	GGT <u>GAG CTC</u> TTA CCA CTC GAT ATT AAA TG	68	Herstellung der YadA-Varianten, Einführung einer SacI-Schnittstelle am Ende der <i>yadA</i> -Sequenz
A-WA314-39-f-SacI	GGT <u>GAG CTC</u> CCA AAT TCT GAT CCT GAT TCG	72	Herstellung des Konstrukts WA D1, Einführung einer SacI-Schnittstelle
A-WA314-48-f-SacI	GGT <u>GAG CTC</u> ATG ATA TTT CAA CCA GAA GTA CG	71	Herstellung des Konstrukts WA D2, Einführung einer SacI-Schnittstelle
A-WA314-58-f-SacI	GGT <u>GAG CTC</u> GGC GGG ACC AAT GCT CTC G	77	Herstellung des Konstrukts WA D3, Einführung einer SacI-Schnittstelle
A-YPIII-45-f-SacI	GGT <u>GAG CTC</u> CCA AAT GTT GAT CCT AAA TTG G	71	Herstellung des Konstrukts YP D1, Einführung einer SacI-Schnittstelle
A-YPIII-86-f-SacI	GGT <u>GAG CTC</u> GAA GCA ATA CAA CCA CAA GTA C	72	Herstellung des Konstrukts YP D2, Einführung einer SacI-Schnittstelle
A-YPIII-96-f-SacI	GGT <u>GAG CTC</u> GGC GGG CTC AAT GCT C	74	Herstellung des Konstrukts YP D3, Einführung einer SacI-Schnittstelle
A-Seq-2-f	GTT GCC ATT GGA CAC TC	52	Sequenzierung der YadA-Varianten
A-Seq-2-r	CGC TAA CCA TGT AGT TCC	54	Sequenzierung der YadA-Varianten
A-Seq-r	GTC TTT AGT GCC AGC CGC	58	Sequenzierung der YadA-Varianten
A-Cla-f	TTT TAA GAT CGA TTAGT GCT GT	60	Sequenzierung der YadA-Varianten

2.11 Molekularbiologische „Kits“

Tabelle 2.11: In dieser Arbeit verwendete molekularbiologische Kits

Protein	Firma
QIAGEN Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
Plasmid DNA Purification Nucleo Bond PC 100	Machery-Nagel (Düren)
PCR clean up, Gel-Extraction Kit Nucleo Spin Extract II	Machery-Nagel (Düren)

2.12 Puffer und Lösungen

Gelelektrophorese

TAE-Puffer 40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA

Ethidiumbromid-Färbebad 1 µg Ethidiumbromid pro ml H₂O_{dest}

Herstellung Ca²⁺-kompetenter *E. coli*

TFB1-Puffer 30 mM K-Acetat, pH 5,8, 50 mM MnCl₂,
100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin

TFB2-Puffer 10 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure-
Natriumsalz (Mops-Natriumsalz), pH 7,0, 75
mM

CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin

SDS-PAGE

SDS-Probepuffer	1 M MgCl ₂	5 ml
	10 % SDS	20 ml
	Glycerin	5 ml
	β-Mercaptoethanol	2,5 ml
	Bromphenolblau	25 mg
	1 M Tris, pH 8,8	4,9 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 50 ml
10 x SDS-Laufpuffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	SDS	10 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Coomassie-Färbung

Coomassie-blau-Lösung	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	Coomassie Brilliant Blau R250	0,15 %
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Material und Methoden

Entfärberlösung	Methanol	500 ml
	Essigsäure	75 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Westernblot

10 x PBS	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	103,2 g
	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	23,5 g
	NaCl	40,0 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
PBS-T	10 x PBS	1000 ml
	Tween 20	1 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
Blockierlösung	Milchpulver	5 g
	10 x PBS	10 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 100 ml

Proteinbestimmung nach Lowry

Reagenz A	Na ₂ CO ₃	2 %
	NaOH	0,4 %
	K/Na-Tartrat	0,16 %
	SDS	1 %
Reagenz B	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	4 %
Reagenz C	Reagenz A	100 ml
	Reagenz B	1 ml
Folin-Lösung	Folin-Ciocalteu's Reagenz	50 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 100 ml

ELISA

PBS, pH 7,4	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	10,32 g
	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	2,35 g
	NaCl	4,00 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
PBS-T	Tween 20	1 ml
	PBS	ad 1000 ml

Material und Methoden

OPD-Lösung	1,2-Phenylenediamin Dihydrochlorid	
	(OPD, 2HCl) 3,5mg/Tablette	4 Tabletten
	H ₂ O ₂ 30%	5 µl
	H ₂ O _{dest}	ad 12 ml
Stopp-Lösung	H ₂ SO ₄ 96%	2,8 ml
	H ₂ O _{dest}	90 ml

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Bakterien

Soweit nicht anders angegeben wurden *E. coli* Stämme (Tabelle 2.1) bei 37°C und *Yersinia* Stämme (Tabelle 2.2) bei 27°C in LB mit Selektivantibiotika in einem Schüttelinkubator (180 U/min) unter aeroben Bedingungen angezogen. Für Versuche, bei denen eine maximale *yadA*-Expression bei 37°C benötigt wurde, wurde das Medium RPMI 1640 verwendet.

3.1.2 Stammhaltung

Alle *E. coli* Stämme und *Yersinia* Stämme wurden bei -80°C in speziellem Einfriermedium asserviert. Dafür wurde eine ÜNK bei 6000 RZB und 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment anschließend in Einfriermedium resuspendiert. Die Kulturen wurden anschließend in Trockeneis eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.1.3 Plasmidisolierung

Für die Isolierung von Plasmiden wurden 100 ml ÜNK des jeweiligen Stammes in LB angesetzt. Die Kultur wurde anschließend bei 6000 RZB und 4°C 10 min zentrifugiert und in entsprechendem Puffer resuspendiert. Die Isolierung von Plasmiden erfolgte je nach benötigter Menge und Anzahl an Kopien im Bakterium mit dem von Macherey-Nagel (Düren) hergestellten „NucleoBond PC 100“-Kit oder dem „Miniprep Kit“ von Qiagen (Tabelle 2.11) nach Angaben des Herstellers.

3.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNS im Labor. Dabei werden spezielle Enzyme eingesetzt, die einen spezifischen DNS-Abschnitt mit Hilfe von kleinen DNS-Fragmenten, den sogenannten Primern, kopieren (Saiki et al, 1988). Dabei kommen je nach Länge des zu replizierenden Fragments und gewünschter Fehlerhäufigkeit unterschiedliche Polymerasen zum Einsatz. So wurden je nach Anforderung entweder „DreamTaq PCR MasterMix“ (Tabelle 2.7/Tabelle 3.1) oder „Phusion Flash High-Fidelity MasterMix“ (Tabelle 2.7/Tabelle 3.2) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Tabelle 3.1: PCR-Reaktionsprogramm für die DreamTaq-Polymerase

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	30	30-35
Hybridisierung	$T_M \pm 2$	30	
Elongation	72	60/1kb	
Finale Elongation	72	600	1

Tabelle 3.2: PCR Reaktionsprogramm für die Phusion Flash High Fidelity Polymerase

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	10	1
Denaturierung	98	1	30-35
Hybridisierung	$T_M \pm 2$	5	
Elongation	72	15/1kb	
Finale Elongation	72	60	1

Als DNS-Matrize wurden dabei Plasmid-DNS, amplifizierte und aufgereinigte DNS oder 1 µl eines Ganzzelllysats, welches 1:10 in H₂O_{dest.} verdünnt und anschließend bei 95°C für 5 min aufgeköcht wurde, eingesetzt. Die Konzentration der verwendeten Primer richtete sich nach der eingesetzten Polymerase und betrug 0,1 µM (DreamTaq) bzw. 0,5 µM (Phusion Flash High-Fidelity). Alle Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) hergestellt. Für die Erstellung der Primer wurden die Programme CLC DNA Workbench 6 (CLC bio, Aarhus, Dänemark) und DNASTAR Lasergene 8 Primer Select (DNASTAR Inc, Madison, USA) verwendet. Die Schmelztemperatur (T_M) wurde durch das Programm DNASTAR Lasergene 8 Primer Select ermittelt.

3.1.5 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNS-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Mit Hilfe der angelegten elektrischen Spannung wandert die DNS, welche negativ geladen ist, zum positiven Pol (Anode) der Spannungsquelle. Dabei ist neben der Größe der DNS entscheidend, ob die DNS linear, zirkulär oder verdrillt („super-coiled“) vorliegt. Für die Auftrennung wurden Agarosegele von 1,0-2,0% (w/v) in TAE-Puffer benutzt. Die DNS

wurde mit 5-fach DNS-Laufpuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Für PCR-Produkte, welche mit dem „DreamTaq PCR MasterMix“ (Thermo Scientific, Waltham, USA) erstellt wurden, war dies nicht erforderlich. Diese Proben konnten direkt auf das Gel aufgetragen werden. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Zur Bestimmung der Größe wurde die „GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder“ (Thermo Scientific, Waltham, USA) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in einer Gelkammer der Firma BioRad (BioRad Laboratories Inc, Hercules, USA) bei 80V für 45-60 min. Die Gele wurden anschließend in einem Ethidiumbromid-Färbebad gefärbt und die Banden in einem UV-Transilluminator bei 254 nm dokumentiert.

3.1.6 Aufreinigung von DNS

Für die Isolierung von DNS aus Kulturen, nach einer Polymerasekettenreaktion oder aus Agarosegelen wurde das „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“-Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) (Tabelle 2.11) gemäß Herstellerangaben verwendet.

3.1.7 Bestimmung der DNS-Konzentration

Die Konzentration der DNS wurde photometrisch mit dem NanoDrop ND 1000 bestimmt (Clark & Swika, 1977). Dabei wird neben der Absorption bei 260 nm, welche typisch für DNS oder RNS ist, auch die Absorption bei 230 nm (Verunreinigungen verschiedener organischer Verbindungen) und 280 nm (Proteine) gemessen. Das Verhältnis von 260/280 nm gibt den Reinheitsgrad der DNS an. Dabei wird allgemein angenommen, dass ein Verhältnis von 1,9 oder höher „reine“ DNS anzeigt (Marmur & Grossman, 1961). Ebenso wichtig ist das Verhältnis von 260/230 nm. Viele Verunreinigungen der Probe, wie z.B. EDTA oder Phenol, absorbieren bei 230 nm. Hier sollte das Verhältnis mindestens 2,0-2,2 betragen. Ist eines der beiden Verhältnisse schlechter, so sollte die Probe erneut aufgereinigt werden.

3.1.8 DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen

Für den Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden wurden Enzyme verschiedener Firmen verwendet (Tabelle 2.7). Dabei wurde stets nach Angaben des jeweiligen Herstellers verfahren. Die Proben wurden in einem Thermoblock der Firma Eppendorf bei entsprechender Temperatur und 300 rpm für die angegebene Zeit inkubiert.

Anschließend wurden die Proben zur weiteren Verwendung aufgereinigt (siehe 3.1.6). Die Proben wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Wurde ein Plasmid nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten, so wurde vor der Lagerung noch eine Inkubation mit einer alkalischen Phosphatase (Thermo Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und anschließend ebenfalls aufgereinigt.

3.1.9 Ligation von DNS-Fragmenten

Für die Ligation wurden geschnittene Plasmide (100 ng) und PCR-Fragmente in einem Verhältnis von 1:3 miteinander vermischt und bei 16°C über Nacht mit einer T4-Ligase (Thermo Scientific, Waltham, USA) und entsprechendem Puffer inkubiert. 1 µl Ligationsprodukt wurde anschließend direkt für eine Transformation verwendet.

3.1.10 DNS-Sequenzanalyse

Alle in dieser Arbeit verwendeten DNS-Abschnitte für Klonierungen und erstellten Plasmide wurden durch die Firma LGC genomics (Berlin, Deutschland) sequenziert.

3.1.11 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* und *Y. enterocolitica* Stämme wurden die entsprechenden ÜNK in 100 ml LB-Medium mit Selektivantibiotika 1:50 verdünnt und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5$) bei 37°C (*E. coli*) bzw. 27°C (*Y. enterocolitica*) unter Schütteln inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend für 15 Minuten bei 4°C gekühlt und in einem 50 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (4°C, 10 min, 4000 RZB). Es folgten drei Waschschrte mit 50 ml, 25 ml bzw. 10 ml H_2O_{dest} . Anschließend wurden die Zellen in 5 ml 10% Glycerin H_2O_{dest} aufgenommen, gewaschen und erneut zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden die Bakterien dann in 200 µl 10% Glycerin H_2O_{dest} resuspendiert und in Aliquots zu je 40 µl bei -80°C eingefroren.

3.1.12 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Bei der Elektrotransformation wird mit Hilfe eines elektrischen Feldes DNS in eine vorbereitete Zelle eingebracht. Dafür werden die Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µl

Ligationsansatz oder 5 ng Plasmid-DNS gemischt und in eine Elektroporationsküvette (2 mm Spaltbreite) pipettiert. Die anschließende Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV mit dem MicroPulser Elektroporationsgerät von Bio-Rad. Die Bakterien wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 27°C (*Y. enterocolitica*) oder 37°C (*E. coli*) bei 300 rpm geschüttelt. 80 µl und 200 µl wurden auf LB-Agarplatten mit Antibiotika ausplattiert und die Platten bei 27°C (*Y. enterocolitica*) bzw. 37°C (*E. coli*) im Brutschrank für 24-48 Stunden bebrütet.

3.1.13 Herstellung Ca²⁺-kompetenter Bakterien

Für die Herstellung von Ca²⁺-kompetenten *E. coli* Stämmen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hanahan (Hanahan, 1983) verwendet. LB-ÜNK wurden mit entsprechenden Antibiotika 1:100 in LB-Medium verdünnt und bei 27°C (*Y. enterocolitica*) bzw. 37°C (*E. coli*) und 180 rpm bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,5) inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min zentrifugiert (4000 RZB, 4°C). Bevor eine weitere Zentrifugation (15 min, 4°C, 4000 RZB) folgte, wurden die Bakterien in TFB1-Puffer resuspendiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml TFB2-Puffer pro 100 ml Bakterienkultur aufgenommen. Zur weiteren Verwendung wurden 100 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

3.1.14 Transformation Ca²⁺-kompetenter Bakterien

Die auf Eis aufgetauten *E. coli* wurden mit 10 µl Ligationsansatz oder 5 ng Plasmid-DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. In einem Thermoblock wurden die Zellen anschließend für 90 sec auf 42°C erwärmt und sofort für 60 sec auf Eis abgekühlt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 1 ml SOC-Medium und eine Inkubation für 60 min bei 37°C (*E. coli*). Im Anschluss wurden 100 µl und 200 µl je Ansatz auf LB-Agarplatten mit Selektivantibiotika ausplattiert und bei 37°C für 24-48 h im Brutschrank inkubiert.

3.1.15 Konjugation

Als Konjugation wird der Transfer von DNS von einem Donor- zu einem Rezipienten-Stamm bezeichnet, welche in engen Kontakt treten müssen. Während des Vorgangs wird ein einzelsträngiger DNS-Strang nach dem „rolling-circle“ Prinzip auf den Empfänger-Stamm

übertragen. Die Donor- und Empfänger-Stamm Plasmide werden wieder von einzelsträngigen zu doppelsträngigen Plasmiden vervollständigt. Der Rezipient-Stamm wird in der Folge als Transkonjugant bezeichnet. Die Konjugation ist auch bei hoher Restriktion effizient, da die übertragene DNS simultan modifiziert wird. Entdeckt wurde dieser Vorgang 1947 von Joshua Lederberg und Edward Tatum (Snyder & Champness, 1997).

Für die Konjugation wurde das Suizidplasmid pGP704 verwendet. Das Plasmid kann sich im Rezipient-Stamm nicht vervielfältigen und wird somit bei der Teilung der Bakterien nicht weitergegeben (Replikation ist von π -Protein (Pir) abhängig). Deshalb muss das Zielgen in das Chromosom oder ein anderes Plasmid über homologe Rekombination „gerettet“ werden, um im Rezipientenstamm zu verbleiben. Über entsprechende Selektivantibiotika und mit Hilfe einer PCR kann dies überprüft werden. Als Donor-Stamm wurde *E. coli* SM10 λ pir verwendet. Dieser Stamm besitzt das *pir*-Gen (kodiert π -Protein), welches zur Aktivierung des OriV führt und somit die Replikation von pGP704 ermöglicht. Der Rezipient war *Y. enterocolitica* WA(pYVO8-YadA^c-0). Für die Konjugation wurden beide Stämme auf Blutagarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 37°C bzw. 27°C für 24°C bebrütet. Beide Stämme wurden in 500 μ l PBS in einem Verhältnis von 1:3 (Rezipient:Donor) vermischt und 200 μ l dieser Suspension wurden auf eine frische Blutagarplatte pipettiert. Anschließend erfolgte eine sechsstündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C. Teile der Bakterienmischkultur wurden in 1 ml PBS resuspendiert. Je Konjugationsansatz wurden 100 μ l und 200 μ l auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 36 h bei 27°C inkubiert.

3.1.16 Konstruktion von pGS-Plasmiden

Für die Herstellung der diversen pGPS-Plasmide (siehe Tabelle 2.2) wurde das Plasmid pGPS:SS (Nägele, 2010) verwendet. Dieses wurde mit SacI verdaut (nach Angaben des Herstellers) und anschließend aufgereinigt. Es folgte eine Inkubation mit alkalischer Phosphatase (Thermo Scientific, Waltham, USA) wie vom Hersteller empfohlen und eine erneute Aufreinigung. Die zu inserierenden *yadA*-Genfragmente wurden mit den entsprechenden Primern (A-x-f-SacI/A-1269-SacI-r) aus den Plasmiden pYVO8 bzw. pYVOIII amplifiziert und nach einer Aufreinigung mit dem Restriktionsenzym SacI geschnitten. Die Fragmente wurden dann wie unter 3.1.9 beschrieben in pGPS:SS ligiert und mittels Transformation in einen Ca²⁺-kompetenten *E. coli* SM10 λ pir eingeschleust. Diese

Stämme wurden anschließend zur Konjugation mit WA(pYVO8-YadA^e-0) und in vivo Rekombination verwendet.

3.1.17 Herstellung der diversen *Y. enterocolitica* Stämme mit modifiziertem pYV

Um die unterschiedlichen YadA-Varianten in einen natürlichen Expressionshintergrund zu integrieren, wurden die wie oben beschriebenen Suizidplasmide (siehe 3.1.16) durch Konjugation in den *Y. enterocolitica* Stamm mit dem Plasmid pYVO8-YadA^e-0 transferiert. Dadurch entstehen durch doppelte homologe Rekombination die Stämme mit den Plasmiden pYVO8-YadA^e₃₈, pYVO8-YadA^e₄₇, pYVO8-YadA^e₅₇, pYVO8-YadA^P₄₄, pYVO8-YadA^P₄₄, pYVO8-YadA^P₉₅ erstellt (siehe Tabelle 2.2).

3.1.18 Bestimmung der Oberflächenhydrophilie von *Y. enterocolitica* Varianten

Die Untersuchung der Hydrophilie/Oberflächenladung der Außenmembran bei unterschiedlichen *Y. enterocolitica* Varianten erfolgte wie bei Schieman (Schieman et al, 1987) beschrieben. Hierfür wurde zunächst eine hydrophile 20% Dextran-Lösung (M_r 450000-650000, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und eine hydrophobe 20% PEG-Lösung (PEG 6000, Serva, Heidelberg) mit 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,0) hergestellt. Anschließend wurden 11 g der PEG-Lösung und 15,5 g der Dextran-Lösung mit 23,5 g 0,03 M Tris-Puffer (pH 7,0) gemischt und bei 4°C über Nacht aufbewahrt. Die aufgetrennten Phasen wurden vorsichtig entnommen und in zwei 50 ml Reaktionsgefäßen getrennt bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für den Versuch wurden 100 µl je Übernachtskultur in 5 ml RPMI 1640 verdünnt und bei 37°C für 4 h bei 180 rpm geschüttelt. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (10000 RZB, 2 min) und auf eine OD₆₀₀ von 5 eingestellt. 2 ml PEG-Lösung, 2ml Dextran-Lösung und 100 µl Bakteriensuspension wurden je Stamm in einem Reagenzglas gemischt (Vortex, Stufe 3). Nach 45 min bei RT wurden 1 ml der oberen Phase und 1 ml der unteren Phase vorsichtig entnommen und der verbliebene Rest erneut sanft gemischt (Vortex, Stufe 3). Dieser Rest bildete die mittlere Phase. Alle Proben wurden 1:10 in 0,9 M NaCl-Lösung verdünnt und die OD₆₀₀ gemessen.

3.1.19 Autoagglutination nach Laird & Cavanaugh

Für die Bestimmung der Autoagglutination der WA(pYVO8-x)-Stämme wurde ein modifizierter Test nach Laird & Cavanaugh durchgeführt (Laird & Cavanaugh, 1980). Reagenzröhrchen wurden mit 5 ml RPMI 1640 befüllt und mit je fünf Kolonien pro Reagenzglas der jeweiligen WA(pYVO8-x)-Stämme inokuliert. Die Reagenzgläser wurden statisch oder bei 180 rpm für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reagenzgläser optisch ausgewertet. Dabei wurden vier unterschiedliche Einteilungen getroffen: \emptyset bedeutet keine Sedimentbildung und sehr starke Trübung des Mediums, + bedeutet sehr schwache Sedimentbildung und starke Trübung des Mediums, ++ bedeutet starke Sedimentbildung und sehr schwache Trübung des Mediums, +++ bedeutet sehr starke Sedimentbildung und keine Trübung des Mediums (siehe Abbildung 3.1)

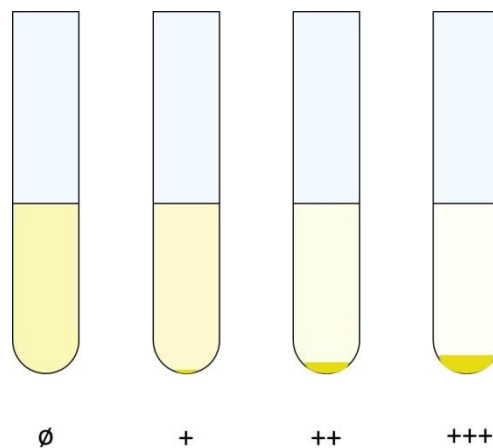


Abbildung 3.1: Graphische Darstellung der Auswertung der Autoagglutination nach Laird & Cavanaugh.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Präparation von Außenmembranproteinen

Um Proteine der Außenmembran zu isolieren und zu gleich „Verunreinigungen“ durch Zytoplasmamembranproteine zu verhindern, erwies sich eine Isolierung der Außenmembranroteine mit Hilfe von N-Lauryl-Sarkosinat als praktikabel (Filip et al, 1973).

Für die Präparation von Außenmembranproteinen wurde eine Übernachtskultur mit Antibiotika 1:100 in RPMI verdünnt und für 6 h bei 37°C unter schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min bei 4°C und 6000 RZB zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und die Bakterien in 10 mM HEPES (pH 7,4) resuspendiert. Diese Suspension wurde in vier 30 Sekunden Intervallen mit jeweils 30 Sekunden Pause zwischen den Intervallen unter Kühlung mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen. Die groben Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation entfernt (6000 RZB, 10 min, 4°C) und der Membran-angereicherte Überstand anschließend ultrazentrifugiert (100.000 RZB, 60 min, 4°C). Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 mM HEPES Puffer mit 1 % N-Lauryl-Sarkosinat (Sarkosyl, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) aufgenommen und für 30 min bei RT kräftig geschüttelt. Es folgte eine erneute Ultrazentrifugation (100.000 RZB, 60 min, 4°C). Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet über Nacht bei 4°C in 50 µl H₂O_{dest} inkubiert, um eine vollständige Lösung des Proteinpellets zu gewährleisten. Die Proteinkonzentration wurde dann nach Lowry (siehe 3.2.2) bestimmt.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Proteinbestimmung wurde mit der von Lowry beschriebenen und später durch Markwell modifizierten Methode durchgeführt (Lowry et al, 1951; Markwell et al, 1978). Dabei wird zunächst ein blauer Komplex durch die Bindung von Peptiden an Kuper-(II)-Ionen gebildet. In einem weiteren Schritt wird dann Cu(II) zu Cu(I) reduziert und das gelbliche Folin-Ciocalteu zu Molybdänblau umgewandelt. Die Absorption dieser Blaufärbung kann anschließend bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen werden. Mit Hilfe einer Standardkurve, bei der definierte Proteinkonzentrationen gemessen werden, kann die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

Für die Erstellung der Eichgeraden wurden verschiedene Konzentrationen an BSA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Je durchgeführte Messung wurden 5 µl der Proteinprobe mit 995 µl H₂O_{dest} verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 ml Reagenz C und eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden zu jeder Probe 300 µl Folin-Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt (Vortex, Stufe 1) und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probenkonzentration wurde nach 45 min bei einer Wellenlänge von 750 nm in einem Photometer bestimmt.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dabei werden die Proteine zunächst in einem 4%-Sammelgel elektrophoretisch konzentriert und anschließend in einem höherprozentigen Gel aufgetrennt. In der Regel wurde dabei ein 11%-Polyacrylamidgel eingesetzt (siehe Tabelle 3.3). Vor dem Beladen der Gele wurden die Proteinproben mit SDS-Probepuffer zur Solubilisierung versetzt und je nach Probe auf 37°C (60 min) oder zur Denaturierung auf 100°C (5-10 min) erhitzt. Die durch SDS-Solubilisierung negativ geladenen Proteine wandern entsprechend ihrer Größe im Gel zur Anode. Es wurden ausschließlich 0,75 mm dicke Gele (8 x 7 cm) verwendet. Für die Herstellung der SDS-Gele wurde Acrylamid/Bis Lösung 29:1 eingesetzt. Die SDS-PAGE wurden zunächst für 20 min bei 80 V und anschließend bei 180 V betrieben, bis die gewünschte Auftrennung erfolgt war (Färbestoffverlauffront). Die Gele wurden anschließend entweder in Coomassie-Lösung gefärbt (siehe 3.2.4) oder für eine Westernblot-Analyse (siehe 3.2.5) verwendet.

Tabelle 3.3: Verwendete Puffer und Lösungen für die Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

	11% Trenngel (10 ml)	4% Sammelgel (2,5ml)
1 M Tris/HCL, pH 8,0	3,75 ml	-
0,25 M Tris/HCl pH 6,8	-	1,25 ml
H ₂ O _{dest}	2,2 ml	0,85 ml
30% Acrylamid-Lösung (29:1 Acrylamid/Bis)	3,7 ml	350 µl
10% SDS	200 µl	50 µl
10% Ammoniumpersulfat	40 µl	15 µl
TEMED	20 µl	15 µl

3.2.4 Coomassie-blau-Färbung

Proteine, welche mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 3.2.3) aufgetrennt wurden, können mit Hilfe der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Hierfür werden die Gele in einer Coomassie-Lösung bei Raumtemperatur für ungefähr 30 min und unter leichtem schwenken gefärbt und fixiert. Anschließend wird die Coomassie-Lösung entfernt und eine Entfärber-Lösung aufgegeben und eventuell mehrmals gewechselt, bis ein klares,

blaues Bandenmuster sichtbar wird. Die Gele können anschließend in H₂O bei Raumtemperatur aufbewahrt, fotografiert und getrocknet werden.

3.2.5 Westernblot (Immunoblot)

Bei einem Westernblot werden die Proteine, welche zuvor mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 3.2.3) aufgetrennt wurden, in einem elektrischen Feld auf eine Membran (in diesem Fall eine PVDF-Membran) transferiert. Nach dem „bloten“ (Transfer der Proteine) kann mit einem spezifischen Antikörper das zu untersuchende Protein auf der Membran nachgewiesen werden. Der Proteintransfer wurde in dieser Arbeit mit dem sogenannten Semi-Dry-Verfahren (Elektroblot) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst sechs Lagen Whatman-Papier in Kathoden-Lösung I getränkt und auf die Blotfläche aufgelegt. Dabei sollte die Fläche des Filterpapers in etwa der des Gels entsprechen, ebenso die Größe der PVDF-Membran. Anschließend folgten drei Lagen in Kathoden-Lösung II getränktes Whatman-Papier. Die Membran, welche zunächst in Methanol aktiviert werden muss, wird ebenfalls kurz in Kathoden-Lösung II gewaschen und dann auf das Filterpapier gelegt. Im nächsten Schritt wurde das Gel in Anoden-Lösung und dann präzise auf die Membran gelegt. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen zwischen Membran und Gel liegen. Abschließend wurden noch neun Lagen in Anoden-Lösung getränkte Whatmanfilter auf das Gel gelegt und die Apparatur geschlossen. Nun wurde ein elektrisches Feld mit einer konstanten Stromstärke (200 mA) für 60 min eingestellt. Dabei kann die Stromstärke und die Zeit je nach Größe der zu transferierenden Proteine angepasst werden. Nach Abschluss des Blotvorgangs wurde die Membran in PBS-Lösung mit 5% Milchpulver über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei 37°C geblockt, um eventuell vorhandene freie Proteinbindestellen zu maskieren. Vor der Inkubation mit dem proteinspezifischen Antikörper (Verdünnung je nach verwendetem Antikörper, siehe Tabelle 2.9) wurde die Membran zweimal kurz mit PBS gewaschen. Inkubationszeit und -temperatur können je nach verwendetem Antikörper stark variieren. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit PBS-Tween (1%) für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurde die Membran dann mit einem Zweitantikörper (siehe Tabelle 2.9) für 45 min bei RT inkubiert. Nach erneuten drei Waschschrten mit PBS-Tween für je 10 min bei RT erfolgte die Entwicklung des Blots anschließend mit dem „ECL Western Blotting Reagenz“ (siehe Tabelle 2.6)

3.2.6 Markierung von Kollagen Typ I mit Alexa488

Für die ECM-Proteinbindungsuntersuchungen im Durchflusszytometer wurde Kollagen Typ I direkt mit Alexa Fluor 488 NHS Ester (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) konjugiert (Han et al, 2008). Hierfür wurden 200 µl Kollagen (3mg/ml) in 2 mM HCl mit 800 µl Puffer I (2,5 M NaCl, 0,5 M NaCO₃, pH 9,3) und 1 µl Alexa Fluor 488-Succinimidylester (gelöst nach Herstellerangaben, 10 µg/ml) gemischt und für 4 Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Die sehr zähe Lösung wurde anschließend mit 1 ml Puffer II (0,5 M Essigsäure, 0,9 M NaCl) gefällt. Nach einer Inkubation im Dunkeln bei RT über Nacht wurde die Lösung zentrifugiert (13000 RZB, 15 min, RT) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml 2 mM HCl aufgenommen. Abschließend wurde das gelöste Kollagen über Nacht in 2 l einer 2 mM HCl-Lösung dialysiert, um ungebundenes Alexa Fluor 488 zu entfernen (Gramlich, 2014). Zur Überprüfung der Konzentration und der Qualität wurde eine SDS-PAGE mit einer definierten Menge unkonjugiertem Kollagen Typ I als Kontrolle durchgeführt.

3.3 Mikroskopie

3.3.1 Nachweis von YadA mit Fluoreszenzmikroskopie

Die *Yersinia*-Stämme wurden zunächst in einer ÜNK (siehe 3.1.1) angezogen und am nächsten Morgen in RPMI 1640 1:50 verdünnt. Die Hauptkultur wurde für sechs Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend eine OD-Messung bei 600 nm durchgeführt. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,1 in PBS eingestellt und jeweils 20 µl pro Vertiefung auf einen Objektträger pipettiert. Nach dem Trocknen über Nacht wurden die Objektträger in eiskaltem Aceton fixiert (10 min) und anschließend erneut über Nacht getrocknet. Am darauffolgenden Morgen wurden je Vertiefung 15 µl 1. Antikörper (8D1, 1:500 in PBS) aufgetragen und für 30 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min. Die Objektträger wurden getrocknet bevor 20 µl pro Vertiefung des 2. Antikörper (FITC-konjugierter Anti-Maus-Antikörper, 1:300 in PBS) auf die Objektträger gegeben wurden. Nach 30 min Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer im Dunkeln wurden die Objektträger zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden wieder getrocknet. In einem abschließenden Schritt wurden die Bakterien mit DAPI (1:1000 in PBS, 20 µl je Vertiefung) für 1 min bei RT gefärbt und wieder zweimal für je 5 min gewaschen. Die getrockneten Objektträger wurden mit VectaShield (Vector laboratories, Burlingame, USA) beschichtet und mit einem Deckglas verschlossen.

Nach einer Trockenphase bei 4°C im Dunkeln über Nacht wurden die Deckgläser noch mit Nagellack fixiert, um ein Verrutschen während des Mikroskopierens zu verhindern. Die Objektträger wurden bei 4°C im Dunkeln bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Mikroskopie wurde ein Olympus BX61 Fluoreszenzmikroskop verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software cell[^]P 3.1 von Olympus (Hamburg, Deutschland).

3.3.2 Nachweis der Bindung an Fibronectin mit Fluoreszenzmikroskopie

Für den Nachweis der Bindung an Plasmafibronektin (pFn) bzw. zelluläres Fibronectin (cFn) in Suspension wurde eine Übernachtskultur (siehe 3.1.1) am nächsten Morgen 1:50 in RPMI 1640 verdünnt und für 4,5 h bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und in PBS mit 50 µg/ml pFn bzw. cFn (siehe Tabelle 2.8) aufgenommen ($OD_{600} = 0,1$). Um mögliche Bakterien/Fibronectin-Aggregate zu dispergieren wurden die Bakterien mit Fibronectin noch durch eine Kanüle (27G) gedrückt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 300 rpm und 37°C wurden die Bakterien zentrifugiert (10.000 RZB, 23°C, 2 min) und dreimal in PBS gewaschen und anschließend erneut mit einer Injektionsspritze durch eine Kanüle (27G) gedrückt. Danach wurden die Bakterien auf einen Objektträger gegeben und getrocknet. Nach der Fixierung in eiskaltem Aceton (10 min) wurden die Bakterien getrocknet und mit einem Kaninchen-anti-Fibronectin-Antikörper (polyklonal, 1:200) für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte in PBS für jeweils 5 min. Als zweiter Antikörper wurde ein Alexa488-anti-Kaninchen-Antikörper (1:400) verwendet. Die Proben wurden für 30 min in einer feuchten Kammer im Dunkeln mit dem Zweitantikörper inkubiert und anschließend zweimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Abschließend erfolgte eine Färbung mit DAPI (1:1000) für eine Minute und erneut zwei Waschschrte mit PBS. Nach dem Trocknen wurden die Proben mit VectaShield eingebettet und mit einem Deckglas eingeschlossen. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop und der Software cell[^]P 3.1 (beides Fa. Olympus, Hamburg, Deutschland).

3.4 Enzyme-Linked Immunosorbend Assay (ELISA)

3.4.1 Nachweis der Bindung von YadA-positiven Yersinien an immobilisierte ECM-Proteine mittels ELISA

Für den ELISA-basierten Bindungstest wurden Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno Maxi-Sorp, Nalgene Nunc International, Penfield, USA) mit verschiedenen ECM-Proteinen (Kollagen Typ I und Typ IV, Laminin und unterschiedlichen Fibronektinfragmenten) sowie dem synthetischen Oligopeptid (POG)₁₀ (Kollagen-Mimetikum) in Konzentrationen von 0,1-10 µg/ml beschichtet (siehe Tabelle 2.8). Dabei wurde die gewünschte Konzentration der ECM-Proteine in PBS verdünnt und je Vertiefung 50 µl der ECM-Lösung in die Mikrotiterplattennäpfe pipettiert. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Morgen wurden die ÜNK (LB-Medium mit Antibiotika, 27°C, 180 rpm) der jeweiligen Stämme 1:50 in RPMI 1640 verdünnt und für 4 Stunden bei 37°C und 180 rpm in einem Schüttler inkubiert. Der Überstand der Platten wurde verworfen und die Platten mit 0,5% BSA-PBS-Lösung für 2 h bei 37°C blockiert. Nach 2 h Inkubationszeit wurden die Platten dreimal mit je 200 µl 0,1% PBS-Tween pro Vertiefung gewaschen und in jede Vertiefung wurden entweder 100 µl Bakteriensuspension (OD₆₀₀ = 0,5) oder PBS pipettiert. Die Platten wurden anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert und dann erneut dreimal mit 0,1% PBS-Tween gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem Erstantikörper (8D1, 1:10000, 100 µl je Vertiefung) bei 37°C. Vor und nach der einstündigen Inkubation bei 37°C mit dem Zweitantikörper (Meerrettich-Peroxidase konjugierter Anti-Maus-Antikörper, 1:10.000) wurde erneut dreimal mit 0,1% PBS-Tween gewaschen. Für die Entwicklung wurden OPD-Tabletten (Dako, Hamburg) nach Herstellerangaben gelöst und 100 µl in jede Vertiefung pipettiert. Nach 30 min Inkubationszeit bei RT unter Lichtschutz wurde die Entwicklung durch Zugabe von 100 µl 0,5 M H₂SO₄ gestoppt. Die Messung erfolgte in einem Plattenphotometer bei 491 nm (Referenzwellenlänge 620 nm).

Mit dieser Methode wird die ECM-bindungsfähigkeit der YadA-Varinaten bestimmt. Die ECM-Bindungsfähigkeit gibt an, wie viele Yersinien an eine definierte Menge immobilisiertem ECM-Proteine binden.

3.4.2 Analyse der kompetitiven (POG)₁₀-/ECM-Proteinbindung an *Yersinia* mittels ELISA

Für die Hemmung der Bindung von YadA-positiven *Yersinien* an ECM-Proteine durch (POG)₁₀ wurden die Kulturen und Platten zunächst wie unter 3.4.1 beschrieben behandelt. Die Bakterienhauptkulturen wurden auf eine OD₆₀₀ = 0,25 eingestellt. Diese Kulturen wurden dann zunächst für 15 min mit ECM-Proteinen (0,04 µg/ml, 0,2 µg/ml, 1,0 µg/ml bzw. 5,0 µg/ml Kollagen Typ I, (POG)₁₀ oder FN-11-5) bei 37°C und 300 rpm in einem Thermomixer präinkubiert, dann zentrifugiert (10000 RZB, 2 min, RT), der Überstand abgenommen, das Sediment wurde in PBS resuspendiert und anschließend jeweils 100 µl pro Vertiefung auf die vorher mit BSA „geblockte“ Mikrotiterplatte pipettiert. Der weitere Ablauf erfolgte dann wie unter 3.4.1 beschrieben.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Nachweis der Autoagglutination von YadA-positiven Bakterien im Durchflusszytometer

Für die Autoagglutination wurden die verwendeten Stämme aus einer Übernachtskultur in RPMI 1640 1:50 verdünnt und für 5 Stunden bei entweder 27°C oder 37°C inkubiert. Teilweise wurden die Kulturen dabei mit 180 rpm geschüttelt. Die Kulturen wurden anschließend 1:10 in FACS-Puffer verdünnt und direkt im Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung erfolgte anschließend mit der FlowJo-Software (Version 7.6.1).

3.5.2 Bindung von Kollagen Typ I und (POG)₁₀ an YadA

Um die Bindung von Kollagen Typ I und (POG)₁₀ in Bakteriensuspension zu untersuchen, wurden die Bakterien zunächst bei 27°C mit Antibiotika über Nacht angezogen und am nächsten Tag 1:100 in RPMI 1640 verdünnt. Die Hauptkultur wurde nach 4,5 h bei 37°C auf eine OD₆₀₀ = 0,5 eingestellt. 500 µl wurden abzentrifugiert (10.000 RZB, 2 min, 23°C) und in PBS mit 10 µg/ml Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I oder 10 µg/ml Alexa645-konjugiertem (POG)₁₀ resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C wurden die Bakterien bei 10.000 RZB für 2 min bei 23°C abzentrifugiert und dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen. Die Bakterien wurden in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen, mit einer Injektionsspritze zur Dispergierung von Aggregaten durch eine Kanüle (27G) gedrückt und

anschließend im Durchflusszytometer die Fluoreszenzintensität der Bakterien bestimmt. Die Auswertung erfolgte dann mittels der FlowJo-Software (Version 7.6.1).

Mit dieser Methode wird die Bindungskapazität der YadA-Variante bestimmt. Die Bindungskapazität gibt an, wieviel ECM-Protein pro Yersinienzelle gebunden wird.

3.5.3 Messung der kompetitiven Hemmung der *Yersinia*-ECM-Proteinbindung im Durchflusszytometer

Um quantitativ zu bestimmen, inwieweit die Bindung von Kollagen Typ I an YadA durch (POG)₁₀ blockiert werden kann, wurde eine Übernachtskultur in RPMI 1640 1:100 verdünnt und 4,5 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. 500 µl Bakterien wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt, abzentrifugiert (10.000 RZB, 23°C, 2 min) und in 500 µl PBS ohne (POG)₁₀ oder mit unterschiedlichen Konzentrationen an (POG)₁₀ (1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml) für 15 min bei 37°C und 300 rpm in einem Thermoblock inkubiert. Die Bakterien wurden zentrifugiert (10.000g RZB, 2 min, 23°C) und in 500 µl PBS mit 10 µg/ml Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I resuspendiert. Nach 15 min bei 37°C wurden die Proben bei 10.000g für 2 min und 23°C zentrifugiert und anschließend dreimal mit 500 µl PBS gewaschen. Die Bakterien wurden in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen, mit einer Injektionspritze zum dispergieren von Aggregaten durch eine Kanüle (27G) gedrückt und anschließend im Durchflusszytometer die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Auswertung erfolgte dann mittels der FlowJo-Software (Version 7.6.1).

3.6 Mausinfektionsversuche

Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern im Tierversuchsantrag AZ 55.2-1-54-2531-153/07 genehmigt.

3.6.1 Mauspassage

Für die Infektion von Mäusen wurden die entsprechenden *Yersinia*-Stämme zunächst in einer Maus intraperitoneal passagiert, um homogen virulente Yersinien zu selektionieren. Hierfür wurde 1 ml ÜNK (LB-Medium mit Antibiotika, 27°C) zentrifugiert (10.000 RZB, 2 min, RT), der Überstand verworfen und die Bakterien in 1 ml sterilem PBS aufgenommen. Je nach vermuteter Virulenz der Stämme wurden 20 µl (sehr virulent) bzw. 50 µl (stark attenuiert) PBS-Bakteriensuspension in den Bauchraum einer C57BL/6-Maus injiziert (intraperitoneal,

ip) und die Maus nach 24 h getötet. Der Bauchraum wurde dann mit 5 ml sterilem PBS gespült, um die überlebenden Keime aus dem Intraperitonealraum zu gewinnen. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis gekühlt und ausplattiert (LB-Agar mit Antibiotikum). Nach einer 48 h Inkubation bei 27°C wurden 120 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) mit 1-3 Kolonien beimpft und über Nacht bei 27°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die ÜNK bei 4000 RZB für 10 min bei 4°C zentrifugiert und in Einfriermedium sehr gut resuspendiert und zu je 50 µl aliquotiert. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren und gelagert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden frühestens 48 h danach einzelne Proben aufgetaut und in verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattiert (LB-Agar). Dieser Vorgang wurde anschließend noch zweimal wiederholt, um eine genaue Keimzahl zu erhalten.

3.6.2 Perorale Mausinfektionen

Die bei -80°C gelagerten Stämme der Mauspassage wurden aufgetaut und auf eine Zellzahl von 5×10^9 Bakterien in 60 µl PBS eingestellt. Jede BALB/c-Maus (6-8 Wochen alt, weiblich) wurde mit 12 µl dieser Bakteriensuspension oral gefüttert (1×10^9 Bakterien/Maus). Die LD₅₀ für BALB/c-Mäuse nach oraler Infektion mit *Y. enterocolitica* O:8 liegt bei rund 5×10^6 Bakterien pro Maus (Handley et al, 2004). Nach 5 Tagen wurden die Tiere mit CO₂-Gas getötet und die Milz, der Dünndarm und die Peyerschen Plaques (PP) entnommen. Zunächst erfolgte die Spülung des Dünndarminhaltes mit 5 ml sterilem PBS. Anschließend wurden die PP (vier je Maus) exzidiert und in 750 µl PBS gegeben. Die Milz wurde in 1 ml sterilem PBS aufbewahrt. Alle Proben wurden direkt nach der Entnahme auf Eis gekühlt. Nach der Gewichtsbestimmung der Organe wurden PP und Milz in einer Schwingmühle (Fa. Retsch, Haan, Deutschland) homogenisiert und von allen drei Proben Verdünnungsreihen angefertigt, welche auf LB-Agar mit Antibiotikum ausplattiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 27°C wurden die Keimzahlen (CFU) pro Platte bestimmt.

3.6.3 Intraperitoneale (ip) Mausinfektionen

Für die ip Infektionsversuche wurden weibliche BALB/c-Mäuse im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Die bei -80°C gelagerten mauspasagierten Yersinien wurden aufgetaut und auf $2,5 \times 10^5$ Bakterien pro ml PBS (steril) eingestellt. Pro Maus wurden 200 µl dieser Bakteriensuspension in den Bauchraum injiziert (5×10^4 Bakterien/Maus). Die LD₅₀ für BALB/c-Mäuse bei intravenöser Infektion mit *Y. enterocolitica* O:8 liegt bei rund 5×10^2

Bakterien/Maus (Hancock et al, 1986). Das Gewicht der Mäuse wurde vor der Injektion und an jedem Tag danach gemessen. Am dritten Tag der Infektion wurden die Mäuse getötet und Leber und Milz entnommen. Die Milz wurde in 1ml sterilem PBS, die Leber in 5 ml aufgenommen und alle Proben auf Eis gelagert. Während die Milz mit einer Schwingmühle (Fa. Retsch, Haan, Deutschland) homogenisiert wurde, wurde für die Leber ein Homogenisator aus Glas verwendet. Anschließend wurde je Probe eine Verdünnungsreihe angefertigt und diese ausplattiert (LB-Agar mit Antibiotika). Nach einer 48 h Inkubation bei 27°C wurden die CFU bestimmt.

3.7 Auswertung

3.7.1 Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten

Je Probe wurden 50.000 Ereignisse im Durchflusszytometer BD Canto II detektiert und dokumentiert. Die anschließende Auswertung der Daten fand mit der Software FlowJo 7.6.1 (Tree Star Inc, San Carlos, USA) statt. Um nur Ereignisse von einzelnen Bakterien zu bewerten, wurde der Streuwert für die Größe der Yersinienzellen anhand des Autoagglutination-YadA-negativen Stammes WA(pYVO8-YadA[°]-0) über den „forward scatter“ (FSC) festgelegt („gating“). Ebenso wurden die unteren Grenzwerte für die Fluoreszenzintensivität (FITC, APC) mit dieser Negativkontrolle festgelegt. Für die qualitative Bestimmung der Durchschnittswerte wurde die mittlere Fluoreszenzintensivität (MFI) jeder Probe bestimmt und ein Durchschnittswert aus drei unabhängigen Proben errechnet. Dieser wurde dann in Relation zum Vergleichsstamm YadA[°] gesetzt.

3.7.2 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle Versuche mindestens dreimal in unabhängigen Versuchsdurchführungen erfasst und aus diesen Werten anschließend ein Mittelwert berechnet. Für die graphische und statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, USA) verwendet. Neben der Ermittlung des Standardfehlers wurde auch eine Bestimmung von signifikanten Unterschieden der Messergebnisse untereinander durchgeführt. Für diesen Zweck wurde ein 1-way ANOVA („one-way analysis of variance“) Test durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde angenommen, wenn der (p)-Wert $\leq 0,05$ war. Dabei fand des Weiteren eine Unterscheidung

in signifikant ($(p) \leq 0,05$, *), hoch signifikant ($(p) \leq 0,01$, **) und höchstsignifikant ($(p) \leq 0,005$, ***) statt. Alle Werte, die eine statistische Signifikanz zu einem anderen Wert hatten, wurden in den Grafiken entsprechend gekennzeichnet. Werte die sich statistisch nicht signifikant von einander unterschieden ($(p) > 0,05$) wurden nicht gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Verwendete *Yersinia*-Stämme

Für die Untersuchungen zur Funktion der NTTD (YadA^e AS26-57, YadA^p AS26-95) von YadA wurden YadA des *Y. enterocolitica* (YadA^e) Stammes WA 314 (Serotyp O:8, Biotyp 1B) und des *Y. pseudotuberculosis* (YadA^p) Stammes YP III (Serotyp III) verwendet. Es wurden N-terminal-verkürzte YadA-Varianten hergestellt oder bereits vorhandene YadA-Varianten verwendet (Roggenkamp et al, 1995; Roggenkamp et al, 1996; Untiet, 2013). Die Aminosäuresequenzidentität von YadA^e und YadA^p beträgt 74,35%. Obwohl YadA^e und YadA^p gleich groß sind (YadA^e: 422 AS/41,5 kDa; YadA^p: 434 AS/42,4 kDa), zeigt die Aminosäuresequenz der NTTD-Regionen große Unterschiede. *Y. pseudotuberculosis* YadA^p hat zusätzlich eine 32 AS große Region in der NTTD im Vergleich zu YadAs von *Y. enterocolitica* der Serotypen O:3, O:8, O:9 und O:5,27. Der zweite große Unterschied ist die Anzahl der Wiederholungen in der Stieldomäne: *Y. enterocolitica* YadA^e von Serotyp O:9 hat neun repetitive Regionen, *Y. enterocolitica* YadA^e von Serotyp O:8 sieben und YadA^p von *Y. pseudotuberculosis* nur sechs (siehe Abbildung 4.1). Die Primärsequenz von YadA besteht aus der N-terminalen Signalsequenz (AS1-25, identisch für alle YadA), einem nachfolgenden Kopfbereich (NTTD, „β-roll“-Kollagenbindedomäne und Halsdomäne), dem Stiel (Stalk) mit Linkerregion und C-terminalen Ankerdomäne (je vier β-Faltblätter). Die N-terminalen Domänen können zwischen den *Yersinia*-Arten und -Serotypen hohe Sequenzunterschiede aufweisen. Der C-terminale Bereich hingegen ist bei allen YadAs stark konserviert.

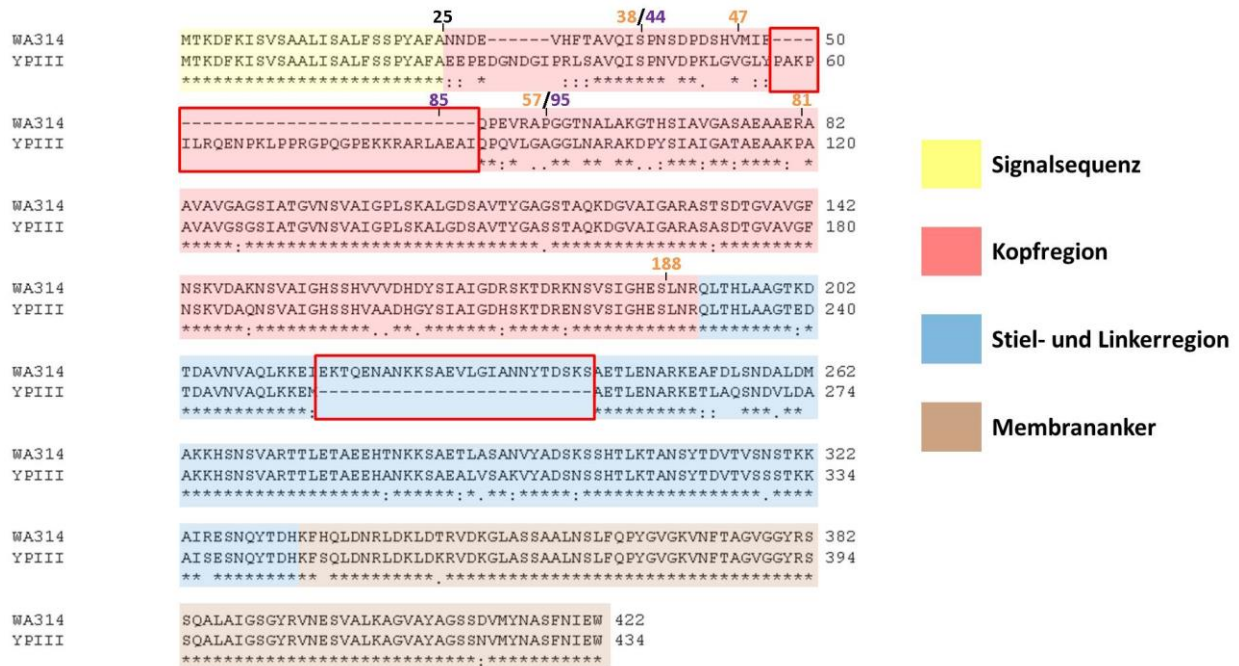


Abbildung 4.1: Aminosäuresequenzvergleich von WA 314 YadA (YadA^e) und YPIII YadA (YadA^P). Die rot umrandeten Bereiche definieren die Unterschiede im Kopf- und Stielbereich zwischen WA 314 YadA^e und YPIII YadA^P. Farblich unterlegt sind die vier großen Teilbereiche. gelb: Signalsequenz, rot: Kopfreion, blau: Stiel- und Linkerregion, braun: Membrananker. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurereste an Schnittstellen des Signalpeptids (schwarz) sowie der verkürzten YadA-Varianten (YadA^e orange, YadA^P violett).

4.2 Herstellung von *yadA*-Genvarianten

Zur Herstellung der YadA-Varianten des pYVO8-Plasmids von WA 314 und des pYVOIII-Plasmids von YPIII wurden die gewünschten DNS-Fragmente isoliert und mit den entsprechenden Primern amplifiziert. Dafür wurden als „Forward-Primer“ die in Tabelle 2.10 angegebenen Primer verwendet. Als „Reverse-Primer“ kam stets A-1296-SacI-r zum Einsatz. Das so entstandene Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym SacI verdaut, ebenso das Plasmid pGPS:SS. Der Vektor trägt die Signalsequenz und die ersten fünf Aminosäuren der N-terminalen Tip-Domäne von *Y. enterocolitica* WA 314 (YadA^e). Jedoch ergibt sich durch die Integration der SacI-Schnittstelle eine Aminosäuresubstitution von Valin zu Leucin an Stelle 30. Beide DNS-Fragmente wurden in einem Verhältnis 1:3 (Vektor:kloniertes Gen) miteinander ligiert und in Ca²⁺-kompetente *E. coli* SM10λpir Zellen transformiert. Über einen Konjugationsschritt wurde das Suizidplasmid pGPS:SS mit der jeweiligen verkürzten YadA-Gensequenz in WA(pYVO8-YadA^e-0) eingeführt und über homologe Rekombination in das Plasmid pYVO8-YadA^e-0 integriert und für „double cross-over“ selektioniert. Die korrekte Insertion wurde mittels einer PCR (Primer: A-Cla-f und A-1296-SacI-r) überprüft. Neben den

in dieser Arbeit produzierten Stämmen wurden darüber hinaus noch bereits vorhandene Stämme (siehe Tabelle 2.3 bzw. Abbildung 4.2) verwendet. Alle verwendeten YadA-Varianten wurden sequenziert und mittels CLC DNA Workbench 6 auf die korrekte Sequenz hin untersucht (Daten nicht gezeigt).

In ersten Versuchen wurden YadA-Varianten hergestellt, die direkt nach der Signalsequenz deletiert worden waren. Jedoch konnte keine ausreichende und zu Stamm YadA^e vergleichbare Produktion und Exposition der YadA-Varianten in WA(pYVO8-x) (x: YadA^e_i bzw. YadA^p_i) gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Dies hängt vermutlich mit der negativen Ladung der Aminosäuren AS28 (Asparaginsäure) und AS29 (Glutaminsäure) zusammen. Der Transport über die innere Membran mittels des Sec-Systems kann durch negative Ladung bzw. die Veränderung dieser bereits vorhandenen Ladung an bestimmten Stellen im zu transportierenden Protein beeinträchtigt werden (Kajava et al, 2000). Deshalb weisen alle in dieser Arbeit verwendeten YadA-Varianten nach der Signalsequenz noch fünf weitere Aminosäuren (AS26-30: NNDEL) auf. Computeranalysen mit dem Programm SignalP 4.1 (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark DTU) der Signalsequenz anderer TAAs, welche über das Sec-System durch die innere Membran transportiert werden, zeigen die Aminosäuren Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) im unmittelbaren Anschluss an die Schnittstellen der Signalsequenzen. Die Vorhersage für YadA^e (GenBank: CAA32086.1) aus *Y. enterocolitica* zeigte wie zu erwarten bei AS25 eine Schnittstelle an. Das Protein hat an den Positionen AS26, AS27 und AS29 jeweils Asparaginsäure. Bei NadA (ACM47292.1) aus *Neisseria meningitidis* wurde die Schnittstelle an Position AS23 angezeigt. An Position AS27-29 dieses Proteins befindet sich dreimal die Aminosäure Asparaginsäure. Beim TAA Hsf (AAC44560.2) aus *Haemophilus influenzae* wird die Signalsequenz bis AS51 angegeben. Die AS53-57 sind auch hier negativgeladene Aminosäuren. Die Signalsequenz des TAA BadA (AAT69970.2) aus *Bartonella henselae* umfasst die Aminosäuren AS1-48. Bei BadA ist jedoch keine negativgeladene Aminosäure unmittelbar nach der Signalsequenz zu finden.

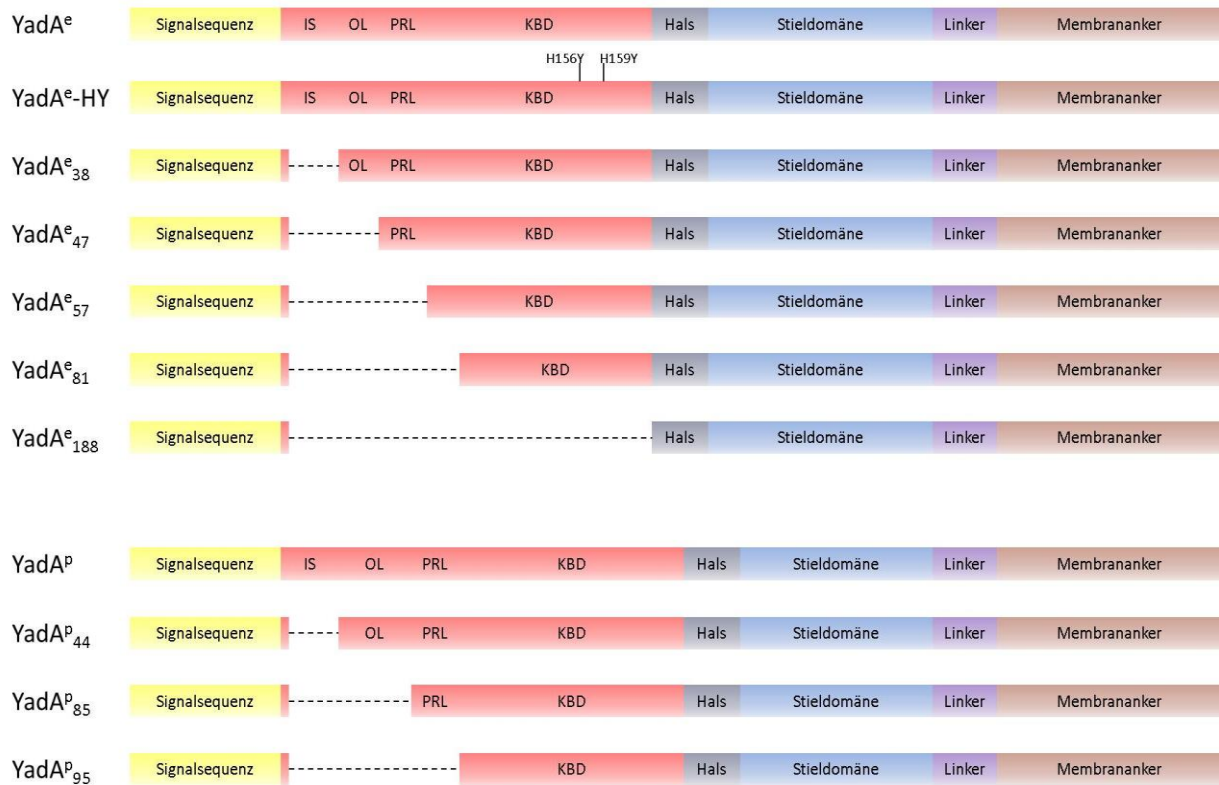


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der hergestellten und untersuchten YadA-Varianten. Schematisch-modularer Aufbau der YadA^e- und YadA^p-Varianten, die von *Y. enterocolitica* WA(pYVO8-x) generiert wurden (x: YadA^e_i (i = 38, 47, 57, 81, 188), YadA^e-HY (Substitution der Histidinreste gegen Tyrosinreste an den Positionen 156 und 159, H156Y/H159Y, (Roggenkamp et al, 1995)) und YadA^p_i (i = 44, 85, 95), dabei gibt i den deletierten Bereich von AS31 bis zur angegebene Zahl an). OL, IS und PRL bilden zusammen die NTTD (OL = Äußerer Loop, IS = Innerer Strang, PRL = Prolin-reicher Loop, KBD = postulierte Kollagenbindedomäne).

Die Stammbezeichnung WA(pYVO8-x) mit x = YadA^e_i bzw. YadA^p_i (i: Anzahl der N-terminal deletierten AS) wird im folgenden Text als Kurzform YadA^e, YadA^e_i (i = 38, 47, 57, 81 und 188), YadA^e-HY (Substitution der Histidinreste gegen Tyrosinreste an den Positionen 156 und 159, H156Y/H159Y), YadA^p, YadA^p_i (i = 44, 85 und 95) verwendet. WA(pYVΔYadA^e) wird als YadA^e-0 und WA-314 ohne pYV-Plasmid wird als WAc bezeichnet.

4.3 Herstellung und Charakterisierung von *Yersinia* WA(pYVO8-x)-Stämmen mit YadA-Varianten

Um die Produktion und korrekte Lokalisation der YadA-Varianten in *Y. enterocolitica* WA(pYVO8-x) nachzuweisen, wurden von allen Stämmen Isolate von Außenmembranproteinen (OMP) (siehe 3.2.1) angefertigt und diese mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.3) und mittels Westernblot-Analyse (siehe 3.2.5) überprüft. Da trimere YadAs auch unter stark denaturierenden Bedingungen (5 min bei 100°C) sehr stabil sind, waren sowohl in der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE als auch im Westernblot neben den Monomeren auch stets noch Oligomere nachweisbar (siehe Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4). Das Molekulargewicht der Monomere wurde mit dem Computerprogramm ProtParam (ExPASy, Bioinformatics Resource Portal) berechnet und kann der Tabelle 4.1 entnommen werden.

Tabelle 4.1: Errechnetes Molekulargewicht der YadA-Varianten. Die untersuchten Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^p_i gekennzeichnet.

Stamm	Molekulargewicht [kDa]
YadA ^e	41,5
YadA ^e -HY	41,6
YadA ^e ₃₈	40,6
YadA ^e ₄₇	39,7
YadA ^e ₅₇	38,5
YadA ^e ₈₁	36,3
YadA ^e ₁₈₈	25,9
YadA ^p	42,4
YadA ^p ₄₄	41,0
YadA ^p ₈₅	36,5
YadA ^p ₉₅	35,5

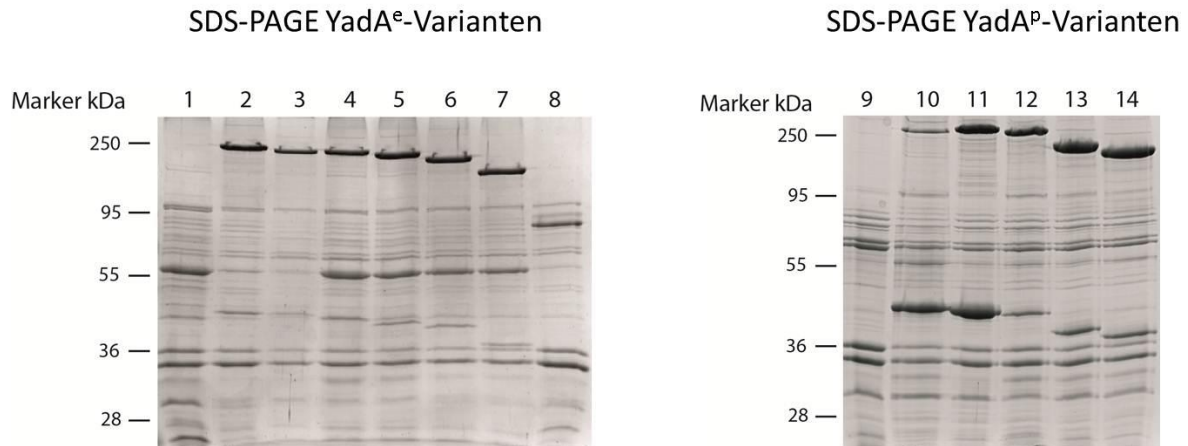


Abbildung 4.3: SDS-PAGE zum Nachweis der Lokalisation der YadA^e- und YadA^p-Varianten in den WA(pYXO8-x)-Stämmen in Außenmembranproteinpräparationen. Die Proben wurden vorher auf 100°C für 5 min erhitzt. Je Probe wurden 10 µg Protein aufgetragen. Färbung der SDS-PAGE erfolgte mittels Coomassie-Färbung. 1/9: YadA^e-0, 2/10: YadA^e, 3: YadA^e-HY, 4: YadA^e₃₈, 5: YadA^e₄₇, 6: YadA^e₅₇, 7: YadA^e₈₁, 8: YadA^e₁₈₈; 11: YadA^p, 12: YadA^p₄₄, 13: YadA^p₈₅, 14: YadA^p₉₅; Die untersuchten Stämme sind in Kurzform YadA_i^e bzw. YadA_i^p gekennzeichnet.

Im Immunoblot der OMP-Präparationen (siehe Abbildung 4.4) ist sehr gut sichtbar, dass alle YadA-Varianten in der äußeren Membran lokalisiert sind. Es wurden je Spur 10 µg Protein aufgetragen. Ebenso diente eine Coomassie-Färbung (siehe 3.2.4) der SDS-PAGE zur Überprüfung der korrekt aufgetragenen Menge an Proteinen (siehe Abbildung 4.3). Im Immunoblot zeigt sich, dass die Menge an YadA bei allen YadA-Varianten mit dem Referenzstamm YadA^e vergleichbar ist. Da alle Proben für 5 min bei 100°C vorbehandelt wurden, sind neben der trimeren Form von YadA auch die YadA-Monomere gut erkennbar. Die errechneten Molekulargewichte der Monomere stimmen sehr gut mit denen in den Immunoblots sichtbaren Banden der Monomere überein (siehe Abbildung 4.4).

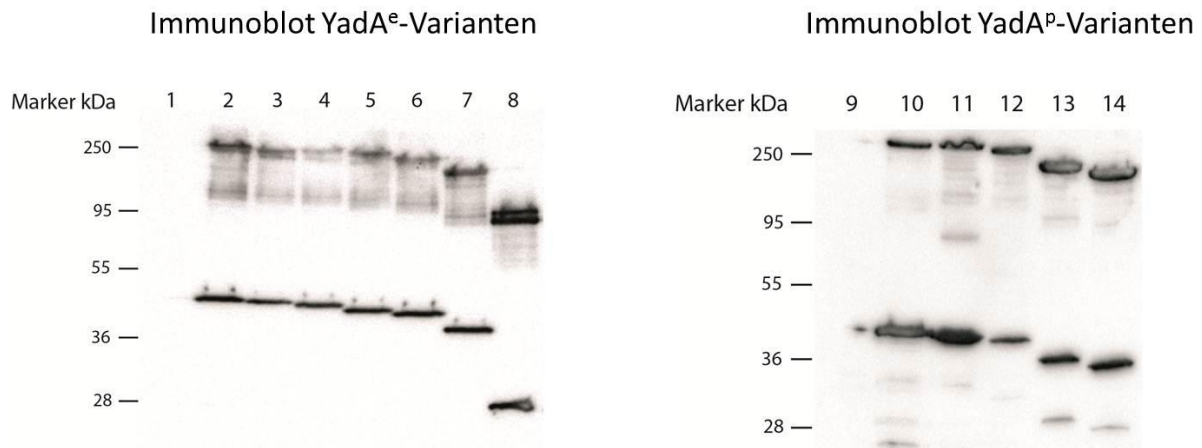


Abbildung 4.4: Immunoblot zum Nachweis der Lokalisation der YadA^e- und YadA^p-Varianten in den WA(pYXO8-x)-Stämmen in Außenmembranproteinpräparationen. Die Proben wurden vorher auf 100°C für 5 min erhitzt. Je Probe wurden 10 µg Protein aufgetragen und nach SDS-PAGE mittels Elektroblob auf eine PVDF-Membran übertragen. Als Antikörper im Immunoblot wurde der monoklonale Maus-anti-YadA-Antikörper 8D1 (1:10000) und als Sekundärantikörper ein Peroxidase-anti-Maus-IgG-Antikörper (1:5000) verwendet. 1/9: YadA^e-0, 2/10: YadA^e, 3: YadA^e-HY, 4: YadA^e₃₈, 5: YadA^e₄₇, 6: YadA^e₅₇, 7: YadA^e₈₁, 8: YadA^e₁₈₈; 11: YadA^p, 12: YadA^p₄₄, 13: YadA^p₈₅, 14: YadA^p₉₅; Die untersuchten Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^p_i gekennzeichnet.

Anschließend wurde die Produktion und Oberflächenexposition von YadA aller YadA-Varianten mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Hierfür wurden alle Stämme nach einer Fixierung mit Aceton mit einem monoklonalen Anti-YadA-Maus-Antikörper (8D1, 1:500) und in einem zweiten Schritt mit einem Alexa488-anti-Maus-Antikörper (1:300) markiert. Ebenso wurde die DNS der einzelnen Bakterien mit DAPI gefärbt. Die Bakterien wurden bei einer Vergrößerung von 1:1000 mikroskopiert. In Abbildung 4.5 ist gut erkennbar, dass sowohl der Stamm YadA^e-0 als auch der Stamm YadA^e ohne den Zweitantikörper kein Fluoreszenzsignal emittieren. Diese Proben dienen als Negativ-Kontrolle bzw. belegen die Spezifität des Erst- und Zweitantikörpers. Bei allen anderen Stämmen ist das grüne Fluoreszenzsignal, welches den Nachweis der Expression von YadA zeigt, gut sichtbar. Zudem ist erkennbar, dass nahezu alle Bakterien, welche eine DAPI-Färbung (Magenta, DNA) aufweisen, auch ein Signal für YadA zeigen (siehe Abbildung 4.5). Somit lässt sich bestätigen, dass alle Stämme ihre YadA-Varianten produzieren.

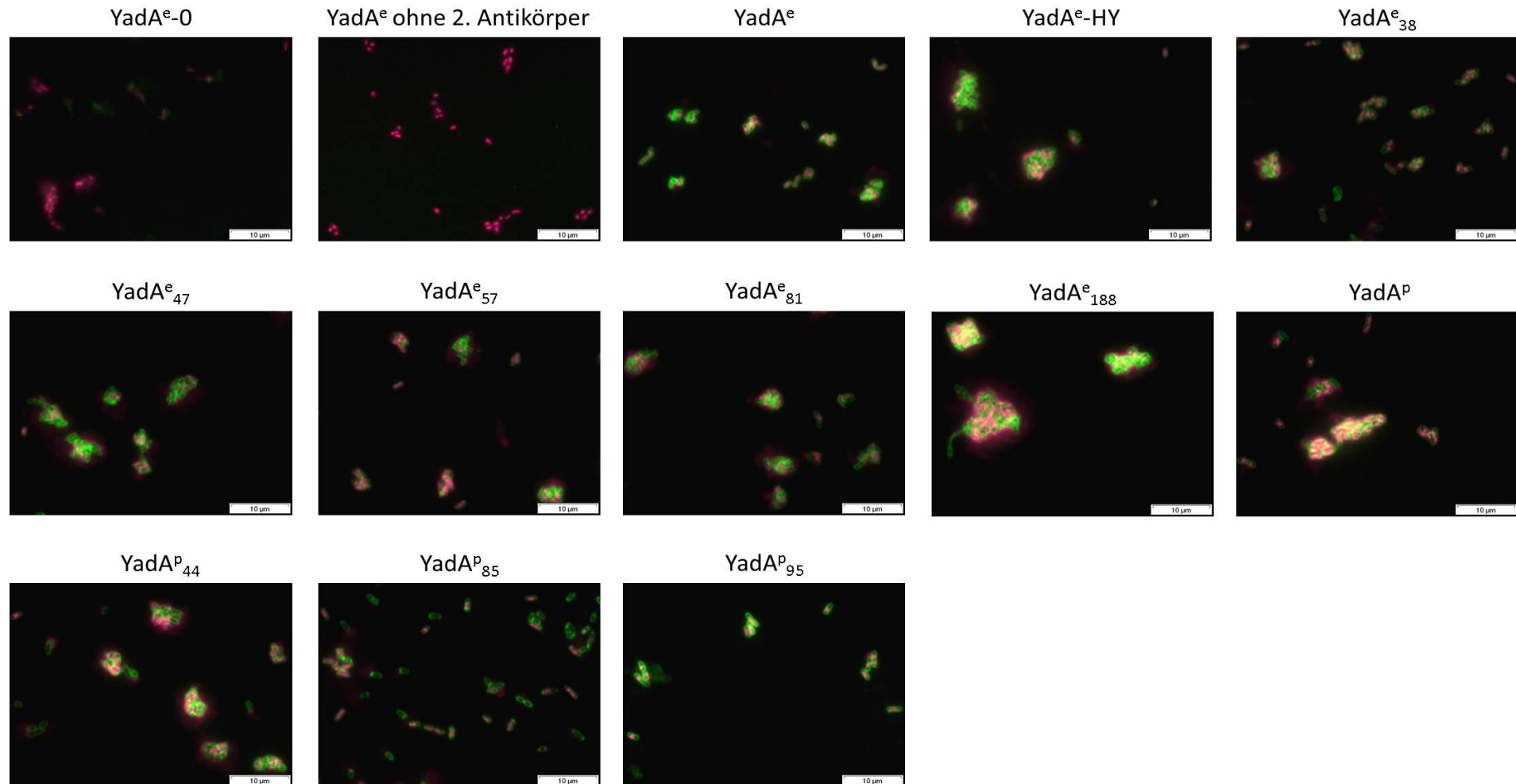


Abbildung 4.5: Immunofluoreszenzfärbung zum Nachweis von YadA der WA(pYVO8-x)-Stämme. Für die Färbung wurden die Bakterien auf einem Objektträger mit Aceton fixiert und anschließend mit einem monoklonalen Anti-YadA-Maus-Antikörper (8D1, 1:500) und einem Alexa488-anti-Maus-Antikörper (1:300) markiert. Zudem erfolgte eine Färbung der DNS mit DAPI. Grün zeigt die Antikörper-Markierung des YadAs, während die DNS-Färbung in magenta zu sehen ist. Die Größenbalken entsprechen 10 μm . Die WA(pYVO8-x)-Stämme sind durch YadA^e_i bzw. YadA^P_i gekennzeichnet. YadA^e-0 : Negativ-Kontrolle, YadA^e bzw. YadA^P : Positiv-Kontrollen. Die untersuchten Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^P_i gekennzeichnet.

4.4 Verteilung *yadA*-exprimierender Stämme in einem Dextran-PEG-Biphasensystem

Für die Bestimmung der Oberflächenhydrophilie/Oberflächenhydrophobizität der *YadA*-positiven *Yersinien*, welche die unterschiedlichen *YadA*-Varianten produzieren, wurde die Verteilung der Bakterien in einem biphasischen Dextran-PEG-Gemisch bei einem pH-Wert von 7,0 untersucht (siehe Abbildung 4.6). Während die untere Dextran-reiche Phase stark hydrophil ist, ist die obere PEG-reiche Phase hydrophob. Da eine klare Trennung der Bakteriensuspension an der Phasengrenze sich nicht einstellte, ergab sich durch den Versuchsaufbau noch eine dritte Phase, die Interphase. Die meisten *yadA*-exprimierenden Stämme reicherten sich nach kurzer Zeit in der Interphase an (siehe Tabelle 4.2): 83% der Bakterien des Stammes *YadA^e* bzw. 86% der Bakterien des Stammes *YadA^e-HY* konnten in der Interphase gefunden werden. Die *YadA*-negativen Stämme (*YadA^e-0* und *WAc*) hingegen reicherten sich stark in der hydrophoben PEG-reichen Phase an (siehe Abbildung 4.7). Hier befanden sich 47% bzw. 55% der Bakterien in der hydrophoben Phase. Dieses Verteilungsmuster konnte ebenso bei *WA(pYVO8-YadA^P₄₄)* beobachtet werden (45%).

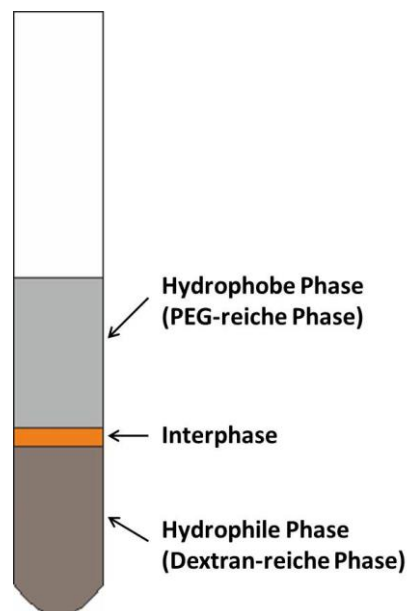


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der drei Phasen des biphasischen PEG-Dextran-Gemisches. Durch die Entmischung der hydrophoben Phase (PEG-reiche Phase) und der hydrophilen Phase (Dextran-reiche Phase) ergibt sich an der Phasengrenze eine dünne Interphase, in der eine Durchmischung beider Phasen stattfindet.

Tabelle 4.2: Relative Verteilung der untersuchten Stämme in einem biphasischen PEG-Dextran-System und errechneter pI-Wert und Gravy-Index. Die untersuchten Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet. Die Werte für pI-Wert und GRAVY-Index wurden bei den $YadA^e_i$ -Stämmen bis AS333 und bei $YadA^p_i$ bis AS343 bestimmt.

Stamm	Hydrophile Phase [%]	Interphase [%]	Hydrophobe Phase [%]	pI-Wert	pI-Wert der NTTD	Gravy-Index
WAc	6,1	38,7	55,1	-	-	-
$YadA^e-0$	6,8	46,4	46,8	-	-	-
$YadA^e$	8,3	83,3	8,4	6,19	4,42	-0,493
$YadA^e-HY$	6,7	86,3	7,0	6,07	4,42	-0,476
$YadA^e_{38}$	6,3	74,4	19,3	6,13	4,10	-0,524
$YadA^e_{47}$	6,8	75,3	17,9	6,39	4,14	-0,491
$YadA^e_{57}$	7,6	77,2	15,1	6,39	3,67	-0,510
$YadA^e_{81}$	9,0	73,2	17,8	6,33	3,67	-0,552
$YadA^e_{188}$	8,4	77,8	13,8	5,97	3,67	-0,984
$YadA^p$	8,2	68,2	23,7	6,23	8,43	-0,454
$YadA^p_{44}$	8,0	46,9	45,2	6,60	9,69	-0,457
$YadA^p_{85}$	8,5	65,7	25,8	5,66	3,57	-0,369
$YadA^p_{95}$	10,3	70,2	19,5	5,78	3,67	-0,398

Die $WA(pYVO8-YadA^e_i)$ Stämme zeigen eine geringfügig höhere Affinität für die hydrophobe Phase, als die Stämme $YadA^e$ oder $YadA^e-HY$. Im Anschluss an die Signalsequenz befindet sich ein hydrophiler Bereich (siehe Abbildung 4.8). Eine Deletion dieses Bereiches könnte zu einer erhöhten Hydrophobizität führen. Die $WA(pYVO8-YadA^p_i)$ Stämme und im Besonderen der Stamm $YadA^p_{44}$ zeigen ebenso eine höhere Hydrophobie im Vergleich zu Stamm $YadA^e$. Der Hydrophilie-Plot von $YadA^p$ zeigt direkt nach der Signalsequenz ebenfalls eine stark hydrophile Region. Dies erklärt die starke Zunahme von $YadA^p_{44}$ in der hydrophoben Phase (siehe Abbildung 4.8). In der hydrophilen Phase konnte bei allen Stämmen die geringste Anzahl an Bakterien gemessen werden. Der relative Anteil der Bakterien liegt hier nur zwischen 6,1% und 10,3%. Im Vergleich der $YadA$ -produzierenden Stämme zu den $YadA$ -negativen Stämmen WAc und $YadA^e-0$ zeigt sich, dass $YadA$ die Oberfläche hydrophiler macht.

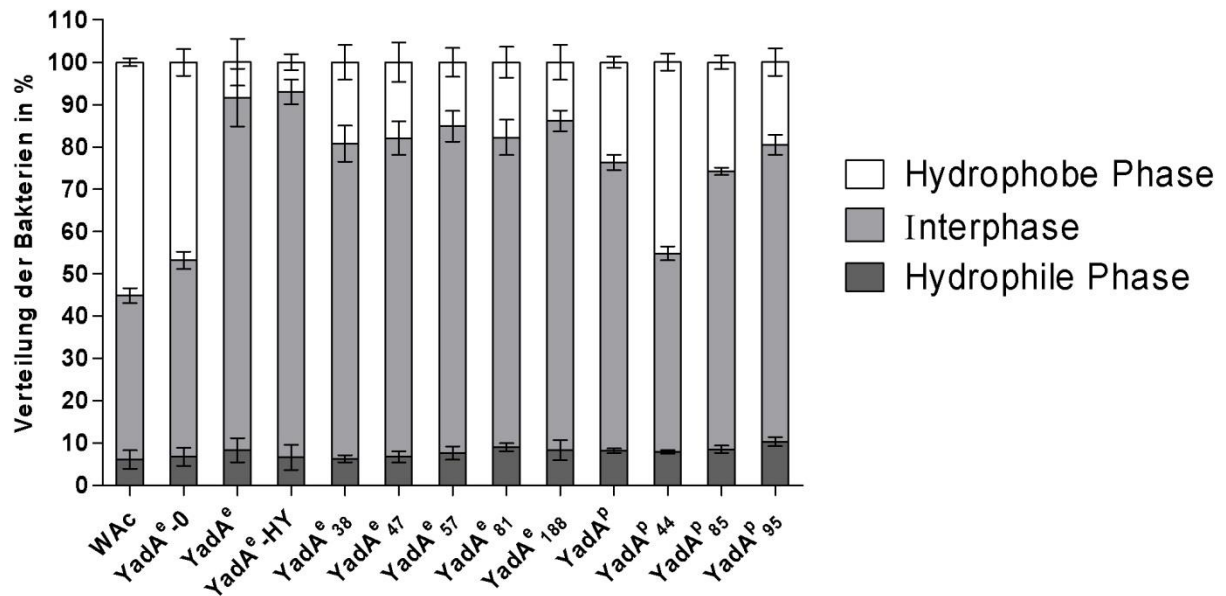


Abbildung 4.7: Relative Verteilung *yadA*-produzierender WA(pYVO8-x) Stämme in einem biphasischen PEG-Dextran System. Alle Stämme wurden bei 37°C kultiviert, auf eine OD₆₀₀ von 5 eingestellt und mit dem Dextran-PEG-Gemisch vermischt. Nach 45 min Ruhezeit wurden die obere Phase, eine Interphase und die hydrophile Phase abgenommen, 1:10 in 0,9% NaCl-Lösung verdünnt und die OD₆₀₀ bestimmt. Die Balken geben einen Durchschnittswert der relativen Verteilung aus drei unabhängigen Versuchen wieder. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^p_i gekennzeichnet.

Mit dem Bioinformatikprogramm ProtParam (ExpPASy, Bioinformatics Resource Portal) wurde der pI-Wert der jeweiligen YadA-Varianten bestimmt (siehe Tabelle 4.2). Für die Berechnungen wurden die Bereiche bis zum Membrananker (YadA^e AS25-333, YadA^p AS25-345) verwendet, um die hydrophoben Bereiche, welche mit der Membran in diesem Bereich interagieren, auszuschließen. Ebenfalls ist in Tabelle 4.2 der errechnete pI-Wert der NTTD (YadA^e AS26-57, YadA^p AS26-95) angegeben. Bei den YadA-Varianten YadA^e₅₇, YadA^e₈₁, YadA^e₁₈₈ und YadA^p₉₅ bezieht sich dieser Wert jedoch nur noch auf die AS26-30, da die restlichen Abschnitte der NTTD deletiert wurden. Auffallend sind hier vor allem die pI-Werte der NTTD von YadA^p (pI 8,43) und YadA^p₄₄ (pI 9,69). Während der Wert von YadA^p jedoch nur einen geringfügigen Einfluss auf die Verteilung im biphasischen PEG-Dextran-Gemisch (pH 7,0) hat, ist der Unterschied der relativen Verteilung bei YadA^p₄₄ deutlich ausgeprägter. Alle anderen YadA-Varianten haben einen annähernd vergleichbaren pI-Wert gegenüber dem Referenzstamm YadA^e.

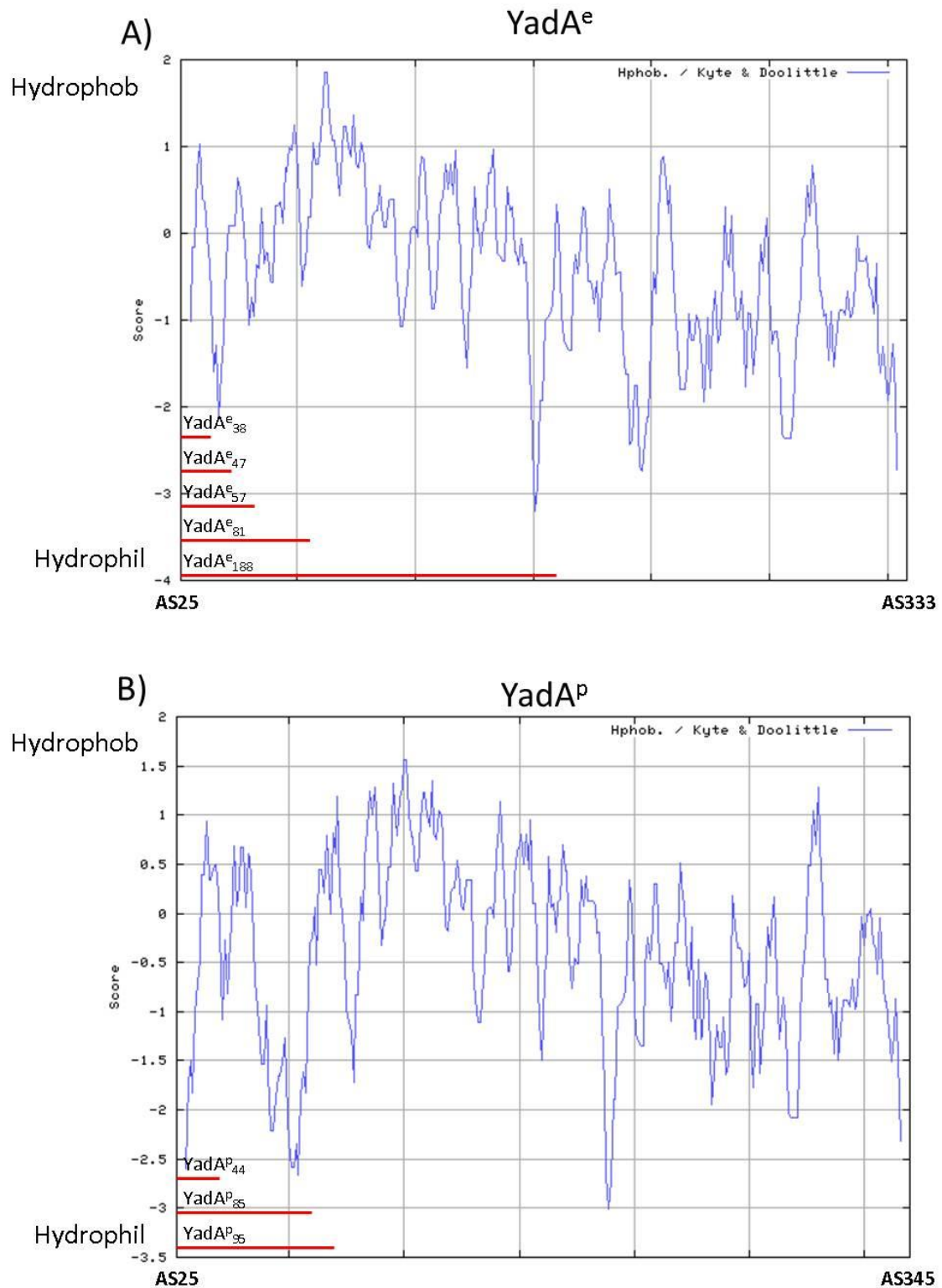


Abbildung 4.8: Hydropathie-Plots nach Kyte & Doolittle für YadA^e AS25-333 (A) und YadA^p AS25-345 (B). Die Hydropathie-Plots wurden anhand der Skala nach Kyle & Doolittle erstellt. Negative Werte zeigen hydrophile Bereiche, während positive Werte hydrophobe Bereiche anzeigen.

Zudem wurde über das Programm der GRAVY-Index (grand average of hydropathicity index) bestimmt. Dieser gibt die Löslichkeit des Proteins wieder. Ein negativer Wert gibt dabei an, dass eine Löslichkeit in hydrophilen Flüssigkeiten besteht. Ein positiver Wert hingegen zeigt eine Löslichkeit in hydrophoben Flüssigkeiten an (Kyte & Doolittle, 1982). Auch hier wurden nur die Bereiche bis zum Membrananker berechnet. Alle YadA-Varianten zeigen einen negativen GRAVY-Index. Dies zeigt eine Löslichkeit in hydrophilen Flüssigkeiten an. Dabei ist der GRAVY-Index für alle YadA^e-Varianten durchgängig negativer als für die YadA^p-Varianten. Bei allen YadA^p-Stämmen ist der Anteil in der hydrophoben Phase höher als der Anteil bei den YadA^e-Stämmen. Der durchgängig negative GRAVY-Index aller YadA-Varianten wird nicht von den experimentellen Resultaten der Zweiphasenverteilung widerspiegelt (siehe Tabelle 4.2 und Abbildung 4.7). Es wird nur eine sehr geringe Anreicherung in der hydrophilen Phase festgestellt. In Abbildung 4.8 sind die AS-Regionen nach ihrer Hydrophilie/Hydrophobie aufgetragen (ExPasy, ProtScale Kyte&Doolittle). Für YadA^e und YadA^p errechnet sich ein ähnliches Muster, jedoch mit einem niedrigeren Durchschnittswert für YadA^e gegenüber YadA^p. Die Ergebnisse könnten einen Hinweis auf die Ausrichtung von YadA ergeben.

4.5 Quantifizierung der *Yersinia*-Bindung an immobilisierte ECM-Proteine mittels ELISA

4.5.1 *Yersinia*-Bindung an immobilisiertes Kollagen Typ I und IV

Der Einfluss der Deletionen im Bereich der NTTD von YadA auf die Bindung an immobilisiertes Kollagen wurde mittels ELISA quantifiziert. Dafür wurde eine Mikrotiterplatte mit Kollagen beschichtet und anschließend mit den Bakterien inkubiert. Der an immobilisierte ECM-Proteine gebundene Yersinienanteil wurde mittels dem YadA-spezifischem, murinen, monoklonalen Antikörper 8D1 und einem Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper und anschließender chemischer Umsetzung von OPD-Substrat photometrisch quantifiziert. Sowohl für Kollagen Typ I als auch Kollagen Typ IV wurden 0,1 µg/ml Protein für die Beschichtung der Platten eingesetzt. Die eingesetzte Proteinmenge wurde dabei in Vorversuchen optimiert.

Da in diesem Test die Bindungsfähigkeit von Bakterien und nicht von YadA-Proteinen in Lösung vergleichend bestimmt wird, können keine Bindungsassoziationskonstanten für YadA ermittelt werden. Auch muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle Yersinien einer

Population eine gleichmäßige YadA-Oberflächendichte haben und dass die Yersinien-Suspensionen der verschiedenen Stämme nicht den gleichen Dispersionsgrad aufgrund von Aggregatbildung haben. Es werden deshalb die Bindungsfähigkeiten an immobilisiertes ECM-Protein im ELISA als Extinktionswerte des umgesetzten Substrats (E_{491} -Werte) vergleichend dargestellt.

Für Kollagen Typ I und Kollagen Typ IV ergibt sich für die jeweiligen Stämme mit den YadA-Varianten eine sehr ähnliche Bindungsfähigkeit, wobei die Bindung an Kollagen Typ IV höhere E_{491} -Werte ergibt, als bei Kollagen Typ I. Durch die jedoch höheren Standardfehler bei Kollagen Typ IV ergeben sich hier jedoch weniger signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen YadA-Varianten-Stämmen als bei Kollagen Typ I (siehe Abbildung 4.9).

Die höchste Bindungsfähigkeit, sowohl an Kollagen Typ I als auch Typ IV, zeigt der Stamm $YadA^e$ im Vergleich zu den übrigen YadA-Varianten-Stämmen. Auffällig bei $YadA^e_i$ -Stämmen ist der starke Abfall der Bindungsfähigkeit bzw. der E_{491} -Werte von ~ 0.6 auf ~ 0.4 bei Kollagen Typ I bzw. von ~ 0.9 auf ~ 0.65 bei Kollagen Typ IV zwischen Stamm $YadA^e$ und Stamm $YadA^e_{38}$. Hier scheinen die AS30-38 in der NTTD entscheidend zu sein, denn weitere Verkürzungen (z.B. von $YadA^e_{47}$ bis $YadA^e_{81}$) führen zu keinem weiteren Abfall der Bindungsfähigkeit. Erst wenn der gesamte „Kopf“, in welcher sich auch die Kollagenbindedomäne befindet, entfernt wird ($YadA^e_{188}$), wird die Yersinia-Bindung an Kollagen nicht mehr nachweisbar. Der Stamm $YadA^e_{188}$ diente bei den ELISA-Experimenten stets als Negativ-Kontrolle (siehe Abbildung 4.9).

Innerhalb der $YadA^p$ -Reihe zeigt der Stamm $YadA^p$ überraschenderweise die geringste Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen im Vergleich zu den Stämmen $YadA^p_{44}$, $YadA^p_{85}$ bzw. $YadA^p_{95}$ (siehe Abbildung 4.9). Noch deutlicher wird die Zunahme der Bindungsfähigkeit von $YadA^p_i$ -Stämmen mit dem Verkürzungsgrad des $YadA^p$ für immobilisiertes Kollagen Typ IV: Die Bindungsfähigkeit bzw. der E_{491} -Wert steigt um das dreifache für den Stamm $YadA^p_{95}$ bezogen auf den Stamm $YadA^p$.

Zusammenfassend führen zunehmende Deletionen der NTTD bei $YadA^e_i$ -Stämmen zur Abnahme der Kollagenbindungsfähigkeit und bei $YadA^p_i$ -Stämmen zur Zunahme der Kollagenbindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen Typ I und Typ IV. Wahrscheinlich ist die zusätzliche Region AS57-88 der NTTD bei $YadA^p$ für die Unterschiede zwischen $YadA^e_i$ und $YadA^p_i$ dafür verantwortlich.

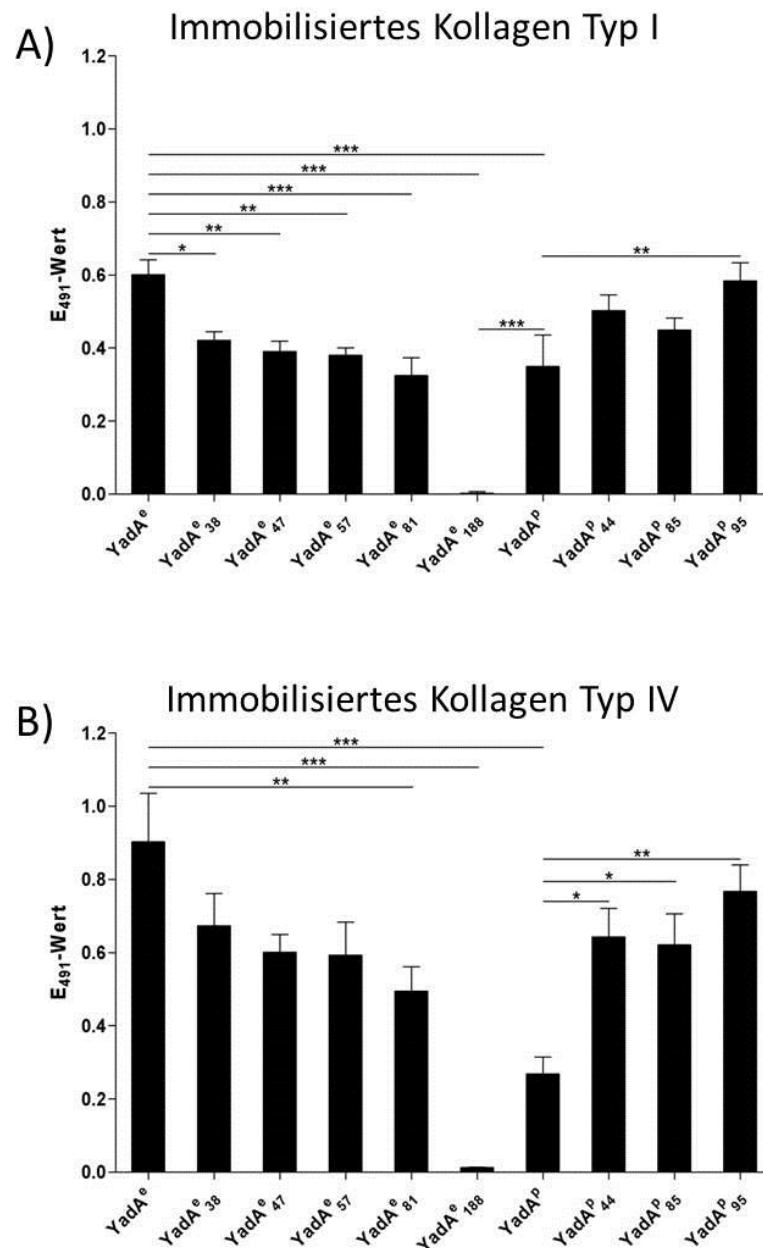


Abbildung 4.9: Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisiertes Kollagen Typ I (A) und Kollagen Typ IV (B). Bestimmung der Bindungsfähigkeit von WA(pYVO8-x) an (A) immobilisiertes Kollagen Typ I (0,1 µg/ml) und (B) immobilisiertes Kollagen Typ IV (0,1 µg/ml) mittels ELISA und photometrischer Quantifizierung (Extinktionswerte des umgesetzten Substrats, E₄₉₁-Wert). Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform Yada^e_i bzw. Yada^p_i gekennzeichnet. (p) ≤ 0,05 = *, (p) ≤ 0,01 = ** und (p) ≤ 0,005 = ***

4.5.2 *Yersinia*-Bindung an immobilisiertes Laminin

Für die Untersuchungen der *Yersinia*-Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Laminin wurden die Mikrotiterplatten mit 1,0 µg/ml Laminin beschichtet. Die Menge an immobilisiertem Laminin wurde durch Vorversuche optimiert.

Für die Bindung der verschiedenen *Yersinia*-Stämme WA(pYVO8-x) an Laminin ergibt sich ein anderes Bindungsverhalten als für die Bindung an Kollagen (siehe Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10). Zwar zeigt auch hier der Stamm $YadA^e$ die höhere Bindungsfähigkeit (E_{491} -Wert), jedoch nimmt die Bindungsfähigkeit der $YadA^e_i$ -Stämme mit dem NTTD-Verkürzungsgrad von $YadA^e$ kontinuierlich ab. Der „kopfloste“ $YadA^e_{188}$ -Stamm zeigt auch hier keine nachweisliche Bindung, was darauf hinweist, dass die Bindung an Laminin ebenfalls durch die Kopfregion vermittelt wird. Die Bindungsfähigkeit der $YadA^P_i$ -Stämme an immobilisiertes Laminin ist für den $YadA^P$ -Stamm geringer als für die Stämme mit $YadA^P$ -Varianten. Auffällig ist, dass der Stamm $YadA^P_{44}$ gegenüber den anderen beiden $YadA^P$ -Varianten eine deutlich höhere Bindungsfähigkeit an Laminin hat.

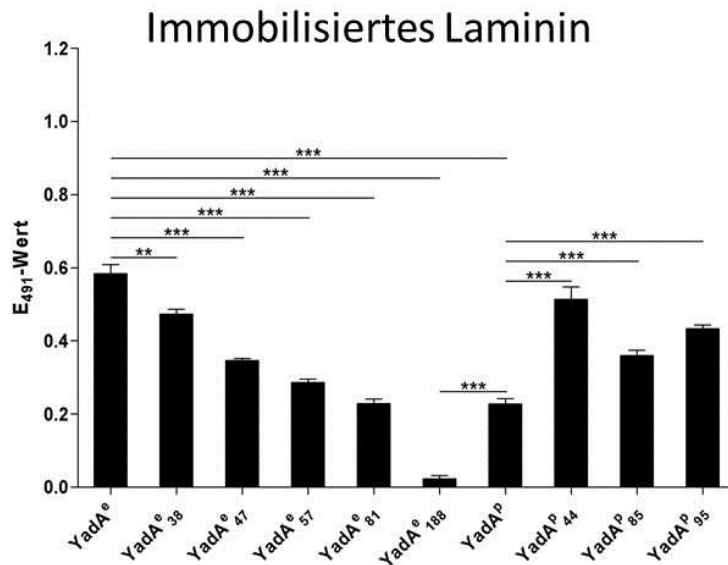


Abbildung 4.10: Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisiertes Laminin. Bestimmung der Bindungsfähigkeit von WA(pYVO8-x) an immobilisiertes Laminin (1,0 $\mu\text{g/ml}$) mittels ELISA und photometrischer Quantifizierung (Extinktionswerte des umgesetzten Substrats, E_{491} -Wert). Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^P_i$ gekennzeichnet. ($p \leq 0,05 = *$, ($p \leq 0,01 = **$ und ($p \leq 0,005 = ***$

4.5.3 *Yersinia*-Bindung an immobilisiertes Fibronectin und immobilisierte Fibronectin-Fragmente

Für Experimente zur *Yersinia*-Bindungsfähigkeit an Fibronectin wurden die Mikrotiterplatten mit 10 $\mu\text{g/ml}$ pFn oder Fibronectin-Fragmenten (siehe Abbildung 4.11) beschichtet. Die Menge an Fibronectin zur Beschichtung der Platten wurde durch Vorversuche optimiert.

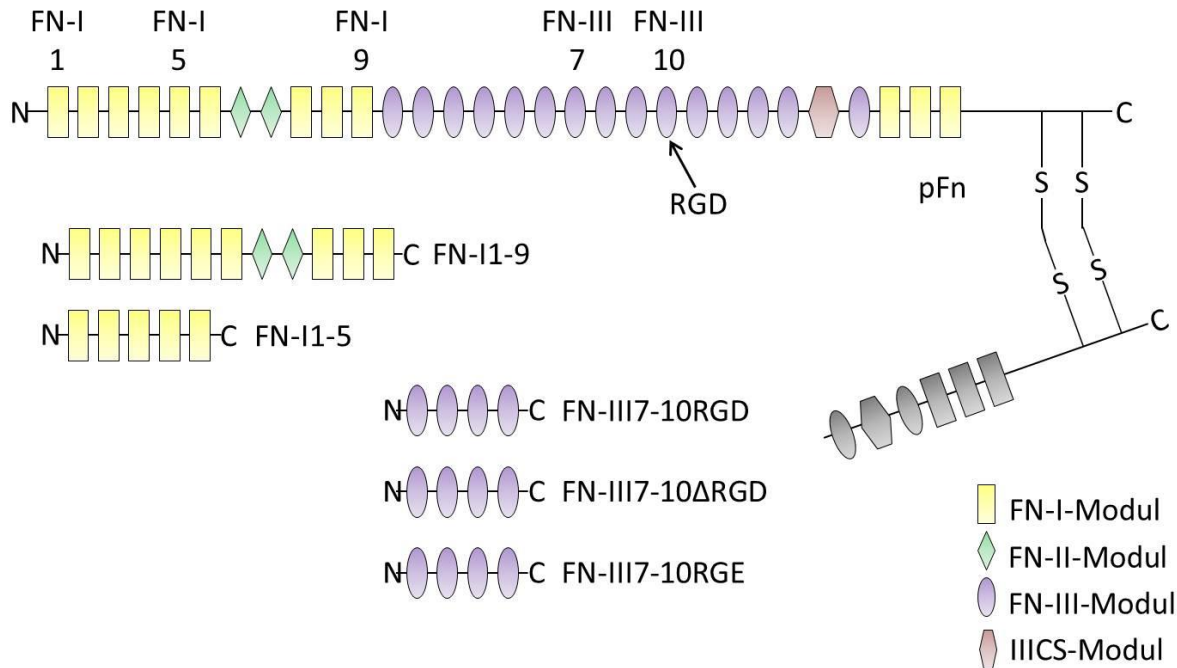


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der modularen Strukturen von Plasmafibronektin (pFn) und pFn-Fragmenten. Oben: Modulare Struktur des dimeren pFn (es ist nur ein vollständiges Monomer dargestellt). Es folgen die untersuchten pFn-Fragmente (Monomere): Während FN-I1-9 noch eine Kollagenbindedomäne aufweist, fehlt diese bei FN-I1-5. Zudem wurden die FN-III7-10-Fragmente FN-III7-10RGD, FN-III7-10 Δ RGD und FN-III7-10RGE verwendet, welche sich nur im RGD-Motiv unterscheiden. Dieses Motiv vermittelt die Bindung an Integrine.

Die Stämme Yada^e und Yada^p zeigen unter den angegebenen experimentellen Bedingungen eine ähnliche Bindungsfähigkeit an Fibronektin. Auffällig ist aber, dass auch der „kopflöse“ Yada^e₁₈₈-Stamm noch eine relativ hohe pFn-Bindungsfähigkeit hat (E_{491} -Wert ca. 50% von Stamm Yada^e). Die Stämme Yada^e und Yada^p zeigen jedoch signifikant bessere Bindung an immobilisiertes pFn (siehe Abbildung 4.12 A) als der Stamm Yada^e₁₈₈. Die Bindung von Stamm Yada^e₁₈₈ wird dabei durch das Fibronektinfragment FN-III7-10 vermittelt. Dabei ist die Bindung nicht abhängig von der RGD-Sequenz, welche für die Bindung an Integrine verantwortlich ist (siehe Abbildung 4.12 B). Zudem ist die Bindung an FN-III7-10 nicht von der Kopfregeion von Yada^e abhängig, da kein signifikanter Unterschied in der Bindungsfähigkeit zwischen den Stämmen Yada^e und Yada^e₁₈₈ gemessen werden kann. Auch der Stamm Yada^e-HY zeigt eine ähnliche Bindungsfähigkeit an FN-III7-10 wie die Stämme Yada^e und Yada^e₁₈₈. Jedoch zeigt die Bindung an die Fragmente FN-III7-10 bei Stamm Yada^e einen niedrigeren E_{491} -Wert als bei immobilisiertem pFn.

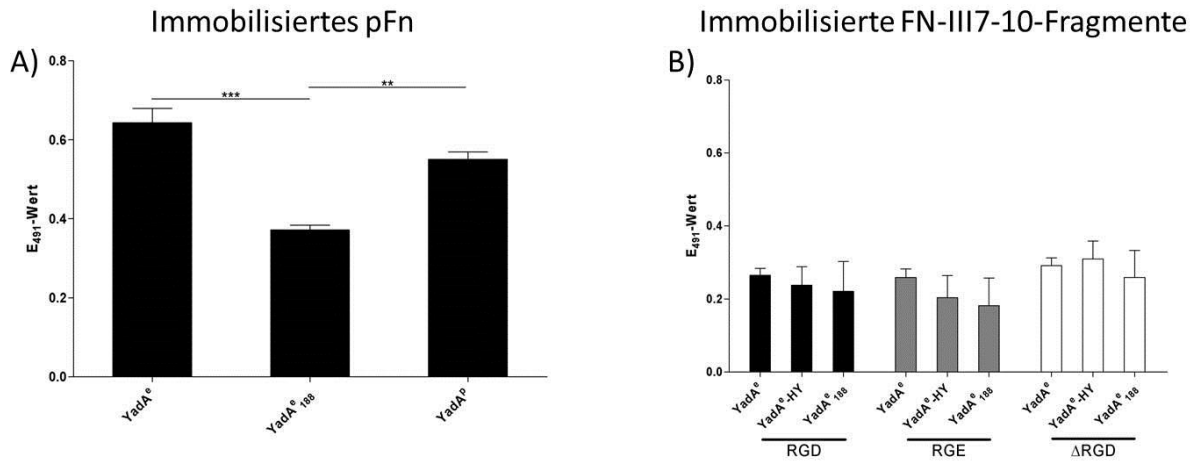


Abbildung 4.12: Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisiertes pFn (A) und immobilisierte FN-III7-10-Fragmente (B). Bestimmung der Bindungsfähigkeit von WA(pYVO8-x) an (A) immobilisiertes pFn (10 μ g/ml) und (B) immobilisierte FN-III7-10 (10 μ g/ml) mittels ELISA und photometrischer Quantifizierung (Extinktionswerte des umgesetzten Substrats, E_{491} -Wert). Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e$ bzw. $YadA^P$ gekennzeichnet. ($p \leq 0,05 = *$, ($p \leq 0,01 = **$ und ($p \leq 0,005 = ***$

Bisher wurden keine Bindestellen für TAAs an Fibronectin lokalisiert. Jedoch konnte für verschiedene bakterielle Adhäsine eine Interaktion mit den Fragmenten FN-II-5 bzw. FN-II-9 gezeigt werden (Henderson et al, 2011). Deshalb wurde die Bindungsfähigkeit der Stämme $YadA^e$ und $YadA^P$ an immobilisierte pFn-Fragmente untersucht. Eine hohe Bindungsfähigkeit für die immobilisierten Fragmente FN-II-5 und FN-II-9 wurde für die Stämme $YadA^e$, $YadA^P$ und $YadA^{P_{44}}$ nachgewiesen (siehe Abbildung 4.13). Die übrigen $YadA$ -Varianten zeigen nur schwache Bindungsfähigkeiten. Wie für die Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen und Laminin zeigte der Stamm $YadA^{P_{44}}$ auch für die immobilisierten pFn-Fragmente eine höhere Bindungsfähigkeit im Vergleich zu Stamm $YadA^P$.

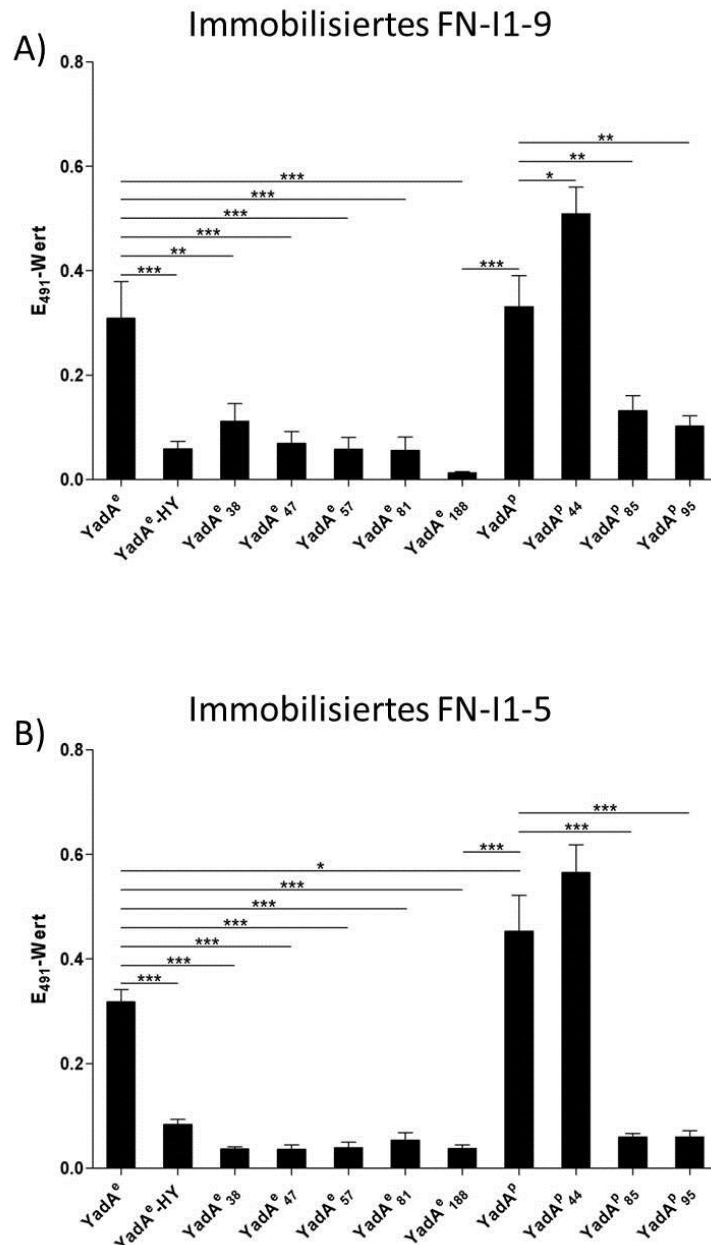


Abbildung 4.13: Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisierte FN-I1-9- (A) und FN-I1-5-Fragmente (B). Bestimmung der Bindungsfähigkeit von WA(pYVO8-x) an (A) immobilisierte FN-I1-9-Fragmente (10 $\mu\text{g/ml}$) und (B) immobilisierte FN-I1-5-Fragmente (10 $\mu\text{g/ml}$) mittels ELISA und photometrischer Quantifizierung (Extinktionswerte des umgesetzten Substrats, E_{491} -Wert). Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^P_i gekennzeichnet. ($p \leq 0,05 = *$, ($p \leq 0,01 = **$ und ($p \leq 0,005 = ***$

4.5.4 Versuche zur Inhibierung der *Yersinia*-Bindung an immobilisierte ECM-Proteine durch $(\text{POG})_{10}$

Da sowohl Kollagen als auch Fibronectin (zumindest teilweise) in der YadA-Kopffregion binden, wurde überprüft, ob an YadA gebundene ECM-Moleküle die Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen oder $(\text{POG})_{10}$ bzw. FN-I1-5 beeinflusst. Dafür wurde neben

Kollagen Typ I auch das synthetische Peptid (POG)₁₀ für Bindungsversuche verwendet, da (POG)₁₀ als Kollagen-Mimetikum die Yersinia-Bindung an immobilisiertes Kollagen Typ I inhibieren kann (siehe Gramlich, 2014). (POG)₁₀ besteht aus zehn Wiederholungen des Tripeptids Prolin-Hydroxyprolin-Glycin, welches ein häufig vorkommendes Motiv in Kollagen ist und spontan helikale Trimere (((POG)₁₀)₃) bildet. Für die Inhibierungsexperimente wurde das FN-11-5-Fragment gewählt, da dies nicht über die Kollagenbindedomäne verfügt und somit auch nicht an Kollagen binden sollte. Die Mikrotiterplatten wurden zunächst mit 0,1 µg/ml Kollagen Typ I oder 0,1 µg/ml (POG)₁₀ (siehe Abbildung 4.14) bzw. 10 µg/ml FN-11-5 (siehe Abbildung 4.15) beschichtet. Die Bakterien wurden mit steigenden Konzentrationen von FN-11-5, (POG)₁₀ oder Kollagen Typ I vorinkubiert (siehe Methodenteil 3.4.2). Da allerdings nur die Stämme YadA^c, YadA^p und YadA^p₄₄ Bindungsfähigkeit an FN-11-5 zeigten, wurden nur diese drei Stämme getestet.

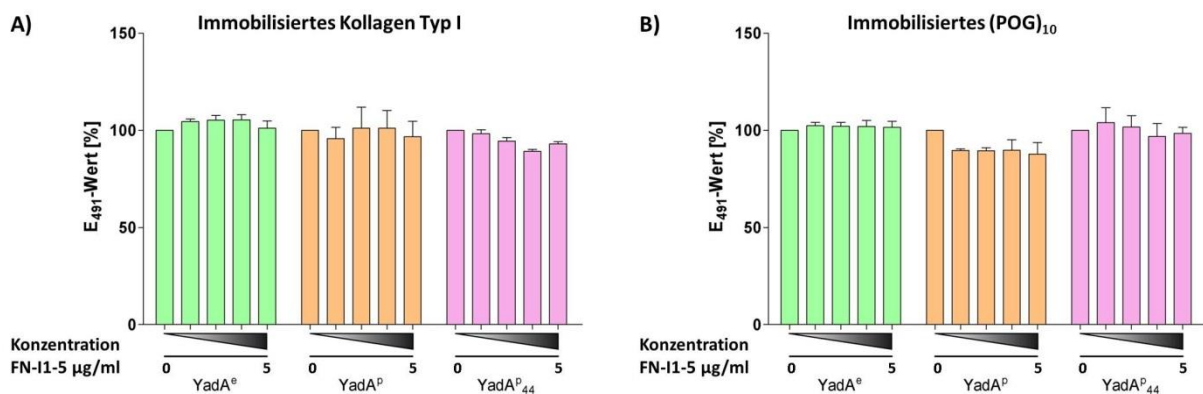


Abbildung 4.14: Inhibierung der Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisiertes Kollagen Typ I (A) bzw. (POG)₁₀ (B) nach Vorinkubation der Yersinien mit ansteigender Konzentration von FN-11-5. Bestimmung der Bindungsfähigkeit von WA(pYVO8-x) an (A) immobilisiertes Kollagen Typ I (0,1 µg/ml) und (B) immobilisiertes (POG)₁₀ (0,1 µg/ml) mittels ELISA und photometrischer Quantifizierung (Extinktionswerte des umgesetzten Substrats, E₄₉₁-Wert). Die Yersinien-Stämme wurden zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen an FN-11-5 (0 µg/ml, 0,04 µg/ml, 0,2 µg/ml, 1,0 µg/ml und 5,0 µg/ml) für 15 min bei 37°C vorinkubiert. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform als YadA^c bzw. YadA^p_i gekennzeichnet.

Nach diesem Protokoll ist FN-11-5 nicht in der Lage die Bindung von Yersinien an Kollagen Typ I oder (POG)₁₀ zu beeinflussen (siehe Abbildung 4.14).

In der umgekehrten Versuchsanordnung mit immobilisiertem FN-11-5 und mit Kollagen- bzw. (POG)₁₀-vorbeschichteten Yersinien konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung festgestellt werden (siehe Abbildung 4.15). Bei allen drei Stämmen zeigt sich eine stetig

abnehmende Bindungsfähigkeit an das immobilisierte Fibronektinfragment mit zunehmender Konzentration von Kollagen Typ I als Inhibitor (siehe Abbildung 4.15 A) Eine Reduktion der Yersinia-Bindungsfähigkeit an immobilisiertes FN-I1-5 zeigt sich auch für die Stämme $YadA^P$ und $YadA^{P_{44}}$ bei $(POG)_{10}$ -Vorinkubation. Auch hier nimmt die Bindungsfähigkeit an immobilisiertes FN-I1-5 mit steigender Konzentration an $(POG)_{10}$ stetig ab (siehe Abbildung 4.15 B). Im Vergleich dazu nimmt aber die Bindungsfähigkeit des $(POG)_{10}$ -vorbeschichteten Stammes $YadA^e$ mit steigender Konzentration (bis 1 $\mu\text{g/ml}$) von $(POG)_{10}$ an immobilisiertes FN-I1-5 zu. Offensichtlich wird durch die Bindung von $(POG)_{10}$ an $YadA^e$ die Bindung des $YadA^e$ -Stammes an immobilisiertes FN-I1-5 aktiviert bzw. die Binde-region für FN-I1-5 „demaskiert“.

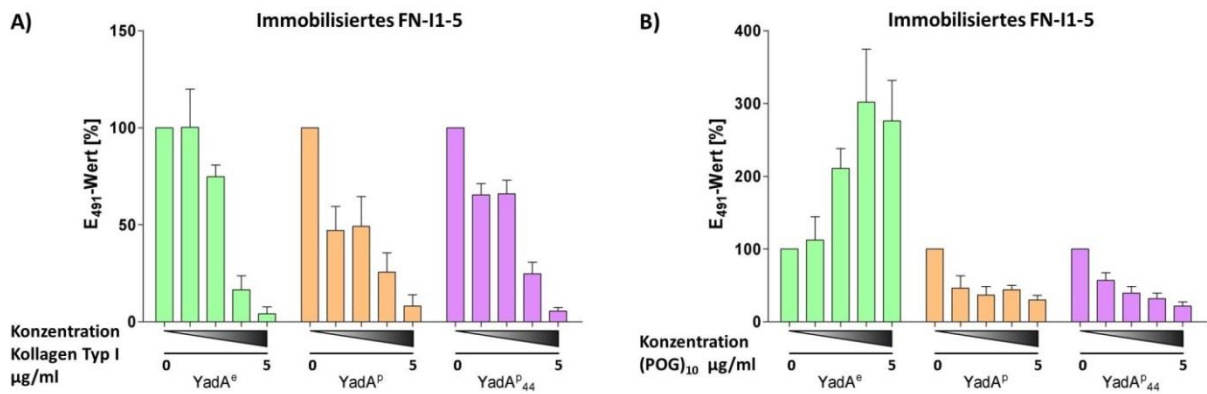


Abbildung 4.15: Inhibition der Bindungsfähigkeit von Yersinien an immobilisiertes FN-I1-5 nach Vorinkubation der Yersinien mit ansteigender Konzentration von Kollagen Typ I (A) bzw. $(POG)_{10}$ (B). Bestimmung der Bindungsfähigkeit von WA(pYVO8-x) an immobilisiertes FN-I1-5 (10 $\mu\text{g/ml}$) mittels ELISA und photometrischer Quantifizierung (Extinktionswerte des umgesetzten Substrats, E_{491} -Wert). Die Yersinien-Stämme wurden zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen an (A) Kollagen Typ I bzw. (B) $(POG)_{10}$ (0 $\mu\text{g/ml}$, 0,04 $\mu\text{g/ml}$, 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 1,0 $\mu\text{g/ml}$ und 5,0 $\mu\text{g/ml}$) für 15 min bei 37°C vorinkubiert. Die Yersinien-Stämme sind als Kurzform $YadA^e$ bzw. $YadA^P$ gekennzeichnet.

4.6 Durchflusszytometrie

4.6.1 Autoagglutinationsverhalten von WA(pYV08-x)-Stämmen

YadA ist ein multifunktionelles Protein. Eine dieser Funktionen ist die Vermittlung von Autoagglutination/Aggregation, wodurch sich Bakterienaggregate bilden (Phänotyp: Agg⁺). Durch die Veränderung der Kopfregion kann diese Funktion beeinflusst werden. Deshalb wurde der Einfluss der Deletion von Teilen der NTTD auf die bakterielle Aggregation auch für die YadA-Varianten untersucht.

Hierfür wurde zunächst ein modifizierter Test nach (Laird & Cavanaugh, 1980) durchgeführt (siehe 3.1.19). Alle pYV-Plasmid positiven Stämmen, also auch Stamm YadA^e-0, zeigten in diesem Versuch eine Aggregation der Bakterien (deutliches Sediment am Boden des Reagenzglases und klares Medium darüber). Der pYV-Plasmid-negative Stamm WAc hingegen zeigte eine homogene Trübung des Mediums und keine Bildung von Agglutination am Boden des Reagenzglases (Agg⁻). Da jedoch der Unterschied der Deletionen im Bereich der NTTD des YadA untersucht werden sollte, wurden die experimentellen Bedingungen leicht geändert. Die Bakterien wurden nicht statisch, sondern bei 180 U/min über Nacht (16 h/37°C) inkubiert. Hier konnten nun deutliche Aggregationsunterschiede bei den YadA-Varianten festgestellt werden. So zeigte der Stamm YadA^e-0 eine homogene Trübung des Mediums und keine Sedimentbildung, wie zuvor WAc bei den statischen Kulturbedingungen (Agg⁻). Ebenso zeigten die Stämme YadA^e₃₈, YadA^p₈₅ und YadA^p₉₅ einen ähnlichen Agg⁻-Phänotyp (siehe Tabelle 4.3). Bei allen übrigen Stämmen war eine deutliche Sedimentbildung und klares Medium im Überstand nach der Inkubationszeit feststellbar. Eine Besonderheit bei diesen Stämmen stellt jedoch Stamm YadA^e-HY dar. Dieser Stamm zeigt eine extrem starke Aggregation. Nach leichtem schütteln der Reagenzgläser verteilte sich das Sediment bei allen Stämmen mit Sedimentbildung außer bei Stamm YadA^e-HY gleichmäßig unter leichter Flockung im Medium. Der Stamm YadA^e-HY zeigte dagegen eine deutliche Flockenbildung.

Tabelle 4.3: Modifizierter Aggregationstest nach Laird & Cavanaugh (1980) der WA(pYVO8-x)-Stämme und Stamm WAc. Die untersuchten Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet. Legende: \emptyset keine Aggregation, + schwache Aggregation, ++ starke Aggregation, +++ sehr starke Aggregation nach visueller Auswertung

Stamm	Aggregation bei 37°C 16h bei 180 U/min
WAc	\emptyset
$YadA^e\text{-}0$	\emptyset
$YadA^e$	++
$YadA^e\text{-}HY$	+++
$YadA^e_{38}$	+
$YadA^e_{47}$	++
$YadA^e_{57}$	++
$YadA^e_{81}$	++
$YadA^e_{188}$	++
$YadA^p$	++
$YadA^p_{44}$	++
$YadA^p_{85}$	\emptyset
$YadA^p_{95}$	+

Um den Einfluss der Deletionen der NTTD der Kopfreion des $YadA$ auf die Aggregation in Suspension näher zu untersuchen, wurde die Größe der Bakterienagglomerate mittels Durchflusszytometer bestimmt. Hierfür wurde die Lichtstreuung des „Forward-scatters“ verwendet. Diese Streuwerte geben die mittlere Größe der lichtstreuenden Partikel („Durchmesser“ eines Kugelmodells) an. In der Auswertung der Durchflusszytometriedaten werden diese Werte gemittelt und als FSC-Mittelwert angegeben und im nachfolgenden auch als solche verwendet (Davey & Kell, 1996; Fulwyler, 1965; Scheper et al, 1984). Aus dem „Durchmesser“ (Kugelmodell) wiederum kann abgeleitet werden, ob es sich um ein einzelnes Bakterium oder ein Bakterienaggregat handelt. Je höher also der FSC-Mittelwert ist, desto größere Bakterienaggregate befinden sich in der Suspension. Aufgrund der Stäbchenform der Bakterien und des veränderten Volumens während des Wachstums ergeben sich zunehmend größere Aggregate (heterogene Aggregation). Die Streuwertkurven zeigen die Bildung von Bakterienaggregaten durch „Schulterbildung“ (siehe Abbildung 4.16).

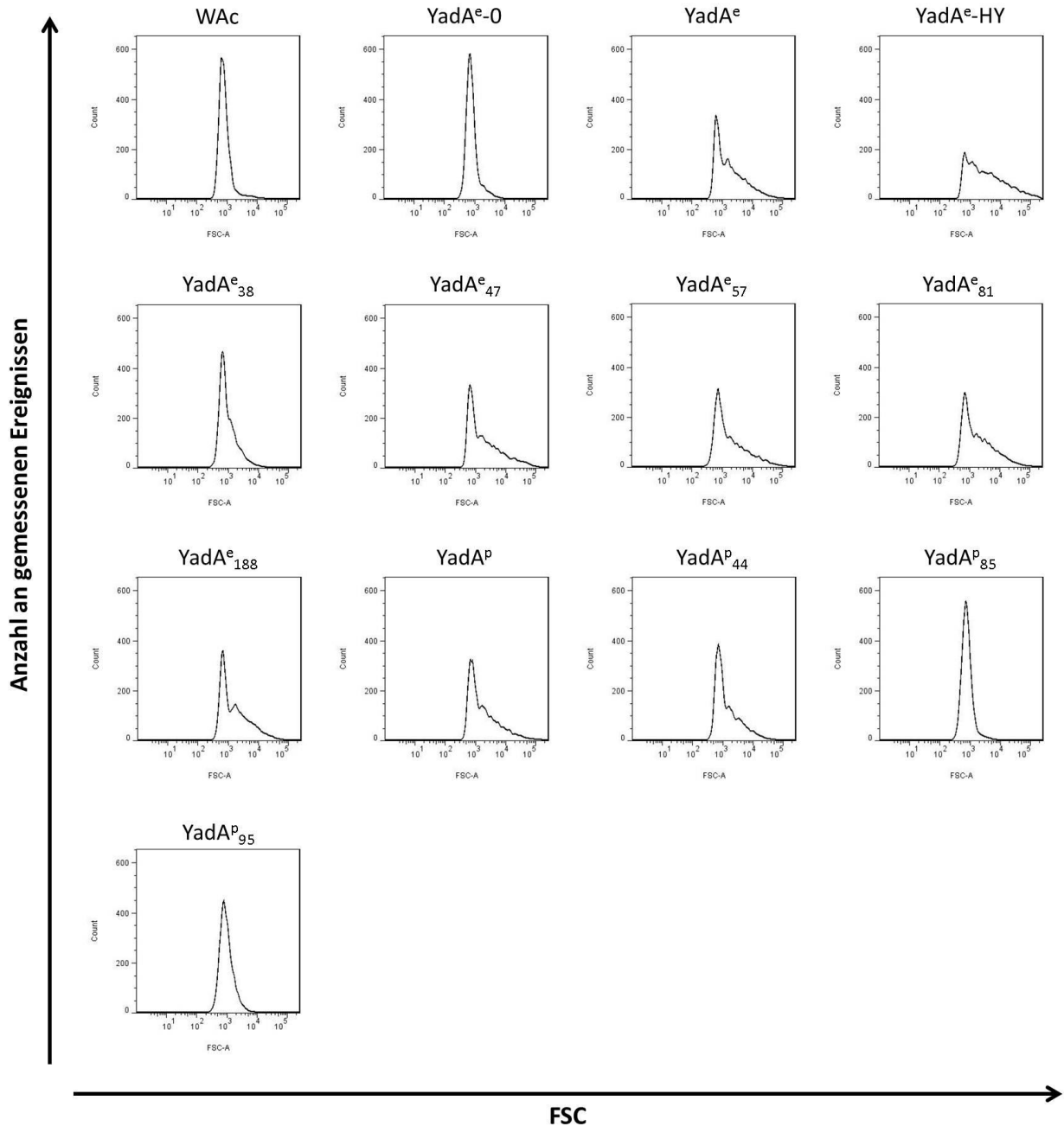


Abbildung 4.16: Histogramme der Autoagglutinate der WA(pYVO8-x)-Stämme. Die Histogramme zeigen die Anzahl der gemessenen Ereignisse in Abhängigkeit des FSC-Wertes. Für jeden Stamm wurde dafür exemplarisch ein repräsentatives Histogramm aus einem von fünf unabhängigen Versuchen gewählt. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet.

Die Veränderung der Autoagglutination hinsichtlich Anzahl und Größe der Bakterienaggregate zeigt sich in den Histogrammen (siehe Abbildung 4.16). Hier zeigen die Stämme WAc, $YadA^e-0$, $YadA^p_{85}$ und $YadA^p_{95}$ eine typisch fast symmetrische Glockenkurve. Diese Verteilung zeigt die Streuwertverteilung von stäbchenförmigen Einzelbakterien. Bei Stamm $YadA^e_{38}$ zeigen sich bereits erste Aggregate durch die Schulter in Richtung höherer

Streuwerte. Die Stämme $YadA^e$, $YadA^e_{47}$, $YadA^e_{57}$, $YadA^p$ und $YadA^p_{44}$ zeigen alle sehr ähnliche Histogramme. Zusammen mit der statistischen Auswertung des FSC-Mittelwertes zeigt dies, dass hier keine Veränderung in den Autoagglutinationseigenschaft der jeweiligen $YadA$ -Varianten vorhanden ist. Der Stamm $YadA^e$ -HY hingegen hat ein stark verändertes Histogramm im Vergleich zu Stamm $YadA^e$. Hier ist ersichtlich, dass eine höhere Anzahl an Bakterienaggregaten und weniger Einzelbakterien gemessen wurde.

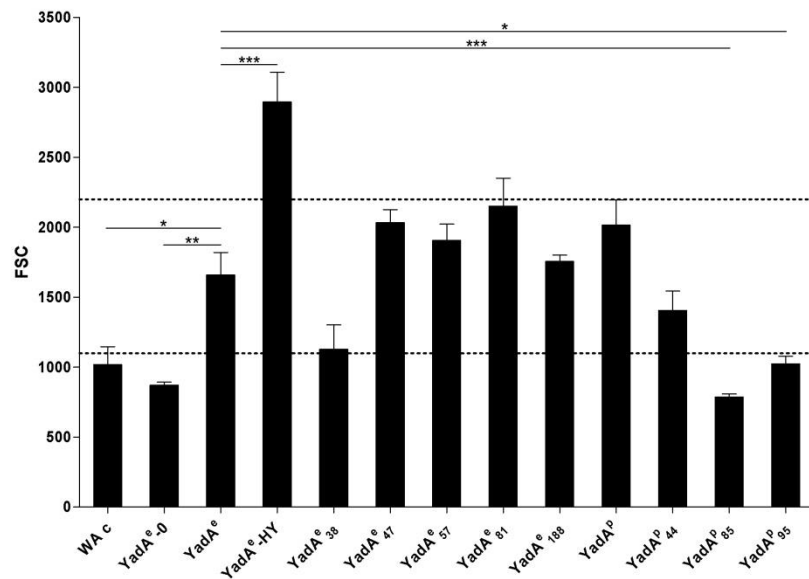


Abbildung 4.17: FSC-Mittelwert der WA(pYVO8-x)-Stämme. Für die Ermittlung der durchschnittlichen Aggregatgröße der Yersinien wurde die Größe der Aggregate mittels einer Messung im Durchflusszytometer bestimmt. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet. $(p) \leq 0,05 = *$, $(p) \leq 0,01 = **$ und $(p) \leq 0,005 = ***$

Für die Ermittlung der durchschnittlichen Größe der Bakterienaggregate wurde der FSC-Mittelwert aus fünf unabhängigen Versuchen gebildet. Da Stamm $YadA^e$ autoagglutiniert, wurden alle $YadA$ -Varianten mit diesem Wert verglichen. Interessant ist, dass es nicht nur Veränderungen in der Autoagglutination gibt, die zu weniger Aggregation führen, sondern auch zu höheren FSC-Mittelwerten. So zeigt der Stamm $YadA^e$ -HY einen signifikanten Anstieg des FSC-Mittelwertes und eine langauslaufende Schulter gegenüber dem Stamm $YadA^e$ (siehe Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17). Dies lässt auf eine gesteigerte Anzahl an Bakterienaggregaten und/oder größere Bakterienaggregate schließen, was sich mit vorherigen Beobachtungen sehr gut deckt (siehe oben). Wie bereits gezeigt, können sowohl der Stamm WAc als auch der Stamm $YadA^e$ -0 als nicht autoagglutinierende Stämme (Agg⁻) eingestuft

werden. Dies spiegelt sich auch im FSC-Mittelwert und einer symmetrischen Glockenkurve wider. Beide haben einen signifikant niedrigeren Wert als der Stamm YadA^e. Einen signifikant niedrigeren FSC-Mittelwert weisen auch YadA^P₈₅ und YadA^P₉₅ auf. Der Wert dieser beiden YadA^P-Stämme ist mit den Werten der Stämme WAc und YadA^e-0 vergleichbar. Somit kann auch bei diesen Stämmen von abgeschwächter Autoagglutination ausgegangen werden. Interessant ist auch der FSC-Mittelwert von YadA^e₃₈. Dieser zeigt einen ebenfalls deutlich niedrigeren FSC-Mittelwert. Auch hier ist die Autoagglutination reduziert.

4.6.2 Kollagenbindungskapazität von YadA-Varianten in *Yersinia* WA(pYV08-x)-Stämmen in Suspension

Da die Immobilisierung (Adsorption an feste Substrate) von Proteinen häufig zu einer Veränderung der Tertiärstruktur führt, sollte neben der Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen auch die Kollagenbindungskapazität der YadA-Varianten in Suspension ermittelt werden. Während durch die Bindungsfähigkeit bei immobilisiertem ECM-Protein die Anzahl an bindenden Bakterien gemessen wurde, wird bei der Bindungskapazität die Menge an gebundenem Protein pro Bakterium gemessen. Die Bindung von löslichen Kollagenfibrillen an Yersinien wurde mit Bakteriensuspensionen und Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurden die Kulturen auf eine OD₆₀₀ 0.5 eingestellt und mit 10 µg/ml Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Messung der Bindungskapazität erfolgte im Durchflusszytometer. Die Auswertung der Daten wurde mit der Software FlowJo 7.6.1 durchgeführt. Im Durchflusszytometer kann die Fluoreszenz von Einzelbakterien und Bakterienaggregaten erfasst und durch Eingrenzung der Ereignisse können in der Auswertung auch ausschließlich Einzelbakterien gemessen werden (sogenanntes „gating“). Die Einzelbakterien werden nach Lichtstreuwerten (FSC-Wert, siehe 4.6.1) registriert. Bei den kleinsten Streuwerten sollte es sich um Einzelbakterien handeln, die für die Auswertung verwendet wurden. Da der Stamm YadA^e-0 keine Autoagglutination und niedrige Lichtstreuwerte zeigte, wurde dieser Stamm als Referenz zur Beurteilung der Streuwerte für Einzelbakterien verwendet.

Für die nähere Erklärung der Ermittlung der Kollagenbindungskapazität der Einzelbakterien wird im nachfolgenden beispielhaft an den Stämmen YadA^e-0, YadA^e und YadA^e-HY das „gating“ und die einzelnen Populationen gezeigt (siehe Abbildung 4.18). Das „gating“ erfolgt in zwei Schritten: I.) Zunächst werden die Bakterienaggregate eingegrenzt, so dass nur noch

Einzelbakterien erfasst werden. Dieser Schritt richtet sich nicht nach der Stärke des Fluoreszenzsignals der Bakterien, sondern nur nach deren FSC-Wert. Dadurch wird die Größe der Ereignisse bestimmt und eingegrenzt. II.) Anschließend werden die Einzelbakterien nach der Stärke ihres Fluoreszenzsignals unterschieden. Der untere Grenzwert für positive Signale (Kollagenbindung vorhanden) wird durch die Höchstwerte der Signale bei Stamm YadA^e-0 vorgegeben. Dieser Grenzwert dient zum Ausschluss der Autofluoreszenz. Nach diesen beiden Schritten können somit die kollagenbindenden Einzelbakterien der jeweiligen Stämme bestimmt werden und ebenso die durchschnittliche Intensität des Fluoreszenzsignals. Dieses gibt an, wieviel Alexa488-konjugiertes Kollagen Typ I pro Einzelbakterium gebunden wurde und lässt somit auf die Kollagenbindungskapazität der jeweiligen YadA-Varianten schließen (siehe Abbildung 4.19).

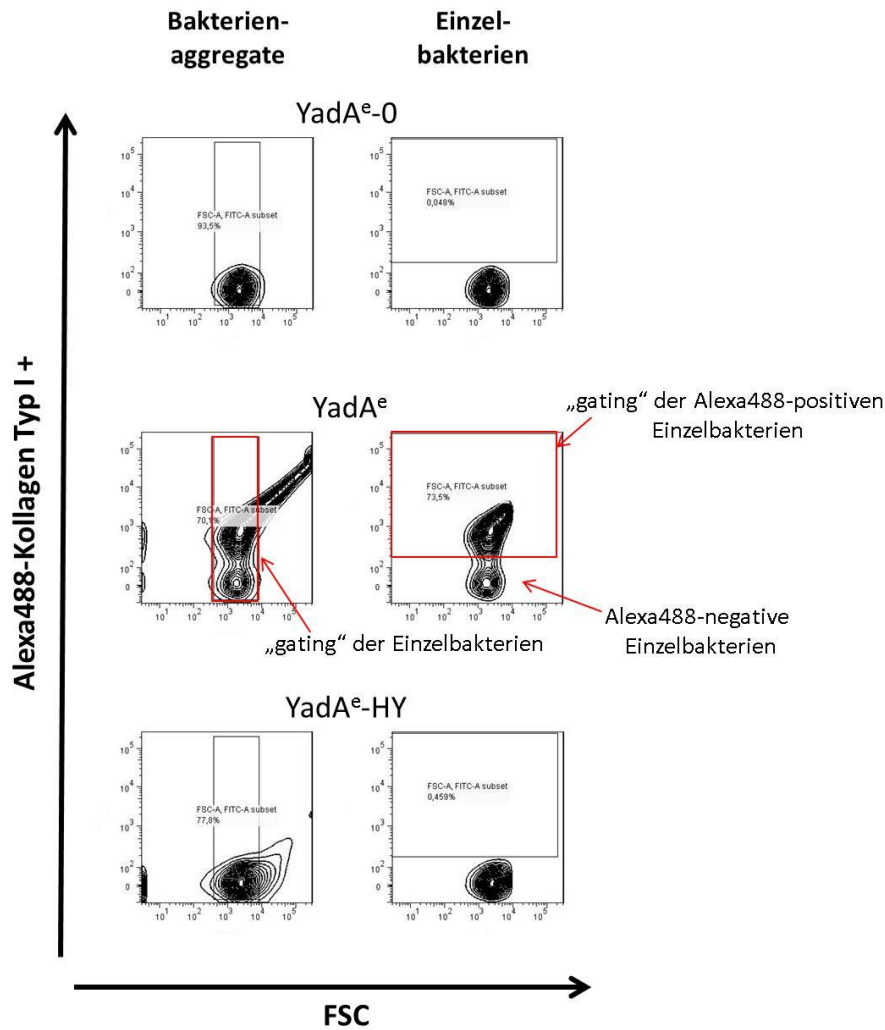


Abbildung 4.18: Diagramm des „gatings“ der Einzelbakterien und der kollagenbindenden Einzelbakterien Anhand der Stämme $YadA^{e-0}$, $YadA^e$ und $YadA^{e-HY}$. Der Rahmen bei den Bakterienaggregaten stellt die erste Stufe des „gatings“ dar und zeigt, wie die Einzelbakterien erfasst werden. Der Rahmen bei den Einzelbakterien stellt die zweite Stufe des „gatings“ dar und zeigt wie die kollagenbindenden Einzelbakterien erfasst werden. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA_i^e$ bzw. $YadA_i^p$ gekennzeichnet. (Alexa488-Kollagen Typ I + Fluoreszenzintensität, y-Achse; Forward-Scatter/FSC, x-Achse)

Die Kollagenbindungsergebnisse in Suspension unterschieden sich von denen mit immobilisiertem Kollagen (ELISA, siehe 4.5.1). So zeigen die Stämme $YadA^e$, $YadA_{47}^e$ und $YadA_{57}^e$ praktisch gleiche Bindungskapazitäten für lösliches Kollagen bezogen auf Einzelbakterien. Die verringerte Bindungskapazität von Stamm $YadA_{38}^e$ ist nur gering (~10%) und nicht signifikant und könnte mit der stark verringerten Autoagglutination zusammenhängen. Im Vergleich dazu zeigt der Stamm $YadA_{81}^e$ eine deutlich schwächere Bindungskapazität von Kollagen als der Stamm $YadA^e$ (siehe Abbildung 4.19). Die Stämme, die für immobilisiertes Kollagen geringe Bindungsfähigkeit zeigten (siehe 4.5.1), zeigen auch

hier nur eine geringe Bindungskapazität von Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I. Bei den Stämmen $\text{YadA}^e\text{-0}$, YadA^e_{188} und $\text{YadA}^e\text{-HY}$ ist nur eine äußerst schwache Bindungskapazität (maximal 0,56%) nachweisbar (siehe Abbildung 4.19 und Abbildung 4.20).

Ein Vergleich der Kollagenbindungskapazität der YadA^p_i -Stämme in Suspension ergibt, dass die jeweilige Subpopulation der Stämme YadA^p und YadA^p_{95} , welche Kollagen binden, prozentual geringer ist als bei den anderen kollagenbindenden Stämmen (YadA^p 43,9% bzw. YadA^p_{95} 38,2%, siehe Abbildung 4.19). Für den errechneten Mittelwert für YadA^p ergibt sich so ein ähnlicher Unterschied zu YadA^e wie in der Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen im ELISA.

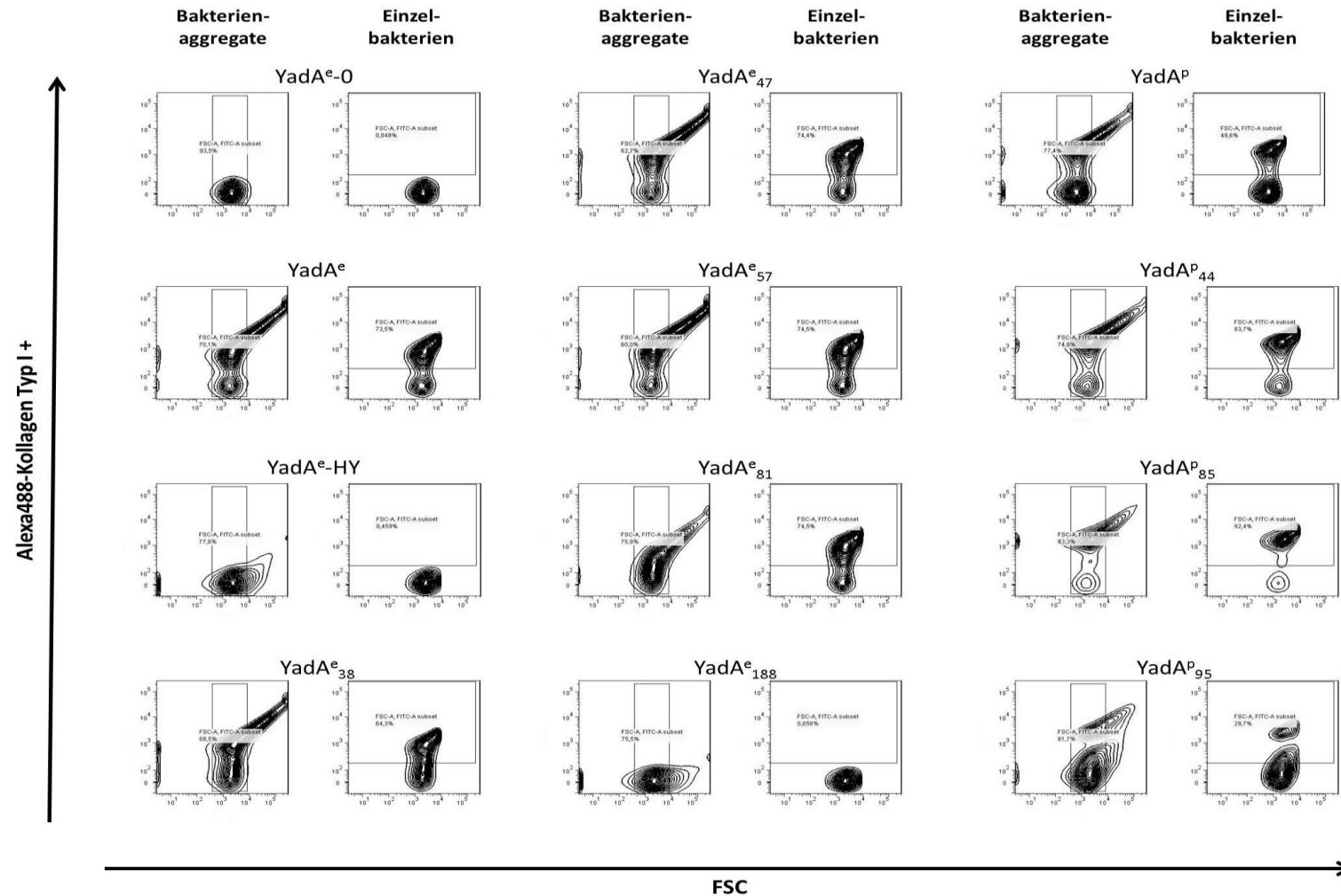


Abbildung 4.19: Repräsentative durchflusszytometrische Diagramme von WA(pYVO8-x) der Alexa488-konjugten Kollagen Typ-I Bindung. Repräsentative Darstellung der zytofourometrischen Quantifizierung der Bindung von Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I-Bindung (Alexa488-Kollagen Typ I + Fluoreszenzintensität, y-Achse) in Bezug auf die Streuwerte der gemessenen Bakterienaggregate und Einzelbakterien (Forward-Scatter/FSC, x-Achse). Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA^e; bzw. YadA^P; gekennzeichnet.

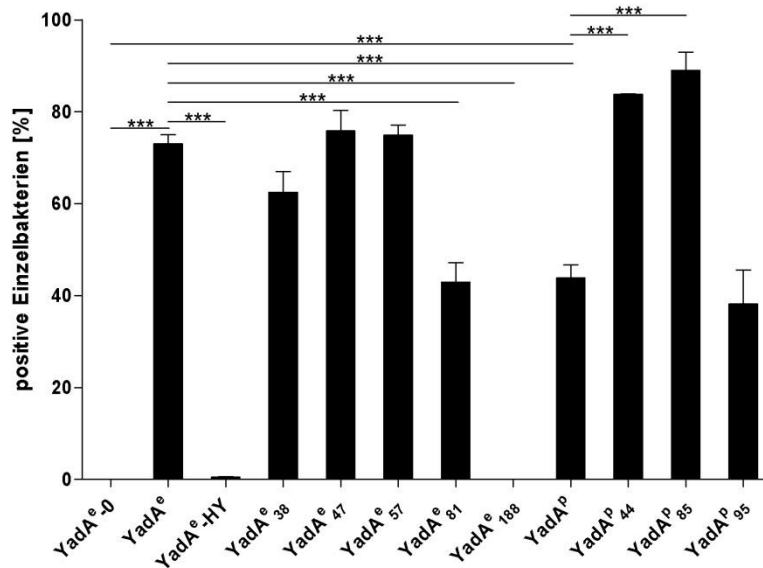


Abbildung 4.20: Prozentuelle Angabe aller kollagenbindenden Einzelbakterien der WA(pYVO8-x)-Stämme. Durchflusszytometrische Messung aller Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I bindenden Yersinien in Bezug auf alle erfassten Einzelbakterien. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^P_i gekennzeichnet. ($p \leq 0,05 = *$, ($p \leq 0,01 = **$ und ($p \leq 0,005 = ***$

Berücksichtigt man jedoch nur die Mittelwerte der MFI der kollagenbindenden Einzelereignisse (siehe Abbildung 4.21 B) hinsichtlich des Fluoreszenzsignals, ist die Bindungskapazität der YadA^P_i-Stämme höher als die der YadA^e_i-Stämme. Herausragend bei den YadA^P_i-Stämmen sind die Stämme YadA^P₄₄ und YadA^P₈₅, welche im Vergleich zum Stamm YadA^P nur eine kollagenbindende Population aufweisen. Diese binden mehr Kollagen pro Bakterium im Vergleich zu YadA^e (siehe Abbildung 4.19 und Abbildung 4.21). Die Stämme YadA^P₄₄ und YadA^P₈₅ haben sowohl mehr positive Einzelbakterien als auch eine höhere MFI pro Bakterienzelle im Vergleich zum Stamm YadA^e.

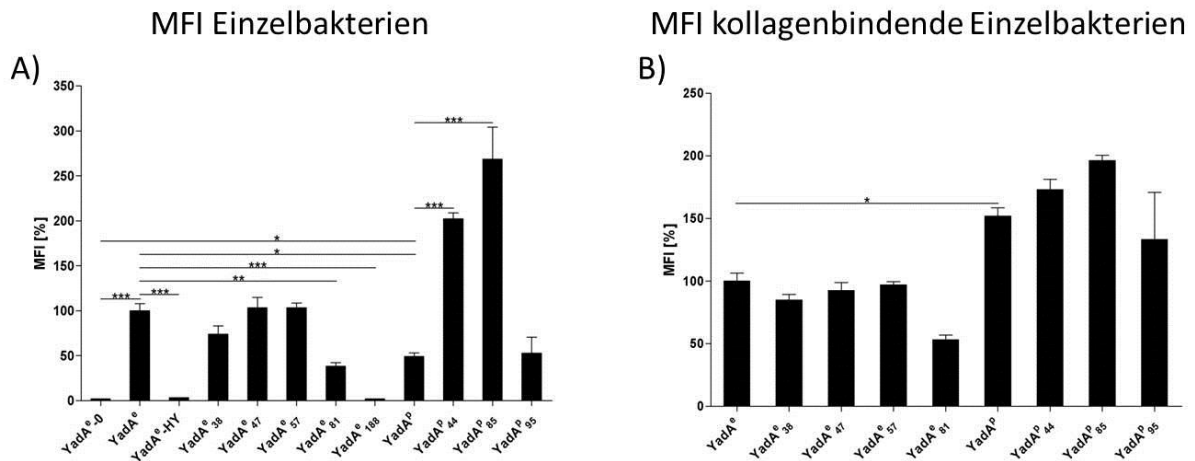


Abbildung 4.21: MFI der Einzelbakterien (A) bzw. der kollagenbindenden Einzelbakterien (B). Der MFI gibt indirekt die Kollagenbindungskapazität wieder. Diese bezieht sich in (A) auf alle erfassten Einzelbakterien und in (B) auf alle kollagenbindenden Einzelbakterien. Die MFI wird stets vergleichend (alle WA(pYVO8-x)-Stämme) auf den Stamm $YadA^e$ bezogen. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet. ($p \leq 0,05 = *$, ($p \leq 0,01 = **$ und ($p \leq 0,005 = ***$

Berücksichtigt man nur die MFI aller kollagenbindenden Einzelbakterien, so zeigen die beiden $YadA^p$ -Stämme ($YadA^p_{44}$ und $YadA^p_{85}$) einen mehr als 1,7fach höheren Wert pro Bakterium für die Kollagenbindungskapazität im Vergleich zum Stamm $YadA^e$ (siehe Abbildung 4.21 B). Diese Ergebnisse entsprechen nicht denen, die durch Bindung von Yersinien an immobilisiertes Kollagen erhalten wurden (siehe 4.5.1). An immobilisiertes Kollagen zeigen die beiden Stämme $YadA^p_{44}$ und $YadA^p_{85}$ eine geringere Bindungsfähigkeit als der Stamm $YadA^e$. Diese Experimente zeigen somit, dass die Bindungskapazität von Yersinien in Suspension nicht zwangsläufig der Bindungsfähigkeit an immobilisiertem Kollagen entspricht. Zudem muss hier darauf hingewiesen werden, dass nur die Kollagenbindungskapazität von Einzelbakterien bestimmt wurde und nicht von Bakterienaggregaten. Da jedoch $YadA$ auch Autoagglutinationseigenschaften (siehe 4.6.1) besitzt, die wahrscheinlich von der Oberflächendichte von $YadA$ und Deletionen im Kopfbereich bestimmt werden, ist die Vergleichbarkeit der Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen der $YadA$ -Varianten mit der Kollagenbindungskapazität in Suspension kritisch.

Tabelle 4.4: Prozentuelle Angabe aller Einzelbakterien bei der Messung der Alexa488-Kollagenbindung von Yersinien im Durchflusszytometer. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet.

Stamm	Einzelbakterien in Abhängigkeit der Bakterienaggregate [%]	Kollagen-bindende Einzelbakterien in Abhängigkeit der Bakterienaggregate [%]	Kollagenbindende Einzelbakterien in Abhängigkeit aller Einzelbakterien [%]
$YadA^e_{-0}$	90,1 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
$YadA^e$	66,5 ± 2,2	48,5 ± 1,8	73,0 ± 2,0
$YadA^e_{-HY}$	76,5 ± 0,7	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,1
$YadA^e_{38}$	71,9 ± 2,9	44,7 ± 1,8	62,5 ± 4,5
$YadA^e_{47}$	67,2 ± 3,1	51,1 ± 5,2	75,9 ± 4,4
$YadA^e_{57}$	61,6 ± 1,1	46,1 ± 1,1	74,9 ± 2,2
$YadA^e_{81}$	74,8 ± 1,1	32,1 ± 3,0	42,9 ± 4,3
$YadA^e_{188}$	75,3 ± 1,2	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
$YadA^p$	76,3 ± 1,4	33,5 ± 2,5	43,9 ± 2,9
$YadA^p_{44}$	75,0 ± 0,3	62,8 ± 0,3	83,8 ± 0,1
$YadA^p_{85}$	83,8 ± 1,4	74,5 ± 2,2	89,0 ± 4,0
$YadA^p_{95}$	78,8 ± 3,0	29,7 ± 4,5	38,2 ± 7,4

4.6.3 (POG)₁₀ Bindungskapazität von YadA-Varianten in *Yersinia WA(pYV08-x)*-Stämmen in Suspension

Für die Bestimmung der Bindungskapazität von (POG)₁₀ an Yersinien in Suspension wurden die Versuche im Wesentlichen wie bei der Bestimmung der Bindungskapazität von Kollagen durchgeführt. Als Kollagenmimetikum wurde das fluoreszierende, synthetische Dy647-konjugierte (POG)₁₀-Peptid (0,1 µg/ml und 10 µg/ml) verwendet. Die Bindung von Dy647-(POG)₁₀ an YadA-positive Yersinien führte zu einer Reduktion von Bakterienaggregaten (Inhibierung der Autoagglutination, (Gramlich, 2014)). Dies hat Einfluss auf die Messung der Fluoreszenzwerte der Einzelbakterien (siehe 4.6.1) im kompetitiven Bindungstest mittels Durchflusszytometer. POG ist das am häufigsten in Kollagen vorkommende Aminosäuretripletmotiv mit 10,5% (Ramshaw et al, 1998). Die Masse von Kollagen Typ I liegt bei rund 400 kDa (zweimal $\alpha 1[I]$ 139 kDa, $\alpha 2[I]$ 129 kDa). (POG)₁₀ hat eine Masse von 3,2 kDa.

Die Stämme $YadA^e-0$, $YadA^e-HY$ und $YadA^e_{188}$ zeigen für $Dy647-(POG)_{10}$ keine Bindung. Zwischen den Stämmen $YadA^e$, $YadA^e_{38}$, $YadA^e_{47}$ und $YadA^e_{57}$ zeigt sich kein Unterschied für die Bindungskapazität von $Dy647-(POG)_{10}$. Der Stamm $YadA^e_{81}$ zeigt bei $10 \mu\text{g/ml}$ $Dy647-(POG)_{10}$ bereits signifikant weniger $Dy647-(POG)_{10}$ -bindende Einzelbakterien. Bei $0,1 \mu\text{g/ml}$ $Dy647-(POG)_{10}$ ist der Unterschied an $Dy647-(POG)_{10}$ -bindenden Einzelbakterien gegenüber dem Stamm $YadA^e$ noch größer. Bei Stamm $YadA^e_{81}$ binden bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ $Dy647-(POG)_{10}$ weniger als die Hälfte aller Einzelbakterien $Dy647-(POG)_{10}$ (siehe Abbildung 4.24). Berücksichtigt man jedoch die MFI der Einzelbakterien so ergibt sich folgendes: bei $10 \mu\text{g/ml}$ zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Stamm $YadA^e$ und den $YadA^e_i$ -Varianten. Die MFI der Stämme $YadA^e_{38}$, $YadA^e_{47}$ und $YadA^e_{57}$ erreicht nur ca. 50% des MFI-Wertes von Stamm $YadA^e$. Diese Unterschiede sind jedoch bei $0,1 \mu\text{g/ml}$ $(POG)_{10}$ nicht nachweisbar. Somit könnte bei den $YadA^e_i$ -Stämmen eine Sättigung der Bindungskapazität bei einer $Dy647-(POG)_{10}$ -Konzentration zwischen $0,1 \mu\text{g/ml}$ und $10 \mu\text{g/ml}$ vorliegen, wogegen der Stamm $YadA^e$ eine höhere Bindungskapazität für $Dy647-(POG)_{10}$ hat.

Eine interessante Beobachtung ist, dass sich anders als bei Kollagen, keine unterschiedlichen Populationen bei den Stämmen $YadA^p$ und $YadA^p_{95}$ hinsichtlich der $Dy647-(POG)_{10}$ -Bindungskapazität zeigt. Ebenso ist nachweisbar, dass $Dy647-(POG)_{10}$ eine Anti-Autoagglutinationswirkung hat. Während die Bindung an Kollagen zu größeren Bakterienaggregaten (höhere FSC-Werte) führt, steigt der Anteil von Einzelbakterien bei der Zugabe von $Dy647-(POG)_{10}$ an (siehe Abbildung 4.22 und Abbildung 4.23).

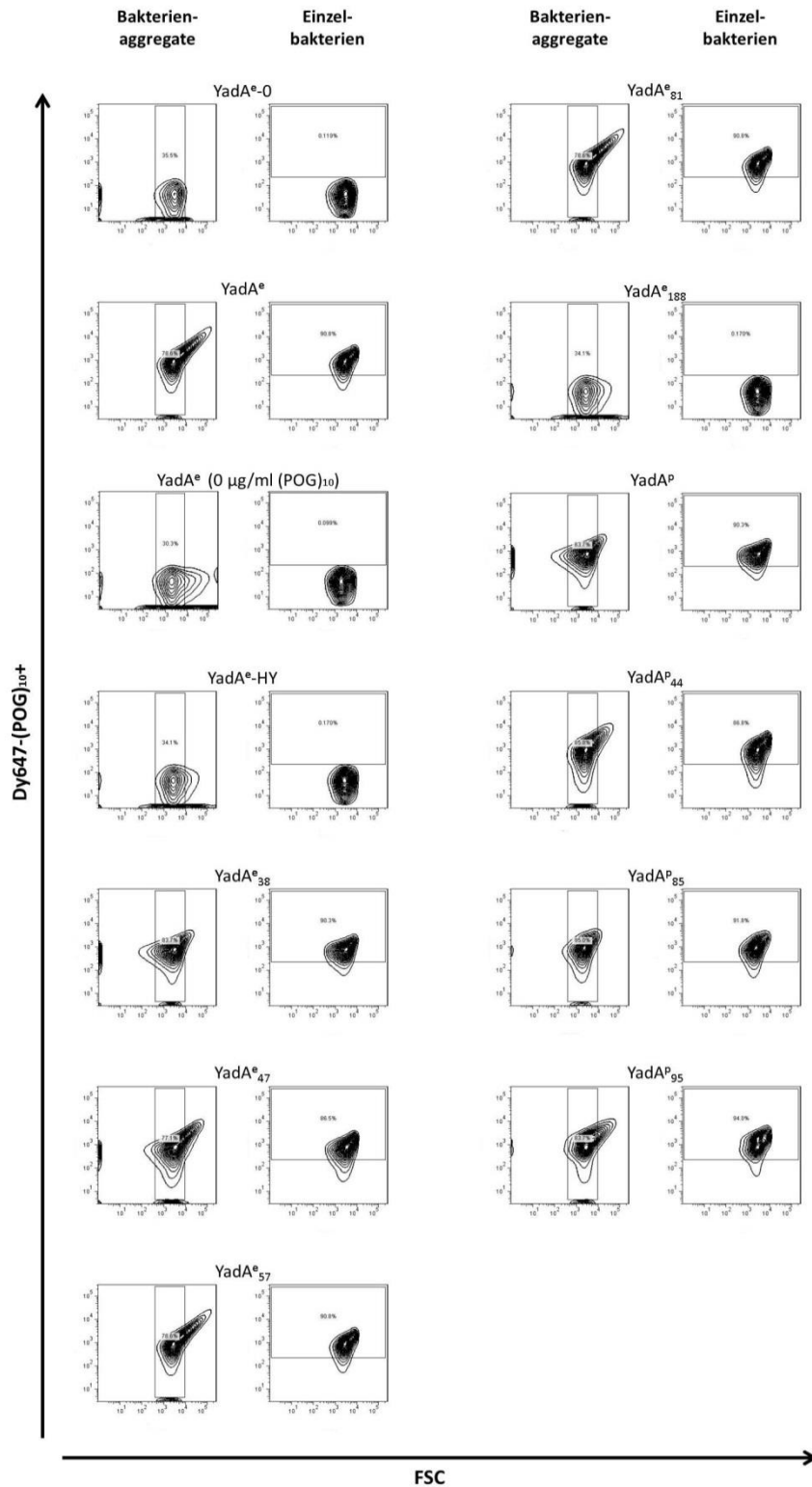


Abbildung 4.22: Darstellung der Dy647-(POG)₁₀-Bindung (0,1 μg/ml) im Durchflusszytometer und des „gatings“. Repräsentative Darstellung der zytofourometrischen Quantifizierung der Bindung der Dy647-(POG)₁₀-Fluoreszenzintensität (Dy647-(POG)₁₀+Fluoreszenzintensität, y-Achse) in Bezug auf die Größe der gemessenen Ereignisse (Forward-Scatter/FSC, x-Achse). Sowohl eine Messung der Bakterienaggregate als auch die Messung der Einzelbakterien ist gezeigt. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^P_i gekennzeichnet.

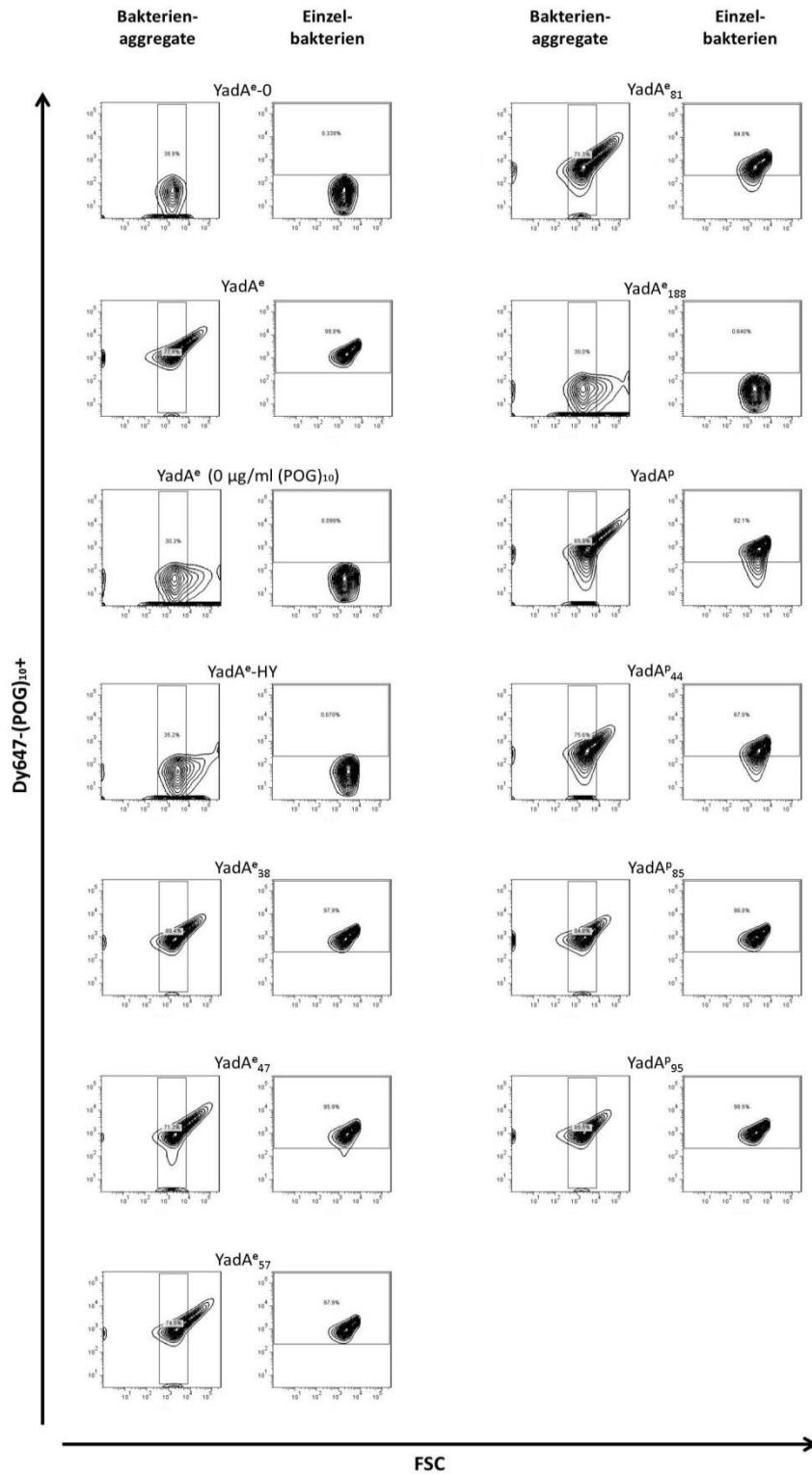


Abbildung 4.23: Darstellung der Dy647-(POG)₁₀-Bindung (10 μg/ml) im Durchflusszytometer und des „gatings“. Repräsentative Darstellung der zytofluorimetrischen Quantifizierung der Bindung der Dy647-(POG)₁₀-Fluoreszenzintensität (Dy647-(POG)₁₀+Fluoreszenzintensität, y-Achse) in Bezug auf die Größe der gemessenen Ereignisse (Forward-Scatter/FSC, x-Achse). Sowohl eine Messung der Bakterienaggregate als auch die Messung der Einzelbakterien ist gezeigt. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA_i^e bzw. YadA_i^p gekennzeichnet.

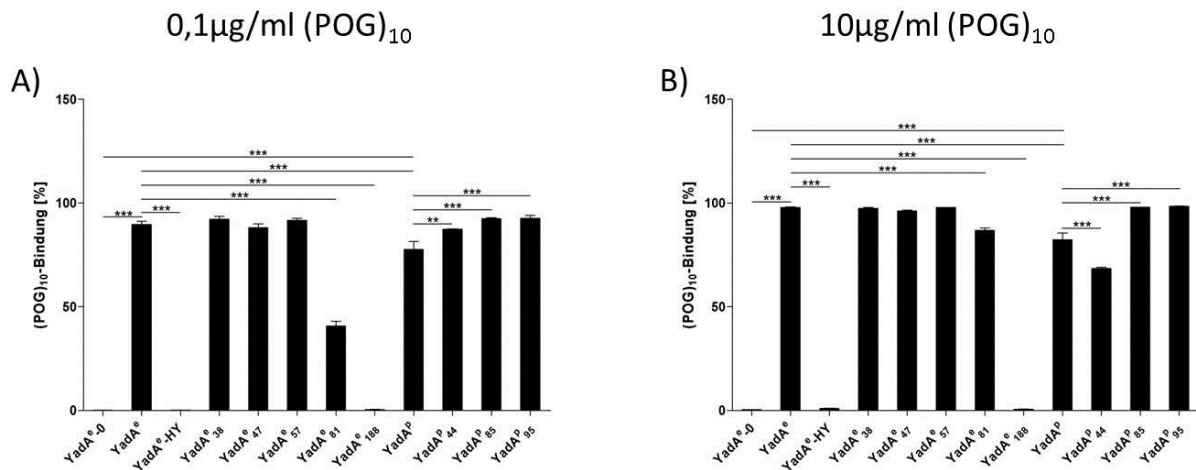


Abbildung 4.24: Prozentuelle Angabe aller Dy647-(POG)₁₀-bindenden Einzelbakterien im Durchflusszytometer. Histogramme aller Dy647-(POG)₁₀-bindenden Einzelbakterien nach der Inkubation mit (A) 0,1 µg/ml bzw. (B) 10 µg/ml. Erfasst wurde der prozentuale Anteil aller als positiv eingestuft Einzelbakterien der jeweiligen WA(pYV08-x)-Stämme. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform Yada^e_i bzw. Yada^P_i gekennzeichnet. (p) ≤ 0,05 = *, (p) ≤ 0,01 = ** und (p) ≤ 0,005 = ***

Die Bindungskapazität für Dy647-(POG)₁₀ aller Yada^P_i-Stämme ist ebenfalls geringer als die von Stamm Yada^e. Zwar zeigen nur die Stämme Yada^P und Yada^P₄₄ signifikant weniger Dy647-(POG)₁₀-bindende Einzelbakterien (Stamm Yada^P₄₄ nur bei einer Konzentration von 10 µg/ml Dy647-(POG)₁₀), jedoch ist die MFI bei 10 µg/ml Dy647-(POG)₁₀ höchstens auf einem ähnlichen Niveau wie die der Yada^e_i-Stämme und somit signifikant niedriger als für Stamm Yada^e (siehe Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26). Auch hier scheint sich eine Sättigung der Bindungskapazität zwischen den Konzentrationen von 0,1 µg/ml und 10 µg/ml Dy647-(POG)₁₀ einzustellen. Bei dieser Konzentration sind die MFI-Werte noch auf gleichem Niveau (Stämme Yada^P und Yada^P₄₄) wie bzw. sogar höher (Stämme Yada^P₈₅ und Yada^P₉₅) als von Stamm Yada^e.

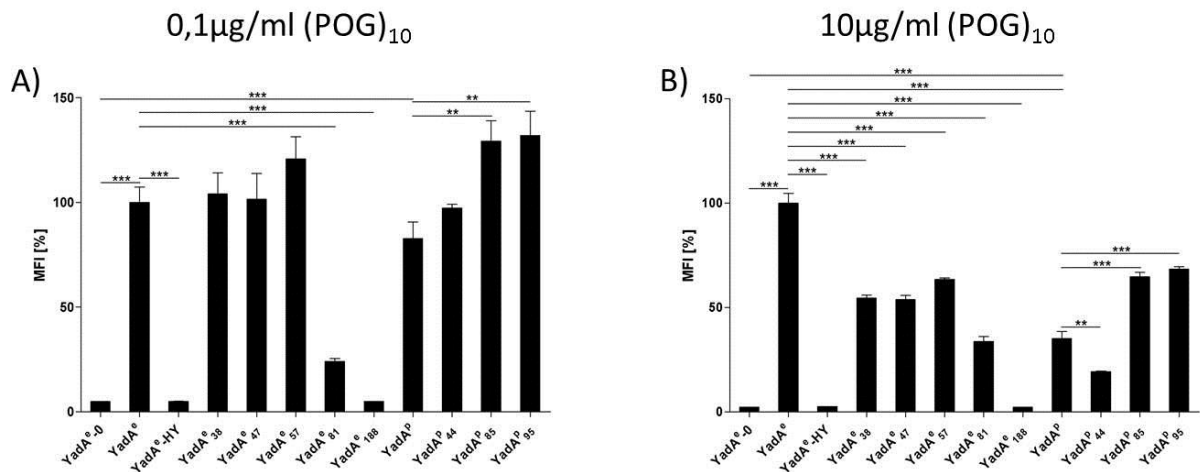


Abbildung 4.25: Prozentuale MFI-Werte der Einzelbakterien für die Bindung von Dy647-(POG)₁₀. Histogramme des MFI-Werts aller Einzelbakterien nach der Inkubation mit (A) 0,1 µg/ml bzw. (B) 10 µg/ml. Erfasst wurde der MFI-Wert aller Einzelbakterien der jeweiligen WA(pYV08-x)-Stämme. Alle Angaben beziehen sich auf den Durchschnittswert von Stamm YadaA^e. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadaA^e_i bzw. YadaA^P_i gekennzeichnet. (p) ≤ 0,05 = *, (p) ≤ 0,01 = ** und (p) ≤ 0,005 = ***

Beim Vergleich der MFI-Werte innerhalb der YadaA^P-Stämme ergeben sich ebenfalls interessante Schlussfolgerungen. Die MFI bei den Stämmen YadaA^P₈₅ und YadaA^P₉₅ liegt bei 0,1 µg/ml bzw. 10 µg/ml Dy647-(POG)₁₀ signifikant über dem Wert von Stamm YadaA^P. Der Vergleich der MFI zwischen den Stämmen YadaA^P und YadaA^P₄₄ zeigt überraschenderweise bei 10 µg/ml Dy647-(POG)₁₀ einen signifikant niedrigeren Wert von Stamm YadaA^P gegenüber Stamm YadaA^P₄₄. Jedoch sind bei 0,1 µg/ml Dy647-(POG)₁₀ die MFI-Werte von Stamm YadaA^P signifikant höher als die von Stamm YadaA^P₄₄. Im Vergleich beider MFI-Werte von Stamm YadaA^P₄₄ zeigt sich ein Rückgang der Bindung bei Erhöhung der Konzentration an Dy647-(POG)₁₀ (siehe Abbildung 4.26), während sich bei allen anderen YadaA-Varianten ein leichter Anstieg der MFI zeigt. Bei den Stämmen YadaA^e und YadaA^e₈₁ ist sogar ein deutlicher Anstieg des MFI-Wertes ersichtlich.

Diese vergleichenden Ergebnisse erlauben den Hinweis, dass die (POG)₁₀-Bindungsstelle mit einer Kollagenbindungsstelle konkurriert, wobei es für Kollagen wahrscheinlich noch eine weitere YadaA-Bindungsstelle gibt (siehe auch (Gramlich, 2014)).

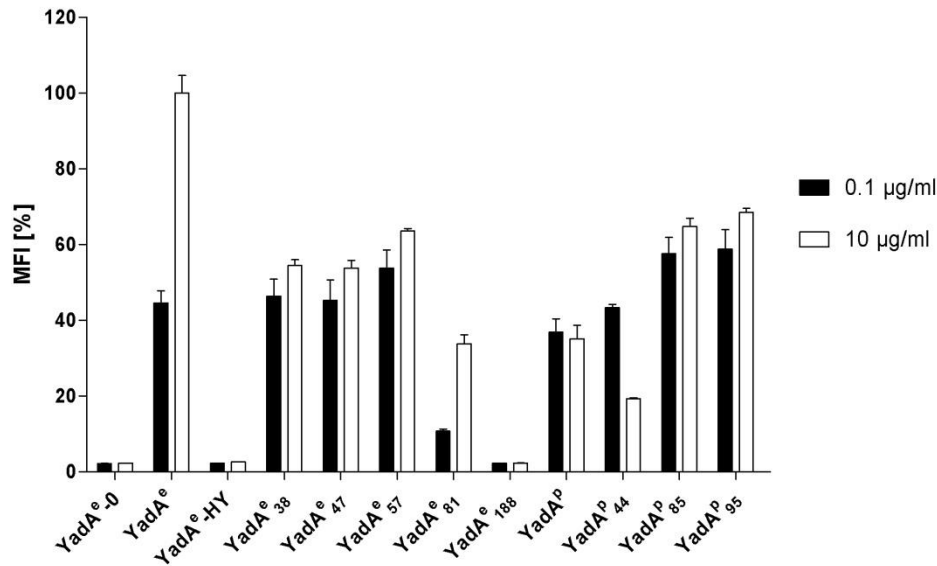


Abbildung 4.26: Vergleich der MFI der Einzelbakterien bei der Bindung von Dy647-(POG)₁₀. Histogramm des Vergleichs zwischen den MFI-Werten aller Einzelbakterien nach der Inkubation mit 0,1 µg/ml und 10 µg/ml. Erfasst wurde der MFI-Wert aller Einzelbakterien der jeweiligen WA(pYV08-x)-Stämme. Alle Angaben beziehen sich auf den Durchschnittswert von Stamm YadA^e nach der Inkubation mit 10 µg/ml Dy647-(POG)₁₀. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA_i^e bzw. YadA_i^p gekennzeichnet.

4.6.4 Inhibierung der Kollagenbindung von YadA-Varianten in *Yersinia* WA(pYV08-x)-Stämmen durch (POG)₁₀

Da sowohl Kollagen Typ I als auch (POG)₁₀ an YadA binden, wurde der Frage nachgegangen, ob (POG)₁₀ die Bindung von Kollagen kompetitiv inhibieren kann. Dafür wurden die Yersinien zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen von unmarkiertem (POG)₁₀ (0 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 50 µg/ml) für 15 min bei 37°C und anschließend mit 10 µg/ml Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I inkubiert. Die Bindung von Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe auch (Gramlich, 2014)).

Es ist nachweisbar, dass die Anzahl der kollagenbindenden Einzelbakterien bei allen YadA_i^e-Stämmen auch bei einer Erhöhung der Konzentration von (POG)₁₀ bis auf 50 µg/ml geringfügig aber signifikant abfällt (siehe Abbildung 4.27 und Tabelle 4.5). Die Stärkste Reduktion der Kollagenbindungskapazität wurde für die Stämme YadA₄₇^e bzw. YadA₄₄^p festgestellt.

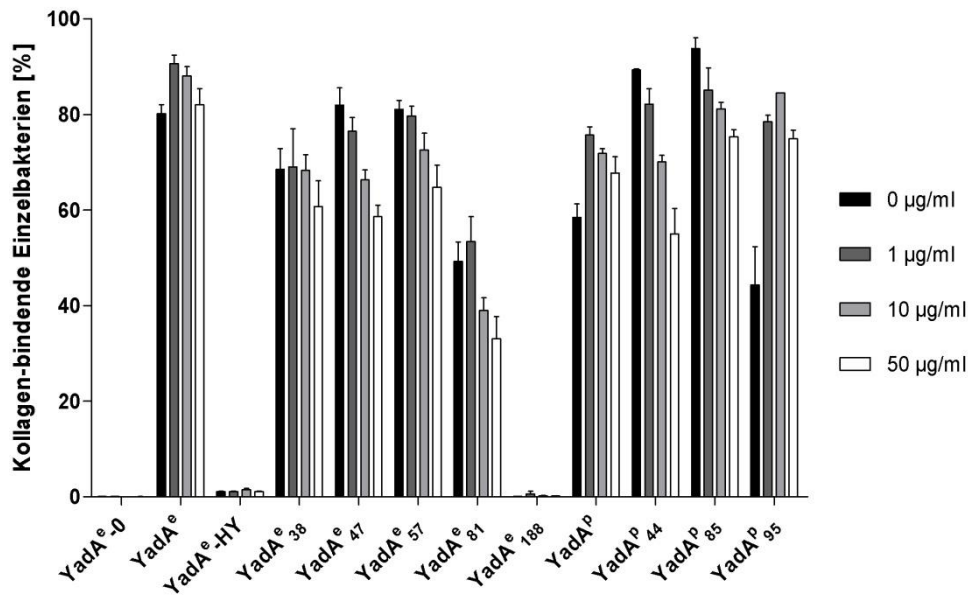


Abbildung 4.27: Prozentuelle Angabe aller kollagenbindenden Einzelbakterien im Durchflusszytometer. Histogramm aller Alexa488-Kollagen-bindenden Einzelbakterien nach der Inkubation mit zunächst unterschiedlichen Konzentration von $(\text{POG})_{10}$ und anschließend $10 \mu\text{g/ml}$ Alexa488-Kollagen. Erfasst wurde der prozentuale Anteil aller als positiv eingestuft Einzelbakterien der jeweiligen WA(pYV08-x)-Stämme. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^P_i gekennzeichnet.

Bei den YadA^P -Stämmen konnten deutliche Unterschiede in der $(\text{POG})_{10}$ -bedingten Hemmung der Kollagenbindung nachgewiesen werden. Die Stämme YadA^P und YadA^P_{95} zeigten ab $1 \mu\text{g/ml}$ $(\text{POG})_{10}$ zunächst eine Steigerung der Kollagenbindung durch Zugabe von $(\text{POG})_{10}$, während bei den Stämmen YadA^P_{44} und YadA^P_{85} die Kollagenbindung durch $(\text{POG})_{10}$ schon bei $1 \mu\text{g/ml}$ $(\text{POG})_{10}$ gehemmt wurde (siehe Tabelle 4.5). Die Steigerung der Alexa488-Kollagen-bindenden Einzelbakterien bei den Stämmen YadA^P und YadA^P_{95} könnte durch die Beeinflussung der Autoagglutination durch $(\text{POG})_{10}$ und die somit verringerte Anzahl an Bakterienaggregaten erklärt werden. Bei einer Präinkubation mit höherer Konzentration an $(\text{POG})_{10}$ fällt der Anteil an kollagenbindenden Einzelbakterien wieder ab.

Tabelle 4.5: Alexa488-Kollagen-bindende Einzelbakterien und MFI-Werte der Alexa488-Kollagen-bindenden Einzelbakterien bezogen auf den MFI-Wert von Stamm YadA^e. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^p_i gekennzeichnet.

Stamm	kollagenbindende Einzelbakterien 0 µg/ml (POG) ₁₀		kollagenbindende Einzelbakterien 1 µg/ml (POG) ₁₀		kollagenbindende Einzelbakterien 10 µg/ml (POG) ₁₀		kollagenbindende Einzelbakterien 50 µg/ml (POG) ₁₀	
	[%]	MFI [%])	[%]	(MFI [%])	[%]	MFI [%])	[%]	MFI [%]
YadA ^e -0	0,1 ± 0,0	-	0,1 ± 0,0	-	0,0 ± 0,0	-	0,0 ± 0,0	-
YadA ^e	80,2 ± 1,9	100 ± 6,4	90,6 ± 1,8	75,6 ± 3,7	88,0 ± 2,0	61,5 ± 1,9	82,0 ± 3,4	58,7 ± 2,7
YadA ^e -HY	1,0 ± 0,1	-	1,1 ± 0,1	-	1,5 ± 0,3	-	1,1 ± 0,1	-
YadA ^e ₃₈	68,5 ± 4,4	84,6 ± 4,5	69,0 ± 8,0	61,6 ± 1,1	68,3 ± 3,3	45,6 ± 0,5	60,7 ± 5,4	43,8 ± 0,8
YadA ^e ₄₇	82,0 ± 3,6	92,4 ± 6,5	76,5 ± 2,9	56,8 ± 3,4	66,3 ± 2,1	45,0 ± 1,1	58,6 ± 2,4	44,3 ± 1,5
YadA ^e ₅₇	81,0 ± 1,9	97,1 ± 2,4	79,6 ± 2,1	67,9 ± 4,2	72,5 ± 3,5	46,9 ± 1,3	64,8 ± 4,6	45,9 ± 2,2
YadA ^e ₈₁	49,2 ± 4,1	52,8 ± 3,6	53,4 ± 5,2	49,7 ± 1,7	39,0 ± 2,6	40,8 ± 1,1	33,1 ± 4,6	37,8 ± 1,1
YadA ^e ₁₈₈	0,1 ± 0,0	-	0,6 ± 0,5	-	0,2 ± 0,1	-	0,2 ± 0,0	-
YadA ^p	58,5 ± 2,8	152 ± 6,9	75,7 ± 1,8	89,1 ± 4,6	71,8 ± 1,0	60,3 ± 1,9	67,7 ± 3,4	53,4 ± 0,9
YadA ^p ₄₄	89,3 ± 0,3	172 ± 8,1	82,2 ± 3,2	61,7 ± 3,9	70,1 ± 1,4	45,6 ± 0,2	55,0 ± 5,3	39,0 ± 1,6
YadA ^p ₈₅	93,8 ± 2,3	194 ± 4,2	85,1 ± 4,6	76,9 ± 3,7	81,1 ± 1,4	52,6 ± 0,3	75,3 ± 1,5	47,1 ± 1,7
YadA ^p ₉₅	44,3 ± 8,0	134 ± 38	78,5 ± 1,4	82,1 ± 6,2	84,5 ± 0,1	52,4 ± 0,7	74,9 ± 1,8	45,3 ± 1,1

Bei zunehmender Konzentration von (POG)₁₀ konnte die Kollagenbindungskapazität der Einzelbakterien bei allen Stämmen reduziert werden (Verringerung der MFI-Werte bei steigender (POG)₁₀-Konzentration). Bei den Einzelbakterien fällt vor allem der Abfall der MFI-Werte bei den Stämmen YadA^p₄₄ und YadA^p₈₅ auf. Die MFI-Werte nehmen bei einer Präinkubation mit 1 µg/ml (POG)₁₀ um das 2,7-fache bei Stamm YadA^p₄₄ bzw. um das 2,8-fache bei Stamm YadA^p₈₅ gegenüber einer Präinkubation ohne (POG)₁₀ ab. Ebenso zeigen die beiden anderen YadA^p-Stämme YadA^p und YadA^p₉₅ bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml (POG)₁₀ eine stark verringerte Kollagenbindungskapazität, obwohl diese beiden Stämme zunächst mehr kollagen-bindende Einzelbakterien zeigen.

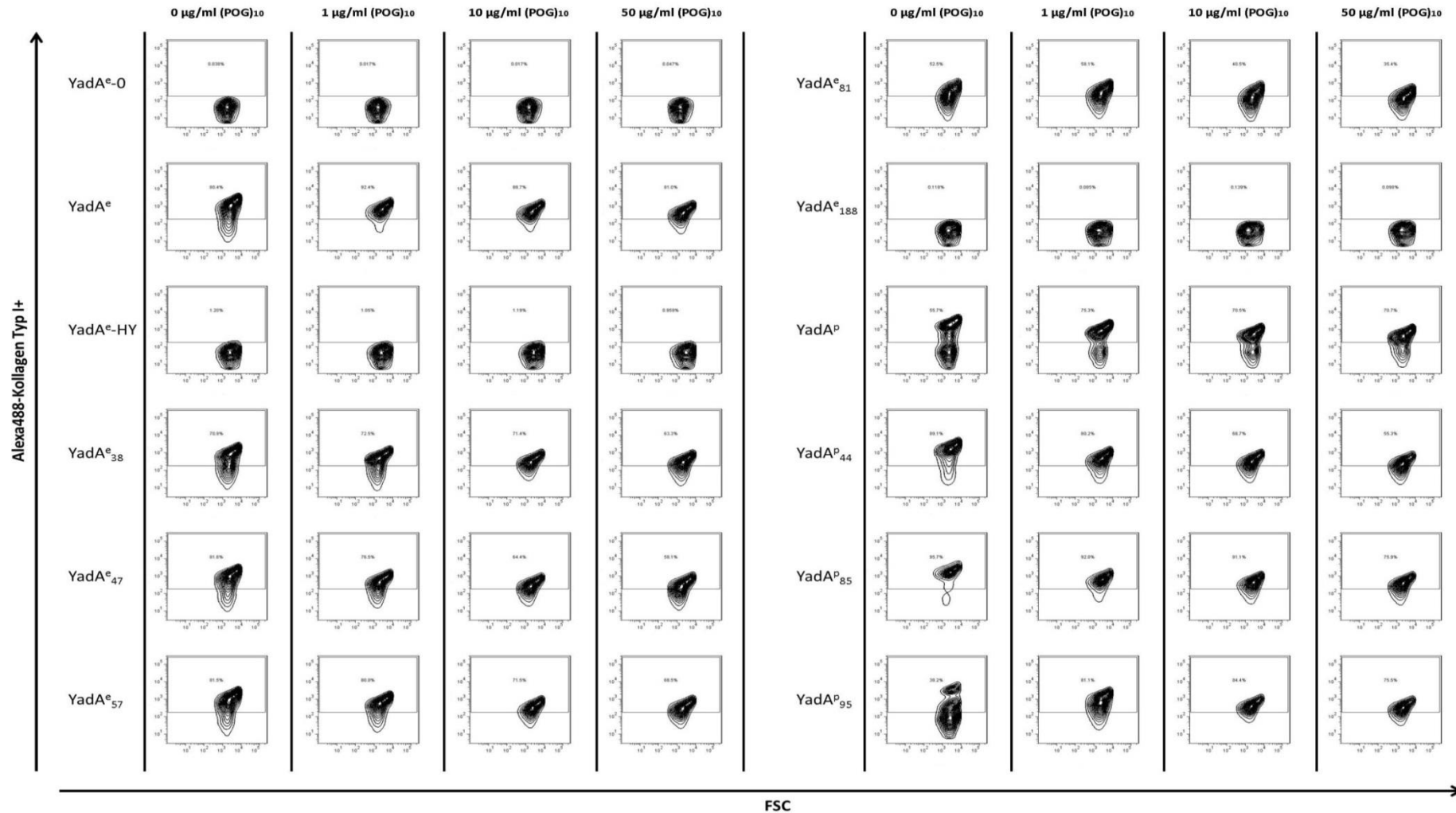


Abbildung 4.28: Repräsentative Diagramme der MFI-Werte mittels Durchflusszytometer in Bezug auf die Alexa488-Kollagenbindungskapazität bei zunehmender (POG)₁₀-Konzentration. Repräsentative Darstellung der zytofluorometrischen Quantifizierung der Bindung aller Alexa488-Kollagenbindenden Einzelbakterien (Alexa488-Kollagen Typ I+ Fluoreszenzintensität, Y-Achse) gegenüber der Größe (Forward-Scatter/FSC, x-Achse) für die verschiedenen (POG)₁₀-Konzentrationen. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^p_i gekennzeichnet.

Interessant sind die MFI-Werte der kollagenbindenden Einzelbakterien auch in anderer Hinsicht. Die MFI-Werte fallen bei steigender Konzentration an $(\text{POG})_{10}$ bei der Präinkubation bei allen Stämmen stetig (siehe Abbildung 4.29 und Tabelle 4.5). Bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ $(\text{POG})_{10}$ liegen jedoch alle YadA^e -Stämme zwischen 38% bzw. 47% des MFI-Wertes von Stamm YadA^e ohne $(\text{POG})_{10}$ Präinkubation. Auch der MFI-Wert von Stamm YadA^e ist bei diesen Konzentrationen nur geringfügig höher ($\sim 60\%$). Die MFI-Werte der YadA^p -Stämme liegen bei 10 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ $(\text{POG})_{10}$ Präinkubation zwischen 39% bzw. 60% des MFI-Wertes von Stamm YadA^e ohne $(\text{POG})_{10}$. Die MFI-Werte für 10 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ $(\text{POG})_{10}$ der einzelnen Stämme unterschieden sich ebenfalls kaum (wahrscheinlich $(\text{POG})_{10}$ Bindungssättigung, siehe auch Abschnitt 4.6.3). Diese Bindungsdaten weisen auf zwei Kollagenbindestellen hin, von denen eine nicht durch $(\text{POG})_{10}$ blockiert werden kann. Ähnliche Befunde wurden in der Dissertation von K. Gramlich 2014 erstellt.

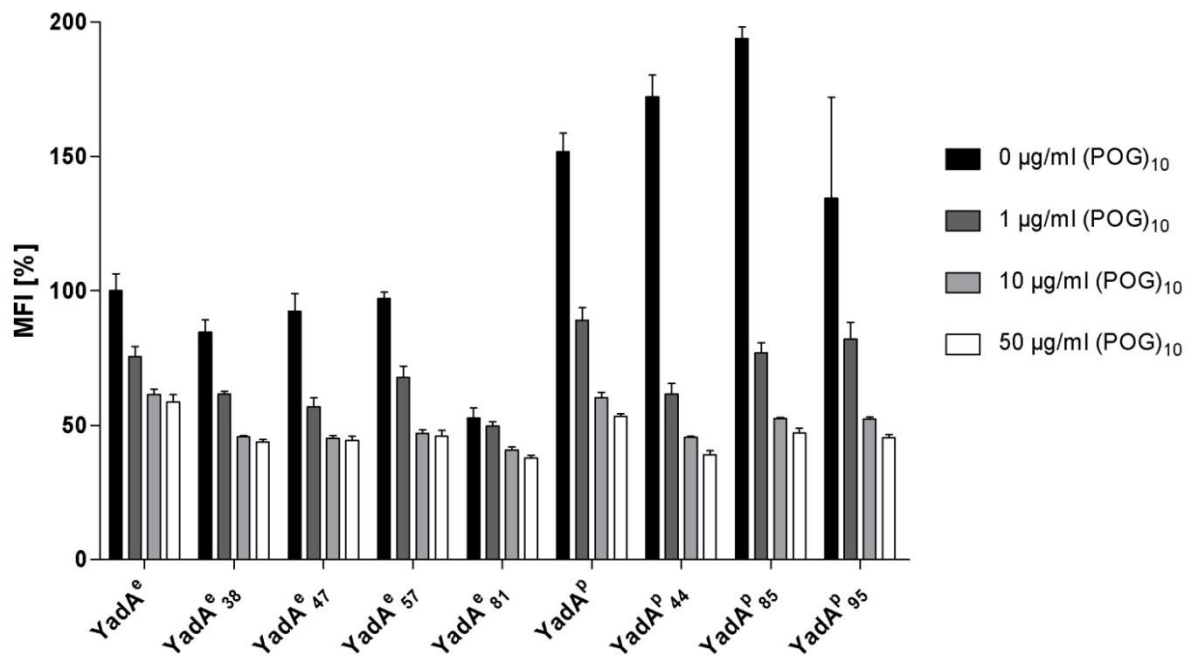


Abbildung 4.29: MFI-Werte aller Alexa488-Kollagen-bindenden Einzelbakterien bei der Inhibierung der Kollagenbindungskapazität durch $(\text{POG})_{10}$. Histogramm der MFI-Werte Alexa488-Kollagen-bindenden Einzelbakterien nach der Inkubation mit zunächst unterschiedlichen Konzentration von $(\text{POG})_{10}$ und anschließend 10 $\mu\text{g/ml}$ Alexa488-Kollagen. Erfasst wurde der MFI-Wert aller als positiv eingestuft Einzelbakterien der jeweiligen WA(pYV08-x)-Stämme. Alle Angaben sind in Prozent und beziehen sich auf den durchschnittlichen MFI-Wert von Stamm YadA^e bei einer Konzentration von 0 $\mu\text{g/ml}$ $(\text{POG})_{10}$. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA^e bzw. YadA^p gekennzeichnet.

4.7 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Fibronectinbindung an Yersinien

Das Dimer des Plasmafibronektins (pFn) wird von Hepatozyten gebildet und sezerniert und gelangt so in das Blutplasma. In Lösung befindet sich pFn in einer bindungsinernten Konformation für Integrine (Mouw et al, 2014). Auf der Zelloberfläche gebunden liegt es jedoch in „gestrecktem“ Zustand vor, wodurch Bindestellen im N-terminalen Bereich zugänglich werden. Die Immobilisierung des pFn auf Kunststoffflächen führt vermutlich ebenfalls zur Streckung des Dimers. Zelluläres Fibronectin (cFn) wird von vielen Zelltypen wie z.B. Fibroblasten sekretiert, und besitzt durch unterschiedliche „splicing“-Varianten unterschiedliche Bindungsstellen. Es befindet sich nur in sehr geringen Mengen im Blutkreislauf (To & Midwood, 2011). Um die Bindungsfähigkeiten von pFn unter „in vivo ähnlicheren“ Bedingungen zu untersuchen, wurde die Bindung von Yersinien in Suspension an nicht-immobilisiertem pFn und cFn mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Bakterien wurden bei 37°C für 15 min mit pFn oder cFn (50 µg/ml) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen und auf Glasobjektivträgern aufgetragen. Nach Trocknung wurden die Proben mit Aceton fixiert. Die Bindung von Fibronectin an YadA wurde indirekt über einen monoklonalen anti-Fibronectin-Maus-Antikörper und einen Alexa488-konjugierten anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Zum Nachweis der Bakterien wurden diese zusätzlich mit DAPI sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (siehe Abbildung 4.30).

Weder der YadA-negative Stamm $YadA^e-0$ noch der Stamm $YadA^e_{188}$ (kopfloses YadA) sind in der Lage pFn oder cFn in Suspension zu binden. Für den Stamm $YadA^e_{188}$ ist dies ein etwas unerwartetes Ergebnis, da dieser Stamm an immobilisiertes pFn (ELISA) Bindung zeigte. Für die Stämme $YadA^e$ und $YadA^e-HY$ konnte zwar eine Bindung an cFn, jedoch nicht pFn, nachgewiesen werden. Auch dieses Ergebnis steht nicht in Einklang mit den Ergebnissen der Bindung an immobilisiertes pFn. Während die Stämme $YadA^e-HY$ wie auch $YadA^e_{188}$ Bindung an FN-III7-10 zeigten, konnte für den $YadA^e$ -Stamm zusätzlich eine kopspezifische Bindung an FN-II-5 nachgewiesen werden. Die Bindung an cFn scheint zudem relativ schwach (schwache IF-Intensität), wobei der Stamm $YadA^e$ etwas stärkere Bindung als der Stamm $YadA^e-HY$ zeigt. Auffällig ist die bevorzugte Bindung von cFn an bakterielle Aggregate. Möglicherweise besteht zwischen aggregierendem YadA und cFn-Bindung eine kooperative Bindungsverteilung.

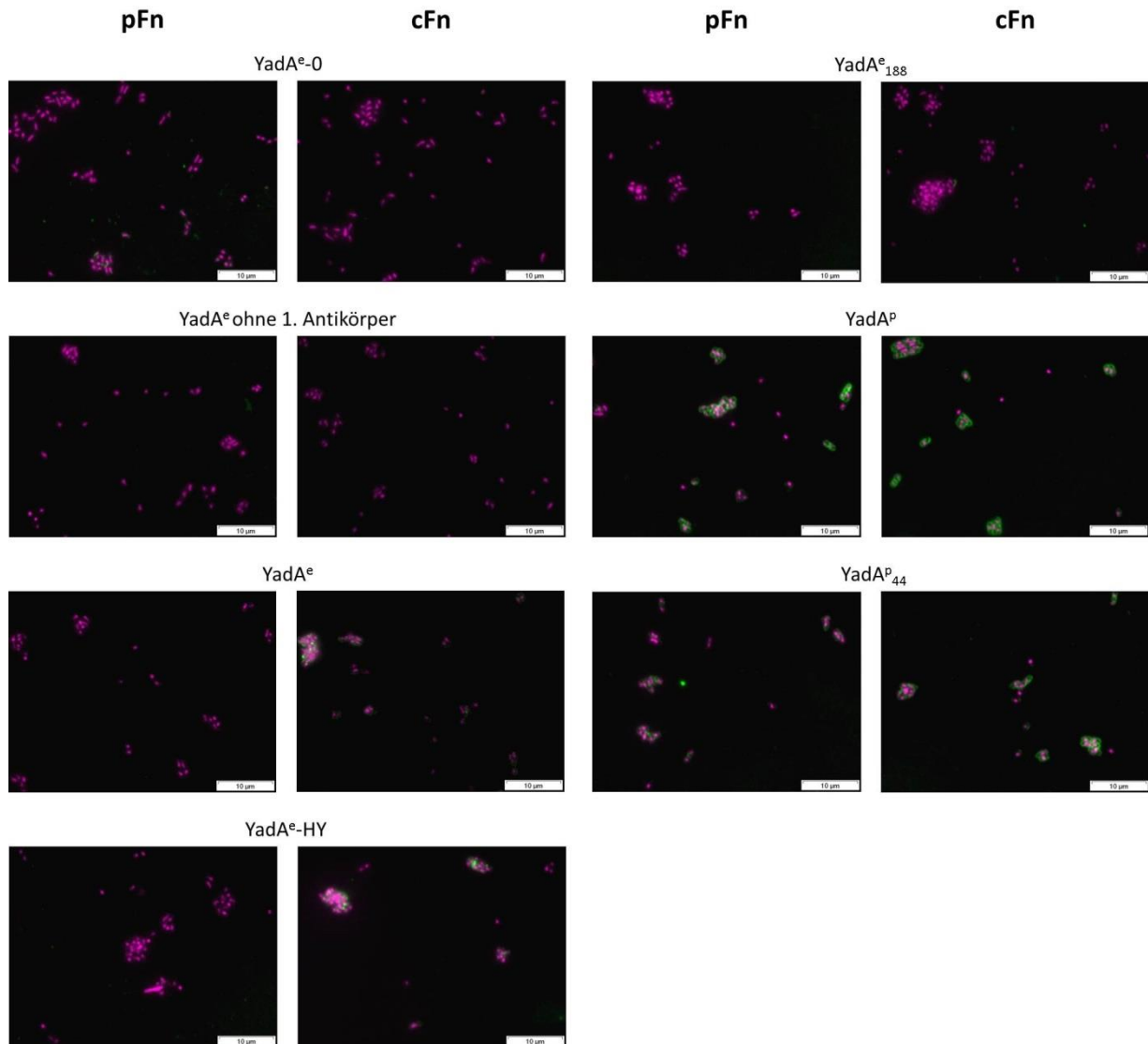


Abbildung 4.30: Darstellung der Bindung von pFn und cFn an unterschiedliche WA(pYVO8-x)-Stämme in Suspension im Fluoreszenzmikroskop. Verschiedene WA(pYVO8-X)-Stämme wurden mit pFn und cFn in Lösung inkubiert. Nach der Fixierung auf einem Objektträger mit Aceton erfolgte eine Färbung mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-FN-Antikörper und einem Alexa488-anti-Kaninchen-Antikörper (grün). Die Bakterien wurden zusätzlich mit DAPI (magenta) angefärbt. Der Größenbalken entspricht einer Länge von 10 μm . Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform YadA^e_i bzw. YadA^P_i gekennzeichnet.

Die Stämme YadA^P und YadA^P_{44} hingegen zeigen sowohl für pFn als auch für cFn ein Bindungssignal. Hier ist auch die Bindung an einzelne, nichtaggregierte Bakterien deutlich sichtbar. Jedoch scheint auch hier die Bindungsfähigkeit für cFn etwas besser zu sein, als die für pFn. Im Vergleich zu den YadA^e -Stämmen binden die YadA^P -Stämme sowohl cFn als auch pFn. Bei allen Stämmen, die Bindungsfähigkeit für pFn oder cFn zeigten, waren jedoch in der Bakterienpopulation auch vereinzelte Bakterien sichtbar, bei denen keine Bindung an

Fibronektin nachweisbar war. Ob die schwach fluoreszierenden Bakterien außerhalb der Fokusebene liegen, konnte nicht geprüft werden.

4.8 Rolle der YadA-NTTD-Verkürzung für die *Yersinia*-Mausvirulenz

4.8.1 Orale Mausinfektionsversuche

Um den Beitrag der YadA-NTTD für die Mausvirulenz zu ermitteln, wurde zunächst die Virulenz im peroralen Mausinfektionsmodell (natürlicher Infektionsweg) getestet. Hierfür wurden BALB/c-Mäusen 10^9 Bakterien in 12 μ l peroral appliziert. BALB/c-Mäuse zeigen eine höhere Infektionsempfänglichkeit für *Yersinien* als C57BL/6-Mäuse (Hancock et al, 1988). Je Stamm wurden fünf Tiere infiziert. Aufgrund der bereits bekannten starken Attenuierung des Stammes YadA^e₁₈₈ (Roggenkamp et al, 1996) wurden nur drei Tiere als Kontrolle in den Versuch mit aufgenommen. Nach vier Tagen wurden die Mäuse mit CO₂ getötet. Nach einer Darmspülung wurden je vier PP und die Milz jeder Maus entnommen und gewogen. PP und Milz wurden im Gewebehomogenisator zerkleinert und eine Verdünnungsreihe der Organsuspension angelegt. Ebenso wurde eine Verdünnungsreihe der Darmspülflüssigkeit angelegt. Die Verdünnungen wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (Unterdrückung der Normalflora) ausplattiert und für 48h bei 27° bebrütet. Anschließend wurden die Keimzahl (CFU) bestimmt. Bei der Milz wurden die CFU pro Gramm Organewebe angegeben. Da bereits in vorangegangenen Versuchen die Stämme YadA^e und YadA^p hinsichtlich ihrer Pathogenität im oralen Mausinfektionsmodell mit einem identischen Versuchsaufbau verglichen wurden (Untiet, 2013), wurde aus tierschutzrechtlichen Gründen auf eine erneute Infektion von Versuchstieren mit YadA^p verzichtet. YadA^e diente in allen Mausvirulenzuntersuchungen als Positivkontrolle.

Kurz vor Beendigung des Versuchs verstarben zwei Versuchstiere, welche mit dem Stamm YadA^p₄₄ infiziert worden waren, weshalb hier nur eine Auswertung für drei Mäuse möglich war (siehe Abbildung 4.31). Während im Dünndarm und den PP die CFU-Bestimmung der einzelnen Versuchstiere für die jeweiligen Stämme geringe Streuwerte zeigen, ist die Streuung in der Milz größer (siehe Abbildung 4.31).

Tabelle 4.6: Median der CFU von fünf Versuchstieren von Dünndarminhalt, PP und Milz vier Tage nach oraler Infektion mit 10^9 Bakterien. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet. (* nur drei Versuchstiere in Versuchsgruppe/ zwei Versuchstiere vor Versuchsende verstorben)**

Stamm	Dünndarm [CFU]/ml	PP [CFU] n = 4/Maus	Milz [CFU/g]
$YadA^e$	6,11	7,78	6,77
$YadA^e_{38}$	6,00	8,08	7,74
$YadA^e_{47}$	6,18	7,85	6,89
$YadA^e_{57}$	5,70	6,34	3,48
$YadA^e_{81}$	5,30	5,85	2,15
$YadA^e_{188}$ *	4,22	2,34	2,62
$YadA^p_{44}$ **	5,78	7,18	2,28
$YadA^p_{85}$	5,30	7,23	2,37
$YadA^p_{95}$	5,40	7,70	2,20

Bei den $YadA^e_i$ -Stämmen zeichnet sich eine abnehmende CFU mit zunehmender Deletion der NTTD ab. Während dieser CFU-Abfall in Dünndarm und PP deutlich ist, ist für den CFU/g-Durchschnittswert der Milz aufgrund der hohen Streuung nur eine abnehmende Tendenz erkennbar. Für den Stamm $YadA^e$ zeigt sich eine hohe Bakterienzahl, sowohl im Darmtrakt als auch in der Milz. Der Stamm $YadA^e_{38}$ zeigt nahezu keinen Unterschied zu Stamm $YadA^e$, auch hier sind Darm, PP und Milz deutlich mit Bakterien kolonisiert. Auch bei Stamm $YadA^e_{47}$ ist nur ein geringfügiger Unterschied in der CFU in der Milz im Vergleich zu Stamm $YadA^e$ nachweisbar. Der Stamm $YadA^e_{57}$ hingegen zeigt bereits einen deutlichen Abfall der CFU in PP und Milz, jedoch nicht im Darm. Stamm $YadA^e_{81}$ zeigt einen Abfall auf ungefähr 10% der Bakterienlast von Stamm $YadA^e$ in Dünndarm und PP, welcher in den PP sogar signifikant ist. Noch deutlicher zeichnet sich der Unterschied bei der CFU/g in der Milz ab, jedoch aufgrund der großen Streuung ergibt sich hier keine Signifikanz. Hier liegt die CFU des Stammes $YadA^e_{81}$ auf dem gleichen Niveau wie die des stark attenuierten Stammes $YadA^e_{188}$. Dieser zeigt jedoch bereits im Darm einen sehr starken Abfall auf ca. ein Hundertstel der CFU von Stamm $YadA^e$. Sowohl in Dünndarm als auch in den PP ist der Unterschied zu Stamm $YadA^e$ signifikant.

Die $YadA^p_i$ -Stämme unterschieden sich von den $YadA^e_i$ -Stämmen hinsichtlich der CFU-Last. Während die $YadA^e_i$ -Stämme durchgängig sehr hohe CFU-Werte in Dünndarm und PP aufweisen, welche denen der mit Stamm $YadA^e$ -infizierten Mäusen ähneln, zeigen sich große

Unterschiede in der Milz. Tiere, mit hoher CFU/g-Belastung in der Milz, hatten einen stark mit Gas aufgeblähten Darm, welcher möglicherweise auf einen Darmverschluss zurückzuführen war. Dies könnte zu einer Verletzung des Darmepithels und einem direkten Übergang der Bakterien vom Darm in den Blutstrom der Tiere geführt haben. Die anderen Tiere, welche mit den YadA^P-Stämmen infiziert waren und nur eine geringe Bakterienlast in der Milz aufwiesen, zeigten weniger Beschwerden (keine makroskopischen Veränderungen des Darms gegenüber gesunden Tieren zu erkennen) und erweckten einen insgesamt wesentlich gesünderen Eindruck. Diese Befunde decken sich nicht mit denen aus einer vorangegangenen Arbeit (Untiet, 2013). Hier zeigte sich zwar eine signifikant geringere CFU in Dünndarm und PP der mit Stamm YadA^P infizierten Mäuse gegenüber denen mit Stamm YadA^c infizierten Mäusen. Jedoch konnte in der Milz kein signifikanter Unterschied mehr nachgewiesen werden. Hier ergab sich eine ähnlich hohe CFU-Last in der Milz wie bei Stamm YadA^c.

Zusammenfassend korrelieren hohe Keimzahlen im Darmlumen und PP mit hohen Keimzahlen in der Milz.

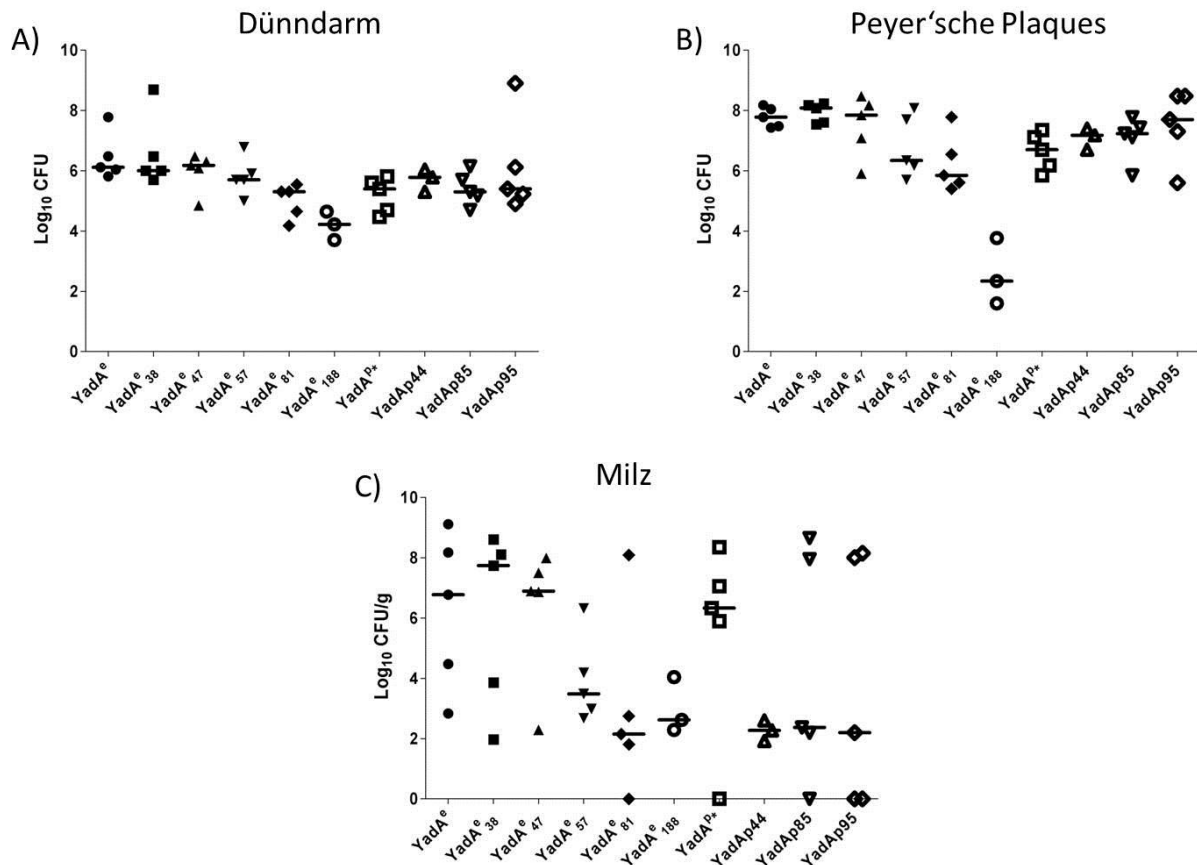


Abbildung 4.31: CFU ausgewählter Organe vier Tage nach oraler Infektion von Balb/C-Mäusen. Jedes Versuchstier wurde mit 10^9 Bakterien infiziert und nach vier Tagen getötet. Anschließend wurde der Dünndarm (A) lavagiert und PP (B) und Milz (C) entnommen. Die CFU wurde nach ausplattieren bestimmt. Vier PP pro Maus wurden entnommen. Bei Milz sind die CFU/g angegeben. Jedes Symbol entspricht einem Versuchstier. Die Striche zeigen den jeweiligen Median an. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform Yada^e_i bzw. Yada^p_i gekennzeichnet. Stamm Yada^p wurde von Untiet (2013) mit in die Grafik aufgenommen.

4.8.2 Intraperitoneale (ip) Mausinfektionen

Aufgrund der unterschiedlichen Darmflora und der schwer kontrollierbaren peroralen applizierten Dosen (Schluckeffizienzen), die die Reproduzierbarkeit des peroralen Mausinfektionsmodells beeinträchtigen, wurde die Virulenz anhand von ip Infektion untersucht. Hierfür wurden BALB/c-Mäuse (weiblich, 6-8 Wochen alt) wie bei der peroralen Infektion verwendet. Jeder Maus wurde eine Dosis von 5×10^4 Bakterien (200 μ l) intraperitoneal appliziert. Das Gewicht jedes Tieres wurde vor der Infektion sowie an jedem Tag nach der Infektion dokumentiert. Da sowohl die Mäuse der Positiv-Kontrollgruppe (Stamm Yada^e) als auch einige der mit Stämmen der Yada-Varianten infizierten Mäuse nach drei Tagen nach Infektion einen Gewichtsverlust von 15% oder mehr aufwiesen, wurde der Versuch am vierten Tag durch die Tötung der Tiere mit CO₂ beendet. Allen Tieren wurden anschließend die Milz und die gesamte Leber entnommen. Von beiden Organen wurde das

jeweilige Gewicht bestimmt und durch Homogenisierung (Mörser) eine Organsuspension hergestellt. Die Suspensionen wurden verdünnt und auf Agarplatten mit Antibiotika ausplattiert. Nach 48h bei 27°C wurden die CFU bestimmt und die CFU/g berechnet. In zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen wurden je YadA-Variante vier Mäuse infiziert, so dass eine Gesamtzahl von acht Tieren pro YadA-Variante bewertet werden konnte (siehe Tabelle 4.7 und Abbildung 4.32).

Tabelle 4.7: CFU/g in Leber und Milz 72 Stunden nach ip Infektion mit 5×10^4 Bakterien. Die -Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet.

Stamm	CFU/g in der Leber (Durchschnittswert)	CFU/g in der Leber (Median)	CFU/g in der Milz (Durchschnittswert)	CFU/g in der Milz (Median)
$YadA^e-0$	$2,62 \pm 0,17$	2,48	$3,46 \pm 0,14$	3,56
$YadA^e$	$6,83 \pm 0,18$	6,87	$8,29 \pm 0,32$	8,74
$YadA^e_{38}$	$5,36 \pm 0,77$	6,22	$5,98 \pm 0,87$	6,80
$YadA^e_{47}$	$5,13 \pm 0,78$	5,67	$5,11 \pm 0,83$	5,95
$YadA^e_{57}$	$3,86 \pm 0,77$	4,29	$3,41 \pm 0,39$	3,02
$YadA^e_{81}$	$3,28 \pm 0,33$	3,18	$3,33 \pm 0,12$	3,38
$YadA^p$	$6,93 \pm 0,12$	6,99	$7,95 \pm 0,37$	8,26
$YadA^p_{44}$	$3,85 \pm 0,44$	4,16	$3,75 \pm 0,63$	3,21
$YadA^p_{85}$	$5,98 \pm 0,89$	7,04	$6,57 \pm 1,11$	7,55
$YadA^p_{95}$	$6,38 \pm 0,35$	6,31	$7,47 \pm 0,52$	7,77

Wie im peroralen Infektionsmodell zeigt sich im ip-Infektionsmodell ein deutlicher Abfall der CFU in Leber und Milz bzw. der Mausvirulenz bei zunehmender Deletion der NTTD bei $YadA^e$. Als Negativ-Kontrolle diente bei diesem Versuch der Stamm $YadA^e-0$. Diese Mutante ist stark attenuiert im Vergleich zu Stamm $YadA^e$, was sich durch eine geringe Bakterienlast (4-5 log-Stufen) in Leber und Milz manifestiert. Die Stämme mit den YadA-Varianten $YadA^e_{38}$ und $YadA^e_{47}$ zeigen einen 10-fach Abfall des CFU-Wertes für die Leber bzw. einen mehr als 100-fachen Abfall für die Milz gegenüber der CFU für den Stamm $YadA^e$. Einen 1000-fachen Abfall der CFU in der Leber und 100.000-facher Abfall der CFU in der Milz zeigen die Stämme $YadA^e_{57}$ und $YadA^e_{81}$. Die Milz CFU-Werte dieser beiden Stämme ähneln denen des YadA-negativen Stammes $YadA^e-0$.

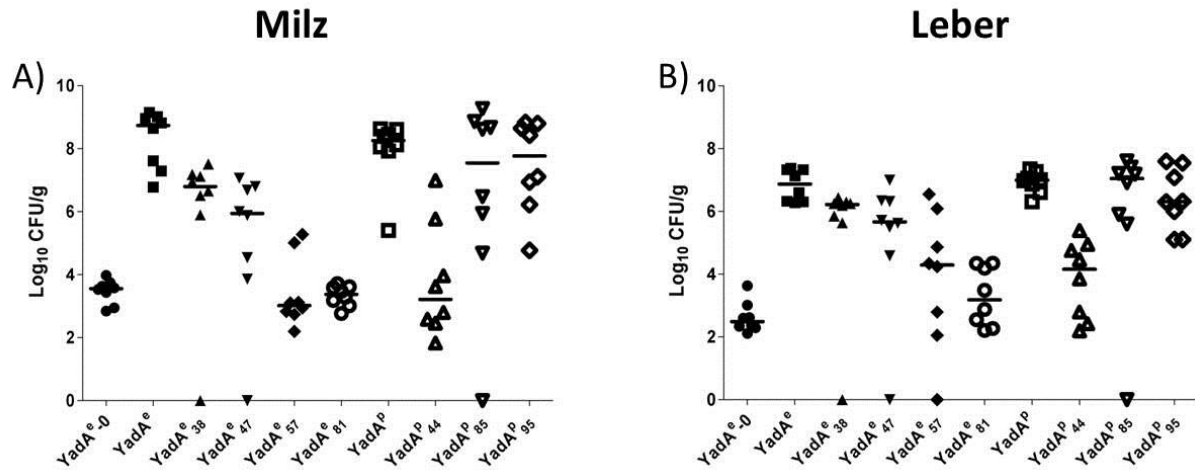


Abbildung 4.32: Median der CFU-Werte von Leber und Milz 72 Stunden nach ip Infektion von Balb/C-Mäusen mit WA(pYVO8-x)-Stämmen. Die Versuchstiere wurden jeweils mit 5×10^4 Bakterien infiziert und nach 72 Stunden getötet. Anschließend wurden Leber (A) und Milz (B) entnommen. Die CFU wurde auf LB-Agarplatten mit Antibiotika bestimmt. In den Abbildungen sind CFU/g angegeben. Jedes Symbol entspricht einem Versuchstier. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^P_i$ gekennzeichnet.

Bei den $YadA^P_i$ -Stämmen zeigt nur der Stamm $YadA^P_{44}$ einen signifikanten Unterschied in der Virulenz gegenüber Stamm $YadA^P$. Zwar zeigen auch die anderen beiden $YadA^P_i$ -Stämme $YadA^P_{85}$ und $YadA^P_{95}$ einen Abfall im CFU/g-Durchschnittswert gegenüber dem Stamm $YadA^P$, jedoch ist dieser nicht signifikant bzw. nur gering ausgeprägt. Der CFU/g-Medianwert von Stamm $YadA^P_{44}$ liegt sogar geringfügig unter dem Median von Stamm $YadA^e-0$, was auf eine sehr starke Attenuierung des Stammes $YadA^P_{44}$ im ip-Infektionsmodell hinweist.

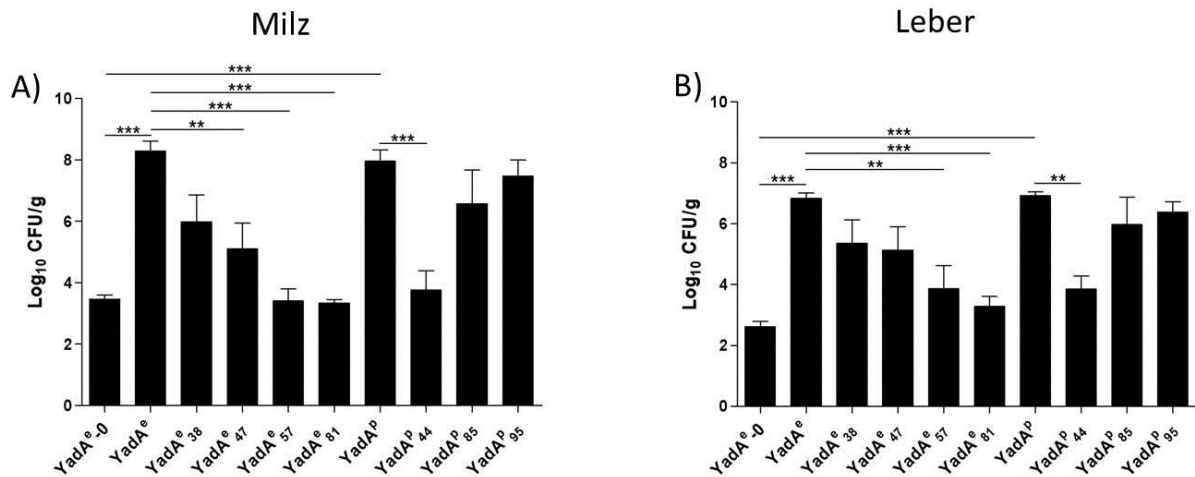


Abbildung 4.33: Durchschnitt der CFU-Werte von Leber und Milz 72 Stunden nach ip Infektion von Balb/C-Mäusen mit WA(pYVO8-x)-Stämmen. Die Versuchstiere wurden jeweils mit 5×10^4 Bakterien infiziert und nach 72 Stunden getötet. Anschließend wurden Leber (A) und Milz (B) entnommen. Die CFU wurde auf LB-Agarplatten mit Antibiotika bestimmt. In den Abbildungen sind CFU/g angegeben. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet. ($p \leq 0,05 = *$, ($p \leq 0,01 = **$ und ($p \leq 0,005 = ***$)

Als weiteres Maß der Virulenz bzw. des Schweregrades der Yersinieninfektion kann die Körpergewichtsabnahme der infizierten Mäuse verwendet werden. Dabei wurde das Gewicht jeder Maus mit einer Waage an jedem Tag zur selben Zeit bestimmt und dokumentiert. Aus den Einzelgewichten jeder Versuchstiergruppe (acht Mäuse) wurde ein Gruppendurchschnittswert gebildet (siehe Abbildung 4.34 und Tabelle 4.8). Auffallend ist die starke inverse Korrelation des Gewichtsverlust nach 72 Stunden (siehe Abbildung 4.34 A) mit den CFU/g-Werten von Leber und Milz im ip-Mausinfektionsmodells (siehe Abbildung 4.32) (starke Gewichtsabnahme mit hoher Keimzahl). Somit erweist sich der Gewichtsverlust als zusätzlicher Parameter zur Beurteilung der Erregervirulenz bzw. des Erkrankungsschweregrades.

Der Gewichtsverlust von über 15% beim Stamm $YadA^e$ nach 72 Stunden lässt auf eine sehr schwere Infektion schließen. Während der Unterschied zu Stamm $YadA^e_{38}$ noch relativ gering und nicht signifikant ausfällt, zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei den anderen $YadA^e_i$ -Stämmen. Bereits bei Stamm $YadA^e_{47}$ ist der Gewichtsverlust nur noch bei unter 10% gegenüber dem Gewicht der Tiere vor der Infektion. Auch hier ist wie bei der Bakterienlast eine stetige Abnahme des Gewichtsverlusts bei den $YadA$ -Varianten zunehmender Verkürzung der NTTD von $YadA^e$ feststellbar. Die Mäuse, welche mit Stamm $YadA^e-0$ infiziert worden waren, zeigen sogar eine geringe Gewichtszunahme drei Tage

postinfektional. Interessant ist auch der Verlauf der Gewichtsänderung über die Zeit (siehe Tabelle 4.8 und Abbildung 4.34). Hier wird deutlich, dass sich mit attenuierten Stämmen infizierte Mäuse nach anfänglichem Gewichtsverlust wieder erholen. Während Mäuse, welche mit dem Stamm YadA^e-0 infiziert worden waren, überhaupt keinen Gewichtsverlust zeigten, kann bei den Mäusen mit Stamm YadA^e₈₁-Infektion am zweiten Tag ein Abfall des Gewichts um ca. 5% festgestellt werden, wobei dieser Gewichtsverlust am 3. Tag postinfektional nur noch 2% beträgt. Noch deutlicher zeigt sich diese „Gewichtszunahme“ bei den Tieren, die mit Stamm YadA^e₅₇ infiziert waren: hier wurde der Gewichtsverlust von 10% am Tag 2 nach der Infektion bereits am Tag 3 nach der Infektion auf ca. 4% Gewichtsverlust ausgeglichen. Alle anderen YadA^e-Stämme zeigten einen stetigen Gewichtsverlust während des Infektionsverlaufs.

Bei den YadA^p-Stämmen zeigten Mäuse, welche mit den Stämmen YadA^p und YadA^p₉₅ infiziert worden waren, sogar einen höheren Gewichtsverlust (zunehmender Erkrankungsgrad) als mit Stamm YadA^e infizierte Mäuse (siehe Tabelle 4.8 Abbildung 4.34). Bei beiden betrug der durchschnittliche Gewichtsverlust drei Tage nach der Infektion fast 20%. Mit Stamm YadA^p₈₅ infizierte Mäuse zeigten einen ähnlichen Gewichtsverlust wie mit Stamm YadA^e infizierte Mäuse (etwas mehr als 15%) während der Infektionsdauer und lagen damit etwas unter den Werten von mit den Stämmen YadA^p und YadA^p₉₅ infizierten Mäusen. Den geringsten Gewichtsverlust zeigten Mäuse, welche mit Stamm YadA^p₄₄ infiziert worden waren. Hier konnte lediglich ein Rückgang von ungefähr 5% des Körpergewichts während der Infektion festgestellt werden. Auch hier korrelieren die Körpergewichtsänderungen, wie bei den YadA^e-Stämmen, sehr gut mit den ermittelten CFU/g-Werten bei Leber und Milz. Beim Gewichtsverlust über die Zeit ergab sich ein starker und stätiger Gewichtsrückgang bei den Stämmen YadA^p, YadA^p₈₅ und YadA^p₉₅. Bei Stamm YadA^p₄₄ zeigte sich ein etwas langsamerer Gewichtsrückgang während der Versuchsdauer (siehe Tabelle 4.8 und Abbildung 4.34).

Der Schweregrad der Infektion bzw. die Virulenz des Erregers zeigt sich anhand der CFU/g in der Leber und der Milz der infizierten Mäuse. Umso höher diese Werte sind, umso stärker ist die Infektion bzw. umso höher ist die Virulenz des Erregers. Neben den CFU/g-Werten der Organe kann aber auch das Gewicht als Marker für den Erkrankungsgrad bzw. die Virulenz des Erregers herangezogen werden. Dies wird deutlich durch die positive Korrelation der CFU/g-Werte der Organe zum Gewichtsverlust der Mäuse über die Infektionsdauer (siehe Abbildung 4.32 und Abbildung 4.34).

Tabelle 4.8: Veränderung des Körpergewichts der BALB/c-Mäuse nach ip Infektion über die gesamte Versuchsdauer von 72 Stunden. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet.

Stamm	Veränderung 24h pi [%]	Veränderung 48h pi [%]	Veränderung 72h pi [%]
$YadA^e-0$	$100,3 \pm 0,65$	$100,7 \pm 0,89$	$100,7 \pm 1,08$
$YadA^e$	$100,1 \pm 0,77$	$90,44 \pm 1,54$	$83,53 \pm 1,47$
$YadA^e_{38}$	$99,37 \pm 0,85$	$90,12 \pm 0,98$	$86,16 \pm 1,78$
$YadA^e_{47}$	$100,2 \pm 0,31$	$94,14 \pm 1,12$	$91,02 \pm 2,14$
$YadA^e_{57}$	$99,57 \pm 0,62$	$89,36 \pm 1,56$	$96,14 \pm 1,28$
$YadA^e_{81}$	$99,99 \pm 0,42$	$95,90 \pm 1,72$	$98,29 \pm 1,39$
$YadA^p$	$99,04 \pm 0,79$	$90,92 \pm 1,30$	$80,06 \pm 0,98$
$YadA^p_{44}$	$99,66 \pm 1,03$	$94,02 \pm 1,13$	$94,23 \pm 2,13$
$YadA^p_{85}$	$97,36 \pm 1,63$	$91,18 \pm 1,41$	$83,61 \pm 1,97$
$YadA^p_{95}$	$98,13 \pm 1,16$	$87,81 \pm 0,72$	$79,97 \pm 0,45$

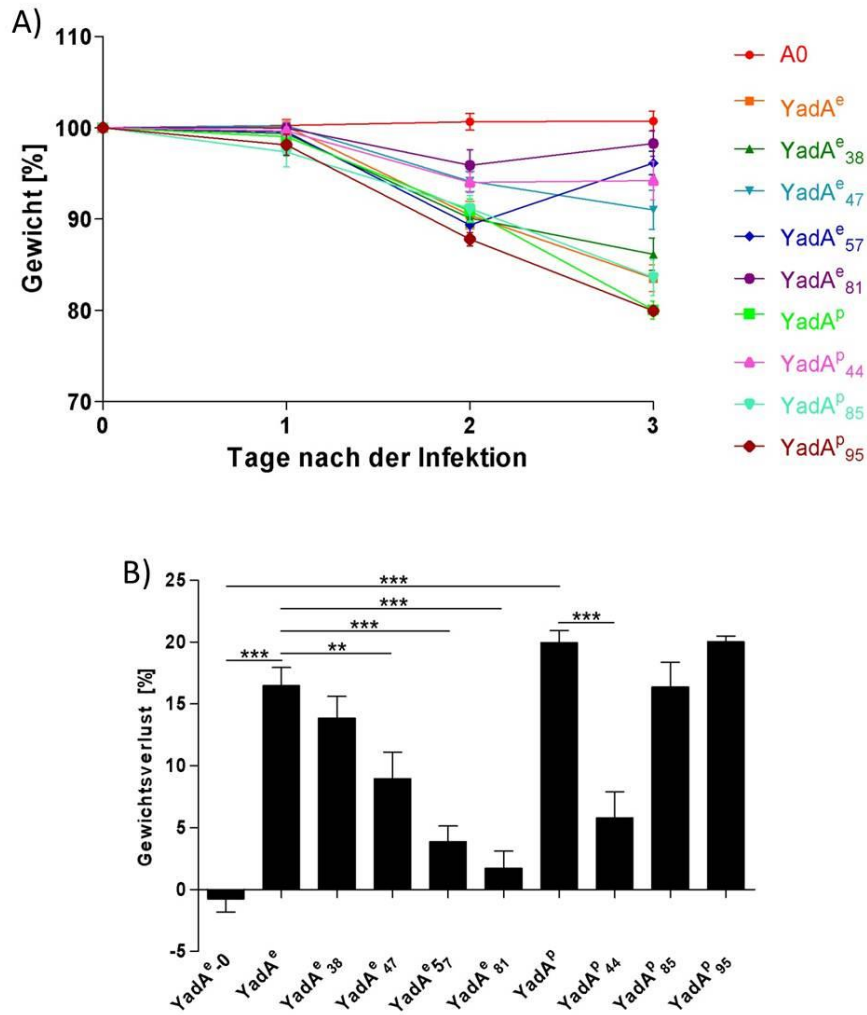


Abbildung 4.34: Gewichtsverlust der Versuchstiere nach ip Infektion. Jedes Tier wurde mit einer Dosis von 5×10^4 Bakterien infiziert und das Gewicht jedes Tieres vor der Infektion und anschließend in einem 24h Intervall bis zur Beendigung des Versuches dokumentiert. In Bild A ist der durchschnittliche Gewichtsverlust über die gesamte Infektionsdauer aufgezeichnet. Bild B zeigt den durchschnittlichen Gewichtsverlust der Mäuse 72 Stunden nach der Infektion. Die Anzahl an Versuchstieren pro Infektionsstamm betrug $n = 8$. Die Yersinien-Stämme sind in Kurzform $YadA^e_i$ bzw. $YadA^p_i$ gekennzeichnet. ($p \leq 0,05 = *$, ($p \leq 0,01 = **$ und ($p \leq 0,005 = ***$)

5 Diskussion

Das *Yersinia* Adhäsın YadA ist der Prototyp der trimeren Autotransporter Adhäsine (TAA) und zeigt wie viele Mitglieder dieser Familie eine Affinität zu ECM-Proteinen wie Kollagen, Laminin oder Fibronektin (Flügel et al, 1994; Tamm et al, 1993; Terti et al, 1992). Die Bindungsfähigkeit bakterieller Adhäsine an ECM-Proteine ist eng mit der Virulenz der Erreger assoziiert. Allerdings fehlt der direkte Beweis, dass die Erreger im Wirtsgewebe an ECM-Proteine binden bzw. ihre Oberfläche mit ECM-Proteinen maskieren. Diskutiert wird, dass diese Interaktion nicht nur eine wichtige Rolle bei der Besiedlung von Gewebe zukommt, sondern auch bei der Adhäsion und Invasion von Zellen. Bereits beschrieben wurde, dass die Deletion der 81 N-terminalen AS bei YadA^e (YadA^e₈₁) zum Verlust der Bindung an Neutrophile führt, wobei die Bindung an HeLa-Zellen und ECM-Proteine erhalten bleibt (Roggenkamp et al, 1996). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die unterschiedliche Fibronektinbindungsfähigkeit von YadA^e und YadA^p durch Unterschiede in der NTTD-Sequenz bedingt ist (Heise & Dersch, 2006). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch rekombinante Herstellung verschiedener N-terminaler Deletionen von YadA von *Y. enterocolitica* O:8 (YadA^e) und *Y. pseudotuberculosis* (YadA^p) im Stammhintergrund WA(pYVO8-x) neue Erkenntnisse zu Struktur-Funktions-Beziehungen hinsichtlich Bindungsfähigkeit für ECM-Proteine, Autoagglutination und Mausvirulenz gewonnen werden können.

Die *yadA*-Gene bilden eine Allelfamilie, wobei der Alleltyp innerhalb einer Serogruppe von *Y. enterocolitica* oder *Y. pseudotuberculosis* nicht variiert. Die verschiedenen Alleltypen führen zu YadA-Varianten mit geringen Unterschieden insbesondere in der N-terminalen AS-Sequenz, die sich in deutlichen Unterschieden der Bindungsfähigkeit von ECM-Proteinen manifestiert (Eitel & Dersch, 2002; Heise & Dersch, 2006). Durch Veränderung der Bindungsfähigkeit an ECM-Proteine wird vermutlich nicht nur die direkte Interaktion mit diesen Proteinen beeinflusst, sondern auch indirekt die Interaktion mit Zellen des Wirtsorganismus wie z.B. Zellen des angeborenen Immunsystems (Roggenkamp et al, 1996). Veränderungen oder Deletionen in der Primärsequenz eines Proteins können neben strukturellen Veränderungen in Bindedomänen für andere Proteine auch die physikalische Interaktion zweier Proteine indirekt beeinflussen. Vor allem die Veränderung der Nettoladung in einzelnen Bereichen eines Proteins haben häufig gravierende Folgen für die Interaktion mit Rezeptoren oder Agonisten wegen veränderter elektrostatischer Wechselwirkungen (Alberts

et al, 2003; Kajava et al, 2000). Diese Veränderungen können auch einen direkten Einfluss auf die Virulenz eines Bakteriums nehmen. YadA positive Yersinien, welche Mikrokolonien im Wirts-Gewebe (extrazelluläre Erreger), wie der Milz oder der Leber, bilden, zeigen eine Resistenz gegen Komplement- und Defensin-vermittelte Lyse und vor der Abtötung durch PMNs (Pilz et al, 1992; Rüssmann et al, 1996; Visser et al, 1996).

5.1 Herstellung und Charakterisierung der YadA-Varianten in WA(pYV08-x)

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression und Oberflächenlokalisierung verschiedener rekombinanter YadA-Varianten nicht durch die Deletion des Kopfes oder dessen Austausch gegen den Kopfbereich anderer TAAs beeinträchtigt wird (Ackermann et al, 2008; Roggenkamp et al, 1996; Tamm et al, 1993). Bei den hier hergestellten und untersuchten YadA-Varianten konnte eine ähnliche Expression, Produktion und Lokalisation in der äußeren Membran im Vergleich zum Referenzstamm $YadA^c$ nachgewiesen werden. Die Exposition der YadA-Varianten ist mit der des $YadA^c$ -Wildtyps (Referenzstammes $YadA^c$) vergleichbar, was durch Immunoblotanalysen der Außenmembranproteine ebenso gezeigt wurde, wie durch Immunofluoreszenzmikroskopie. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass alle rekombinanten Stämme gleichmäßig die YadA-Varianten auf ihrer Oberfläche exponiert haben (siehe Abbildung 4.5).

Eine essentielle Rolle für die Insertion in die äußere Membran und die Exposition von YadA spielen nicht nur die 25 AS der Signalsequenz (Sec-abhängige Sekretion), sondern auch die nachfolgenden fünf AS hinter der Signalpeptidase-Schnittstelle. Werden die fünf Kodons für diese AS deletiert führt dies zur verminderten Produktion und Exposition der YadA-Varianten (siehe 4.2). Verantwortlich dafür dürfte vermutlich die negative Nettoladung (AS D und E) dieser fünf AS (EEPED oder NNDEL) sein. Denn auch andere TAAs wie NadA oder Hsf, welche Sec-abhängig ins Periplasma transportiert werden, haben im unmittelbaren Anschluss an die Signalsequenz negativ geladene AS (E und D). Zudem konnten Kavaja und Mitarbeiter zeigen, dass die Nettoladung in diesem Bereich einen starken Einfluss auf den effizienten Transport von Proteinen durch den Sec-Apparat hat (Kajava et al, 2000).

Der Einbau in die äußere Membran sowie die nachgewiesene Exposition (IF-Nachweis) sprechen dafür, dass N-terminal verkürzte YadA-Varianten wahrscheinlich eine ähnlich dicht gepackte YadA-Schicht (S-Layer ähnlich) bilden wie der YadA-Wildtyp. Deletionen der

NTTD, welche nicht strukturiert sein sollte (Nummelin et al, 2004), haben somit keinen Einfluss auf die YadA-Dichte auf der Bakterienoberfläche, dafür jedoch teilweise auf den pI-Wert und den GRAVY-Index der YadA-Varianten (siehe 4.4). Da YadA die komplette Oberfläche des Bakteriums bedeckt, ergeben sich dadurch auch Unterschiede in der Oberflächenladung des Bakteriums (Hoiczky et al, 2000). So wurden hier in der Verteilung in einem biphasischen Dextran-PEG-Gemisch bei einem pH-Wert von 7,0 ein starker Unterschied zwischen Yersinien mit YadA (z.B. Stamm YadA^e) und Yersinien ohne YadA (z.B. Stamm YadA^e-0) nachgewiesen (siehe Abbildung 4.7). Dies steht im Einklang mit früheren Beobachtungen (Schiemann et al, 1987). Auch dort konnte gezeigt werden, dass die Expression von YadA Einfluss auf die Verteilung in einem biphasischen System hat. Die errechneten pI-Werte aller YadA^e-Varianten weisen eine relativ geringe Streuung auf (pI-wert zwischen 6,45 und 6,92), ebenso wie die Verteilung der YadA^e-Stämme im biphasischen PEG-Dextran-Gemisch (siehe Tabelle 4.2 und Abbildung 4.7). Der pI-Wert der NTTD bzw. von Teilen der NTTD bei den YadA^e-Varianten mit Deletionen in diesem Bereich liegt bei allen YadA^e-Varianten sogar bei unter 4,5. Die Nettoladung im Bereich der NTTD ist bei allen YadA^e-Varianten negativ (siehe Abbildung 5.1). Dies erklärt den pI-Wert >7 bzw. >4,5 für alle YadA^e-Varianten. Mit diesen Ergebnissen würde man einen hohen Anteil der YadA^e-Stämme in der hydrophilen Dextran-reichen Phase erwarten. Jedoch sammelten sich die Bakterien an der Phasengrenze an. Dies könnte jedoch mit der Dichte der Bakterien und der Dichte der Dextran-reichen Phase oder mit der Bildung von Bakterienaggregaten zusammenhängen.

	NTTD	Nettoladung der NTTD
YadA ^e	MTKDFKISVS AALISALFSS PYAFANDEV HFTAVQISPN SDPDSHVMIF QPEVRAPGGT NALAKGTHSI AVGASAEAAE RAAVAVGAGS	-2
YadA ^e ₃₈	MTKDFKISVS AALISALFSS PYAFANDELPN SDPDSHVMIF QPEVRAPGGT NALAKGTHSI AVGASAEAAE RAAVAVGAGS	-3
YadA ^e ₄₇	MTKDFKISVS AALISALFSS PYAFANDEL MIF QPEVRAPGGT NALAKGTHSI AVGASAEAAE RAAVAVGAGS	-2
YadA ^e ₅₇	MTKDFKISVS AALISALFSS PYAFANDELGGT NALAKGTHSI AVGASAEAAE RAAVAVGAGS	-2
YadA ^e ₈₁	MTKDFKISVS AALISALFSS PYAFANDEL -AAVAVGAGS	-2
YadA ^e ₁₈₈	MTKDFKISVS AALISALFSS PYAFANDEL	-2

Abbildung 5.1: Vergleich der ersten 90 AS der YadA-Varianten YadA^e, YadA^e₃₈, YadA^e₄₇, YadA^e₅₇, YadA^e₈₁ und YadA^e₁₈₈ (von oben nach unten). Aminosäuren, deren Seitenketten bei pH-Wert 7,0 negativgeladen sind, sind rot angegeben. Aminosäuren, deren Seitenketten bei einem pH-Wert von 7,0 positivgeladen sind, sind blau markiert. Grün sind polare AS, deren Seitenketten bei einem pH-Wert von 7,0 keine Nettoladung tragen. Die YadA-Varianten YadA^e und YadA^e-HY unterscheiden sich in diesem Bereich nicht in der Ladung.

Der Stamm $YadA^P$ zeigt einen höheren pI-Wert und einen höheren Anteil der Bakterien in der PEG-reichen Phase. Diese $YadA$ -Variante hat eine positive Nettoladung im Bereich der NTTD. Die $YadA$ -Variante $YadA^{P_{44}}$ hat einen noch höheren errechneten pI-Wert. Auch die Verteilung im biphasischen PEG-Dextran-Gemisch war gegenüber dem Stamm $YadA^P$ noch stärker in Richtung der hydrophoben Phase verschoben. Dies liegt zum einen am Austausch der AS26-30 (gegenüber $YadA^P$, siehe Abbildung 5.2), da hier vier AS mit negativ geladenen Seitenketten gegen zwei AS mit negativer Ladung und zwei polaren, neutralen AS ausgetauscht wurden. Und zum anderen an der großen Anzahl basischer AS im Bereich der AS45-85 und somit einer positiven Nettoladung im Bereich der NTTD (siehe Abbildung 5.2). Die Deletion der neun basischen AS in diesem Bereich der $YadA$ -Varianten $YadA^{P_{85}}$ und $YadA^{P_{95}}$ führte zu einem niedrigeren pI-Wert dieser $YadA$ -Varianten. Dies zeigt auch die geringere prozentuelle Anreicherung dieser beiden Stämme in der hydrophoben Phase der PEG-Dextran-Mischung.

	NTTD	Nettoladung der NTTD
$YadA^P$	MTKDFKISVS AALISALFSS PYAFEEPEP GNDGIPRLSA VQISPNVDPK LGVGLYPAKP ILRQENPKLP PRGPQGPEKK RARLAEAIQP QVLGAGGLNA RAKDPYSIAI GATAEAAKPA	+1
$YadA^{P_{44}}$	MTKDFKISVS AALISALFSS PYAFANDEL PHVDPK LGVGLYPAKP ILRQENPKLP PRGPQGPEKK RARLAEAIQP QVLGAGGLNA RAKDPYSIAI GATAEAAKPA	+3
$YadA^{P_{85}}$	MTKDFKISVS AALISALFSS PYAFANDEL EAIQP QVLGAGGLNA RAKDPYSIAI GATAEAAKPA	-3
$YadA^{P_{95}}$	MTKDFKISVS AALISALFSS PYAFANDEL GGLNA RAKDPYSIAI GATAEAAKPA	-2

Abbildung 5.2: Vergleich der ersten 120 AS der $YadA$ -Varianten $YadA^P$, $YadA^{P_{44}}$, $YadA^{P_{85}}$ und $YadA^{P_{95}}$ (von oben nach unten). Aminosäuren, deren Seitenketten bei pH-Wert 7,0 negativgeladen sind, sind rot angegeben. Aminosäuren, deren Seitenketten bei einem pH-Wert von 7,0 positivgeladen sind, sind blau markiert. Grün sind polare AS deren Seitenketten bei einem pH-Wert von 7,0 keine Nettoladung trägt.

Zur Charakterisierung der $YadA$ -Varianten wurden auch die Autoagglutinationseigenschaften in Suspension gemessen. Dafür wurden von allen Stämmen die Größe der Partikel erstmalig im Durchflusszytometer bestimmt und auf dieser Grundlage Unterschiede im Autoagglutinationsverhalten der $YadA$ -Varianten ermittelt. Interessant ist, dass im Vergleich zum Referenzstamm $YadA^e$, sowohl kleinere als auch größere Bakterienaggregate auftreten können. Die Stämme WAc und $YadA^e-0$ zeigten wie erwartet keine Autoagglutination (siehe 4.6.1). Bei beiden Stämmen wurden ausschließlich Einzelbakterien im Durchflusszytometer nachgewiesen. Dies war ebenso bei den Stämmen $YadA^{P_{85}}$ und $YadA^{P_{95}}$ der Fall. Einige wenige Aggregate konnten bei $YadA^{e_{38}}$ im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine stark verringerte Autoagglutination schließen, welche jedoch nicht völlig

aufgehoben ist. $YadA^{e_{47}}$, $YadA^{e_{57}}$, $YadA^{e_{81}}$, $YadA^P$ und $YadA^{P_{44}}$ zeigten keine auffälligen Unterschiede in der Autoagglutinationsstärke zum Referenzstamm $YadA^e$. Als sehr interessant erweisen sich die beiden Stämme $YadA^{e_{188}}$ und $YadA^e$ -HY. Zwar zeigt $YadA^{e_{188}}$ keinen Unterschied in der Autoagglutination zu Stamm $YadA^e$, da jedoch eine hydrophobe Region im Kopfbereich im Vorgang der Autoagglutination involviert zu sein scheint bzw. die Kopfbereiche der $YadA$ -Proteine der unterschiedlichen Bakterien direkt miteinander interagieren (elektronen-mikroskopische Aufnahmen von Hoiczky zeigen dies gut), hätte man von einem Verlust der Autoagglutination bei Stamm $YadA^{e_{188}}$ (kopfloses $YadA^e$) ausgehen können (Hoiczky et al, 2000; Tamm et al, 1993). Möglicherweise können sich jedoch die Stiele der kopflosen $YadA$ -Proteine ebenfalls in einer „Zipper“-ähnlichen Art und Weise miteinander verknüpfen, vergleichbar zum Referenzstamm $YadA^e$. Die $YadA$ -Variante $YadA^e$ -HY hingegen zeigt die stärkste Autoagglutinationseigenschaft im Vergleich zu $YadA^e$ und den anderen $YadA$ -Varianten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieses Stammes zeigen die gleiche Art der Vernetzung durch die Interaktion der Kopfreionen zweier $YadA$ -Proteine miteinander (Hoiczky et al, 2000). Eine stärkere Wechselwirkung durch eine veränderte Kopfstruktur scheint die wahrscheinlichste Erklärung für die gesteigerte Anzahl und Größe der bakteriellen Aggregate zu sein. Autoagglutination kann ebenfalls beim *E. coli* TAA EibD festgestellt werden. Auch hier wird eine Wechselwirkung zwischen den Köpfen der EibD-Proteine verschiedener Bakterien, wie bei $YadA$, gezeigt (Hoiczky et al, 2000; Leo et al, 2011). Während bei den $YadA^e$ -Varianten eine Verkürzung der NTTD zunächst zu einem negativen Einfluss auf das Autoagglutinationsvermögen führt (starke Verringerung der Autoagglutination bei $YadA^{e_{38}}$), zeigen sich bei zunehmender Deletion der NTTD und des Kopfes von $YadA^e$ keine Veränderung der Autoagglutinationsstärke gegenüber $YadA^e$. Bei $YadA^P$ verhält es sich umgekehrt. So führt eine Deletion des ersten Teils der NTTD ($YadA^{P_{44}}$) zu keinem Unterschied in der Autoagglutinationsstärke. Werden jedoch größere Bereiche der NTTD deletiert ($YadA^{P_{85}}$ und $YadA^{P_{95}}$), führt dies zu einem Verlust der Autoagglutination. Es konnten keine einheitlichen Muster, welche an der Autoagglutination beteiligt sind, in der NTTD erkannt werden. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen Nettoladung, pI-Wert oder Oberflächenladung im $YadA$ -Kopfbereich der Yersinien und der Autoagglutination nachgewiesen werden.

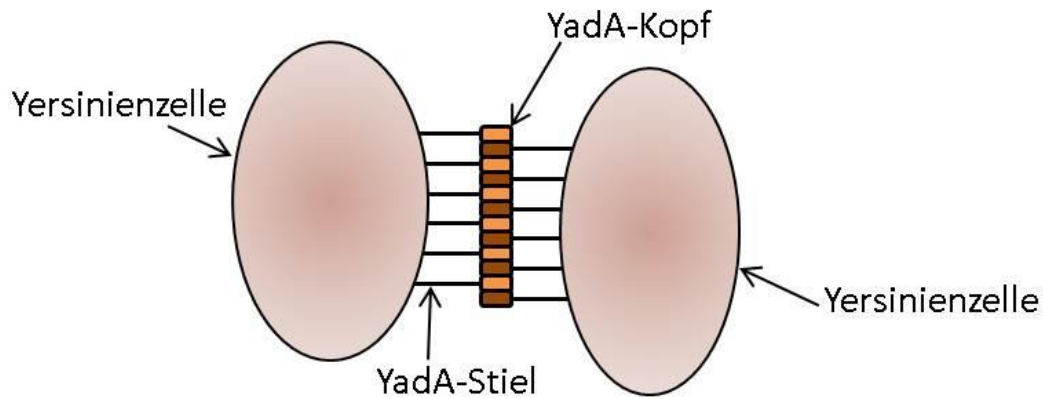


Abbildung 5.3: Grafische Darstellung der Bindung zweier Yersinien mittels YadA. Nicht-maßstabsgetreue Darstellung.

5.2 in vitro vermittelte YadA-Bindung an ECM-Proteine

5.2.1 Yersinien-Bindung an immobilisierten Kollagen und gelöstes Kollagen

In den späten 1980er und frühen 1990er Jahren konnten verschiedene Gruppen einen Zusammenhang zwischen YadA und der Bindung von Kollagen von Yersinien zeigen (Emödy et al, 1989; Schulze-Koops et al, 1992; Tamm et al, 1993). Analysen zur Struktur-Funktion von YadA konnten die Kollagenbindung dem YadA-Kopfbereich zuweisen (Kollagen-Bindedomäne, CBD). YadA-Varianten mit Mutationen im „ β -roll“ Bereich in der CBD verloren die Fähigkeit Kollagen zu binden (Roggenkamp et al, 1995; Tahir et al, 2000). Bei der Bindung an immobilisiertes Kollagen wird die Kollagenbindungsfähigkeit gemessen. Dies bedeutet, dass indirekt die Menge an gebundenen Yersinien an eine vorgegebene Menge an immobilisiertem Kollagen auf einer definierten Fläche gemessen wird. Somit kann bestimmt werden, wie groß die Anzahl der gebundenen Yersinien ist, die von Kollagen gebunden werden kann. Zwei grundsätzliche Bindemodelle sind dabei möglich (siehe Abbildung 5.4) Auf der einen Seite das Gleichgewichtsmodell, in dem ein ständiger Austausch von kollagenbindenden Yersinien und Yersinien in Suspension vorkommt, und auf der anderen Seite das Expressions- oder Selektionsmodell, in dem alle YadA produzierenden Yersinien (unabhängig von der Oberflächendichte) an Kollagen binden und Yersinien, welche kein YadA bzw. nicht die kritische YadA-Dichte exprimieren, in Suspension verbleiben. Eine Erweiterung des Expressionsmodells stellt das Aggregatmodell dar. Hier wird auch die Fähigkeit von YadA zur Autoagglutination mit einbezogen.

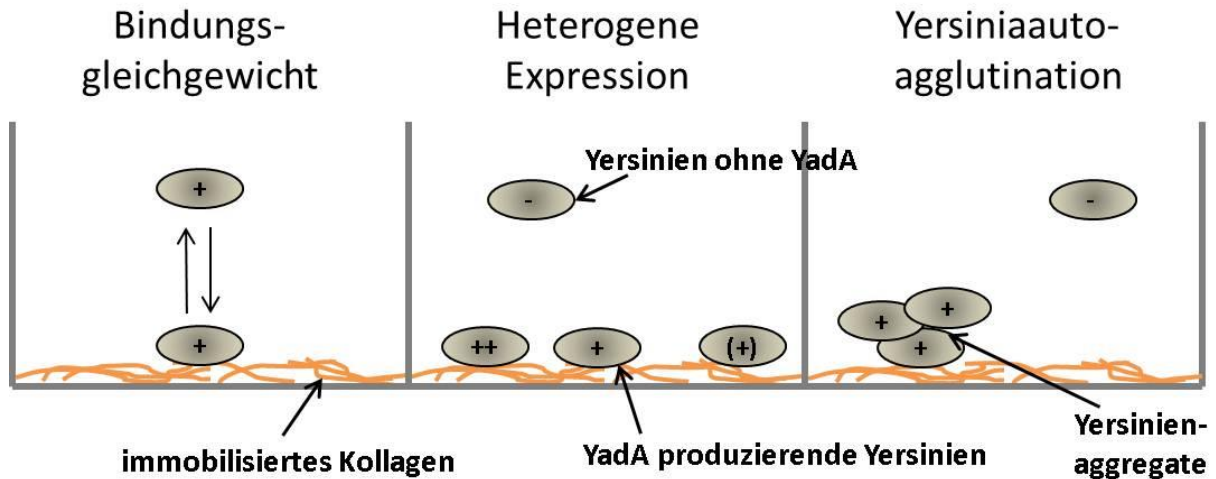


Abbildung 5.4: Drei mögliche Bindemodelle an immobilisiertes Kollagen (ECM-Protein) im ELISA-Aufbau. links: Gleichgewichtsmodell, mitte: Expressionsmodell, rechts: Aggregatmodell

Da für YadA-Varianten, welche signifikante Unterschiede in der Autoagglutination zeigten keine signifikanten Unterschiede oder erkennbare Trends in der Bindungsfähigkeit an Kollagen bestimmt werden konnten, scheint die Aggregatbildung bei der Bindung an immobilisierte ECM-Proteine keine bedeutende Rolle zu spielen. Da auch keine Unterschiede in der Exposition von YadA in den WA(pYVO8-x)-Stämmen zu sehen war, scheint das Gleichgewichtsmodell letztendlich ebenfalls unwahrscheinlich.

Die in dieser Arbeit getesteten YadA-Varianten mit kurzen Deletionen im nicht-strukturierten N-terminalen Bereich zeigten Bindung von Kollagen, welche jedoch im Vergleich zu Stamm $YadA^e$ geringer ist (siehe Abbildung 4.9). Zwischen den einzelnen Stämmen mit den unterschiedlichen $YadA^e_i$ -Varianten bestanden in den Bindungsfähigkeiten von immobilisierten ECM-Proteinen jedoch kaum Unterschiede. Auch die $YadA^p_i$ -Stämme zeigten eine geringere Bindung an immobilisiertes Kollagen als der Stamm $YadA^e$. Nur der Stamm $YadA^e_{188}$ (Deletion der Kopfdomäne) zeigte, wie erwartet, keine Bindung an immobilisiertes Kollagen, wie auch $YadA^e-HY$. Interessant ist die geringe Bindungsfähigkeit von $YadA^p$. Zwar weisen große Teile der CBD ($YadA^e$ AS58-188 und $YadA^p$ AS96-226) beider YadA-Varianten Sequenzidentität auf (85,4%), jedoch sind auch einzelne AS-Abschnitte im N-terminalen und C-terminalen Bereich der Kollagenbindedomäne unterschiedlich (siehe Abbildung 5.5).

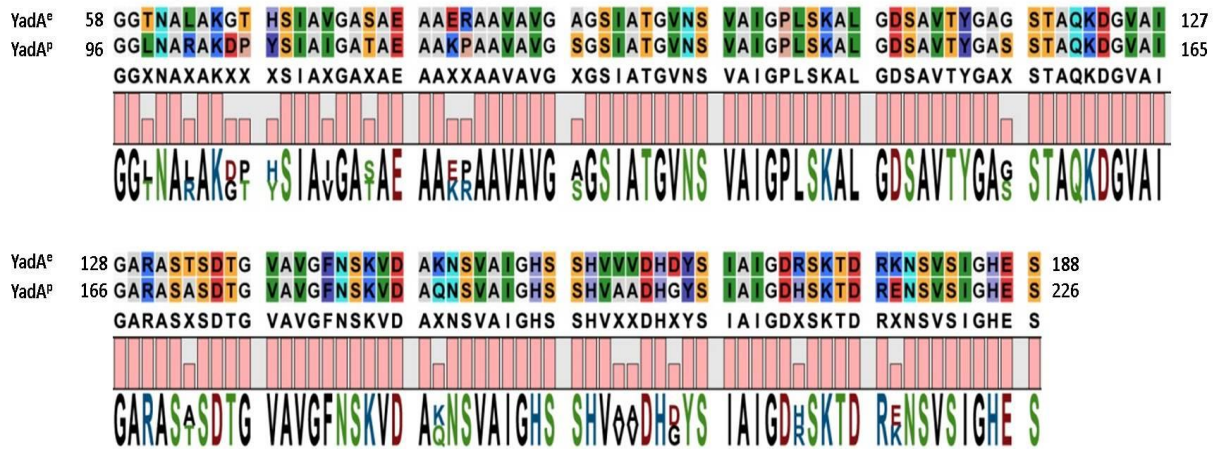


Abbildung 5.5: Sequenzvergleich der CBD von YadaA^e (AS58-188, oben) und YadaA^p (AS96-226, unten). Die Proteine weisen im Bereich der CBD eine Sequenzhomologie von 85,4% auf.

Dies könnte durchaus Einfluss auf die Kollagenbindungsfähigkeit haben. Sowohl in YadaA^e als auch YadaA^p kann das NSVAIG-Motiv gefunden werden. Ob jedoch das NSVAIG-Motiv wirklich eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Kollagen spielt, ist bisher nicht überzeugend bewiesen worden (Leo et al, 2008). Auch andere TAAs, welche kein Kollagen binden, haben dieses Motiv (Mühlenkamp et al, 2015). Zudem hat YadaA^p in der NTTD zusätzlich 32 AS gegenüber YadaA^e. Dieser Unterschied und die Unterschiede in der AS-Sequenz in der CBD könnten eine leicht unterschiedliche Struktur der CBD und dadurch eine Beeinflussung der Kollagenbindungsfähigkeit verursachen (Nummelin et al, 2004). Die Unterschiede der YadaA^e_i-Varianten und YadaA^p_i-Varianten zu den Wildtyp-Varianten YadaA^e bzw. YadaA^p könnten durch eine Destabilisierung der „β-roll“ verursacht werden. Dies würde auch erklären, warum kaum Unterschiede in der Bindung an immobilisiertes Kollagen nach Deletion von Teilen der NTTD zu anderen YadaA-Varianten innerhalb der YadaA^e_i- bzw. YadaA^p_i-Varianten nachgewiesen werden konnten. Die Daten zeigen also, dass keine Kollagenbindestelle in der NTTD vorhanden ist, jedoch die Kollagenbindestelle im Kopfbereich des YadaA durch Deletionen im Bereich der NTTD beeinflusst werden kann.

In dieser Arbeit lassen sich kaum Unterschiede bei der Bindung den einzelnen YadaA-Varianten von immobilisiertem Kollagen Typ I und immobilisiertem Kollagen Typ IV nachweisen. Kempf und Mitarbeiter sind zu ähnlichen Ergebnissen gekommen (Müller et al, 2011). Jedoch konnte in der Arbeit von Müller et al. auch gezeigt werden, dass sich die Bindung an immobilisiertes Kollagen Typ I von der Bindung an immobilisiertes Kollagen Typ IV unter dynamischen Bedingungen (Strömungskammer) unterscheidet. Die Bindung an

immobilisiertes Kollagen Typ I unter statischen und dynamischen Bedingungen wies jedoch keine Unterschiede auf.

Die Immobilisierung von ECM-Protein auf eine Oberfläche kann die Struktur des ECM-Proteins verändern und somit auch die Bindestellen. Dies könnte zu einer „artifiziellen“ Bindung der Yersinien über YadA an Kollagen führen. Deshalb wurde erstmalig auch die Bindung von Kollagen in Suspension mittels Zytofluorometrie untersucht. Diese Experimente kommen physiologischen Bedingungen näher und bringen zudem zusätzliche Informationen, da nicht die Kollagenbindungsfähigkeit gemessen wird, sondern die Kollagenbindungskapazität. Die Kollagenbindungskapazität zeigt zum einen, wie viele Yersinien Kollagen gebunden haben, und zum anderen auch, wieviel Kollagen pro Einzelbakterium gebunden wird.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Kollagenbindungskapazität unterschieden sich stark von den Ergebnissen der Kollagenbindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen. Da Kollagen zu Bakterienaggregaten führt, wurden bei den gemessenen Ergebnissen nur Einzelbakterien (62%-84% der Gesamtpopulation) für die quantitativen Bestimmungen berücksichtigt. In den Messungen der Bindung von Kollagen in Suspension im Durchflusszytometer (Kollagenbindungskapazität) zeigen sich bei den Stämmen der YadA^e-Varianten kaum Unterschiede. Weder in der prozentualen Menge an bindenden einzelnen Yersinien, noch in der Menge des gebundenen Kollagens pro Einzelbakterium. Nur Stamm YadA^e₈₁ zeigte eine signifikant geringere Bindung von Kollagen im Vergleich zu Stamm YadA^e. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Kollagenbindungsfähigkeit. Bei den YadA^p-Varianten ist das Ergebnis noch überraschender. Während bei YadA^p₄₄ und YadA^p₈₅ über 80% aller Einzelbakterien Kollagen binden, waren es bei YadA^p und YadA^p₉₅ nur rund 40%. Jedoch zeigten alle YadA^p-Varianten mehr gebundenes Kollagen pro Bakterium, wenn Kollagenbindung vorhanden war, als bei YadA^e und seinen Varianten YadA^e_i.

Bei Stamm YadA^p scheint eine Erklärung für die geringe Anzahl an gebundenen Yersinien an immobilisiertes Kollagen zunächst sehr einfach. Die Daten der Bindung von Stamm YadA^p an Kollagen in Suspension zeigen, dass zwei unterschiedliche kollagenbindende Populationen vorhanden sind: Population A, welche kein Kollagen bindet, und Population B, die sehr gut bindet. Ein ähnliches Ergebnis zu Stamm YadA^p zeigt der Stamm YadA^p₉₅ in Suspension, wogegen die Stämme YadA^p₄₄ und YadA^p₈₅ überwiegend aus einer kollagenbindenden Population bestehen. Jedoch zeigen nicht nur Stamm YadA^p und Stamm YadA^p₉₅ eine geringe

Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen im Vergleich zu Stamm YadA^e, sondern auch die Stämme YadA^P₄₄ und YadA^P₈₅. Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass es sich bei der Bindung an immobilisiertes Kollagen um einen anderen Bindungsmechanismus handeln muss als bei der Bindung an lösliches Kollagen.

Am Wahrscheinlichsten scheint eine Beeinflussung der Bindung durch die Immobilisierung des Kollagens und der dadurch möglicherweise veränderten Struktur des Kollagens zu sein. In früheren Experimenten in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass YadA^e zwei Bindestellen für Kollagen in der CBD aufweist (Gramlich, 2014). Eine dieser Bindestellen kann durch das synthetische Tripeptid (POG)₁₀ (Kollagenbindestelle A) inhibiert werden, die andere Bindestelle (Kollagenbindestelle B) jedoch nicht. Denkbar wäre, dass Kollagenbindestelle A besser an immobilisiertes Kollagen binden kann als an Kollagen in Suspension. Kollagenbindestelle A könnte zudem durch Deletionen im Bereich der NTTD verändert werden und dadurch die Bindungseigenschaften an Kollagen z.B. negativ beeinflussen.

5.2.2 Bindung von (POG)₁₀ an YadA und Inhibierung der Kollagenbindung durch (POG)₁₀ in Suspension

Um eine bessere Erklärung für die Unterschiede zwischen der Kollagenbindungsfähigkeit und der Kollagenbindungskapazität zu finden, wurden Versuche durchgeführt, um die Yersinien-Bindungskapazität für das synthetische trimere Oligopeptid (POG)₁₀ und die Inhibierung der Kollagenbindung durch (POG)₁₀ zu bestimmen. Zur Messung der (POG)₁₀-Bindungskapazität wurden die Yersinien mit Dy647-(POG)₁₀ inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer die Fluoreszenzintensität der Einzelbakterien bestimmt. Eine Veränderung der YadA-Bindungseigenschaften von (POG)₁₀ und Dy647-(POG)₁₀ aufgrund der Markierung mit Dy647-Molekülen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Alle YadA^e-Varianten, welche Dy647-(POG)₁₀ binden können, zeigen bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml Dy647-(POG)₁₀ keine signifikanten Unterschiede in der Dy647-(POG)₁₀-Bindungskapazität (siehe Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25). Einzige Ausnahme bildet der Stamm YadA^e₈₁. Hier zeigen sich signifikante Unterschiede sowohl in der Bindungskapazität als auch in der Anzahl der Dy647-(POG)₁₀-bindenden Yersinien gegenüber Stamm YadA^e. Die Stämme, welche kein Kollagen binden (YadA^e-0, YadA^e-HY, YadA^e₁₈₈), binden ebenfalls kein Dy647-(POG)₁₀. Die Stämme YadA^P und YadA^P₄₄ zeigen keine

signifikanten Unterschiede in der Bindungskapazität gegenüber der von Stamm YadA^e. Bei den Stämmen YadA^P₈₅ und YadA^P₉₅ ist die Bindungskapazität von Dy647-(POG)₁₀ signifikant höher als die von Stamm YadA^P. Bei einer Erhöhung der Konzentration von Dy647-(POG)₁₀ auf 10 µg/ml verändert sich die gemessene Bindungskapazität im Verhältnis zu Stamm YadA^e deutlich. Hier zeigten die MFI-Werte einen ähnlichen Verlauf zu den Bindungsfähigkeitswerten der YadA^e-Stämme im ELISA mit immobilisiertem Kollagen Typ I (siehe Abbildung 4.9 und Abbildung 4.25). Dies deutet, wie bereits zuvor angesprochen, darauf hin, dass zwei Bindestellen (Kollagenbindestelle A und Kollagenbindestelle B, siehe 5.2.1) für Kollagen Typ I bzw. (POG)₁₀ in der CBD des Kopfes von YadA vorhanden sind. Eine der beiden Kollagenbindestellen könnte durch Veränderungen der Struktur der Kopfdomäne durch Deletionen im Bereich der NTTD beeinflusst werden. Für den YadA^e₈₁-Stamm könnte diese Bindestelle sogar soweit verändert sein, dass die Bindestelle A nicht mehr funktional ist und nur noch die Bindestelle B für die (POG)₁₀- und Kollagenbindungsfähigkeit verbleibt (siehe Abbildung 4.25). Alle YadA^P-Varianten binden Dy647-(POG)₁₀ bei einer Konzentration von 10 µg/ml deutlich schlechter als der Stamm YadA^e. Dies könnte daraufhin deuten, dass hier nur eine Bindestelle in der CBD für Kollagen Typ I vorhanden ist oder die zweite Bindestelle (POG)₁₀ nicht binden kann. Es wäre auch denkbar, dass die Bindung zwischen Kollagen bzw. (POG)₁₀ in der Kollagenbindestelle A bei den YadA^P-Stämmen nicht so stark ist wie bei Stamm YadA^e. Dies könnte dazu führen, dass sowohl die Bindung an immobilisiertes Kollagen als auch die Bindung von Kollagen in Suspension die Bindung zwischen den YadA^P-Stämmen und Kollagen an der Kollagenbindestelle A leichter durch Scherkräfte gelöst werden kann. Somit könnte die Anzahl an Kollagen gebundenen Yersinien für die YadA^P_i-Stämme bzw. deren Bindungskapazität niedriger erscheinen.

Um weitere Hinweise über die Positionen der beiden Kollagenbindestellen in der CBD von YadA zu erhalten und ob YadA^P zwei Bindestellen für Kollagen besitzt, wurden Inhibierungsversuche für die Bindung von Kollagen Typ I durch (POG)₁₀ durchgeführt. Um die Inhibierung zu quantifizieren, wurden die Yersinien zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen an (POG)₁₀ (0 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 50 µg/ml) und anschließend mit Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I (10 µg/ml) inkubiert. Im Durchflusszytometer wurde dann der MFI der Einzelbakterien bestimmt.

Die Kollagenbindungsfähigkeit der Einzelbakterien nahm stetig ab mit steigender (POG)₁₀-Konzentration, bis maximal um 35 Prozent (siehe Abbildung 4.27 und Tabelle 4.5). Bei den

Stämmen $YadA^e$, $YadA^e_{81}$, $YadA^P$ und $YadA^P_{95}$ (siehe Abbildung 4.27) konnte anfänglich eine Zunahme der kollagenbindenden Einzelbakterien gemessen werden. Dies könnte auf die Autoagglutinationsinhibierung durch $(POG)_{10}$ zurückzuführen sein (Gramlich, 2014). Die MFI für Alexa488-Kollagen Typ I nimmt bei allen Stämmen jedoch mit zunehmender Konzentration an $(POG)_{10}$ stetig ab, wobei die Unterschiede zwischen 10 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ $(POG)_{10}$ nur noch sehr gering sind ($(POG)_{10}$ -Sättigung). Dies bestätigt die Ergebnisse, welche bei vorangegangenen Experimenten mit dem Stamm $YadA^e$ erzielt wurden (Gramlich, 2014). Bei den $YadA^P$ -Stämmen führt $(POG)_{10}$ zu einem stärkeren Abfall der MFI als bei den kollagenbindenden $YadA^e$ -Stämmen. Bei 50 $\mu\text{g/ml}$ $(POG)_{10}$ weisen alle kollagenbindenden Stämme in etwa die gleiche MFI-Werte auf. Dies deutet auf eine stark konservierte Kollagenbindestelle hin, die nicht durch Deletion in der NTTD beeinflusst wird. Ebenso sind keine signifikanten Unterschiede der $(POG)_{10}$ -inhibierten Kollagenbindung zwischen $YadA^e$ und $YadA^P$ festzustellen. Somit lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass die Kollagenbindestelle B, welche ausschließlich Kollagen bindet und nicht durch $(POG)_{10}$ inhibiert werden kann, in der CBD lokalisiert ist. Die Kollagenbindestelle A, welche sowohl Kollagen als auch $(POG)_{10}$ binden kann, sollte weiter N-terminal positioniert sein. Dies könnte auch die inhibierende Wirkung der Autoagglutination erklären. Die dafür zuständige Region wird bei *Y. enterocolitica* O:8 im Bereich der AS80-101 im Kopfbereich von $YadA$ vermutet (Tamm et al, 1993). Die verminderte Bindungskapazität von $(POG)_{10}$ von $YadA^e_{81}$ unterstützt die Annahme, dass die Kollagenbindestelle A ebenfalls in diesem Bereich lokalisiert ist. Die $(POG)_{10}$ -Kollagenbindungsexperimente zeigen, dass auch $YadA^P$ zwei Bindestellen für Kollagen haben sollte. Die Kollagenbindestelle A kann dabei sehr gut durch $(POG)_{10}$ inhibiert werden. Dies zeigt sich dadurch, dass die MFI für Alexa488-kojugiertes Kollagen Typ I schon bei niedrigen Konzentrationen von $(POG)_{10}$ reduziert wurde. Die Kollagenbindestelle B lässt sich, wie bei $YadA^e$, ebenfalls nicht durch $(POG)_{10}$ blockieren. Dies deutet auf eine schwächere Bindung von Kollagen an der Kollagenbindestelle A im Vergleich zu Kollagenbindestelle B hin. Dies könnte, wie bereits oben erwähnt, eine Erklärung für die unterschiedlichen Bindungsmuster für immobilisiertes Kollagen und Kollagen in Lösung sein.

Mit den vorliegen Ergebnissen lässt sich das Modell über die Kollagenbindestellen im Kopfbereich von $YadA$, welches von Gramlich (2014) eingeführt wurde, erweitern (siehe Abbildung 5.6). Die Kollagenbindestelle A, welche sowohl $(POG)_{10}$ als auch Kollagen Typ I binden kann, befindet sich im Bereich $YadA^e$ AS80-101 der CBD. Die Kollagenbindestelle B,

welche Kollagen Typ I nicht jedoch (POG)₁₀ binden kann, sollte sich im Bereich YadA^e AS102-188 der CBD befinden. Deletionen im Bereich der NTTD haben möglicherweise einen Einfluss auf die Struktur im N-terminalen Bereich der CBD und beeinflussen dadurch die Bindung an Kollagen Typ I und vor allem (POG)₁₀ (Kollagenbindestelle A).

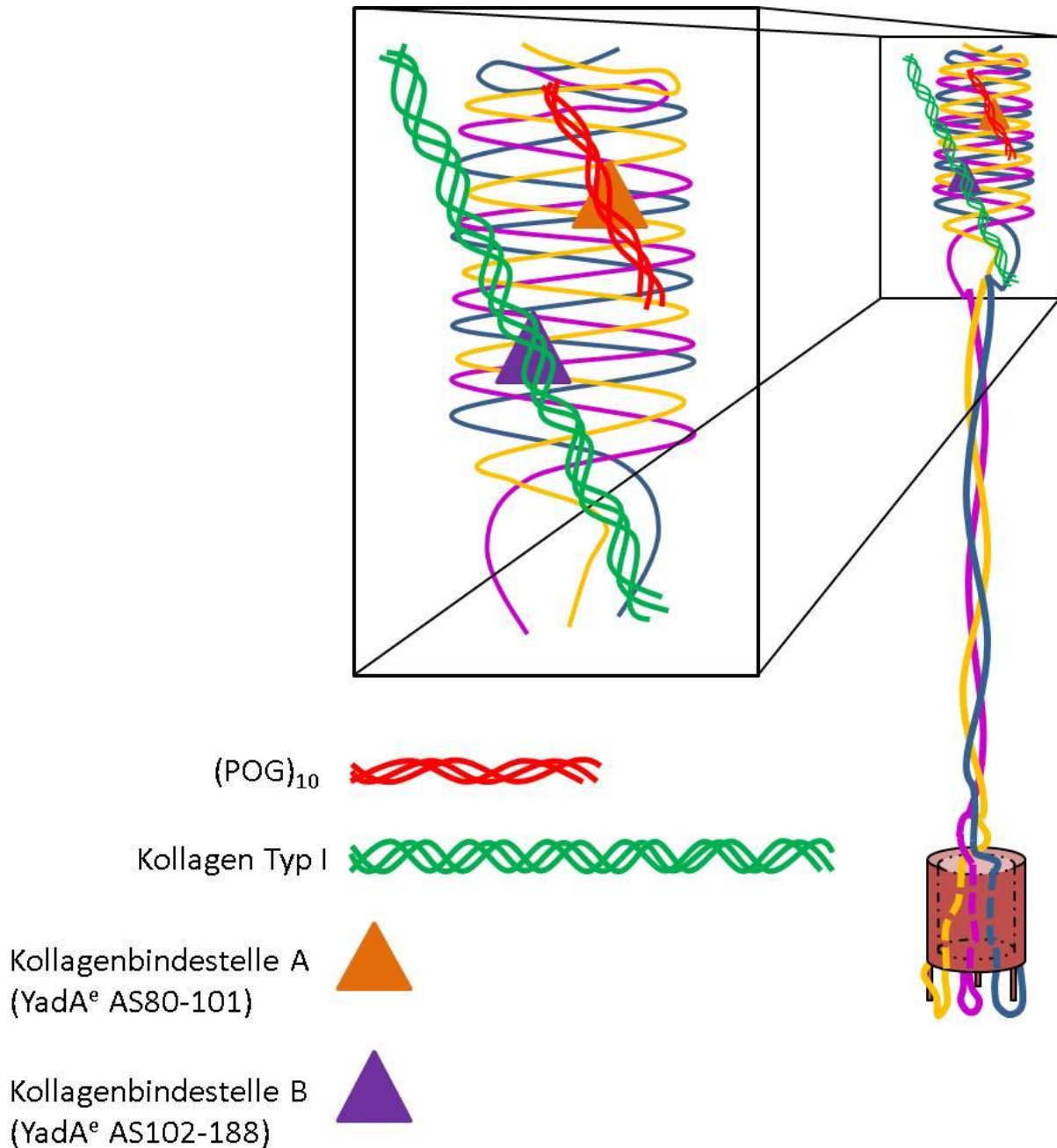


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der verschiedenen, potentiellen Bindungsstellen für Kollagen Typ I in YdaA. Darstellung der beiden Kollagenbindestellen im Kopfbereich (Länge ~5 nm) von YdaA. Während die Kollagenbindestelle A sowohl Kollagen Typ I (Durchmesser ~2 nm) als auch (POG)₁₀ (Länge ~4,5 nm) binden kann, bindet die Kollagenbindestelle B kein (POG)₁₀ (modifiziert nach (Gramlich, 2014) und Nummelin et al (2004). Kollagen- und (POG)₁₀-Fibrillen nicht maßstabsgetreu dargestellt.

5.2.3 Bindung von Yersinien an immobilisiertes Laminin

Es wurde bereits in den frühen 1990er Jahren gezeigt, dass YadA Laminin binden kann und diese Bindung schwächer als die Bindung an Kollagen zu sein scheint (Flügel et al, 1994; Tamm et al, 1993). In dieser Arbeit wurde die Lamininbindungsfähigkeit für YadA an immobilisiertes Laminin untersucht. Dafür wurden Mikrotiterplatten, welche mit Laminin (1 µg/ml) beschichtet wurden, in einem ELISA-Aufbau verwendet.

Die Bindungsfähigkeit an Laminin der YadA^e-Stämme nimmt mit zunehmender Deletion des N-Terminus von YadA^e stetig ab (siehe Abbildung 4.10). Stamm YadA^e₁₈₈, bei dem der komplette Kopfbereich von YadA deletiert ist, zeigt keine Bindung an Laminin. Die stetige Abnahme der Bindungsfähigkeit der YadA^e-Stämme mit zunehmender Deletion im N-terminalen Bereich von YadA zeigt eine Beteiligung der NTTD in der Bindung an Laminin. Es lässt sich jedoch nicht zeigen, ob Strukturveränderungen oder eine fortschreitende Denaturierung der Bindungsstelle dafür verantwortlich sind (siehe Abbildung 5.8). Dies wird durch die Daten von Skurnik und Mitarbeitern unterstützt. Hier konnte bei einem *Y. enterocolitica* O:8 Stamm, welcher ein YadA mit einer Deletion der AS80-101 produziert, ein Verlust der Bindung an Laminin gezeigt werden (Tamm et al, 1993).

Interessanterweise zeigt Stamm YadA^P, wie bei der Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen, eine signifikant geringere Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Laminin im Vergleich zu Stamm YadA^e. Ebenfalls wie bei der Bindungsfähigkeit an immobilisiertes Kollagen zeigen die Stämme YadA^P₄₄, YadA^P₈₅ und YadA^P₉₅ eine signifikant höhere Bindungsfähigkeit für immobilisiertes Laminin gegenüber Stamm YadA^P (siehe Abbildung 4.10). Leider konnte aus technischen Gründen im Durchflusszytometer nicht zwischen lamininbindenden und nicht-lamininbindenden Populationen differenziert werden, da die verwendeten Anti-Laminin-Antikörper kein deutliches Signal zeigten. Offensichtlich wird die Bindungsfähigkeit von YadA^P durch Deletion von N-terminalen AS verstärkt. Ob dies mit einer Strukturveränderung oder Denaturierung von Bindungsregionen zusammenhängt bleibt, wie bei YadA^e, offen.

5.2.4 Bindung von Yersinien an Fibronectin und Fibronectinfragmente

Mit Kollagen und Laminin ist Fibronectin das wichtigste ECM-Protein des menschlichen Körpers. In früheren Arbeiten wurde die Bindung von YadA an Fibronectin bereits untersucht (Heise & Dersch, 2006; Schulze-Koops et al, 1993; Tertti et al, 1992). Aufgrund der

unterschiedlichen Versuchsanordnungen, der Verwendung sowohl von pFn als auch cFn und unterschiedlicher Yersinienstämme ergaben sich jedoch teilweise kontroverse Ergebnisse. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Untersuchung des Einflusses der NTTD sowohl bei YadA^e als auch YadA^p für die Bindung von cFn und pFn in immobilisiertem Zustand und in Suspension untersucht.

Die Bindungsfähigkeit an immobilisiertes pFn ist für den Stamm YadA^e höher als für den Stamm YadA^p. Bei beiden Stämmen konnte eine signifikant höhere Bindungsfähigkeit an immobilisiertes pFn gemessen werden als beim Stamm YadA^e₁₈₈. Interessanterweise zeigte jedoch auch Stamm YadA^e₁₈₈ (kopfloses YadA) eine Bindung an immobilisiertes pFn. Um mehr Erkenntnisse über die Bindungsstellen in pFn für YadA zu erlangen, wurden unterschiedlichste Fibronektinfragmente immobilisiert und die Bindung von verschiedenen YadA-Varianten in Vorversuchen untersucht. Dabei zeigte sich sowohl im N-terminalen Bereich von pFn als auch in der Region FN-III7-10 eine sehr hohe Bindungsfähigkeit der untersuchten Yersinien-Varianten. Darüber hinaus konnten bereits für andere bakterielle Adhäsine Bindestellen im N-terminalen Bereich von Fibronektin identifiziert werden (Henderson et al, 2011). Die Bindungsergebnisse für die Stämme YadA^e, YadA^e₁₈₈ und YadA^e-HY hinsichtlich der Bindung an verschiedene FN-III7-10-Fragmente (FN-III7-10RGD, FN-III7-10RGE und FN-III7-10ΔRGD) zeigen, dass die Bindung in diesem Bereich nicht vom RGD-Motiv des Fn (Bindung an Integrine) abhängig ist. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Bindungsfähigkeit der drei Stämme an diese drei Fragmente (siehe Abbildung 4.12). Für die Untersuchung der Bindung an die N-terminale Region von pFn wurden die Fragmente FN-I1-5 und FN-I1-9 verwendet. Während im Fragment FN-I1-9 die Kollagenbindestelle noch vorhanden ist, fehlt diese bei Fragment FN-I1-5. Nur für die Stämme YadA^e, YadA^p und YadA^p₄₄ konnte eine Bindung an die Fragmente nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.13). Somit konnten erstmalig zwei Bindestellen in immobilisiertem pFn für Yersinien identifiziert werden, von der mindestens die Bindestelle im N-terminalen Bereich von pFn direkt von YadA abhängt. Diese Daten zeigen zudem, dass die spezifische Bindungsstelle für den N-terminalen Bereich (FN-I1-5) von pFn in der NTTD von YadA lokalisiert ist (siehe Abbildung 5.8) und stehen teilweise in Einklang mit den Daten für *Y. pseudotuberculosis* der Arbeitsgruppe Dersch (Heise & Dersch, 2006), welche ihre Versuche jedoch alle in einem *Y. pseudotuberculosis* Hintergrund durchgeführt haben und nicht in einem *Y. enterocolitica* Hintergrund wie in dieser Arbeit. Sie konnten für YadA^p ebenfalls eine Bindung in der NTTD nachweisen. Darüber hinaus konnte nachgewiesen

werden, dass eine 32 AS lange, für YadA^P spezifische Sequenz für die Bindung an cFn verantwortlich ist. Bei Stamm YadA^P wird die Bindestelle für Fibronectin in der NTTD vermutlich teilweise durch die N-terminale Domäne AS30-44 maskiert. Dies wird durch die höhere Bindungsfähigkeit von Stamm YadA^P₄₄ im Vergleich zu Stamm YadA^P bestätigt. Für *Y. enterocolitica* O:8 Stamm 8081 konnte in der Arbeit von Dersch und Mitarbeitern jedoch keine Bindung an immobilisiertes cFn nachgewiesen werden. Diese Diskrepanzen könnten zum einen an der Verwendung von pFn-Fragmenten in dieser Arbeit und zum anderen an den oben genannten unterschiedlichen *Yersinia*-Hintergründen liegen. Ein Sequenzvergleich des YadA^e der beiden *Y. enterocolitica* O:8 Stämme 8081 und WA-314 zeigt zehn unterschiedliche AS in der NTTD beider YadA^e (siehe Abbildung 5.7).

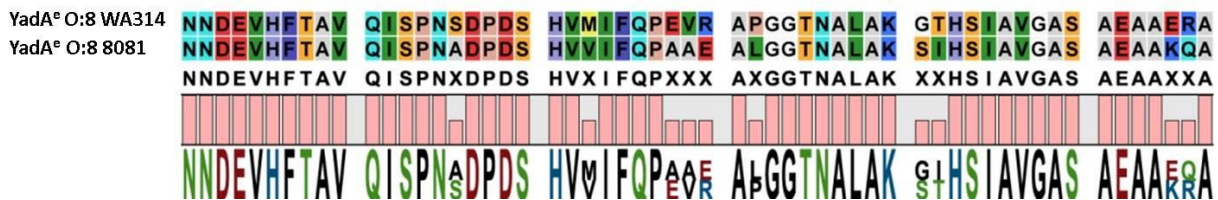


Abbildung 5.7: Aminosäuresequenzvergleich der AS26-57 (NTTD) von YadA zweier *Y. enterocolitica* O:8 Stämme. Die Aminosäuresequenzen stammen von YadA^e von *Y. enterocolitica* O:8 Stamm WA314 und YadA^e von *Y. enterocolitica* O:8 Stamm 8081. YadA^e 8081 wurde von der Arbeitsgruppe Dersch bei Experimenten zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit von cFn verwendet (Heise & Dersch, 2006).

Da pFn im menschlichen Körper im Blutplasma in löslicher Form vorliegt, wurde auch die Bindung von YadA von Fibronectin in gelöstem Zustand untersucht. Das Durchflusszytometer erwies sich dabei als nicht geeignet für die Bindungsuntersuchungen von Fibronectin an Yersinien (kein Nachweis über Anti-Fibronectin-Antikörper oder Alexa488-markiertes Fibronectin wegen des sehr niedrigen Fluoreszenzsignals, welches sich nicht von der Hintergrundfluoreszenz unterschied, möglich). Deshalb wurde die Bindungskapazität der WA(pYVO8-x)-Stämme mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Dafür wurden die Yersinienstämme zunächst mit Fibronectin inkubiert, anschließend auf Objektträgern fixiert und die Bindung von Fibronectin mittels indirekter Immunofluoreszenzmikroskopie (Anti-Fibronectin-Antikörper) untersucht (siehe Abbildung 4.30).

Für YadA^e₁-Stämme konnte keine Bindung von pFn nachgewiesen werden. Für die Stämme YadA^e und YadA^e-HY konnte mit cFn eine Bindung an Bakterienaggregate gezeigt werden,

jedoch nur sehr schwach an Einzelbakterien. Während Stamm YadA^c₁₈₈ noch eine Bindung von immobilisiertem pFn zeigte, ist in Suspension weder eine Bindung von pFn noch von cFn nachzuweisen. Bei den Stämmen YadA^p und YadA^p₄₄ konnte eine Bindung sowohl von pFn als auch von cFn festgestellt werden. Dabei zeigte die Bindung von cFn bei beiden Stämmen eine stärkere Fluoreszenz als die von pFn.

Die Bindungsstelle von cFn ist im Kopfbereich von YadA^c lokalisiert. Dieser Befund steht im Einklang mit den Bindungsergebnissen von Stamm YadA^c mit den immobilisierten FN-I-Fragmenten. Die fehlende Bindung von pFn durch den Stamm YadA^c könnte mit einer Konformationsänderung von pFn in Lösung zusammenhängen, da die Bindestellen sowohl im N-terminalen Teil als auch jene im Bereich FN-III7-10 maskiert sein könnten (Mao & Schwarzbauer, 2005; To & Midwood, 2011). Erst bei der Bindung an Integrine auf der Oberfläche von Zellen erfolgt eine Streckung von pFn, wodurch diese Bindestellen für andere Bindungspartner zugänglich gemacht werden. Diese Daten stehen auch in Einklang mit Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen, bei denen die Bindung an immobilisiertes pFn an *Y. enterocolitica* O:3 gezeigt werden konnte, nicht jedoch an pFn in Suspension (Terti et al, 1992). Bei cFn ist eine Streckung des Proteins zur Exprimierung der Bindungsmotive nicht nötig, hier sind diese Bindestellen auch in Suspension zugänglich. In vivo könnte diese Bindung jedoch durchaus eine Rolle spielen, da in vivo pFn an der Zelloberfläche durch Integrine gebunden und gestreckt wird und somit mögliche Bindestellen für YadA^c zugänglich wären.

Das zu Stamm YadA^c andere Fn-Bindevverhalten von Stamm YadA^p deutet auf einen anderen Bindungsmechanismus, d.h. YadA^p könnte zusätzliche Bindestellen für pFn haben, welche auch in gelöstem pFn zugänglich sind.

Einen Hinweis auf unterschiedliche Bindungsmechanismen und/oder Bindestellen ergaben sich auch aus den Experimenten zur Inhibierung der Fibronectinbindung durch Kollagen Typ I bzw. (POG)₁₀. Während *Yersinia*-gebundenes FN-II-5 keinen Einfluss auf die *Yersinia*-Bindung an immobilisiertes Kollagen Typ I bzw. (POG)₁₀ hat, wirkt *Yersinia*-gebundenes Kollagen Typ I bzw. (POG)₁₀ inhibitorisch auf die *Yersinia*-Bindung an immobilisiertes FN-II-5 (siehe Abbildung 4.14 und Abbildung 4.15). *Yersinia*-gebundenes Kollagen Typ I inhibiert die *Yersinia*-Bindung an immobilisiertes FN-II-5 sowohl bei Stamm YadA^c als auch bei den Stämmen YadA^p und YadA^p₄₄. Dieser Effekt könnte sterische Gründe wegen der Größe der Kollagenfibrillen und damit verbundenen Maskierung der Bindestelle für

Fibronectin haben. Für *Yersinia*-gebundenes (POG)₁₀ ergeben sich interessante Unterschiede für die Bindung an immobilisiertes FN-I1-5 zwischen Stamm YadA^e und den Stämmen YadA^P und YadA^P₄₄. Während bei steigender Konzentration von gebundenem (POG)₁₀ für YadA^e die Bindungsfähigkeit an immobilisiertes FN-I1-5 um das dreifache erhöht wird, wird die Bindungsfähigkeit für immobilisiertes FN-I1-5 bei den Stämmen YadA^P und YadA^P₄₄ mit steigender (POG)₁₀-Konzentration zunehmend inhibiert. Dies könnte an Strukturveränderungen in der NTTD durch Bindung von (POG)₁₀ und der damit verbundenen Änderung der Fibronectinbindestelle liegen. Eine zusammenfassende Interpretation der ECM-Proteinbindungsergebnisse mit Bindestellen für YadA ist schematisch in der Abbildung 5.6 (Kollagen- und (POG)₁₀-Bindestellen) und der Abbildung 5.8 (Laminin- und Fibronectinbindestellen) dargestellt.

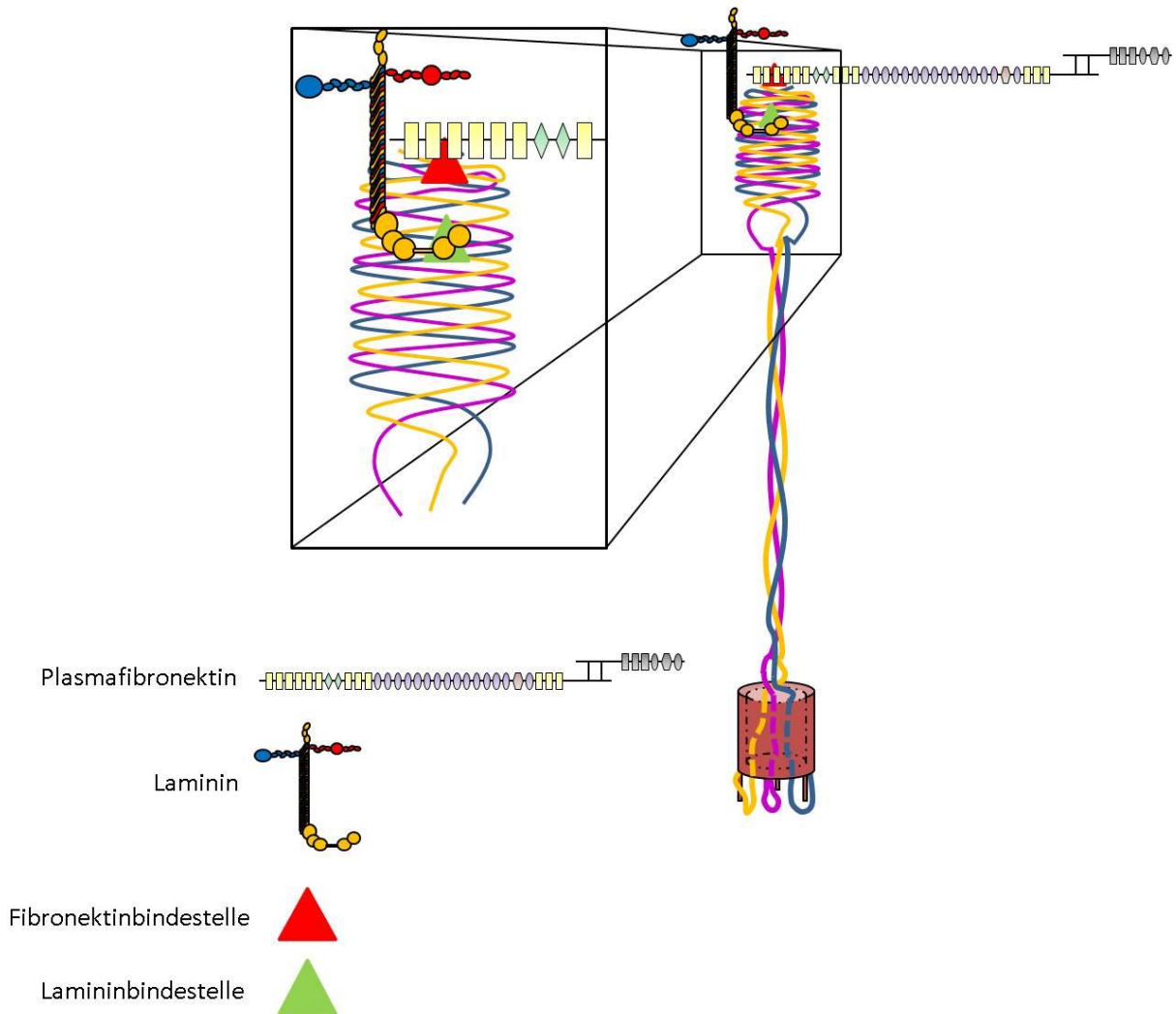


Abbildung 5.8: Schematische Darstellung der Bindungsstellen für Fibronectin und Laminin in Yada. Aus den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen sind folgende Bindungsstellen im Kopfbereich von Yada für Fibronectin und Laminin plausibel. Die Bindestelle für Laminin (Länge des „coiled-coil“-Bereichs beträgt 77 nm) befindet sich vermutlich im N-terminalen Bereich der CBD. Die Bindestelle für Fibronectin (Länge 160 nm in gestreckter Konformation, Durchmesser 2 nm) dürfte im Bereich der NTTD liegen. Bei Yada^P ist ein 32AS langer Bereich, welcher nicht in Yada^E vorkommt, an der Fibronectinbindung beteiligt, wodurch sich die Bindungsmechanismen und/oder -stellen zwischen Yada^E und Yada^P unterscheiden (modifiziert nach Nummelin et al (2004)). Laminin und Fibronectin sind nicht maßstabsgetreu dargestellt.

5.3 Rolle von YadA im Mausinfektionsmodell

5.3.1 Perorales Mausinfektionsmodell

Um Zusammenhänge zwischen ECM-Bindungsfähigkeit bzw. ECM-Bindungskapazität von *Y. enterocolitica* und Virulenz zu überprüfen, wurden mit den Stämmen der YadA-Varianten (WA(pYVO8-x)) Infektionsversuche im Mausmodell durchgeführt. Beim Menschen ist der übliche Infektionsweg die orale Aufnahme von Yersinien über kontaminierte Nahrungsmittel (Bottone, 1997). Das pathogene Potential (Virulenzgrad) bei einer peroralen Infektion mit Yersinien wird auf die Keimzahl (CFU) der Milz, der Peyerschen Plaques des Dünndarms und den Dünndarminhalt bezogen. Die Darminvasivität der Yersinien hängt von verschiedenen Parametern wie Darmflora, Immunabwehrpotential und effektive Infektionsdosis ab. Da diese Parameter bei peroralen Infektionen schwer zu kontrollieren sind, kann die Keimzahl (CFU) nach Infektionen im Darm und den infizierten Organen innerhalb der Versuchsgruppe variieren. Um reproduzierbare Mittel- bzw. Medianwerte für CFU zu erhalten, werden in der Regel über zehn Versuchstiere pro Gruppe verwendet, für signifikante Unterschiede zwischen einzelnen YadA-Varianten hätten die einzelnen Versuchsgruppen jeweils ca. 40 Tiere (Berechnung mit openepi.com Version oe2.3 durchgeführt) umfassen müssen. Im peroralen Mausmodell konnten in dieser Arbeit nur fünf Versuchstiere pro Gruppe einbezogen werden, um wenigstens tendenzielle Virulenzveränderungen der YadA-Varianten zu ermitteln.

Mit diesem Vorbehalt zeigt sich, dass YadA^e_i-Stämme mit zunehmender Deletion der NTTD ein stetig abnehmendes Virulenzpotential haben. Dies bestätigt die Versuche von Roggenkamp mit dem Stamm YadA^e₈₁, der kaum virulenter als der YadA-negative Stamm YadA^e₀ war (Roggenkamp et al, 1996). Die CFU-Werte der PP liegen bei den Stämmen YadA^e₃₈, YadA^e₄₇, YadA^p₄₄, YadA^p₈₅ und YadA^p₉₅ in einem ähnlichen Bereich im Vergleich zu Stamm YadA^e. Die Stämme YadA^e₅₇ und YadA^e₈₁ liegen 1,5-2 log-Stufen darunter. Der Stamm YadA^e₁₈₈ kann die PP nur noch schwach besiedeln und liegt rund sechs log-Stufen niedriger im Vergleich zu Stamm YadA^e. In der Milz erreichen nur die Stämme YadA^e₃₈ und YadA^e₄₇ im Mittel ähnliche CFU-Werte im Vergleich zu Stamm YadA^e. Bei Infektionen mit YadA^e_i-Stämmen im Darmbereich zeigen die Stämme YadA^e₅₇, YadA^e₈₁ eine schwache bzw. bei Stamm YadA^e₁₈₈ eine starke Attenuierung. Bei systemischen Infektionen zeigen alle drei Stämme (YadA^e₅₇, YadA^e₈₁ und YadA^e₁₈₈) starke Attenuierung im Vergleich zu Stamm YadA^e.

Bei den $YadA^P_i$ -Stämmen wurde im Mausinfektionsmodell keine kontinuierliche CFU-Abnahme mit zunehmender Deletion von $YadA^P$ festgestellt. Da bereits in einer früheren Arbeit in unserer Arbeitsgruppe der Virulenzgrad von Stamm $YadA^P$ untersucht wurde (Untiet, 2013) und keine signifikanten Unterschiede in der CFU in der Milz gegenüber Stamm $YadA^e$ nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Stamm nicht mehr für perorale Infektionsversuche berücksichtigt. Bei den $YadA^P_i$ -Stämmen zeigten sich große CFU-Streuungen in der Milz innerhalb jeder Infektionsgruppe der $YadA^P_i$ -Stämme. Bei allen drei $YadA^P_i$ -Varianten (Stämme $YadA^P_{44}$, $YadA^P_{85}$ und $YadA^P_{95}$) hatten drei der fünf infizierten Mäuse sehr niedrige CFU-Werte in der Milz, für die übrigen Tiere hingegen konnten in die Milz sehr hohe CFU-Werte nachgewiesen werden. Die Tiere mit hohen CFU-Werten in der Milz hatten eine Störung im Darmbereich und hatten einen stark aufgeblähten, angegriffenen Darm. Bei Stamm $YadA^P_{44}$ waren die beiden Tiere in der Nacht vor Versuchsende verstorben. Für die $YadA^P_i$ -Stämme lässt sich aufgrund der geringen Versuchsgruppengröße keine valide Aussage über eine mögliche Attenuierung der Stämme treffen.

Die Invasion der PP und eine anschließende systemische Invasion ist stark von der Infektionsdosis abhängig (Oellerich et al, 2007). Eine spätere Vermehrung der Yersinien im Darmlumen ist nicht mehr entscheidend für systemische Infektionen, da der Hauptvirulenzfaktor für die Invasion der PP (Invasin) bei 37°C herunter reguliert wird. Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Verkürzung der NTTD zu einer schlechteren Vermehrung der Yersinien in den PP und somit zu geringeren Keimzahlen in der Milz führt.

5.3.2 Intraperitoneales Mausinfektionsmodell

Um den Einfluss von Mikrobiota, Überleben in Darm und PP-Invasivität zu umgehen und so die Reproduzierbarkeit der Dissemination der Yersinien von der Bauchhöhle über die Blutbahn in Milz und Leber zu verbessern und das Überleben und Vermehren in diesen Organen vergleichend zu untersuchen, wurde der intraperitoneale Infektionsweg gewählt. Neben der Bestimmung der CFU in Leber und Milz 72 Stunden nach der Infektion wurde für den Vergleich der Virulenz der $YadA$ -Varianten auch das Gewicht der Tiere (alle 24 Stunden) bestimmt. Bei den $YadA^e_i$ -Stämmen kann der Trend, welcher bei den peroralen Infektionen bereits beobachtet werden konnte, dass mit zunehmender Deletion der NTTD die CFU in der Milz abnimmt, bestätigt werden. Sowohl in Milz als auch in der Leber konnten für die verkürzten $YadA$ -Varianten signifikant kleinere CFU-Werte im Vergleich zu Stamm $YadA^e$

festgestellt werden. Einzig Stamm $YadA^e_{38}$ weist keine signifikanten Unterschiede zu Stamm $YadA^e$ auf. Da auch der Stamm $YadA^e$ -HY (kollagenbindungsdefizient) eine starke Attenuierung im intraperitonealen Mausmodell zeigt (Roggenkamp et al, 1995), wurde vermutet, dass eine Verringerung bzw. ein Verlust der Kollagenbindungsfähigkeit für die Attenuierung der Virulenz verantwortlich ist. In dieser Arbeit konnte eine sukzessive Attenuierung mit zunehmender Verkürzung von $YadA^e$ 72 Stunden nach Infektionsstart festgestellt werden. Diese schrittweise Attenuierung der Virulenz korreliert nicht mit der Kollagenbindungsfähigkeit der $YadA^e$ -Stämme, vielmehr korreliert die Virulenz der $YadA^e$ -Stämme mit der Lamininbindungsfähigkeit. Bei $YadA^e$ scheint nicht nur die Bindung an ein ECM-Protein für die Virulenz verantwortlich zu sein. Die Bindung von Fibronectin scheint für $YadA^e$ jedoch nicht wesentlich an der Virulenz beteiligt zu sein.

Bei den $YadA^p$ -Stämmen zeigt sich eine starke Attenuierung der Virulenz für Stamm $YadA^p_{44}$. Die Stämme $YadA^p_{85}$ und $YadA^p_{95}$ zeigen weder wesentliche Unterschiede in der CFU noch im Gewichtsverlust im Vergleich zu Stamm $YadA^p$. Für $YadA^p$ lässt sich kein Zusammenhang zwischen den in vitro Untersuchungen für die Bindungseigenschaften von ECM-Proteinen und der Virulenz in den unterschiedlichen Mausinfektionsmodellen feststellen. Einzig der pI-Wert könnte eine Erklärung für den unterschiedlichen Virulenzgrad von $YadA^p_{44}$ sein.

Diese Ergebnisse zeigen, dass $YadA$ zwar für die Mausvirulenz ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist, dass aber keine eindeutige Korrelation zwischen Mausvirulenz und ECM-Proteinbindungsfähigkeit bzw. -kapazität festzustellen ist. Somit könnte es sich bei der ECM-Proteinbindung auch nur um ein Epiphänomen handeln, das keinen direkten Einfluss auf die Virulenz hat.

Literaturverzeichnis

Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A et al (1999) Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of Yersinia pseudotuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 14043-14048

Ackermann N, Tiller M, Anding G, Roggenkamp A, Heesemann J (2008) Contribution of Trimeric Autotransporter C-Terminal Domains of Oligomeric Coiled-Coil Adhesin (Oca) Family Members YadA, UspA1, EibA, and Hia to Translocation of the YadA Passenger Domain and Virulence of Yersinia enterocolitica. *Journal of Bacteriology* **190**: 5031-5043

Aepfelbacher M, Trasak C, Ruckdeschel K (2007) Effector functions of pathogenic Yersinia species. *Thrombosis and Haemostasis* **98**

Aepfelbacher M, Trasak C, Wilharm G, Wiedemann A, Trulzsch K et al (2003) Characterization of YopT effects on Rho GTPases in Yersinia enterocolitica-infected cells. *J Biol Chem* **278**: 33217-33223

Aili M, Isaksson EL, Carlsson SE, Wolf-Watz H, Rosqvist R et al (2008) Regulation of Yersinia Yop-effector delivery by translocated YopE. *International Journal of Medical Microbiology* **298**: 183-192

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K et al (2003) Molecular biology of the cell. 4th edn. *Annals of Botany* **91**: 401

Andor A, Trülzsch K, Essler M, Roggenkamp A, Wiedemann A et al (2001) YopE of Yersinia, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cellular Microbiology* **3**: 301-310

Astrof S, Crowley D, Hynes RO (2007) Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Developmental biology* **311**: 11-24

Autenrieth IB, Firsching R (1996) Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by Yersinia enterocolitica: an ultrastructural and histological study. *Journal of Medical Microbiology* **44**: 285-294

Bach S, de Almeida A, Carniel E (2000) The Yersinia high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Letters* **183**: 289-294

Balligand G, Laroche Y, Cornelis G (1985) Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 Yersinia enterocolitica strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infection and Immunity* **48**: 782-786

Barnes PD, Bergman MA, Mecsas J, Isberg RR (2006) Yersinia pseudotuberculosis disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *The Journal of Experimental Medicine* **203**: 1591-1601

Bateman JF, Boot-Handford RP, Lamande SR (2009) Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations. *Nat Rev Genet* **10**: 173-183

Bella J, Eaton M, Brodsky B, Berman HM (1994) Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* **266**: 75-81

Bhunia AK (2008) Yersinia enterocolitica and Yersinia pestis. In *Foodborne Microbial Pathogens*, 13, pp 227-240. Springer New York

- Biedzka-Sarek M, Jarva H, Hyytiäinen H, Meri S, Skurnik M (2008a) Characterization of Complement Factor H Binding to *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infection and Immunity* **76**: 4100-4109
- Biedzka-Sarek M, Salmenlinna S, Gruber M, Lupas AN, Meri S et al (2008b) Functional Mapping of YadA- and Ail-Mediated Binding of Human Factor H to *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infection and Immunity* **76**: 5016-5027
- Biedzka-Sarek M, Venho R, Skurnik M (2005) Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infection and Immunity* **73**: 2232-2244
- Black DS, Bliska JB (2000) The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Molecular Microbiology* **37**: 515-527
- Bliska JB, Copass MC, Falkow S (1993) The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infection and Immunity* **61**: 3914-3921
- Bliska JB, Falkow S (1992) Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 3561-3565
- Bliska JB, Wang X, Viboud GI, Brodsky IE (2013) Modulation of innate immune responses by *Yersinia* type III secretion system translocators and effectors. *Cellular Microbiology* **15**: 1622-1631
- Bockemühl J, Roggentin P (2004) Enterale Yersiniosen. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* **47**: 685-691
- Bolin I, Norlander L, Wolf-Watz H (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* **37**: 506-512
- Bottone EJ (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clinical Microbiology Reviews* **10**: 257-276
- Bottone EJ (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection* **1**: 323-333
- Bottone EJ, Mollaret H-H (1977) *Yersinia Enterocolitica*: A Panoramic View of a Charismatic Microorganism. *Critical Reviews in Microbiology* **5**: 211-241
- Brandis H. EJ, Köhler W., Pulverer G. (1994) *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, Vol. 7. Auflage, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Brazel D, OberbÄumer I, Dieringer H, Babel W, Glanville RW et al (1987) Completion of the amino acid sequence of the $\alpha 1$ chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 non-triplet interruptions located within the collagenous domain. *European Journal of Biochemistry* **168**: 529-536
- Brinckmann J (2005) Collagens at a Glance. In *Collagen*, Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK (eds), Vol. 247, 1, pp 1-6. Springer Berlin Heidelberg
- Brodsky IE, Palm NW, Sadanand S, Ryndak MB, Sutterwala FS et al (2010) A *Yersinia* effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host Microbe* **7**: 376-387
- Brubaker RR (1991) Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clinical Microbiology Reviews* **4**: 309-324

- Buchrieser C, Prentice M, Carniel E (1998) The 102-Kilobase Unstable Region of *Yersinia pestis* Comprises a High-Pathogenicity Island Linked to a Pigmentation Segment Which Undergoes Internal Rearrangement. *Journal of Bacteriology* **180**: 2321-2329
- Bukholm G, Kapperud G, Skurnik M (1990) Genetic evidence that the *yopA* gene-encoded *Yersinia* outer membrane protein Yop1 mediates inhibition of the anti-invasive effect of interferon. *Infection and Immunity* **58**: 2245-2251
- Carniel E (2001) The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes and Infection* **3**: 561-569
- Carniel E, Guilvout I, Prentice M (1996) Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology* **178**: 6743-6751
- Carniel E, Guiyoule A, Guilvout I, Mercereau-Puijalon O (1992) Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Molecular Microbiology* **6**: 379-388
- Champlaud M-F, Virtanen I, Tiger C-F, Korhonen M, Burgeson R et al (2000) Posttranslational Modifications and β/γ Chain Associations of Human Laminin $\alpha 1$ and Laminin $\alpha 5$ Chains: Purification of Laminin-3 from Placenta. *Experimental Cell Research* **259**: 326-335
- Chatterjee S, Chaudhury S, McShan AC, Kaur K, De Guzman RN (2013) Structure and Biophysics of Type III Secretion in Bacteria. *Biochemistry* **52**: 2508-2517
- Clark JM, Swika RL (1977) *Experimental biochemistry.*, 2 edn. San Francisco: W.H. Freeman and Company.
- Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G (2012) Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* **3**: 71-87
- Cornelis GR (2002a) *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *The Journal of Cell Biology* **158**: 401-408
- Cornelis GR (2002b) The *Yersinia* Ysc-Yop 'Type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 742-754
- Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nature reviews Microbiology* **4**: 811-825
- Cotter SE, Surana NK, St. Geme Iii JW (2005) Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends in Microbiology* **13**: 199-205
- Cowan PM, McGavin S, North AC (1955) The polypeptide chain configuration of collagen. *Nature* **176**: 1062-1064
- Craig AS, Birtles MJ, Conway JF, Parry DA (1989) An estimate of the mean length of collagen fibrils in rat tail-tendon as a function of age. *Connective tissue research* **19**: 51-62
- D'Souza SE, Ginsberg MH, Plow EF (1991) Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends in biochemical sciences* **16**: 246-250
- Davey HM, Kell DB (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological Reviews* **60**: 641-696
- de Rouvoit CL, Sluiter C, Cornelis GR (1992) Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology* **6**: 395-409

- Dènes V, Oacute, Ria, Witkovsky P, Koch M et al (2007) Laminin deficits induce alterations in the development of dopaminergic neurons in the mouse retina. *Visual Neuroscience* **24**: 549-562
- Dersch P, Isberg RR (1999) A region of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *The EMBO Journal* **18**: 1199-1213
- Dersch P, Isberg RR (2000) An Immunoglobulin Superfamily-Like Domain Unique to the Yersinia pseudotuberculosis Invasin Protein Is Required for Stimulation of Bacterial Uptake via Integrin Receptors. *Infection and Immunity* **68**: 2930-2938
- Dewoody R, Merritt PM, Marketon MM (2013a) Regulation of the Yersinia type III secretion system: traffic control. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**
- Dewoody R, Merritt PM, Marketon MM (2013b) YopK controls both rate and fidelity of Yop translocation. *Mol Microbiol* **87**: 301-317
- Diepold A, Wiesand U, Amstutz M, Cornelis GR (2012) Assembly of the Yersinia injectisome: the missing pieces. *Mol Microbiol* **85**: 878-892
- Donadini R, Fields BA (2007) Yersinia pseudotuberculosis superantigens. *Chemical immunology and allergy* **93**: 77-91
- Doyle MP, Hugdahl MB, Taylor SL (1981) Isolation of virulent Yersinia enterocolitica from porcine tongues. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 661-666
- Duan R, Liang J, Shi G, Cui Z, Hai R et al (2014) Homology Analysis of Pathogenic Yersinia Species Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis, and Yersinia pestis Based on Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology* **52**: 20-29
- Durbeej M (2010) Laminins. *Cell Tissue Res* **339**: 259-268
- Eitel J, Dersch P (2002) The YadA Protein of Yersinia pseudotuberculosis Mediates High-Efficiency Uptake into Human Cells under Environmental Conditions in Which Invasin Is Repressed. *Infection and Immunity* **70**: 4880-4891
- El Tahir Y, Skurnik M (2001) YadA, the multifaceted Yersinia adhesin. *International Journal of Medical Microbiology* **291**: 209-218
- Ellison DW, Lawrenz MB, Miller VL (2004) Invasin and beyond: regulation of Yersinia virulence by RovA. *Trends in microbiology* **12**: 296-300
- Ellison DW, Miller VL (2006) H-NS Represses inv Transcription in Yersinia enterocolitica through Competition with RovA and Interaction with YmoA. *Journal of Bacteriology* **188**: 5101-5112
- Emödy L, Heesemann J, Wolf-Watz H, Skurnik M, Kapperud G et al (1989) Binding to collagen by Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *Journal of Bacteriology* **171**: 6674-6679
- Erdem AL, Avelino F, Xicohtencatl-Cortes J, Girón JA (2007) Host Protein Binding and Adhesive Properties of H6 and H7 Flagella of Attaching and Effacing Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* **189**: 7426-7435
- Evdokimov AG, Tropea JE, Routzahn KM, Waugh DS (2002) Crystal structure of the Yersinia pestis GTPase activator YopE. *Protein science : a publication of the Protein Society* **11**: 401-408

- Fàbrega A, Vila J (2012) *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **30**: 24-32
- Farfan MJ, Cantero L, Vidal R, Botkin DJ, Torres AG (2011) Long Polar Fimbriae of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Bind to Extracellular Matrix Proteins. *Infection and Immunity* **79**: 3744-3750
- Filip C, Fletcher G, Wulff JL, Earhart CF (1973) Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli* by the Ionic Detergent Sodium-Lauryl Sarcosinate. *Journal of Bacteriology* **115**: 717-722
- Flügel A, Schulze-Koops H, Heesemann J, Kühn K, Sorokin L et al (1994) Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 29732-29738
- Flynn LA, Blissett AR, Calomeni EP, Agarwal G (2010) Inhibition of Collagen Fibrillogenesis by Cells Expressing Soluble Extracellular Domains of DDR1 and DDR2. *Journal of Molecular Biology* **395**: 533-543
- Forsberg A, Rosqvist R, Wolf-Watz H (1994) Regulation and polarized transfer of the *Yersinia* outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis. *Trends Microbiol* **2**: 14-19
- Franz M, Brehm B, Richter P, Gruen K, Neri D et al (2010) Changes in extra cellular matrix remodelling and re-expression of fibronectin and tenascin-C splicing variants in human myocardial tissue of the right atrial auricle: implications for a targeted therapy of cardiovascular diseases using human SIP format antibodies. *J Mol Hist* **41**: 39-50
- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Siitonen A, Korkeala H (2006) Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pigs. *Journal of Medical Microbiology* **55**: 747-749
- Freire-de-Lima L (2014) Sweet and Sour: The Impact of Differential Glycosylation in Cancer Cells Undergoing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in Oncology* **4**
- Fulwyler MJ (1965) Electronic separation of biological cells by volume. *Science* **150**: 910-911
- Galan JE, Wolf-Watz H (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573
- Galyov EE, Hakansson S, Forsberg A, Wolf-Watz H (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730-732
- Gramlich K (2014) Charakterisierung der Kollagenbindung von *Yersinia enterocolitica* und ihre Bedeutung in der Wirtszellinteraktion. Dr. rer. nat. Thesis, WZW, TU München, Freising
- Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory M-P, Cornelis GR (2002) Role of Yops and Adhesins in Resistance of *Yersinia enterocolitica* to Phagocytosis. *Infection and Immunity* **70**: 4165-4176
- Grützkau A, Hanski C, Naumann M (1993) Comparative study of histopathological alterations during intestinal infection of mice with pathogenic and non-pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Vichows Archiv A Pathol Anat* **423**: 97-103
- Haag H, Hantke K, Drechsel H, Stojiljkovic I, Jung G et al (1993) Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of General Microbiology* **139**: 2159-2165

- Håkansson S, Bergman T, Vanooteghem JC, Cornelis G, Wolf-Watz H (1993) YopB and YopD constitute a novel class of Yersinia Yop proteins. *Infection and Immunity* **61**: 71-80
- Hamburger ZA, Brown MS, Isberg RR, Bjorkman PJ (1999) Crystal Structure of Invasin: A Bacterial Integrin-Binding Protein. *Science* **286**: 291-295
- Han S, Makareeva E, Kuznetsova NV, DeRidder AM, Sutter MB et al (2010) Molecular Mechanism of Type I Collagen Homotrimer Resistance to Mammalian Collagenases. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 22276-22281
- Han S, McBride DJ, Losert W, Leikin S (2008) Segregation of Type I Collagen Homo- and Heterotrimers in Fibrils. *Journal of Molecular Biology* **383**: 122-132
- Han YW, Miller VL (1997) Reevaluation of the virulence phenotype of the *inv yadA* double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity* **65**: 327-330
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hancock GE, Schaedler RW, MacDonald TT (1986) *Yersinia enterocolitica* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infection and Immunity* **53**: 26-31
- Hancock GE, Schaedler RW, MacDonald TT (1988) Multigenic control of resistance to *Yersinia enterocolitica* in inbred strains of mice. *Infection and Immunity* **56**: 532-533
- Handley SA, Dube PH, Revell PA, Miller VL (2004) Characterization of Oral *Yersinia enterocolitica* Infection in Three Different Strains of Inbred Mice. *Infection and Immunity* **72**: 1645-1656
- Hanski C, Kutschka U, Schmoranzler HP, Naumann M, Stallmach A et al (1989a) Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infection and Immunity* **57**: 673-678
- Hanski C, Naumann M, Hahn H, Riecken EO (1989b) Determinants of invasion and survival of *Yersinia enterocolitica* in intestinal tissue. *Med Microbiol Immunol* **178**: 289-296
- Hartmann MD, Ridderbusch O, Zeth K, Albrecht R, Testa O et al (2009) A coiled-coil motif that sequesters ions to the hydrophobic core. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 16950-16955
- Hayashi Y, Emoto T, Futaki S, Sekiguchi K (2004) Establishment and characterization of a parietal endoderm-like cell line derived from Engelbreth-Holm-Swarm tumor (EHSPCL), a possible resource for an engineered basement membrane matrix. *Matrix Biology* **23**: 47-62
- Heesemann J, Algermissen B, Laufs R (1984) Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity* **46**: 105-110
- Heesemann J, Gross U, Gruter L (1987) Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 312-316
- Heesemann J, Gross U, Schmidt N, Laufs R (1986a) Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infection and Immunity* **54**: 561-567
- Heesemann J, Grüter L (1987) Genetic evidence that the outer membrane protein YOP1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters* **40**: 37-4

- Heesemann J, Hantke K, Vocke T, Saken E, Rakin A et al (1993) Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65 000 Da and pesticin sensitivity. *Molecular Microbiology* **8**: 397-408
- Heesemann J, Kalthoff H, Koch F (1986b) Monoclonal antibodies directed against plasmid-encoded released proteins of enteropathogenic *Yersinia*. *FEMS Microbiology Letters* **36**: 15-19
- Heesemann J, Laufs R (1983) Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *Journal of Bacteriology* **155**: 761-767
- Heino J (2007) The collagen family members as cell adhesion proteins. *BioEssays* **29**: 1001-1010
- Heise T, Dersch P (2006) Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3375-3380
- Henderson B, Nair S, Pallas J, Williams MA (2011) Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbiology Reviews* **35**: 147-200
- Hentschke M, Berneking L, Belmar Campos C, Buck F, Ruckdeschel K et al (2010) *Yersinia* Virulence Factor YopM Induces Sustained RSK Activation by Interfering with Dephosphorylation. *PLoS ONE* **5**: e13165
- Hoiczuk E, Blobel G (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 4669-4674
- Hoiczuk E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**: 5989-5999
- Holmstrom A, Petterson J, Rosqvist R, Hakansson S, Tafazoli F et al (1997) YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol Microbiol* **24**: 73-91
- Hurst MRH, Becher SA, Young SD, Nelson TL, Glare TR (2011) *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**: 844-849
- Hynes RO (1990) *Fibronectins*: Springer-Verlag.
- Hynes RO, Zhao Q (2000) The Evolution of Cell Adhesion. *The Journal of Cell Biology* **150**: F89-F96
- Ibrahim A, Goebel BM, Liesack W, Griffiths M, Stackebrandt E (1993) The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiology Letters* **114**: 173-177
- Iriarte M, Cornelis GR (1998) YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* **29**: 915-929
- Isberg RR, Leong JM (1990) Multiple β 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**: 861-871
- Isberg RR, Voorhis DL, Falkow S (1987) Identification of invasin: A protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**: 769-778
- Jain S, Kaur H, Pandav G, Dewan A, Saxena D (2014) *Collagen: Basis of Life*, Vol. 4.

- Juris SJ, Shao F, Dixon JE (2002) Yersinia effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol* **4**: 201-211
- Kajava AV, Zolov SN, Kalinin AE, Nesmeyanova MA (2000) The Net Charge of the First 18 Residues of the Mature Sequence Affects Protein Translocation across the Cytoplasmic Membrane of Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology* **182**: 2163-2169
- Khoshnoodi J, Cartailier J-P, Alvares K, Veis A, Hudson BG (2006) Molecular Recognition in the Assembly of Collagens: Terminal Noncollagenous Domains Are Key Recognition Modules in the Formation of Triple Helical Protomers. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 38117-38121
- Kirjavainen V, Jarva H, Biedzka-Sarek M, Blom AM, Skurnik M et al (2008) Yersinia enterocolitica serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog* **4**: e1000140
- Klein T, Bischoff R (2011) Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* **41**: 271-290
- Kolodziejek AM, Hovde CJ, Minnich SA (2012) Yersinia pestis Ail: multiple roles of a single protein. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2**
- Konkel ME, Tilly K (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes and Infection* **2**: 157-166
- Koretke KK, Szczesny P, Gruber M, Lupas AN (2006) Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of Yersinia enterocolitica. *Journal of Structural Biology* **155**: 154-161
- Kostourou V, Papalazarou V (2014) Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1840**: 2403-2413
- Krall R, Zhang Y, Barbieri JT (2004) Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and Yersinia YopE in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**: 2747-2753
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**: 105-132
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lai C-S, Wolff CE, Novello D, Griffone L, Cuniberti C et al (1993) Solution Structure of Human Plasma Fibronectin under Different Solvent Conditions: Fluorescence Energy Transfer, Circular Dichroism and Light-scattering Studies. *Journal of Molecular Biology* **230**: 625-640
- Laird WJ, Cavanaugh DC (1980) Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae. *Journal of Clinical Microbiology* **11**: 430-432
- Leclercq A, Martin L, Vergnes ML, Ounnoughene N, Laran JF et al (2005) Fatal Yersinia enterocolitica biotype 4 serovar O:3 sepsis after red blood cell transfusion. *Transfusion* **45**: 814-818
- Lee LA, Gerber AR, Lonsway DR, Smith JD, Carter GP et al (1990) Yersinia enterocolitica O:3 Infections in Infants and Children, Associated with the Household Preparation of Chitterlings. *New England Journal of Medicine* **322**: 984-987
- Lehr U, Schütz M, Oberhettinger P, Ruiz-Perez F, Donald JW et al (2010) C-terminal amino acid residues of the trimeric autotransporter adhesin YadA of Yersinia enterocolitica are decisive for its recognition and assembly by BamA. *Molecular Microbiology* **78**: 932-946

- Leo J, Skurnik M (2011) Adhesins of Human Pathogens from the Genus *Yersinia*. In *Bacterial Adhesion*, Linke D, Goldman A (eds), Vol. 715, 1, pp 1-15. Springer Netherlands
- Leo JC, Elovaara H, Brodsky B, Skurnik M, Goldman A (2008) The *Yersinia* adhesin YadA binds to a collagenous triple-helical conformation but without sequence specificity. *Protein Engineering Design and Selection* **21**: 475-484
- Leo JC, Grin I, Linke D (2012) Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 1088-1101
- Leo Jack C, Lyskowski A, Hattula K, Hartmann Marcus D, Schwarz H et al (2011) The Structure of *E. coli* IgG-Binding Protein D Suggests a General Model for Bending and Binding in Trimeric Autotransporter Adhesins. *Structure* **19**: 1021-1030
- Leong JM, Fournier RS, Isberg RR (1990) Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J* **9**: 1979-1989
- Lian C-J, Hwang WS, Kelly JK, Pai CH (1987) Invasiveness of *Yersinia enterocolitica* lacking the virulence plasmid: an in-vivo study. *Journal of Medical Microbiology* **24**: 219-226
- Linke D, Riess T, Autenrieth IB, Lupas A, Kempf VAJ (2006) Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends in microbiology* **14**: 264-270
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275
- Mack D, Heesemann J, Laufs R (1994) Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA. *Med Microbiol Immunol* **183**: 217-227
- Mack D, Pulz M, Heesemann J (1991) Recognition by peptide mapping of three different structural groups of outer membrane protein YOP-1 of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Med Microbiol Immunol* **180**: 205-211
- Mao Y, Schwarzbauer JE (2005) Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology* **24**: 389-399
- Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* **87**: 206-210
- Marmur J, Grossman L (1961) ULTRAVIOLET LIGHT INDUCED LINKING OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID STRANDS AND ITS REVERSAL BY PHOTOREACTIVATING ENZYME. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **47**: 778-787
- Marra A, Isberg RR (1996) Analysis of the Role of Invasin during *Yersinia pseudotuberculosis* Infection of Mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* **797**: 290-292
- Marra A, Isberg RR (1997) Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infection and Immunity* **65**: 3412-3421
- McNally A, Cheasty T, Fearnley C, Dalziel RW, Paiba GA et al (2004) Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999–2000. *Letters in Applied Microbiology* **39**: 103-108

- Mikula KM, Kolodziejczyk R, Goldman A (2012) Yersinia infection tools-characterization of structure and function of adhesins. *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 169
- Miller VL, Beer KB, Heusipp G, Young BM, Wachtel MR (2001) Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Molecular Microbiology* **41**: 1053-1062
- Miller VL, Bliska JB, Falkow S (1990) Nucleotide sequence of the Yersinia enterocolitica ail gene and characterization of the Ail protein product. *Journal of Bacteriology* **172**: 1062-1069
- Miller VL, Falkow S (1988) Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity* **56**: 1242-1248
- Miller VL, Farmer JJ, Hill WE, Falkow S (1989) The ail locus is found uniquely in Yersinia enterocolitica serotypes commonly associated with disease. *Infection and Immunity* **57**: 121-131
- Miller VL, Mekalanos JJ (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in Vibrio cholerae requires toxR. *Journal of Bacteriology* **170**: 2575-2583
- Miner JH (2008) Laminins and their roles in mammals. *Microscopy Research and Technique* **71**: 349-356
- Mittal R, Peak-Chew S-Y, McMahon HT (2006) Acetylation of MEK2 and I κ B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 18574-18579
- Moran AP, Broaders SA, Rapa A, Oderda G (2005) In vivo expression of the 25-kDa laminin-binding protein of Helicobacter pylori. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **43**: 331-337
- Morita A, Sugimoto E, Kitagawa Y (1985) Post-translational assembly and glycosylation of laminin subunits in parietal endoderm-like F9 cells. *The Biochemical journal* **229**: 259-264
- Mosher D (1989) *Fibronectin*, 1st edn.: Academic Press: New York.
- Mota LJ, Journet L, Sorg I, Agrain C, Cornelis GR (2005) Bacterial Injectisomes: Needle Length Does Matter. *Science* **307**: 1278
- Mouw JK, Ou G, Weaver VM (2014) Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 771-785
- Mueller CA, Broz P, Müller SA, Ringler P, Erne-Brand F et al (2005) The V-Antigen of Yersinia Forms a Distinct Structure at the Tip of Injectisome Needles. *Science* **310**: 674-676
- Mühlenkamp M, Oberhettinger P, Leo JC, Linke D, Schütz MS (2015) Yersinia adhesin A (YadA) – Beauty & beast. *International Journal of Medical Microbiology* **305**: 252-258
- Mukherjee S, Keitany G, Li Y, Wang Y, Ball HL et al (2006) Yersinia YopJ Acetylates and Inhibits Kinase Activation by Blocking Phosphorylation. *Science* **312**: 1211-1214
- Müller NF, Kaiser PO, Linke D, Schwarz H, Riess T et al (2011) Trimeric Autotransporter Adhesin-Dependent Adherence of Bartonella henselae, Bartonella quintana, and Yersinia enterocolitica to Matrix Components and Endothelial Cells under Static and Dynamic Flow Conditions. *Infection and Immunity* **79**: 2544-2553
- Murray PR BE, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (1999) *Manual of clinical microbiology*, 7 edn.: ASM.

- Murros-Konttinen A, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H, Johansson P, Rahkila R et al (2011a) *Yersinia nurmii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**: 2368-2372
- Murros-Konttinen A, Johansson P, Niskanen T, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H et al (2011b) *Yersinia pekkanenii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**: 2363-2367
- Nagel G, Lahrz A, Dersch P (2001) Environmental control of invasins expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Molecular Microbiology* **41**: 1249-1269
- Nägele V (2010) Funktionelle Charakterisierung trimerer Autotransporteradhesine von *Neisseria meningitidis* (NadA) und *Yersinia enterocolitica* (YadA). Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Technische Universität München, Freising
- Natarajan E, Omobono JD, II, Jones JC, Rheinwald JG (2005) Co-expression of p16INK4A and Laminin 5 by Keratinocytes: A Wound-Healing Response Coupling Hypermotility with Growth Arrest that Goes Awry During Epithelial Neoplastic Progression. *J Investig Dermatol Symp Proc* **10**: 72-85
- Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* **11**: 142-201
- Neubauer H, Aleksic S, Hensel A, Finke E-J, Meyer H (2000) *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *International Journal of Medical Microbiology* **290**: 61-64
- Noto JM, Gaddy JA, Lee JY, Piazuelo MB, Friedman DB et al (2013) Iron deficiency accelerates *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation* **123**: 479-492
- Nummelin H, Merckel MC, Leo JC, Lankinen H, Skurnik M et al (2004) *The Yersinia adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel β -roll*, Vol. 23.
- Oellerich MF, Jacobi CA, Freund S, Niedung K, Bach A et al (2007) *Yersinia enterocolitica* Infection of Mice Reveals Clonal Invasion and Abscess Formation. *Infection and Immunity* **75**: 3802-3811
- Ohashi T, Erickson HP (2005) Domain Unfolding Plays a Role in Superfibrinectin Formation. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 39143-39151
- Olsson C, Olofsson T, Ahrné S, Molin G (2003) The *Yersinia* HPI is present in *Serratia liquefaciens* isolated from meat. *Letters in Applied Microbiology* **37**: 275-280
- Orth K (2002) Function of the *Yersinia* effector YopJ. *Curr Opin Microbiol* **5**: 38-43
- Pankov R, Yamada KM (2002) Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* **115**: 3861-3863
- Park H, Teja K, O'Shea JJ, Siegel RM (2007) The *Yersinia* Effector Protein YpkA Induces Apoptosis Independently of Actin Depolymerization. *The Journal of Immunology* **178**: 6426-6434
- Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I (2002) Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* **12**: 197-207
- Paulsson M (1992) Basement Membrane Proteins: Structure, Assembly, and Cellular Interactions. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **27**: 93-127

- Pelludat C, Rakin A, Jacobi CA, Schubert S, Heesemann J (1998) The Yersiniabactin Biosynthetic Gene Cluster of *Yersinia enterocolitica*: Organization and Siderophore-Dependent Regulation. *Journal of Bacteriology* **180**: 538-546
- Pepe JC, Badger JL, Miller VL (1994) Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. *Molecular Microbiology* **11**: 123-135
- Pepe JC, Miller VL (1990) The *Yersinia enterocolitica* *inv* gene product is an outer membrane protein that shares epitopes with *Yersinia pseudotuberculosis* *invasin*. *Journal of Bacteriology* **172**: 3780-3789
- Pepe JC, Miller VL (1993) *Yersinia enterocolitica* *invasin*: a primary role in the initiation of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 6473-6477
- Pepe JC, Wachtel MR, Wagar E, Miller VL (1995) Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infection and Immunity* **63**: 4837-4848
- Perry RD, Balbo PB, Jones HA, Fetherston JD, DeMoll E (1999) Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology* **145**: 1181-1190
- Perry RD, Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews* **10**: 35-66
- Petersson J, Holmstrom A, Hill J, Leary S, Frithz-Lindsten E et al (1999) The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* **32**: 961-976
- Petersson J, Nordfelth R, Dubinina E, Bergman T, Gustafsson M et al (1996) Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* **273**: 1231-1233
- Pierson DE, Falkow S (1993) The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infection and Immunity* **61**: 1846-1852
- Pilz D, Vocke T, Heesemann J, Brade V (1992) Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. *Infection and Immunity* **60**: 189-195
- Potts JR, Campbell ID (1994) Fibronectin structure and assembly. *Current opinion in cell biology* **6**: 648-655
- Prehna G, Ivanov MI, Bliska JB, Stebbins CE (2006) *Yersinia* Virulence Depends on Mimicry of Host Rho-Family Nucleotide Dissociation Inhibitors. *Cell* **126**: 869-880
- Prentki P, Krisch HM (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313
- Rakin A, Noelting C, Schubert S, Heesemann J (1999) Common and Specific Characteristics of the High-Pathogenicity Island of *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity* **67**: 5265-5274
- Rakin A, Saken E, Harmsen D, Heesemann J (1994) The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. *Molecular Microbiology* **13**: 253-263
- Ramshaw JAM, Shah NK, Brodsky B (1998) Gly-X-Y Tripeptide Frequencies in Collagen: A Context for Host-Guest Triple-Helical Peptides. *Journal of Structural Biology* **122**: 86-91

- Razzaq S (2006) Hemolytic uremic syndrome: an emerging health risk. *American family physician* **74**: 991-996
- Reuter S, Connor TR, Barquist L, Walker D, Feltwell T et al (2014) Parallel independent evolution of pathogenicity within the genus *Yersinia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 6768-6773
- Revell PA, Miller VL (2000) A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Molecular Microbiology* **35**: 677-685
- Ricard-Blum S (2011) The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**: a004978
- Rich A, Crick FH (1955) The structure of collagen. *Nature* **176**: 915-916
- Riess T, Andersson SGE, Lupas A, Schaller M, Schäfer A et al (2004) Bartonella Adhesin A Mediates a Proangiogenic Host Cell Response. *The Journal of Experimental Medicine* **200**: 1267-1278
- RKI. (2014) Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2013. Robert Koch Institut, pp. 200-203.
- Roggenkamp A, Ackermann N, Jacobi CA, Truelzsch K, Hoffmann H et al (2003) Molecular Analysis of Transport and Oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* Adhesin YadA. *Journal of Bacteriology* **185**: 3735-3744
- Roggenkamp A, Neuberger H-R, Flügel A, Schmoll T, Heesemann J (1995) Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Molecular Microbiology* **16**: 1207-1219
- Roggenkamp A, Ruckdeschel K, Leitritz L, Schmitt R, Heesemann J (1996) Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infection and Immunity* **64**: 2506-2514
- Roppenser B, Röder A, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M (2009) *Yersinia enterocolitica* differentially modulates RhoG activity in host cells. *Journal of Cell Science* **122**: 696-705
- Rosner B, Werber D, Hohle M, Stark K (2013) Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of *Yersinia enterocolitica* infections in a population-based study, Germany 2009-2010. *BMC Infectious Diseases* **13**: 236
- Rosqvist R, Forsberg A, Wolf-Watz H (1991) Microinjection of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Biochemical Society transactions* **19**: 1131-1132
- Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H (1994) Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* **13**: 964-972
- Rosqvist R, Skurnik M, Wolf-Watz H (1988) Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature* **334**: 522-525
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infection and Immunity* **64**: 724-733
- Rüssmann H, Ruckdeschel K, Heesemann J (1996) Translocation of *Yersinia enterocolitica* through an endothelial monolayer by polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity* **64**: 1016-1019

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sauvonnnet N, Lambermont I, Bruggen Pvd, Cornelis GR (2002) YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Molecular Microbiology* **45**: 805-815
- Savin C, Martin L, Bouchier C, Filali S, Chenau J et al (2014) The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: Characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*. *International Journal of Medical Microbiology* **304**: 452-463
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Wittinghofer A (1998) GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends in biochemical sciences* **23**: 257-262
- Scheper T, Gebauer A, Sauerbrei A, Niehoff A, Schügerl K (1984) Measurement of biological parameters during fermentation processes. *Analytica Chimica Acta* **163**: 111-118
- Schiemann DA, Crane MR, Swanz PJ (1987) Surface properties of *Yersinia* species and epithelial cell interactions in vitro by a method measuring total associated, attached and intracellular bacteria. *Journal of Medical Microbiology* **24**: 205-218
- Schofield KP, Humphries MJ (1999) *Identification of Fibronectin III/CS Variants in Human Bone Marrow Stroma*, Vol. 93.
- Schubert S, Bockemuhl J, Brendler U, Heesemann J (2003) First isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* O8, biotype 1B in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**: 66-68
- Schubert S, Rakin A, Heesemann J (2004) The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *International Journal of Medical Microbiology* **294**: 83-94
- Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E, Heesemann J (1998) Prevalence of the "High-Pathogenicity Island" of *Yersinia* Species among *Escherichia coli* Strains That Are Pathogenic to Humans. *Infection and Immunity* **66**: 480-485
- Schulte R, Kerneis S, Klinke S, Bartels H, Preger S et al (2000) Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to $\beta 1$ integrins apically expressed on M-like cells. *Cellular Microbiology* **2**: 173-185
- Schulze-Koops H, Burkhardt H, Heesemann J, Kirsch T, Swoboda B et al (1993) Outer membrane protein YadA of enteropathogenic *Yersinia* mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infection and Immunity* **61**: 2513-2519
- Schulze-Koops H, Burkhardt H, Heesemann J, Mark KVD, Emmrich F (1995) Characterization of the binding region for the *Yersinia enterocolitica* adhesin yada on types i and ii collagen. *Arthritis & Rheumatism* **38**: 1283-1289
- Schulze-Koops H, Burkhardt H, Heesemann J, von der Mark K, Emmrich F (1992) Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia* to various types of collagen. *Infection and Immunity* **60**: 2153-2159
- Sedgwick AK, Tilton RC (1971) Biochemical and Serological Characteristics of a *Yersinia enterocolitica* Isolate. *Applied Microbiology* **21**: 383-384
- Senkovich OA, Yin J, Ekshyyan V, Conant C, Traylor J et al (2011) *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB Bind Host Laminin and Influence Gastric Inflammation in Gerbils. *Infection and Immunity* **79**: 3106-3116

Shao F, Dixon J (2003) YopT Is a Cysteine Protease Cleaving Rho Family GTPases. In *The Genus Yersinia*, Skurnik M, Bengoechea J, Granfors K (eds), Vol. 529, 14, pp 79-84. Springer US

Shao F, Merritt PM, Bao Z, Innes RW, Dixon JE (2002) A Yersinia effector and a Pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**: 575-588

Shoulders MD, Raines RT (2009) Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry* **78**: 929-958

Singh B, Fleury C, Jalalvand F, Riesbeck K (2012) Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS Microbiology Reviews* **36**: 1122-1180

Skurnik M, Bölin I, Heikkinen H, Piha S, Wolf-Watz H (1984) Virulence plasmid-associated autoagglutination in Yersinia spp. *Journal of Bacteriology* **158**: 1033-1036

Skurnik M, Peippo A, Ervelä E (2000) Characterization of the O-antigen gene clusters of Yersinia pseudotuberculosis and the cryptic O-antigen gene cluster of Yersinia pestis shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from Y. pseudotuberculosis serotype O:1b. *Molecular Microbiology* **37**: 316-330

Skurnik M, Toivanen P (1992) LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. *Journal of Bacteriology* **174**: 2047-2051

Skurnik M, Wolf-Watz H (1989) Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of Yersinia spp. *Molecular Microbiology* **3**: 517-529

Snyder L, Champness W (1997) *Molecular genetics of bacteria*, Vol. 3, Washington D.C.: ASM Press.

Sorokin L (2010) The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* **10**: 712-723

St. Geme JW, Cutter D (2000) The Haemophilus influenzae Hia Adhesin Is an Autotransporter Protein That Remains Uncleaved at the C Terminus and Fully Cell Associated. *Journal of Bacteriology* **182**: 6005-6013

Stenhouse MAE, Milner LV (1982) Yersinia enterocolitica. *Transfusion* **22**: 396-398

Straley SC, Perry RD (1995) Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in Yersinia. *Trends in microbiology* **3**: 310-317

Strobel E, Heesemann J, Mayer G, Peters J, Müller-Wehrich S et al (2000) Bacteriological and Serological Findings in a Further Case of Transfusion-Mediated Yersinia enterocolitica Sepsis. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 2788-2790

Szczesny P, Lupas A (2008) Domain annotation of trimeric autotransporter adhesins—daTAA. *Bioinformatics* **24**: 1251-1256

Tahir YE, Kuusela P, Skurnik M (2000) Functional mapping of the Yersinia enterocolitica adhesin YadA. Identification of eight NSVAIG – S motifs in the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. *Molecular Microbiology* **37**: 192-206

Takahashi S, Leiss M, Moser M, Ohashi T, Kitao T et al (2007) The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *The Journal of Cell Biology* **178**: 167-178

- Tamkun JW, Hynes RO (1983) Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **258**: 4641-4647
- Tamm A, Tarkkanen A-M, Korhonen TK, Kuusela P, Toivanen P et al (1993) Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology* **10**: 995-1011
- Tertti R, Skurnik M, Vartio T, Kuusela P (1992) Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infection and Immunity* **60**: 3021-3024
- Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T et al (2000) Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biology* **19**: 309-317
- To W, Midwood K (2011) Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair* **4**: 21
- Totsika M, Wells TJ, Beloin C, Valle J, Allsopp LP et al (2012) Molecular Characterization of the EhaG and UpaG Trimeric Autotransporter Proteins from Pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 2179-2189
- Trasak C, Zenner G, Vogel A, Yüsekdağ G, Rost R et al (2007) *Yersinia* Protein Kinase YopO Is Activated by A Novel G-actin Binding Process. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 2268-2277
- Tsubokura M, Otsuki K, Sato K, Tanaka M, Hongo T et al (1989) Special features of distribution of *Yersinia pseudotuberculosis* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* **27**: 790-791
- Tzu J, Marinkovich MP (2008) Bridging structure with function: Structural, regulatory, and developmental role of laminins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**: 199-214
- Uliczka F, Pisano F, Schaake J, Stolz T, Rohde M et al (2011) Unique Cell Adhesion and Invasion Properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the Most Frequent Cause of Human Yersiniosis. *PLoS Pathog* **7**: e1002117
- Untiet S (2013) Vergleichende Untersuchungen zur Adhärenz und Mauspathogenität von *Yersinia-Adhäsins*(YadA)-Varianten verschiedener *Yersinia* Arten und Serotypen. Dr. med. Thesis, Medizinische Fakultät der LMU München, LMU München, München
- Viboud GI, Bliska JB (2005) YERSINIA OUTER PROTEINS: Role in Modulation of Host Cell Signaling Responses and Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology* **59**: 69-89
- Visser LG, Hiemstra PS, van den Barselaar MT, Ballieux PA, van Furth R (1996) Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infection and Immunity* **64**: 1653-1658
- Von Pawel-Rammingen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K, Wolf-Watz H et al (2000) GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Molecular Microbiology* **36**: 737-748
- Wachtel MR, Miller VL (1995) In vitro and in vivo characterization of an ail mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity* **63**: 2541-2548
- Wells TJ, McNeilly TN, Totsika M, Mahajan A, Gally DL et al (2009) The *Escherichia coli* O157:H7 EhaB autotransporter protein binds to laminin and collagen I and induces a serum IgA response in O157:H7 challenged cattle. *Environmental Microbiology* **11**: 1803-1814
- Welsch U (2006) *Lehrbuch Histologie*, 2. Auflage edn. München: Elsevier.

- White ES, Baralle FE, Muro AF (2008) New insights into form and function of fibronectin splice variants. *The Journal of Pathology* **216**: 1-14
- Whittaker CA, Bergeron K-F, Whittle J, Brandhorst BP, Burke RD et al (2006) The echinoderm adhesome. *Developmental Biology* **300**: 252-266
- Wollmann P, Zeth K, Lupas AN, Linke D (2006) Purification of the YadA membrane anchor for secondary structure analysis and crystallization. *International Journal of Biological Macromolecules* **39**: 3-9
- Wren BW (2003) The Yersiniae [mdash] a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Micro* **1**: 55-64
- Yamashita S, Lukacik P, Barnard Travis J, Noinaj N, Felek S et al (2011) Structural Insights into Ail-Mediated Adhesion in *Yersinia pestis*. *Structure* **19**: 1672-1682
- Yehualaeshet T, Graham M, Montgomery M, Habtemariam T, Samuel T et al (2013) Effects of temperature on the viability, growth and gene profile of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* inoculated in milk. *Food Control* **34**: 589-595
- Young VB, Miller VL, Falkow S, Schoolnik GK (1990) Sequence, localization and function of the invasin protein of *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology* **4**: 1119-1128
- Zaleska M, Lounatmaa K, Nurminen M, Wahlstrom E, Makela PH (1985) A novel virulence-associated cell surface structure composed of 47-kd protein subunits in *Yersinia enterocolitica*. *EMBO J* **4**: 1013-101

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit am WZW an der TU München und die sehr anregenden Diskussionen und das Interesse an meiner Arbeit danken. Ebenso für die Hilfestellung in organisatorischen Belangen bei der Einreichung meiner Dissertation.

Vielen Dank an Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und Dr. Nikolaus Ackermann für die ständige Diskussionsbereitschaft, die sehr hilfreichen Ratschläge und die Betreuung meiner Arbeit am Max von Pettenkofer-Institut.

Ein herzliches Dankeschön an Frau Anding für die Unterstützung im Labor und die vielen kleinen, aber oft sehr nützlichen, Tipps. Ein ebenso herzliches Dankeschön geht auch an Kristina, Steffi und Bettina für die Hilfe bei vielen Dingen im Labor.

Vielen Dank auch an die restliche AG-Heesemann für die netten Diskussionen und vielen nützlichen Ratschläge während und außerhalb des „Yersinia-Clubs“. Besonders Eva möchte ich danken, die es geschafft hat drei Jahre mit mir in einem Büro zu verbringen. Und einen ganz besonderen Dank auch an Steffi für vier tolle Jahre im Labor und Büro. Danke für deine Unterstützung und gerade am Anfang und am Ende für die vielen aufmunternden Worte.

Allen anderen, die leider einfach zu zahlreich sind, um sie hier alle zu erwähnen: Danke für die tolle Zeit während der Mittagspausen und Feiern am Institut. Es war mir eine große Freude euch alle kennen gelernt zu haben.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden für die großartige Unterstützung in allen Belangen während der letzten fünf Jahre danken.