



**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

TUM School of Life Sciences

**Der Einfluss phagenverwandter Lysegene und eines neuen  
Enterotoxins auf die insektizide Aktivität von Yersinien**

Katharina Springer

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktorin der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Dirk Haller

Prüfende der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Thilo M. Fuchs

2. Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 02.08.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 24.01.2022 angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>III</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i> .....	1
1.1.1 <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	1
1.1.2 <i>Yersinia frederiksenii</i> .....	2
1.1.3 Virulenzfaktoren von Yersinien .....	3
1.1.4 Virulenzregulation und die Proteasen Lon und ClpP.....	6
1.2 Die Pathogenitätsinsel Tc-PAI <sub>ye</sub> ermöglicht <i>Y. enterocolitica</i> W22703 eine insektizide und nematozide Aktivität .....	8
1.2.1 Der insektizide Toxinkomplex von <i>Photorhabdus luminescens</i> .....	8
1.2.2 Verbreitung und Variabilität insektizider Toxinkomplexe.....	10
1.2.3 Aufbau der Pathogenitätsinsel Tc-PAI <sub>ye</sub> .....	12
1.2.4 Regulation der <i>tc</i> -Gene bei <i>Yersinia enterocolitica</i> W22703.....	14
1.3 Die phagenverwandten Gene innerhalb der Tc-PAI <sub>ye</sub> .....	16
1.3.1 Das dreistufige Lyse-Modell der Bakteriophagen .....	16
1.3.2 Adaption von Holin/Endolysin durch Bakterien .....	18
1.4 <i>Galleria mellonella</i> -Larven als Modellorganismus .....	21
1.5 Ziel der Arbeit und angewandte Methodik .....	24
<b>2 Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
2.1 <b>Publikation 1:</b> „Activity of a holin-endolysin system in the insecticidal pathogenicity island of <i>Yersinia enterocolitica</i> .“ .....	29
2.2 <b>Publikation 2:</b> „Lon protease- and temperature-dependent activity of a lysis cassette located in the insecticidal island of <i>Yersinia enterocolitica</i> .“ .....	50

2.3 **Publikation 3:** „Insecticidal toxicity of *Yersinia frederiksenii* involves the novel enterotoxin YacT.“ ..... 68

**3 Diskussion ..... 89**

3.1 Die Lysekassette innerhalb der TC-PAI<sub>Y<sub>e</sub></sub> ist biologisch funktional..... 89

3.2 Die engmaschige Kontrolle der Aktivität der Lysekassette ist überlebenswichtig..... 95

3.3 Sind die Phagenproteine Teil eines neuen Typ 10-Sekretionssystems? ..... 97

3.4 Yersinien besitzen ein breites Repertoire an neuartigen Toxinen ..... 101

3.5 Ausblick..... 105

**Literaturverzeichnis ..... 109**

**Konferenzbeiträge ..... 131**

**Eidesstattliche Erklärung..... 132**

**Danksagung ..... 133**



## Zusammenfassung

Die Gattung *Yersinia* ist vor allem für ihre drei humanpathogenen Vertreter bekannt: Diese sind *Y. pestis*, der Pesterreger, sowie *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, welche beide eine Darmentzündung infolge einer Lebensmittelvergiftung, die sogenannte Yersiniose, verursachen. Die Gattung umfasst noch mindestens 17 weitere Spezies, die vor allem in der Umwelt vorkommen. Das Interesse an diesen Arten ist in den letzten Jahren gestiegen, unter anderem weil auch manche dieser nicht mit dem Menschen assoziierten Spezies aus Proben erkrankter Personen isoliert wurden. Außerdem tragen die Erkenntnisse zum Überleben dieser Arten in der Umwelt zu einem besseren Verständnis der Evolution der Bakterien der Gattung *Yersinia* und insbesondere der Krankheitserreger bei. Es ist inzwischen bekannt, dass es bei den *Yersinia*-Spezies (spp.) ein breites Repertoire an Faktoren gibt, die es ihnen ermöglichen, in der Umwelt zu überleben und, wie am Beispiel von *Y. enterocolitica* gezeigt, zwischen Säugetieren und Invertebraten als Wirten zu wechseln. Während viele dieser Faktoren noch unbekannt sind, ist für die insektizide und nematozide Aktivität von *Y. enterocolitica* W22703 ein dreigliedriger Toxinkomplex (Tc) verantwortlich, welcher durch die 19 kb große Pathogenitätsinsel Tc-PAI<sub>ye</sub> kodiert wird. Diese Pathogenitätsinsel ist innerhalb der *Yersinia* spp. hoch konserviert und besteht aus Genen für einen LysR-ähnlichen Regulator und für die drei Untereinheiten des Tc. Alle *tc*-Gene unterliegen der strikten Temperaturregulation: Während sie bei 37°C unterdrückt werden, erfolgt die Aktivierung bei Temperaturen zwischen 10°C und 20°C. Zusätzlich zu diesen bereits gut untersuchten Genen befinden sich innerhalb der Insel vier phagenverwandte und ebenfalls hoch konservierte Gene, die für eine Lysekassette, bestehend aus einem Holin (*holY*), einem Endolysin (*elyY*), einem i-Spanin (*yRz*) und einem o-Spanin (*yRz1*), kodieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Charakterisierung dieser phagenverwandten Lysekassette. Zunächst wurde mittels Reverser Transkriptions-PCR gezeigt, dass die vier Gene polycistronisch transkribiert werden. Die Bestätigung der Funktionalität der Phagenproteine erfolgte zum einen über die Demonstration der Fähigkeit von *holY*, Poren zu formen, indem es ein defektes S-Holin im lysogenen Phagen  $\lambda$  komplementierte. Zum anderen konnte die lytische Aktivität durch Überexpression von *holY* und *elyY* mit oder ohne Spanine in einem induzierbaren Vektor in *Escherichia coli*-Zellen bewiesen werden. Diese zeigte sich in dem heterologen Wirt als Temperatur-unabhängig, und war stärker ausgeprägt, wenn alle vier Lysegene in dem Überexpressionskonstrukt enthalten waren. Im Gegensatz dazu zeigte sich in dem homologen Wirt *Y. enterocolitica* W22703, ebenso wie in den *Y. enterocolitica* Biovarien 1A, 1B, 3 und 5, eine Lyse temperaturabhängig nur bei 37°C. Bei 15°C lysierten die Zellen nicht. Zur Untersuchung der Spezifität der Phagenproteine wurden weitere *Yersinia*-Spezies herangezogen; beispielsweise wurde bei *Y. pseudotuberculosis* ebenfalls eine Temperatur-unabhängige Lyse beobachtet. Zur Klärung des molekularen Mechanismus, der der

temperaturabhängigen Lyse zugrunde liegt, wurde eine Lon Protease-negative Mutante von W22703 erstellt, in der die Überexpression der Lysegene nun auch bei 15°C zum Zelltod führte. Eine Analyse der Stabilität ElyYs zeigte im Stamm *Y. enterocolitica* W22703 einen zügigen proteolytischen Abbau des überexprimierten Proteins bei 37°C. Bei 15°C erfolgte die Degradation zeitlich verzögert. Im Gegensatz dazu wurde ElyY im Stamm W22703  $\Delta lon$  sowie in *Y. pseudotuberculosis* bei beiden Temperaturen kaum degradiert. Jedoch liegt der Temperatur-Effekt der Lyse bei W22703 in der bei 15°C höheren Stabilität der Protease selbst begründet. Somit spielt die Protease Lon eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der lytischen Aktivität der Phagenproteine. Diese Art Schutzmechanismus ist unter anderem dann notwendig, wenn eine Freisetzung des Toxinkomplexes unabhängig von einer Zelllyse ermöglicht werden soll. Damit wäre das hier besprochene System ein Beispiel für ein neuartiges Typ 10-Sekretionssystem, das auf lytischen Phagenproteinen basiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die insektizide Aktivität von *Y. enterocolitica* W22703 sowie weiterer Vertreter verschiedener *Yersinia*-Spezies, die keine Pathogenitätsinsel besitzen, im Modellorganismus *Galleria mellonella* untersucht und quantifiziert. Die Infektionsversuche, bei welchen die Isolate direkt in das Hämocoel der Insektenlarven injiziert wurden, zeigten, dass *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii* hoch toxisch gegenüber diesen Tieren sind. Ebenso besitzt der *Y. enterocolitica*-Stamm 8081, Mitglied der *Y. enterocolitica*-Phylogruppe 2, offenbar eine hohe Virulenz, da er die Larven bereits bei einer Injektionsdosis von etwa 38 Zellen abtötet. Dieser Stamm ähnelt damit in seiner insektiziden Aktivität der von *Photobacterium luminescens*. Bei allen untersuchten *Yersinia*-Isolaten konnte für die insektizide Aktivität ein Temperatur-Effekt gezeigt werden. Die Pathogenität der *Yersinia*-Spezies ist höher, wenn die Tiere nach der Infektion bei 15°C kultiviert werden, und niedriger bei einer Lagerung der Larven bei 30°C. Aus einer Auflistung an Genen, die für Faktoren kodieren, die für die Toxizität der beiden Stämme *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii* verantwortlich sein können, und die überdies nicht im Genom von *Y. enterocolitica* W22703 vorkommen, wurde das Gen *yacT* ausgewählt. Dieses kodiert für ein Protein, das eine signifikante Ähnlichkeit zu dem hitze-stabilen cytotonischen Enterotoxin (Ast) von *Aeromonas hydrophila*, welches für Durchfallerkrankungen bei Kindern verantwortlich zeichnet, besitzt. Es wurde eine *yacT*-negative Mutante von *Y. frederiksenii* erstellt und diese in Infektionsversuchen mit dem Wildtypstamm verglichen. Es zeigte sich, dass die Mutante eine deutlich verringerte Pathogenität gegenüber den *G. mellonella*-Larven besitzt und länger benötigt, um sich in den Tieren zu vermehren. Die direkte Injektion des Proteins YacT in die Larven führt zu einer deutlich veränderten Morphologie der Hämocyten.

Die phagenverwandte Lysekassette sowie das Enterotoxin YacT nehmen signifikanten Einfluss auf die insektizide Aktivität. Die vorliegende Arbeit erweitert mit dieser Erkenntnis das Wissen um das umfangreiche Repertoire an Virulenzfaktoren, das in der Umwelt vorkommende *Yersinia*-Spezies aufweisen.

## Abstract

The genus *Yersinia* is primarily known for the three human pathogenic representatives: There is the etiological agent of plague, *Y. pestis*, as well as the two enteric pathogens *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* which are usually transmitted via contaminated food and cause a gut-associated disease, called yersiniosis. Besides these well examined pathogens, the genus consists of at least 17 predominantly environmental species. The interest in these representatives of the genus *Yersinia* has recently increased because some of these non-human-associated species were isolated from specimen of patients with diarrhea. In addition, insights into the survival of these species in the environment contribute to a better understanding of the evolution of the bacteria of the genus *Yersinia* and of the pathogens in particular. It is known that the *Yersinia* species (spp.) carry an extensive repertoire of virulence factors allowing them to survive in the environment and adapt to mammalian and invertebrate hosts as was shown for *Y. enterocolitica*. Most of these factors are not known yet but the insecticidal and nematocidal activity of *Y. enterocolitica* strain W22703 is determined by the tripartite toxin complex (Tc) that is encoded on the 19 kb pathogenicity island Tc-PAI<sub>ve</sub>. This pathogenicity island is highly conserved in the genomes of *Yersinia* spp. and it carries a LysR-like regulator as well as genes encoding the three toxin complex components. All *tc*-genes follow a strict temperature regulation: They are silenced at 37°C but activated at lower temperatures between 10°C and 20°C. In addition to these already well-studied *tc*-genes, four phage-related and also highly conserved genes encoding a lysis cassette consisting of a holin (*holY*), an endolysin (*elyY*), an i-spanin (*yRz*) and an o-spanin (*yRz1*), are located within the island.

The first part of this thesis focused on the characterization of this phage-related lysis cassette. First, reverse transcription PCR was used to show that the four genes are transcribed polycistronically. To verify the functionality of the phage proteins, demonstration of the ability of HolY to form pores was performed by complementation of a phage  $\lambda$  lysogen with a mutated gene for holin S. In addition, their lytic activity was demonstrated by overexpression of *holY* and *elyY* with or without spanins using an inducible vector in *Escherichia coli* cells. The lysis effect was shown to be temperature-independent in the heterologous host and it was more pronounced when all four genes were included in the overexpression construct. In contrast, lysis was evident in the homologous host *Y. enterocolitica* W22703, as well as in *Y. enterocolitica* biovars 1A, 1B, 3, and 5, in a temperature-dependent manner only at 37°C. At 15°C the cells did not lyse. To test the specificity of the phage proteins additional *Yersinia* spp. were used. In some of them the lysis effect was temperature-independent, too, for instance in *Y. pseudotuberculosis*. To elucidate the molecular mechanism underlying this temperature-dependent lysis, a Lon protease negative mutant of W22703 was constructed. Using this mutant in overexpression experiments lead to cell death at 15°C as well. An analysis of ElyYs stability showed

rapid proteolytic degradation of the overexpressed protein at 37°C in strain *Y. enterocolitica* W22703. At 15°C, the degradation occurred with a time delay. In contrast, ElyY was barely degraded in strain W22703  $\Delta$ lon and in *Y. pseudotuberculosis* at either temperature. However, the temperature-dependent lysis effect is a result of the higher stability of protease Lon at 15°C. Consequently, the protease Lon plays an important role in the control of the lytic activity of the phage proteins. Such a protective mechanism is necessary, among other things, in the case that the toxin complex is released independently of cell lysis. Thus, the system discussed here would be an example of a novel type 10 secretion system based on lytic phage proteins.

In the second part of this study, the greater wax moth *Galleria mellonella* was used as model organism to analyze and quantify the insecticidal activity of representatives of various *Yersinia* species that do not possess a pathogenicity island. For this purpose, the isolates were injected into the hemocoel. It could be shown that *Y. intermedia* and *Y. frederiksenii* are highly toxic to this insect. Strain *Y. enterocolitica* 8081, member of *Y. enterocolitica* phylogroup 2, also exhibits a high virulence and kills *G. mellonella* larvae using low injection doses of approximately 38 cells only, and thus resembles *Photobacterium luminescens* in its insecticidal activity. During these infection experiments, temperature dependency of pathogenicity was observed. Pathogenicity of *Yersinia* spp. toward the larvae is significantly higher if the animals are cultivated at 15°C and lower if they are kept at 30°C. Using a list of genes encoding for factors which may be responsible for the toxicity of the two species *Y. intermedia* and *Y. frederiksenii*, and which were absent in the genome of *Y. enterocolitica* W22703 the gene *yacT* was chosen. This gene encodes for a protein that has a significant similarity to the heat-stable cytotoxic enterotoxin (Ast) of *Aeromonas hydrophila*, which is responsible for diarrhea in children. A *yacT* negative mutant of *Y. frederiksenii* was constructed and used in infection experiments in comparison to the wildtype strain. The mutant exhibited a reduced pathogenicity toward *G. mellonella* larvae and a retarded proliferation within the animals. The injection of the protein YacT into the larvae influences morphology of hemocytes.

The phage-related lysis cassette as well as the enterotoxin YacT significantly affect insecticidal activity. With this finding, the present work extends the knowledge of the extensive repertoire of virulence factors exhibited by *Yersinia* species present in the environment.

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AAA+	<i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>
Abb.	Abbildung
Ail	Yersinia-Membranprotein ( <i>attachment-invasive-locus</i> )
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	ungefähr
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
eDNA	Umwelt-DNA ( <i>environmental DNA</i> )
ElyY	Endolysin
evtl.	eventuell
E-Wert	Erwartungswert ( <i>expected value</i> )
GFP	grün-fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GTA	Vehikel zum horizontalen Gentransfer ( <i>gene transfer agents</i> )
H-Antigene	Geißelantigene
H-NS	Nucleoid-assoziiertes Protein ( <i>histone-like nucleoid structuring protein</i> )
HolY	Holin
HPI	Pathogenitätsinsel ( <i>high pathogenicity island</i> )
Inv	Invasin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPP	Braun-Lipoprotein
LTR	Regulationselement der späten Transkription ( <i>late transcription regulatory elements</i> )
MAM	Yersinia Adhesin ( <i>multivalent adhesion molecule</i> )
MCF	Genprodukt des Genes <i>mcf</i> ( <i>makes caterpillars floppy</i> )
MyfA	Yersinia Außenmembranprotein ( <i>mucoïd yersinia fibrillae</i> )
O-Antigene	Oberflächenantigene

OD	optische Dichte
OMVs	äußere Membranvesikel ( <i>outer membrane vesicles</i> )
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAI	Pathogenitätsinsel ( <i>pathogenicity island</i> )
PaLoc	Pathogenitätslocus
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Pla	Plasminogen-Aktivator
pYV	Yersinia Virulenzplasmid ( <i>plasmid for Yersinia virulence</i> )
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR ( <i>quantitative real time PCR</i> )
RFP	rot-fluoreszierenden Protein ( <i>red fluorescent protein</i> )
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RovA	Regulator der Virulenz A ( <i>regulator of virulence A</i> )
SAR	Signalsequenz ( <i>signal-anchor-release</i> )
spp.	mehrere Spezies
T3SS	Typ 3-Sekretionssystem
T10SS	Typ 10-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle aus einer Publikation
Tc	Toxinkomplex ( <i>toxin complex</i> )
TD <sub>50</sub>	diejenige Zeit, bei der 50% der Population tot sind ( <i>50% time of death</i> )
YadA	Yersinia Adhärenzprotein A ( <i>Yersinia adhesin A</i> )
YAPI	Yersinia Pathogenitätsinsel ( <i>Yersinia adhesion pathogenicity island</i> )
Ybt	Yersiniabactin
YmoA	Yersinia Virulenz-Modulator A ( <i>Yersinia virulence modulator A</i> )
Ymt	Yersinia Virulenzfaktor ( <i>Yersinia murine toxin</i> )
Yop	Yersinia Outer Protein ( <i>Yersinia outer proteins</i> )
Ysa	Yersinia-Sekretionsapparat ( <i>Yersinia secretion apparatus</i> )
Yst	Yersinia Enterotoxin ( <i>Yersinia-heat-stable enterotoxin</i> )
Yts1	Yersinia Type II Sekretionsapparat ( <i>Yersinia type II secretion 1</i> )
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Darstellung der Konformationsänderung des dreigliedrigen Toxincomplexes von *P. luminescens* von der Bindung an die Zielzelle hin zur Bildung der Translokationspore und Freisetzung der toxischen Komponente. .... 10
- Abb. 2: Anordnung der *tc*-homologen Gene innerhalb der Pathogenitätsinsel Tc-PAI<sub>Ye</sub> von *Y. enterocolitica* W22703. .... 12
- Abb. 3: Modell zur temperaturabhängigen Regulation der Pathogenitätsinsel. .... 15





# 1 Einleitung

## 1.1 Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* gehört zur Familie der *Yersiniaceae* innerhalb der Ordnung *Enterobacterales* [Adeolu *et al.*, 2016], einer Gruppe Gram-negativer, fakultativ anaerober und nicht-sporulierender Stäbchen [Brenner, 1979]. Ihren Namen erhielt die Gattung nach dem Schweizer Bakteriologen Alexandre Jean Émile Yersin, der 1894 zeitgleich mit Shibasaburo Kitasato das Bakterium *Yersinia pestis* als Ursache der Pest-Erkrankungen in Honkong und die Ratte als Überträger der Seuche identifizierte [Bibel & Chen, 1976].

Seit 2005 wurde die Gattung um neun neue Spezies erweitert und umfasst derzeit 20 Arten [Nguyen *et al.*, 2019., Savin *et al.*, 2019., Nguyen *et al.*, 2020]. Die bekanntesten Vertreter sind die drei humanpathogenen Spezies *Y. pestis*, der Erreger der Lungen- und Beulenpest, sowie *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, beides Erreger der Yersiniose. Die weiteren 17 Stämme kommen mehrheitlich in der Umwelt vor: *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. aleksiciae* (2005), *Y. massiliensis* (2008), *Y. similis* (2008), *Y. entomophaga* (2011), *Y. pekkanenii* (2011), *Y. nurmii* (2011), *Y. wautersii* (2014), *Y. hibernica* (2019), *Y. canariae* (2020).

### 1.1.1 *Yersinia enterocolitica*

*Y. enterocolitica* ist ein zoonotischer Erreger und verursacht bei Menschen eine gastrointestinale Erkrankung [Bottone, 1999]. Erstmals beschrieben wurde die Spezies 1934 von McIver und Pike, ihren heutigen Namen erhielt sie jedoch erst 1964 durch Wilhelm Frederiksen. Die Bakterien können aus einer Vielzahl an domestizierten und wildlebenden Tieren, wie Schweinen, Rindern, Schafen, Ziegen, Hunden, kleinen Nagetieren, Vögeln und Insekten isoliert werden. Dabei sind vor allem für humanpathogene *Y. enterocolitica*-Stämme Haus- und Wildschweine das bedeutendste Tierreservoir [Bottone, 1999]. Die Infektion des Menschen erfolgt häufig durch den Verzehr von rohem oder unzureichend erhitztem Schweinefleisch [Tauxe *et al.*, 1987]. Die psychrotrophe Eigenschaft der Bakterien verstärkt dabei ihre Rolle als Lebensmittelkeim. Zwar liegt die optimale Temperatur für ihre Vermehrung bei 28-30°C [Brubaker, 1972], dennoch können sie auch bei Temperaturen bis -5°C wachsen [Bergann *et al.*, 1995].

Die Spezies *Y. enterocolitica* umfasst eine Reihe pathogener und apathogener Stämme, die sich in ihren biochemischen und antigenen Eigenschaften teilweise deutlich unterscheiden. Sie wird anhand biochemischer Eigenschaften in sechs Biotypen untergliedert: 1A, 1B und die Gruppen 2, 3, 4 und 5.

Während der Biotyp 1A vor allem apathogene, in der Umwelt vorkommende Stämme umfasst, enthält der Biotyp 1B vorwiegend aus Amerika stammende Isolate humanpathogener Stämme. Die Biotypen 2 bis 5 sind eher Europa, Asien und Australien zuzuordnen und enthalten hochpathogene bis gering pathogene Stämme [Wauters *et al.*, 1987]. Die weitere Untergliederung in Serotypen erfolgt anhand verschiedener Antigene, wobei die Oberflächenantigene (O-Antigene) und die Geißelantigene (H-Antigene) für die Diagnostik relevant sind. Die O-Antigene, für deren Bezeichnung Zahlen verwendet werden, können bei mehreren Spezies der Gattung *Yersinia* vorkommen. Die H-Antigene sind speziesspezifisch und können somit zur Speziesidentifizierung herangezogen werden [Aleksić & Bockemühl, 1990].

Der in dieser Arbeit untersuchte *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 ist dem Biotyp 2 und dem Serotyp O:9 zuzuordnen. Es handelt sich um einen gering pathogenen Stamm, dem das Virulenzplasmid pYV [Mulder *et al.*, 1989] sowie die im Genom des humanpathogenen *Y. enterocolitica*-Stammes 8081 vorhandenen Gene, die für die Pathogenitätsinsel YAPI (*Yersinia adhesion pathogenicity island*), die Sekretionssysteme Ysa (*Yersinia secretion apparatus*) und Yts1 (*Yersinia type II secretion 1*) kodieren [Fuchs *et al.*, 2011], fehlen. Dafür besitzt *Y. enterocolitica* W22703 ein Typ 3-Sekretionssystem (T3SS), welches sonst nur in apathogenen *Yersinia*-Spezies gefunden werden kann [Fuchs *et al.*, 2011], sowie eine Pathogenitätsinsel (*pathogenicity island*, PAI), die dem Stamm eine insektizide und nematozide Aktivität verleiht [Bresolin *et al.*, 2006].

### 1.1.2 *Yersinia frederiksenii*

*Y. frederiksenii* zählte bis 1980 zur Gruppe der *Y. enterocolitica*-like Spezies. Mit der Anwendung der DNA-DNA Hybridisierung auf eine Vielzahl an *Y. enterocolitica*- und *Y. pseudotuberculosis*-Stämme wurde *Y. frederiksenii* ebenso wie *Y. intermedia* und *Y. kristensenii* als eigenständige Spezies erkannt [Brenner *et al.*, 1976] und beschrieben [Ursing *et al.*, 1980]. Ihren Namen erhielt die Spezies zu Ehren des dänischen Mikrobiologen Wilhelm Frederiksen. Trotz einer großen Übereinstimmung in physiologischen Eigenschaften und Kulturbedingungen lässt sich *Y. frederiksenii* biochemisch von *Y. enterocolitica* dadurch unterscheiden, dass es zwar Rhamnose fermentieren kann, nicht jedoch Melibiose, Raffinose und  $\alpha$ -Methyl-D-Glucose [Ursing *et al.*, 1980].

Die Spezies *Y. frederiksenii* umfasst eine heterogene Gruppe von Stämmen, die unter anderem aus Klär- und Flusswasser, Rohmilch, Schweinefleisch sowie humanen Stuhlproben oder klinischen Proben isoliert wurden [Stock & Wiedemann, 2003]. Anhand ihrer Genomsequenzen teilen sich diese auf drei Speziescluster auf [Reuter *et al.*, 2014] bzw. gehören sie zu drei Abstammungslinien, von denen zwei eine eigene Spezies darstellen könnten [Savin *et al.*, 2019]. Bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Y. frederiksenii*-Stamm ATCC33641 handelt es sich um den Typstamm der von SAVIN *et al.* als *Y. frederiksenii sensu stricto* bezeichneten Klade.

### 1.1.3 Virulenzfaktoren von Yersinien

Die Gattung *Yersinia* beinhaltet sowohl hochpathogene Spezies, die beim Menschen Erkrankungen wie die Pest oder eine Yersiniose, eine fieberhafte Darmerkrankung, auslösen können, als auch als apathogen eingestufte Spezies. Die Einschätzung, zu welcher Kategorie ein Stamm zählt, erfolgt vor allem danach, ob dieser bestimmte Virulenzfaktoren besitzt. Ein wichtiger Faktor für die Pathogenität ist das Vorhandensein des ca. 70 Kilobasen (kb) großen Virulenzplasmides pYV (pCD1 in *Y. pestis*) [Gemski *et al.*, 1980]. Auf diesem Plasmid befinden sich die Gene für das Adhärenzprotein YadA (*Yersinia adhesin A*), die Yops (*Yersinia outer proteins*) und ein T3SS [Gemski *et al.*, 1980; Portnoy *et al.*, 1981, Portnoy & Martinez, 1985]. Das ca. 45 kDa große äußere Membranprotein YadA ist hauptverantwortlich für die Zelladhärenz und damit für die Einleitung einer Infektion der Zelle [Heesemann & Grüter, 1984]. Des Weiteren führt es ab einer gewissen Menge zur Autoagglutination [Skurnik *et al.*, 1984] und ist wichtig für die Phagozytose- und Serumresistenz [Bottone, 1997]. Während YadA in *Y. enterocolitica* eine entscheidende Rolle für die Infektiosität spielt, ist die Virulenz von *Y. pseudotuberculosis* bei Fehlen des Adhäsins unverändert [Bölin & Wolf-Watz, 1984]. In *Y. pestis* führte die Deletion eines einzelnen Basenpaares zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zur vollständigen Abwesenheit von YadA [Rosqvist *et al.*, 1988; Skurnik & Wolf-Watz, 1989].

In allen drei humanpathogenen Spezies sind die Yops von besonderer Bedeutung für die Virulenz. Diese umfassen zum einen die Effektorproteine, die das Überleben und Replizieren der Yersinien begünstigen und die zelluläre Antwort des Wirtes unterdrücken [Rosqvist *et al.*, 1990]. Zum anderen gibt es innerhalb der Gruppe der Yops auch Proteine mit regulatorischer Funktion [Holmström *et al.*, 1997; Ferracci *et al.*, 2005] und solche, die zur Translokation beitragen [Rosqvist *et al.*, 1995]. Die Effektorproteine werden mit Hilfe des ebenfalls auf dem Plasmid pYV kodierten T3SS in die Zielzelle injiziert. Die 27 strukturbildenden Proteine, die sich zu dem Injektionsapparat zusammensetzen, weisen eine hohe Homologie zu Flagellenproteinen auf [Hueck, 1998] und sind unter den Yersinien stark konserviert [Cornelis, 2006].

Die auf dem Plasmid pYV kodierten Virulenzfaktoren sind für die Pathogenität der Bakterien zwar erforderlich, jedoch nicht ausreichend [Heesemann *et al.*, 1984]. Zusätzlich zu diesen gibt es eine Reihe von chromosomal kodierten Faktoren, die die Infektiosität maßgeblich beeinflussen, indem sie eine effiziente Kolonisierung des Wirtes begünstigen. So nutzen die enteralen *Yersinia* spp. die Aktivität einer Urease, die von den drei Operons *ureABC*, *ureEF* und *ureGD* kodiert wird, um dem sauren pH im Magen mit Ammoniak-Bildung entgegenzuwirken [De Konning-Ward & Robins-Browne, 1995; Young *et al.*, 1996]. Das vom *inv*-Gen kodierte Außenmembranprotein Invasin ist der wichtigste Invasionsfaktor von *Y. enterocolitica*. Im Mausversuch wurde gezeigt, dass es über eine Interaktion mit  $\beta$ 1-Integrinen die Durchdringung enteraler M-Zellen und folglich die Invasion der Peyer'schen Plaques

ermöglicht. Somit ist Invasin bereits in der Frühphase der Infektion für eine effiziente Translokation der Bakterien über das intestinale Epithel erforderlich [Pepe & Miller, 1993]. Ein intaktes *inv*-Gen gibt es nur in *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, während *Y. pestis* ein Pseudogen besitzt [Simonet *et al.*, 1996]. Ein weiterer Faktor für die Adhärenz sowie die Invasion ist das Adhäsın Ail (*attachment-invasive-locus*), welches durch das *ail*-Gen kodiert wird. Ail ist außerdem für die Serumresistenz erforderlich [Bliska & Falkow, 1992]. Ein *ail*-Gen kann nur in pathogenen *Y. enterocolitica*-Serotypen detektiert werden, es kommt weder in apathogenen *Y. enterocolitica*-Stämmen noch in apathogenen *Yersinia*-Spezies vor [Miller *et al.*, 1989]. *Y. pseudotuberculosis* besitzt ein *ail*-Gen, wobei das resultierende Protein nicht zu Adhäsion und Inversion beiträgt, sondern nur zur Serumresistenz [Yang *et al.*, 1996]. *Y. pestis* kodiert für ein funktionales Ail, welches hier für die Infektion entscheidende Funktionen übernimmt. Es ist der primäre Faktor für die Adhäsion an Säugetierzellen [Felek & Krukoniš, 2009] und befördert die Invasion von Immunzellen [Marketon *et al.*, 2005]. Des Weiteren vermittelt es Serumresistenz [Anisimov *et al.*, 2005] sowie Autoaggregation [Laird & Cavanaugh, 1980]. Das Gen *myfA* (*mucoıd yersinia fibrillae*) wird ebenfalls nur von pathogenen *Y. enterocolitica*-Serotypen exprimiert [Iriarte *et al.*, 1993]. Dieses ist ein Homolog des Gens *psaA* von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*, welches für die Hauptkomponente des pH6-Antigens kodiert [Lindler *et al.*, 1990]. Das pH6-Antigen weist eine fibrillenähnliche Struktur auf, die eine Rolle bei der Adhärenz an Säugetierzellen spielt [Yang *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2006]. *Y. pestis* besitzt mit dem Protein YapE einen weiteren für die Adhärenz wichtigen Faktor [Lawrenz *et al.*, 2009].

Einige *Y. enterocolitica* Stämme produzieren ein hitzestabiles Enterotoxin Yst I (*Yersinia-heat-stable enterotoxin*). Dieses ist strukturell und funktional homolog zu dem hitzestabilen Enterotoxin von enterotoxischen *E. coli* [Takao *et al.*, 1984] und stimuliert die Guanylat-Zyklase im Darm, wodurch der typische wässrige Durchfall einer *Y. enterocolitica*-Infektion verursacht wird [Delor & Cornelis, 1992; Delor *et al.*, 1990]. Inzwischen wurde ein weiteres Enterotoxin identifiziert, Yst II genannt, welches vor allem von als apathogen eingeschätzten Stämmen produziert wird [Robins-Browne *et al.*, 1993]. Des Weiteren wurden verschiedene Subtypen von Yst I nämlich YstA, YstB und YstC charakterisiert [Delor *et al.*, 1990; Yoshino *et al.*, 1994; Yoshino *et al.*, 1995]. YstA wird hauptsächlich von *Y. enterocolitica* Biovaren 1B und 2-5 produziert, während Stämme des Biovars 1A vor allem für YstB und in seltenen Fällen für YstC kodieren [Singh & Virđi, 2004]. Neben *Y. enterocolitica* sind auch in anderen *Yersinia* spp. Gene für Yst oder weitere Enterotoxine nachgewiesen worden, z.B. in *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii* oder *Y. intermedia* [Robins-Browne *et al.*, 1991; Sulakvelidze *et al.*, 1999; Singh & Virđi, 2004].

Ein weiterer Faktor, der sich auf die Ausprägung der Virulenz auswirkt, ist das Vorhandensein der Pathogenitätsinsel HPI (*high pathogenicity island*). Diese trägt Gene, die für die Eisenaufnahme der Bakterien relevant sind. Da Eisen-Ionen als Kofaktor für verschiedene zelluläre Prozesse benötigt

werden, ist die erfolgreiche Eisenaufnahme während des Infektionsgeschehens wichtig für die Vermehrung und Verbreitung von Pathogenen. Die Gene der HPI sind involviert in die Biosynthese, den Transport und die Regulation des Siderophors Yersiniabactin (Ybt) [Carniel *et al.*, 1996]. Dieses bindet mit einer so hohen Affinität Eisen, dass es in der Lage ist, diese Ionen den meisten Eisenbindeproteinen des Wirtes zu entziehen [Perry *et al.*, 1999]. Zusätzlich zur Ybt-vermittelten Eisenaufnahme gibt es noch weitere Eisentransporter wie YfeABCD, FeoABC, FetMP oder EfeUOB, die zur Virulenz pathogener Yersinien beitragen. Neben der Aufnahme von Eisen spielen auch die Aufnahmesysteme für Mangan durch die Transporter Yfe oder MntH sowie für Zink durch den ZnuABC Transporter eine Rolle für die Virulenz [Perry *et al.*, 2012].

Obwohl die Spezies *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* den größten Teil ihrer genomischen Ausstattung gemeinsam haben [Chain *et al.*, 2004], verursachen sie sehr unterschiedliche Krankheiten und beide nutzen verschiedene Infektionswege. Während *Y. pestis* hauptsächlich durch einen Flohbiss übertragen wird [Perry & Fetherston, 1997], ist *Y. pseudotuberculosis* toxisch gegenüber diesen Tieren [Erickson *et al.*, 2007] und wird vom Menschen vor allem über kontaminierte Nahrung aufgenommen [Smego *et al.*, 1999]. Ursächlich für diese Unterschiede ist sowohl der Erwerb neuer Gene als auch der Verlust einzelner Gene bzw. deren Mutation zu Pseudogenen [Chain *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2014]. So besitzt *Y. pestis* zusätzlich zu pYV zwei Plasmide, auf denen Faktoren kodiert werden, die für die Virulenzeigenschaften des Pesterregers wichtig sind. Auf dem Plasmid pPCP1 befindet sich das Gen für den Plasminogen-Aktivator Pla [Sodeinde & Goguen, 1988]. Hierbei handelt es sich um eine Protease, die unter anderem die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin katalysiert. Plasmin ist wiederum eine Serinprotease, die den Gerinnungsfaktor Fibrin sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Laminin und Kollagen abbauen kann [Lähteenmäki *et al.*, 1998]. Pla ist dabei erheblich an der Manifestation sowohl der Beulen- als auch der Lungenpest beteiligt. Im Fall einer subkutanen Infektion erleichtert Pla die weitere Verbreitung von *Y. pestis* in das Lymphsystem sowie tiefere Gewebe und folglich die für die Beulenpest typische systemische Ausbreitung [Sebbane *et al.*, 2006]. Erfolgt die Infektion intranasal, trägt Pla unter anderem durch eine Verzögerung der Immunantwort zur Vermehrung und zum Überleben der Bakterien in der Lunge bei [Lathem *et al.*, 2007].

Das Plasmid pMT1 trägt zum einen das Gen *caf1*, das für das Fraktion 1-Kapselprotein kodiert [Galyov *et al.*, 1990]. Die von Caf1-Proteinen gebildete F1-Kapsel verhindert die Phagozytose durch Makrophagen und begünstigt die Übertragung der Erreger auf den Menschen während eines Flohbisses [Du *et al.*, 2002]. Zum anderen ist auf pMT1 das Gen *ymt* (*yersinia murine toxin*) zu finden. Dieses kodiert für eine Phospholipase D, die erforderlich ist für die Besiedlung und das Überleben der Pathogene im Flohdarm [Hinnebusch *et al.*, 2002].

Durch die Aufnahme der beiden beschriebenen Plasmide erhielten die *Y. pestis*-Bakterien neue Eigenschaften und damit einen Selektionsvorteil. Zusätzlich ermöglichte der selektive Verlust einzelner Genfunktionen die Entwicklung eines stabilen Biofilms im Proventrikel des Flohs, welcher für die erfolgreiche Übertragbarkeit auf den Menschen notwendig ist [Hinnebusch & Erickson, 2008; Sun *et al.*, 2014]. Beispielsweise besitzt *Y. pseudotuberculosis* die Glykosidase NghA, die die Bildung eines Biofilmes hemmt, indem sie die Bildung der extrazellulären Matrix stört. Bei *Y. pestis* liegt das *nghA* Ortholog als Pseudogen vor [Erickson *et al.*, 2008]. Die Gene *rcsA*, PDE2 und PDE3 sind involviert in den Metabolismus von zyklischem di-Guanosinmonophosphat und beeinflussen damit die Bildung eines Biofilms negativ. Diese sind ebenfalls nur bei *Y. pseudotuberculosis* funktional, während sie im Genom von *Y. pestis* als Pseudogene vorliegen [Sun *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012].

Im Allgemeinen gilt ein *Yersinia*-Stamm als apathogen, wenn er nicht das Virulenzplasmid pYV trägt [Portnoy *et al.*, 1981], obwohl das Fehlen eines der oben beschriebenen Virulenzfaktoren nicht zwangsläufig zu einem Verlust der Pathogenität führt [Pepe & Miller, 1993]. So wurden auch als apathogen eingestufte *Y. enterocolitica* oder andere *Yersinia* spp. in (Stuhl-) Proben von Patienten mit gastroenteraler Erkrankung gefunden und als Ursache für die Symptome angenommen [Bottone & Robin, 1977; Cafferkey *et al.*, 1993]. Daher ist die Untersuchung der möglichen Pathogenität dieser Spezies und die Suche nach neuen Virulenzfaktoren Gegenstand verschiedener Studien [Batzilla *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 1998; Imori *et al.*, 2017].

#### 1.1.4 Virulenzregulation und die Proteasen Lon und ClpP

Die Transkription und die Synthese von Proteinen stellen generell einen Energieaufwand für die Bakterien dar. Daher ist es wichtig, dass diese nur in der richtigen Situation und entsprechend der äußeren Bedingungen erfolgen. Die Virulenzgene sollen nur exprimiert werden, wenn sich das Pathogen innerhalb eines Wirtes befindet. Um dies sicherzustellen, besitzen Pathogene neben einer Reihe von Sensoren, die die Umweltbedingungen und deren Änderung erfassen, ein Netzwerk aus transkriptionellen und translationalen Regulatoren, die in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen wie Temperatur, pH-Wert, Nährstoffangebot, Sauerstoffkonzentration und Osmolarität unterschiedliche Gene aktivieren oder reprimieren [Mekalanos, 1992].

Die wichtigsten Regulatoren bezüglich der Virulenz von Yersinien sind der Transkriptionsfaktor RovA (*regulator of virulence A*), der *Yersinia*-Virulenz-Modulator A (YmoA, *Yersinia virulence modulator A*), das Nukleoid-assoziierte Protein H-NS (*Histone-like nucleoid structuring protein*) sowie der plasmidkodierte Aktivator VirF (LcrF in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*).

Die Expression der plasmidkodierten Virulenzfaktoren erfolgt unter anderem temperaturabhängig. Erhöht sich die Temperatur von moderaten Werten (10-20°C) auf 37°C im Wirt, wird das Wachstum

verlangsamt und die Transkription durch den ebenfalls auf pYV kodierten Aktivator VirF/LcrF, der zur Familie der AraC-Transkriptionsregulatoren gehört, induziert [Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992]. Bei 25°C wird die Expression von *virF* selbst dadurch inhibiert, dass das Histon-ähnliche Protein YmoA an seinen Promotor bindet [Cornelis *et al.*, 1991]. Außerdem bildet die *virF*-mRNA (*messenger ribonucleic acid*) stabile Sekundärstrukturen aus, die eine Bindung der Ribosomen verhindert [Böhme *et al.*, 2012]. Nach einer Erhöhung der Temperatur auf 37°C wird YmoA durch die Proteasen ClpXP und Lon abgebaut [Jackson *et al.*, 2004]. Gleichzeitig ist die Sekundärstruktur der mRNA weniger stabil. Nachfolgend ist eine Produktion von VirF möglich, wodurch die Expression des T3SS, der Translokatoren und von YadA induziert wird [Böhme *et al.*, 2012].

RovA fungiert als Aktivator für die Expression von *inv* bei moderaten Temperaturen [Revell & Miller, 2000], während YmoA dessen Expression zusammen mit H-NS durch die Blockade des Promotors hemmt [Ellison *et al.*, 2003]. Bei 37°C ändert sich die Tertiärstruktur von RovA und infolgedessen ist seine DNA (*deoxyribonucleic acid*)-Bindekcapazität verringert. Zusätzlich wird das Protein ebenfalls Ziel einer proteolytischen Spaltung durch ClpP und Lon [Herbst *et al.*, 2009].

ClpXP und Lon gehören zu den ATP-abhängigen Proteasen und werden der AAA+ (*ATPases associated with diverse cellular activities*)-Superfamilie von ATPasen zugeordnet [Neuwald *et al.*, 1999]. Ihre hauptsächliche Aufgabe ist der kontrollierte Abbau von fehlgefalteten oder beschädigten Proteinen. Mit Hilfe dieser Qualitätskontrolle wird sichergestellt, dass nicht funktionale Proteine aus der Zelle entfernt werden [Gottesman *et al.*, 1997]. Doch auch bei der Proteolyse von besonders kurzlebigen Regulationsfaktoren, die an Entwicklungsprozessen, der Stressresistenz und der bakteriellen Fitness beteiligt sind, spielen sie eine wichtige Rolle und tragen so zu einem Funktionieren der physiologischen Prozesse innerhalb der Bakterienzelle bei [Gottesman, 2003].

Sowohl bei der Protease Lon als auch bei ClpXP handelt es sich um zytoplasmatische Serinproteasen, die eine fassartige Struktur bilden und aus einer proteolytischen Untereinheit sowie einer ATPase-Domäne bestehen [Gottesman, 2003]. Die ATPase-Untereinheit ist verantwortlich für die Erkennung und Bindung des Substrats, das Entfalten der Proteine und die Translokation des Polypeptides zum aktiven Zentrum der proteolytischen Domäne [Licht & Lee, 2008]. Bis das Substrat in kleine Peptide von etwa 10 bis 15 Aminosäuren gespalten wird, durchläuft dieses viele Runden der Freisetzung und erneuten Bindung durch die ATPase-Domäne [Kenniston *et al.*, 2003]. Die Protease Lon besteht aus einem Polypeptid, das beide Domänen enthält, während ClpXP aus zwei Proteinen besteht. ClpP ist die proteolytische Komponente und ClpX die ATPase-Untereinheit, die auch durch ClpA ersetzt werden kann [Gottesman *et al.*, 1997].

## 1.2 Die Pathogenitätsinsel Tc-PAI<sub>Ye</sub> ermöglicht *Y. enterocolitica* W22703 eine insektizide und nematozide Aktivität

Sämtliche unter 1.1.3 genannten Virulenzfaktoren betreffen die Pathogenität der Bakterien gegenüber dem Menschen. Zusätzlich dazu tragen Yersinien Gene, die ihnen eine insektizide und nematozide Aktivität ermöglichen. Solche Gene, die für einen insektiziden Toxinkomplex (*toxin complex*, Tc) kodieren, wurden 1998 erstmalig in dem Organismus *Photorhabdus luminescens* identifiziert [Bowen *et al.*, 1998a]. 2001 untersuchten WATERFIELD *et al.* die Verbreitung der *tc*-Gene und beschrieben ein Vorkommen bei Spezies wie *Xenorhabdus nematophila*, *Y. pestis* und *Serratia entomophila*. Eine Benennung der *tc*-Gene erfolgt seither gemäß ihrer Homologie zu den insektiziden Toxinkomplexen von *P. luminescens* [Waterfield *et al.*, 2001a].

### 1.2.1 Der insektizide Toxinkomplex von *Photorhabdus luminescens*

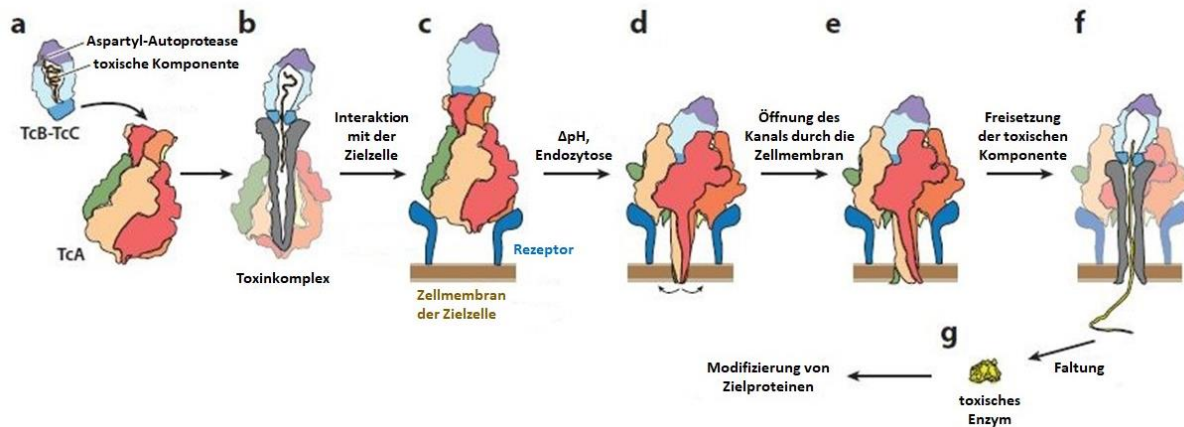
Das Bakterium *P. luminescens* lebt mit entomopathogenen Nematoden in mutualistischer Symbiose. Dabei dienen ihm die Nematoden der Familie *Heterorhabditidae* zum Schutz vor Umwelteinflüssen sowie als Transportmittel zum Insekt, welches eine Nahrungsquelle für das Bakterium darstellt [Ciche *et al.*, 2003]. Um diese erschließen zu können, produziert *P. luminescens* innerhalb des Insekts Toxine und andere, das Gewebe schädigende Moleküle [Münch *et al.*, 2008]. Derweil ernähren sich die Nematoden von den proliferierenden Bakterien und vermehren sich ebenfalls, bis sie als Dauerlarven den Insektenkadaver verlassen und mit *P. luminescens* im Darm nach einem neuen Insektenwirt suchen [Ciche *et al.*, 2003].

Die Toxinkomplexe gehören neben Proteasen, Lipasen und Lipopolysacchariden zu einer Reihe von potenziellen Virulenzfaktoren, die von *P. luminescens* sekretiert werden, um die Immunantwort des Insekts zu umgehen und um den Wirt zu töten [Forst *et al.*, 1997]. Die dazugehörigen *tc*-Gene sind an vier Loci innerhalb des Bakteriengenoms zu finden und kodieren für Proteine, die sich zu den Toxinkomplexen Tca, Tcb, Tcc und Tcd zusammensetzen [Bowen *et al.*, 1998b]. Von diesen weisen jedoch nur die beiden Komplexe Tca und Tcd eine starke orale insektizide Aktivität auf [Bowen *et al.*, 1998a]. Die *tc*-Gene sind in Form von Pathogenitätsinseln angeordnet und die resultierenden Proteine werden den verschiedenen Komponenten der dreigliedrigen Toxinkomplexe zugeordnet. Dabei kodieren *tcaAB*- oder *tcb/tcdA*-ähnliche Gene für die Komponente TcA, *tcaC*- oder *tcdB*-ähnliche Gene für die Komponente TcB und die *tccC*-ähnlichen Gene für die Komponente TcC [Bowen *et al.*, 1998., Waterfield *et al.*, 2001a].

Das biologisch aktive Toxin ist aus allen drei Untereinheiten zusammengesetzt [Lang *et al.*, 2010], wobei TcA als Homopentamer vorliegt und sowohl der Bindung an die Zielzelle als auch der Porenbildung durch deren Zellmembran dient [Gatsogiannis *et al.*, 2013, Meusch *et al.*, 2014]. Mithilfe



hochauflösender Kryo-Elektronenmikroskopie und Kristallstrukturanalysen konnte am Beispiel von TcdA1 von *P. luminescens* gezeigt werden, dass sich die Struktur des freien TcA vor der Bildung der Translokationspore sehr von seiner Struktur nach der Kanalbildung unterscheidet. Das lösliche TcA hat zunächst die Form einer Glocke und die fünf TcA-Protomere bilden einen zentralen Kanal aus  $\alpha$ -Helices, der über eine *linker*-Domäne mit der Hülle aus einer  $\alpha$ -Helix-Domäne sowie fünf rezeptorbindenden Domänen verbunden ist. Am oberen Ende der TcA-Komponente bilden die TcB-bindenden Domänen einen Trichter und am unteren Ende wird der Kanal von mehreren  $\beta$ -Faltblattstrukturen verschlossen [Gatsogiannis *et al.*, 2013., Meusch *et al.*, 2014]. Wird nun der pH stark abgesenkt [Lang *et al.*, 2010], beispielsweise durch die Ansäuerung in späten Endosomen, oder auf einen Wert über 11 erhöht [Gatsogiannis *et al.*, 2013], wie er im Mitteldarm von einigen Insekten vorkommt [Dow, 1984], ändert sich die Konformation von TcA erheblich. Die fünf *linker*-Domänen innerhalb von TcA ziehen sich zusammen, die Unterseite der Hülle öffnet sich und der Kanal wird nach unten in die Zellmembran bewegt. Während dieser Bewegung ordnen sich die  $\alpha$ -Helices des Kanals neu an und nehmen eine gestrecktere Konformation ein, wodurch eine bis dahin verschlossene Pore geöffnet wird [Gatsogiannis *et al.*, 2016]. Durch diese Translokationspore gelangt das toxische Enzym in das Zytoplasma der Zielzelle. Dieses ist Teil von TcC und befindet sich innerhalb eines von TcB und TcC gebildeten Kokons aus gestapelten  $\beta$ -Fass-Strukturen. Im Inneren des Kokons sind vornehmlich hydrophobe Seitenketten lokalisiert, die eine Faltung des toxischen Proteins verhindern. Während der Bindung des TcB-TcC-Kokons an TcA wird das toxische Protein mittels der Aspartyl-Autoprotease, welche ebenfalls zur Struktur der TcC-Komponente gehört, abgespalten und anschließend mit dem C-Terminus voraus in den von TcA gebildeten Kanal eingeführt. Auf diese Weise entsteht der Gesamtoxin-Komplex, der bereit ist, die toxische Komponente in die Zielzelle zu translozieren [Gatsogiannis *et al.*, 2018]. Nach seiner korrekten Faltung im Zytosol der Zelle agiert das toxische Enzym als ADP-Ribosyltransferase, die Aminosäuren beispielsweise von Aktin oder von Rho-GTPasen modifiziert und somit zur Hemmung der Phagozytose oder zur Aggregation des Aktinzytoskeletts führen kann [Lang *et al.*, 2010]. Auf diese Weise kommt es zur Veränderung und in den meisten Fällen auch zur Störung zellulärer Funktionen sowie zur Einschränkung der Immunabwehr [Simon *et al.*, 2014].



**Abb. 1:** Darstellung der Konformationsänderung des dreigliedrigen Toxinkomplexes von *P. luminescens* von der Bindung an die Zielzelle hin zur Bildung der Translokationspore und Freisetzung der toxischen Komponente. (a) Die Bindung des TcB-TcC-Kokons, der das ungefaltete toxische Enzym samt Autoprotease enthält, an TcA führt zur Bildung des kompletten Toxinkomplexes (b). (c) Der Toxinkomplex bindet an die Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle und löst damit die Endozytose aus. (d) Durch die Ansäuerung im späten Endosom kommt es zur Konformationsänderung von TcA und der Kanal stößt in die Zellmembran. (e) Die Streckung der  $\alpha$ -Helices innerhalb des Kanals öffnet die Spitze des Kanals und das toxische Enzym gelangt in das Zytosol der Zielzelle (f) und wird dort nach korrekter Faltung aktiv (g) [Roderer & Raunser, 2019 – Abdruck mit Genehmigung des Verlages Annual Review of Microbiology, Volume 73 © 2019 by Annual Reviews, <http://www.annualreviews.org>].

### 1.2.2 Verbreitung und Variabilität insektizider Toxinkomplexe

Seit der Entdeckung des insektiziden Toxinkomplexes in *P. luminescens* wurde eine Reihe weiterer Bakterien bekannt, die ebenfalls *tc*-Gene besitzen. Diese sind unter anderem im Genom der entomopathogenen Bakterien *X. nematophila* [Morgan *et al.*, 2001], welche mit Nematoden in Symbiose leben, und *Pseudomonas entomophila* [Vodovar *et al.*, 2006] zu finden. Bei der Spezies *S. entomophila* liegen die entsprechenden Gene auf dem Plasmid pADAP [Hurst *et al.*, 2000]. Beispiele für humanpathogene Spezies, die die *tc*-Gene tragen sind *P. asymbiotica* [Wilkinson *et al.*, 2009], *Salmonella enterica*, *Burkholderia pseudomallei* [Hinchliffe *et al.*, 2010] und *Morganella morganii* [Chen *et al.*, 2012]. Des Weiteren wurden bei den Gram-positiven Bakterien der Gattung *Paenibacillus* [Enright & Griffin, 2005], der Spezies *Bacillus thuringiensis* [Blackburn *et al.*, 2011], den Pflanzen-Pathogenen *P. syringae*, *P. fluorescens* [ffrench-Constant, *et al.*, 2007] und *Erwinia pyrifoliae* als auch bei marinen Bakterien der Spezies *Shewanella baltica* [Hinchliffe *et al.*, 2010] die für Tc-Proteine kodierenden Gene identifiziert. In der neuesten Untersuchung zum Vorkommen von Tc-Loci innerhalb der Bakterien wurden sämtliche öffentlich zugänglichen bakteriellen Genome der *Reference Sequence* Datenbank auf das Vorhandensein von Tc-Protein-Homologen analysiert. Dabei fanden die Autoren 1421 Bakteriengenome, die einen oder mehrere Tc-Loci besitzen. Die identifizierten Spezies gehören mehrheitlich zu dem Phylum der Proteobacteria, während deutlich weniger Spezies der Phyla Firmicutes und Actinobacteria Tc-Proteine besitzen [Song *et al.*, 2021]. Des Weiteren wurde in der

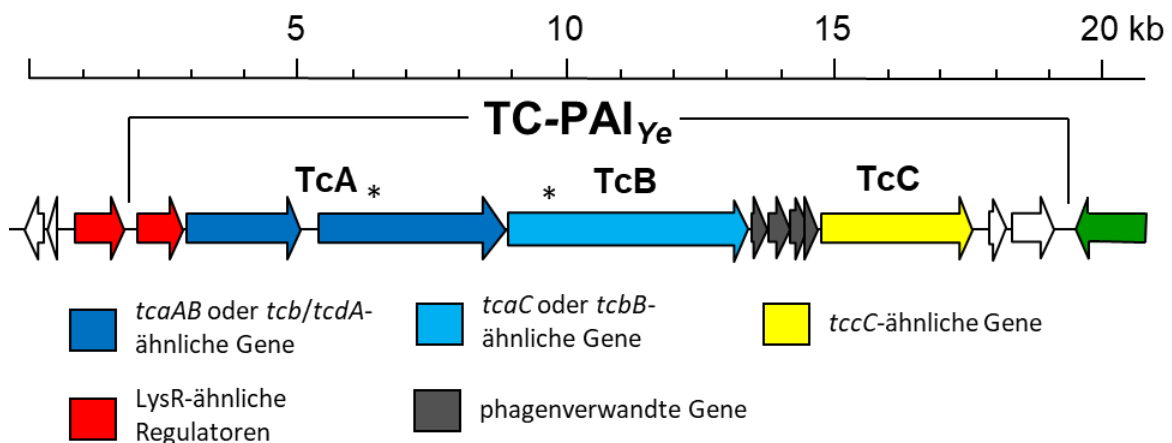
Veröffentlichung die Gattung *Yersinia* genauer betrachtet. Die Autoren nutzten die *EnteroBase*-Datenbank, um die größtmögliche Anzahl an *Yersinia*-Genomen analysieren zu können. Von 3341 untersuchten Genomen enthalten 1693 die Gene für Tc-Proteine. Die Zuordnung der Genome zeigt, dass die *tc*-Gene bei einem Großteil der *Yersinia*-Spezies zu finden sind [Song *et al.*, 2021]. Darunter sind sowohl die humanpathogenen Spezies *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* [Parkhill *et al.*, 2001] sowie einige *Y. enterocolitica*-Isolate der Biovare 2 bis 5 [Bresolin *et al.*, 2006; Fuchs *et al.*, 2008], inklusive des Stamms W22703, und der dem Biovar 1A angehörende Stamm T83. Darüber hinaus sind *tc*-Gene im Genom des Insektenpathogens *Y. entomophaga* [Hurst *et al.*, 2011] und bei *Y. mollaretii* [Waterfield *et al.*, 2007] zu finden. Bei *Y. frederiksenii* sind sie, wie bei *S. entomophila*, auf einem Plasmid lokalisiert [Dodd *et al.*, 2006]. Diese Vielzahl an verschiedenen Bakterien lässt darauf schließen, dass die *tc*-Gene höchst mobil sind und eine Übertragung von Spezies zu Spezies stattgefunden hat [Hinchliffe *et al.*, 2010].

Bei der Spezies *P. luminescens* sind die *tc*-Gene im Genom an vier Loci zu finden. Dabei gibt es von den für TcA und TcC kodierenden Genen bis zu sieben verschiedene Varianten. So kann die TcA-Komponente durch ein einzelnes Gen wie beispielsweise *tcdA1* oder durch zwei benachbarte Gene, z. B. *tcaA* und *tcaB*, kodiert werden. Bereits bei *P. asymbiotica* hat sich die Anzahl der Gene deutlich reduziert. Der gesamte *tcc*-Locus fehlt, und es sind für jede Untereinheit nur noch zwei Gen-Alternativen vorhanden [Wilkinson *et al.*, 2009]. Im Genom von *X. nematophila* liegen die Gene für alle Toxinkomponenten an einem einzigen Locus und umfassen zwei verschiedene Gene für die A- und jeweils nur ein Gen für die B- sowie die C-Untereinheit [Sergeant *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2016]. Auch in den meisten anderen Spezies treten die *tc*-Gene an nur einem Ort im Genom und in reduzierter Form auf. Häufig kommt es vor, dass die TcA-Komponente durch zwei Gene kodiert wird wie bei *Pseudomonas* spp. und *Yersinia* spp., und dass mehrere Kopien des *tcc*-Gens vorhanden sind [Hinchliffe *et al.*, 2010]. Zur Ausbildung eines aktiven Gesamttoxinkomplexes müssen die einzelnen Untereinheiten nicht auf demselben Genlocus liegen. Die verschiedenen Proteine, die aus der Mehrzahl an Loci resultieren, können untereinander ausgetauscht werden und ermöglichen so eine Aktivität gegen verschiedene Insekten [Waterfield *et al.*, 2005]. Aus der verringerten Anzahl der Gene ergibt sich eine reduzierte Diversität der Toxinkomplexe und somit auch eine geringere Anzahl an Insekten, gegen die eine toxische Aktivität möglich ist. So ist *P. luminescens* gegen eine Vielzahl an Insekten aktiv, während z.B. *Serratia*, welches ein Gen für jede Toxinuntereinheit besitzt, eine hohe Spezifität zeigt und allein auf sogenannte Grasmaden, die Larven von *Costelytra zealandica*, toxisch wirkt [Hurst *et al.*, 2007]. Für *X. nematophila* konnte gezeigt werden, dass die beiden verschiedenen Gene für die TcA-Untereinheit jeweils die Spezifität des Toxinkomplexes beeinflusst [Sergeant *et al.*, 2003].

Neueste Strukturanalysen verglichen mittels Kryo-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse den Aufbau der TcA-Komponenten der vier Spezies *P. luminescens*, *X. nematophila*, *M. morgani* und *Y. pseudotuberculosis*. Die Untersuchungen zeigten, dass die jeweiligen TcAs alle als Pentamere mit einer glockenartigen Struktur vorliegen und sich im Aufbau der wichtigen funktionalen Strukturen sehr ähnlich sind. Die größten strukturellen Unterschiede wurden im Aufbau der Hülle, wo die Rezeptorbindestellen lokalisiert sind, festgestellt [Leidreiter *et al.*, 2019].

### 1.2.3 Aufbau der Pathogenitätsinsel Tc-PAI<sub>Ye</sub>

Während ihrer Untersuchungen zur kälteinduzierten Genexpression in *Y. enterocolitica* W22703 mittels Transposon-gestützter Genomanalyse fanden BRESOLIN *et al.* erstmalig Gene, die eine signifikante Homologie zu den Genen des insektiziden Toxin Komplexes von *P. luminescens* aufweisen [Bresolin, 2004; Bresolin *et al.*, 2006]. Die infolge ihrer weiteren Auswertungen identifizierten offenen Leserahmen wurden entsprechend ihrer Homologie zu den *P. luminescens*-Genen benannt. Sie sind in Form einer Pathogenitätsinsel angeordnet und umfassen sowohl die Gene für die drei Toxinuntereinheiten A, B und C als auch den LysR-ähnlichen und als TcaR2 bezeichneten Regulator sowie vier phagenverwandte Gene [Bresolin *et al.*, 2006]. Die folgende Abb. 2 zeigt die Abfolge der *tc*-Gene im Stamm *Y. enterocolitica* W22703.



**Abb. 2:** Anordnung der *tc*-homologen Gene innerhalb der Pathogenitätsinsel Tc-PAI<sub>Ye</sub> von *Y. enterocolitica* W22703. [modifiziert nach Fuchs *et al.*, 2008]

Die Pathogenitätsinsel ist zwischen den Genen YE3797 (*tcaR1*) und YE3798 (*tldD*) lokalisiert und umfasst etwa 19 kb. Zu ihr zählen neben dem Gen für den Regulator TcaR2 die Gene *tcaA* und *tcaB*, welche gemeinsam für die Toxinuntereinheit TcA kodieren. Im Stamm *Y. enterocolitica* W22703 ist *tcaB* durch eine Leserasterverschiebung in zwei ORFs, *tcaB1* und *tcaB2* benannt, unterteilt. Ein weiteres Gen der PAI ist *tcaC*, welches für die Komponente TcB kodiert. Auch dieses Gen enthält eine

Verschiebung in der Nukleotidabfolge. Es folgen vier phagenverwandte Gene und das für die Untereinheit TcC kodierende Gen *tccC*. Zwischen *tccC* und *tldD* sind zwei Leserahmen vorhanden, deren Funktion jedoch unbekannt ist. Das direkt vor der Insel gelegene Gen *tcaR1* kodiert für einen weiteren Regulator der LysR-Familie. Obwohl dieser die Expression der *tc*-Gene beeinflusst, wird er nicht zur Pathogenitätsinsel gezählt, da das *tcaR1*-Gen im Genom aller *Yersinia* spp. vorhanden ist, unabhängig davon, ob sie eine PAI besitzen oder nicht [Bresolin *et al.*, 2006; Fuchs *et al.*, 2008].

Dieser Aufbau der Pathogenitätsinsel ist bei den meisten *Yersinia*-Stämmen, die *tc*-Gene besitzen, sehr ähnlich. Abweichungen ergeben sich hauptsächlich aus der Anzahl der *tccC*-Gene und aus der An- bzw. Abwesenheit der beiden ORFs zwischen *tccC* und *tldD*. Die Anzahl der *tccC*-Gene variiert zwischen einem, wie bei 85% der Tc-Loci der Gattung *Yersinia* [Song *et al.*, 2021], darunter beispielsweise alle *Y. enterocolitica*-Stämme der Biovare 2-5, *Y. mollaretii* und *Y. pseudotuberculosis* YPIII, und vier, wie bei dem Stamm *Y. pseudotuberculosis* IP31758. Die Spezies *Y. mollaretii* und *Y. pseudotuberculosis* besitzen keinen Leserahmen zwischen *tccC* und *tldD*, *Y. pestis* hat einen und die *Y. enterocolitica*-Stämme der Biovare 2-5 beide [Waterfield *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2008]. *Y. enterocolitica* T83 weicht in der Organisation der PAI von der der anderen Stämme dadurch ab, dass er statt zwei Genen ein einzelnes Gen besitzt, das für die A-Komponente des Toxins kodiert. Dieses ist entsprechend seiner Homologie als *tcdA* benannt. Das Gen *tcdB* kodiert für die B-Komponente [Tennant *et al.*, 2003b].

Fast alle *Yersinia* spp. haben gemeinsam, dass die Gene der Pathogenitätsinsel am selben hochkonservierten Genlocus aufzufinden sind. Sie liegen immer zwischen den Genen YE3797 und YE3798. Eine Ausnahme bildet der Stamm *Y. entomophaga*, dessen Pathogenitätsinsel in einer anderen Region im Genom lokalisiert ist. Außerdem befinden sich in dieser PAI neben den *tc*-Genen zwei weitere Gene, die für Chitinasen kodieren [Hurst *et al.*, 2010].

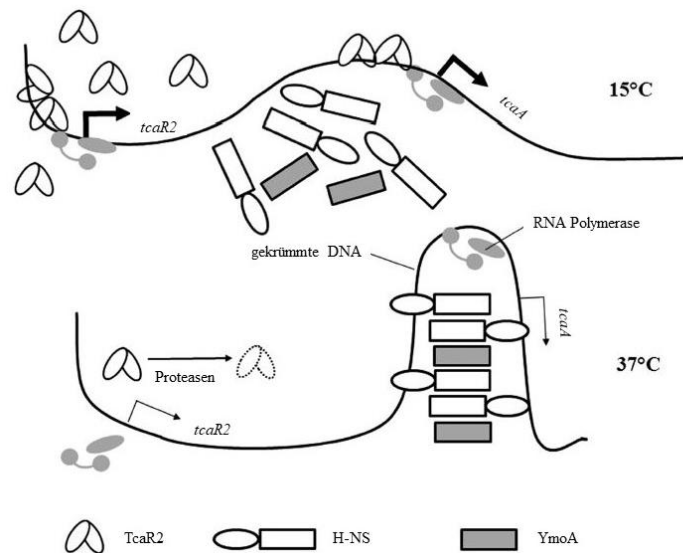
Trotz der großen Ähnlichkeit im Aufbau der Pathogenitätsinsel sowie der gleichen Position im Genom der *Yersinia* spp. unterscheiden sich die Stämme in der Expression der *tc*-Gene. Diese erfolgt bei *Y. pseudotuberculosis* IP32953 und *Y. enterocolitica* T83 bei einer Temperatur von 37°C [Hares *et al.*, 2008; Tennant *et al.*, 2005]. Bei *Y. pestis* ist die Transkription der *tc*-Gene bei 21-26°C signifikant stärker als bei 37°C [Motin *et al.*, 2004; Gendlina *et al.*, 2007], während sie bei *Y. enterocolitica* W22703 nur bei 10-20°C stattfindet [Bresolin *et al.*, 2006]. So zeigen letztgenannte Bakterien nur eine Aktivität gegen die Larven von *Manduca sexta* nach der Anzucht bei 10°C. Werden sie bei 30°C kultiviert, wird keine insektizide Wirkung mehr erzielt [Bresolin *et al.*, 2006]. Dieser temperaturabhängigen Expression liegt ein komplexes Wechselspiel der beiden Regulatoren TcaR1 und TcaR2 sowie dem Virulenzregulator YmoA zugrunde, auf welches im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

#### 1.2.4 Regulation der *tc*-Gene bei *Yersinia enterocolitica* W22703

Die *tc*-Gene von *Y. enterocolitica* W22703 verleihen den Bakterien sowohl eine insektizide Aktivität, z. B. gegen *M. sexta*-Larven, als auch eine nematozide, beispielsweise gegen den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* [Bresolin *et al.*, 2006; Spanier *et al.*, 2010]. Dabei ist die Expression der *tc*-Gene temperaturabhängig [Bresolin *et al.*, 2006]. Mittels Transkriptionsfusionsanalysen und Gelmobilitätsstudien konnten STARKE *et al.* zeigen, dass der LysR-ähnliche Regulator TcaR2 die Expression der Gene *tcaA* und *tcaB* induziert, indem er an deren Promotoren bindet. In den Versuchen führte die Deletion von TcaR2 zu einem Verlust der Transkriptionsaktivität der beiden Toxingene. Durch Komplementation konnte die Expression auf Wildtyp-Niveau wiederhergestellt werden. Von der Temperatur ist abhängig, ob der Aktivator in ausreichender Menge vorhanden ist. Zum einen ist bei 15°C die Transkription des Regulators selbst signifikant höher als bei 37°C. Zusätzlich wirkt er bei niedrigen Temperaturen positiv autoregulierend durch Bindung an seinen eigenen Promotor. Zum anderen zeigt TcaR2 bei 37°C eine geringere Proteinstabilität und wird vermehrt von Proteasen abgebaut. Hinzu kommt, dass die *tcaR2*-Expression von dem konstitutiv exprimierten Regulator TcaR1 reprimiert wird [Starke *et al.*, 2013].

Als Gegenspieler zum Aktivator TcaR2 identifizierten STARKE & FUCHS den Komplex aus YmoA und H-NS. Dieser verhindert die Expression sämtlicher *tc*-Gene bei 37°C durch eine Bindung an deren Promotoren sowie im Fall von *tcaA* und *tcaB* an intragenische Regionen. Zur Klärung der temperaturabhängigen Regulation bezüglich der Toxingene wurden die Proteinmenge und -stabilität von YmoA bei 15°C und bei 37°C verglichen. Während die Menge an YmoA in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien bei beiden Temperaturen gleich war, wurde in der stationären Phase bei 15°C weniger von dem Protein nachgewiesen als bei 37°C. Im Stabilitätsversuch wurde die Proteintranslation in den Zellen gehemmt und über einen längeren Zeitraum die Menge an YmoA beobachtet. Dabei stellte sich YmoA als thermostabil heraus, da es bei keiner Temperatur zu einer signifikanten Reduktion des Proteins kam. Bei 15°C gelingt es TcaR2, den repressorischen Komplex aus YmoA und H-NS zu verdrängen. Dies ist auf eine verringerte Tetramerisierungsrate von H-NS zurückzuführen, wodurch es zu einer verringerten Funktionalität des Komplexes kommt. [Starke & Fuchs, 2014] Die weiteren Toxingene *tcaC* und *tccC* werden ebenfalls bei 37°C von YmoA/H-NS reprimiert, jedoch konnte für diese keine positive Regulation durch TcaR2 festgestellt werden [Starke, 2015].

Die Abb. 3 zeigt ein Modell zur temperaturabhängigen Regulation des Gens *tcaA* entsprechend den oben beschriebenen Zusammenhängen.



**Abb. 3: Modell zur temperaturabhängigen Regulation der Pathogenitätsinsel.** Bei 15°C ist TcaR2 positiv autoregulierend, es bindet an den Promotor von *tcaA* und aktiviert damit dessen Expression. Die Tetramerisierungsrate von YmoA und H-NS ist stark reduziert und TcaR2 ist in der Lage, den Komplex zu verdrängen. Bei 37°C ist die Menge an funktionalem YmoA/H-NS-Komplex erhöht und dieser reprimiert die Expression von *tcaR2* sowie *tcaA*. Zusätzlich zur verringerten Transkription von *tcaR2*, wird TcaR2 von Proteasen abgebaut [Starke & Fuchs, 2014 – Abdruck mit Genehmigung des Verlages Molecular Microbiology, Volume 92 © 2014 by John Wiley & Sons].

Weitere Versuche wie beispielsweise die Bestimmung der relativen Expression mittels qRT-PCR zeigten, dass neben der Temperatur auch die Wachstumsphase der Bakterienkultur eine Rolle spielt. So beginnt die Transkription von *tcaR2* erst im Übergang von der exponentiellen Phase zur stationären Phase und damit auch die von *tcaA* und *tcaB*. Eine Abhängigkeit der Expression vom sogenannten *Quorum sensing*, der Fähigkeit von Bakterien, die Zelldichte der Population zu bestimmen und abhängig davon nur bestimmte Gene zu aktivieren, wurde bisher nicht abschließend untersucht. Jedoch wurde ein Einfluss der *Quorum-sensing*-Synthasen LuxS und YenI auf die Expression von *tcaR2* festgestellt. Die Deletion der beiden Gene *luxS* und *yenI* führte sowohl bei 15°C als auch bei 37°C zu einer signifikanten Steigerung der Promotoraktivität von *tcaR2* [Starke, 2015].

Außerdem wiesen die Untersuchungen von Reporterstämmen, bei welchen eine Fusion mit einem Fluoreszenzprotein vorlag, darauf hin, dass die Bildung des TcaA-Proteins nur in einem geringen Teil der Population erfolgt. Mithilfe einer translationalen Fusion von TcaA mit einem Reporter konnte auf Einzelzellebene veranschaulicht werden, dass bei 15°C nur etwa 5% der Zellen der Bakterienkultur TcaA bilden. Die Anzahl *tcaR2*-exprimierender Zellen ist sogar noch etwas geringer [Starke, 2015].

Die Regulation der Gene der Pathogenitätsinsel von *Y. enterocolitica* W22703 scheint darauf ausgelegt zu sein, die energieaufwendige Bildung des Toxin Komplexes nur bei einer optimalen Temperatur und/oder Zelldichte auszuführen und dies auf einen Teil der Population zu beschränken [Starke, 2015].

### 1.3 Die phagenverwandten Gene innerhalb der Tc-PAI<sub>Ye</sub>

Neben den Genen, die für die Toxinuntereinheiten kodieren, und den beiden Regulatoren befinden sich in der Pathogenitätsinsel der *Yersinia* spp. vier phagenverwandte Gene. Diese liegen zwischen den Genen *tcaC* und *tccC* und kodieren für ein Holin, ein Endolysin sowie zwei putative Spanine [Bresolin *et al.*, 2006; Reuter, 2008]. Die enzymatische Aktivität und Substratspezifität des Endolysins wurde bereits von STARKE mittels Zymographie untersucht und damit dessen Funktionalität nachgewiesen [Starke, 2015].

#### 1.3.1 Das dreistufige Lyse-Modell der Bakteriophagen

Bakteriophagen mit doppelsträngiger DNA produzieren am Ende des vegetativen Zyklus Holin-, Endolysin- sowie Spanin-Proteine, um nach erfolgter Vervielfältigung und Reifung ihre Gram-negativen Wirtszellen zu lysieren und somit neue Phagenpartikel freizusetzen [Young *et al.*, 1992, Berry *et al.*, 2012].

Das Endolysin ist ein lösliches Enzym mit Murein-abbauender Aktivität, welches eine Zellyse von innen heraus induzieren kann [Jakob & Fuerst, 1985]. Die Art der Aktivität kann sich zwischen den verschiedenen Phagen unterscheiden. Entsprechend ihres Angriffspunktes innerhalb des Peptidoglykans gibt es Endolysine mit Glykosidase-, Endopeptidase-, Amidase- oder Transglykosidase-Aktivität. Glykosidasen, welche auch Muramidasen oder Lysozyme genannt werden, und Transglykosidasen wirken auf die glykosidischen Bindungen im Rückgrat des Mureins, die Endopeptidasen und Amidasen dagegen hydrolysieren die Peptidverbindungen zweier benachbarter Stränge [Young, 1992]. Während Endolysine von Phagen mit Gram-positiven Wirtszellen am C-Terminus eine Domäne zur Bindung an die Zellwand und am N-Terminus die katalytisch aktive Domäne haben [Fischetti, 2005], besitzen die meisten Endolysine von Phagen Gram-negativer Bakterien eine einzige Domäne, die diese beiden Funktionen der Substraterkennung und der enzymatischen Spaltung in sich vereint [Briers *et al.*, 2007]. Damit ein Endolysin die hydrolytische Spaltung einer Bindung des Peptidoglykans katalysieren kann, muss es in dessen räumliche Nähe gelangen. Dazu haben sich bei den Phagen zwei verschiedene Strategien entwickelt, die auf den beiden Endolysin-Subtypen basieren, nämlich den kanonischen oder den sogenannten SAR (*signal-anchor-release*) Endolysinen [Xu *et al.*, 2004]. Die kanonischen Endolysine liegen im Zytoplasma der Wirtszelle bereits vollständig gefaltet vor und katalysieren die hydrolytische Spaltung einer Bindung des Peptidoglykans, sobald sie in dessen räumliche Nähe gelangen [Young, 1992]. Die SAR Endolysine besitzen eine spezielle N-terminale Signalsequenz, die es ermöglicht, das Sec-System des Wirtes für den Transport in das Periplasma zu nutzen [Xu *et al.*, 2004]. Dort akkumulieren die SAR Endolysin-Proteine in Membran-gebundener aber inaktiver Form. Kommt es zur Depolarisierung der



Zellmembran, werden sie freigesetzt, falten sich zur enzymatisch aktiven Form und bauen das Murein ab [Xu *et al.*, 2005].

Den Zugang zur Peptidoglykanschicht ermöglichen dem Endolysin in den meisten Fällen sogenannte Holine [Reader & Siminovitch, 1971]. Dabei handelt es sich um kleine Membranproteine, die nach ihrer Fähigkeit benannt wurden, nicht-spezifische Löcher in der Zellmembran zu bilden [Young, 1992]. Die Gruppe der Holine ist sehr divers und umfasst eine Vielzahl an funktionellen Homologen, die sich in mehr als 30 orthologe Untergruppen einteilen lassen [Wang *et al.*, 2000]. Sie besitzen alle eine stark hydrophobe und geladene C-terminale Domäne und werden anhand ihrer Größe und der Anzahl an Transmembrandomänen in drei Gruppen eingeteilt [Young & Bläsi, 1995]. Die Klasse I-Holine besitzen drei  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen und sind zwischen 95 und 130 Aminosäurereste groß. Zu dieser Gruppe gehört beispielsweise das Holin S105 des  $\lambda$ -Phagen. Zur Klasse II zählen Holine, die zwei  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen ausbilden und die mit einer maximalen Größe zwischen 65 und 95 Aminosäureresten kleiner sind. Ein gut untersuchtes Beispiel für diese Klasse ist das S21-Holin des lambdoiden Phagen 21. Das Holin des Phagen T4 kann keiner der beiden genannten Klassen zugeordnet werden und bildet somit eine eigene, die Klasse III [Ramanculov & Young, 2001b]. Es weist nur eine Transmembrandomäne auf und verfügt über einen sehr großen in das Periplasma gerichteten C-Terminus [Tran *et al.*, 2005]. Die Holine der Klassen I und II besitzen einen C-Terminus, der in das Zytoplasma reicht. Während sich der N-Terminus der Klasse I-Holine im Periplasma befindet, liegt der N-Terminus der Klasse II-Holine im Zytoplasma [Gründling *et al.*, 2000a]. Die Transmembrandomänen interagieren miteinander, sowohl intra- als auch intermolekular, und die Entstehung von Holin-Aggregaten führt zur Bildung der Poren durch die Zytoplasmamembran [White *et al.*, 20011]. Bei manchen Phagen, z. B. dem Phagen  $\lambda$  oder dem Phagen 21, ist das sogenannte Antiholin für die Festlegung des Zeitpunkts der Lyse verantwortlich. Das Antiholin ist ein nahezu identisches Homolog zum Holin und resultiert in den meisten Fällen aus derselben Gensequenz wie das Holin lediglich mit einem oder zwei zusätzlichen Codons vor dem Start-Codon [Bläsi *et al.*, 1990; Bonovich & Young, 1991]. Bei dem T4-Phagen wird das Antiholin von einem separaten Gen kodiert [Ramanculov & Young, 2001a]. Die zusätzlichen Codons resultieren in positiv geladenen Aminosäuren, die die erste Transmembrandomäne des Proteins blockieren. Die Antiholine unterdrücken die Holin-Aggregation durch Bildung von Holin-Antiholin-Heterodimeren [Gründling *et al.*, 2000b]. Kommt es zu Depolarisierung der Membran, ändert sich die Konformation der Antiholine hin zu funktionalen Holin-Proteinen, und die Anzahl an Löchern in der Membran erhöht sich schlagartig [Park *et al.*, 2006].

Eine weitere Unterscheidung innerhalb der Holine erfolgt entsprechend ihrer Funktionalität. Wie bei den Endolysinen werden auch bei den Holinen zwei Subtypen unterschieden, die sich jeweils durch eine etwas andere Wirkungsweise auszeichnen. Während das kanonische Holin vereinzelt Löcher formt, durch die das (meist aktive) Endolysin die Zellmembran passieren kann [Wilson, 1982],

entstehen durch das sogenannte Pinholin eine Vielzahl kleiner Löcher. Diese sind nicht groß genug, um Proteine durchzulassen, verursachen jedoch eine Erniedrigung des Membranpotentials [Park *et al.*, 2007]. Das Pinholin kommt nur in Kombination mit dem SAR Endolysin vor. Da auch die durch das kanonische Holin verursachten Löcher zur Depolarisierung der Membran führen, ist eine Kombination mit beiden Endolysin-Subtypen möglich [Young, 20014]. Beide Holin-Typen haben gemeinsam, dass die einzelnen Proteine zunächst harmlos und frei beweglich in der Zellmembran akkumulieren. Wird eine kritische Konzentration überschritten, bilden sich sogenannte Holinflöße, große zweidimensionale Proteinaggregate. Dabei wechselwirken die Transmembrandomänen der Holine miteinander und es entstehen Löcher [White *et al.*, 2011].

Erst seit 2008 ist bekannt, dass neben der Permeabilisierung der Zellmembran durch das Holin und dem Abbau des Peptidoglykans durch das Endolysin weitere Faktoren an der vollständigen Lyse der Zellen beteiligt ist. Die Durchlässigkeit der äußeren Membran wird durch die als Spanine bezeichneten Proteine Rz und Rz1 katalysiert [Berry *et al.*, 2008; Berry *et al.*, 2012]. Aktuell wird davon ausgegangen, dass die Spanine zu einer Fusion der inneren und der äußeren Membran führen, indem sie einen Komplex bilden, der sich über das gesamte Periplasma spannt [Rajaure *et al.*, 2015]. Es gibt Spanine, die sich aus zwei Komponenten zusammensetzen: Das o-Spanin ist ein kleines Lipoprotein, das in der äußeren Membran lokalisiert ist, und das i-Spanin ist ein integrales Membranprotein. Die sogenannten u-Spanine sind Proteine, die sowohl ein N-terminales Lipoprotein-Signal für die äußere Membran als auch eine C-terminale Transmembrandomäne besitzen [Summer *et al.*, 2007].

Die genannten Lysegene sind meist in sogenannten Lysekassetten angeordnet, die mit dem Gen für das Holin beginnen, nachfolgend von den Genen für das Endolysin und den Spaninen [Young, 1992]. Dabei können die Spanin-Gene überlappend kodiert sein, ein Gen in das zweite eingebettet sein oder beide als getrennte Gene vorliegen [Summer *et al.*, 2007].

### 1.3.2 Adaption von Holin/Endolysin durch Bakterien

Seit ihrer Entdeckung galten die Holine und Endolysine als von Bakteriophagen und Prophagen kodierte Proteine, die dazu dienen, die Zielzellen zu lysieren und damit die Freisetzung neuer Phagenpartikel zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurden die Gene Holin- und/oder Endolysin-artiger Proteine auch in den Genomen Phagen-freier Bakterien gefunden. Die aus diesen Genen resultierenden Proteine sind in verschiedenste physiologische Prozesse involviert. Beispielsweise sind sie Bestandteil der chromosomal kodierten Vehikel zum horizontalen Gentransfer (*gene transfer agents*, GTA) bei Bakterien wie *Rhodobacter capsulatus* [Lang & Beatty, 2001] oder *Brachyspira hyodysenteriae* [Matson *et al.*, 2005]. Die GTA werden vom Donor gebildet und sehen aus wie Phagen mit kurzem Schwanz. Da ihnen für die normale virale Funktionsweise essenzielle Gene fehlen, dienen sie ausschließlich dem Gentransfer [Lang & Beatty, 2001].

Bei *Staphylococcus aureus* führt das Holin-artige Protein CidA durch Permeabilisierung der Zellmembran zur Lyse. Mithilfe des Antiholin-ähnlichen Proteins LrgA und zweier Regulatoren wird in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen und Nährstoffangebot in einer kleinen Subpopulation der programmierte Zelltod ausgelöst. Dabei wird DNA freigesetzt (eDNA), die der Bildung eines Biofilms dient [Rice *et al.*, 2007]. Homologe zu diesen Proteinen gibt es bei den Bakterien *B. subtilis* und *Streptococcus mutans*, bei denen sie jedoch nicht mit Zelllyse assoziiert sind. In diesen Spezies sind die Holin-artigen Proteine an der Aufnahme von extrazellulärem Pyruvat beteiligt und beeinflussen somit indirekt zelluläre Prozesse wie Antibiotikaresistenz, Autolyse, Biofilmbildung und die Reaktion auf oxidativen Stress sowie auf Hitzestress [Ahn *et al.*, 2010; Charbonnier *et al.*, 2017; van den Esker *et al.*, 2017; Ahn *et al.*, 2019].

In der Spezies *B. subtilis* gibt es ein weiteres Holin-artiges Protein, YwcE, welches für die korrekte Bildung von Sporen wichtig zu sein scheint. Die Expression des Gens *ywcE* wird während des vegetativen Zellwachstums von dem Repressor AbrB reprimiert und zu Beginn der Sporenceimung aktiviert. Mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) gekoppelte YwcE-Proteine wurden sowohl in der Zellmembran als auch der Sporenceimungsmembran nachgewiesen. Außerdem akkumuliert in den Sporen der *ywcE*-Deletionsmutante weniger Dipicolinsäure als in Wildtyp-Sporen, die eine veränderte äußere Sporenhülle zeigen [Real *et al.*, 2005].

Neben den bereits genannten Funktionen der phagenverwandten Proteine in Bakterienzellen spielen diese darüber hinaus eine Rolle bei der Sekretion von Proteinen und führen auch dabei nicht zwingend zur Lyse der exprimierenden Zellen. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel hierfür ist *Serratia marcescens* DB10 [Hamilton *et al.*, 2014]. Dieser Stamm besitzt ein aus vier Genen bestehendes Operon *chiWXYZ*. Die resultierenden Produkte, die sich für die Sekretion der chitinolytischen Proteine verantwortlich zeigen, ähneln denen der Lysekassette des Phagen Lambda. Das Protein ChiW, das etwa 32% Sequenzübereinstimmung mit dem Lambda Holin besitzt, und die Peptidoglykan-Hydrolase ChiX, bei der es sich um eine Zink-Protease mit L-Ala D-Glu Endopeptidase-Aktivität handelt [Owen *et al.*, 2018], sind essenziell für die Chitinase-Sekretion, während die beiden Spanin-Homologe ChiY und ChiZ unter Laborbedingungen entbehrlich sind [Hamilton *et al.*, 2014]. Die Expression des Operons ist ebenso wie die Expression der Chitinase-Gene bistabil und beides findet, durch den LysR-ähnlichen Regulator ChiR induziert, in einer kleinen Subpopulation der Zellen statt. Mittels Einzelzellmikroskopie wurde gezeigt, dass sich die Chitinase-exprimierenden Zellen normal teilen und nicht lysieren [Hamilton *et al.*, 2014].

Für die Sekretion des Typhus-Toxins von *S. enterica* serovar Typhi ist ebenfalls ein phagenverwandtes Protein essenziell. Die Muramidase Ttsa, welche zusammen mit den Genen für das Toxin in einer Pathogenitätsinsel kodiert wird [Hodak & Galán, 2013]. Die Komponenten des AB<sub>5</sub>-Toxins PltA, PltB und CdtB besitzen N-terminale Sec-Signalsequenzen und werden somit ins Periplasma transportiert,

wo die Assemblierung des Toxins erfolgt [Song *et al.* 2013]. Für den weiteren Export des Toxins ist die enzymatische Aktivität von TtsA notwendig, welches selbst kein Signalpeptid für einen Transport ins Periplasma aufweist. Auch wenn mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden konnte, dass der Export des assemblierten Toxins ohne eine Lyse der Zellen erfolgt, ist TtsA unter bestimmten Bedingungen in Lage eine Zelllyse zu verursachen. Zum einen lysierten die Zellen, wenn *ttsA* überexprimiert und eine geringe Menge Chloroform zugegeben wurde [Hodak & Galán, 2013]. Die Chloroform-Zugabe ist ein typischer Assay für den Nachweis einer Murein-abbauenden Aktivität. Dabei destabilisiert Chloroform die innere Membran und das putative Endolysin gelangt ins Periplasma und damit in die unmittelbare Nähe seines Substrates [Young, 1992]. Zum anderen führte auch die Co-Expression eines *Salmonella*-Holins, welches an einer anderen Stelle im Genom kodiert ist, zur Lyse der Zellen. Da sich in der Pathogenitätsinsel kein Gen für ein Holin befindet, gehen die Autoren davon aus, dass ein an einer anderen Stelle im Genom von *S. Typhi* kodiertes Holin für den Transport von TtsA durch die Zytoplasmamembran notwendig ist [Hodak & Galán, 2013].

Bei dem Durchfallerreger *Clostridioides difficile* liegt zwischen den beiden Genen für die Hauptvirulenzfaktoren, den Toxinen TcdB und TcdA, das Protein TcdE, welches zur Proteinfamilie der Holine gehört. Zusammen mit den Genen für den Sigmafaktor TcdR und den anti-Sigmafaktor TcdC wird der Genlocus als Pathogenitätslocus (PaLoc) bezeichnet [Hammond & Johnson, 1995]. Für das Protein TcdE wird eine Beteiligung bei der Toxinsekretion postuliert [Govind & Dupuy, 2012], die jedoch abhängig vom Stamm und der Toxinmenge ist. GOVIND & DUPUY zeigten für den Stamm R20291, dass die Toxinfreisetzung direkt von TcdE abhängig ist und ohne eine Lyse der Zellen erfolgt [Govind & Dupuy, 2012]. Im Gegensatz dazu ermittelten OLLING *et al.* in ihren Untersuchungen mit dem *C. difficile* Stamm 630 eine von TcdE unabhängige Freisetzung der Toxine TcdA und TcdB, die durch Autolyse in der stationären Phase erfolgt [Olling *et al.*, 2012]. Des Weiteren gibt es von dem Protein TcdE drei Isoformen, nämlich das Holin, ein Antiholin und die am N-Terminus verlängerte Isoform TcdE-M1 [Govind & Dupuy, 2012]. In nachfolgenden Betrachtungen stellten sich alle drei Isoformen als potenziell lytisch für *C. difficile* heraus, wenn deren Expression stark induziert wurde [Govind *et al.*, 2015]. Während die Autoren eine native Produktion von TcdE-M1 nicht nachweisen konnten, da sie wahrscheinlich unter dem Detektionslevel liegt, führten bereits geringe Mengen des Proteins zu vermehrtem Zelltod. Ebenso zeigten GOVIND *et al.*, dass nur ein Zusammenspiel der drei Isoformen eine effiziente Toxinfreisetzung ohne Zelllyse ermöglicht. Diese Annahme wird von der Erkenntnis einer weiteren Studie unterstützt, dass bei der Expression in *E. coli* die Isoform TcdE-M1 inhibitorisch auf die Zelllyse wirkt, auch wenn die kleineren Isoformen reichlich vorhanden sind [Mehner-Breitfeld *et al.*, 2018]. Während GOVIND *et al.* postulieren, dass die Form der Toxinfreisetzung abhängig vom untersuchten Stamm und der produzierten Toxinmenge ist, thematisiert eine neuere Untersuchung die Medienzusammensetzung und genauer die Anwesenheit von Glukose. Ist Glukose im Medium

vorhanden, erfolgt die Toxinfreisetzung während der stationären Phase vermittelt durch Bakteriolyse, welche durch eine Peptidoglykan-abbauende Transglykosylase hervorgerufen wird. Fehlt die Glukose, erhöht sich die Toxinproduktion und es ist bereits in der exponentiellen Wachstumsphase eine signifikante Menge an extrazellulärem Toxin nachweisbar. Dass diese hier durch die Aktivität von TcdE verursacht wurde, bleibt lediglich eine Vermutung der Autoren [Wydau-Dematteis *et al.*, 2018]. Zusätzlich befindet sich innerhalb des PaLoc ein Überbleibsel eines Endolysin-Gens, *tcdL* benannt, welches zwar keine hydrolytische Domäne aufweist, aber mit dem Toxin TcdB interagiert [Mehner-Breitfeld *et al.*, 2018].

Die beschriebenen Beispiele zeigen eine nicht-lytische Sekretion von Proteinen abhängig von der Anwesenheit der phagenverwandten Proteine [Owen *et al.*, 2018]. Der genaue Mechanismus, der dieser Form der Proteinfreisetzung zugrunde liegt, ist jedoch noch ungeklärt.

#### 1.4 *Galleria mellonella*-Larven als Modellorganismus

Die Große Wachsmotte, *Galleria mellonella*, ist ein nachtaktiver Kleinschmetterling aus der Familie der *Pylalidae* (Zünsler) und gehört innerhalb dieser zu der Unterfamilie der *Galleriinae* (Wachsmotten). *G. mellonella* ist vornehmlich in der Nähe von Bienenstöcken zu finden, in welchen sie ihre Eier in bis zu 200 Stück umfassenden Eipaketen ablegen. Die Brut ernährt sich von Pollen, Larven- bzw. Puppenhäuten der Honigbienen und dem Bienenwachs der Waben. Die Große Wachsmotte gilt als Schädling, da die Larven auf der Suche nach Nahrung die Bienenwaben zerstören und dabei Krankheitserreger in den Bienenstock einschleppen können. Sie ist ein holometaboles Insekt und durchläuft während ihrer Entwicklung zum adulten Tier die vier Stadien Ei, Larve, Puppe und Adult. Die Larven werden etwa 25-30 mm groß, bevor sie sich verpuppen. Sie sind cremeweiß gefärbt und besitzen sechs Beine am Thorax sowie weitere Beinpaare am Abdomen. Das Larvenstadium kann zwischen 28 Tagen und sechs Monaten lang sein. Während dieser Zeit durchlaufen die Tiere 8-10 Häutungsphasen. Im Verlauf des ein bis neun Wochen dauernden Puppenstadiums sind die Tiere unbeweglich, fressen nicht und verbleiben innerhalb des Kokons. Aus diesem schlüpft anschließend ein gräulich gefärbter Falter [Kwadha *et al.*, 2017].

Da das angeborene Immunsystem von Vertebraten eine sehr hohe Ähnlichkeit zu dem der Invertebraten aufweist [Salzet, 2001], werden Tiere wie *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* oder *G. mellonella* als Modellorganismen für die Untersuchung zur Pathogenität von Mikroorganismen und die resultierende Immunantwort herangezogen [McGhee, 2007; Panayidou *et al.*, 2014; Kavanagh & Reeves, 2004]. Mithilfe der Larven von *G. mellonella* wurden bereits die Pathogenität von *Proteus mirabilis* [Morton *et al.*, 1987], *E. coli* und *B. cereus* beurteilt [Walters & Ratcliffe, 1983]. Ebenso wurde die Virulenz verschiedener *S. pneumoniae* Serotypen untersucht und in

eine Korrelation mit der An- und Abwesenheit bekannter Virulenzgene gebracht [Evans & Rozen, 2012]. Untersuchungen zur Virulenz von *P. aeruginosa* zeigten eine gute Vergleichbarkeit von Versuchen mit *G. mellonella*-Larven und mit Mäusen [Jander *et al.*, 2000]. Unter Verwendung des *Galleria*-Modells konnte als Hauptvirulenzfaktor einer Infektion mit *Enterococcus faecalis* die extrazelluläre Gelatinase GelE identifiziert werden. GelE wurde als hitzelabiles proteolytisches Enzym charakterisiert, welches das induzierbare antimikrobielle Peptid Gm Cecropin abbaut. Des Weiteren ist es in der Lage, den humanen Komplementfaktor C3a zu spalten und somit eine Abnahme der bakteriziden und hämolytischen Aktivität menschlichen Serums zu verursachen [Park *et al.*, 2007]. Mithilfe des *luxABCDE*-Operon, das auf einem Plasmid in die Bakterien eingebracht wird, kann das Wachstum von *E. faecalis* innerhalb der Gallerien verfolgt sowie deren Genexpression untersucht werden [La Rosa *et al.*, 2012; La Rosa *et al.*, 2013]. Auch bei der Erforschung der Virulenz von Listerien sind die Wachsmottenlarven ein wichtiger Modellorganismus. Zum einen ist es möglich, die pathogene Spezies *Listeria monocytogenes* von den apathogenen Spezies zu unterscheiden, wenn die Tiere mit einer Dosis von  $10^6$  kolonieformenden Einheiten infiziert wurden. Zum anderen wurde bereits eine Vielzahl an Deletionsmutanten in diesem Modell getestet und die Ergebnisse zeigten ebenfalls eine gute Korrelation mit den vorher im Mausmodell erfassten Daten. Außerdem ist die einer Infektion folgende Wirtsantwort gut untersucht. Diese zeichnet sich durch die vermehrte Produktion von Lysozym, der Defensine Galiomyzin und Gallerimylin sowie dem Insekt-Metalloprotease-Inhibitor aus [Mukherjee *et al.*, 2010]. Zusätzlich kommt es zur Aktivierung des Phenol-Oxidase-Systems und zu der Zerstörung von Hämocyten [Joyce & Gahan, 2010]. Auffällig ist zudem die Bildung von Knoten an der Oberfläche des Gehirns, welche eingeschlossene Bakterien enthalten. Diese Strukturen sind ähnlich zu denen, die am menschlichen Gehirn in Folge einer Infektion mit *L. monocytogenes* auftreten können [Mukherjee *et al.*, 2013].

Zusammenfassend stellen die *Galleria*-Larven eine gute Möglichkeit dar, die Expression bakterieller Virulenzfaktoren in der Hämolymphe zu untersuchen und die Ergebnisse analog zum Vertebratenwirt zu betrachten [Junqueira, 2012]. Neben ihrer Rolle in der Erforschung humanpathogener Erreger sind die Larven ebenfalls Gegenstand von Studien zu Organismen mit insektizider Aktivität wie *P. luminescens*, *X. nematophila* oder verschiedener *Yersinia*-Spezies [Münch *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2017; Fuchs *et al.*, 2008]. Darüber hinaus wurde kürzlich begonnen, die Wachsmottenlarven zu nutzen, um antimikrobielle Substanzen zu testen. Die Tiere dienen der Vorauswahl von effektiven Wirkstoffen und helfen die Anzahl an Versuchen mit Säugetieren zu minimieren. Dabei werden z.B. Kombinationen von Antibiotika getestet oder eine Effizienzsteigerung durch Gabe mehrerer Dosen untersucht. Für den Vancomycin-sensitiven *E. faecalis* und den Vancomycin-resistenten *E. faecium* zeigte sich die Kombination von Gentamycin und Daptomycin signifikant effektiver als jedes der Antibiotika allein verabreicht [Luther *et al.*, 2014]. Gegen den multiresistenten *P. aeruginosa*-Stamm NCTC13437 waren

die Kombinationen von Cefotaxim und Piperacillin sowie von Piperacillin, Amikacin und Meropenem sehr gut wirksam. Die Autoren der Studie erhöhten die Effizienz weiter, indem sie die Antibiotika in drei Dosen je zwei, fünf und acht Stunden nach der Infektion applizierten [Krezdorn *et al.*, 2014]. Neben Antibiotika werden auch andere Substanzen wie Hamamelitannin und Baicalin, beide reduzieren die Aktivität von Biofilmen, Zimtaldehyd [Brackman *et al.*, 2011], Tamoxifen [Jacobs *et al.*, 2013] oder Metallionen wie Zink oder Silber [Coughlan *et al.*, 2010] auf ihre lebensverlängernde Wirkung für die Gallerien getestet.

Die *G. mellonella* Larven sind preisgünstig und einfach zu handhaben, da sie vergleichsweise groß sind und keine spezielle Ausrüstung zur Haltung der Tiere nötig ist. Für Infektionsstudien können die Tiere bei Temperaturen zwischen 15°C und 37°C gehalten werden. Die Infektion der Tiere erfolgt in den meisten Fällen über eine Inokulation der zu untersuchenden Pathogene ins Hämocoel. Dazu wird eine Bakteriensuspension mit einer sterilen Injektionsspritze in den letzten linken Abdominalfuß injiziert. Eine orale Infektion der Tiere ist möglich, aber weniger gebräuchlich [Ramarao *et al.*, 2012]. Als Resultat einer erfolgreichen Infektion beginnen die Tiere in der Regel sich zu verfärben. Beginnend mit vereinzelten dunklen Flecken schreitet die Verfärbung mit jedem weiteren Tag fort, bis die Tiere komplett schwarz sind und sterben. Diese Verfärbung wird durch eine Melanisierung der Larven verursacht. Im Zuge der Erregerabwehr produzieren die Larven Melanin, welches dazu dient, diese am Ort der Infektion einzuhüllen. Dadurch kommt es zu Koagulation der Hämolymphe und zur Opsonisierung, einer Form der Immunantwort, bei der die Bakterien mit Antikörpern und Faktoren des Komplementsystems bedeckt werden. Zur Beurteilung der bakteriellen Virulenz wird in erster Linie die Überlebensrate der Larven für einen bestimmten Zeitraum nach der Infektion beobachtet. Werden verschiedenen Dosen inokuliert, kann die toxische Dosis (TD<sub>50</sub>) berechnet werden. Des Weiteren kann untersucht werden, wie gut sich die Bakterien innerhalb der Tiere vermehren oder wie stark die Produktion von antimikrobiellen Proteinen während der Infektion ist [Tsai *et al.*, 2016].

## 1.5 Ziel der Arbeit und angewandte Methodik

### **Teil 1: Die Charakterisierung der Lysekassette der Tc-PAI<sub>Ye</sub>**

Die Expression der *tc*-Gene der insektiziden Pathogenitätsinsel Tc-PAI<sub>Ye</sub> von *Y. enterocolitica* W22703 ist ein gut untersuchtes Beispiel für die Aktivierung von Virulenzfaktoren bei moderaten Temperaturen. Die Bakterien sind nur letal für Insekten und Nematoden, wenn sie bei Temperaturen zwischen 10-20°C angezogen wurden [Bresolin *et al.*, 2006]. Mithilfe von Promotorfusionsstudien und Proteinstabilitätsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Genaktivität bei 15°C durch den positiv autoregulierten Transkriptionsfaktor TcaR2 sowie die Inhibition desselben bei 37°C durch den YmoA/H-NS-Komplex erfolgt [Starke *et al.*, 2013; Starke & Fuchs, 2014]. Experimente mit dem Fadenwurm *C. elegans* bestätigten, dass für die nematozide Aktivität das Vorhandensein des Gens *tcaA* erforderlich ist. Ist das Gen deletiert, ist diese Aktivität nahezu aufgehoben [Spanier *et al.*, 2010]. STARKE konnte einen solchen Phänotyp ebenfalls durch die Deletion der Gene, die für Holin und Endolysin kodieren, hervorrufen [Starke, 2015]. Somit spielen die innerhalb der Tc-PAI<sub>Ye</sub> vorhandenen Lysegene eine Rolle für die Pathogenität der Bakterien, möglicherweise durch eine Beteiligung an der Freisetzung der Tc-Proteine.

Das Ziel der Arbeit war daher die Charakterisierung der phagenverwandten Lysekassette mittels molekularbiologischer und proteinbiochemischer Methoden. Nach erfolgter bioinformatischer Analyse der phagenverwandten Gene durch STARKE und REUTER [Starke, 2015; Reuter, 2008] sollte zunächst geklärt werden, ob die vier Gene polycistronisch transkribiert werden und damit einen gemeinsamen Promotor besitzen. Anschließend sollten die Aktivität und Spezifität der phagenverwandten Proteine untersucht werden. Um die Ergebnisse der Versuche zur Aktivität der Lysekassette mit den Beobachtungen zur Toxingenexpression und -funktionalität in einen Zusammenhang bringen zu können, wurden ebenfalls die beiden Temperaturen 15°C und 37°C verglichen. Zur Feststellung der Funktionalität des Holins sollte dessen lytische Kompetenz im Zusammenspiel mit dem Endolysin des Lambda-Phagen getestet werden.

Die Regulation der Lysekassette sollte anschließend auf Proteinebene untersucht werden. Dazu sollten Deletionsmutanten für die Proteasen Lon und ClpP erstellt und diese dann für die Analyse der Aktivität sowie der Stabilität der Phagenproteine verwendet werden.

Die genauere Betrachtung der phagenverwandten Gene und deren Regulation auf Proteinebene sollte die Hypothese prüfen, dass die Lysegene bei der Freisetzung des insektiziden Toxin-Komplexes beteiligt sind.



Zur Untersuchung der genannten Punkte wurden die folgenden Methoden, die in den eingebundenen Publikationen genauer beschrieben sind, verwendet:

- Mittels Reverser Transkriptions-PCR (RT-PCR) Untersuchung, ob die vier Lysegene eine Transkriptionseinheit bilden.
- Überexpressionsversuche mit induzierbaren Vektoren bei den beiden Temperaturen 15°C und 37°C zur Analyse der Funktionalität der phagenverwandten Proteine. Zur Einschätzung der Spezifität der Proteine wurden verschiedene Isolate der *Y. enterocolitica* Biovare, *Yersinia* spp., *E. coli*, *S. enterica* Serovar Typhimurium und *P. luminescens* verwendet.
- Nachweis der erfolgreichen Überexpression der Lysegene mittels quantitativer Echtzeit-PCR für ausgewählte Isolate.
- Komplementation des defekten Holingens eines lysogenen  $\lambda$ -Phagen im Genom von *E. coli* als Funktionalitätsnachweis für das Holin von *Y. enterocolitica* W22703.
- Erstellen von Deletionsmutanten für die Gene *lon* und *clpP* sowie des Plasmids zur Komplementation der *lon*-Deletion, Verwendung der Mutanten für Überexpressionsversuche bei den Temperaturen 15°C und 37°C.
- Vergleich der Proteinstabilität des Endolysins mittels Western Blot im Wildtyp-Stamm und dem *lon*-defizienten Stamm bei 15°C und 37°C.

## Teil 2: Insektizide Toxizität von *Y. frederiksenii*

Die Gene der insektiziden Pathogenitätsinsel Tc-PAI<sub>Ye</sub>, deren Aufbau hochkonserviert ist, sind innerhalb der *Yersinia* spp. weit verbreitet. Neben den *Y. enterocolitica* Biovaren 2-5 sind die *tc*-Gene auch im Genom von *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. mollaretii* zu finden. Die *Y. enterocolitica*-Stämme, die zu den Biovaren 1A und 1B gehören, mit der Ausnahme des Stammes T83, tragen die Gene nicht, ebenso die Spezies *Y. intermedia*, *Y. bercovieri* und *Y. ruckeri*. In Infektionsversuchen waren auch solche Stämme, die keine *tc*-Gene besitzen, toxisch für *G. mellonella* Larven bei Injektion ins Hämocoel. Somit ist anzunehmen, dass es weitere insektizide Faktoren gibt, die bisher noch nicht bekannt sind [Fuchs *et al.*, 2008].

Auch für den Organismus *P. luminescens* sind neben den Toxinkomplexen Tca, Tcb, Tcc und Tcd weitere insektizid wirkende Faktoren beschrieben, beispielsweise die MCF (*makes caterpillars floppy*)-Toxine [Daborn *et al.*, 2002], die Pir-Toxine [Waterfield *et al.*, 2005], die Protease PrtA [Bishop, 2014], Txp40 [Brown *et al.*, 2006] oder die XaxAB-ähnlichen binären Toxine [Zhang *et al.*, 2014].

Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Interaktion von Yersinien mit Invertebraten zur Evolution der humanpathogenen Spezies beigetragen hat [Waterfield *et al.*, 2004]. Um diese

evolutionären Prozesse besser verstehen zu können, wird auch die Interaktion von Umweltisolaten mit bspw. Insekten untersucht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte anhand von Infektionsversuchen mit *G. mellonella*-Larven die insektizide Aktivität von *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* und dem humanpathogenen *Y. enterocolitica* 8081 mit der Aktivität von *Y. enterocolitica* W22703 und *P. luminescens* verglichen werden. Anhand von Genomvergleichen von *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* und dem Stamm W22703 wurden Gene identifiziert, die W22703 nicht besitzt und die zur Pathogenität der beiden in der Umwelt vorkommenden Spezies beitragen könnten. Aus dieser Liste an Genen wurde ein potenzieller Virulenzfaktor ausgewählt und das entsprechende Gen in *Y. frederiksenii* deletiert. Die resultierende Deletionsmutante sollte anschließend in weiteren Infektionsversuchen auf eine Reduktion der Pathogenität getestet werden.

Die Identifikation neuer Virulenzfaktoren, die von als apathogen eingestuft und in der Umwelt vorkommenden *Yersinia* spp. produziert werden, kann zu einem besseren Verständnis der Überlebensstrategien dieser Spezies sowie der Evolution von Krankheitserregern beitragen.

Zur Untersuchung der genannten Punkte wurden die folgenden Methoden und Versuchsbedingungen, wie in den eingebundenen Publikationen beschrieben, verwendet:

- Infektion von *G. mellonella*-Larven mit einer Auswahl an Isolaten mittels Injektion der zu untersuchenden Bakterien direkt ins Hämocoel. Beobachtung der Überlebensrate der bei 15°C inkubierten Tiere über einen definierten Zeitraum von mindestens fünf Tagen, dabei Vergleich verschiedener Infektionsdosen.
- Infektionsversuche mit dem *Y. frederiksenii* Wildtyp-Stamm, der *yacT*-Deletionsmutante sowie der Komplementante, Vergleich der Infektionstemperaturen 15°C und 30°C.
- Untersuchung der Vermehrung der Bakterien innerhalb der Larven durch Bestimmung der Zellzahlen nach Isolation aus infizierten Tieren über einen Zeitraum von fünf Tagen bei einer Inkubationstemperatur von 15°C.
- Klonierung des Gens *yacT* in das Überexpressionsplasmid pBAD-HisA(tet) und Aufreinigung von YacT aus *E. coli* BL21. Injektion von YacT in die Larven.

## 2 Ergebnisse

### Teil 1: Die Charakterisierung der Lysekassette der Tc-PAI<sub>ye</sub>

Die Ergebnisse zum ersten Teil dieser Dissertation, der sich mit der Charakterisierung der Lysekassette befasste, wurden in den beiden im Folgenden eingebundenen Publikation veröffentlicht. Dabei erfolgten die persönlichen Beiträge der Co-Autoren wie beschrieben.

#### Publikation 1:

Springer, K., Reuter, S., Knüpfer, M., Schmauder, L., Sanger P. A., Felsl, A. und Fuchs T. M. (2018). Activity of a holin-endolysin system in the insecticidal pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology*. 200(16): e00180-18.

#### Beiträge:

K. Springer analysierte die Transkriptionsorganisation der Lysekassette und führte sämtliche Uberexpressionsversuche, die Zellzahlbestimmung, die qRT-Analysen, sowie die Charakterisierung des Phagen-Holins durch. Zusätzlich untersuchte K. Springer die Auswirkungen der Deletion des *araA*-Gens. S. Reuter erstellte die BLAST-Analysen und klonierte die Plasmide zur Überexpression von Holin und Endolysin mit und ohne Spanine. Die Versuche zur Endolysin-Enzymaktivität und -Spezifität wurden von M. Knüpfer durchgeführt. S. Schmauder assistierte bei der Durchführung der Uberexpressionsversuche, und P. A. Sanger unterstützte bei der Revision der Publikation. A. Felsl assistierte im Labor.

#### Publikation 2:

Springer, K., Sanger, P. A., Felsl, A. und Fuchs, T. M. (2021). Lon protease- and temperature-dependent activity of a lysis cassette located in the insecticidal island of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology*. 203(5): e00616-20.

#### Beiträge:

K. Springer führte die Uberexpressionsversuche mit sämtlichen untersuchten Stämmen durch, erstellte die verwendeten Mutanten und untersuchte die Stabilität des Endolysins. P. A. Sanger unterstützte den Revisionsprozess und untersuchte die Stabilität der Protease Lon. A. Felsl war bei Versuchsdurchführungen behilflich.

**Teil 2: Insektizide Toxizität von *Y. frederiksenii***

Die Ergebnisse zum zweiten Teil dieser Dissertation, zur insektiziden Toxizität von *Y. frederiksenii*, wurden in der im Folgenden eingebundenen Publikation veröffentlicht. Die persönlichen Beiträge der Co-Autoren erfolgten wie beschrieben.

**Publikation 3:**

Springer, K., Sanger, P. A., Moritz, C., Felsl, A., Rattei, T. und Fuchs, T. M. (2018). Insecticidal toxicity of *Yersinia frederiksenii* involves the novel enterotoxin YacT. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8:392.

**Beiträge**

K. Springer führte die Infektionsversuche zur Dosis-abhängigen Toxizität der verschiedenen *Yersinia* Isolate im Vergleich mit *P. luminescens* und *E. coli* sowie die Infektionsversuche zum Vergleich von *Y. frederiksenii* Wildtyp-Stamm mit der Deletionsmutante und dem Stamm, der das Plasmid zur Komplementation trägt, durch. Ebenfalls durch K. Springer erfolgte die Isolation der Bakterien aus den infizierten Larven sowie die Klonierung des Uberexpressionsplasmids mit anschließender Aufreinigung von YacT. P. A. Sanger unterstützte den Revisionsprozess und untersuchte den Einfluss von YacT auf die Hämozyten. C. Moritz führte die Infektionsversuche zum Vergleich der Tiermodelle *M. sexta* und *G. mellonella*, zum zeitlichen Verlauf der Infektionen mit *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii* sowie zur temperaturabhängigen Pathogenität der verschiedenen *Yersinia*-Stämme durch. A. Felsl leistete technische Assistenz. T. Rattei verglich die Genome von *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii* mit dem von *Y. enterocolitica* W22703.

## 2.1 **Publikation 1:** „Activity of a holin-endolysin system in the insecticidal pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*.“

### **Zusammenfassung**

*Yersinia enterocolitica* ist ein zoonotisches Pathogen, welches bei Menschen eine gastrointestinale Erkrankung hervorrufen kann. Aufgrund seiner insektiziden Aktivität bei niedrigen Temperaturen können sowohl Invertebraten als auch Säugetiere einen Wirtsorganismus für das Bakterium darstellen. Die insektizide Aktivität des Stammes W22703 ist assoziiert mit einer 19 kb großen Pathogenitätsinsel (Tc-PAI<sub>Ye</sub>), welche Regulatoren und die für einen aus drei Untereinheiten bestehenden Toxinkomplex kodierenden Gene enthält. Zusätzlich zu diesen bereits umfangreich untersuchten Genen befinden sich innerhalb der Insel vier phagenverwandte und hochkonservierte Gene mit bisher unbekannter Funktion, welche polycistronisch transkribiert werden. Zwei dieser offenen Leserahmen besitzen eine signifikante Homologie mit Holinen und Endolysinen und zeigten bei Überexpression eine lytische Aktivität gegenüber *E. coli*-Zellen. Bei der Überexpression in einer Vielzahl an *Yersinia*-Stämmen konnte eine hohe Variabilität in der Anfälligkeit für eine Lyse beobachtet werden, wobei einige Stämme gegen die Lyse resistent waren. Kam es zur Lyse der Zellen, war diese stärker ausgeprägt, wenn zwei akzessorische Elemente der Kasette, die für ein i-Spanin und ein o-Spanin kodieren, in dem Überexpressionskonstrukt enthalten waren. Die Fähigkeit des putativen Holins, HoLY, Poren zu formen, wurde durch die Komplementierung eines Lyse-Defekts einer S-Holin-Mutante des Phagen  $\lambda$  demonstriert. In Experimenten, die mit Membranpräparationen durchgeführt wurden, wies ElyY eine hohe Spezifität gegen das Peptidoglykan des Stammes *Y. enterocolitica* W22703 mit einer ähnlichen Spaltungsaktivität wie die von Lysozym auf. Obwohl hier die Funktionalität der Lysekasette aus der Tc-PAI<sub>Ye</sub> in dieser Untersuchung demonstriert wird, bleibt ihre biologische Funktion zu klären.

## Originalpublikation



RESEARCH ARTICLE



## Activity of a Holin-Endolysin System in the Insecticidal Pathogenicity Island of *Yersinia enterocolitica*

Katharina Springer,<sup>a,b</sup> Sandra Reuter,<sup>a,b\*</sup> Mandy Knüpfner,<sup>a,b\*</sup> Lukas Schmauder,<sup>a,b</sup> Philipp-Albert Sanger,<sup>c</sup> Angela Felsl,<sup>a,b</sup> Thilo M. Fuchs<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>ZIEL Institute for Food & Health, Technische Universität München, Munich, Germany

<sup>b</sup>Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Department biowissenschaftliche Grundlagen, Technische Universität München, Munich, Germany

<sup>c</sup>Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Molekulare Pathogenese, Jena, Germany

**ABSTRACT** *Yersinia enterocolitica* is a pathogen that causes gastroenteritis in humans. Because of its low-temperature-dependent insecticidal activity, it can oscillate between invertebrates and mammals as host organisms. The insecticidal activity of strain W22703 is associated with a pathogenicity island of 19 kb (Tc-PAI<sub>ve</sub>), which carries regulators and genes encoding the toxin complex (Tc). The island also harbors four phage-related and highly conserved genes of unknown functions, which are polycistronically transcribed. Two open reading frames showed significant homologies to holins and endolysins and exhibited lytic activity in *Escherichia coli* cells upon overexpression. When a set of *Yersinia* strains was tested in an equivalent manner, highly diverse susceptibilities to lysis were observed, and some strains were resistant to lysis. If cell lysis occurred (as demonstrated by membrane staining), it was more pronounced when two accessory elements of the cassette coding for an i-spanin and an o-spanin were included in the overexpression construct. The pore-forming function of the putative holin, HoLY, was demonstrated by complementation of the lysis defect of a phage λ S holin mutant. In experiments performed with membrane preparations, ElyY exhibited high specificity for W22703 peptidoglycan, with a cleavage activity resembling that of lysozyme. Although the functionality of the lysis cassette from Tc-PAI<sub>ve</sub> was demonstrated in this study, its biological role remains to be elucidated.

**IMPORTANCE** The knowledge of how pathogens survive in the environment is pivotal for our understanding of bacterial virulence. The insecticidal and nematocidal activity of *Yersinia* spp., by which the bacteria gain access to nutrients and thus improve their environmental fitness, is conferred by the toxin complex (Tc) encoded on a highly conserved pathogenicity island termed Tc-PAI<sub>ve</sub>. While the regulators and the toxin subunits of the island had been characterized in some detail, the role of phage-related genes within the island remained to be elucidated. Here, we demonstrate that this cassette encodes a holin, an endolysin, and two spanins that, at least upon overexpression, lyse *Yersinia* strains.

**KEYWORDS** *Yersinia enterocolitica*, dual-lysis cassette, endolysin, pathogenicity islands

*Yersinia enterocolitica* is a foodborne pathogen that is widely spread in aquatic and terrestrial reservoirs as well as in dairy products. It is the major cause of yersiniosis, which is one of the five primary bacterial gastrointestinal diseases in humans (1). The major animal source of pathogenic *Y. enterocolitica* is swine (2). Because *Y. enterocolitica* is a psychrotolerant pathogen, it is of major concern in infection containment. The *Yersinia* genus, belonging to the *Enterobacteriaceae* family, comprises three human

Received 29 March 2018 Accepted 29 May 2018

Accepted manuscript posted online 4 June 2018

**Citation** Springer K, Reuter S, Knüpfner M, Schmauder L, Sanger P-A, Felsl A, Fuchs TM. 2018. Activity of a holin-endolysin system in the insecticidal pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 200:e00180-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00180-18>.

**Editor** Victor J. DiRita, Michigan State University

**Copyright** © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Thilo M. Fuchs, [thilo.fuchs@wzw.tum.de](mailto:thilo.fuchs@wzw.tum.de).

\* Present address: Sandra Reuter, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene, Freiburg, Germany; Mandy Knüpfner, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, Munich, Germany.

pathogens (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica*), and thus far, 14 environmental species considered harmless to humans have been identified, including *Y. ruckeri*, a salmonid pathogen, and *Y. intermedia*, an intermediate between *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*, based on its genetic and phenotypic properties. The species *Y. enterocolitica* comprises six biovars that differ in their biochemical reactions (3). Biovar 1A strains are considered avirulent because they lack *Yersinia* virulence plasmid pYV (4), whereas biovar 1B strains, mainly found in North America, carry a pathogenicity island responsible for iron acquisition that confers high virulence toward humans and mice (5). Biovar 2 to 5 strains, predominately isolated in Europe and Japan, comprise a weakly pathogenic group unable to kill mice (6). Both insecticidal and nematocidal activities were experimentally demonstrated in biovar 2 strain W22703 (7, 8), which demonstrated a multiphasic life cycle of this pathogen that permitted it to oscillate between invertebrates and vertebrates (9–11). A key determinant that enables *Y. enterocolitica* to kill *Caenorhabditis elegans* and insect larvae is the Tc-PAI<sub>ve</sub> pathogenicity island, which encodes the toxin complex (Tc) that was first characterized in *Photobacterium luminescens* and acts on actin and Rho-GTPases through ADP-ribosylation (12). The Tc-PAI<sub>ve</sub> is highly conserved in the genomes of the three pathogenic *Yersinia* species, excluding *Y. enterocolitica* biovars 1A and 1B, as well as in the genomes of *Y. mollaretii* and *Y. similis*, whereas it is absent in the genomes of all other (environmental) *Yersinia* species (13). The expression of the *tc* genes *tcaA*, *tcaB*, *tcaC*, and *tccC* is strictly temperature dependent in *Y. enterocolitica* strain W22703, because they are silenced at 37°C and activated at lower temperatures, with maximal activation at 10°C (8). At low temperatures, the TcaR2 regulator outcompetes its antagonist, the H-NS/YmoA complex, and activates the *tc* genes. At 37°C, *tcaR2* transcription is reduced, TcaR2 is subjected to proteolysis, and the amount of functional YmoA increases, allowing it to interact with DNA-binding protein H-NS and inhibit transcription of the *tc* genes (14, 15).

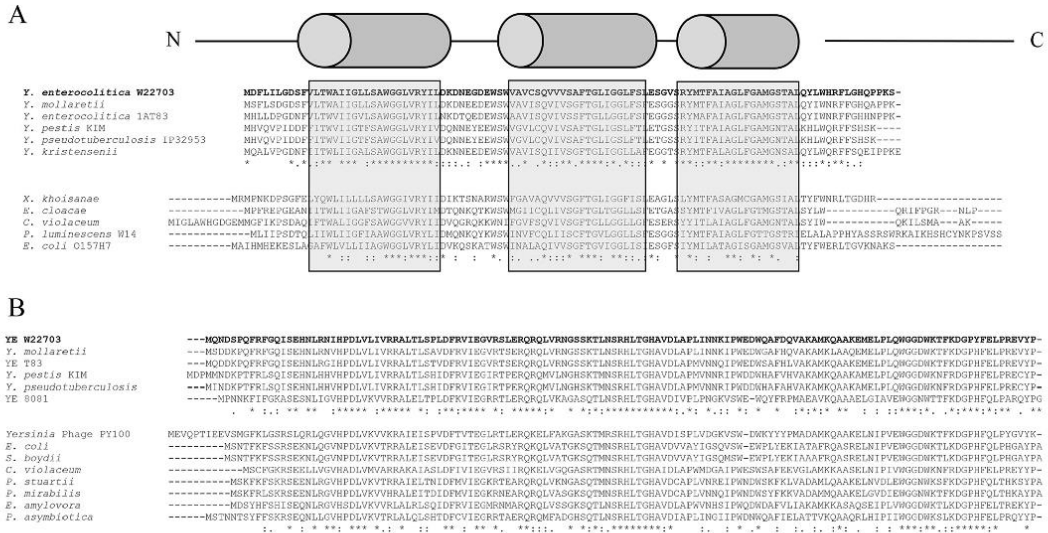
The *tcaA*, *tcaB*, and *tcaC* gene cluster on Tc-PAI<sub>ve</sub> is separated from *tccC* by two small phage-related genes putatively encoding a holin and endolysin (HE) and by two open reading frames (ORFs) of unknown function. This cassette of four ORFs has a total length of approximately 1.3 kb and is conserved in all examples of Tc-PAI<sub>ve</sub> identified to date. The origin of the cassette is unclear, and no other phage-related genes have been detected in the neighborhood of Tc-PAI<sub>ve</sub>. In the chromosome of *Y. pestis* Angola, the cassette is flanked by a transposon, which suggests the acquisition of the phage-related genes by a common ancestor of the pathogenic *Yersinia* strains, possibly as a relic of a prophage.

In this study, we characterized the lysis cassette of Tc-PAI<sub>ve</sub> in detail.

## RESULTS

**Phage-related genes of Tc-PAI<sub>ve</sub> encode a putative lysis cassette.** Four ORFs related to phage genes are located between *tcaC* and *tccC* within the Tc-PAI<sub>ve</sub> insecticidal island of *Y. enterocolitica* strain W22703 (8). These ORFs are proposed to constitute a lysis cassette, as two of the ORFs code for a holin-endolysin (HE) cassette according to the results of homology searches and the prediction of transmembrane helices. The holin, termed HolY, consists of 103 amino acids. The 11.3-kDa protein is predicted to form three transmembrane helices and therefore belongs to the class I holins represented by the λ S protein (16). Its sequence was compared with sequences in databases using protein BLAST (17). Well-conserved homologs (70% to 87% identity) were encoded by genes located on the insecticidal islands of several *Yersinia* species (13). Less closely related homologs (51% to 60% identity) comprised holins present in human and insect pathogens (Fig. 1A). Holin TcdE from *Clostridium difficile* (18), the phage λ holin, and a holin encoded by *Serratia entomophila* plasmid pADAP, which confers insecticidal activity (19), exhibited low or no significant sequence homology to HolY. The putative endolysin of Tc-PAI<sub>ve</sub>, ElyY, comprises 133 amino acids and is predicted to have a modular organization with an N-terminal, enzymatically active domain and a C-terminal cell wall-binding domain (CBD). The most closely related





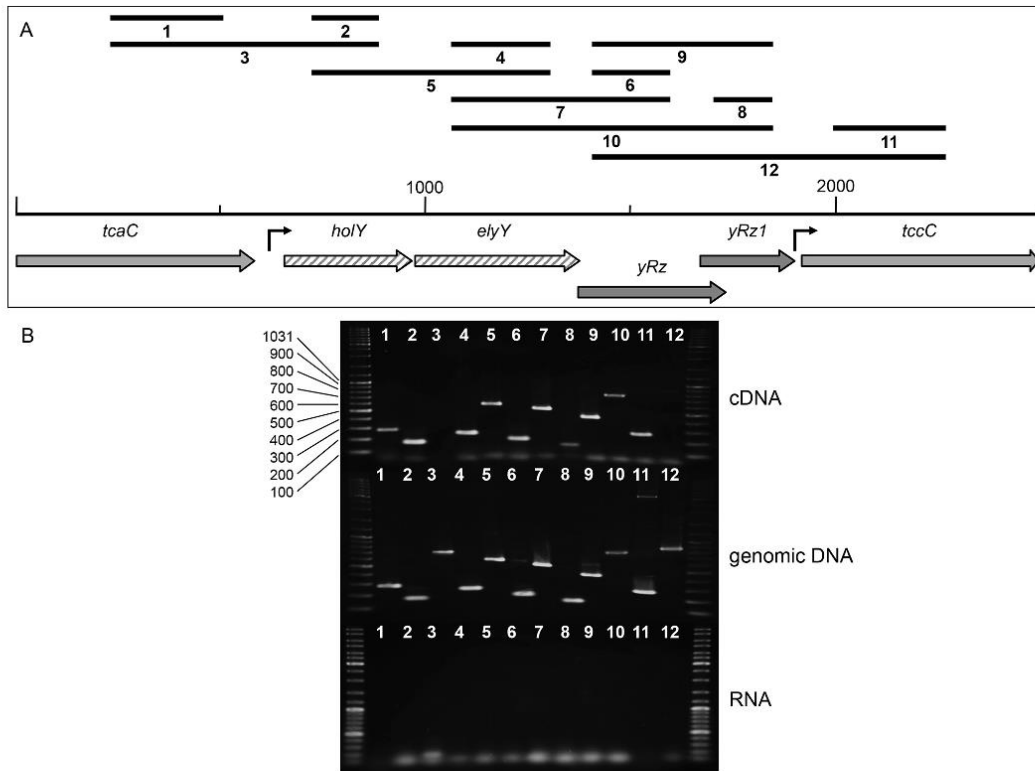
**FIG 1** Comparison of proteins with homology to the holin and endolysin sequences of *Y. enterocolitica* strain W22703. (A) Alignment of 15 representative holin sequences grouped according to their identity with HoLY of strain W22703. A hydrophobicity prediction performed using TMPred revealed three possible transmembrane domains (indicated by cylinders and rectangles). *E. cloacae*, *Enterobacter cloacae*; *C. violaceum*, *Chromobacterium violaceum*; *X. khoisanae*, *Xenorhabdus khoisanae*. (B) Alignment of 17 representative sequences of endolysins and related proteins. Asterisks indicate positions with identical fully conserved residue amino acids; colons indicate conservation among groups with strongly similar properties. Multiple-sequence alignment was performed using Clustal Omega (54, 55). The accession numbers of all proteins are listed in Table S2. *E. amylovora*, *Erwinia amylovora*; *P. asymbiotica*, *Photorhabdus asymbiotica*; *P. mirabilis*, *Proteus mirabilis*; *P. stuartii*, *Providencia stuartii*; *S. boydii*, *Shigella boydii*.

homologs (74% to 90% identity) were detected in *Yersinia* genomes (Fig. 1B). In *Yersinia* strains with Tc-PAI<sub>Yer</sub>, the endolysin gene is located immediately downstream of the holin gene. An endolysin from *Y. enterocolitica* strain 8081 also belongs to this group (64% identity), but its gene (YE1672) is neither part of one of the four prophages in this strain (20) nor flanked by a holin gene. Homologous endolysins (53% to 63% identity) were also found in a number of species in addition to members of the *Yersinia* group (Fig. 1B). In accordance with its homology to VanY from *Escherichia coli*, ElyY is a putative L-alanyl-D-glutamate endopeptidase or a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase. Homologs of ElyY are absent in *P. luminescens* or *S. entomophila*.

The two ORFs, which overlap by 62 bp and are located downstream of the HE genes of strain W22703, are present in all the insecticidal islands of yersiniae (13). BLAST analysis revealed that the first ORF encodes a putatively exported protein of 119 amino acids and N-terminal transmembrane domain (TMD) and that the second ORF encodes a putative membrane protein of 76 amino acids. They may therefore be considered to encode an i-spanin and an o-spanin (21, 22) that are part of the lysis cassette. We termed these two accessory elements yersinial Rz and Rz1 (*yRz* and *yRz1*) in accordance with the Rz and Rz1 nonhomologous genes of phage lambda (23). Significant (>33%) homologies of these two genes beyond *Yersinia* strains were not observed.

**Transcriptional organization of the lysis gene cassette.** The transcriptional activity of the promoter of the lysis cassette is very low (unpublished data) and below a threshold value defined recently (15). We revealed the transcriptional organization of this lysis cassette using reverse transcriptase PCR with RNA isolated from strain W22703 grown at 15°C to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.85. cDNA of 12 regions spanning approximately 200 to 800 bp was analyzed (Fig. 2A). All but two PCRs performed with cDNA as the template revealed a DNA fragment with a length corresponding to that of the PCR fragments amplified from genomic DNA (Fig. 2B). The

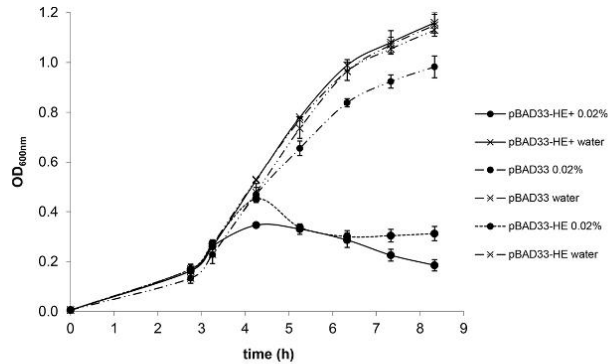




**FIG 2** Transcriptional organization of the lysis cassette in *Y. enterocolitica* strain W22703. (A) Holin/endolysin-encoding genes *holY* and *elyY* are followed by two hypothetical genes; *tcaC* and *tccC* flanking the cassette are also shown. The whole fragment is a part of the 19-kb Tc-PAI<sub>Y<sub>e</sub></sub> pathogenicity island. The arrows indicate promoters according to reverse transcriptase PCR, promoter predictions, or reporter fusion experiments (14, 15). (B) Cells were grown at 15°C, and mRNA was extracted at an OD<sub>600</sub> of 0.85. cDNA was amplified with primers listed in Table S1. Reverse transcriptase PCR was performed with primer pairs specific for regions 1 to 12 (indicated in panel A). All PCR products were separated using 2% agarose gel electrophoresis. PCR was performed with genomic DNA and DNase-treated RNA samples as the templates serving as controls. Primers for cDNA amplification had been tested in a similar manner (data not shown). Each PCR was performed at least twice.

transcription of all genes was shown, and fragments overlapping the genes of the lysis cassette indicate that the transcription of the *holY*, *elyY*, *yRz*, and *yRz1* genes is controlled by a single promoter. This finding was confirmed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) experiments performed with plasmid pBAD-HE<sup>+</sup> (including the HE genes together with *yRz* and *yRz1* [HE<sup>+</sup>]) (see Fig. S1 in the supplemental material). No amplification was observed using primers whose products would point to a polycistronic mRNA of *tcaC* and *holY* or of *yRz1* and *tccC*. These data illustrate that the lysis cassette of strain W22703 constitutes an independent transcriptional unit of these four genes.

**Lysis of *E. coli* upon HE gene overexpression.** To test the biological function of the lysis determinant, the HE genes, alone and together with *yRz* and *yRz1* (HE<sup>+</sup>), were overexpressed using plasmids pBAD33-HE and pBAD33-HE<sup>+</sup> in heterologous host *E. coli* strain TOP10. The OD<sub>600</sub> decreased within 1 h after addition of 0.02% arabinose (Fig. 3). No significant difference was observed in the growth properties in the presence of the two accessory elements (HE<sup>+</sup>). As a control, we showed that logarithmic growth of *E. coli* cultures was not affected by arabinose or the nonrecombinant vector. Overexpres-



**FIG 3** Growth of *E. coli* TOP10 in the presence of overexpressed HE. *E. coli* cells were transformed with pBAD33, pBAD33-HE, and pBAD33-HE<sup>+</sup>. An overnight culture was diluted 1:1,000 in LB medium. Following incubation at 37°C with shaking, each of the three cultures was split when the two cultures reached an OD<sub>600</sub> of 0.25, and arabinose was added to reach a final concentration of 0.02% or was not added (control). Cells were then incubated under the same conditions for 5 h. Time point zero was set immediately after dilution. Each experiment was independently performed thrice, and the standard deviations (SDs) are shown.

sion of the lysis genes following addition of arabinose was shown by the determination of the relative gene expression levels of *holY*, *elyY*, and spanin genes via qRT-PCR (Fig. S1A). Taken together, these data demonstrate the biological functionality of the lysis cassette from the Tc-PAI<sub>ye</sub>.

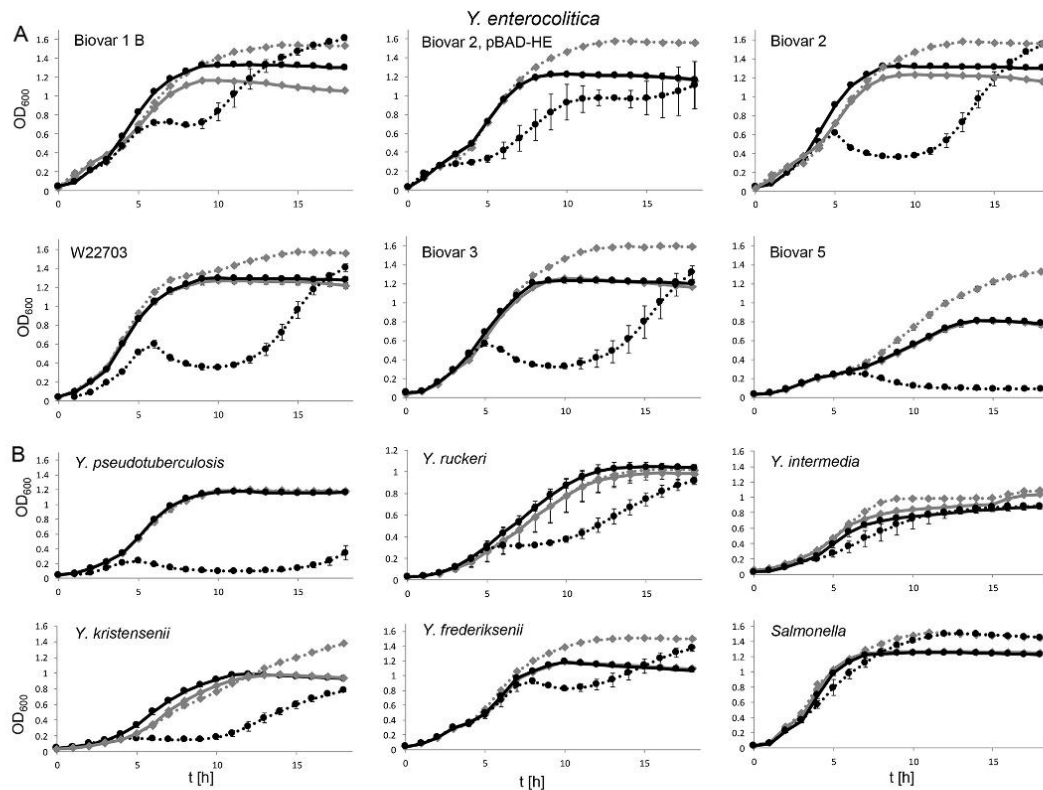
#### Overexpression of the lysis cassette in a diverse range of Gram-negative hosts.

To investigate the specificity of the lysis genes, pBAD33-HE and pBAD33-HE<sup>+</sup> were tested in the representatives of *Y. enterocolitica* biovars 1 to 5, *Y. pseudotuberculosis*, several apathogenic *Yersinia* species, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *P. luminescens* (Fig. 4). In biovar 2 strain W22703, arabinose-induced HE and HE<sup>+</sup> overexpression resulted in growth curves at 37°C similar to those seen in the *E. coli* experiment.

In the biovar 1 to 3 and 5 strains, overexpression of the HE<sup>+</sup> lysis cassette had an attenuating effect on the growth of *Y. enterocolitica* biovar 1B, 2, 3, and 5 strains at 37°C (Fig. 4A) but exhibited only a very weak effect on biovars 1A and 4 strains (data not shown). When the construct lacking *yRz* and *yRz1* (HE) was used, we also observed lysis that, however, was less pronounced than in the presence of HE<sup>+</sup> as exemplified by biovar 2.

Growth retardation upon HE<sup>+</sup> induction was also observed in *Y. pseudotuberculosis*, *Y. ruckeri*, *Y. kristensenii*, and *S. Typhimurium* but not in *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* (Fig. 4B), and *Y. aldovae* (data not shown). Interestingly, *P. luminescens* strain TT01 was resistant to the activity of overexpressed HE (data not shown). Nonrecombinant plasmid pBAD33, used as a control, exhibited no effect on the growth behavior of all strains tested in medium with or without arabinose. Because Tc-PAI<sub>ye</sub> is absent in all strains shown in Fig. 4B as well as in the biovar 1A and 1B strains, no correlation was observed between the presence of the insecticidal island and the lytic capacities of the HE cassette. The addition of arabinose stimulated the growth of strains, indicating that the effect of the lysis cassette on cell viability is stronger than is suggested by the graphs. The successful overexpression of the lysis genes in several strains was demonstrated by qRT-PCR (Fig. S1A to C).

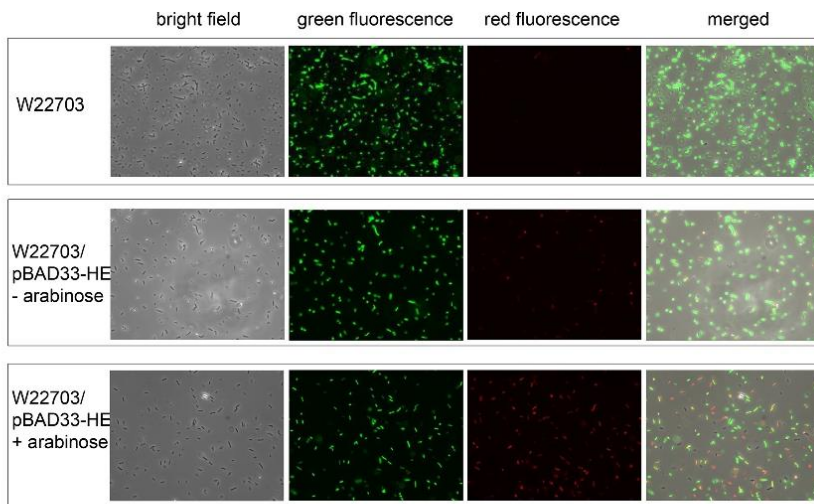
To test whether the decrease of the OD<sub>600</sub> value is a result of cell lysis, the CFU levels of W22703 and W22703 pBAD33-HE were determined. Figure S2 shows a decrease in CFU at 3 h after the addition of arabinose by more than 1 order of magnitude, thus confirming that HE overexpression had killed a majority of the population. W22703 and



**FIG 4** Overexpression of *holY* and *elyY*. (A) Plasmids pBAD33 and pBAD33-HE<sup>+</sup> were transformed in *Y. enterocolitica* biovar 1A and 1B and biovar 2 to 5 strains, and plasmid pBAD33-HE was transformed in the biovar 2 strain. Overnight cultures were diluted 1:500 and grown at 37°C with shaking. Induction with 0.2% (wt/vol) arabinose was performed at an OD<sub>600</sub> of 0.2. (B) *Y. pseudotuberculosis*, *Y. ruckeri*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, and *S. Typhimurium* were similarly tested. Gray, strains with plasmid pBAD33; black, strains with pBAD-HE<sup>+</sup>. Cultivation was performed in the absence (solid lines) or presence (dashed lines) of arabinose. SDs of results from three independently performed experiments are shown.

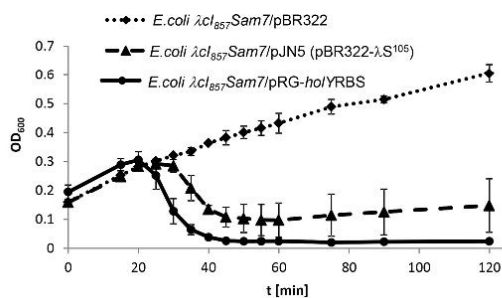
W22703 pBAD33-HE cells grown at 37°C with and without arabinose were also subjected to a viability test by which cells with intact membranes were stained green and those with compromised membrane integrity were stained red. Fluorescence microscopy revealed that most W22703 cells were alive, whereas most arabinose-induced W22703 pBAD33-HE culture cells were stained red, clearly suggesting membrane damage and cell death upon HE overexpression (Fig. 5). W22703/pBAD33-HE exhibited a low number of dead cells in the absence of arabinose, probably due to the leakiness of the pBAD33 system.

In contrast to the induction of a prophage, overexpression of the lysis cassette allowed growth resumption, and the strains reached stationary phase after several hours of incubation (data not shown). To investigate whether or not the metabolization of arabinose is responsible for this phenomenon, an *araA* deletion mutant of strain W22703 equipped with pBAD-HE was tested. In the presence of arabinose, we measured a higher maximal OD<sub>600</sub> of strain W22703 than of W22703  $\Delta$ *araA*, unable to utilize arabinose (data not shown), whereas equal growth of the two strains resumed after approximately 7 h. These data suggest that the all-or-none induction of P<sub>BAD</sub> (24), resulting in a selection for recombinant plasmid loss, is responsible for growth resumption.

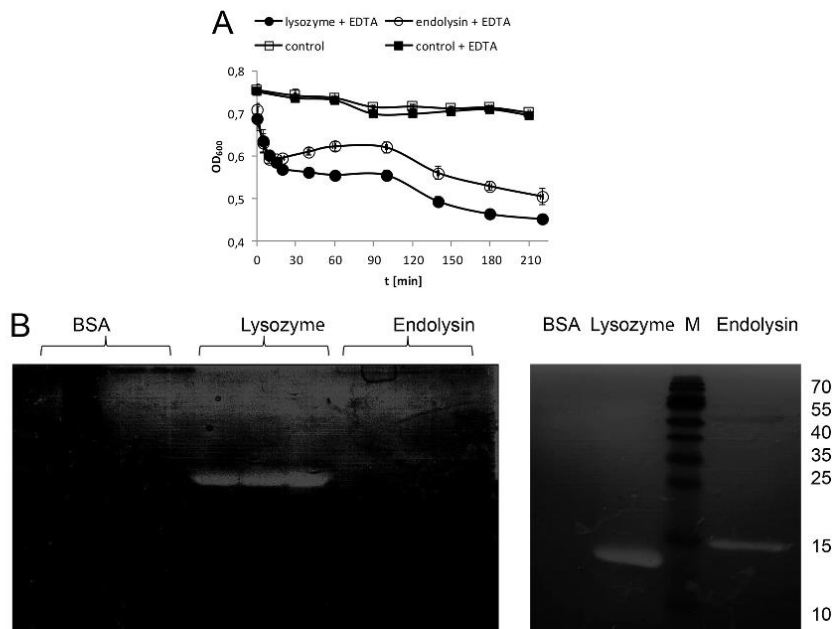


**FIG 5** Live/dead staining of W22703 cultures without and with overexpression of the HE genes. Strains W22703 and W22703 pBAD33-HE were grown at 37°C until an  $OD_{600}$  of 0.2 was achieved. The latter culture was split, 0.2% arabinose was added to one sample, and the two cultures were grown for 1 h. Cells were harvested, washed thrice with phosphate-buffered saline (PBS) buffer, and adjusted to equal densities. The samples were exposed to a mixture of SYTO 9 and propidium iodide (PI), which stains nucleic acids, using a Live/Dead bacterial viability kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany; catalog no. L7007) according to the manufacturer's instructions. SYTO 9 stains live cells (green fluorescence), whereas PI penetrates only cells with damaged membranes, thus reducing the SYTO 9 stain (red fluorescence) as monitored with a fluorescence microscope at 40-fold magnification.

**Holin activity of HolY.** To define the function of the putative holin, HolY, from *Y. enterocolitica* strain W22703, strain *E. coli* MC1061/ $\lambda$ cl<sub>857</sub>-Sam7 with a nonsense mutation of the  $\lambda$ S holin was used for a complementation experiment. Thermal induction of this strain, which is equipped with pRG-holYRBS, which carries holY with its own ribosomal binding site (RBS), by a shift from 30°C to 42°C for 15 min resulted in nearly complete lysis after approximately 20 min at 37°C (Fig. 6), clearly confirming the holin activity of HolY. A similar effect was observed in the presence of the pJN5 control plasmid, a pBR322 derivative carrying the gene encoding holin S<sup>105</sup>, although the lysis was incomplete. No such reduction in  $OD_{600}$  was observed when the *E. coli*  $\lambda$  lysogen was tested using pBR322 as a control. Because every holin tested previously, irrespective of



**FIG 6** Characterization of HolY. *E. coli* strain MC1061/ $\lambda$ cl<sub>857</sub>-Sam7 was transformed with pRG-holYRBS and pJN5, which were able to complement the mutated phage I holin gene. MC1061/ $\lambda$ cl<sub>857</sub>-Sam7 with plasmid pBR322 was used as the control.



**FIG 7** (A) Activity of purified ElyY compared with that of lysozyme. A W22703 culture was grown to the exponential phase, and growth was blocked via the addition of kanamycin. Aliquots were then treated with purified endolysin or lysozyme. Buffer and EDTA were used as controls. Each experiment was repeated twice, and SDs are depicted. (B) Zymograms testing ElyY against membrane preparations of *E. coli* (left) and *Y. enterocolitica* W22703 (right). Following gel electrophoresis, proteins were renatured at 37°C for 24 h. Gels were stained with methylene blue. Transparent bands indicate enzymatic activities toward the peptidoglycan of the bacteria. Each experiment was performed thrice; representative zymograms are shown.

its class, was found to complement  $\lambda$  5 null mutants (25), this experiment clearly demonstrated that *holY* indeed encodes a holin.

**Enzymatic activity and substrate specificity of ElyY.** To analyze the activity of exogenously applied endolysin, the protein was overproduced and purified using pET28b and was added to W22703 cells in a buffer with kanamycin that inhibited cell growth. Measurement of the OD<sub>600</sub> over 225 min revealed a 30% reduction in the cell density compared with 35% in the control sample similarly treated with lysozyme (Fig. 7A). Cells resuspended in buffer and with kanamycin, or additionally with EDTA as a further control, exhibited an OD<sub>600</sub> of 0.7 at the end of the experiment, corresponding to a 7% decrease in the cell density. Thus, endolysin displayed a lytic activity toward W22703 cells that was comparable to that of lysozyme.

Using purified enzyme from the aforementioned experiment and lyophilized cells of W22703, *Y. intermedia*, *Y. ruckeri*, *Y. mollaretii*, *Y. frederiksenii*, *E. coli* OP50, and *S. Typhimurium*, the substrate specificity of ElyY was tested via zymography. Bovine serum albumin (BSA) and lysozyme were used as controls. A representative zymogram with cell membrane fractions of *E. coli* and *Y. enterocolitica* W22703 is shown in Fig. 7B. The highest (100%) activity of ElyY was observed against W22703 cells and the lowest (5%) against *E. coli* cells; degradation rates of 32% to 95% were determined for the other lyophilized cells (Table 1). These data describe the high substrate specificity of ElyY with respect to yersinial murein. The absolute enzymatic activity of lysozyme was higher than that of endolysin (Fig. 7B); however, zymograms of this enzyme revealed a distinct activity pattern ranging from 32% activity against *Y. ruckeri* cells to 100% against *Y. intermedia* cells (Table 1).



**TABLE 1** Substrate specificity of ElyY from strain W22703

Strain	% lysozyme activity	% endolysin activity
<i>Y. enterocolitica</i> W22703	85	100
<i>Y. frederiksenii</i>	69	77
<i>Y. ruckeri</i>	32	32
<i>Y. mollaretii</i>	74	82
<i>Y. intermedia</i>	100	95
<i>E. coli</i> OP50	64	5
<i>S. Typhimurium</i> 14028	94	89

## DISCUSSION

There are three mechanisms that contribute to phage lysis of Gram-negative bacterial host cells. In the canonical phage L model, the S holin harmlessly accumulates in the cytoplasm until it suddenly triggers the formation of micron scale holes that allow its release into the periplasm to degrade peptidoglycan (26). The second mechanism is exemplified by bacteriophage P1 or 21, which possesses a signal-arrest-release (SAR) domain endolysin that accumulates as an inactive enzyme in the periplasm and refolds to an active form when the proton motive force collapses in the presence of a pinholin (27) (28–30). Recently, disruption of the outer membrane by a spanin complex, which comprises a small outer membrane lipoprotein (o-spanin) and an integral cytoplasmic membrane protein (i-spanin), was identified as a third step in cell lysis (21). These spanins are encoded by  $\lambda$  *Rz* and *Rz1* gene equivalents that have been identified among most phages of Gram-negative bacteria and that were grouped into the three classes of embedded, overlapped, and separated genes (21, 22). The overlapping *yRz* and *yRz1* gene pair of *Y. enterocolitica* investigated in this study corresponds to the spanin concept, because *YRz* is a protein with a TMD and *YRz1* is a putative lipoprotein. When the two pBAD33 constructs for HE overexpression with and without *yRz* and *yRz1* (pBAD33-HE<sup>+</sup> and pBAD33-HE) were tested in *Y. enterocolitica* strains (Fig. 4A), we observed that the lytic effect on the cell culture was more pronounced in the presence of the two accessory genes. Although this effect was demonstrated under the artificial condition of arabinose-induced overexpression, the distinct growth phenotypes of W22703 with pBAD33-HE<sup>+</sup> or pBAD33-HE are in line with the assumption that the two spanins are required or that they at least significantly contribute to cell lysis. This assumption is supported by the observation of a stronger lysis of *E. coli* cells after HE<sup>+</sup> overexpression than after HE overexpression in the presence of cations under conditions of mild shaking (see Fig. S3 in the supplemental material).

Endolysins constitute classes of highly specific amidases, glycosidases, muramidases, and endopeptidases that are composed of a N-terminal catalytic domain and a C-terminal CBD (31). The endolysin ElyY investigated in this study is a putative endopeptidase that lacks an SAR domain. Endolysins are known for their high substrate specificity (33), and we observed that ElyY has the strongest preference for W22703 murein and the weakest preference for peptidoglycan of *E. coli* (Table 1).

Cryptic prophages, e.g., prophage elements that are inactive with respect to cell lysis, phage production, and plaque formation, help bacteria to cope with adverse environments (34). For example, they contribute to resistance against serum-mediated killing (35) or antibiotics, to biofilm formation (34, 36), and to the virulence properties of Shiga toxin-producing *E. coli* (37). Some endolysin/holin pairs that are not colocalized with other prophage genes are carried in locations adjacent to those of genes encoding toxins or extracellular enzymes, such as a colicin in *Klebsiella oxytoca*, heat-labile enterotoxins IIA/B of *E. coli*, and a chitinase in *S. Typhi* (38). Another example is a gene encoding an *N*-acetyl- $\beta$ -D-muramidase similar to phage endolysins that is located close to the gene encoding toxin CdtB of *S. Typhi*, and it was demonstrated that this endolysin, possibly in conjunction with a holin located elsewhere in the genome, is responsible for typhoid toxin secretion. Consequently, it was proposed that this endolysin represents an evolutionarily recent adaptation of phage-associated enzymes that perform a different function involved in protein secretion (38). For *Clostridium difficile*

strain R20291, the holin-like TcdE protein has been demonstrated to facilitate the release of toxins A and B to the extracellular environment (18, 39, 40), whereas such an observation was not made upon *tcdE* inactivation in strain 630 (41). This discrepancy is possibly due to the larger amount of TcdA and TcdB produced by strain R20291 than by strain 630. It is also interesting that *Y. pestis* strain Angola encodes a truncated holin of 44 amino acids with a single transmembrane domain (TMD) only, suggesting a loss of function in line with the apathogenic behavior of *Y. pestis* strains toward fleas (42). The potential influence of the HE cassette from Tc-PAI<sub>ve</sub> on the phenotype of *Y. enterocolitica* strain W22703 is unknown, and its possible biological role remains to be elucidated.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** Bacterial strains used in this study are indicated in Table 2. All cultures were grown in lysogeny broth (LB) medium (containing 10 g/liter tryptone, 5 g/liter yeast extract, and 5 g/liter NaCl) or in NZY medium (containing 10 g/liter N-Z-Amine, 5 g/liter yeast extract, and 8 g/liter NaCl; pH 7.0) or on LB agar (LB supplemented with 1.5% agar). *E. coli* was grown at 37°C and *Yersinia* spp. at 30°C or as indicated. If necessary, kanamycin (50 µg/ml), streptomycin (50 µg/ml), chloramphenicol (20 µg/ml), tetracycline (12 µg/ml), nalidixic acid (20 µg/ml), IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; 0.1 mM), or arabinose (as indicated) was added to the medium. For zymography, cultures were grown to an OD<sub>600</sub> of 1.0. The cells were autoclaved, sedimented, and then shock frozen in liquid nitrogen. Following lyophilization, cells were stored at -20°C.

**General molecular techniques.** DNA manipulation and chromosomal DNA isolation were performed according to standard procedures (49) or in accordance with the manufacturer's protocol. PCR was performed using Thermoprime *Taq* polymerase (ABgene, Hamburg, Germany) via the following protocol: 95°C for 2 min; 30 cycles of 95°C for 10 s (annealing temperature depending on oligonucleotides for 30 s) and 72°C for 20 to 180 s (depending on the expected fragment length); and final extension at 72°C for 10 min. Chromosomal DNA (100 ng) was used as the template.

For qRT-PCR performed on a Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), cDNA was generated using 1 µg of DNA-free RNA samples and qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instructions. Resulting cDNA samples were diluted 5-fold, and 5 µl of a dilution was applied in each qRT-PCR. Amplicon formation was quantified by monitoring the fluorescence of SYBR green dye (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD). The oligonucleotide primer pairs (see Table S1 in the supplemental material) were designed using Primer3 software, and primer efficiencies were determined in experiments performed with serial dilutions of selected cDNA samples. The 16S rRNA gene was used as the housekeeping control gene for normalization and for calculating the relative levels of gene expression by the threshold cycle (ΔΔC<sub>t</sub>) method.

Conjugational transfer was performed using the mobilizing *E. coli* SM10 strain as the donor for matings (43, 50). RNA was isolated according to the modified single-step method of Chomczynski and Sacchi (51). Briefly, a 1-ml culture of *Y. enterocolitica* strain W22703 was grown to an OD<sub>600</sub> of approximately 0.85 and centrifuged, and the pellet was resuspended in 1 ml of TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The cells were disrupted using a Ribolyser system (Hybaid, Heidelberg, Germany) as described previously (52). Following chloroform extraction, nucleic acids were precipitated, washed, and resuspended in 0.5% SDS. DNase treatment was performed using RQ1 DNase I (Promega, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instruction.

**Recombinant plasmids and strains.** For HE and HE<sup>+</sup> overexpression, a 772-bp fragment comprising the HE genes was cloned into pBAD33 via *SacI* and *XbaI* using oligonucleotides *toxIF46* and *toxIR52*, resulting in plasmid pBAD-HE. A 1,310-bp fragment comprising the HE cassette plus *yRz* and *yRz1* was cloned in the same manner using primers *toxIF46* and *toxIR53*, giving rise to pBAD-HE<sup>+</sup>. The construct pBAD33-*elyY-yRz1* was generated using *SacI* and *XbaI*, pET28-*elyY* was generated using *NcoI* and *XhoI*, and pRG-*holYRBS* was generated using *XbaI* and *HindIII*. The in-frame deletion of *araA* was performed using suicide plasmid pKNG101, into which two fragments flanking *araA* were cloned. Strain W22703 Δ*araA* was then generated via a previously described procedure (8). The deletion was confirmed by sequencing. All oligonucleotides used for these constructs are listed in Table S1.

**Overproduction and purification of ElyY.** ElyY-His<sub>6</sub> was overproduced and purified as follows. An overnight culture of *E. coli* BL21(DE3) harboring pET28b-*elyY* was diluted 1:100 into 400 ml of LB medium and incubated at 30°C and 180 rpm. At an OD<sub>600</sub> of 0.6, production of ElyY was induced by the addition of IPTG. After incubation for 4 h, the cells were harvested, and the pellet was resuspended in 4 ml of native lysis buffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM imidazole; pH 8.0) in the presence of 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. The cells were lysed using a French press (SLM Aminco Instruments, Rochester, NY), and the lysate was incubated with 40 µl of DNase I (1 U/µl) and 40 µl of lysozyme (10 mg/ml) for 1 h at 4°C. The cell debris was removed by centrifugation at 4°C (performed at 13,200 rpm 3 times for 10 min each time). Then, 20 µl of the supernatant containing soluble proteins was mixed with 5 µl of 5× Laemmli buffer and applied to sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels, and the separated proteins were stained with Coomassie blue to verify ElyY overproduction. ElyY-His<sub>6</sub> was purified using a nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) Fast Start kit (Qiagen, Hilden, Germany). The fusion protein was bound to the column and then washed and eluted according to the manufacturer's protocol. Protein concentrations were determined using RotiQuant solution (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

TABLE 2 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype/relevant features <sup>a</sup>	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> B121(DES)	F- ompT hsdR <sub>g</sub> (h <sub>g</sub> <sup>-</sup> m <sub>h</sub> <sup>-</sup> ) gal lon dcm meI31 λIDES lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 hns5]	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcra Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(lara leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>r</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
<i>E. coli</i> LMG194	F- ΔlacX74 galE thi rpsL ΔphoA (PvuII) Δara714 leu::Tn10	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
<i>E. coli</i> SM10	lacY tonA recA Mu <sub>c</sub> <sup>+</sup> thi thr leu supE RP4-2-Tc::Mu Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	43
<i>E. coli</i> MC1061/IC <sub>857</sub> Sam7	Lysogenic derivative carrying λcI857Sam7	46
<i>Y. enterocolitica</i> W22703	Nal <sup>r</sup> Res <sup>-</sup> Mod <sup>+</sup> pYV <sup>-</sup>	This study
<i>Y. enterocolitica</i> W22703 ΔaraA	Nonpolar deletion mutant of araA encoding L-arabinose isomerase	V. L. Miller, St. Louis, MO
<i>Y. enterocolitica</i> 8081v	Wild type, Nal <sup>r</sup>	Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
<i>Y. enterocolitica</i> SZ4331/97	Biovar 1A, O:14, Tc-PAI <sub>ve</sub> negative	Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
<i>Y. enterocolitica</i> SZ5108/01	Biovar 1B, O:8, Tc-PAI <sub>ve</sub> negative	Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
<i>Y. enterocolitica</i> H692/94	Biovar 2, O:9, Tc-PAI <sub>ve</sub> positive	Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
<i>Y. enterocolitica</i> H230/89	Biovar 3, O:5,27, Tc-PAI <sub>ve</sub> positive	Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
<i>Y. enterocolitica</i> H317/80	Biovar 4, O:3	Hamburg, Germany
<i>Y. enterocolitica</i> 519-36/88	Biovar 5, O:2a, 2b, 3	Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	CIP 55.85	Hamburg, Germany
<i>Y. ruckeri</i>	CIP 80.20	Collection Institute Pasteur
<i>Y. aldovae</i>	CIP 103162	Collection Institute Pasteur
<i>Y. intermedia</i>	CIP 80.28	Collection Institute Pasteur
<i>Y. kristensenii</i>	CIP 80.30	Collection Institute Pasteur
<i>Y. frederiksenii</i>	CIP 80.29	Collection Institute Pasteur
<i>Y. mollaretii</i>	CIP 103324	Collection Institute Pasteur
<i>P. luminescens</i>	TT01	Collection Institute Pasteur
<i>S. Typhimurium</i>	Wild-type strain ATCC 14028	ATCC
<b>Plasmids</b>		
pKNG101	Conditionally replicating vector; R6K origin, mobRK2 transfer origin, sucrose-inducible sacB, Str <sup>r</sup>	47
pBAD33	Arabinose-inducible promoter, Cam <sup>r</sup>	24
pBAD33-HE	A 772-bp fragment comprising the holin and endolysin genes was cloned into pBAD33 via SacI and XbaI	This study
pBAD33-HE <sup>+</sup>	A 1,310-bp fragment comprising the HE cassette and yRz and yRz1 cloned into pBAD33 via SacI and XbaI	This study
pBAD33-ely <sup>+</sup> -yRz1	ely <sup>+</sup> , yRz, and yRz1 cloned into pBAD33 via SacI and XbaI	This study
pBR322	Amp <sup>r</sup> -Tet <sup>r</sup>	48
pIN5	pBR322 derivative carrying S <sup>105</sup> under the control of the late transcription regulatory elements of phage λ	44
pRG32	pBRQ(Δrbs) with tcdE Met <sup>1</sup> of <i>C. difficile</i> with its own RBS	39
pRG-hol/RBS	Derivative of pRG32; exchange of <i>C. difficile</i> holin gene with holY, including its RBS, via XbaI and HindIII	This study
pET28b	Expression vector; T7 promoter, N- and C-terminal polyhistidine tag, Kan <sup>r</sup> pBR322.Zorigin	Merck, Darmstadt, Germany
pET28b-elyY	Plasmid for endolysin gene overexpression; elyY cloned into IPTG-inducible pET28b via NcoI and XhoI; C-terminal polyhistidine tag	This study

<sup>a</sup>Amp<sup>r</sup>, ampicillin resistance; Cam<sup>r</sup>, chloramphenicol resistance; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance; Nal<sup>r</sup>, nalidixic acid resistance; Str, streptomycin resistance; Tet<sup>r</sup>, tetracycline resistance.



based on Bradford's method (53), and the purity of eluted fractions was analyzed using 12.5% SDS polyacrylamide gel.

**Measurement of ElyY activity.** W22703 was cultivated in lysogeny broth (LB) medium at 30°C until the culture reached an OD<sub>600</sub> of 1.0. Aliquots of 1 ml were centrifuged, and the cell pellets were washed in 100 mM Tris and 150 mM NaCl (pH 7.5). Cells were resuspended in 1 ml of this buffer containing 50 mM EDTA and 50 µg/ml endolysin. Cell growth was then inhibited by the use of 50 µg/ml kanamycin, and the samples were incubated at 37°C.

The functionality of ElyY was determined by zymography as follows. Lyophilized cells (0.2% [wt/vol]) were enclosed in the 15% separation gel of an SDS-polyacrylamide gel that was preceded by a 4% stacking gel. Then, 20 µl of purified endolysin (1 mg/ml) was mixed with 5 µl of 5× Laemmli buffer, incubated at 100°C for three min, and separated by gel electrophoresis. BSA and lysozyme were used as controls and treated in the same manner. The gel was washed thrice in distilled water for 10 min. Following equilibration in denaturing buffer (10 mM Tris, Triton X-100, pH 7.0) for 5 min, the zymograms were incubated at 37°C for 24 h. After washing, the gel was stained with 0.1% methylene blue and 0.1% KOH for 3 h and then destained in distilled water. Semiquantitative densitometry of the scanned zymograms was performed using Kodak ID Image Analysis software. For each band, values corresponding to regions of equal size were determined and were then calculated as integrals of the background in percentages.

#### SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JB.00180-18>.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.4 MB.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Bruno Dupuy for providing plasmids pRG32 and pJN5.

This study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to T.M.F. (FU375/4-2).

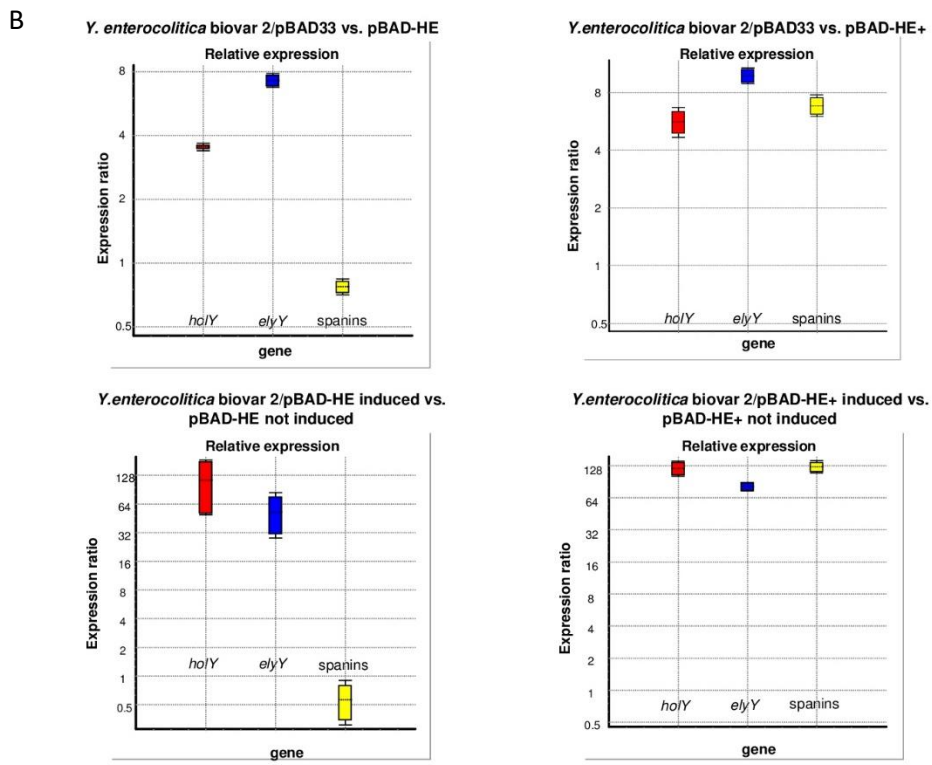
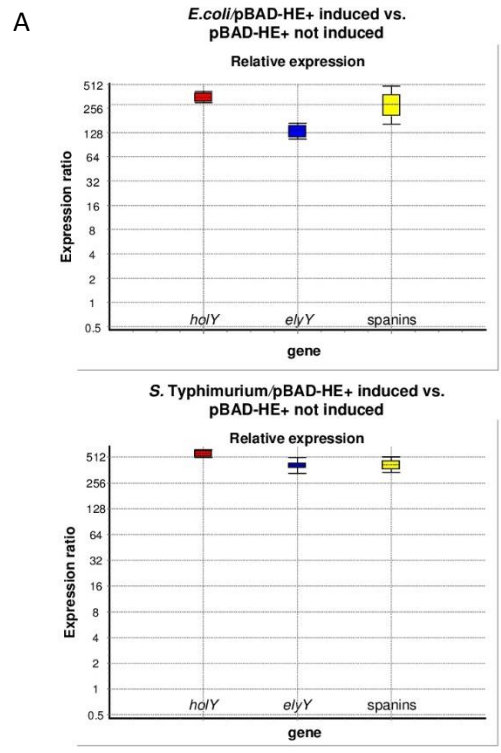
#### REFERENCES

- Stamm I, Hailer M, Depner B, Kopp PA, Rau J. 2013. *Yersinia enterocolitica* in diagnostic fecal samples from European dogs and cats: identification by Fourier transform infrared spectroscopy and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 51:887–893. <https://doi.org/10.1128/JCM.02506-12>.
- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H. 2006. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47:315–329. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00095.x>.
- Wauters G, Kandolo K, Janssens M. 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* 9:14–21.
- Tennant SM, Skinner NA, Joe A, Robins-Browne RM. 2003. *Yersinia enterocolitica* biotype 1A: not as harmless as you think. *Adv Exp Med Biol* 529:125–128. [https://doi.org/10.1007/0-306-48416-1\\_24](https://doi.org/10.1007/0-306-48416-1_24).
- Schubert S, Rakin A, Heesemann J. 2004. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* 294:83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jjmm.2004.06.026>.
- Wren BW. 2003. The *Yersinia*—a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 1:55–64. <https://doi.org/10.1038/nrmicro730>.
- Spanier B, Starke M, Higel F, Scherer S, Fuchs TM. 2010. *Yersinia enterocolitica* infection and *tcaA*-dependent killing of *Caenorhabditis elegans*. *Appl Environ Microbiol* 76:6277–6285. <https://doi.org/10.1128/AEM.01274-10>.
- Bresolin G, Morgan JA, Ilgen D, Scherer S, Fuchs TM. 2006. Low temperature-induced insecticidal activity of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 59:503–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04916.x>.
- Fuchs TM, Brandt K, Starke M, Rattei T. 2011. Shotgun sequencing of *Yersinia enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O:9): genomic evidence for oscillation between invertebrates and mammals. *BMC Genomics* 12:168. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-168>.
- Heermann R, Fuchs TM. 2008. Comparative analysis of the *Photobacterium luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. *BMC Genomics* 9:40. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-40>.
- Bresolin G, Neuhaus K, Scherer S, Fuchs TM. 2006. Transcriptional analysis of long-term adaptation of *Yersinia enterocolitica* to low-temperature growth. *J Bacteriol* 188:2945–2958. <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.2945-2958.2006>.
- Lang AE, Schmidt G, Schlosser A, Hey TD, Larrinua IM, Sheets JJ, Mannherz HG, Aktories K. 2010. *Photobacterium luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science* 327:1139–1142. <https://doi.org/10.1126/science.1184557>.
- Fuchs TM, Bresolin G, Marcinowski L, Schachtner J, Scherer S. 2008. Insecticidal genes of *Yersinia* spp.: taxonomical distribution, contribution to toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution. *BMC Microbiol* 8:214. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-214>.
- Starke M, Fuchs TM. 2014. YmoA negatively controls the expression of insecticidal genes in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 92:287–301. <https://doi.org/10.1111/mmi.12554>.
- Starke M, Richter M, Fuchs TM. 2013. The insecticidal toxin genes of *Yersinia enterocolitica* are activated by the thermolabile LTTR-like regulator TcaR2 at low temperatures. *Mol Microbiol* 89:596–611. <https://doi.org/10.1111/mmi.12296>.
- Young I, Wang I, Roof WD. 2000. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* 8:120–128. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01705-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01705-4).
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Tan KS, Wee BY, Song KP. 2001. Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 50:613–619. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-7-613>.
- Hurst MR, Glare TR, Jackson TA, Ronson CW. 2000. Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photobacterium luminescens*. *J Bacteriol* 182:5127–5138. <https://doi.org/10.1128/JB.182.18.5127-5138.2000>.
- Thomson NR, Howard S, Wren BW, Holden MT, Crossman L, Challis GL, Churcher C, Mungall K, Brooks K, Chillingworth T, Feltwell T, Abdellah Z, Hauser H, Jagels K, Maddison M, Moule S, Sanders M, Whitehead S, Quail MA, Dougan G, Parkhill J, Prentice MB. 2006. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity

- Yersinia enterocolitica* strain 8081. PLoS Genet 2:e206. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020206>.
21. Young R. 2014. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. J Microbiol 52:243–258. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z>.
  22. Summer EJ, Berry J, Tran TA, Niu L, Struck DK, Young R. 2007. Rz/Rz1 lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts. J Mol Biol 373:1098–1112. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.045>.
  23. Young R, Way J, Way S, Yin J, Syvanen M. 1979. Transposition mutagenesis of bacteriophage lambda: a new gene affecting cell lysis. J Mol Biol 132:307–322. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90262-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90262-6).
  24. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J Bacteriol 177:4121–4130. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995>.
  25. Wang IN, Smith DL, Young R. 2000. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. Annu Rev Microbiol 54:799–825. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.799>.
  26. White R, Chiba S, Pang T, Dewey JS, Savva CG, Holzenburg A, Pogliano K, Young R. 2011. Holin triggering in real time. Proc Natl Acad Sci U S A 108:798–803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011921108>.
  27. Reference deleted.
  28. Pang T, Savva CG, Fleming KG, Struck DK, Young R. 2009. Structure of the lethal phage pinhole. Proc Natl Acad Sci U S A 106:18966–18971. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907941106>.
  29. Park T, Struck DK, Dankenbring CA, Young R. 2007. The pinholin of lambdaoid phage 21: control of lysis by membrane depolarization. J Bacteriol 189:9135–9139. <https://doi.org/10.1128/JB.00847-07>.
  30. Park T, Struck DK, Deaton JF, Young R. 2006. Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis. Proc Natl Acad Sci U S A 103:19713–19718. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600943103>.
  31. Young R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. Microbiol Rev 56:430–481.
  32. Reference deleted.
  33. Eugster MR, Haug MC, Huwiler SG, Loessner MJ. 2011. The cell wall binding domain of *Listeria* bacteriophage endolysin PlyP35 recognizes terminal GlcNAc residues in cell wall teichoic acid. Mol Microbiol 81:1419–1432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07774.x>.
  34. Wang X, Kim Y, Ma Q, Hong SH, Pokusaeva K, Sturino JM, Wood TK. 2010. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. Nat Commun 1:147. <https://doi.org/10.1038/ncomms1146>.
  35. Barondess JJ, Beckwith J. 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda. Nature 346:871–874. <https://doi.org/10.1038/346871a0>.
  36. Toba FA, Thompson MG, Campbell BR, Junker LM, Rueggeberg KG, Hay AG. 2011. Role of DLP12 lysis genes in *Escherichia coli* biofilm formation. Microbiology 157:1640–1650. <https://doi.org/10.1099/mic.0.045161-0>.
  37. Creuzburg K, Kohler B, Hempel H, Schreiber P, Jacobs E, Schmidt H. 2005. Genetic structure and chromosomal integration site of the cryptic prophage CP-1639 encoding Shiga toxin 1. Microbiology 151:941–950. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27632-0>.
  38. Hodak H, Galan JE. 2013. A *Salmonella* Typhi homologue of bacteriophage muramidases controls typhoid toxin secretion. EMBO Rep 14:95–102. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.186>.
  39. Govind R, Dupuy B. 2012. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. PLoS Pathog 8:e1002727. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002727>.
  40. Govind R, Fitzwater L, Nichols R. 2015. Observations on the role of TcdE isoforms in *Clostridium difficile* toxin secretion. J Bacteriol 197:2600–2609. <https://doi.org/10.1128/JB.00224-15>.
  41. Olling A, Seehase S, Minton NP, Tatge H, Schroter S, Kohlscheen S, Pich A, Just I, Gerhard R. 2012. Release of TcdA and TcdB from *Clostridium difficile* cdi 630 is not affected by functional inactivation of the *tcdE* gene. Microb Pathog 52:92–100. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.10.009>.
  42. Erickson DL, Waterfield NR, Vadyvaloo V, Long D, Fischer ER, Ffrench-Constant R, Hinnebusch BJ. 2007. Acute oral toxicity of *Yersinia pseudotuberculosis* to fleas: implications for the evolution of vector-borne transmission of plague. Cell Microbiol 9:2658–2666. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00986.x>.
  43. Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Bio/Technology 1:784–791. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>.
  44. São-José C, Santos S, Nascimento J, Brito-Maduro AG, Parreira R, Santos MA. 2004. Diversity in the lysis-integration region of oenophage genomes and evidence for multiple tRNA loci, as targets for prophage integration in *Oenococcus oeni*. Virology 325:82–95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.04.029>.
  45. Goldberg AR, Howe M. 1969. New mutations in the 5' cistron of bacteriophage lambda affecting host cell lysis. Virology 38:200–202. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(69\)90148-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(69)90148-2).
  46. Cornelis G, Colson C. 1975. Restriction of DNA in *Yersinia enterocolitica* detected by recipient ability for a derepressed R factor from *Escherichia coli*. J Gen Microbiol 87:285–291. <https://doi.org/10.1099/00221287-87-2-285>.
  47. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. Gene 109:137–141. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90599-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90599-7).
  48. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crossa JH, Falkow S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2:95–113.
  49. Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
  50. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J Bacteriol 172:6557–6567. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6557-6567.1990>.
  51. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2).
  52. Jakob K, Satorhelyi P, Lange C, Wendisch VF, Silakowski B, Scherer S, Neuhaus K. 2007. Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. J Bacteriol 189:5582–5590. <https://doi.org/10.1128/JB.00082-07>.
  53. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
  54. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol 7:539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
  55. Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. Nucleic Acids Res 38:W695–W699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq313>.

Supplement

Fig. S1





C

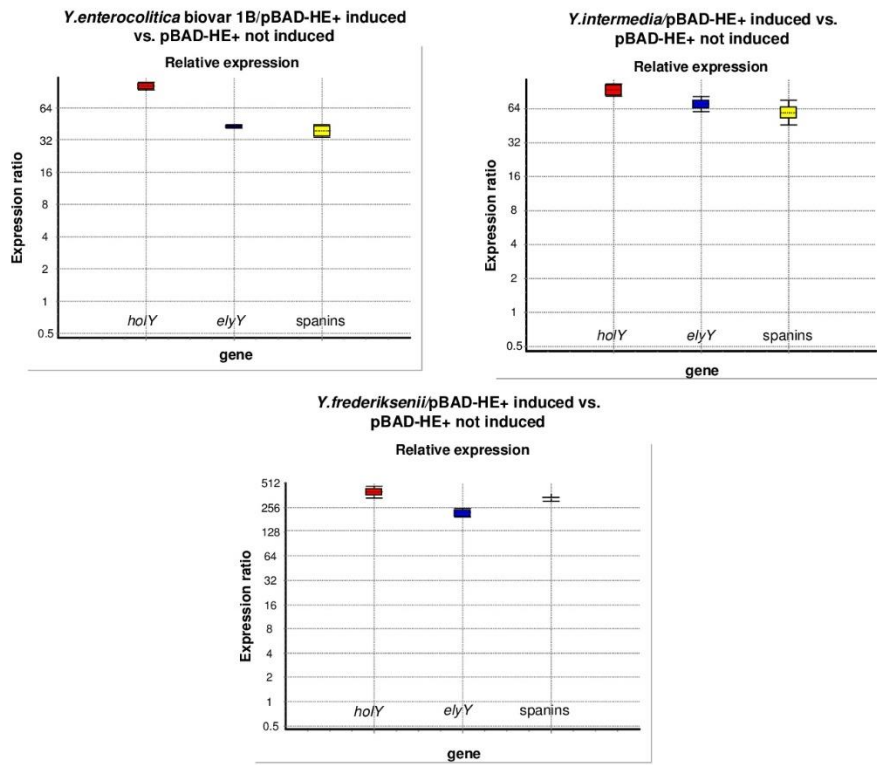


Fig. S2

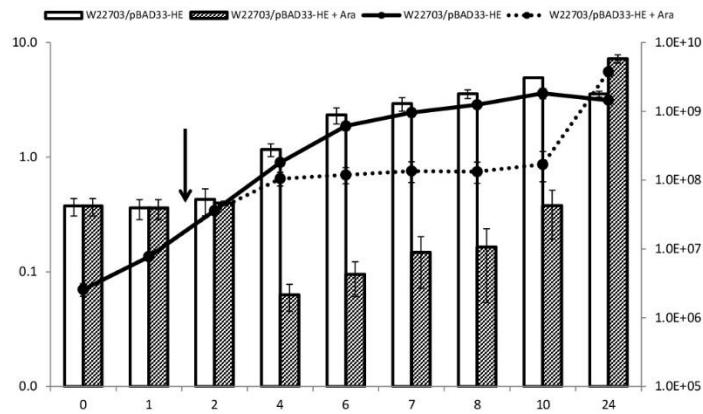
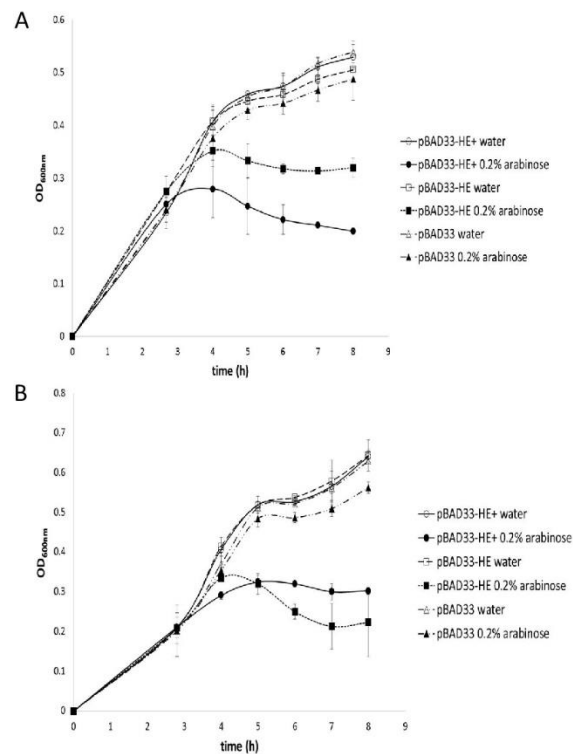


Fig. S3



**Fig. S1.** Overexpression of the lysis genes by arabinose. *E. coli* LMG194, *S. enterica*, (A) *Y. enterocolitica* biovar 2 (B), *Y. enterocolitica* biovar 1, *Y. intermedia*, and *Y. frederiksenii* (C) were equipped with pBAD33 or its derivatives, and were cultivated in LB medium in the absence or presence of 0.2% (w/v) arabinose. Samples were taken 1 h after addition of the inducer, and qRT-PCR was performed in technical duplicates with cDNA gained from DNA-free total RNA; oligonucleotides are listed Table S1. The expression of the 16S rRNA gene was used for normalization and for calculating the relative gene expression. Red boxes: relative expression of *holY*; blue boxes: relative expression of *elyY*; yellow boxes: relative expression of spanin genes.

**Fig. S2.** Determination of cell lysis by plating at different time points. *Y. enterocolitica* strain W22703/pBAD33-HE was cultivated in the absence or presence of arabinose; the arrow indicates the time point at which arabinose was added at a final concentration of 0.2% (w/v). Columns indicate CFU/ml, and the graphs represent the OD<sub>600</sub> of the cultures. SDs of three independently performed experiments are shown.

**Fig. S3.** Growth of *E. coli* LMG194 in the presence of overexpressed HE. *E. coli* cells were transformed with pBAD33, pBAD33-HE, and pBAD33-HE<sup>+</sup>. An overnight culture was diluted 1:1000 in LB medium (A) with or without (B) 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and shaken at 55 rpm. Following incubation at 37°C with shaking, each of the three cultures was split when the two cultures reached an OD<sub>600</sub> of 0.2, and arabinose was added at a final concentration of 0.2%, or not (control). Cells were then incubated under the same conditions for five hours. Time point zero was set immediately after dilution. Each experiment was independently performed thrice, and the standard deviations (SDs) are shown.

Supplementary Table S1: Oligonucleotides used in this study.

Name	sequence 5'-3'	Site
Transcriptional organization: RT primer		
tcaC_RT_F	CGGTGAAGCCTATGTCTG	
tcaC_RT_R	CGCCGTAAATAGCCCTTG	
HolY_RT_F	GGAGGTTTGGTTTCGTTAC	
HolY_RT_R	CGGCGATGGCAAATGTC	
ElyY_RT_F	CGCGCTCTGACTCTAAG	
ElyY_RT_R	TGCAGCGGTAATCCATC	
yRz_RT_F	ACTGCGCTGTCACTGATG	
yRz_RT_R	CGCTCTAGCTCTTGAACC	
yRz1_RT_F	AACAAGCCATCGGTAACG	
yRz1_RT_R	GCATCGGGTTAATACCAG	
tccC_RT_F	CGCACTGGCTTATAATCG	
tccC_RT_R	CCAACCTCCGGCTCATAAG	
Recombinant plasmids		
toxIF46	GGAGAGCTCCCTGCATGCCATGCG	SacI
toxIR52	GCGATCTAGAGCGTAAATTGATCATGGG	XbaI
toxIR53	GCGATCTAGATTAGACATGGTAATTTTCCT	XbaI
ElyY_pBAD33_F	CGATGAGCTCATGCAAATGACAGCCCTCAG	SacI
ElyY_pBAD33_R	GCGATCTAGATCATGGGTAGACCTCTCTG	XbaI
ElyY-yRz1_pBAD33_R	GCGATCTAGACTATTGTTTTTGTGCTGTA	XbaI
HolY_pBAD33_F	CGATGAGCTCATGGACTTCTTAATCCTCGGCG	SacI
HolY_pBAD33_R	GCGATCTAGACTATGATTTAGGGGGTTGATG	XbaI
ElyY_pET28b_F	CGATCCATGGATGCAAATGACAGCCCTCAG	NcoI
ElyY_pET28b_R	CCGCTCGAGTGGGTAGACCTCTCTGGGTA	XhoI
Deletion of araA gene		
AraA.delR1	CCGGAATTCCTTGCTTGAATACGTCCATCG	EcoRI
AraA.delF1	CTATCGCCGGGATTTGTGG	
AraA.delF2	CCGGAATTCATTTCGCTGGAATGAAGTC	EcoRI
AraA.delR2	AGCGACGGATCTGATTTG	
AraA.nestedF	CGGGATCCGACATGTATGCCTGGTTC	BamHI
AraA.nestedR	CGGGATCCCCTAAACCATGCCATTG	BamHI
Holin complementation		
HolY_RBS_pRG_F	GCGATCTAGACTGACAGTCAACAATGATAG	XbaI
HolY_pRG_R	CCCAAGCTTCTATGATTTAGGGGGTTGATG	HindIII
Gene expression: qRT primer		
16S_Yersinia_qRT_f	AAATGCGTAGAGATCTGGAG	
16S_Yersinia_qRT_r	CAAGTCGACATCGTTTACAG	

HolY_qRT_f	GTCGTGGTTTCTGCTTTTAC	
HolY_qRT_r	AAACGATGCCAAAGATATTG	
ElyY_qRT_f	TATTCACCCCGACTTAGTGT	
ElyY_qRT_r	GCTATTGAGGGTTTTACTGC	
Spanins_qRT_f	AAAGCGGTGAACTACAAAAA	
Spanins_qRT_r	CAGGGAAAGGTAAACACTCA	
16S_Ecoli_qRT_f	AGCGTTAATCGGAATTACTG	
16S_Ecoli_qRT_r	CCCTCTACGAGACTCAAGC	

Supplementary Table S2: Accession numbers of proteins used for Fig. 1.

genome	holin accession number
<i>Y. enterocolitica</i> str. W22703	CAI77377.1
<i>Y. enterocolitica</i> str. T83	AAT90758.1
<i>Yersinia mollaretii</i>	WP_004875774.1
<i>Yersinia kristensenii</i>	WP_050116509.1
<i>Y. pestis</i> str. KIM	AAM83780.1
<i>Y. pestis</i> str. Angola	ABX88260.1
<i>Y. pseudotuberculosis</i> str. IP32953	CAH22792.1
<i>P. luminescens laumondii</i> TT01	CAE13263.1
<i>E. coli</i> O157:H7 str. EDL933	AAG55972.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	WP_047345313.1
<i>Xenorhabdus khoisanae</i>	WP_047964150
<i>C. violaceum</i> ATCC12472	AAQ 61208.1
Genome	endolysin accession number
<i>Y. enterocolitica</i> W22703	CAI77378.1
<i>Y. enterocolitica</i> T83	AAT90759.1
<i>Y. enterocolitica</i> 8081	CAL11745.1
<i>Y. pestis</i> Angola	ABX88135.1
<i>Y. pestis</i> KIM	AAM83781.1
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IP32953	CAH22793.1
<i>Chromobacter violaceum</i> ATCC12472	AAQ61207.1
<i>Erwinia amylovora</i>	



<i>Providencia stuartii</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Photobacterium luminescens</i>	
Phage PY100	CAJ28446.1
<i>E. coli</i> UTI89	ABE06417.1
<i>Shigella boydii</i> SB227	ABB66025.1

## 2.2 Publikation 2: „Lon protease- and temperature-dependent activity of a lysis cassette located in the insecticidal island of *Yersinia enterocolitica*.“

### Zusammenfassung

Die Gattung *Yersinia* enthält Pathogene, die in der Lage sind, sich in der Umwelt zu vermehren sowie Säugetiere zu infizieren. Der Stamm *Yersinia enterocolitica* W22703 weist sowohl eine insektizide als auch eine nematozide Aktivität auf, hervorgerufen durch einen dreigliedrigen Toxinkomplex, der durch die 19 kb große Pathogenitätsinsel Tc-PAI<sub>Ye</sub> kodiert wird. Alle *tc*-Gene unterliegen einer strikten Temperaturregulation: Sie werden bei 37°C unterdrückt und bei Temperaturen zwischen 10°C und 20°C aktiviert. Für die vier hochkonservierten phagenverwandten Gene, die innerhalb der Tc-PAI<sub>Ye</sub> liegen, wurde bereits nachgewiesen, dass sie für eine biologisch funktionale Holin-Endolysin-Kassette kodieren, welche ihren eigenen Wirt W22703 bei 37°C lysiert. Im Gegensatz zu *E. coli* führte eine Überproduktion von Holin und Endolysin im Stamm W22703 bei 15°C nicht zu einer Lyse der Zellen. Die Überexpression der Gene *holY* und *elyY* bei 15°C führte in vier *Y. enterocolitica* Biovarien und in vier anderen *Yersinia*-Spezies zu einem heterogenen Muster an Phänotypen vom Ausbleiben einer Lyse wie bei Biovar 1A bis hin zu einer vollständigen Einstellung des Wachstums bei dem Stamm *Y. kristensenii*. Um den molekularen Mechanismus hinter der temperaturabhängigen Lyse aufzuklären, wurde eine Lon-Protease-negative Mutante von W22703 erstellt. Eine Überexpression der Lysekassette führte in dieser auch bei 15°C zum Zelltod. Überexprimiertes Endolysin zeigte eine hohe proteolytische Anfälligkeit im Stamm W22703, jedoch eine Stabilität im Stamm W22703  $\Delta lon$  oder in *Y. pseudotuberculosis*. Obwohl die Experimente mittels Überexpression artifizielle Bedingungen darstellen, weisen die hier präsentierten Ergebnisse auf eine Rolle der Lon-Protease bei der Kontrolle der temperaturabhängigen Lyse in *Y. enterocolitica* W22703 hin.

## Originalpublikation



RESEARCH ARTICLE



## Lon Protease- and Temperature-Dependent Activity of a Lysis Cassette Located in the Insecticidal Island of *Yersinia enterocolitica*

Katharina Springer,<sup>a</sup> Philipp-Albert Sanger,<sup>b</sup> Angela Felsl,<sup>a</sup>  Thilo M. Fuchs<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>ZIEL-Institute for Food & Health and Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Department Biowissenschaftliche Grundlagen, Technische Universität München, Freising, Germany

<sup>b</sup>Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Molekulare Pathogenese, Jena, Germany

**ABSTRACT** The *Yersinia* genus comprises pathogens that can adapt to an environmental life cycle stage as well as to mammals. *Yersinia enterocolitica* strain W22703 exhibits both insecticidal and nematocidal activity conferred by the tripartite toxin complex (Tc) that is encoded on the 19-kb pathogenicity island Tc-PAI<sub>Y<sub>e</sub></sub>. All tc genes follow a strict temperature regulation in that they are silenced at 37°C but activated at lower temperatures. Four highly conserved phage-related genes, located within the Tc-PAI<sub>Y<sub>e</sub></sub> were recently demonstrated to encode a biologically functional holin-endolysin gene cassette that lyses its own host W22703 at 37°C. Conditions transcriptionally activating the cassette are not yet known. In contrast to *Escherichia coli*, the overproduction of holin and endolysin did not result in cell lysis of strain W22703 at 15°C. When the holin-endolysin genes were overexpressed at 15°C in four *Y. enterocolitica* biovars and in four other *Yersinia* spp., a heterogenous pattern of phenotypes was observed, ranging from lysis resistance of a biovar 1A strain to the complete growth arrest of a *Y. kristensenii* strain. To decipher the molecular mechanism underlying this temperature-dependent lysis, we constructed a Lon protease-negative mutant of W22703 in which the overexpression of the lysis cassette leads to cell death at 15°C. Overexpressed endolysin exhibited a high proteolytic susceptibility in strain W22703 but remained stable in the W22703  $\Delta$ lon strain or in *Y. pseudotuberculosis*. Although artificial overexpression was applied here, the data indicate that Lon protease plays a role in the control of the temperature-dependent lysis in *Y. enterocolitica* W22703.

**IMPORTANCE** The investigation of the mechanisms that help pathogens survive in the environment is a prerequisite to understanding their evolution and their virulence capacities. In members of the genus *Yersinia*, many factors involved in virulence, metabolism, motility, or biofilm formation follow a strict temperature-dependent regulation. While the molecular mechanisms underlying the activation of determinants at body temperature have been analyzed in detail, the molecular basis of low-temperature-dependent phenotypes is largely unknown. Here, we demonstrate that a novel phage-related lysis cassette, which is part of the insecticidal and nematocidal pathogenicity island of *Y. enterocolitica*, does not lyse its own host following overexpression at 15°C and that the Lon protease is involved in this phenotype.

**KEYWORDS** *Yersinia enterocolitica*, dual lysis cassette, Lon protease, low-temperature-dependent activity

*Yersinia enterocolitica* is a foodborne, psychrotolerant pathogen that causes a range of gastrointestinal diseases (1). Since pigs are the major animal source of yersiniae, yersiniosis is assumed to be transmitted from contaminated pork, especially minced

**Citation** Springer K, Sanger P-A, Felsl A, Fuchs TM, 2021. Lon protease- and temperature-dependent activity of a lysis cassette located in the insecticidal island of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 203:e00616-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00616-20>.

**Editor** George O'Toole, Geisel School of Medicine at Dartmouth

**Copyright** © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Thilo M. Fuchs, [thilom.fuchs@fli.de](mailto:thilom.fuchs@fli.de).

**Received** 10 November 2020

**Accepted** 30 November 2020

**Accepted manuscript posted online** 7 December 2020

**Published** 8 February 2021

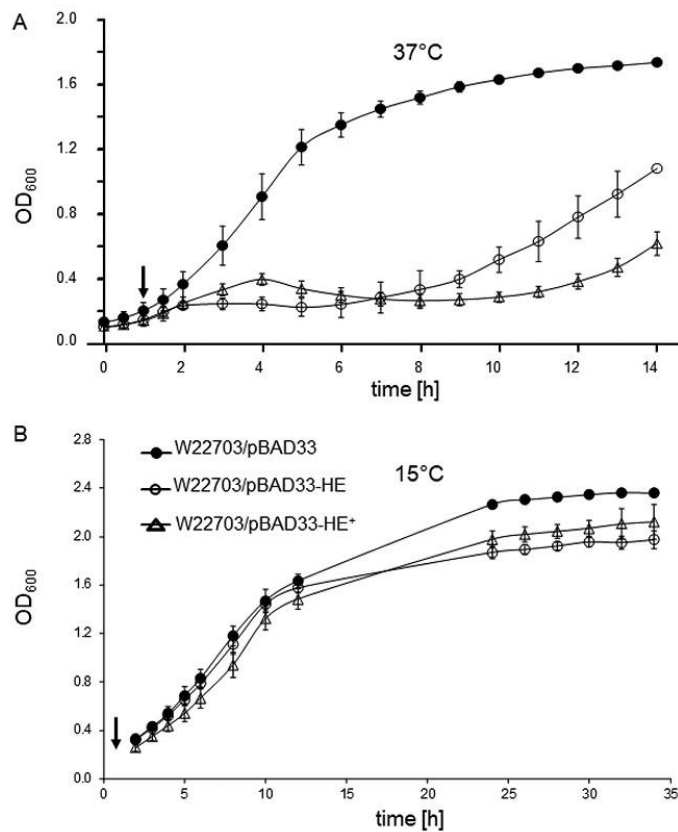
meat (2). *Y. enterocolitica* is widely spread in nature and can survive for extended periods in aquatic and terrestrial reservoirs at ambient temperature. The species *Y. enterocolitica* comprises six biovars (3), of which biovar 1A strains lacking *Yersinia* virulence plasmid pYV (4) are avirulent, whereas biovar 1B strains are highly virulent in humans and mice due to a pathogenicity island responsible for iron acquisition (5). Biovar 2 to 5 strains, which are predominately isolated in Europe and Japan, are weakly pathogenic and unable to kill mice (6). Biovar 2 strain W22703 has been experimentally demonstrated to be toxic against insect larvae and the nematode *Caenorhabditis elegans* (7–9), illustrating a multiphasic life cycle of this pathogen that allows its oscillation between invertebrates and vertebrates (10–12).

A key determinant that enables *Y. enterocolitica* strain W22703 to kill invertebrates is the pathogenicity island Tc-PAI<sub>ve</sub>. It encodes the tripartite, high-molecular-weight toxin complex (Tc) that was first characterized in the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* and acts on actin and Rho-GTPases of host cells through ADP-ribosylation (13). Tc-PAI<sub>ve</sub> was found in *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica*, excluding *Y. enterocolitica* biovars 1A and 1B, and in *Y. mollaretii* and *Y. similis*, whereas it is absent from the genomes of all other *Yersinia* species (14). The expression of the *tc* genes *tcaA*, *tcaB*, *tcaC*, and *tccC* in *Y. enterocolitica* strain W22703 occurs in a temperature-dependent manner. These genes are completely silenced at 37°C and activated at lower temperatures, with a maximal activation at 10°C (8). The molecular mechanism underlying the regulation of *tc* gene expression is mainly based on an antagonism between the regulator TcaR2 on the one hand and a complex of the DNA-binding protein H-NS, which is involved in gene silencing, and the *Yersinia* modulator of virulence, YmoA, on the other hand. At low temperatures, TcaR2 outcompetes H-NS/YmoA and activates transcription of the *tc* genes. At 37°C, the copy numbers of autoregulated TcaR2 are reduced, whereas the amount of functional YmoA increases, allowing the H-NS/YmoA complex to interact with the promoters of the *tc* genes and, thus, to inhibit their transcription (15, 16).

In addition to the *tc* genes, Tc-PAI<sub>ve</sub> carries two small phage-related genes coding for the putative holin HoLY and the endolysin ElyY and two open reading frames (ORFs) encoding a putative i-spanin and o-spanin, respectively, which we termed yersinial Rz and Rz1, in line with the phage lambda nomenclature (17, 18). It is assumed that the spanin complex contributes to the disruption of the outer membrane (19). The lysis cassette of strain W22703, with a total length of approximately 1.3 kb, is located between *tcaC* and *tccC* and is highly conserved in all Tc-PAI<sub>ve</sub> islands identified so far (14). No other phage-related genes are found in the neighborhood of Tc-PAI<sub>ve</sub>, suggesting the acquisition of Tc-PAI<sub>ve</sub> by a common ancestor of the pathogenic *Yersinia* strains via phage transduction or the stable propagation of a respective prophage relic due to an unknown selection pressure. Due to the lack of native conditions under which the holin and endolysin (HE) genes are induced, we established the overexpression of the lysis cassette via the pBAD system and demonstrated that the phage-related genes indeed code for a holin and an endolysin. By cell staining, we showed that growth stagnation at 37°C is caused by cell death upon lysis (17).

The presence of the putative i- and o-spanins indicated the attenuating effect of HE on yersinial growth. When heterologous hosts were used, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. frederiksenii*, *P. luminescens*, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium were revealed to be resistant to the overexpressed cassette (17). Although these data demonstrated the functionality of the lysis cassette from Tc-PAI<sub>ve</sub> in yersiniae, its biological role remains unclear.

In this study, we investigated the effects of the holin/endolysin cassette at environmental temperature, e.g., 15°C, following overexpression in *Y. enterocolitica* W22703 and related biovars and species. We demonstrated that the biological activity of the lysis cassette is abolished at low temperature in strain W22703, whereas other *Yersinia* species remained susceptible to lysis. Evidence is provided that the Lon protease blocks temperature-dependent lysis, probably by degrading the endolysin ElyY.

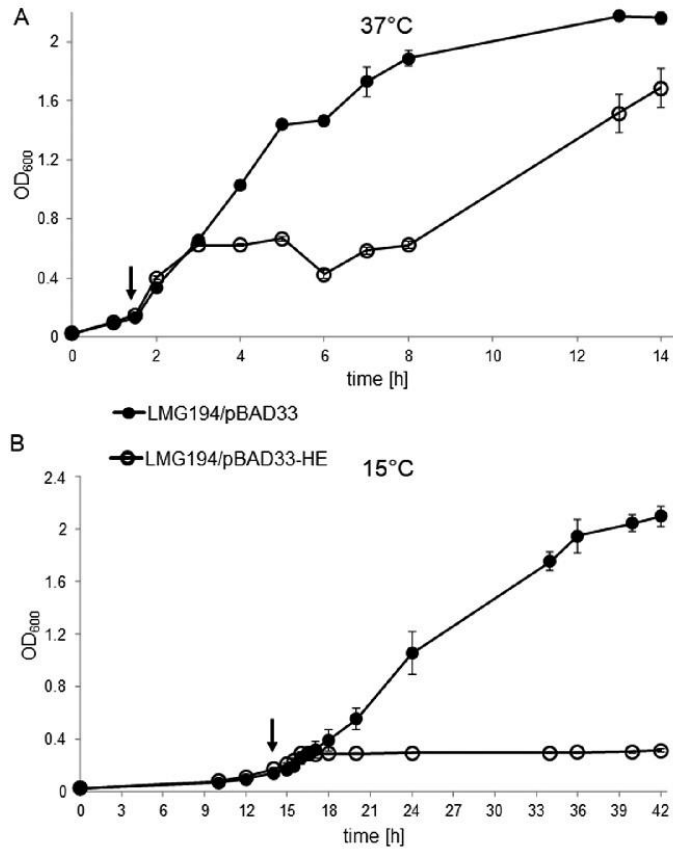


**FIG 1** Temperature-dependent activity of the lysis cassette in *Y. enterocolitica* W22703. W22703 cells were transformed with pBAD33, pBAD33-HE, and pBAD33-HE<sup>+</sup>. An overnight culture was diluted 1:1,000 in LB medium. Following incubation either at 37°C (A) or at 15°C (B) with shaking, arabinose was added at a final concentration of 0.2% when the cultures reached an OD<sub>600</sub> of 0.25, as indicated by the arrow. Time point zero was set immediately after dilution. Each experiment was biologically independently and performed thrice; error bars show the standard deviations.

## RESULTS

**The activity of the lysis cassette is high temperature dependent in *Y. enterocolitica* strain W22703.** To test the function of the lysis determinant, the HE genes alone or together with *yRz* and *yRz1* (HE<sup>+</sup>), respectively, were overexpressed using the plasmids pBAD33-HE and pBAD33-HE<sup>+</sup> in *Y. enterocolitica* W22703. At 37°C, the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) arrested and decreased within 2 h after the addition of 0.2% arabinose (Fig. 1A). At 15°C, however, the overexpression of the lysis genes had no significant effect on the growth phenotype of strain W22703, indicating that temperature is a major clue of the autolysis (Fig. 1B). Control cultures lacking arabinose and the proof of holin gene induction by arabinose at 15°C are shown in File S1A and B in the supplemental material.

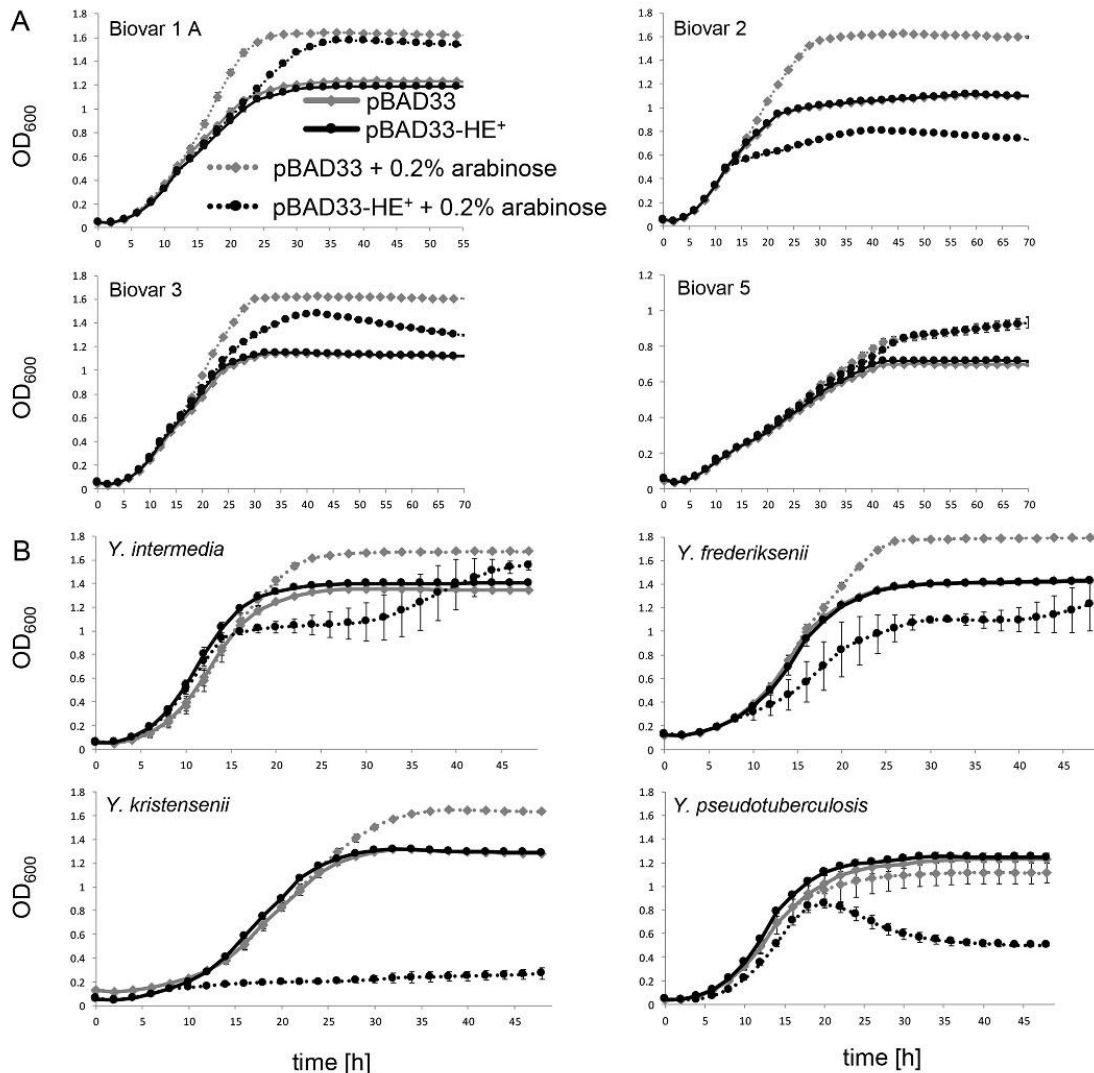
To further investigate the functionality of the lysis determinant in response to temperature, the HE genes were overexpressed using the plasmids pBAD33 and pBAD33-HE in the heterologous host *E. coli* strain LMG194 growing at 37°C and 15°C. At 37°C, growth arrested 2 h after the addition of arabinose and restarted 4 h later (Fig. 2A). Growth resumption can probably be attributed to the all-or-none induction of the arabinose promoter P<sub>BAD</sub> (20), resulting in selection for recombinant plasmid loss (17).



**FIG 2** Activity of the holin-endolysin cassette in *E. coli* LMG cells. *E. coli* LMG194 cells were transformed with pBAD33 and pBAD33-HE. An overnight culture was diluted 1:1,000 in LB medium. Following incubation at 37°C (A) or 15°C (B) with shaking, arabinose was added to a final concentration of 0.2% at an OD<sub>600</sub> of 0.2 (arrows). Time point zero was set immediately after dilution. Each experiment was independently performed thrice; standard deviations are indicated by error bars.

At 15°C, the OD<sub>600</sub> stagnated within the first 3 h after addition of 0.2% arabinose and did not resume until at least 27 h later, probably due to the longer generation time at low temperature (Fig. 2B). Taken together, these data demonstrate that the lysis cassette from Tc-PAI<sub>96</sub> is functional in *Y. enterocolitica* W22703 at 15°C but not at 37°C. In contrast, the heterologous host *E. coli* LMG194 is lysed by the yersinial cassette at both temperatures.

**Overexpression of the lysis cassette in *Yersinia* spp. at 15°C.** To investigate the activity of the lysis genes at 15°C in *Yersinia* spp., pBAD-33 and pBAD33-HE<sup>+</sup>, including the i-spanin *yRz* and the o-spanin *yRz1*, were tested in representatives of *Y. enterocolitica* biovars 1A, 2, 3, and 5, in *Y. pseudotuberculosis*, and in the apathogenic *Yersinia* species *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, and *Y. kristensenii*. At 15°C, the overexpression of the lysis cassette HE<sup>+</sup> had no significant effect on the growth of the *Y. enterocolitica* biovar 5 strain compared to the control strain equipped with pBAD33 ( $P=0.2131$ ) but reduced the maximal cell density of biovar 2 and biovar 3 strains and attenuated the growth of a biovar 1A strain during the exponential phase ( $P=0.0040$ ) (Fig. 3A). These data are in contrast to similar experiments performed at 37°C that showed more drastic effects of HE<sup>+</sup> overexpression (17).



**FIG 3** Overexpression of the holin-endolysin cassette in *Yersinia* spp. at 15°C. (A) Plasmids pBAD33 and pBAD33-HE<sup>+</sup> were transformed into *Y. enterocolitica* biovar 1A, 2, 3, and 5 strains. Overnight cultures were diluted in LB medium to an OD<sub>600</sub> of 0.07, and measurements were performed in microtiter plates incubated at 15°C with shaking. Induction with 0.2% (wt/vol) arabinose was performed at an OD<sub>600</sub> of 0.2. (B) *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, and *Y. pseudotuberculosis* were tested in a similar manner. Cultivation was performed in the absence or presence of arabinose as indicated. The standard deviations from three independently performed experiments are shown.

When the plasmids were tested in other *Yersinia* species, a significant growth retardation upon HE<sup>+</sup> induction was observed in *Y. intermedia* ( $P=0.0399$ ) and *Y. frederiksenii* ( $P=0.0171$ ) (Fig. 3B). In *Y. pseudotuberculosis*, we monitored a strong decrease of the OD<sub>600</sub> from 0.82 to 0.49, and growth did not resume during growth monitoring for 48 h. The strongest effect of HE<sup>+</sup> was observed with *Y. kristensenii* (Fig. 3B) and *S. Typhimurium* (File S2), whose growth arrested immediately after the addition of arabinose and resumed 15 h later only in the case of the *S. Typhimurium* culture. Growth retardation to different extents was also observed with *Y. ruckeri* ( $P=0.0404$ ), *Y. aldovae* ( $P=0.0042$ ), *Y. bercovieri* ( $P=0.0441$ ), and *Y. mollaretii*



( $P = 0.0252$ ) (File S2). When the construct lacking *yRz* and *yRz1* (HE) was used, no qualitative deviations from the phenotypes seen with pBAD-HE<sup>+</sup> were observed (data not shown). The nonrecombinant plasmid pBAD33, used as a control, exhibited no effect on the growth behavior of all strains tested in medium with or without arabinose. The addition of arabinose stimulated the growth of most strains, as observed previously (17).

Because Tc-PAI<sub>ve</sub> is present only in *Y. enterocolitica* biovars 2 to 5, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. mollaretii* but absent from all other strains investigated here, there is no correlation between the presence of Tc-PAI<sub>ve</sub> and the lytic capacities of the HE cassette. Taken together, a temperature-dependent activity of the lysis cassette was observed only in *Y. enterocolitica* strains, pointing to a species-specific mechanism underlying this lysis phenomenon.

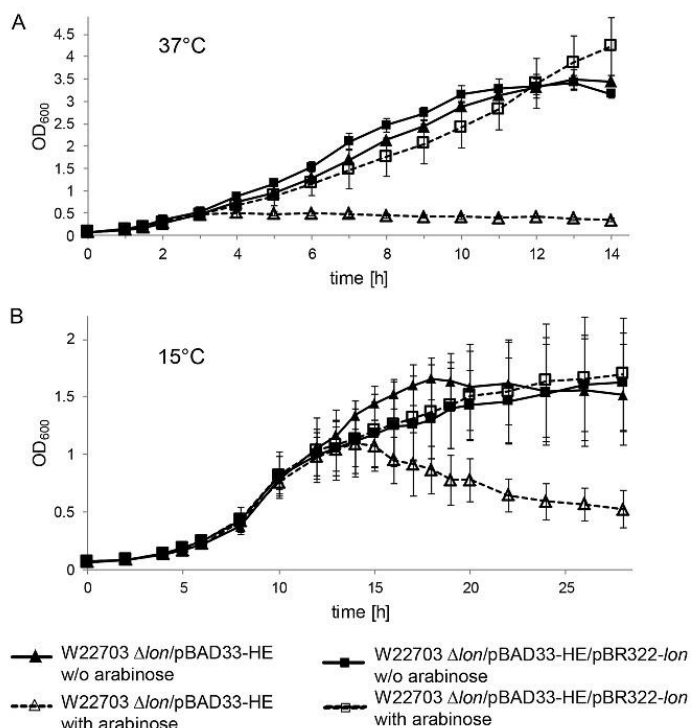
**Lon protease contributes to temperature-dependent activity of the lysis cassette.** The proteases Lon and ClpP are known to contribute to temperature-dependent gene regulation, as exemplified by RovA (21, 22). In particular, RovA acts as a proteinaceous thermometer whose conformation at body temperature results in a higher susceptibility to the Lon protease. Therefore, we tested whether or not these two proteases play a role in the lysis phenotypes described above. Nonpolar deletion mutants of their genes were constructed, and the resulting W22703  $\Delta lon$  and W22703  $\Delta clpP$  strains were transformed with pBAD33-HE. Compared with results shown in Fig. 1A, the growth curve of W22703  $\Delta clpP$ /pBAD33-HE did not exhibit a strong phenotype in preliminary experiments (File S3).

The growth behavior of strain W22703  $\Delta lon$ /pBAD33-HE at 37°C was monitored in the absence or presence of arabinose (Fig. 4A). Cell proliferation was stopped upon HE overexpression due to the addition of arabinose. Compared with the graphs shown in Fig. 1A, the effect of HE overexpression was more pronounced, as growth did not restart until at least the end of the experiment, 14 h after inoculation. However, when the same strain was incubated at 15°C, arabinose-induced overexpression of HE resulted in growth arrest and cell lysis until at least 27 h after inoculation, when the noninduced culture reached the stationary phase. As a control, the growth of strain W22703  $\Delta lon$ /pBAD33-HE was not restricted in the absence of arabinose (Fig. 4B). This activity of the lysis cassette at 15°C in the absence of *lon* is in clear contrast to the data shown in Fig. 1B. To further validate this finding, strain W22703  $\Delta lon$ /pBAD33-HE was equipped with plasmid pBR322-*lon* to complement the lack of the *lon* gene. We observed that cell lysis of strain W22703  $\Delta lon$ /pBAD33-HE at low temperature and with arabinose was completely abolished by adding the medium-copy-number plasmid pBR322 carrying *lon* (Fig. 4B). These data indicate that the Lon protease contributes to the lysis effect at 15°C, possibly by degrading the holin and/or the endolysin. In the following section, we focus on endolysin, because holin is a relatively small protein of approximately 12 kDa that is hardly separated or visible on SDS gels.

**Longer half-life of ElyY in the absence of Lon protease.** To test the hypothesis that the Lon protease targets ElyY, we cultivated the strains W22703/pET28b-*elyY*/pTARA and W22703 $\Delta lon$ /pET28b-*elyY*/pTARA in LB medium at 30°C until an OD<sub>600</sub> of 0.6. The helper plasmid pTARA provides T7 RNA polymerase required for transcription of *elyY*, which was induced with 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). The cultures were incubated at 30°C for 4 h and split into four aliquots, two of which were further cultivated at 15°C and 37°C, respectively. To inhibit protein biosynthesis, 50  $\mu$ g/ml tetracycline was added to one culture at each temperature. Samples of 1 ml each were taken after 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, and 300 min, and the amounts of ElyY-His<sub>6</sub> were determined by Western blotting.

In the absence of tetracycline, a steady amount of endolysin was measured for 5 h at both temperatures. After adding the antibiotic to the culture of strain W22703/pET28b-*elyY*/pTARA, successive degradation of ElyY was detected to 20.7% at 37°C and to 58.8% at 15°C with respect to the amount measured at time zero (Fig. 5A). In the case of strain W22703 $\Delta lon$ /pET28b-*elyY*/pTARA lacking the Lon protease, almost no



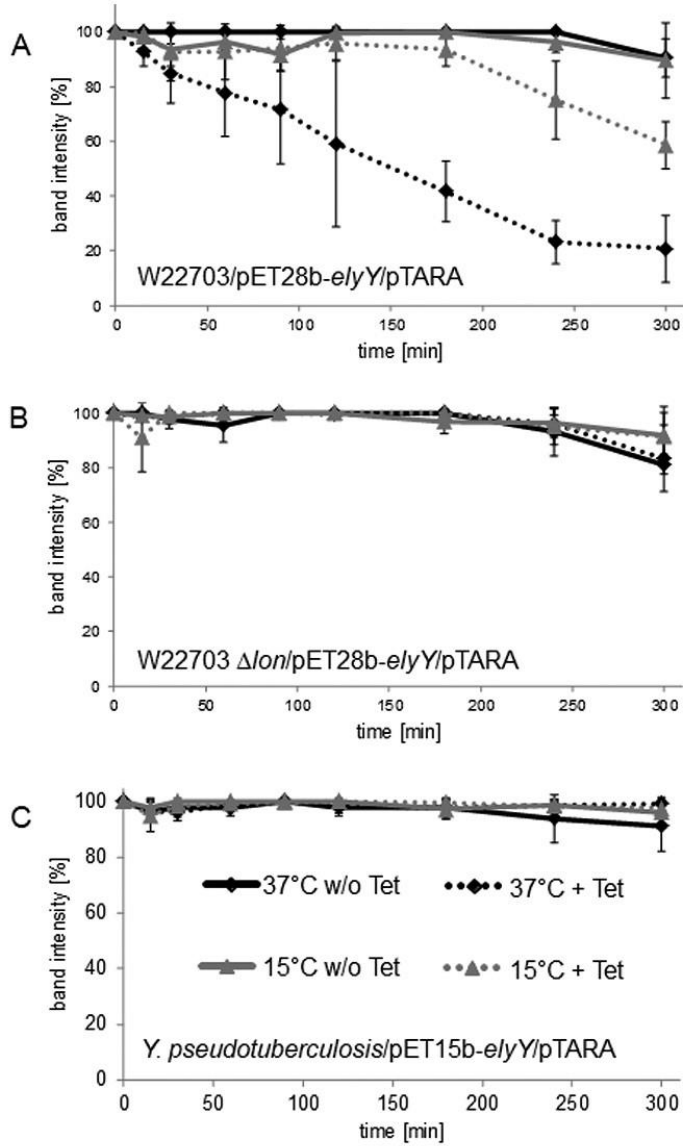


**FIG 4** Effect of holin-endolysin overexpression in *Y. enterocolitica* W22703 cells in the absence of protease Lon. (A) Using the plasmid pBAD33-HE, the overexpression of holin and endolysin in the W22703  $\Delta lon$  mutant was tested at 37°C in three biologically independent experiments. The resulting strain was transformed with pBR322-*lon* for complementation of the *lon* deletion. As controls, both strains were grown in the absence of arabinose. Growth was monitored in 50 ml LB medium under shaking, and 0.2% arabinose was added at an  $OD_{600}$  of 0.2. (B) The growth experiment was performed at 15°C. Controls with nonrecombinant plasmid pBR322 are shown in File S6. Three biologically independent cultures were measured at both temperatures.

reduction of ElyY amounts was observed at either temperature, indicating that the Lon protease is responsible for ElyY degradation (Fig. 5B). The short half-life of the endolysin ElyY at 37°C could explain why, at this temperature, growth of W22703 restarts following lysis (Fig. 1), in contrast to that of the W22703  $\Delta lon$  strain at the same temperature.

The stability of Lon protease was investigated in the same manner. At 15°C, nearly identical amounts of the proteolytic enzymes were monitored in the presence or absence of tetracycline. In contrast, a rapid decline of the protease amount was detected at 37°C until complete degradation 120 min after the addition of the antibiotic (File S4). These data support the hypothesis that different stabilities of the Lon protease contribute to the temperature-dependent lysis of *Y. enterocolitica* cells upon HE overexpression.

Finally, we tested the stability of ElyY overexpressed in *Y. pseudotuberculosis*, in which lysis occurred at both temperatures upon overexpression of HE (Fig. 3B) (17). We transformed the plasmids pET15b-*elyY* and pTARA into *Y. pseudotuberculosis* and performed the same experiment as that described above. Following the addition of tetracycline, no significant decrease of the amount of ElyY was observed at either 15°C ( $P=0.2231$ ) or 37°C ( $P=0.3054$ ) (Fig. 5C). This result is in contrast to the findings made with *Y. enterocolitica* strain W22703 in Fig. 5A and B



**FIG 5** Stability of ElyY. Cultures of *Y. enterocolitica* W22703/pET28b-elyY/pTARA (A), W22703  $\Delta lon$ /pET28b-elyY/pTARA (B), and *Y. pseudotuberculosis* (C) were grown in 200 ml LB medium to exponential phase ( $OD_{600}$  of 0.6) at 30°C before IPTG was added to a final concentration of 1 mM. After incubation for an additional 3 h, the cultures were divided into four samples, and tetracycline (50  $\mu$ g/ml) was added to two of them to inhibit protein biosynthesis. The samples were then incubated at 37°C or at 15°C. Aliquots were taken at the indicated time points, and equilibrated amounts of total protein were loaded onto an 18% Tricine-SDS polyacrylamide gel. The amount of ElyY was quantified by Western blotting. Three independent experiments were performed for each temperature.

but in line with the lysis of *Y. pseudotuberculosis* upon HE overexpression at 15°C (Fig. 3B).

## DISCUSSION

Members of the genus *Yersinia* are well known to regulate their virulence toward mammals in a temperature-dependent manner. For example, the Yop effector proteins and the adhesin YadA are produced at body temperature (23, 24). In *Y. pestis* and in *Y. pseudotuberculosis*, the transcript of the virulence regulator gene *lcrF* serves as an RNA thermometer. While the mRNA of *lcrF* forms a secondary structure that masks the Shine-Dalgarno sequence in a stem-loop at 25°C, it melts at higher temperatures and allows the translation of the *lcrF* mRNA (22, 25). Another example is the transcription of the invasion gene *inv*, which is activated by the regulatory protein RovA at 25°C in both *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* (26–28). Levels of active RovA are low at 37°C and high at 25°C due to the characteristic of RovA as a proteinaceous thermometer that undergoes conformational changes at 37°C, reducing its DNA-binding capacity and rendering it more susceptible to degradation by the Lon protease (21).

In contrast, a large part of the *Yersinia* gene set is transcriptionally activated at temperatures below 37°C, pointing to environmental surroundings that yersiniae encounter during their life cycles (9, 11). For example, genes of yersiniae that are more strongly expressed at temperatures below 25°C than at 37°C are involved in the synthesis of lipopolysaccharides, iron scavenging systems, and biofilms (29–31). Low-temperature-induced determinants of pathogenic *Yersinia* species are also involved in chemotaxis, central metabolism, anaerobic respiration, hemin storage, amino acid metabolism, and substrate transport (12, 32, 33). The most prominent example is the Tc of *Y. enterocolitica* that is responsible for the insecticidal and nematocidal activity of strain W22703 (7, 8). The *tc* genes, which are located on the pathogenicity island Tc-PAI<sub>Yer</sub>, are transcriptionally silenced at 37°C but maximally activated at 10°C to 15°C. The underlying molecular mechanism is based on an antagonism between the inducer TcaR2 and the repression complex YmoA/H-NS (15, 16). In contrast to *inv* regulation by RovA, the conformation of TcaR2 is not affected by temperature changes. The regulatory model proposes a higher oligomerization rate of H-NS at lower temperature, allowing the YmoA/H-NS complex to interact with multiple DNA binding sites of the *tc* promoters, thereby forming a DNA bridge that blocks insecticidal gene transcription at low temperatures (15).

The four phage-related genes located on the insecticidal island are a biologically functional holin-endolysin system upon overexpression via the arabinose-inducible vector pBAD at 37°C (17) and, therefore, might play a role in the release of toxic factors. Here, we performed growth assays at 15°C and observed lysis in different *Yersinia* species and in *E. coli*, but not in *Y. enterocolitica* strains, following HE overexpression. An explanation is that the murein of *Y. enterocolitica*, the primary target of ElyY (17), is resistant to HE activity at low temperature. Another possibility tested here is a temperature-dependent proteolytic degradation of components of the lysis cassette. Indeed, a lack of the Lon protease resulted in growth arrest of strain W22703 at 15°C that had not been observed for the parental strain. At 37°C, the lack of *lon* intensified the phenotype of growth arrest and cell lysis, as monitored in Fig. 1A. Both of these lysis phenotypes were abolished when the *lon* gene was provided in *trans* via plasmid pBR322-*lon*, which has a middle copy number (34). These findings led to the assumption that the Lon protease degrades the holin and/or the endolysin at 15°C but not at 37°C. The data provided in Fig. 5 do not indicate a higher stability of ElyY at 37°C, but the Lon protease seems to be less stable at higher temperature. Although this effect seems to be compensated by sufficient protease expression, as demonstrated in File S4 in the supplemental material, a higher Lon protease stability at 15°C might contribute to a lack of W22703 cell lysis despite HE overexpression.

At both temperatures tested here, the overexpression of ElyY revealed the high

stability of this enzyme in *Y. pseudotuberculosis*, in contrast to its increased proteolytic susceptibility in *Y. enterocolitica* strain W22703 at both temperatures, an observation that is in line with the lytic phenotypes of *Y. pseudotuberculosis* at 15°C (Fig. 3B) and 37°C (17). The reason for the longer half-life of ElyY in *Y. pseudotuberculosis* is unknown. In *Y. pseudotuberculosis*, the Lon protease is significantly more strongly expressed at 37°C than at 25°C (21). With respect to RovA, it is assumed that thermally induced conformational changes and/or DNA binding blocks degradation of RovA by Lon and Clp proteases at 25°C and that partial defolding/inactivation of the RovA protein further improves cofactor binding and allows better access of the proteases (21). Given the overall identity of the Lon proteins from *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*, additional factors rather than substrate specificity might be responsible for the different half-lives in the two species. A difference between the two pathogens in protein stability was also observed with YmoA, which is stable in *Y. enterocolitica* strain W22703 at both 15°C and 37°C (15) but degraded in *Y. pseudotuberculosis* at body temperature (25).

Native conditions under which the HE cassette of Tc-PAI<sub>Y<sub>e</sub></sub> is expressed have not yet been identified. This prompted us to establish an artificial system based on the overexpression of the lytic genes that, despite its limitations, allowed several conclusions. (i) The Lon protease degrades the endolysin ElyY. (ii) Adding higher copy numbers of Lon via pBR322 prevents cell lysis completely, suggesting that the protease has similar activity at 15°C and 37°C. (iii) The Lon protease is less stable at 37°C than at 15°C, a finding that points to a conformational change, as observed for RovA. (iv) *Y. enterocolitica* cells are less susceptible to HE-mediated cell lysis at 15°C than at 37°C. Under native conditions, cell lysis at 37°C is probably prevented by a tight repression of the HE cassette. To conclude, we propose that the HE cassette is induced only during infection under environmental conditions and contributes to the insecticidal activity in a manner that does not require cell lysis for Tc release.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** Bacterial strains and oligonucleotides used in this study are listed in Table 1 and in File S5 in the supplemental material, respectively. Cultures were grown in LB broth (containing 10 g/liter tryptone, 5 g/liter yeast extract, and 5 g/liter NaCl) or on LB agar (LB broth supplemented with 1.5% agar). *E. coli* was grown at 37°C and *Yersinia* spp. at 30°C or as indicated. For growth studies, overnight cultures were diluted to an OD of 0.07 in 200-ml flasks with 50 ml medium and incubated under vigorous shaking or in microtiter plates with 200  $\mu$ l per well. If necessary, kanamycin (50  $\mu$ g/ml), streptomycin (50  $\mu$ g/ml), chloramphenicol (20  $\mu$ g/ml), tetracycline (12  $\mu$ g/ml), nalidixic acid (20  $\mu$ g/ml), ampicillin (150  $\mu$ g/ml), IPTG (1 mM), or 0.2% (wt/vol) arabinose was added to the medium.

**Standard procedures.** DNA manipulation and chromosomal DNA isolation were performed according to standard procedures (34) or to the manufacturer's protocol. PCR was performed using Thermoprime Taq polymerase (ABgene, Hamburg, Germany) via the following protocol: 95°C for 2 min; 30 cycles at 95°C for 10 s, annealing temperature depending on oligonucleotides for 30 s, and 72°C for 20 to 180 s depending on the expected fragment length; and final extension at 72°C for 10 min. Chromosomal DNA (100 ng) was used as the template.

Conjugational transfer was performed using the mobilizing *E. coli* strain SM10 as the donor for matings (35, 36). The T7 RNA polymerase-expressing helper plasmid pTARA was used to allow pET-plasmid driven gene expression within *Yersinia* spp.

Protein biosynthesis of bacterial cultures in exponential phase was stopped by adding 50  $\mu$ g/ml tetracycline. Subsequently, cultures were incubated at either 15°C or 37°C, and samples were taken at the indicated time points. Protein concentration was determined using RotiQuant solution (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) based on Bradford's method (37).

Student's *t* test was applied for statistical evaluations; *P* values of  $\leq 0.05$  were considered significant.

**Recombinant plasmids and strains.** The plasmid pET15b-elyY was generated using NdeI and BamHI. The in-frame deletion of *lon* was performed using the suicide plasmid pKNG101, into which two fragments flanking *lon* were cloned. Strain W22703  $\Delta$ *lon* then was generated via a previously described procedure (8). The deletion was confirmed by sequencing. All oligonucleotides used for these constructs are listed in File S5.

**Immunoblotting.** To prepare *Y. enterocolitica* protein extracts, culture samples were pelleted at 13,200 rpm for 1 min. The pellet was boiled in 100  $\mu$ l 1 $\times$  Laemmli buffer for 5 min at 100°C and stored at -20°C. After centrifugation at 4°C, aliquots of the supernatant were subjected to 18% Tricine-SDS polyacrylamide gel electrophoresis, and separated proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Merck, Darmstadt, Germany) with a semidry blot apparatus. The prestained protein ladder



**TABLE 1** Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or relevant feature(s)	Reference or source
<i>E. coli</i>		
LMG194	F <sup>-</sup> $\Delta$ lacX74 galE thi rpsL $\Delta$ phoA (Pvull) $\Delta$ ara714 leu::Tn10	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
SM10	lacY tonA recA Mu <sub>c</sub> <sup>+</sup> thi thr leu supE RP4-2–Tc::Mu Km <sup>r</sup> $\lambda$ pir	35
<i>Y. enterocolitica</i>		
W22703	Nal <sup>r</sup> Res <sup>-</sup> Mod <sup>+</sup> pYV <sup>-</sup>	38
W22703 $\Delta$ lon	Nonpolar deletion mutant of <i>lon</i> encoding ATP-depending protease Lon	This study
SZ4331/97	Biovar 1A, O:14, Tc-PAI <sub>ve</sub> negative	Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
H692/94	Biovar 2, O:9, Tc-PAI <sub>ve</sub> positive	Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
H230/89	Biovar 3, O:5, 27, Tc-PAI <sub>ve</sub> positive	Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
519-36/88	Biovar 5, O:2a, 2b, 3	Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
<i>Yersinia</i> spp.		
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	CIP 55.85	Collection Institute Pasteur
<i>Y. intermedia</i>	CIP 80.28	Collection Institute Pasteur
<i>Y. kristensenii</i>	CIP 80.30	Collection Institute Pasteur
<i>Y. frederiksenii</i>	CIP 80.29	Collection Institute Pasteur
<i>Y. ruckeri</i>	CIP 80.20	Collection Institute Pasteur
<i>Y. aldovae</i>	CIP 103162	Collection Institute Pasteur
<i>Y. bercovieri</i>	CIP 103323	Collection Institute Pasteur
<i>Y. mollaretii</i>	CIP 103324	Collection Institute Pasteur
Plasmids		
pKNG101	Conditionally replicating vector; R6K origin, mobRK2 transfer origin, sucrose-inducible <i>sacB</i> , Str <sup>r</sup>	37
pBAD33	Arabinose-inducible promoter, Cam <sup>r</sup>	20
pBAD33-HE	772-bp fragment comprising the holin and endolysin genes cloned into pBAD33 via SacI and XbaI	17
pBAD33-HE <sup>+</sup>	1,310-bp fragment comprising the HE cassette and <i>yRz</i> and <i>yRz1</i> cloned into pBAD33 via SacI and XbaI	17
pET28b	Expression vector; IPTG-inducible T7lac promoter, N- and C-terminal polyhistidine tag, Kan <sup>r</sup> <i>lacI</i> ; pBR322 origin	Merck, Darmstadt, Germany
pET28b-elyY	Plasmid for endolysin gene overexpression; <i>elyY</i> cloned into IPTG-inducible pET28b via NcoI and XhoI; C-terminal polyhistidine tag	17
pET15b	Expression vector; T7 promoter, N-terminal polyhistidine tag, Amp <sup>r</sup> <i>lacI</i> ; pBR322 origin	Merck, Darmstadt, Germany
pET15b-elyY	Plasmid for endolysin gene overexpression; <i>elyY</i> cloned into IPTG-inducible pET15b via NdeI and BamHI; N-terminal polyhistidine tag	This study
pTARA	pBAD33-derived plasmid carrying the gene for arabinose-inducible T7 RNA polymerase; Cam <sup>r</sup>	Addgene, Cambridge, MA
pBR322	Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	39
pBR322- <i>lon</i>	Plasmid to complement gene deletion of protease Lon; <i>lon</i> cloned into pBR322 via PstI; Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	This study

of Fermentas/ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Germany, was used as a marker. If appropriate, the membrane was blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline (TBS) with 0.1% Tween 20 containing 5% milk powder. The antibodies (primary antibodies, monoclonal mouse anti-His<sub>6</sub> tag antibody [Invitrogen], polyclonal rabbit anti-LONP1 [Sino Biological], and monoclonal mouse anti-GroEL [Enzo Life Sciences]; secondary antibodies, horseradish peroxidase [HRP]-conjugated goat anti-mouse antibody [Dianova, Hamburg, Germany; ThermoFisher] and HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody [ThermoFisher Scientific]) were diluted 1:2,000 or 1:10,000 in TBS with Tween 20 (TBST) containing 10% fetal calf serum (FCS). Proteins were detected using the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (ThermoFisher, Waltham, MA). The signals were monitored with a Lumina *in vivo* imaging system (IVIS) and quantified with Living Image 3.0 software (Xenogen, CA).

#### SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 2.1 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to T.M.F. (FU375/4-2).

We thank Josefine Bach for technical assistance.

We have no conflicts of interest to declare.

## REFERENCES

1. Bottone EJ. 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect* 1:323–333. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)80028-8](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(99)80028-8).
2. Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H. 2006. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47:315–329. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00095.x>.
3. Wauters G, Kandolo K, Janssens M. 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* 9:14–21.
4. Tennant SM, Skinner NA, Joe A, Robins-Browne RM. 2003. *Yersinia enterocolitica* biotype 1A: not as harmless as you think. *Adv Exp Med Biol* 529:125–128. [https://doi.org/10.1007/0-306-48416-1\\_24](https://doi.org/10.1007/0-306-48416-1_24).
5. Schubert S, Rakin A, Heesemann J. 2004. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* 294:83–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.026>.
6. Wren BW. 2003. The *Yersinia*—a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 1:55–64. <https://doi.org/10.1038/nrmicro730>.
7. Spanier B, Starke M, Higel F, Scherer S, Fuchs TM. 2010. *Yersinia enterocolitica* infection and *tcaA*-dependent killing of *Caenorhabditis elegans*. *Appl Environ Microbiol* 76:6277–6285. <https://doi.org/10.1128/AEM.01274-10>.
8. Bresolin G, Morgan JA, Ilgen D, Scherer S, Fuchs TM. 2006. Low temperature-induced insecticidal activity of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 59:503–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04916.x>.
9. Springer K, Sanger PA, Moritz C, Felsl A, Rattei T, Fuchs TM. 2018. Insecticidal toxicity of *Yersinia frederiksenii* involves the novel enterotoxin Yact. *Front Cell Infect Microbiol* 8:392. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00392>.
10. Fuchs TM, Brandt K, Starke M, Rattei T. 2011. Shotgun sequencing of *Yersinia enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O:9): genomic evidence for oscillation between invertebrates and mammals. *BMC Genomics* 12:168. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-168>.
11. Heermann R, Fuchs TM. 2008. Comparative analysis of the *Photorhabdus luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. *BMC Genomics* 9:40. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-40>.
12. Bresolin G, Neuhaus K, Scherer S, Fuchs TM. 2006. Transcriptional analysis of long-term adaptation of *Yersinia enterocolitica* to low-temperature growth. *J Bacteriol* 188:2945–2958. <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.2945-2958.2006>.
13. Lang AE, Schmidt G, Schlosser A, Hey TD, Larrinua IM, Sheets JJ, Mannherz HG, Aktories K. 2010. *Photorhabdus luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science* 327:1139–1142. <https://doi.org/10.1126/science.1184557>.
14. Fuchs TM, Bresolin G, Marciniowski L, Schachtner J, Scherer S. 2008. Insecticidal genes of *Yersinia* spp.: taxonomical distribution, contribution to toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution. *BMC Microbiol* 8:214. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-214>.
15. Starke M, Fuchs TM. 2014. YmoA negatively controls the expression of insecticidal genes in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 92:287–301. <https://doi.org/10.1111/mmi.12554>.
16. Starke M, Richter M, Fuchs TM. 2013. The insecticidal toxin genes of *Yersinia enterocolitica* are activated by the thermolabile LTR-like regulator TcaR2 at low temperatures. *Mol Microbiol* 89:596–611. <https://doi.org/10.1111/mmi.12296>.
17. Springer K, Reuter S, Knüpfer M, Schmauder L, Sanger P-A, Felsl A, Fuchs TM. 2018. Activity of a holin-endolysin system in the insecticidal pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 200:e00180-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00180-18>.
18. Young R, Way J, Way S, Yin J, Syvanen M. 1979. Transposition mutagenesis of bacteriophage lambda: a new gene affecting cell lysis. *J Mol Biol* 132:307–322. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90262-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90262-6).
19. Young R. 2014. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol* 52:243–258. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z>.
20. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177:4121–4130. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995>.
21. Herbst K, Bujara M, Heroven AK, Opitz W, Weichert M, Zimmermann A, Dersch P. 2009. Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA. *PLoS Pathog* 5:e1000435. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000435>.
22. Hoe NP, Goguen JD. 1993. Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J Bacteriol* 175:7901–7909. <https://doi.org/10.1128/jb.175.24.7901-7909.1993>.
23. Cornelis G, Sluiter C, de Rouvoit CL, Michiels T. 1989. Homology between virF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J Bacteriol* 171:254–262. <https://doi.org/10.1128/jb.171.1.254-262.1989>.
24. Skurnik M, Toivanen P. 1992. LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 174:2047–2051. <https://doi.org/10.1128/jb.174.6.2047-2051.1992>.
25. Böhme K, Steinmann R, Kortmann J, Seekircher S, Heroven AK, Berger E, Pisano F, Thiermann T, Wolf-Watz H, Narberhaus F, Dersch P. 2012. Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog* 8:e1002518. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002518>.
26. Nagel G, Lahrz A, Dersch P. 2001. Environmental control of invasive expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol* 41:1249–1269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02522.x>.
27. Revell PA, Miller VL. 2000. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol* 35:677–685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01740.x>.
28. Ellison DW, Miller VL. 2006. H-NS represses *inv* transcription in *Yersinia enterocolitica* through competition with RovA and interaction with YmoA. *J Bacteriol* 188:5101–5112. <https://doi.org/10.1128/JB.00862-05>.
29. Straley SC, Perry RD. 1995. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends Microbiol* 3:310–317. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)88960-x](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)88960-x).
30. Marceau M. 2005. Transcriptional regulation in *Yersinia*: an update. *Curr Issues Mol Biol* 7:151–177.
31. Perry RD, Bobrov AG, Kirillina O, Jones HA, Pedersen L, Abney J, Fetherston JD. 2004. Temperature regulation of the hemin storage (Hms<sup>+</sup>) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. *J Bacteriol* 186:1638–1647. <https://doi.org/10.1128/jb.186.6.1638-1647.2004>.
32. Han Y, Zhou D, Pang X, Song Y, Zhang L, Bao J, Tong Z, Wang J, Guo Z, Zhai J, Du Z, Wang X, Zhang X, Wang J, Huang P, Yang R. 2004. Microarray analysis of temperature-induced transcriptome of *Yersinia pestis*. *Microbiol Immunol* 48:791–805. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03605.x>.
33. Motin VL, Georgescu AM, Fitch JP, Gu PP, Nelson DO, Mabery SL, Garnham JB, Sokhansanj BA, Ott LL, Coleman MA, Elliott JM, Kegelmeyer LM, Wyrobek AJ, Slezak TR, Brubaker RR, Garcia E. 2004. Temporal global changes in gene expression during temperature transition in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 186:6298–6305. <https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6298-6305.2004>.
34. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
35. Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Nat Biotechnol* 1:784–791. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>.

36. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172:6557–6567. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6557-6567.1990>.
37. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109:137–141. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90599-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90599-7).
38. Cornelis G, Colson C. 1975. Restriction of DNA in *Yersinia enterocolitica* detected by recipient ability for a derepressed R factor from *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 87:285–291. <https://doi.org/10.1099/00221287-87-2-285>.
39. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95–113. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(77\)90000-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(77)90000-2).

**SUPPLEMENTAL MATERIAL FOR PUBLICATION**

Supplemental File 1: A) Control curves to Fig. 1; B) qPCR to quantify the *holY* mRNA at 15°C.

Supplemental File 2: Additional growth curves.

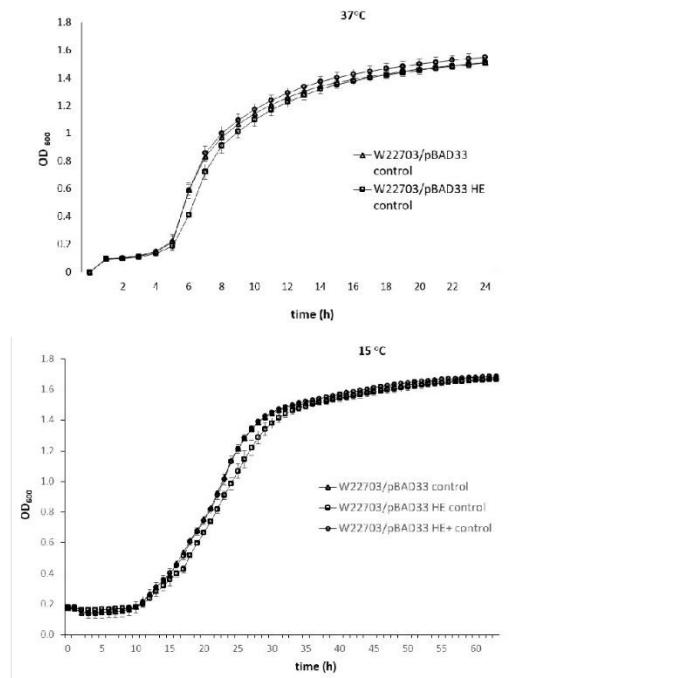
Supplemental File 3: Growth phenotypes of W22703  $\Delta clpP$  strains

Supplemental File 4: Stability of the Lon protease.

Supplemental File 5: Oligonucleotides used in this study.

Supplemental File 6: Control curves to Fig. 4.

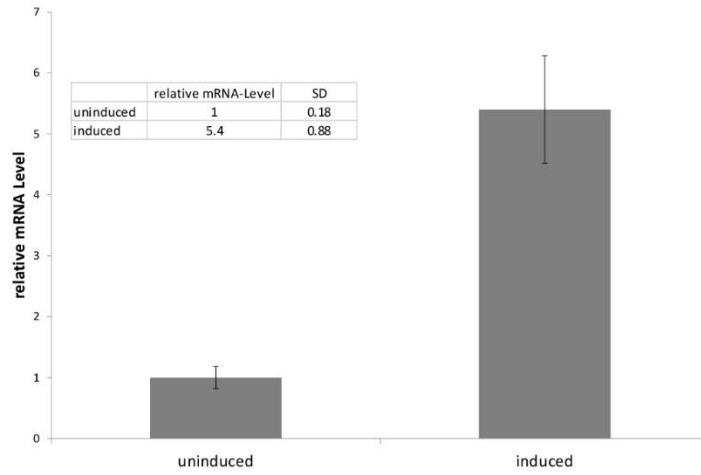
Supplemental File 1A:  
Control curves to Fig. 1.



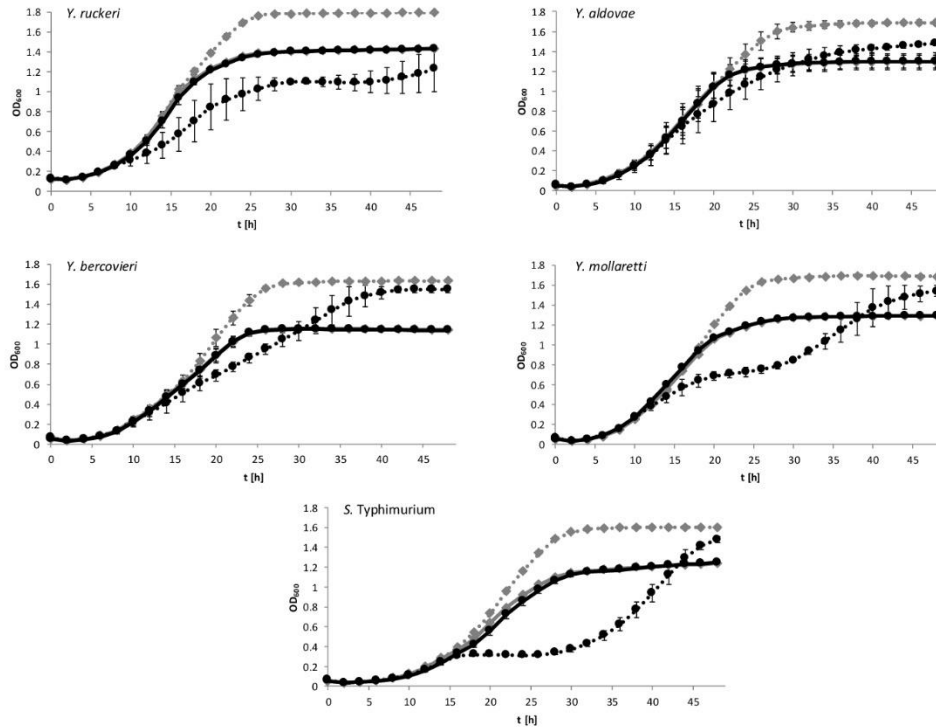


Supplemental File 1B:  
qPCR to quantify the *holY* mRNA level at 15°C

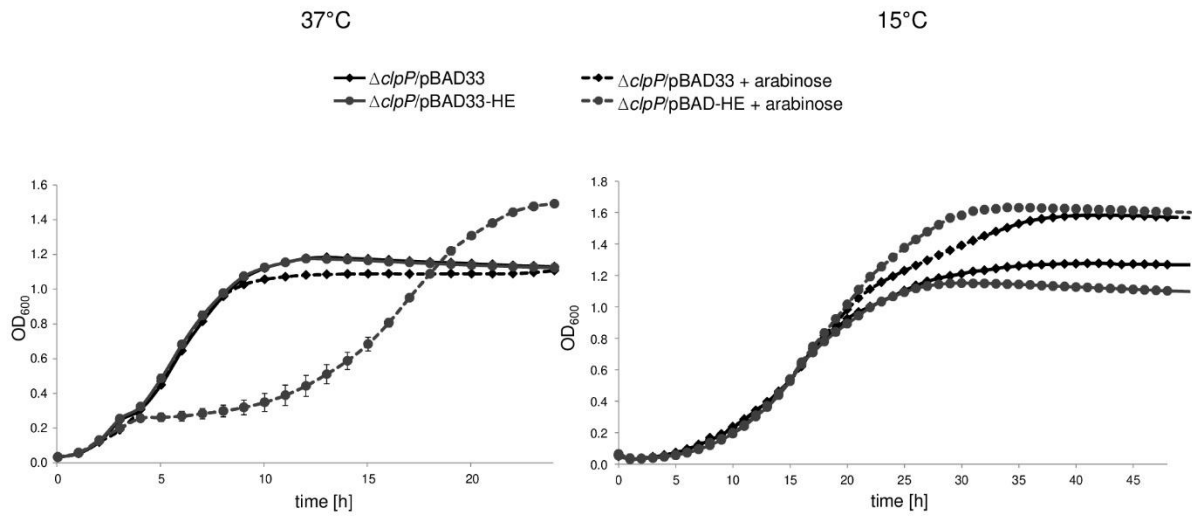
W22703 pBAD33HE+ was induced with arabinose at an  $OD_{600} = 0.3$  and incubated for another hour  
 - RNA-iso and cDNA synthesis of three biological replicates was performed  
 - expression levels are related to the reference (16s rRNA)  
 - evaluation was carried out using  $\Delta\Delta Ct$  method



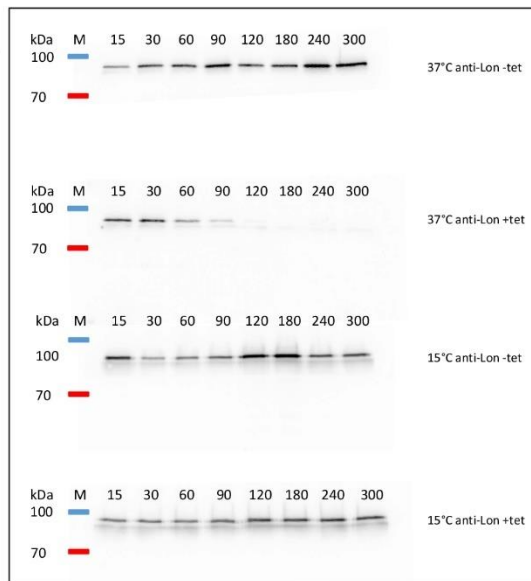
Supplemental File 2: Additional growth curves.



Supplemental File 3: Growth phenotypes of W22703  $\Delta clpP$  strains



Supplemental File 4: stability of the Lon protease

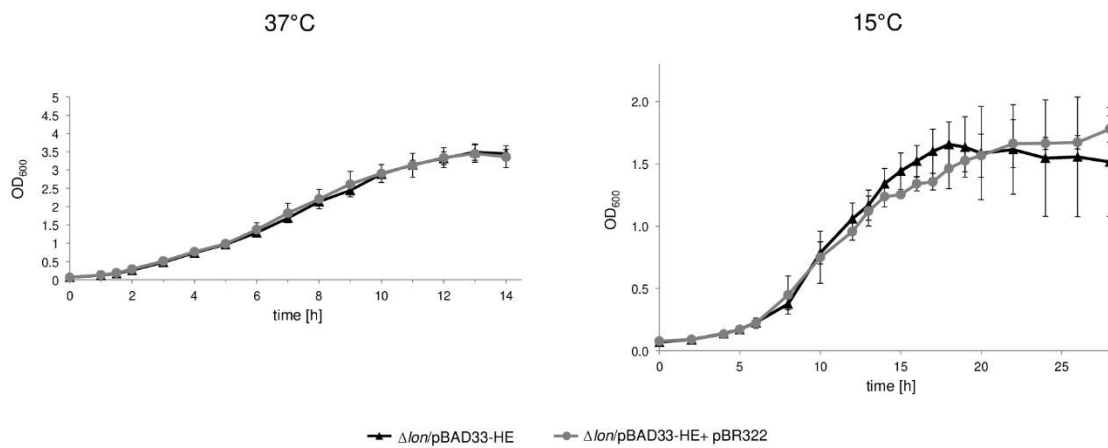


Marker: Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa

Supplemental file 5: Oligonucleotides used in this study.

Name	sequence 5'-3'	Site
Recombinant plasmids		
HolY_pET28b_F	CGATCCATGGATGGACTTCTTAATCCTCGG	NcoI
HolY_pET28b_R	CCGCTCGAGTGATTTAGGGGGTTGATGAC	XhoI
ElyY_pET15b_F	GGAATTC <u>CATATG</u> ATGC AAAATGACAGCCCTC	NdeI
ElyY_pET15b_R	CGGGATCCTCATGGGTAGACCTCTCTG	BamHI
Deletion of <i>lon</i> gene		
Lon.delR1	CCGGAATTCGAACGCTCAGGGTTCATAG	EcoRI
Lon.delF1	TTTGCGGGCCTGGATAAAG	
Lon.delF2	CCGGAATTCGCAAAATCCTGCCTTCGG	EcoRI
Lon.delR2	GAGCCACCAATCAGATAG	
Lon.nestedF	CGGGATCCCGACAGAAGGCGAGTTATTG	BamHI
Lon.nestedR	CGGGATCCGAGCACGACGTTATTAGC	BamHI

Supplemental File 6: Control curves to Fig. 4



### 2.3 **Publikation 3:** „Insecticidal toxicity of *Yersinia frederiksenii* involves the novel enterotoxin YacT.“

#### **Zusammenfassung**

Die Gattung *Yersinia* umfasst 20 Spezies und von diesen sind drei als pathogen gegenüber Menschen und Tieren bekannt. Einige Spezies zeigen eine Toxizität gegen Invertebraten vermittelt durch einen sogenannten Toxinkomplex und/oder bisher unbekannte Einflussfaktoren. Kürzlich erschienene Studien zeigten eine bemerkenswerte Variabilität der insektiziden Aktivität, wenn Vertreter verschiedener *Yersinia*-Spezies subkutan in die Große Wachsmotte, *G. mellonella*, injiziert wurden. In dieser Studie wird gezeigt, dass *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii* hoch toxisch für die Larven dieser Insekten sind. Ein Mitglied der *Y. enterocolitica* Phylogruppe 2 tötete *G. mellonella*-Larven bereits bei einer Injektionsdosis von etwa 38 Zellen und ähnelt damit in seiner insektiziden Aktivität der von *P. luminescens*. Die Pathogenität der *Yersinia*-Spezies gegenüber den Tieren ist bei 15°C höher als bei 30°C und zeigt sich dabei unabhängig von dem Toxinkomplex Tc. Durch die Subtraktion aller Gene des gering pathogenen *Y. enterocolitica*-Stammes W22703 von den Genomen von *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii* wurde eine Reihe von Genen identifiziert, die für die Toxizität dieser zwei Stämme verantwortlich sein könnten. Tatsächlich zeigte eine Mutante von *Y. frederiksenii*, der das Gen *yacT* fehlt, welches für ein Protein mit signifikanter Ähnlichkeit zu dem hitze-stabilen cytotonischen Enterotoxin (Ast) von *Aeromonas hydrophila* kodiert, eine verringerte Pathogenität gegen *G. mellonella*-Larven. Die Injektion von YacT in die Larven führte zu einer veränderten Morphologie der Hämocyten. Die Daten zeigen, dass aus dem Repertoire an Virulenzfaktoren, die in den in der Umwelt vorkommenden Spezies der Gattung *Yersinia* vorhanden sind, noch einige zu entdecken sind.



# Insecticidal Toxicity of *Yersinia frederiksenii* Involves the Novel Enterotoxin YacT

Katharina Springer<sup>1</sup>, Philipp-Albert Sanger<sup>2</sup>, Christian Moritz<sup>1</sup>, Angela Felsl<sup>1</sup>, Thomas Rattei<sup>3</sup> and Thilo M. Fuchs<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Fakultät für Grundlagen der Biowissenschaften, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München, Freising, Germany, <sup>2</sup> Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Molekulare Pathogenese, Jena, Germany, <sup>3</sup> Department of Computational Systems Biology, University of Vienna, Vienna, Austria

The genus *Yersinia* comprises 19 species of which three are known as human and animal pathogens. Some species display toxicity toward invertebrates using the so-called toxin complex (TC) and/or determinants that are not yet known. Recent studies showed a remarkable variability of insecticidal activities when representatives of different *Yersinia* species (spp.) were subcutaneously injected into the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Here, we demonstrate that *Y. intermedia* and *Y. frederiksenii* are highly toxic to this insect. A member of *Y. enterocolitica* phylogroup 1B killed *G. mellonella* larvae with injection doses of approximately 38 cells only, thus resembling the insecticidal activity of *Photorhabdus luminescens*. The pathogenicity *Yersinia* spp. displays toward the larvae was higher at 15°C than at 30°C and independent of the TC. However, upon subtraction of all genes of the low-pathogenic *Y. enterocolitica* strain W22703 from the genomes of *Y. intermedia* and *Y. frederiksenii*, we identified a set of genes that may be responsible for the toxicity of these two species. Indeed, a mutant of *Y. frederiksenii* lacking *yacT*, a gene that encodes a protein similar to the heat-stable cytotoxic enterotoxin (Ast) of *Aeromonas hydrophila*, exhibited a reduced pathogenicity toward *G. mellonella* larvae and altered the morphology of hemocytes. The data suggests that the repertoire of virulence determinants present in environmental *Yersinia* species remains to be elucidated.

**Keywords:** *Yersinia*, *Galleria mellonella*, insecticidal activity, enterotoxin, YacT

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Matthew S. Francis,  
Umeå University, Sweden

### Reviewed by:

Mark Robin Holmes Hurst,  
AgResearch, New Zealand  
Louis S. Tisa,  
University of New Hampshire,  
United States

### \*Correspondence:

Thilo M. Fuchs  
thilom.fuchs@fhi.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Bacterial Pathogenesis,  
a section of the journal  
*Frontiers in Cellular and Infection  
Microbiology*

**Received:** 20 April 2018

**Accepted:** 18 October 2018

**Published:** 14 November 2018

### Citation:

Springer K, Sanger P-A, Moritz C,  
Felsl A, Rattei T and Fuchs TM (2018)  
Insecticidal Toxicity of *Yersinia  
frederiksenii* Involves the Novel  
Enterotoxin YacT.  
*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:392.  
doi: 10.3389/fcimb.2018.00392

## INTRODUCTION

The genus *Yersinia* so far consists of three human pathogens (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica*), and at least 16 species are considered mostly harmless to humans, namely *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei*, and the more recently described *Y. ruckeri*, a fish pathogen (Sulakvelidze, 2000), *Y. aleksiciae* (Sprague and Neubauer, 2005), *Y. similis* (Sprague et al., 2008), *Y. massiliensis* (Merhej et al., 2008), *Y. nurmii* (Murros-Konttinen et al., 2010a), *Y. pekkanenii* (Murros-Konttinen et al., 2010b), *Y. wautersii* (Savin et al., 2014), and *Y. entomophaga* (Hurst et al., 2010). These species that are non-pathogenic for humans have been isolated from water, soil, food, domestic and wild animals, and human beings in which they do not cause any clinical infections.

While the virulence properties of the pathogenic species have been characterized during last few decades, much less is known about the determinants that allow *Yersinia* species to survive in the

environment. We have recently demonstrated that the *Y. enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O:9) is toxic to nematodes and larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, upon oral infection or oral toxin application, and that this insecticidal activity correlates with the presence of the pathogenicity island (TC-PAI<sup>Y<sub>e</sub></sup>) (Bresolin et al., 2006; Spanier et al., 2010). This 20-kb fragment is present in the genome of *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica* biotype 2–5 strains, but is absent in the genomes of the highly–pathogenic biotype 1B strains, including 8081 and of the most biotype 1A strains, which are considered to be non-pathogenic to humans. The TC-PAI<sup>Y<sub>e</sub></sup> carries the toxin complex (TC) genes with high identity to the *tc* genes of entomophagous *Photorhabdus luminescens*, and it might be speculated that the TC is required to penetrate the epithelial cell barrier of the insect gut to allow *Y. enterocolitica* cells to enter the hemocoel. In *Y. entomophaga* MH96, an insecticidal pathogenicity island termed PAI<sub>Y<sub>e</sub>96</sub> was characterized, which is distinct from TC-PAI<sup>Y<sub>e</sub></sup> in terms of gene homology and genetic organization (Hurst et al., 2011). A unique feature of this island is that it encodes, besides the type ABC genes, two chitinases that are associated with the mature TC (Busby et al., 2012).

The transcription of the *tc* genes in *Y. enterocolitica* is subject to a strict temperature-dependent regulation as they are completely silenced at 37°C, but strongly upregulated at lower temperatures with a maximal transcription at 10–15°C approximately (Bresolin et al., 2006; Starke et al., 2013; Starke and Fuchs, 2014). Thus, the TC-dependent activity of *Y. enterocolitica* to invertebrates is reciprocally regulated in comparison with that of many *Yersinia* virulence factors directed against humans (Marceau, 2005). Notably, strains lacking the insecticidal genes, including *Y. enterocolitica*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. ruckeri*, and *Y. aldovae*, are still toxic when subcutaneously injected into *G. mellonella*, indicating the presence of yet unknown insecticidal determinants in these species (Fuchs et al., 2008). More recently, it was demonstrated that *Y. enterocolitica* strains of phylogroup 1 exhibit a strong virulence against *G. mellonella* larvae at temperatures of 25°C and higher upon intrahemocoelic injection, independently of the presence of virulence plasmid pYV (Alenizi et al., 2016). These findings resemble functional redundancy in *P. luminescens* that carries a set of insecticidal factors besides the TC (French-Constant et al., 2007), including the *makes caterpillars floppy* (MCF) toxins (Daborn et al., 2002), the Pir toxins (Waterfield et al., 2005), the protease PrtA (Bishop, 2014), Txp40 (Brown et al., 2006), the XaxAB-like binary toxins (Zhang et al., 2014), and the *Photorhabdus* virulence cassettes (Yang et al., 2006). Interestingly, the (partial) loss of some of these insecticidal genes does not result in a lack of toxicity to invertebrates (Wilkinson et al., 2009).

The insecticidal determinants of some *Yersinia* spp. remain to be investigated. Here, we used an established infection assay with *G. mellonella* larvae to monitor the phenotype of the host intrahemocoelically infected with *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *P. luminescens*, and *Y. enterocolitica* 8081 and W22703 cells. Dose- and temperature-dependent characteristics of their insecticidal activity were determined, and genome comparison as well as toxin injection were applied to gain further

insights into the entomopathogenic repertoire of environmental *Yersinia* strains.

## RESULTS

Dose-dependent toxicity of *Y. frederiksenii* and *Y. intermedia* to *G. mellonella* larvae. When larvae of the first-instar neonates of *M. sexta* were challenged orally with *Y. frederiksenii* and *Y. intermedia* in preliminary experiments, the toxicity was calculated as 71 and 19%, respectively (Table 1). As both strains used here lack the TC-PAI<sup>Y<sub>e</sub></sup>, we switched from this oral infection model to a subcutaneous infection model and injected 5 µl of a 1:100 dilution of *Y. frederiksenii* and *Y. intermedia* overnight culture into *G. mellonella* larvae, and observed a 99–100% lethality after 5 days of incubation at 15°C (Table 1). Thus, the insecticidal activity of *Y. frederiksenii* and *Y. intermedia* is higher than that of all other *Yersinia* strains tested recently in the same infection model, including *Y. enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O:9) (Fuchs et al., 2008). To determine the toxicity of *Y. intermedia* and *Y. frederiksenii* toward *G. mellonella* larvae in more detail, we used defined infection aliquots of approximately 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> colony forming units (CFU), and monitored the fate of intrahemocoelically infected *G. mellonella* larvae over 5 days at room temperature (20°C) (Figure 1A). The timecourse revealed that all larvae survived for 24 h, but most of them died within the next 2 days. The survival rates of the animals infected with two *Yersinia* species did not significantly (*p* > 0.05) differ under the conditions applied here. In parallel, we homogenized two larvae each day, and monitored the replication of *Y. frederiksenii* within the larvae. The CFU of *Y. frederiksenii* increased from 1.15 × 10<sup>3</sup> to 3.21 × 10<sup>3</sup> (day one) and to 2.79 × 10<sup>9</sup> (day two) directly after the infection, and remained constant for next 3 days (1.88–2.62 × 10<sup>9</sup>). This unimpeded bacterial growth resembles the mortality of the larvae that starts only when the *Y. frederiksenii* reaches its stationary phase. This finding suggests that a high cell number of this insect pathogen in the larvae of *Galleria* is a prerequisite for its toxicity and/or that the pathogen has incapacitated the host in the initial phase of intrahemocoelical infection.

We further reduced the infection dose to approximately 100–150 CFU and observed a slightly higher toxicity of *Y. frederiksenii* in comparison with *Y. intermedia*, which, however, started to kill larvae a day earlier (Figure 1B). In contrast, 145 CFU of *Y. enterocolitica* W22703 were not sufficient to kill any larva. Altogether, these data demonstrate a high, dose-dependent toxicity of *Y. frederiksenii* and *Y. intermedia* toward larvae of *G. mellonella*.

### Entomopathogenicity of *Y. enterocolitica* Strain 8081 Resembles That of *P. luminescens*

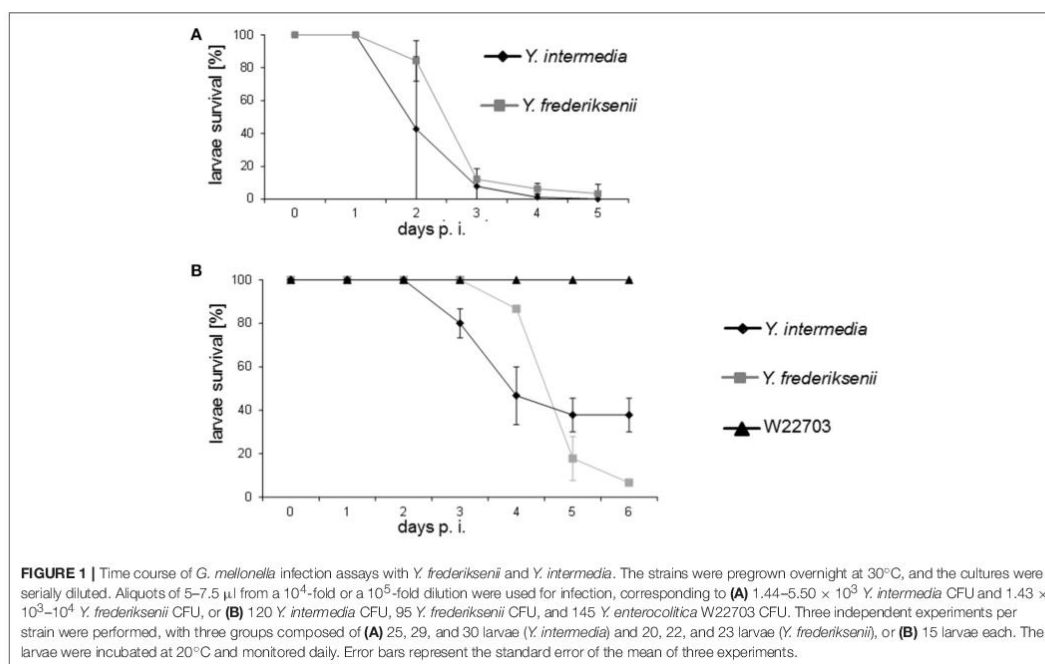
We compared the injectable insecticidal activity of *P. luminescens*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, and *Y. enterocolitica* strain 8081 (biotype 1B, serotype O:8), which carries a so-called “high-pathogenicity island” encoding the siderophore yersiniabactin (Carniel et al., 1996). In each experiment, the



**TABLE 1** | Oral infection of *M. sexta* and intrahemocoelic infection of *G. mellonella* for 5 days.

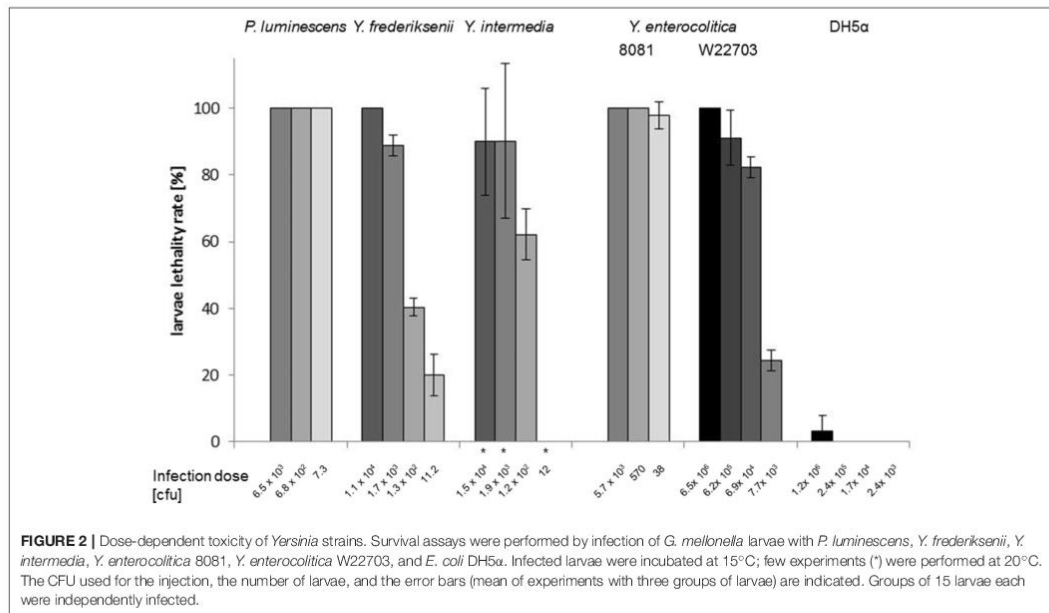
Infection model	Strain	tc-PAI <sup>Ye</sup>	Total no.	Dead	Alive	Dead	Alive	Dead	Alive	Dead [%] ± Sd <sup>a</sup>
<i>G. mellonella</i>					1:10			1:100	total	
	<i>Y. intermedia</i>	Absent <sup>b</sup>	52	25	0	27	0	52	0	<b>100 ± 0</b>
	<i>Y. frederiksenii</i>	Plasmid-encoded <i>sep</i> -like genes absent in strain CIP 80.29 <sup>c</sup>	68	28	0	39	1	67	1	<b>99 ± 2</b>
	<b>Controls</b>									
	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Absent <sup>b</sup>	63	5	34	2	22	7	56	<b>13 ± 6</b>
	LB		64					3	61	<b>5 ± 0</b>
<i>M. sexta</i>					Undiluted					
	<i>Y. intermedia</i>	Absent <sup>b</sup>	27	5	22					<b>19 ± 14</b>
	<i>Y. frederiksenii</i>	Plasmid-encoded <i>sep</i> -like genes absent in strain CIP 80.29 <sup>c</sup>	21	15	6					<b>71 ± 4</b>
	<b>Control</b>									
	DH5 $\alpha$	Absent <sup>b</sup>	21	1	20					<b>5 ± 7</b>

<sup>a</sup>The average mortality of at least three independently performed experiments with a minimum of six larvae each are shown <sup>b</sup>according to the genome sequence <sup>c</sup>(Fuchs et al., 2008).



lethality of the larvae decreased with lower numbers of CFU (Figure 2). Interestingly, the survival assays demonstrated that *Y. enterocolitica* 8081 is nearly as toxic as *P. luminescens* toward *G. mellonella* larvae upon intrahemocoelic infection, and is more virulent than *Y. frederiksenii* and *Y. intermedia*. Approximately 38 CFU of *Y. enterocolitica* 8081 were

revealed to be sufficient to kill nearly all larvae, after an infection period of 5 days. For comparison, larvae were intrahemocoelically infected with *Y. enterocolitica* W22703 and DH5 $\alpha$ , demonstrating the high insect-pathogenicity of *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, and *Y. enterocolitica* strain 8081 despite the lack of TC-PAI<sup>Ye</sup>. Altogether, these data



show that the lethality toward *G. mellonella* larvae is strictly dose-dependent.

### The Lethality of *Yersinia* Strains Is Temperature-Dependent

Low temperature-dependent toxicity of *Y. enterocolitica* W22703 toward *M. sexta* and *C. elegans*, and of representative strains of *Y. enterocolitica* phylogroups 1–5 against *G. mellonella* has been reported previously (Bresolin et al., 2006; Fuchs et al., 2008; Spanier et al., 2010; Alenizi et al., 2016). Therefore, we tested whether the injectable insecticidal activity described earlier is higher at lower temperature. *G. mellonella* larvae were infected with varying cell numbers of *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. enterocolitica* 8081, and *Y. enterocolitica* W22703 and incubated at 15°C and at 30°C. However, upon infection with eight or 95 *Y. frederiksenii* CFU, the larvae showed a higher survival rate at 30°C than at 15°C (Figure 3A). A temperature-dependent pathogenicity toward *G. mellonella* was also observed for *Y. intermedia*. Although this species was found to be slightly low pathogenic at 15°C than *Y. frederiksenii*, we observed that at 30°C, 120 *Y. intermedia* CFU killed more larvae (40% survival rate) in comparison with 95 *Y. frederiksenii* CFU (80% survival rate) (Figure 3B). *Y. enterocolitica* 8081 exhibited a higher toxicity against the larvae at lower temperature as well. Only 57 CFU of this pathogen killed nearly all larvae at 15°C, but 40 CFU killed only 4% at 30°C (Figure 3C). Independent of the infection dose, *Y. enterocolitica* W22703 did not exhibit a significant temperature-dependent toxicity in this model (Figure 3D). A high infection dose of  $9 \times 10^5$  CFU quickly killed all larvae at

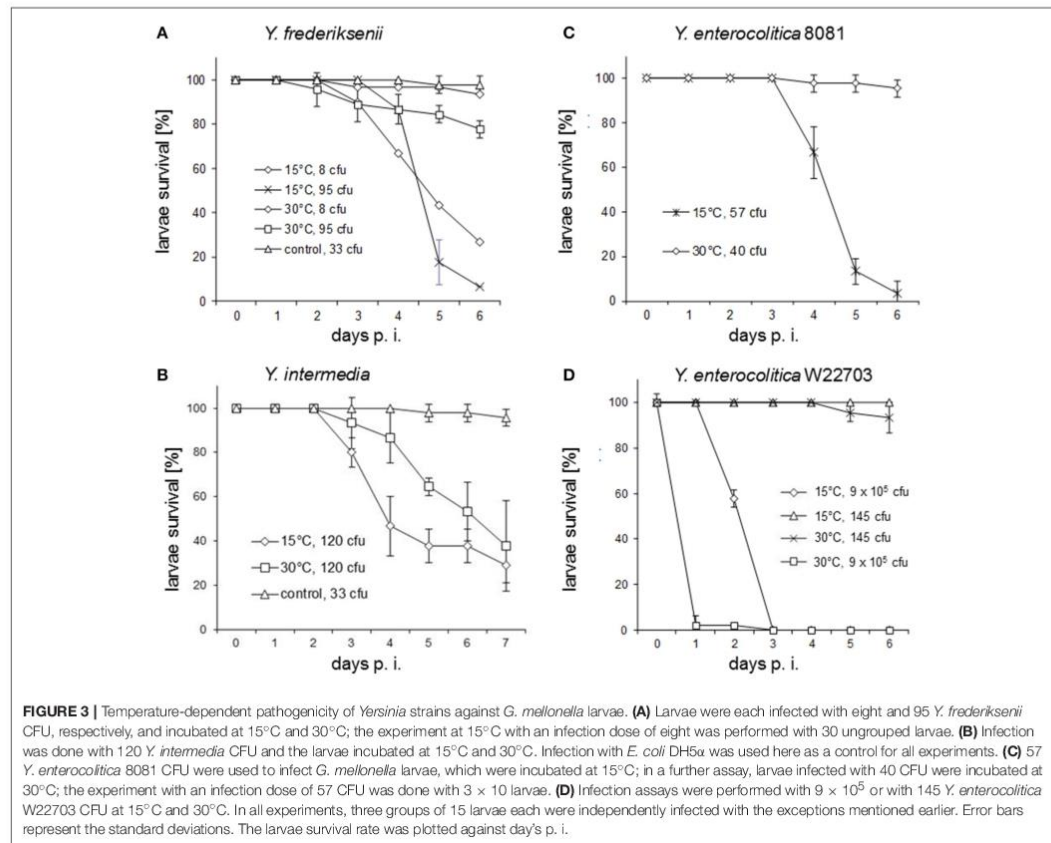
15°C and at 30°C, and a low infection dose of 145 CFU killed zero or only 7% of all larvae at these temperatures. Thus, a pronounced dose-dependent insecticidal activity was observed in these experiments with *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, and both *Y. enterocolitica* strains.

### Phenotypes of Infected Larvae

A healthy *G. mellonella* larva rapidly moves forward and back upon touch, and its exoskeleton is light colored. During the pathogenicity assays described earlier, we observed distinct phenotypes of the larvae at both 15°C and 30°C (Figure 4A). The insects infected with 95 *Y. frederiksenii* CFU were more agile at 30°C, possibly due to the lower toxicity of the pathogen at this temperature. At this temperature, injuries by combats and thus the release of hemolymph is visible from day 3 post infection (p. i.) due to the high density of insects. From day 4 to 6 p. i., the number of insects in the pupal stage as well as cocoon production increased. At 15°C, all larvae remained undamaged. However, their agility decreased from day 1 p. i. until the larvae moved only their heads or died. They also exhibited a stronger exoskeleton coloring from day 4 p. i. that strengthened until day 6 p. i. Furthermore, while non-infected larvae are sturdy, their body volume decreased upon the loss of liquid as visible in Figure 4B, left, on the larvae's surface.

Another interesting observation was the differential pigmentation of the larvae. Melanization is a defense mechanism of *G. mellonella* larvae to encapsulate pathogens, and the intensity of pigment formation correlates with the number of injected cells (Thomaz et al., 2013). Following infection with *Y.*



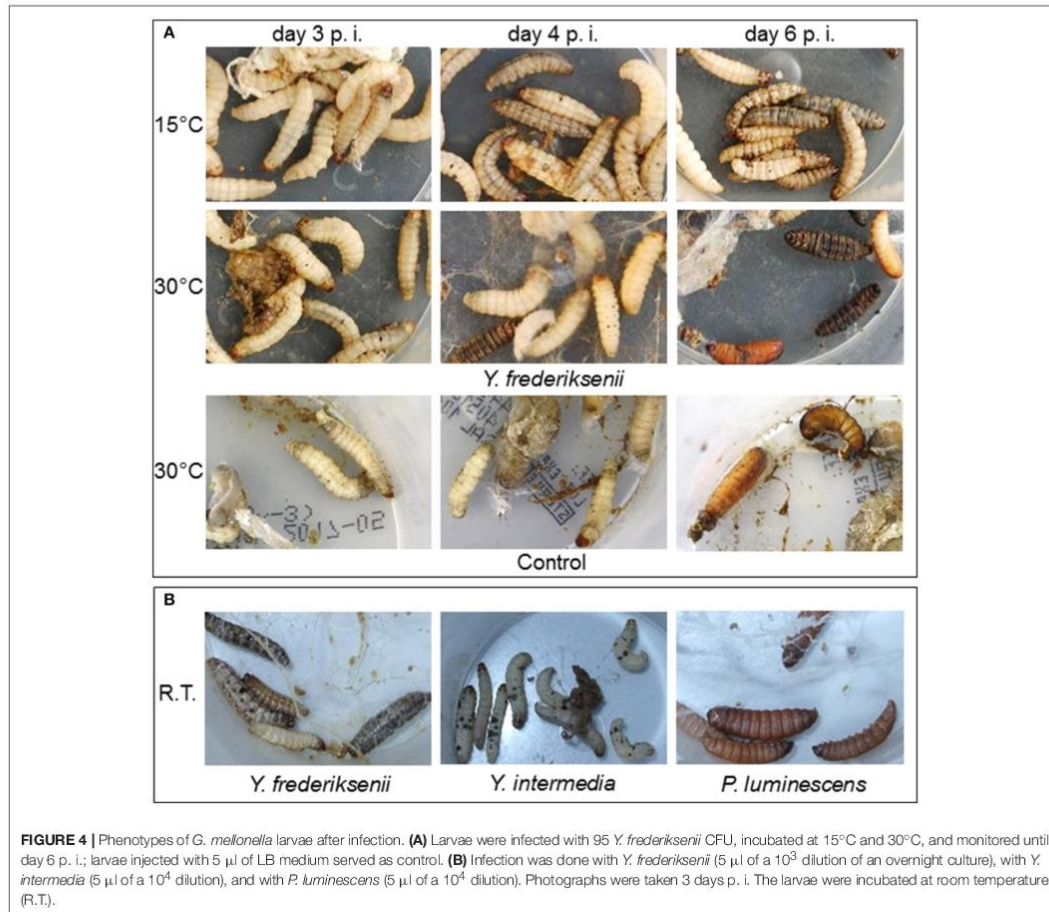


*frederiksenii* and *Y. intermedia*, the larvae colored gray-brown to black before they died (Figure 4B); many larvae also exhibited a punctiform pigmentation that resembled that at the injection site. Larvae infected with *P. luminescens*, however, did not show such a pigmentation, but colored red, similar to the effect of red anthraquinones produced by *P. luminescens* following infection (Richardson et al., 1988). These observations point out to different factors that are involved in the injectable insecticidal activity of the three pathogens.

### A Genome Comparison Approach Identifies Potential Virulence Genes Present in Highly and Absent in Weakly Insecticidal Strains

Although their genomes lack the *tc* genes or their homologs, *Y. intermedia* and *Y. frederiksenii* are much more toxic against *G. mellonella* larvae than *Y. enterocolitica* W22703. This finding suggests the presence of yet unknown genetic determinants that contribute to the insecticidal activity of yersinia. Therefore,

we performed a genome comparison that identified 329 genes that are common for *Y. intermedia* strain ATCC 29909 and *Y. frederiksenii* strain ATCC 33641, but absent in *Y. enterocolitica* W22703 (Table S1). This set comprises a large number of genes whose (putative) products belong to categories such as lipoproteins and other membrane proteins (10 + 14), sensing, signaling, and regulation (36), metabolism (28), resistance toward toxic substances (17), transport and secretion (16 + 12), stress response (2), and iron uptake and storage (9). With respect to genetic determinants potentially involved in pathogenicity, the bioinformatics approach identified putative adhesins, toxins, hemolysins, and secretory systems (Table 2). For example, *Y. intermedia* and *Y. frederiksenii* carry a type VI secretion system (T6SS) that, among other functions, contributes to virulence (Filloux, 2013) and is present in all *Yersinia* spp. and in *P. luminescens*, but not in *Y. enterocolitica* W22703. The two species harbor an ATP-binding protein possibly involved in uptake of heme, which is absent in all other species of the *Yersinia* genus, but closely related to a protein in *Klebsiella pneumoniae*.



### Attenuated Insecticidal Phenotype of *Y. frederiksenii* $\Delta yacT$

In this genome comparison approach, we identified *yacT* (accession numbers EEQ13070 and WP\_004712324) encoding a protein whose amino acid sequence exhibits a significant homology (*e*-value 0.0, identity 54%; **Supplementary Figure S1**) to the heat-stable cytotonic enterotoxin (Ast) of *Aeromonas hydrophila*. We termed this protein, with a molecular weight of 71.46 kDa, *Yersinia* Ast-like cytotonic toxin (YacT), and the corresponding gene *yacT*. Homologs or orthologs of YacT are also encoded by *P. luminescens*, *P. asymbiotica*, and many *Yersinia* spp., but neither by *Y. pestis* or *Y. pseudotuberculosis*, nor by *Y. enterocolitica* strains W22703 and 8081. We generated a deletion mutant of *yacT* termed *Y. frederiksenii*  $\Delta yacT$ , which was also complemented with pACYC-*yacT* carrying the toxin gene. On performing the *G. mellonella* infection assay at 15°C, we

observed a strongly reduced virulence of *Y. frederiksenii*  $\Delta yacT$  (time in days for 50% of the larvae to die,  $TD_{50} = 5.4 \pm 0.22$ ) and of *Y. frederiksenii*  $\Delta yacT/pACYC184$  ( $TD_{50} = 5.59 \pm 0.01$ ) in comparison to strain *Y. frederiksenii/pACYC184* ( $TD_{50} = 3.33 \pm 0.18$ ) (**Table 3, Figure 5A**). When the mutant harbored gene *yacT* in trans via plasmid pACYC-*yacT*, its phenotype reverted to that of the parental strain showing a  $TD_{50} = 3.79 \pm 0.46$ . These data clearly demonstrated that *yacT* is required for the high virulence of *Y. frederiksenii* toward the larvae at 15°C.

To understand better the role of the novel toxin during infection, the number of viable *Y. frederiksenii* cells within infected larvae incubated at 15°C was determined daily over a duration of 4 days (**Figure 5B**). We observed a strong growth of *Y. frederiksenii* within 4 days by more than six orders of magnitude. In comparison, a mutant *Y. frederiksenii*  $\Delta yacT$

**TABLE 2 |** Putative virulence factors of *Y. frederiksenii* and *Y. intermedia* absent in *Y. enterocolitica* W22703.

Gene product	<i>Y. frederiksenii</i> <sup>a</sup>	<i>Y. intermedia</i> <sup>a</sup>	Closest homologs/orthologs in	Putative function
ATP-binding protein	yfred0001_42840	yinte0001_30410	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Virulence
Enterotoxin YacT	yfred0001_650	yinte0001_42030	<i>Yersinia</i> spp. excluding <i>Y. pestis</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Enterococcus cloacae</i> , <i>P. luminescens</i>	<i>Yersinia</i> Ast-like cytotoxic toxin
Enterotoxin	yfred0001_3400	yinte0001_16990	<i>Yersinia</i> spp. including <i>Y. pestis</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Ribonuclease E
Hemolysin activator protein large exoprotein	yfred0001_19600 yfred0001_19590	yinte0001_24640 yinte0001_24650	<i>Yersinia</i> spp., <i>P. luminescens</i>	Heme utilization or adhesion
Thermostable hemolysin	yfred0001_34090	yinte0001_3870	<i>Yersinia</i> spp. excluding <i>Y. pestis</i> and <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Aeromonas</i> spp.	Cytotoxicity
Autotransporter adhesion	yfred0001_13070	yinte0001_3950	<i>Y. mollaharii</i> , <i>Serratia fonticola</i>	Adhesion
N-acetylglucosamine-binding protein A	yfred0001_36580	yinte0001_6590	<i>Yersinia</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp., <i>Erwinia</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Pectobacterium</i> spp., <i>E. cloacae</i>	Adhesion
HlyD family	yfred0001_6370	yinte0001_17830	<i>Yersinia</i> spp. excluding <i>Y. pestis</i> and <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Serratia</i> spp.	Secretion of RTX toxin
RTX toxin and Ca <sup>2+</sup> -binding protein	yfred0001_38780	yinte0001_10500	<i>Yersinia</i> spp. excluding <i>Y. pestis</i> and <i>Y. pseudotuberculosis</i> , including <i>Y. enterocolitica</i> 8081	Cytotoxicity
Peroxidase-related enzyme	yfred0001_6530	yinte0001_17680	<i>Yersinia</i> spp., <i>Serratia</i> spp.	Defense
T6SS	yfred0001_31470-31660	yinte0001_22540-22350	<i>Yersinia</i> spp., <i>P. luminescens</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	Secretion of effector proteins
Twin-arginine translocation pathway signal	yfred0001_6530	yinte0001_9040	<i>Y. pestis</i> and <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Serratia</i> spp.	Virulence (Lavander et al., 2006)

<sup>a</sup>Gene code was taken from the PEDANT 3 database (Walter et al., 2009).

**TABLE 3 |** Infection doses and TD<sub>50</sub> values testing *yacT*.

	CFU/ml inoculum	CFU per 5 µl	TD <sub>50</sub> *(±sd)
<b>15°C</b>			
<i>Y. frederiksenii</i> /pACYC184	2.11 × 10 <sup>6</sup> ± 6.46 × 10 <sup>5</sup>	1.05 × 10 <sup>4</sup>	3.33 ± 0.18
<i>Y. frederiksenii</i> Δ <i>yacT</i>	2.63 × 10 <sup>6</sup> ± 3.05 × 10 <sup>5</sup>	1.31 × 10 <sup>4</sup>	5.4 ± 0.22
<i>Y. frederiksenii</i> Δ <i>yacT</i> /pACYC- <i>yacT</i>	1.94 × 10 <sup>6</sup> ± 3.25 × 10 <sup>5</sup>	9.70 × 10 <sup>3</sup>	3.79 ± 0.46
<i>Y. frederiksenii</i> Δ <i>yacT</i> /pACYC184	2.72 × 10 <sup>6</sup> ± 5.12 × 10 <sup>5</sup>	1.36 × 10 <sup>4</sup>	5.59 ± 0.01
<b>30°C</b>			
<i>Y. frederiksenii</i> /pACYC184	3.35 × 10 <sup>6</sup> ± 2.91 × 10 <sup>5</sup>	1.68 × 10 <sup>4</sup>	—**
<i>Y. frederiksenii</i> Δ <i>yacT</i>	24.11 × 10 <sup>6</sup> ± 7.50 × 10 <sup>5</sup>	2.06 × 10 <sup>4</sup>	—**
<i>Y. frederiksenii</i> Δ <i>yacT</i> /pACYC- <i>yacT</i>	3.90 × 10 <sup>6</sup> ± 3.03 × 10 <sup>5</sup>	1.95 × 10 <sup>4</sup>	—**
<i>Y. frederiksenii</i> Δ <i>yacT</i> /pACYC184	3.15 × 10 <sup>6</sup> ± 1.91 × 10 <sup>5</sup>	1.58 × 10 <sup>4</sup>	—**

Sd, standard deviation; \*, time in days for 50% of the larvae to die; \*\*, more than 50% of the larvae survived.

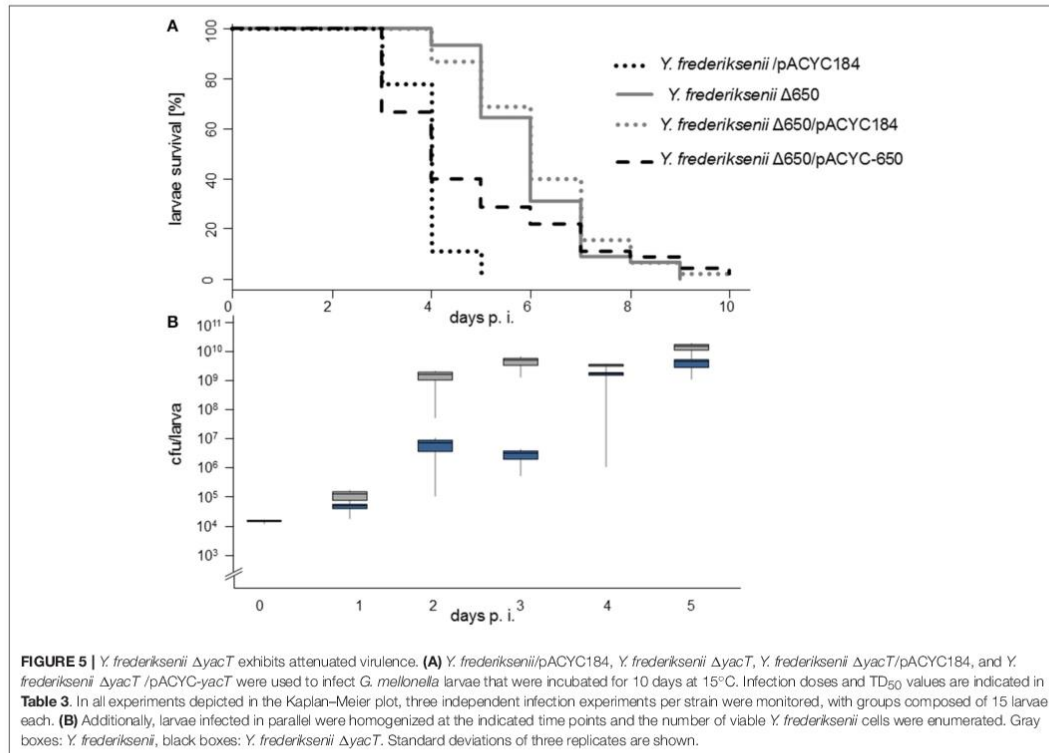
exhibited a retarded proliferation at day 2 p. i., followed by growth stagnation for 1 day. However, at day 4 p. i., the mutant reached approximately the same cell density as the parental strain. These data confirm that the yersiniae cell numbers increase before the larvae start to die and that YacT contributes to proliferation of *Y. frederiksenii* within the insect host.

### Effect of YacT on Hemocytes

YacT was purified from *E. coli* BL21 (DE3)/pBAD-HisA(tet)-650. Six microliter of a toxin solution with a concentration of 1.4 µg/µl or of phosphate-buffered saline (PBS) as control were

injected into 20 *G. mellonella* larvae. The larvae of the toxin group showed paralysis of the half rebral abdomen immediately after injection. In addition, some caterpillars of this group displayed a constriction of the head-thorax area and did not react to touching. In comparison, the control group showed none of these symptoms. One day p.i., animals of both groups that were kept at 30°C maintained vigor and formed fine webs. After web removal, 2 or 3 days p. i., the caterpillars of the toxin-treated group showed punctate- to strokelike black discolorations at the dorsal-abdominal areas that we did not observe in the control group (Supplementary Figure S2).





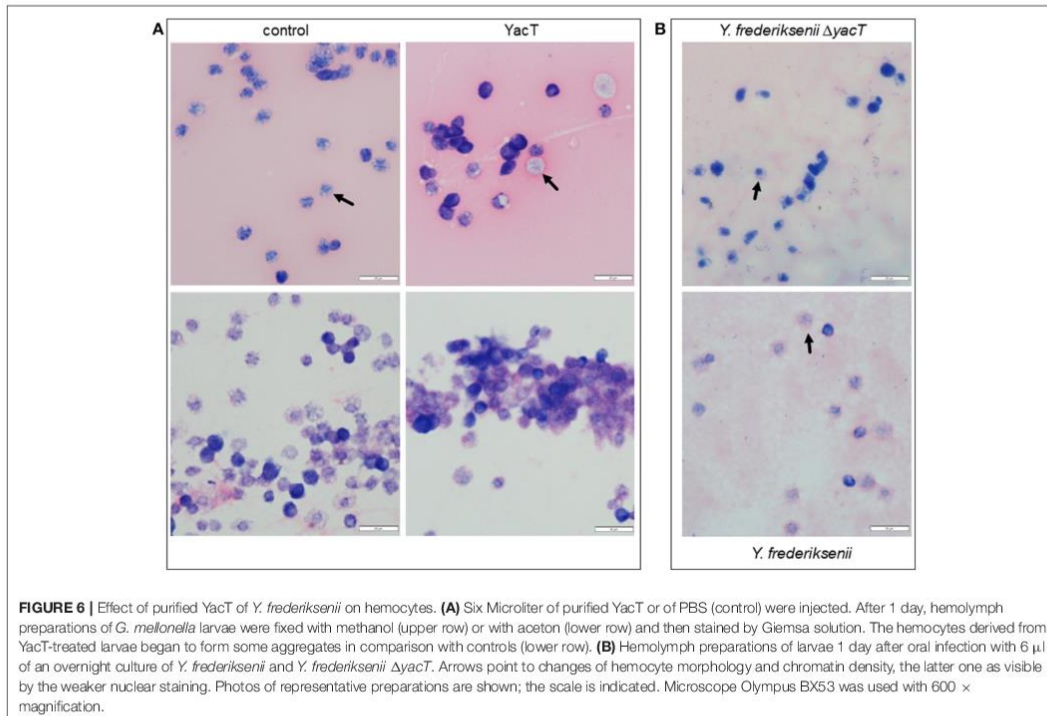
To study the effect of YacT on hemocytes after 1 day, the hemolymph of larvae was prepared from the aorta and streaked out on microscope slides for staining. Injection of PBS (10 mM phosphate buffer, pH 7.4; 2.7 mM KCl; 137 mM NaCl) served as a control. Upon microscopic analysis, we observed repeatedly several distinct cell phenotypes: hemocytes from animals treated with the toxin showed a round-shaped morphology and they began to form aggregates in comparison to the controls and several cells also enlarged and showed a reduction of chromatin, possibly indicating the beginning of early stages of the cell death (**Figure 6A**).

As a complementary experiment, *G. mellonella* larvae were infected orally with *Y. frederiksenii* and its *yacT* deletion mutant. Again, the morphology and chromatin density of hemocytes were modified in the presence of *Y. frederiksenii*, but not of *Y. frederiksenii*  $\Delta yacT$  (**Figure 6B**). In both cases, yersinial cells were visible in the preparations, indicating that penetrating the gut epithelial barrier occurs independent of YacT.

## DISCUSSION

Members of the genus *Yersinia* are fascinating organisms, as they are able to adapt to the environmental life cycle stage as well

as to mammals (Fuchs et al., 2011). During a transition, they encounter a broad spectrum of hostile conditions, and a major clue to overcome these challenges is the temperature-dependent production of host-specific virulence factors. Therefore, the interaction of yersiniae with invertebrates may have been a precursor to human pathogenicity during evolution (Waterfield et al., 2004). In this study, we tested the entomopathogenic potential of a set of *Yersinia* spp. toward larvae of *G. mellonella*. The larvae are considered to be a natural host of yersiniae and other pathogens and, therefore, serve as an indicator of yersinial virulence activities against insects. We identified *Y. enterocolitica* 8081, a representative of the highly pathogenic biovar 1B group, to be the most virulent *Yersinia* strain tested so far against *G. mellonella* larvae, resembling the high insecticidal activity of *P. luminescens*. Data on strain 8081 as the least pathogenic strain among several *Y. enterocolitica* strains tested against *G. Mellonella* are not in contradiction with our findings, because Alenizi et al. performed the infection experiments at 25°C and missed the high toxicity at the environmental temperature of 15°C (Alenizi et al., 2016). *Y. enterocolitica* strain 5303, which belongs to the biovar 1A group and is considered to be apathogenic toward mammals, showed an even higher toxicity toward the *Galleria* larvae, since only ten CFU were sufficient



to kill 50% of the larvae within 5 days (Alenizi et al., 2016). Interestingly, also *Y. intermedia* and *Y. frederiksenii* are more virulent to *Galleria* larvae than other *Yersinia* spp., including *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. ruckeri*, *Y. aldovae*, and *Y. kristensenii*, as tested recently (Fuchs et al., 2008). *Y. frederiksenii* and *Y. intermedia* occupy related ecological niches and exhibit very similar phenotypes (Martin et al., 2009). *Y. intermedia*, which is isolated mainly from the environment, animals, food, and (rarely) human beings, received its name due to its genetic and phenotypic properties that are an intermediate between those of *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* (Martin et al., 2009). *Y. intermedia* also shares several O antigens with *Y. enterocolitica* (Wauters et al., 1972), of which O:4 and O:17 are probably the prevailing serotypes (Ursing et al., 1980). *Y. frederiksenii* was differentiated from *Y. enterocolitica* in 1980 (Ursing et al., 1980). The high insecticidal potential might point out to yet overlooked natural habitats of these strains.

Temperature is an important signal in the regulation of yersinia virulence factors of that are predominantly produced at 37°C and repressed at temperatures lower than body temperature, or vice versa, as exemplified by the insecticidal *tc* genes in *Y. enterocolitica* W22703. Temperature-dependent mortality of *G. mellonella* upon oral infection, but not

upon intrahemocoelic injection, was observed recently for *Y. entomophaga* (Hurst et al., 2015). Therefore, it is not a surprising outcome of this study that the toxicity of *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, and *Y. enterocolitica* 8081 increases with lower temperature, thus pointing out to a relevant ecological niche of these strains. Irrespective of the fact that *G. mellonella* has been chosen here as an infection model rather than as a natural host for yersinial infection, the two temperatures applied here correspond to the lifestyle of *G. mellonella* larvae that grow best between 29°C and 35°C, and also develop at 15°C, but not at 10°C or less.

The pronounced contrast between the insecticidal potential of *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, and *Y. enterocolitica* 8081, on the one hand, and the TC-PAI<sup>Y<sub>e</sub></sup>-harboring *Y. enterocolitica* W22703, on the other hand, at least with respect to the *G. mellonella* model used here, prompted us to perform a genome comparison. This approach aimed to identify the determinants that confer the high insecticidal activity of these strains. **Table 2**, which probably still lacks several factors involved in infection, points out to a broad spectrum of yersinial factors whose role in pathogenicity as well as their host specificity remains to be investigated. One of them is YacT that is highly homologous to the *ast*-encoded heat-stable, cytotoxic enterotoxin of *A. hydrophila* (Chopra et al., 1994) that was associated with gastroenteritis



and non-bloody diarrhea in children and shown to contribute to the fluid secretory response in a murine model (Sha et al., 2002). Cell lysates of *E. coli* cells carrying *ast* elongated Chinese hamster ovary cells, which is a typical response to enterotoxins (Chopra et al., 1994). Besides *Yersinia* strains, YacT orthologs were identified also in *P. luminescens* ssp. *laumondii* ( $e$ -value =  $10^{-177}$ ) and in the human pathogen, *P. asymbiotica* ( $e$ -value =  $10^{-179}$ ), demonstrating that this factor is not unique to *A. hydrophila* as assumed previously (Sha et al., 2002). The prevalence of the Ast and YacT homologs confirms the strong functional relatedness between *Photorhabdus* spp. and *Yersinia* spp. with respect to their invertebrate and vertebrate association (Heermann and Fuchs, 2008). It is important to note that YacT is distinct from the heat-stable enterotoxin Yst of yersiniae, for which a homolog is missing in *Y. frederiksenii* ATCC 33641 and *Y. intermedia* (Singh and Viridi, 2004). Our data demonstrate that YacT is required for full pathogenicity toward *G. mellonella*. Moreover, the finding that YacT injection affects the morphology of hemocytes suggests that the immune response of *G. mellonella* controls better the proliferation of *Y. frederiksenii*  $\Delta$ yacT during the first 3 days p. i. as compared with that of *Y. frederiksenii*. The list of determinants in Table 3 and the variation of *Yersinia* spp. in pathogenesis toward *Galleria* larvae suggest that the yersinial toxicity toward insects upon intrahemocoelic infection is a multifactorial process due to the presence of several cytotoxic determinants. In the light of this assumption, the virulence attenuation upon deletion of *yacT* in *Y. frederiksenii* is remarkably high. Therefore, YacT is a candidate to explain the high toxicity of *Y. frederiksenii* against *G. mellonella*.

## CONCLUSION

A major implication of this study is that the yersinial toxicity toward insects not only depends on the TC, but also on a broader set of insecticidal toxins than known so far. We identified a novel yersinial entomopathogenic factor, whose activity might be associated with the hemocoel rather than with the insect gut as indicated by the distinct oral and intrahemocoelic toxicity of *Y. intermedia* and *Y. frederiksenii*. The findings of this study and other studies suggest that yersiniae strains, regardless of being human pathogens or not, acquire a substantial selection advantage by entering invertebrates. By overcoming infection barriers such as the gut epithelium or the innate immune response of insect larvae or nematodes, they might bioconvert their host, thus getting easy access to energy- and nitrogen-rich nutrients. The resulting proliferation increases the chance of *Yersinia* strains to be transmitted to other hosts including mammals.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strains and Growth Conditions

The strains used in this study were *Y. intermedia* (Collection Institut Pasteur [CIP] 80.28; ATCC 29909), *Y. frederiksenii* (CIP 80.29; ATCC 33641), *Y. enterocolitica* 8081 (Virginia Miller, St. Louis, USA), *Y. enterocolitica* W22703 (Cornelis and Colson,

1975), and *P. luminescens* ssp. *laumondii* strain TT01 BX470251 (Fischer-Le Saux et al., 1999). All cultures were grown in lysogeny broth (LB) ( $10 \text{ g l}^{-1}$  tryptone,  $5 \text{ g l}^{-1}$  yeast extract, and  $5 \text{ g l}^{-1}$  NaCl) or on lysogeny broth (LB) agar (LB broth supplemented with 1.5 % w/v agar). *Escherichia coli* were grown at  $37^\circ\text{C}$  and *P. luminescens* and *Yersinia* strains at  $30^\circ\text{C}$ . If appropriate, the media were supplemented with the following antibiotics:  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  streptomycin,  $12 \mu\text{g ml}^{-1}$  tetracycline,  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin,  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  chloramphenicol, and  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  nalidixic acid.

### General Molecular Techniques

The DNA manipulation was performed according to standard procedures (Sambrook and Russell, 2001). To isolate the chromosomal DNA, 1.5 ml of a bacterial culture was centrifuged, and the sediment was re-suspended in  $400 \mu\text{l}$  of lysis buffer ( $100 \text{ mM}$  Tris pH 8.0,  $5 \text{ mM}$  EDTA,  $200 \text{ mM}$  NaCl). After incubation for 15 min on ice,  $10 \mu\text{l}$  of 10% SDS and  $5 \mu\text{l}$  of proteinase K ( $10 \text{ mg/ml}$ ) were added, and the sample was incubated overnight at  $55^\circ\text{C}$ . The chromosomal DNA was precipitated with  $500 \mu\text{l}$  of isopropanol, washed in ethanol, dried, and dissolved in  $500 \mu\text{l}$  of TE buffer ( $10 \text{ mM}$  Tris-HCl,  $1 \text{ mM}$  Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.4) containing  $1 \mu\text{l}$  of RNase ( $10 \text{ mg/ml}$ ). Polymerase chain reactions (PCR) were carried out with Taq polymerase (Fermentas, Vilnius, and Lithuania) and the following programme: one cycle at  $95^\circ\text{C}$  for 2 min; 30 cycles at  $95^\circ\text{C}$  for 10 s, at the appropriate annealing temperature for 30 s, at  $72^\circ\text{C}$  for 45 s to 180 s depending on the expected fragment length; one cycle at  $72^\circ\text{C}$  for 10 min. Four microliter of chromosomal DNA ( $100 \text{ ng ml}^{-1}$ ) was used as a template for PCR amplification, and the GeneRuler DNA mix (Fermentas) served as a DNA ladder.

### Genome Comparison

The sequences of genome used for the comparison were that of *Y. enterocolitica* 8081 (accession numbers AM286415 for the chromosome and AM286416 for the plasmid), *Y. intermedia* (genome draft: GCA\_000168035.1), and *Y. frederiksenii* (genome draft: GCA\_000754805.1). Homology searches of predicted proteins were performed by basic local alignment search tool analysis (Altschul et al., 1997). The PEDANT software system [http://pedant.gsf.de; (Walter et al., 2009)] was used for automatic genome sequence analysis and annotation (Frishman et al., 2001). Genomes were recorded and homology searches of predicted proteins were performed by SIMAP (Arnold et al., 2014). The genome comparisons were calculated by using a custom Perl script, which formatted bidirectional-best sequence hits between all predicted proteins ( $E \leq 0.0001$ ).

### Insecticidal Bioassays

*M. sexta* were reared as described (Schachtner et al., 2004). For oral bioassays, bacteria were grown at  $15^\circ\text{C}$  (*Yersinia* strains) or  $37^\circ\text{C}$  (DH5 $\alpha$ ) until stationary phase. About  $50 \mu\text{l}$  of a culture was applied to  $4 \text{ mm}^3$  disks of an agar-based artificial diet (David and Gardiner, 1965). The liquid was allowed to soak into the agar block, which was dried under a laminar flow. First-instar *M. sexta* neonate larvae were placed on the disk and incubated at  $22^\circ\text{C}$ .

The application of bacterial culture aliquots was repeated after 3 days, and the larvae mortality was recorded after 5 days.

Larvae of *G. mellonella* were obtained from the Zoo-Fachmarkt (München, Germany) and stored for less than 1 week at room temperature. Bacterial strains were grown to stationary phase (optical density at 600 nm [OD<sub>600</sub>] ~1–5 × 10<sup>9</sup> cfu/ml) at temperatures between 15°C and 30°C (*Yersinia* spp.), at 30°C (*P. luminescens*), or at 37°C (DH5α), and 10-fold serially diluted. Larvae of 2–3 cm length and of 110–130 mg weight were used. A 5 μl of the bacterial culture or an appropriate dilution thereof were orally applied or injected by a sterilized microsyringe (Hamilton 1702 RN, 25 μl) into the hemocoel through the last left proleg. The aperture reseals after the removal of the syringe, thus preventing the loss of inoculum (Kavanagh and Reeves, 2004).

Infection doses were determined by plating serial dilutions of the cultures used for injection. Control assays had demonstrated that neither the medium nor the wounding by the syringe contributes to the mortality rate of the insects (Fuchs et al., 2008). Infected larvae were incubated for at least 5 days in the dark at the temperature indicated and the number of killed and alive larvae were enumerated each day. Larvae were considered dead if they failed to respond to touch. The TD<sub>50</sub> was calculated using the dose-response curve (drc) package of the R software. To recover bacteria from the larvae, the larvae were surface sterilized with 70% ethanol, washed in H<sub>2</sub>O, and cut into small pieces. The homogenous mass was suspended into 1 ml LB, rigorously shaken for 5 min with a vortex, and centrifuged at 1,000 rpm for 2 min. Serial dilutions were plated on agar plates with LB or with *Yersinia* selective medium (Schiemann CIN medium, Oxoid, Wesel, Germany).

### Deletion Mutants and Complementing Plasmid

In-frame deletion of *yacT* from *Y. frederiksenii* was performed by the one-step method based on the phage λ. Red recombinase (Datsenko and Wanner, 2000). In short, PCR products comprising the kanamycin resistance cassette of plasmid pKD4, including the flanking FRT sites, were generated using pairs of 70-nucleotide-long primers that included 20 nucleotides priming sequences for pKD4 as template DNA. Homology extensions of 50 bp overlapped 18 nucleotides of the 5'-end and 36 nucleotides of the 3'-end of the target gene (Link et al., 1997). About 500–1,000 ng of fragment DNA were transferred into *Y. frederiksenii* cells harboring plasmid pKD119. Allelic replacement of the target gene by the kanamycin resistance cassette was controlled by PCR, and nonpolar deletion mutants were obtained via transformation of pCP20. The deletion was confirmed by PCR and sequencing.

Gene *yacT* including 220 bp upstream and 100 bp downstream of the coding sequence was amplified with the oligonucleotides 5'-CGATGAATTCAGTGACCGTCTGTGGTCTG-3' and 5'-CGGCCATGGGGGGGCGAGCATCGTGATTTC-3' and ligated into the chloramphenicol resistance cassette of plasmid pACYC184 via *NcoI* und *EcoRI*, resulting in pACYC-*yacT*. The recombinant plasmid was validated by PCR and sequencing.

### Overproduction and Purification of YacT

Gene *yacT* of *Y. frederiksenii* was cloned into plasmid pBAD-HisA(tet) (Starke et al., 2013) via *SacI* and *PstI* using the oligonucleotides 5'-CGATGAGCTCATGCAGAAAATCATACC GAG-3' and 5'-AACTGCAGTTATTGGGTGCTAGCCACAG-3'. An overnight culture of *E. coli* BL21 (DE3)/pBAD-HisA(tet)-650 was diluted 1:100 into 800 ml of LB medium supplemented with 12 μg/ml tetracycline and incubated at 37°C with rotation at 180 rpm. At an OD<sub>600</sub> of 0.6, protein production was induced by adding 0.2% of arabinose. After incubation for an additional 4 h at 37°C and 180 rpm, the cells were harvested by centrifugation at 4°C and 7,500 rpm for 20 min. The pellets were each re-suspended in 5 ml of native lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, and 10 mM imidazole at pH 8.0) in the presence of 1 mM protease inhibitor Pefabloc SC (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and lysed by 4 passages through a French press (SLM Aminca Instruments, Rochester, NY, USA) at 900 psi; residual cell debris was removed thrice by centrifugation at 4°C and 9,000 rpm for 15 min. Following the filtration, YacT was isolated using the Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. For imidazole removal, proteins were dialyzed against 50 mM phosphate buffer plus 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM ZnSO<sub>4</sub>, and 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> and protein extracts were concentrated down to 1 ml with Amicon ultracentrifugal filter units (Millipore). The protein concentration was determined using Roti-Quant solution (Carl, Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) according to the Bradford method (Bradford, 1976). The purity of the eluted fractions was analyzed by the separation on a 12.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAA gel (Supplementary Figure S3).

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

KS, P-AS, and CM performed infection assays and analyzed the results, AF constructed the recombinant strains, TR was responsible for the genome comparison, and TF analyzed the data, conceived the study, and wrote the manuscript. All authors drafted and revised the work and approved of the final version.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Siegfried Scherer for supporting this study, Luise Ernst for technical assistance, Elisabeth Liebler-Tenorio for support in microscopical analysis, and Henry Derschum, Virginia Miller, Guy Cornelis, and Ralf Heermann for the gift of strains. This study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to TF (FU375/4-2).

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00392/full#supplementary-material>



## REFERENCES

- Alenizi, D., Ringwood, T., Redhwan, A., Bouraha, B., Wren, B. W., Prentice, M., et al. (2016). All *Yersinia enterocolitica* are pathogenic: virulence of phylogroup 1 *Y. enterocolitica* in a *Galleria mellonella* infection model. *Microbiology* 162, 1379–1387. doi: 10.1099/mic.0.000311
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Arnold, R., Goldenberg, F., Mewes, H. W., and Rattei, T. (2014). SIMAP—the database of all-against-all protein sequence similarities and annotations with new interfaces and increased coverage. *Nucleic Acids Res.* 42, 279–284. doi: 10.1093/nar/gkt970
- Bishop, A. H. (2014). Expression of *prtA* from *Photorhabdus luminescens* in *Bacillus thuringiensis* enhances mortality in lepidopteran larvae by sub-cutaneous but not oral infection. *J. Invertebr. Pathol.* 121, 85–88. doi: 10.1016/j.jip.2014.07.001
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Bresolin, G., Morgan, J. A., Ilgen, D., Scherer, S., and Fuchs, T. M. (2006). Low temperature-induced insecticidal activity of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 59, 503–512. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04916.x
- Brown, S. E., Cao, A. T., Dobson, P., Hines, E. R., Akhurst, R. J., and East, P. D. (2006). Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1653–1662. doi: 10.1128/AEM.72.2.1653-1662.2006
- Busby, J. N., Landsberg, M. J., Simpson, R. M., Jones, S. A., Hankamer, B., Hurst, M. R., et al. (2012). Structural analysis of Chi1 Chitinase from Yen-Tc: the multisubunit insecticidal ABC toxin complex of *Yersinia entomophaga*. *J. Mol. Biol.* 415, 359–371. doi: 10.1016/j.jmb.2011.11.018
- Carniel, E., Guilvout, L., and Prentice, M. (1996). Characterization of a large chromosomal “high-pathogenicity island” in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 178, 6743–6751. doi: 10.1128/jb.178.23.6743-6751.1996
- Chopra, A. K., Pham, R., and Houston, C. W. (1994). Cloning and expression of putative cytotoxic enterotoxin-encoding genes from *Aeromonas hydrophila*. *Gene* 139, 87–91. doi: 10.1016/0378-1119(94)90528-2
- Cornelis, G., and Colson, C. (1975). Restriction of DNA in *Yersinia enterocolitica* detected by recipient ability for a derepressed R factor from *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 87, 285–291. doi: 10.1099/00221287-87-2-285
- Daborn, P. J., Waterfield, N., Silva, C. P., Au, C. P., Sharma, S., and Ffrench-Constant, R. H. (2002). A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (*mcf*), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10742–10747. doi: 10.1073/pnas.102068099
- Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297
- David, W. A. L., and Gardiner, B. O. C. (1965). Rearing *Pieris brassicae* larvae on a semi-synthetic diet. *Nature* 207, 882–883. doi: 10.1038/207882b0
- ffrench-Constant, R. H., Dowling, A., and Waterfield, N. R. (2007). Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon* 49, 436–451. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.019
- Filloux, A. (2013). The rise of the Type VI secretion system. *F1000Prime Rep.* 5:52. doi: 10.12703/P5-52
- Fischer-Le Saux, M., Viillard, V., Brunel, B., Normand, P., and Boemare, N. E. (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1645–1656. doi: 10.1099/00207713-49-4-1645
- Frishman, D., Albermann, K., Hani, J., Heumann, K., Metanovski, A., Zollner, A., et al. (2001). Functional and structural genomics using PEDANT. *Bioinformatics* 17, 44–57. doi: 10.1093/bioinformatics/17.1.44
- Fuchs, T. M., Brandt, K., Starke, M., and Rattei, T. (2011). Shotgun sequencing of *Yersinia enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O9): genomic evidence for oscillation between invertebrates and mammals. *BMC Genomics* 12:168. doi: 10.1186/1471-2164-12-168
- Fuchs, T. M., Bresolin, G., Marcinowski, L., Schachtner, J., and Scherer, S. (2008). Insecticidal genes of *Yersinia* spp.: taxonomical distribution, contribution to toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution. *BMC Microbiol.* 8:214. doi: 10.1186/1471-2180-8-214
- Heermann, R., and Fuchs, T. M. (2008). Comparative analysis of the *Photorhabdus luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. *BMC Genomics* 9:40. doi: 10.1186/1471-2164-9-40
- Hurst, M. R., Beattie, A. K., Jones, S. A., Hsu, P. C., Calder, J., and Van Koten, C. (2015). Temperature-Dependent *Galleria mellonella* mortality as a result of *Yersinia entomophaga* infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6404–6414. doi: 10.1128/AEM.00790-15
- Hurst, M. R., Becher, S. A., Young, S. D., Nelson, T. L., and Glare, T. R. (2010). *Yersinia entomophaga* sp. nov. isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 844–849. doi: 10.1099/ijs.0.024406-0
- Hurst, M. R., Jones, S. A., Bingl, T., Harper, L. A., Jackson, T. A., and Glare, T. R. (2011). The main virulence determinant of *Yersinia entomophaga* MH96 is a broad-host-range toxin complex active against insects. *J. Bacteriol.* 193, 1966–1980. doi: 10.1128/JB.01044-10
- Kavanagh, K., and Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 101–112. doi: 10.1016/j.femsre.2003.09.002
- Lavander, M., Ericsson, S. K., Broms, J. E., and Forsberg, A. (2006). The twin arginine translocation system is essential for virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 74, 1768–1776. doi: 10.1128/IAI.74.3.1768-1776.2006
- Link, A. J., Phillips, D., and Church, G. M. (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* 179, 6228–6237. doi: 10.1128/jb.179.20.6228-6237.1997
- Marceau, M. (2005). Transcriptional regulation in *Yersinia*: an update. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7, 151–177.
- Martin, L., Leclercq, A., Savin, C., and Carniel, E. (2009). Characterization of atypical isolates of *Yersinia intermedia* and definition of two new biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2377–2380. doi: 10.1128/JCM.02512-08
- Merhej, V., Adekambi, T., Pagnier, I., Raoult, D., and Drancourt, M. (2008). *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 779–784. doi: 10.1099/ijs.0.65219-0
- Murros-Konttinen, A. E., Fredriksson-Ahomaa, M., Korkeala, H., Johansson, P., Rahkila, R., and Bjorkroth, J. (2010a). *Yersinia nurmii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2368–2372. doi: 10.1099/ijs.0.024836-0
- Murros-Konttinen, A. E., Johansson, P., Niskanen, T., Fredriksson-Ahomaa, M., Korkeala, H., and Bjorkroth, J. (2010b). *Yersinia pekkänenii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2363–2367. doi: 10.1099/ijs.0.019984-0
- Richardson, W. H., Schmidt, T. M., and Nealon, K. H. (1988). Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1602–1605.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edn.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Savin, C., Martin, L., Bouchier, C., Filali, S., Chenau, J., Zhou, Z., et al. (2014). The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 452–463. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.02.002
- Schachtner, J., Huetteroth, W., Nighorn, A., and Honegger, H. W. (2004). Copper/zinc superoxide dismutase-like immunoreactivity in the metamorphosing brain of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.* 469, 141–152. doi: 10.1002/cne.10992
- Sha, J., Kozlova, E. V., and Chopra, A. K. (2002). Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect. Immun.* 70, 1924–1935. doi: 10.1128/IAI.70.4.1924-1935.2002
- Singh, I., and Virdi, J. S. (2004). Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Med. Microbiol.* 53, 1065–1068. doi: 10.1099/jmm.0.45527-0
- Spanier, B., Starke, M., Higel, F., Scherer, S., and Fuchs, T. M. (2010). *Yersinia enterocolitica* infection and *tcaA*-dependent killing of *Caenorhabditis elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6277–6285. doi: 10.1128/AEM.01274-10



- Sprague, L. D., and Neubauer, H. (2005). *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 831–835. doi: 10.1099/ijs.0.63220-0
- Sprague, L. D., Scholz, H. C., Amann, S., Busse, H. J., and Neubauer, H. (2008). *Yersinia similis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 952–958. doi: 10.1099/ijs.0.65417-0
- Starke, M., and Fuchs, T. M. (2014). YmoA negatively controls the expression of insecticidal genes in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 92, 287–301. doi: 10.1111/mmi.12554
- Starke, M., Richter, M., and Fuchs, T. M. (2013). The insecticidal toxin genes of *Yersinia enterocolitica* are activated by the thermolabile LTTR-like regulator TeaR2 at low temperatures. *Mol. Microbiol.* 89, 596–611. doi: 10.1111/mmi.12296
- Sulakvelidze, A. (2000). *Yersinia* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes Infect.* 2, 497–513. doi: 10.1016/S1286-4579(00)00311-7
- Thomaz, L., Garcia-Rodas, R., Guimaraes, A. J., Taborada, C. P., Zaragoza, O., and Nosanchuk, J. D. (2013). *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. *Virulence* 4, 139–146. doi: 10.4161/viru.23047
- Ursing, J., Brenner, D. J., Bercovier, H., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., Brault, J., et al. (1980). *Yersinia frederiksenii*: a new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like. *Curr. Microbiol.* 4, 213–217. doi: 10.1007/BF02605859
- Walter, M. C., Rattei, T., Arnold, R., Guldener, U., Munsterkotter, M., Nenova, K., et al. (2009). PEDANT covers all complete RefSeq genomes. *Nucleic Acids Res.* 37, 408–411. doi: 10.1093/nar/gkn749
- Waterfield, N., Kamita, S. G., Hammock, B. D., and Ffrench-Constant, R. (2005). The *Photobacterium* Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 47–52. doi: 10.1016/j.femsle.2005.02.018
- Waterfield, N. R., Wren, B. W., and Ffrench-Constant, R. H. (2004). Invertebrates as a source of emerging human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 833–841. doi: 10.1038/nrmicro1008
- Wauters, G., Le Minor, L., Chalon, A. M., and Lassen, J. (1972). Supplement to the antigenic schema of *Yersinia enterocolitica*. *Ann. Inst. Pasteur.* 122, 951–956.
- Wilkinson, P., Waterfield, N. R., Crossman, L., Corton, C., Sanchez-Contreras, M., Vlisidou, I., et al. (2009). Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photobacterium asymbiotica* with the insect pathogen *Photobacterium luminescens*. *BMC Genomics* 10:302. doi: 10.1186/1471-2164-10-302
- Yang, G., Dowling, A. J., Gerike, U., Ffrench-Constant, R. H., and Waterfield, N. R. (2006). *Photobacterium* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. *J. Bacteriol.* 188, 2254–2261. doi: 10.1128/JB.188.6.2254-2261.2006
- Zhang, X., Hu, X., Li, Y., Ding, X., Yang Q., Sun Y., et al. (2014). XaxAB-like binary toxin from *Photobacterium luminescens* exhibits both insecticidal activity and cytotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 350, 48–56. doi: 10.1111/1574-6968.12321

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Springer, Sânger, Moritz, Felsl, Rattei and Fuchs. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Table S1. Products of genes present in *Y. frederiksenii* and *Y. intermedia*, but absent in *Y. enterocolitica* 22703.

Gene product	Comment	Category
Ferrichrysobactin receptor		Iron metabolism
AMP-dependent synthetase and ligase	Degradation of heme to bilirubin	Iron metabolism
Hemin transport protein hmuS	Hemin uptake	Iron metabolism
4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding	Intracellular sensing	Iron metabolism
HmsH protein	Hemin storage	Iron metabolism
Nodulin 21-like protein	Nodulin/iron and manganese transporter domain	Iron metabolism
Dipeptide ABC transporter, ATP-binding protein	Putative heme uptake	Iron metabolism
Dipeptide ABC transporter, ATP-binding protein	Putative heme uptake	Iron metabolism
Iron-binding protein IscA	Iron-sulfur cluster assembly scaffold	Iron metabolism
Lipopolysaccharide biosynthesis protein RffA		Lipoprotein
Putative Lipoprotein		Lipoprotein
Putative Lipoprotein		Lipoprotein
Putative Lipoprotein		Lipoprotein
Lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase		Lipoprotein
Polymerase Wzy	O-antigen biosynthesis protein	Lipoprotein
Uncharacterized lipoprotein YfhM	Cell membrane; lipid-anchor	Lipoprotein
Outer membrane lipoprotein carrier protein LolA	Sorting of lipoproteins	Lipoprotein
Putative lipoprotein		Lipoprotein
Glycosyl transferase family 2	LPS biosynthesis	Lipoprotein
Putative inner mebrane protein		Membrane
Conserved integral membrane protein		Membrane
Porin B		Membrane
Putative inner membrane protein		Membrane
Putative outer membrane protein		Membrane
Outer membrane pore protein E		Membrane
Outer membrane protein S1		Membrane
Inner membrane protein YebS	Involved in phosphotransfer	Membrane
Putative membrane protein Ycjf		Membrane
OmpA domain protein		Membrane
Putative transmembrane protein		Membrane
Inner membrane protein YcdZ		Membrane
Membrane receptor protein		Membrane
Inner membrane protein yecN	Three predicted transmembrane domains	Membrane
Ethanolamine ammonia-lyase heavy chain	Degradation of amines	Metabolism
Ethanolamin permease		Metabolism
Ethanolamine ammonia-lyase light chain		Metabolism

Tetrathionate reductase subunit A		Metabolism
L-fucose isomerase		Metabolism
L-fucose operon activator		Metabolism
Fucose isomerase domain protein		Metabolism
L-fucose-proton symporter		Metabolism
L-fucose mutarotase		Metabolism
L-rhamnose isomerase		Metabolism
L-rhamnose mutarotase		Metabolism
L-rhamnose-proton symporter		Metabolism
Cobalamin biosynthesis protein cbiB		Metabolism
N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase		Metabolism
N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase		Metabolism
Vitamin B12 import ATP-binding protein BtuD		Metabolism
Vitamin B12-binding protein		Metabolism
Ammonia channel		Metabolism
DsdX permease	Gluconate transport	Metabolism
$\alpha$ -ketoglutarate permease		Metabolism
Xylose isomerase domain protein TIM barrel		Metabolism
Formate transporter 1		Metabolism
DeoX-like	Deoxyribose mutarotase	Metabolism
Cellulase synthase operon protein		Metabolism
Thiamine biosynthesis lipoprotein ApbE		Metabolism
Ornithine carbamoyltransferase		Metabolism
Inducible histidine transporter		Metabolism
Histidine utilization repressor		Metabolism
$\beta$ -lactamase domain protein	Beta-lactamase	Resistance
Antibiotic biosynthesis monooxygenase	Biosynthesis of several antibiotics	Resistance
AbgT family protein	Putative drug efflux pump	Resistance
Acriflavine resistance protein B		Resistance
Uncharacterized inner membrane transporter YhbE	DMT family, putative drug permease	Resistance
Innermembrane transport protein YdhC	Putative drug resistance transporter	Resistance
Uncharacterized GST-like protein YghU	Putative detoxification of xenobiotics	Resistance
Arsenical pump membrane protein		Resistance
Integral membrane protein	DMT family, putative drug efflux pump	Resistance
Lactoylglutathione lyase	Detoxification of methylglyoxal	Resistance
Microcin-24	Bacteriocin	Resistance
Heavy metal efflux pump, CzcA family		Resistance
Glyoxalase/bleomycin resistance		Resistance
Cation/multidrug efflux pump	-	Resistance
Uncharacterized GST-like protein YghU	Putative detoxification of xenobiotics	Resistance
Multidrug resistance protein MdtG	Resistance to bile salt and fosfomycin	Resistance
Arsenate reductase		Resistance

PTS permease protein	Phosphotransferase system	Secretion
YeeE/YedE	Secretory pathway	Secretion
Twin-arginine translocation pathway signal	Transport of folded protein	Secretion
Efflux transporter, RND family, MFP subunit		Secretion
Tricarboxylic transport		Secretion
Efflux transporter, RND family		Secretion
Tricarboxylic transport		Secretion
Tricarboxylic transport		Secretion
YeeE/YedE family protein	Secretory pathway	Secretion
Arginine-binding periplasmic protein 1	ABC-transporter	Secretion
Magnesium transporter		Secretion
Outer membrane efflux protein	Similar to heavy metal RND efflux OMP	Secretion
Two-component sensor kinase		Sensing, signalling and regulation (SSR)
Carbonic anhydrase	CO2 sensing, putative role in pH regulation and virulence induction	SSR
Transcriptional regulatory protein BaeR		SSR
Transcriptional regulatory protein		SSR
HTH-type transcriptional regulator DsdC		SSR
Starvation-sensing protein <i>rspA</i>	Putative HSL degradation	SSR
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase		SSR
AraC-family transcriptional regulator	Putative stress response	SSR
Sensor kinase <i>dpiB</i>		SSR
Putative transcriptional regulator		SSR
Transcriptional regulatory protein <i>TctD</i>		SSR
3-oxoacyl-[ACP] synthase		SSR
Transcriptional regulatory protein		SSR
Transcriptional regulator	<i>B. thuringiensis</i> regulator <i>MarR</i>	SSR
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	Involved in covalent fatty acid acylation of RTX-toxins	SSR
Acetoacetate metabolism regulatory protein <i>AtoC</i>		SSR
HTH-type transcriptional activator <i>RhaR</i>		SSR
Response regulator		SSR
Transcriptional regulator, LysR family		SSR
PAS/PAC domain		SSR
LysR-family regulatory protein		SSR
Signal transduction histidine-protein kinase <i>AtoS</i>		SSR
HTH-type transcriptional activator <i>RhaS</i>		SSR
Diguanylate cyclase with PAS/PAC sensor		SSR
Transcriptional regulatory protein		SSR
AraC-type DNA-binding domain-containing protein		SSR

Transcriptional regulator, LysR family		SSR
Predicted transcriptional regulator	DeoR family, similar to <i>Legionella</i> regulator	SSR
Predicted transcriptional regulator	MerR family regulator, putative response to oxidative stress, heavy metals	SSR
Transcriptional regulator		SSR
Sensor protein RstB		SSR
Two-component system response regulator		SSR
Transcriptional regulator		SSR
Putative kinase inhibitor	Phospholipid-binding protein	SSR
HTH-type transcriptional regulator TreR		SSR
Predicted transcriptional regulator		SSR
Universal stress protein F		Stress response
Heat shock protein 15		Stress response
Member of the Nips/Nap superfamily	Putative role in vesicular transport	Transport
Uncharacterised symporter YihO	GPH-cation symporter family	Transport
Extracellular solute-binding protein family 5	ABC-transporter	Transport
Lysine-specific permease		Transport
MFS-family transporter	Secondary active transport	Transport
D-galactonate transporter		Transport
Arabinose import ATP-binding protein araG 2	ABC-transporter	Transport
Sugar ABC transporter, periplasmic protein		Transport
Sugar ABC transporter		Transport
ABC transporter related		Transport
Arginine/ornithine antiporter	ABC transporter	Transport
Ribose ABC transporter		Transport
Short-chain fatty acids transporter		Transport
Inner-membrane translocator		Transport
PTS system, glucose-like		Transport

**Supplementary Figure S1: Homology between YacT and Ast**

ACCESSION #: WP\_101615653 *Aeromonas hydrophila*  
 EQ13070 *Yersinia frederiksenii* ATCC 33641

E value: 0.0; Query cover: 90%; Identity: 54%

Data-Reference: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

```

A. hydrophila      1  MHARTAMTLLMLTP-FAQAEETLSIEGDQYRIKVEITDAGKFRELTFTNTANGDLIRSDN-
Y. frederiksenii  1  MQKIIPSSLLLLIMSHGAFAAEYLINNDKLSISFD-----D-KNSAVVVKDKL
consensus         1  *      .***.* . * * * * . . . . . . . . . . . . . . * .

A. hydrophila      59  -----LFDIKGTDDRITPSADFKVTAFTKSDDRTEVALENADFVVKSAIRLIGDKR
Y. frederiksenii  48  SDHKLAPVELEFLLTLENDVIHAADFNINKVTKQDDAHLIDYEHKDFDVTVVNLVKG-K
consensus         61  .....** . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * *

A. hydrophila      110 YASIDEALDTLKNQKKTNGFSSMLPF--HSQAPFVYGAINSSPIVSDSFFITPQNPLVNTN
Y. frederiksenii  107 YASIDYTIKAKGKARDVAKITFFFTKQSQAPVVDGAINSSPIIADSFITLPEKPLVNTY
consensus         121 ***** . . . . . * .. ***** * ***** * ***** * *

A. hydrophila      168 AYEGLVSQLPPLKLPVLAEGKPLSYRTIYVGTFFGE-GOLRRDFNREFLNEARDRPYAPYLHYN
Y. frederiksenii  167 AYETTTTNLNVELKTPHETDAEPTITTYFGTFEENNLRRSFNCFINAMRPRPYYQYLHYN
consensus         181 *** . * * * . * .. * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A. hydrophila      227 SWIDIGFFNPYTEAEALKRVDQGFHALTSRGRVPMNGFLFDDGWDDRLLGNWGFSGKDFPNG
Y. frederiksenii  227 SWMDIGFFTTYEQEVLDRMDTYADELKKRGVQVDDGFLDDGWDDRITCKWLEGPASKSG
consensus         241 **.****** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A. hydrophila      287 FSKLKRAAERYHAQLGIVLSPWGGYNKPRDERVSHAAEFGYELSDGKFALSGFVYVQNFH
Y. frederiksenii  287 FSVVKEKADSLNTSVGLWLSPWGGYNKPRDIRVSHAKENGFEIVDGGKFALSGFNRYRNFN
consensus         301 * * . * . . * .***** * * * * * * * * * * * * * * * * *

A. hydrophila      347 QKVLSLIKDQGVSHFKFDGTGNADKLTIEGSRFTSDFDAATHLITADARAANKVFINLTTG
Y. frederiksenii  347 EQIIKLIKNEHITSFKLDGMGNANSHIKGSQFASDFDASTIELIKNMRBANKDIFINLTTG
consensus         361 .. *** . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A. hydrophila      407 TIASPAWLFADSIWRGDDINFYCPGSRVQQWITYRDAETYRSIVKNGPLFLPLNSLMLH
Y. frederiksenii  407 TNASESWLFYADSIWRGDDINVFCKGSPAQQWITYRDAETYRSIVKNGPLFLPLNSLMYH
consensus         421 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A. hydrophila      467 GLVYAKQAKH-ID-RQSPQDFADQAWSYFATGTQLQELYITPELISGNWDLAKAALWS
Y. frederiksenii  467 GLVSAENAYFGLKVOIDPQDFADQAWSYFATGTQLQELYITPELNSLNSKWDILANAAKWS
consensus         481 * . * * * . * . . * . * * * * * * * * * * * * * * * * *

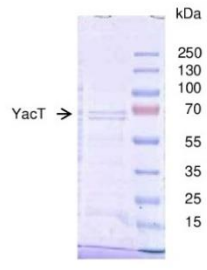
A. hydrophila      525 QQNQAVLFDSSHWIGGPTLLAVYGWAAWSPSRAFITLRNPSNRPQTELLDLPQFQLEIPAG
Y. frederiksenii  527 RENSDVIVDTHWIGGPTAIDITYGASWSKDKAIFGLRNPSPKQSYLDLTKDFEIPSG
consensus         541 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A. hydrophila      585 EATRFTVQPRYGSNASVPATLDAPRLITLAPLELITLLELTPAGTKPAAAEKS
Y. frederiksenii  587 CATSETIKTVYGINPSLAKDYSKVITITKPLETIVIEAIPVASTQ-----
consensus         601 * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

**Supplementary Figure S2: Phenotype of larvae following YacT injection.** The arrows indicate areas of discolorations.



**Supplementary Figure S3: SDS-PAA of purified YacT.**







## 3 Diskussion

### 3.1 Die Lysekassette innerhalb der TC-PAI<sub>Ye</sub> ist biologisch funktional

BRESOLIN *et al.* beschrieben 2006 das Vorkommen einer insektiziden Pathogenitätsinsel TC-PAI<sub>Ye</sub> im Genom von *Y. enterocolitica* W22703. Bei der Sequenzanalyse dieser Insel identifizierten sie nicht nur die Gene, die für die drei Toxinuntereinheiten und deren transkriptionelle Regulatoren kodieren, sondern auch Gene, die homolog zu Phagengenen sind. So liegen zwischen den Genen *tcaC* und *tccC1* vier offene Leserahmen. Zunächst durchgeführte Homologieanalysen zeigten, dass es sich bei diesen ORFs um ein Holin, ein Endolysin sowie zwei Spanine handelt.

Das Holin aus Stamm W22703, als Protein mit HOLY bezeichnet, ist ein etwa 11,3 kDa großes und aus 103 Aminosäuren bestehendes Protein, für das drei Transmembranhelices vorhergesagt werden. Die durchgeführten Nukleotid- oder Protein-BLAST-Analysen ergaben große Ähnlichkeiten vor allem zu Genen oder Proteinen aus anderen *Yersinia*-Spezies. Proteine mit weniger stark ausgeprägter Ähnlichkeit zu HOLY kommen in Human- oder Insektenpathogenen vor, bspw. in *Enterobacter cloacae*, *Chromobacterium violaceum*, *X. khoisanae*, *P. luminescens* oder *E. coli* [Abb. 1A in Springer *et al.*, 2018]. Gemäß der 2013 von REDDY & SAIER eingeführten Holin-Superfamilien ist HOLY der Superfamilie III zuzuordnen. Weitere Mitglieder dieser Superfamilie sind z. B. das Holin S105 des Lambda Phagen, das Holin des Bakteriophagen P2 und ChiW aus *S. marcescens*. Innerhalb dieser Superfamilie gehört HOLY zur Familie 1.E.5, für welche das Holin P35 des Phagen PRDI als Prototyp gilt [Reddy & Saier, 2013]. Der Phage PRDI, der verschiedene Gram-negative Bakterien, die ein incP-Plasmid tragen, infiziert, besitzt jedoch nur ein aus den beiden Komponenten Holin und Endolysin bestehendes Lyse-System ohne Spanine. Des Weiteren zeigen die Proteinsequenzen von HOLY und P35 nur eine geringe Übereinstimmung.

Basierend auf ihrer Primärstruktur werden Holin-Proteine in drei Klassen eingeteilt [Young *et al.*, 2000]. Aufgrund seiner Größe und der drei Transmembranhelices wird HOLY der Klasse I zugeordnet. Der Prototyp der Klasse I-Holine ist das kanonische Holin S105 des  $\lambda$ -Phagen [Young *et al.*, 2000]. Die wahrscheinlich an der Freisetzung von Proteinen beteiligten Holine TcdE aus *C. difficile* und ChiW aus *S. marcescens* gehören ebenfalls dieser Klasse an [Govind & Dupuy, 2012; Hamilton *et al.*, 2014]. Die Homologieanalysen zeigen jedoch kaum oder keine Übereinstimmungen dieser drei Proteine zum Holin aus W22703. Ein wesentlicher Unterschied zum Holin S105 ist das Fehlen des dualen Startmotives. Wie die meisten Holine, die von Phagen oder Prophagen kodiert werden, enthält auch die Gensequenz des Lambda-Holins ein duales Startmotiv, und daher entsteht neben dem Holin S105 auch das zwei Aminosäuren längere Antiholin S107 [Bläsi *et al.*, 1990]. Dieses lagert nur zwei seiner drei Transmembrandomänen in die Zellmembran und verhindert durch Heterodimerbildung mit einem

funktionalen Holin die frühzeitige Lyse der Wirtszelle. Diese Art der Verzögerung ist für die Bakteriophagen wichtig, da die Lyse erst erfolgen sollte, wenn genügend Phagenpartikel gebildet wurden [Bläsi *et al.* 1990]. Der Phage T4 reagiert mit Hilfe seiner beiden Antiholine RI und RIII sogar auf veränderte Umweltbedingungen. Dabei bindet RI an die periplasmatische Domäne des Holins T und RIII an dessen zytoplasmatische Domäne. Auf diese Weise wird die Freisetzung von neuen Phagenpartikeln im Falle einer Superinfektion verhindert, da in der Umgebung nicht genügend oder keine neuen Zielzellen vorhanden sind [Chen & Young, 2016]. Die beiden Antiholine werden dabei nicht durch ein duales Startmotiv von T kodiert, sondern von zwei zusätzlichen offenen Leserahmen [Paddison *et al.*, 1998]. Auch bei den Bakteriophagen P1 und P2 entstehen die jeweiligen Antiholine nicht durch ein duales Startmotiv des eigentlichen Holin-Gens, sondern durch weitere Leserahmen im Phagengenom [Young & Bläsi, 1995].

Im Fall des Holins TcdE aus *C. difficile* wurden sogar drei funktionale Isoformen nachgewiesen, nämlich das Holin, ein Antiholin und die am N-Terminus verlängerte Isoform TcdE-M1 [Govind & Dupuy, 2012]. Die Untersuchung von GOVIND *et al.* zeigte, dass alle drei Isoformen potenziell lytisch für die *C. difficile*-Zellen sind, wenn sie stärker überexprimiert werden. Ebenso zeigten die Autoren, dass nur ein Zusammenspiel der drei Isoformen eine effiziente Toxinfreisetzung ohne Zelllyse ermöglicht [Govind *et al.*, 2015]. Dazu passt die Beobachtung einer neueren Studie, dass bei der Expression in *E. coli* die Isoform TcdE-M1 inhibitorisch auf die Zelllyse wirkt, auch wenn die kleineren Isoformen reichlich vorhanden sind [Mehner-Breitfeld *et al.*, 2018].

Das für die Sekretion von Chitinasen aus *S. marcescens* essenzielle Holin ChiW besitzt eine 46%ige Ähnlichkeit zum  $\lambda$  S Holin. Dessen Gensequenz enthält jedoch nur einen einzigen Translationsstart. Ein weiterer Leserahmen, der für ein Antiholin kodieren könnte, ist ebenfalls nicht bekannt, und daher wird eine Regulation der Holin-Aktivität mittels eines Antiholins ausgeschlossen [Hamilton *et al.*, 2014]. Die Autoren nannten den spezifischen Transport des Endolysins ChiX ins Periplasma als einzige Funktion des Holins und schlossen eine Lyse der Zellen anhand von Sekretom-Analysen aus.

Auch für HOLY aus dem Stamm W22703 konnte weder ein duales Startmotiv in der Gensequenz noch ein für ein Antiholin kodierender ORF in der Nähe ermittelt werden [Reuter, 2008]. Dies ist ein entscheidender Unterschied in der Regulation der Holin-Aktivität im Vergleich zu den Phagen, und es ist davon auszugehen, dass die Regulation des Proteins auf eine andere Weise erfolgt. Da es sich um ein für das Schicksal der Zelle potenziell schädliches oder gar letales Protein handelt, ist von einer strengen Regulation auszugehen, die sowohl auf Ebene der Genexpression als auch auf Proteinebene erfolgen kann. Darauf wird im Abschnitt 3.2 genauer eingegangen.

Bereits die Namensgebung der Holin-Proteine erfolgte entsprechend ihrer einzigen Funktion, nämlich der Bildung unspezifischer Öffnungen in der bakteriellen Membran. Sie ermöglichen so einem

weiteren Protein, dem Endolysin, den Zugang zur Peptidoglykanschicht [Young, 1992]. Dabei erfolgt keinerlei Interaktion der beiden Proteine. Es ist bekannt, dass Holin- und Endolysin-Paare auch lytisch kompetent sind, wenn sie aus unterschiedlichen Phagen stammen, die wiederum spezifische Wirte infizieren können [Wang *et al.*, 2000]. Dabei wird die Spezifität der Phagen für einen bestimmten Wirt durch die Zellwand-Bindedomäne des Endolysins bestimmt, welche einmalige Bestandteile in der Peptidoglykanschicht erkennt [Borysowski *et al.*, 2006]. Im Gegensatz dazu erfolgt die Aktivität des Holins unspezifisch [Young, 1992]. Diesen Umstand macht man sich zunutze, um Holin-Proteine als solche zu identifizieren bzw. zu verifizieren. Die Komplementierung eines defekten Holin-Gens mit einer Nonsense-Mutation in dem lysogenen Lambda-Phagen, der aber ein funktionales Endolysin besitzt, diente bereits dem Nachweis einer Holin-Aktivität von Proteinen des *Lactococcus lactis* Bakteriophagen  $\phi$ LC3 [Birkeland, 1994], des *Lactobacillus gasseri* Phagen  $\phi$ adh [Henrich *et al.*, 1995] oder des *S. aureus* Bakteriophagen Twort [Loessner *et al.*, 1998]. GOVIND & DUPUY nutzten diesen Versuchsansatz ebenfalls, um die Holin-Aktivität von TcdE aufzuzeigen. Wie die Abbildung 6 in Springer *et al.*, 2018 zeigt, ist auch HOLY in der Lage, das defekte Lambda-Holin zu komplementieren. Zusammen mit seiner eigenen ribosomalen Bindestelle in einen Vektor hinter die Regulationselemente der späten Transkription (*late transcription regulatory elements*, LTR) des Lambda-Phagen kloniert, führte die Expression von *holy* schneller zur Lyse der *E. coli*-Zellen als die Expression des Phagen-eigenen Holins. Auf diese Weise wurde die Fähigkeit von HOLY zur Bildung von Löchern und damit seine biologische Funktionalität demonstriert.

Die biologische Aktivität und Spezifität des Endolysins aus dem *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 war bereits Gegenstand der Dissertation von STARKE und wurde mit Hilfe von Zymogrammen nachgewiesen [Starke, 2015]. Das circa 16 kDa große und aus 133 Aminosäuren bestehende Endolysin, hier ElyY abgekürzt, zeigt eine signifikante Ähnlichkeit von 77% (E-Wert:  $1 \times e^{-73}$ ) zu einer M15-Peptidase aus *Y. pseudotuberculosis*. Diese Peptidase wird als D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase klassifiziert und kann in weiteren *Yersinia* spp. gefunden werden. Daher wird angenommen, dass es sich bei ElyY um eine Endopeptidase handelt. Damit besitzt sie eine von vier möglichen Funktionen, die ein Endolysin aufweisen kann. Während es sich bei den meisten Endolysinen um Glykosidasen oder Amidasen handelt [Loessner, 2005], gibt es auch Enzyme mit Transglykosidase-Aktivität [Young, 1992]. Die Hauptaufgabe des Endolysins besteht darin, die Peptidoglykanschicht der Wirtszelle abzubauen und damit die strukturelle Integrität der Zelle zu stören. Als Folge kann die Zelle dem internen osmotischen Druck nicht mehr standhalten und platzt [Oliveira *et al.*, 2013]. Um die Peptidoglykanschicht abzubauen zu können, muss das Endolysin in aktiver Form in deren räumliche Nähe kommen. Kanonische Endolysine liegen bereits in aktiver Form im Zytoplasma vor und nutzen die von Holinen gebildeten unspezifischen Löcher, um die Zytoplasmamembran zu durchqueren [Young, 1992]. Im Gegensatz dazu akkumulieren die SAR-Endolysine im Periplasma in Membran-gebundener und inaktiver Form. Nach

einer ebenfalls von einem Holin hervorgerufenen Depolarisation der Zellmembran, werden die SAR-Endolysine in aktiver Form freigesetzt [Xu *et al.*, 2005]. Ein SAR-Endolysin besitzt eine spezielle N-terminale Signalsequenz, die einen Transport des Proteins mittels Sec-System ermöglicht [Xu *et al.*, 2004]. Die Sequenzanalysen ließen bei ElyY keine SAR-Domäne erkennen. Somit handelt es sich hierbei um ein kanonisches Endolysin, welches vollständig gefaltet und aktiv im Zytoplasma vorliegt und auf die Aktivität des Holins angewiesen ist.

Ist das Endolysin in räumlicher Nähe zum Peptidoglykan, erfolgt zunächst die Bindung an die Zellwand, bevor die enzymatisch aktive Domäne das Murein spalten kann [Loessner, 2005]. Gemäß der Prädiktion besitzt ElyY dazu ein Zellwand-bindendes C-terminales Ende und ein enzymatisch aktives N-terminales Ende. Die Aktivität der Zellwand-Bindedomäne von Endolysinen ist sehr spezifisch und richtet sich gegen einmalige und essenzielle Bestandteile des Mureins. Daraus resultiert das enge Wirtsspektrum eines Endolysins. So ist die Aktivität des Endolysins häufig auf die Wirtsspezies des jeweiligen Phagen, aus dem das Endolysin stammt, beschränkt. In manchen Fällen kann sie sogar spezifisch für einen bestimmten Genus sein [Borysowski *et al.* 2006]. Eine solche Substratspezifität konnte für ElyY mittels der Zymogramme beobachtet werden. Am meisten bevorzugt ElyY demnach das Murein von *Y. enterocolitica* W22703 als Substrat, gefolgt von dem Peptidoglykan von *Y. intermedia* und *Y. mollaretii*. Im Gegensatz dazu wies ElyY die geringste proteolytische Aktivität gegen *E. coli* und *Y. ruckeri* auf [Tabelle 1 in Springer *et al.*, 2018].

Für die N-Acetyl- $\beta$ -D-Muramidase TtsA von *S. enterica* serovar Typhi konnte anschaulich dargestellt werden, wie wichtig die Peptidoglykan-bindende Domäne für die Spezifität des Enzyms ist. TtsA ist verantwortlich für die Freisetzung des Typhus-Toxins aus dem Periplasma. Das *ttsA*-Gen liegt innerhalb der Pathogenitätsinsel des Toxins und seine Expression korreliert mit der Toxin-Genexpression. Die Deletion von *ttsA* führte dazu, dass kein Toxin mehr außerhalb der Zellen detektiert wurde. Durch die Konstruktion von verschiedenen Chimären aus TtsA und der *Salmonella*-Muramidase Sen1395, die nicht in der Lage ist, die Toxinfreisetzung zu ermöglichen, wurde der für die Spezifität wichtige Bereich immer weiter eingegrenzt. Zum einen konnte der gesamte enzymatisch aktive N-Terminus von Sen1395 übernommen werden und die Freisetzung war weiterhin möglich. Zum anderen war auch ein Ersatz der Aminosäuren am C-Terminus der Proteinsequenz bis auf die letzten 32, die von TtsA stammen mussten, ohne eine Einschränkung der Freisetzung möglich. Innerhalb dieser 32 Aminosäuren kristallisierte sich eine bestimmte Aminosäure, und zwar ein Asparagin an Position 166, als besonders wichtig heraus, aber auch eine Loop-Struktur in diesem Bereich scheint Einfluss auf die Spezifität zu haben. Obwohl die Freisetzung des Toxins ohne eine Lyse der Zellen erfolgt, ist TtsA in der Lage, nach Zugabe geringer Mengen Chloroforms eine Zellyse zu verursachen [Hodak & Galán, 2013].

Während die Endolysine mit der meisten Ähnlichkeit zu ElyY in *Yersinia*-Genomen zu finden sind und sich dort meist innerhalb einer Tc-PAI<sub>ye</sub> hinter einem Holin-Gen befinden, gibt es auch Homologe mit geringerer Übereinstimmung in Spezies wie *E. amylovora*, *P. asymbiotica*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Shigella boydii* [Abb. 1B in Springer *et al.*, 2018]. Auch das Endolysin ChiX aus *S. marcescens* zeigte eine Übereinstimmung zu ElyY von 51% (E-Wert:  $2 \times e^{-50}$ ). Bei diesem handelt es sich um eine Zink-abhängige L-Alanyl-D-Glutamat-Endopeptidase [Owen *et al.*, 2018], die an der Freisetzung chitinolytischer Proteine beteiligt ist [Hamilton *et al.*, 2014]. Ebenso wie die Deletion des Holin-Gens *chiW* führte die Deletion von *chiX* dazu, dass die Chitinasen ChiA, ChiB und ChiC nicht mehr im Überstand nachgewiesen werden konnten, sondern im Periplasma akkumulierten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *chiX* koordiniert mit der Expression des Chitinase-Gens *chiA* bimodal, und zwar nur in einer kleinen Subpopulation von weniger als 1% der Zellen, exprimiert wird, und dass die Zellen trotz *chiA*- und *chiX*-Expression nicht lysieren. Zusätzlich zum Holin ChiW und dem Endolysin ChiX besitzt *S. marcescens* zwei Gene *chiY* und *chiZ*, die für Spanine kodieren [Hamilton *et al.*, 2014]. Es ähnelt somit in dem Aufbau seiner Lysekassette den Bakteriophagen und auch W22703, wie im Folgenden beschrieben.

Hinter den Genen *holY* und *elyY* liegen zwei weitere ORFs, welche mit 62 bp überlappen. Sie kodieren für ein 119 Aminosäuren großes Protein, das eine N-terminale Transmembrandomäne aufweist und wahrscheinlich exportiert wird, und ein Protein, das aus 76 Aminosäuren besteht und bei dem es sich vermutlich um ein Membranprotein handelt. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen beiden Proteinen um ein i-Spanin und ein o-Spanin handelt. Der Aufbau entspricht damit einer klassischen Lysekassette wie sie etwa beim Phagen  $\lambda$  oder dem Phagen 21 zu finden ist [Young, 1992]. In Anlehnung an die akzessorischen Proteine Rz und Rz1 der Phagen werden die beiden Proteine hier YRz und YRz1 genannt, wobei es keine Homologie zu den Phagenproteinen gibt. Proteine mit signifikanter Sequenzübereinstimmung können nur innerhalb der *Yersinia*-Spezies gefunden werden, nämlich in jenen Spezies, die ebenfalls die insektizide Pathogenitätsinsel tragen. Generell sind die vier Lysegene innerhalb der Gattung *Yersinia* hoch konserviert und dabei immer zwischen den Genen der TC-PAI<sub>ye</sub> zu finden [Fuchs *et al.*, 2008]. Des Weiteren besitzen die vier Gene einen gemeinsamen Promotor und bilden ein polycistronisches Transkript [Abb. 2 in Springer *et al.*, 2018]. Dies entspricht den Erwartungen, da auch die Lysegene der Phagen in der späten Phase der Infektion als transkriptionelle Einheit ausgehend von dem gemeinsamen Promotor pR' beschrieben werden [Young, 1992]. Obwohl die Lysekassette mitten in der Pathogenitätsinsel liegt, ermöglicht der eigene Promotor eine Regulation dieser Gene unabhängig von der Toxingenexpression.

Die Toxingene werden bei Temperaturen zwischen 10°C und 20°C exprimiert [Bresolin *et al.*, 2006]. Bei 15°C ist die Expression der Lysegene zumindest so hoch, dass es möglich gewesen ist, eine ausreichende Menge an RNA zu isolieren, um die RT-PCR-Analysen durchführen zu können

[Abb. 2 in Springer *et al.*, 2018]. Dennoch zeigte der gemeinsame Promotor der Lysegene in Promotorfusionsstudien weder bei 15°C noch bei 37°C eine signifikante Transkriptionsaktivität. Erst eine Deletion des Gens *ymoA* führte zu einer messbaren Aktivität des Promotors bei beiden Temperaturen [Starke, 2015]. Der Virulenzregulator YmoA verhindert die Expression sämtlicher *tc*-Gene bei 37°C [Starke & Fuchs, 2014], daher ist auch ein Einfluss auf die Expression der Lysegene denkbar.

Da bisher keine nativen Bedingungen bekannt sind, bei denen die Expression der Lysekassette *in vitro* signifikant induziert wird, wurde die biologische Funktionalität mittels Überexpressionsversuchen untersucht. Die Überexpression, meist im heterologen Wirt *E. coli*, ist dabei ein häufig verwendeter Ansatz, um die Funktionalität eines potenziell lytischen Proteins zu testen [Wang *et al.*, 2000]. So wurden putative Holine oder Endolysine oftmals einzeln getestet, wie das Holin HOL des *L. plantarum* Phagen  $\phi$ g1e [Oki *et al.*, 1997] oder das Endolysin PlyTW des *S. aureus* Phagen Twort [Loessner *et al.*, 1998], aber auch das Holin TcdE [Tan *et al.*, 2001] oder die Muramidase TtsA [Hodak & Galán, 2013]. Ebenso führte die gleichzeitige Expression von Holin NucE und Endolysin NucD aus *S. marcescens* zur Lyse von *E. coli*-Zellen und bestätigte deren Funktionalität [Berkmen *et al.*, 1997]. Während die phagenverwandten Proteine den heterologen Wirt *E. coli* sowie verschiedene *Yersinia*-Spezies wie *Y. kristensenii* oder *Y. pseudotuberculosis* unabhängig von der Temperatur lysierten [Abb. 3 und 4B in Springer *et al.*, 2018; Abb. 2 und 3B in Springer *et al.*, 2021], erfolgte eine Lyse der W22703-Zellen sowie der anderen getesteten *Y. enterocolitica* Biovare nur bei einer Temperatur von 37°C [Abb. 4A in Springer *et al.*, 2018; Abb. 1 und 3A in Springer *et al.*, 2021]. Als Nachweis dafür, dass es sich bei dem Absinken der Optischen Dichte nach der Überexpression von *holY* und *elyY*, tatsächlich um eine Lyse handelt, dienten die Lebend-Tot-Färbung [Abb. 5 in Springer *et al.*, 2018] sowie Zellzahlbestimmungen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Induktion der Genexpression [Abb. S2 in Springer *et al.*, 2018]. Bei den Überexpressionsversuchen handelt es sich zwar um stark artifizielle Bedingungen, aber so konnte gezeigt werden, dass die Phagenproteine in der Lage sind, eine Zelllyse zu verursachen. Des Weiteren war es so möglich, eine Aktivität der Spanine zu beobachten. Waren deren Gene ebenfalls im Überexpressionsplasmid enthalten, war die hervorgerufene Lyse der *Y. enterocolitica*-Zellen ausgeprägter im Vergleich zur Überexpression von *holY* und *elyY* allein [Abb. 4 in Springer *et al.*, 2018, am Beispiel von Biovar 2 dargestellt]. Während sich bei der Expression in *E. coli* unter normalen Kulturbedingungen kein Unterschied zeigte [Abb. 1A in Springer *et al.*, 2018], wurde dieser umso deutlicher, als die Kulturen unter Zugabe von divalenten Magnesium-Ionen nur leicht geschüttelt wurden [Abb. S3 in Springer *et al.*, 2018]. Die Zugabe von  $MgCl_2$  stabilisiert die äußere Membran und hält damit das Peptidoglykan zusammen, obwohl es durch das Endolysin gespalten wird. Sind die Spanine anwesend, erfolgt eine Lyse. Sind die Spanine nicht vorhanden, werden die Zellen kugelförmig und fragil, die OD sinkt weniger stark. Wird die Kultur zu stark geschüttelt, ist dieser Unterschied

weniger gut zu erkennen [Young, 1992]. Es ist zu erwarten, dass die beiden Spanine unter nativen Bedingungen mindestens signifikant zur Lyse beitragen, wenn sie nicht sogar dafür erforderlich sind. Bei der durch Phagen hervorgerufenen Lyse gelten die Spanine als notwendige Faktoren für eine vollständige Lyse. Es wird aktuell davon ausgegangen, dass sie für die Durchlässigkeit der äußeren Membran sorgen, indem sie zu einer Fusion der inneren und äußeren Membran führen [Berry *et al.*, 2012; Rajaure *et al.*, 2015].

### 3.2 Die engmaschige Kontrolle der Aktivität der Lysekassette ist überlebenswichtig

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, sind die vier phagenverwandten Gene *holY*, *elyY*, *yRz* und *yRz1* funktional. Kommt es zu einer Erhöhung der Expression der Gene, lysieren sie ihre Wirtszellen. Bei den meisten Phagen wird eine zu frühe und/oder zu starke Expression der Lysegene durch mindestens zwei Mechanismen umgangen. Zum einen unterliegen die Gene dem Promotor für die späte Genexpression  $pR'$  und werden erst vollständig abgelesen, wenn der Antiterminationsfaktor Q das Überlesen des Terminators  $tR'$  ermöglicht. Somit werden zunächst die für die Bildung der Phagenpartikel wichtigen Gene exprimiert, bevor eine Lyse der Zellen induziert wird [Roberts, 1975]. Zum anderen verhindert die Produktion von Antiholinen, dass es zu einer vorzeitigen Lyse durch zu schnelles Akkumulieren der Holin-Proteine in der Zellmembran kommen kann [Gründling *et al.*, 2000b].

Auch für die innerhalb der Pathogenitätsinsel von *Y. enterocolitica* W22703 liegenden Lysekassette verdichten sich die Hinweise auf eine strenge Regulation, die stark von der Temperatur beeinflusst wird. Diese erfolgt einerseits auf der Ebene der Genexpression: So wie die Expression der Toxingene nur bei niedrigen Temperaturen zwischen 10°C und 20°C erhöht ist [Bresolin *et al.*, 2006], konnte lediglich bei 15°C ein Transkript der Phagengene isoliert werden [Abb. 2 in Springer *et al.*, 2018]. Ein Komplex aus YmoA und H-NS verhindert die Expression der Toxingene bei 37°C durch Bindung an deren Promotoren bzw. intragenische Regionen [Starke & Fuchs, 2014]. Es zeigte sich, dass der Promotor der Lysegene ebenfalls von YmoA reprimiert wird. Ist *ymoA* deletiert kommt es bei beiden Temperaturen gleichermaßen zu einer messbaren Promotoraktivität [Starke, 2015]. Ob umgekehrt der Aktivator TcaR2 die Expression bei einer der Temperaturen aktiviert, wie es bei den Toxingenen der Fall ist, ist leider nicht bekannt und verdient weitere Untersuchungen.

Die Beobachtung der Repression der Lyse-Genexpression durch YmoA erklärt jedoch nicht den temperaturabhängigen Lyse-Effekt, den die Überexpression der Phagengene auf die getesteten *Y. enterocolitica* Biovare zeigt. Dieser ist auf einen weiteren Regulationsmechanismus, der auf Proteinebene erfolgt, zurückzuführen. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Lyseproteine von der Protease Lon kontrolliert wird. Zum einen wurde der Temperatur-Effekt bei der

Überexpression der Phagengene in einem *lon*-defizienten W22703-Stamm aufgehoben, so dass eine Lyse nun auch bei 15°C zu beobachten war. Dies konnte durch das Einbringen des *lon*-Gens mittels Plasmids komplementiert werden [Abb. 4 in Springer *et al.*, 2021]. Zum anderen zeigte sich, dass die Protease für den Abbau von ElyY verantwortlich ist [Abb. 5 in Springer *et al.*, 2021]. Die Protease Lon ist ebenso wie ClpXP nicht nur für den Abbau fehlgefalteter und beschädigter Proteine zuständig [Gottesman *et al.*, 1997], sondern trägt durch die Proteolyse besonders kurzlebiger Regulationsfaktoren zu einem reibungslosen Ablauf physiologischer Prozesse bei [Gottesman, 2003]. Ein Beispiel für einen solchen Vorgang ist der temperaturabhängige Abbau des Transkriptionsfaktors RovA bei *Y. pseudotuberculosis* [Herbst *et al.*, 2009]. Bei pathogenen Yersinien koordiniert RovA die Expression einer Vielzahl an Genen, die für den Metabolismus oder die Virulenz wichtig sind. Unter anderem aktiviert RovA die Transkription von *inv* oder anderen Adhesinen bei moderaten Temperaturen [Revell & Miller, 2000]. Dabei erfolgt eine Expression von *rovA* selbst nur bei diesen Temperaturen und das Gen wird bei 37°C reprimiert [Heroven *et al.*, 2004]. Liegt RovA bereits als Protein in der Zelle vor und es kommt zu einer Temperaturveränderung von kalt nach warm, ändert sich die Tertiärstruktur des Proteins selbst. Infolgedessen ist seine DNA-Bindekapazität verringert, und RovA ist prädisponiert für den Abbau durch die Protease Lon [Herbst *et al.*, 2009]. Die phagenverwandten Proteine sind mindestens im heterologen Wirt *E. coli* sowohl bei 37°C als auch bei 15°C lytisch aktiv. Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass es zu einer Konformationsänderung in Folge einer Temperaturänderung kommt und sie dadurch anfälliger für eine Degradation durch Lon sind. Hier scheint eher die Stabilität der Protease selbst eine Rolle zu spielen. Untersuchungen dazu zeigten, dass Lon in *Y. enterocolitica* W22703 bei 37°C weniger stabil ist als bei 15°C [Abb. S4 in Springer *et al.*, 2021].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Expression der Lysegene im Stamm W22703 bei 37°C sehr wahrscheinlich von YmoA inhibiert wird, so wie es bei den Toxingenen der Fall ist [Starke & Fuchs, 2014; Starke, 2015]. Eine Koexpression mit den Toxingenen wurde zwar nicht experimentell nachgewiesen, ist aber anzunehmen, wie auch für die Endolysingene *ttsA* aus *S. Typhi* und *chiX* aus *S. marcescens* die koordinierte Expression mit den umliegenden Genen gezeigt werden konnte [Hodak & Galán, 2013; Hamilton *et al.*, 2014]. Somit wäre ein proteolytischer Abbau der Proteine der Lysekassette bei 37°C nicht notwendig. Ist die Expression bei 15°C aktiviert, bietet die Degradation durch die Protease Lon eine Art Schutzmechanismus dafür, dass nicht zu viele der Proteine in der Zelle vorliegen und eine Lyse der Zellen verhindert werden kann. Was passiert, wenn dieser *Y. enterocolitica*-spezifische Schutzmechanismus nicht greift, zeigen die Überexpressionsdaten von *Y. pseudotuberculosis* oder *E. coli*. Bei diesen Stämmen erfolgt eine Lyse unabhängig von der Temperatur.



Die Degradation von HOLY wurde experimentell nicht überprüft. Es ist aber anzunehmen, dass das Holin ebenfalls abgebaut wird. Denn kommt es zu einer ungehinderten Produktion von Holin-Proteinen infolge einer induzierten Überexpression, erfolgt ein Sterben der Zellen auch unabhängig von einem Endolysin, da der Elektronentransport über die Zytoplasmamembran gestoppt wird und kleine Moleküle aus der Zelle austreten können [Reader & Siminovitch, 1971].

### 3.3 Sind die Phagenproteine Teil eines neuen Typ 10-Sekretionssystems?

Nachdem die Funktionalität der vier phagenverwandten Gene nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage nach ihrer biologischen Bedeutung für die *Y. enterocolitica* W22703-Zellen. Auffällig ist dabei vor allem ihre Lage. Die Gene befinden sich mitten in der Pathogenitätsinsel Tc-PAI<sub>ve</sub>, weshalb sich ein Zusammenhang mit der Sekretion des Toxins geradezu aufdrängt. Bereits WATERFIELD *et al.* stellten die Vermutung auf, dass die Proteine Holin und Endolysin an der Freisetzung der hochmolekularen Toxine beteiligt sein könnten, da auch die insektiziden Pathogenitätsinseln von *P. luminescens* oft mit den Lysegenen assoziiert vorliegen [Waterfield *et al.*, 2001b; Waterfield *et al.*, 2007]. Doch in welcher Form sie in die Freisetzung involviert sein könnten, ist bislang unklar. Neben der Möglichkeit, dass Zellen durch die Phagenproteine lysiert werden und infolgedessen der Toxinkomplex freigesetzt wird, liefern mehrere Publikationen Anhaltspunkte für eine Sekretion ohne Zelllyse und konstruieren damit das Modell eines möglichen neuen Sekretionssystems.

Bei den in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Beispielen für die im Bakteriengenom vorkommenden Holin- und/oder Endolysin-Gene, zeigte sich stets ein Zusammenhang zwischen dem Genlocus und den umliegenden Genen. Das Gen *ttsA* von *S. Typhi* liegt mitten zwischen den Genen, die für die Typhus-Toxinuntereinheiten kodieren. Ist das Gen deletiert, erfolgt keine Freisetzung des Toxins [Hodak & Galán, 2013]. Das Gen *tcdE* liegt innerhalb der PaLoc von *C. difficile* zwischen den beiden Genen für die Toxine TcdB und TcdA und zumindest bei manchen Stämmen zeigte sich eine TcdE-abhängige Sekretion dieser Toxine [Govind & Dupuy, 2012]. *S. marcescens* besitzt eine komplette Lysekassette in unmittelbarer Nähe der Gene, die für die Chitinasen kodieren. Auch hier wurde eine Sekretion in Abhängigkeit der potenziell lytischen Proteine nachgewiesen [Hamilton *et al.*, 2014]. Anhand von Sequenzvergleichen und Homologie-Analysen wurden weitere Toxine oder extrazelluläre Enzyme in unmittelbarer Nähe zu Paaren von einem Peptidoglykan-abbauenden Protein und einem Holin ermittelt. Unter anderem ist im Genom von *S. Typhi* eine weitere Chitinase in der Nachbarschaft des Holins sty0015 und des Endolysins sty0016 lokalisiert [Hodak & Galán, 2013]. Aber auch in anderen Organismen wurden Homologe zu den Endolysinen ChiX oder TtsA gefunden. Zum Beispiel gibt es ein Holin/Endolysin-Paar in Stämmen von *Enterobacter*, *Citrobacter* und *Proteus*. Diese Beispiele haben gemeinsam, dass in ihrer unmittelbaren Umgebung mindestens ein Gen für einen

Transkriptionsregulator der LysR-Familie vorhanden ist. Homologe zu TtsA wurden unter anderem im Genom verschiedener *E. coli*-Stämme *downstream* von zwei Holin-Genen neben zwei Untereinheiten des hitzelablen Enterotoxins IIA gefunden [Palmer *et al.*, 2021].

Anhand der bisher bekannten Daten zu TtsA aus *S. Typhi* und der ChiWXYZ-Kassette aus *S. marcescens* postulieren PALMER *et al.*, dass diese ein neuartiges Sekretionssystem darstellen, welches sie Typ 10-Sekretionssystem (T10SS) nennen. Die genaue Funktionsweise ist zwar bisher noch unbekannt, aber es wird postuliert, dass dieses Sekretionssystem in die Freisetzung von Toxinen und extrazellulären Proteinen involviert ist. Da die Autoren ihre Annahmen vor allem auf die Daten zur Funktion von TtsA stützen, gehen sie davon aus, dass die Sekretion der Proteine nur über das Peptidoglykan und die äußere Membran vermittelt wird. Bei *S. Typhi* besitzen die freizusetzenden Toxinkomponenten eine Sec-Sequenz und werden auf diese Weise ins Periplasma transportiert, wo das Holoenzym gebildet wird [Song *et al.*, 2013]. Es erfolgt dann ein Transport des Toxins von der *cis*-Seite des Periplasmas durch das Peptidoglykan auf dessen *trans*-Seite, und zwar mittels der von TtsA herbeigeführten Hydrolyse des mit bestimmten LD-Querverbindungen vernetzten Peptidoglykans. Diese Verknüpfung zwischen zwei Diaminopimelinsäuren (m-DAP) von benachbarten Peptidketten häuft sich bei *S. Typhi* vor allem an den Zellpolen, weswegen auch das Typhus-Toxin und TtsA an den Polen lokalisiert sind [Geiger *et al.*, 2018; Geiger *et al.*, 2020]. Für die finale Freisetzung der Proteine in den extrazellulären Raum scheinen dann Wirtsfaktoren wie Gallensalze oder antimikrobielle Peptide nötig zu sein [Geiger *et al.*, 2018]. Da in unmittelbarer Nähe von TtsA kein Holin kodiert ist, wird angenommen, dass ein an einer anderen Stelle im Genom vorhandenes Holin diese Funktion übernimmt [Hodak & Galán, 2013; Palmer *et al.*, 2021].

Der Mechanismus des Sekretionssystems scheint bei *S. marcescens* etwas von dem oben beschriebenen abzuweichen. Dies liegt zum einen daran, dass das Endolysin ChiX das Peptidoglykan an anderen Stellen hydrolysiert. Es spaltet nämlich nicht im Rückgrat des Mureins wie TtsA, sondern innerhalb der Peptidstränge zwischen dem L-Alanin an Position eins und der D-Glutaminsäure an zweiter Position [Owen *et al.*, 2018]. Zum anderen ist das Peptidoglykan bei den Vertretern der *Enterobacteriaceae* über das reichlich vorhandene Braun-Lipoprotein (Lpp-Protein) fest mit der äußeren Membran verbunden, wodurch die Stabilität der äußeren Membran erhöht wird [Braun & Wolff, 1970]. Durch die Aktivität von ChiX werden nicht nur die Querverbindungen der Glykan-Stränge gespalten, sondern auch die Lpp-Proteine von der äußeren Membran gelöst [Owen *et al.*, 2018]. Dieser Vorgang könnte zu einer Formation von äußeren Membranvesikeln (OMVs) führen [Schwechheimer *et al.*, 2014], über die die Freisetzung der Chitinasen erfolgt [Palmer *et al.*, 2021]. In diesem Modell könnten die Spanine ChiY und ChiZ die Funktion haben, entweder den periplasmatischen Raum zu begrenzen, in dem ChiX aktiv ist, oder die äußere Membran zu stabilisieren, indem sie sich über das Periplasma erstrecken [Palmer *et al.*, 2021]. Diese Hypothese setzt voraus, dass alle Chitinasen ins

Periplasma transportiert werden, da dem Holin selbst keine Funktion bei der Protein-Sekretion zugeschrieben wird. Seine einzige Funktion in diesem Szenario ist es, dem Endolysin den Zugang zum Peptidoglykan zu ermöglichen. Jedoch besitzen nur zwei der vier am selben Genlocus vorhandenen Chitinasen eine Sec-Sequenz [Hamilton *et al.*, 2014]. Daher könnte die Rolle des Holins vielleicht doch umfangreicher sein als von PALMER *et al.* angenommen. GOVIND & DUPUY mutmaßen in ihrer Arbeit über die Möglichkeit, dass die Toxine von *C. difficile* in ungefaltetem Zustand die innere Membran passieren. Somit wäre nur ein schmaler Kanal in der Zytoplasmamembran nötig, wodurch ein Austreten anderer zytoplasmatischer Proteine verhindert werden könnte [Govind & Dupuy, 2012]. Tatsächlich erreichen die von Holinen geformten Poren Durchmesser zwischen 15 Å im Fall eines Pinholins [Pang *et al.*, 2009] und 1 µm bei einem kanonischen Holin [Dewey *et al.*, 2010]. An dem konkreten Beispiel des Lambda Holins S105 konnte gezeigt werden, dass die mittels Detergenzien solubilisierten Proteine ringähnliche Strukturen aus 72 Monomeren bilden, die einen inneren Durchmesser von 8 nm besitzen [Sava *et al.*, 2008]. Die von den kanonischen Holinen gebildeten Poren sind demnach so groß, dass vollständig gefaltete Proteine hindurch passen. Diese können sogar noch größer sein als das bereits korrekt gefaltet im Zytoplasma vorliegende, relativ kleine Protein Endolysin. Zu diesem Umstand formulieren GOVIND & DUPUY zwei weitere Hypothesen. Zum einen würde eine kontrolliert niedrige Expression des Holin-Gens dazu führen, dass die gebildeten Poren so klein sind, dass sie zwar eine Protein-Sekretion ermöglichen, aber eine Lyse der Zellen verhindern. Diese Hypothese würde dann die Idee der Sekretion von ungefalteten Proteinen unterstützen. Zum anderen könnten die korrekt gefalteten Toxine TcdA und TcdB als eine Art Stöpsel dienen und die Pore verschließen. Dadurch würde eine Lyse der Zellen verhindert werden, aber die Toxine könnten auf eine Wirtszelle wirken [Govin & Dupuy, 2012].

Bei den näher betrachteten Beispielen für eine Beteiligung der phagenverwandten Proteine an der Freisetzung von Proteinen (TtsA, TcdE, ChiWXYZ) wird stets betont, dass diese ohne eine Lyse der Zellen erfolgt [Hodak & Galán, 2013; Govin & Dupuy, 2012; Hamilton *et al.*, 2014]. GOVIND & DUPUY bezeichnen die Sekretion der Proteine als physiologisch sinnvoller, wenn die Zellen dabei nicht lysieren. Dennoch lässt sich der Gedanke, dass die Freisetzung der Proteine anhand einer Lyse erfolgt, nicht gänzlich von der Hand weisen. Dies gilt vor dem Hintergrund, dass auch unter den Bakterien eine Art altruistisches Verhalten möglich ist, wobei sich ein geringer Teil der Population zum Vorteil der restlichen Population aufopfert. Dabei kommt es unter Selbstlyse einiger weniger Zellen zur Freisetzung von Toxinen oder anderen das Gewebe schädigenden Molekülen, die es dem größeren Teil der Population ermöglichen, neue Nahrungsquellen zu erschließen [Ackermann, 2015]. Beispielsweise exprimieren nur etwa 15% der Population von *S. typhimurium* das SPI-T3SS und die Flagellengene, die für die Invasion des Darmes im Wirt erforderlich sind. Diese wenigen Zellen werden ins Darmgewebe eingeschleust, wodurch eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Dabei stirbt dieser Teil der Population, während sich der größere Teil der Zellen ungehindert vermehren kann. Die beiden

Subpopulationen sind genetisch identisch, trotzdem opfert sich nur ein Teil der Salmonellen und dringt ins Darmgewebe ein [Ackermann *et al.*, 2008]. Ein solch altruistisches Verhalten wäre auch dann zu erwarten, wenn eine Freisetzung des bakteriellen Toxins nur durch eine Lyse der Bakterien erfolgen kann, wie bspw. bei dem Shiga-Toxin 1 von *E. coli* [Wagner *et al.*, 2002] oder bei Pneumolysin von *S. pneumoniae* [Martner *et al.*, 2008]. Bei letzterem Beispiel setzt ein Teil der Bakterien das Toxin frei, indem sie selbstzerstörerisch platzen, wodurch für die übrige Population eine Invasion der Lunge des Wirtes begünstigt wird.

Ob und in welcher Form die Lysekassette aus *Y. enterocolitica* W22703 an der Freisetzung des insektiziden Toxinkomplexes beteiligt ist, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden. Die Kassette ist funktional, und eine Überexpression der Gene führt zur Lyse der Wirtszellen. Des Weiteren zeigten bereits frühere Infektionsversuche mit *C. elegans*, dass die Lysekassette für die volle nematozide Pathogenität der Bakterien notwendig ist. Eine Deletion von Holin und Endolysin führte zu einer signifikanten Reduktion der Virulenz gegen die Nematoden [Starke, 2015]. Dennoch konnte bisher nicht aufgeklärt werden, wie genau die Kassette zur Pathogenität beiträgt. Es ist ebenfalls festzuhalten, dass bisher noch für keine Spezies ein Mechanismus bekannt ist, der die Freisetzung dieser sehr großen Toxinkomplex-Proteine, die keinerlei Sekretionssignal besitzen, erklärt [McQuade & Stock, 2018]. Die für die insektiziden Proteine von *Y. pestis* aufgestellte Hypothese, dass es sich dabei um einen gerichteten Transport durch das Ysc-Yop-T3SS handeln könnte [Gendlina *et al.*, 2007], wurde bereits widerlegt [Spinner *et al.*, 2012]. Gegen diese Hypothese der Sekretion mittels T3SS spricht auch die Größe des funktionalen Toxinkomplexes. Dies würde bedeuten, dass jede Toxinkomponente einzeln in den extrazellulären Raum transportiert werden müsste und sich erst außerhalb der Bakterienzelle das funktionale Holoenzym bilden würde [Hinchliffe *et al.*, 2010]. Es gibt jedoch Studien für *X. nematophilus*, die zeigen, dass die Toxinkomponenten in der gleichen Zelle exprimiert werden müssen, um eine orale Aktivität gegen *Pieris brassicae*, den Großen Kohlweißling, aufzuweisen. Wurden dagegen Lysate, die die drei einzelnen Proteinkomponenten enthalten, vermischt, war keine Toxizität nachweisbar [Sergeant *et al.*, 2003]. Dadurch, dass die Freisetzung des insektiziden Toxins von Yersinien als Holotoxin erfolgen muss, lässt sich die oben aufgeführte Hypothese des altruistischen Verhaltens einer Subpopulation nicht generell ausschließen. Dabei würden sich einige wenige Zellen mit Hilfe der phagenverwandten Gene lysieren und den Toxinkomplex in seiner aktiven Form freisetzen. Dieser würde den übrigen Zellen dienen, um eine Besiedelung des Wirtes voranzutreiben. Diese Hypothese wird gestützt von der Beobachtung, dass die Expression von *tcaA* nur in einer kleinen Subpopulation erfolgt [Starke, 2015]. Allerdings erfolgte diese Beobachtung nur unter *in vitro*-Bedingungen. Es ist nicht auszuschließen, dass innerhalb des Wirtes, wenn die entscheidenden extrazellulären Signale vorhanden sind, in allen Bakterienzellen die *tcaA*-Expression erhöht ist. Ein solcher Vorgang konnte bereits für das insektizide Toxin FitD von *P. aeruginosa* gezeigt werden.

Während dieses *in vitro* nur von einem geringen Prozentsatz der Bakterienzellen gebildet wird, produzieren *in vivo* alle Zellen das Toxin [Péchy-Tarr *et al.*, 2013]. Des Weiteren spricht gegen ein altruistisches Verhalten, dass für *S. marcescens* ebenfalls eine bimodale Expression der Chitinase ChiA unter *in vitro*-Bedingungen festgestellt, eine Lyse durch die Phagenproteine jedoch experimentell ausgeschlossen wurde [Hamilton *et al.*, 2014]. Die Analogie im Aufbau und zur Lage der Lysekassette von *S. marcescens* sowie der Homologie von ElyY zu ChiX deutet auf eine ähnliche Funktionsweise hin. Dies würde bedeuten, dass die Toxinkomponenten zunächst ins Periplasma gelangen müssten. Aufgrund der fehlenden Sekretionssignale stellt sich jedoch die Frage, wie sie dorthin kommen. Eventuell passieren sie die von HolY gebildeten Poren in ungefalteter Form, wie von GOVIND & DUPUY postuliert. MEHNER-BREITFELD *et al.* identifizierten in der PaLoc von *C. difficile* ein Überbleibsel eines Endolysins und zeigten, dass dieses mit dem Toxin TcdB interagiert. Diese Interaktion könnte dazu beitragen, dass das Toxin durch die Holin-Pore geschleust wird [Mehner-Breitfeld *et al.*, 2018]. So könnte auch eine Interaktion ElyYs mit den Toxinkomponenten sicherstellen, dass diese den Weg ins Periplasma finden. Anschließend würde sich das Holotoxin bilden und dieses die Zelle in den durch die Aktivität von ElyY gebildeten OMVs verlassen. Eine andere Möglichkeit wäre aber auch, dass gemäß der zweiten Hypothese von GOVIND & DUPUY das Toxin als Holotoxin aus dem Zytoplasma durch die vom Holin gebildeten Poren gelangt und dort als Pfropfen in der Membran verbleibt. Versuche zum Nachweis der Toxinuntereinheit TcA in der äußeren Membran ergaben jedoch keine Unterstützung dieser Hypothese (Daten nicht gezeigt). Dabei sollte im Western Blot mithilfe zweier verschiedener Primärantikörper entweder das Fusionsprotein von TcaA mit dem rot-fluoreszierenden Protein (RFP) oder TcaA allein in Überstandsproben und Präparationen der äußeren Membran detektiert werden. Wurden der Wildtypstamm *Y. enterocolitica* W22703 oder die Holin/Endolysin-Deletionsmutante verwendet, war es kaum möglich die Proteine in den einzelnen Fraktionen nachzuweisen. Erst die Deletion des Gens *ymoA* führte zu einer starken Bande im Western Blot. Die *tcaA*-Expression war nun aber so stark erhöht, dass in allen Fraktionen viel TcaA vorlag und kein Unterschied zwischen der *ymoA*-Deletionsmutante und einer *ymoA-holy/elyY*-Doppelmutante erkennbar war.

Weitere Untersuchungen zur Freisetzung des Toxincomplexes sollten daher unter möglichst nativen Bedingungen, evtl. in einem passenden Tiermodell wie *G. mellonella* unter oraler Infektion, erfolgen, um eine experimentell verursachte Lyse durch artifizielle Bedingungen wie die Überexpression einzelner Gene zu vermeiden.

### 3.4 Yersinien besitzen ein breites Repertoire an neuartigen Toxinen

Die Gattung *Yersinia* umfasst mindestens 20 Spezies, von denen drei als humanpathogen gelten. Die übrigen Arten kommen mehrheitlich in der Umwelt vor und werden aufgrund des Fehlens des

Virulenzplasmids pYV als apathogen eingestuft [Portnoy *et al.*, 1981]. Dennoch werden auch solche *Yersinia*-Spezies sowie als nicht humanpathogen geltende *Y. enterocolitica* Isolate in Proben von Patienten mit gastroenteralen Symptomen gefunden [Huovinen *et al.*, 2010]. Daher ist die Suche nach möglichen Virulenzfaktoren, die es auch diesen Spezies ermöglichen, in verschiedenen Wirtsorganismen zu überleben, Gegenstand verschiedener Untersuchungen. Eine Reihe von Studien befasst sich bspw. mit der Virulenz gegenüber Säugetieren der als apathogen eingeschätzten *Y. enterocolitica*-Isolate, die dem Biotyp 1A (Phylogruppe 1) zugeordnet werden. So konnte für solche Stämme gezeigt werden, dass sie durchaus in der Lage sind, in kultivierte Epithelzellen einzudringen [McNally *et al.*, 2006; Tennant *et al.*, 2003a] und in kultivierten Makrophagen zu überleben [McNally *et al.*, 2006]. Als ein wichtiger Faktor für das Überleben dieser Isolate in den Makrophagen stellten sich die Flagellen heraus [McNally *et al.*, 2007]. Diese spielen ebenfalls eine große Rolle bei der kürzlich demonstrierten Toxizität gegenüber Insekten [Alenizi *et al.*, 2016]. Des Weiteren sind die sogenannten *Y. enterocolitica*-ähnlichen und als apathogen bewerteten Spezies wie *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* oder *Y. kristensenii* von besonderem Interesse. Diese besitzen zwar kein Virulenzplasmid pYV, dafür aber Gene für andere typische Virulenzfaktoren wie *fepA*, *fes*, *ystB* oder *ail*. Innerhalb der genannten Spezies gibt es einzelne Stämme, die im Zellkulturversuch ein ähnlich invasives Potential wie der hochpathogene *Y. enterocolitica*-Stamm 8081 zeigten [Imori *et al.*, 2017]. Neben der Frage nach den bereits humanpathogen wirkenden Virulenzfaktoren, finden auch jene Pathogenitätsfaktoren Beachtung, die ein Überleben in Invertebraten wie Nematoden und Insekten ermöglichen. Die Gattung *Yersinia* besitzt ein breites Repertoire an neuartigen Toxinen, die sich vielleicht nur minimal verändern müssten, um sich von einem insektiziden zu einem humanpathogenen Toxin zu entwickeln. So konnte bereits für die humanpathogen Bakterien *Y. pestis*, *B. anthracis* und *P. asymbiotica* gezeigt werden, dass sie sich rasant und nur durch geringfügige Änderungen im Genom aus einem Insekt-assoziierten Vorfahren weiterentwickelt haben [Waterfield *et al.*, 2004].

Bisher wurde die Pathogenität der einzelnen Stämme vor allem im Mausmodell untersucht [Bottone, 1999]. Inzwischen dienen aber auch Insektenlarven bspw. von *M. sexta*, dem Tabakschwärmer, oder *G. mellonella* zur Einschätzung der Virulenz und dem Vergleich der Pathogenität verschiedener Stämme [Fuchs *et al.*, 2008; Alenizi *et al.*, 2016]. Dazu werden die Tiere infiziert und die Toxizität der untersuchten Bakterien anhand der Überlebensrate im Verlauf von ein paar Tagen bestimmt. Hierbei gibt es bereits Unterschiede im Infektionsgeschehen, wenn die Infektion der Tiere oral oder mittels Inokulation ins Hämocoel durchgeführt wird. Beispielsweise konnten FUCHS *et al.* nur eine Korrelation zwischen der Anwesenheit des insektiziden Toxinkomplexes Tc in verschiedenen *Yersinia* spp. und deren Virulenz gegen die Insektenlarven feststellen, wenn die Infektion der Tiere oral erfolgte. Nach Injektion der Bakterien direkt in das Hämocoel der *G. mellonella*-Larven wurde ein insektizides Potential der untersuchten Stämme unabhängig von Tc beobachtet [Fuchs *et al.*, 2008]. Dieser

Unterschied zwischen einer oralen Infektion von *M. sexta*-Larven und der intrahämocoelen Infektion von *G. mellonella*-Larven konnte ebenfalls für die Spezies *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii* gezeigt werden [Tab. 1 in Springer *et al.*, 2018]. Während im oralen Infektionsmodell *Y. frederiksenii* die deutlich höhere Pathogenität zeigte, war im *Galleria*-Modell für beide Isolate eine starke Virulenz gegen die Tiere zu verzeichnen. Diese ist höher als bei allen anderen bisher getesteten *Yersinia* spp., wie *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. ruckeri* oder *Y. bercovieri* [Fuchs *et al.*, 2008] und sie tritt unabhängig vom insektiziden Toxinkomplex auf. Ebenfalls unabhängig von Tc ist die hohe Virulenz des *Y. enterocolitica*-Stammes 8081, die nahezu der Toxizität von *P. luminescens* entspricht [Abb. 2 in Springer *et al.*, 2018]. Die letztgenannte Beobachtung ist hervorzuheben, da sie im Widerspruch zu den Ergebnissen von ALENIZI *et al.* zu stehen scheint. In dieser Studie zeigten nämlich sämtliche getesteten und als humanpathogen eingestuften *Y. enterocolitica*-Isolate, unter welchen sich auch der Stamm 8081 befand, keine Virulenz gegenüber der Wachsmottenlarve. Jedoch führten die Autoren ihre Versuche bei 37°C und 25°C durch, während sie die niedrigeren Temperaturen vernachlässigten [Alenizi *et al.*, 2016]. Bei 15°C zeigte sich der Stamm 8081 indessen hoch-virulent mit einer letalen Dosis von 38 kolonieformenden Einheiten [Abb. 2 in Springer *et al.*, 2018]. Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass bei 15°C wiederum andere Virulenzfaktoren aktiviert werden als bei höheren Temperaturen. Dass die Virulenzfaktoren bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich reguliert werden, ist ein für die Gattung *Yersinia* häufig beobachteter Umstand. So werden bei den humanpathogenen Spezies bspw. die für eine Infektion nötigen, auf dem Plasmid pYV kodierten Faktoren bei 37°C induziert, während sie noch bei 25°C reprimiert werden [Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992]. Im Gegensatz dazu wird die Expression der Gene, die für den insektiziden Toxinkomplex kodieren, im Stamm W22703 bei 37°C gehemmt und bei niedrigen Temperaturen aktiviert [Bresolin *et al.*, 2006]. ALENIZI *et al.* stellten ebenfalls für die Stämme, die einen insektiziden Effekt auf die Gallerien hatten, eine höhere Virulenz bei 25°C als bei 37°C fest. Auch die Virulenz der *Y. frederiksenii*- und *Y. intermedia*-Isolate sowie des Stammes 8081 zeigte einen Temperatur-Effekt und war bei 15°C deutlich höher als bei 30°C [Abb. 3 in Springer *et al.*, 2018]. Dies weist auf eine weitere Anpassung der Bakterien an niedrige Temperaturen in ökologischen Nischen hin, die unter anderem auf Insekten als (Zwischen-)Wirt zielen könnte.

Da die hier beobachtete insektizide Toxizität der untersuchten Stämme unabhängig von Tc ist, stellt sich die Frage, welche anderen Faktoren zur Pathogenität gegenüber Invertebraten beitragen können. Anhand von Genomvergleichen wurden eine Reihe von verschiedenen putativen Virulenzfaktoren identifiziert, die bei *Y. frederiksenii* und *Y. intermedia* vorkommen, aber im Genom von *Y. enterocolitica* W22703 fehlen [Tab. 2 in Springer *et al.*, 2018]. Neben den Proteinen, die an der Adhäsion beteiligt sein können oder einem Typ VI-Sekretionssystem, befindet sich auf dieser Liste auch ein Protein, das eine Homologie zu dem hitzestabilen zytotonischen Enterotoxin (Ast) von



*A. hydrophila* aufweist. Bei diesem handelt es sich um eine Lipase, die an der Verursachung von schwerem Durchfall bei Kindern beteiligt ist [Albert *et al.*, 2000]. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu dem Protein Ast, wurde das Protein von *Y. frederiksenii* YacT genannt. Es zeigte sich, dass YacT für die hohe Virulenz von *Y. frederiksenii* gegenüber den *Galleria*-Larven erforderlich ist, indem es zur schnelleren Proliferation der Bakterien innerhalb der Tiere beiträgt [Abb. 5 in Springer *et al.*, 2018] sowie die Morphologie der Hämocyten und somit die Immunantwort beeinflusst [Abb. 6 in Springer *et al.*, 2018]. Ohne YacT nimmt die Pathogenität der Bakterien zwar deutlich ab, dennoch können sie sich nach drei Tagen erfolgreich in den Larven vermehren und eine Infektion der Tiere führt in den meisten Fällen zum Tod. Daher ist davon auszugehen, dass es noch weitere Komponenten gibt, welche zur insektiziden Toxizität von *Y. frederiksenii* beitragen. Ebenso wie auch *P. luminescens* eine ganze Reihe von insektiziden Faktoren besitzt, die sich gegenseitig ersetzen können [Wilkinson *et al.*, 2009], ist auch hier von einem multifaktoriellen Infektionsgeschehen auszugehen.

Das Gen *yacT* ist auch in anderen *Yersinia*-Spezies ausgenommen *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* W22703 zu finden. Daher könnte YacT eines von vielen verschiedenen Elementen und neuartigen Toxinen darstellen, die das Überleben der Bakterien in der Umwelt ermöglichen, indem es entweder die Vermehrung in Insekten und damit die Verwendung dieser als Nahrungsquelle begünstigt oder die Nutzung der Insekten als Vektor ermöglicht, ohne von deren Immunsystem eliminiert zu werden.

Da die untersuchten Stämme nur bei niedrigen Temperaturen eine Virulenz gegenüber den *Galleria*-Larven zeigten, ist dieses Infektionsmodell vor allem geeignet, um ein insektizides Potential der *Yersinia*-Isolate zu ermitteln und zu vergleichen. Die Übertragbarkeit der Infektionsdaten auf den Menschen ist als eher gering einzuschätzen. Darauf, dass die Tiere kein Maß böten für die Einschätzung der Humanpathogenität einzelner Isolate, wiesen auch ALENIZI *et al.* hin, da sie unter ihren Versuchsbedingungen keinerlei Virulenz der humanpathogenen Stämme beobachten konnten. Es wäre interessant zu untersuchen, ob es bei einer oralen Infektion der Tiere mit den vornehmlich enteropathogen wirkenden Bakterien zu einem anderen Ergebnis käme.

Dennoch eignen sich die Larven von *G. mellonella* auch zur Untersuchung von humanpathogenen Mechanismen, wie unter 1.4 beschrieben wurde. Neben den bereits benannten Beispielen gibt es ebenfalls Studien zu *Y. pseudotuberculosis*, die die Larven als Modellorganismus verwendeten, um bestimmte bei der Infektion von Säugetieren zum Tragen kommende Virulenzmechanismen zu analysieren. In diesen wurde bspw. betrachtet, wie sich die bakterielle Superoxid-Dismutase [Champion *et al.*, 2009] oder die Anwesenheit des Adhesins MAM (*multivalent adhesion molecule*) [Krachler *et al.*, 2021] auf die Virulenz der Yersinien auswirkt. In beiden Fällen wurden vergleichsweise hohe Infektionsdosen von mindestens  $10^6$  Zellen verwendet, um eine messbare Pathogenität zu

erzielen und einen Unterschied zwischen Wildtyp und Deletionsmutante zu erkennen. Im Fokus beider Studien stand der Einfluss der Bakterien auf die Hämocyten als zellulärer Komponente der angeborenen Immunabwehr, da ihre Funktionsweise sehr ähnlich zu der von den Phagozyten bei Säugetieren wie Makrophagen oder dendritischen Zellen ist. Auch durch YacT wird die Morphologie der Hämocyten beeinflusst und die Immunantwort geschwächt. Ob YacT auf die Immunzellen von Säugetieren eine ähnliche Wirkung hat, kann weder ausgeschlossen noch angenommen werden.

Des Weiteren wurde für den Stamm W22703 wiederholt nur eine geringe Virulenz gegen die Larven infolge einer Inokulation der Bakterien direkt in das Hämocoel beobachtet. Daher lässt sich festhalten, dass die intrahämocoeläre Infektion der *Galleria*-Larven nicht das richtige Modell zur Untersuchung des insektiziden Toxin-Komplexes Tc einschließlich der Lysekassette ist. Entweder muss zu diesem Zweck die Infektion oral erfolgen oder ein anderes Insektenmodell verwendet werden.

### 3.5 Ausblick

Mithilfe verschiedener molekularbiologischer und proteinbiochemischer Methoden konnte in der vorliegenden Arbeit die Funktionalität und Spezifität der phagenverwandten Lysekassette, die sich innerhalb der insektiziden Pathogenitätsinsel von *Y. enterocolitica* W22703 befindet, gezeigt werden. Zusätzlich brachte die Verwendung einer *lon*-defizienten Mutante einen Einblick in die Regulation der Phagenproteine. Die Ergebnisse deuten auf einen Kontrollmechanismus hin, der eine übermäßige Lyse der Zellen, verursacht durch die Phagenproteine, verhindern soll.

Der Umstand, dass die Lysekassette biologisch aktiv ist, wirft die Frage nach der Funktion auf. Die aufgrund ihrer Lage innerhalb in der Tc-PAI<sub>ve</sub> naheliegende Vermutung, dass sie an der Freisetzung des insektiziden Toxin-Komplexes beteiligt ist, wird hauptsächlich durch die Beispiele in anderen Organismen wie *C. difficile*, *S. Typhi* und *S. marcescens* bekräftigt. Der bisher einzige experimentelle Hinweis darauf, dass die Phagenproteine für die vollständige Virulenz von *Y. enterocolitica* W22703 erforderlich sind, erfolgte in Experimenten mit dem Fadenwurm *C. elegans* [Starke, 2015]. Diese zeigten, dass durch die Deletion der Gene *holY* und *elyY* die nematozide Aktivität im gleichen Maße reduziert war wie bei der Infektion der Tiere mit einem *tcaA*-negativen Stamm [Spanier *et al.*, 2010]. Ein weiterer experimenteller Nachweis der durch die Phagenproteine vermittelten Freisetzung wurde hier nicht erbracht. Die durchgeführten Versuche mit *G. mellonella*-Larven zeigten sich, aufgrund der gewählten intrahämocoelen Infektionsmethode, als nicht geeignet, um den Toxin-Komplex und die Lyseproteine weiter zu untersuchen. Stattdessen diente das Infektionsmodell dazu, das insektizide Potential weiterer *Yersinia* spp. wie *Y. intermedia* und *Y. frederiksenii*, aber auch des humanpathogenen *Y. enterocolitica*-Stammes 8081 nachzuweisen. Dies verdeutlicht, dass es neben dem insektiziden Toxin-Komplex auch innerhalb der Gattung *Yersinia* eine Vielzahl an Faktoren gibt, die

zu deren insektizider Pathogenität beitragen. Anhand der hier verwendeten Kombination von Genomvergleichen und Infektionsversuchen konnten weitere potenziell insektizide Virulenzfaktoren identifiziert und verifiziert werden. Die Kenntnis dieser Faktoren trägt zu einem besseren Verständnis der Überlebensstrategien der Yersinien in der Umwelt bei. Außerdem lassen sich durch die Analyse der Verbreitung der entsprechenden Gene innerhalb der Gattung *Yersinia* sowie durch Homologieanalysen Rückschlüsse auf die Evolution der Krankheitserreger ziehen.

Das Protein YacT verleiht *Y. frederiksenii* insektizide Toxizität, indem es unter anderem die Immunzellen der Larven modifiziert. Um zu untersuchen, ob das Protein auch auf die Immunzellen von Säugetieren Einfluss nehmen kann, könnten Versuche mit kultivierten Makrophagen durchgeführt werden. Sollte sich dabei ein Effekt zeigen, könnte in Betracht gezogen werden, YacT im Mausmodell zu untersuchen, um den dahinterstehenden Mechanismus aufzuklären.

Die Datenlage zeigt, dass das hier verwendete Infektionsmodell zwar nicht direkt als Maß für die Virulenz einzelner Isolate gegen den Menschen verwendet werden kann [Alenizi *et al.*, 2016], seine Anwendung aber zum Verständnis der Evolution pathogener Bakterien im Allgemeinen und von Virulenzfaktoren im Besonderen beiträgt. Es besteht die Möglichkeit, dass eine orale Infektion der *G. mellonella*-Larven besser für die Einschätzung der Humanpathogenität der Stämme geeignet wäre. Diese Annahme müsste in entsprechenden Infektionsversuchen untersucht werden.

Eine orale Infektion der *G. mellonella*-Larven sollte auch für weitere Untersuchungen zur Lysekassette von *Y. enterocolitica* W22703 in Betracht gezogen werden. Da für den insektiziden Toxinkomplex eine starke orale Aktivität gezeigt wurde [Bowen *et al.*, 1998a], wäre dies eine Möglichkeit, auch in den Gallerien eine signifikante Virulenz des Stammes W22703 zu beobachten. Sollte dies nicht der Fall sein, könnten die Larven von *M. sexta* für weiterführende Untersuchungen dienen. In diesem Modell konnte bereits eine insektizide Aktivität der Bakterien sowie deren Temperaturabhängigkeit gezeigt werden [Bresolin *et al.*, 2006], jedoch ist die Haltung dieser Tierlarven weniger einfach als die der *Galleria*-Larven.

In einem passenden Tiermodell könnte dann mittels Gewebeschnitten und Immunofärbung mit einem Primärantikörper gegen TcaA das Toxin innerhalb des Wirts nachgewiesen werden. In einem weiteren Schritt könnte untersucht werden, ob und wie sich im Wirt die Freisetzung des Toxins in An- und Abwesenheit der Lysegene ändert, und damit evtl. ein direkter Zusammenhang der Lysekassette mit der Toxinfreisetzung gezeigt werden.

Außerdem könnte das Tiermodell zum einen dazu dienen, die Bistabilität der *tcaA*-Expression *in vivo* zu betrachten. Dabei wäre interessant, ob auch während des Infektionsgeschehens nur eine geringe Subpopulation *tcaA* exprimiert oder ob sich das Verhältnis verschiebt und mehr Zellen oder sogar die gesamte Population das Toxin produzieren, wie am Beispiel von FitD aus *P. aeruginosa* gesehen

[Péchy-Tarr *et al.*, 2013]. Dazu müsste dann die Betrachtung der Expression der insektiziden Gene sowie der Lysegene *in vivo* auf Einzelzellebene erfolgen. Zum anderen wäre es sehr aufschlussreich, das Transkriptom der Bakterienzellen während des Infektionsgeschehens zu analysieren. Dazu müssten die Bakterien zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Infektion aus den homogenisierten Larven bspw. mittels immunomagnetischer Auftrennung isoliert und deren RNA aufgereinigt werden. Dabei könnten sowohl Informationen zur Regulation des insektiziden Toxinkomplexes mitsamt der Lysegene als auch zur Expression von Virulenzregulatoren, der *Quorum sensing*-Systeme sowie zu bisher unbekanntem Faktoren innerhalb des Wirtes im Vergleich zu einer *in vitro*-Kultur generiert werden.

Auch auf molekularbiologischer Ebene *in vitro* gibt es weitere Versuchsansätze, deren Betrachtung lohnend wäre. So war es zwar teilweise möglich, die Toxinkomponente TcaA in Überstandsproben des Wildtyp-Stammes *Y. enterocolitica* W22703 sowie verschiedener Mutanten mittels Western Blots nachzuweisen, jedoch konnte kein Unterschied zwischen der An- und Abwesenheit der Lysegene festgestellt werden. Dies wird unter anderem mit der geringen Sensitivität der Methode begründet. Daher wäre es sinnvoll, das Sekretom des Wildtyp-Stammes mit dem des Lysegene-defizienten Stammes mittels hochauflösender Massenspektrometrie zu vergleichen. Dies würde Aufschluss darüber geben, welche Proteine die Zellen verlassen und ob dies in Abhängigkeit der Phagengene erfolgt. Mit diesem Ansatz könnte zusätzlich ausgeschlossen werden, dass eine Freisetzung des Toxins mittels Lyse erfolgt, sofern keine zytoplasmatischen Proteine im Überstand detektiert würden.

PALMER *et al.* postulieren in ihrem Modell zum T10SS bei *S. marcescens* eine Freisetzung der im Periplasma korrekt gefalteten Proteine in OMVs. Diese könnten durch einen Verlust der Stabilität der äußeren Membran entstehen, der wiederum aus dem Lösen der Lpp-Proteine von der äußeren Membran resultiert. Zur Klärung dieses Sachverhaltes bezogen auf den *Y. enterocolitica*-Stamm W22703 sind eine Reihe verschiedener Experimente möglich. Zum einen wäre mittels Peptidoglykan-Hydrolyse-Assay mit anschließender HPLC-Analyse zu klären, ob es sich bei ElyY ebenfalls um eine L-Alanyl-D-Glutamat-Endopeptidase handelt und die Hydrolyse des Peptidoglykans an denselben Stellen wie durch ChiX erfolgt. Zum anderen könnte die Menge an freiem Lpp quantifiziert werden [Schwechheimer *et al.*, 2014], um die Möglichkeit der Vesikelbildung zu verifizieren. Eine Beobachtung von OMVs ist mikroskopisch möglich, erfordert aber eine sehr hochauflösende Technik wie Transmissionselektronenmikroskopie oder Rasterkraftmikroskopie. Gibt es Hinweise auf die Bildung von Vesikeln, können diese gezielt aufgereinigt werden und deren Inhalt mittels Western Blot auf das Vorhandensein von bspw. TcaA untersucht werden.

Zur Klärung der Fragestellung, ob eine Interaktion ElyYs mit den Toxinkomponenten zu deren Transport durch die von HolY gebildete Pore ins Periplasma beiträgt, könnte das bakterielle Zwei-Hybrid-System

verwendet werden [Karimova *et al.*, 1998]. Dieses basiert auf der Wiederherstellung der Adenylatcyclase-Aktivität, wenn die mit den Enzymfragmenten fusionierten Proteine bspw. ElyY und TcaA durch eine Interaktion miteinander in unmittelbare Nähe kommen. Kommt es zur Enzymaktivität, wird cAMP gebildet, welches wiederum zusammen mit dem Protein CAP den Promotor eines Reportergens z.B. *lacZ* aktiviert.

Die in den beschriebenen Versuchsansätzen generierten Daten können zum einen dazu beitragen, Erkenntnisse über den Mechanismus zur Freisetzung des insektiziden Toxincomplexes zu gewinnen. Zum anderen können sie dazu dienen, aufzuklären, inwiefern die phagenverwandte Lysekassette an der Toxinsekretion beteiligt ist und ob es sich hierbei um ein Beispiel des neuartigen Typ 10-Sekretionssystems handelt.

## Literaturverzeichnis

- Ackermann, M.** (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **13**(8), 497-508.
- Ackermann, M., Stecher, B., Freed, N. E., Songhet, P., Hardt, W. D. and Doebeli, M.** (2008). Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature* **454**(7207): 987-990.
- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S. and Gupta, R. S.** (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**(12): 5575-5599.
- Ahn, S. J., Deep, K., Turner, M. E., Ishkov, I., Waters, A., Hagen, S. J. and Rice, K. C.** (2019). Characterization of LrgAB as a stationary phase-specific pyruvate uptake system in *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol* **19**(1): 223.
- Ahn, S. J., Rice, K. C., Oleas, J., Bayles, K. W. and Burne, R. A.** (2010). The *Streptococcus mutans* Cid and Lrg systems modulate virulence traits in response to multiple environmental signals. *Microbiology* **156**: 3136-3147.
- Albert, M. J., Ansaruzzaman, M., Talukder, K. A., Chopra, A. K., Kuhn, I., Rahman, M., Faruque, A. S., Islam, M. S., Sack, R. B. and Mollby, R.** (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin Microbiol* **38**(10): 3785-3790.
- Aleksić, S. and Bockemühl, J.** (1990). Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections. *Immun Infect* **18**(6): 178-185.
- Alenizi, D., Ringwood, T., Redhwan, A., Bouraha, B., Wren, B. W., Prentice, M. and McNally, A.** (2016). All *Yersinia enterocolitica* are pathogenic: virulence of phylogroup 1 *Y. enterocolitica* in a *Galleria mellonella* infection model. *Microbiology* **162**(8): 1379-1387.
- Anisimov, A. P., Dentovskaya, S. V., Titareva, G. M., Bakhteeva, I. V., Shaikhutdinova, R. Z., Balakhonov, S. V., Lindner, B., Kocharova, N. A., Senchenkova, S. N., Holst, O., Pier, G. B. and Knirel, Y. A.** (2005). Intraspecies and temperature-dependent variations in susceptibility of *Yersinia pestis* to the bactericidal action of serum and to polymyxin B. *Infect Immun* **73**(11): 7324-7331.
- Batzilla, J., Heesemann, J. and Rakin, A.** (2011). The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A. *Int J Med Microbiol* **301**(7): 556-561.

- Bergann, T., Kleemann, J. and Sohr, D.** (1995) Model studies of psychrotrophia in *Yersinia enterocolitica*. *J Vet Med B* **42**: 523-531.
- Berkmen, M., Benedik, M. J. and Bläsi, U.** (1997). The *Serratia marcescens* NucE protein functions as a holin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**(20): 6522-6524.
- Berry, J., Rajaure, M., Pang, T. and Young, R.** (2012) The spanin complex is essential for lambda lysis. *J Bacteriol* **194**(20): 5667-5674.
- Berry, J., Summer, E. J., Struck, D. K. and Young, R.** (2008) The final step in the phage infection cycle: the Rz and Rz1 lysis proteins link the inner and outer membranes. *Mol Microbiol* **70**(2): 341-351.
- Bibel, D. J. and Chen, T. H.** (1976). Diagnosis of plaque: an analysis of the Yersin-Kitasato controversy. *Bacteriol Rev* **40**(3): 633-651.
- Birkeland, N. K.** (1994). Cloning, molecular characterization, and expression of the genes encoding the lytic functions of lactococcal bacteriophage phi LC3: a dual lysis system of modular design. *Can J Microbiol* **40**(8): 658-665.
- Bishop, A. H.** (2014). Expression of *prtA* from *Photorhabdus luminescens* in *Bacillus thuringiensis* enhances mortality in lepidopteran larvae by sub-cutaneous but not oral infection. *J Invertebr Pathol* **121**: 85-88.
- Blackburn, M. B., Martin, P. A., Kuhar, D., Farrar, R. R., Jr and Gundersen-Rindal, D. E.** (2011). The occurrence of *Photorhabdus*-like toxin complexes in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS one* **6**(3): e18122.
- Bläsi, U., Chang, C. Y., Zagotta, M. T., Nam, K. B. and Young, R.** (1990). The lethal lambda S gene encodes its own inhibitor. *EMBO J* **9**(4): 981-989.
- Bliska, J. B. and Falkow, S.** (1992). Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8): 3561-3565.
- Böhme, K., Steinmann, R., Kortmann, J., Seekircher, S., Heroven, A. K., Berger, E., Pisano, F., Thiermann, T., Wolf-Watz, H., Narberhaus, F. and Dersch, P.** (2012). Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog* **8**(2), e1002518.
- Bonovich, M. T. and Young, R.** (1991). Dual start motif in two lambdoid S genes unrelated to lambda S. *J Bacteriol* **173**(9): 2897-2905.
- Bölin, I. and Wolf-Watz, H.** (1984). Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **43**(1): 72-78.



- Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B. and Górski, A.** (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med* **231**(4): 366-377.
- Bottone, E. J.** (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* **10**(2): 257-276.
- Bottone, E. J.** (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect* **1**(4): 323-333.
- Bottone, E. J. and Robin, T.** (1977). *Yersinia enterocolitica*: recovery and characterization of two unusual isolates from a case of acute enteritis. *J Clin Microbiol* **5**(3): 341-345.
- Bowen, D. J. and Ensign, J. C.** (1998b). Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Appl Environ Microbiol* **64**(8): 3029-3035.
- Bowen, D. J., Rocheleau, T. A., Blackburn, M., Andreev, E., Golubeva, R., Bhartia, R. and French-Constant, R. H.** (1998a). Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* **280**(5372): 2129-2132.
- Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H. J. and Coenye, T.** (2011). Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**(6): 2655-2661.
- Braun, V. and Wolff, H.** (1970). The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **14**(2): 387-391.
- Brenner, D. J.** (1979). Speciation in *Yersinia*. *Contrib Microbiol Immunol* **5**: 33-43.
- Brenner, D. J., Steigerwalt A. G., Falcão, D. P., Weaver, R. E. and Fanning, G. R.** (1976). Characterization of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by deoxyribonucleic acid hybridization and by biochemical reactions. *Int J Syst Bacteriol* **26**: 180-194.
- Bresolin, G.** (2004). Charakterisierung des Kälteadaptations-Stimulons von *Yersinia enterocolitica* durch transposongestützte Genomanalyse. *Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie*. München, Technische Universität München.
- Bresolin, G., Morgan, J. A., Ilgen, D., Scherer, S. and Fuchs, T. M.** (2006). Low temperature-induced insecticidal activity of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **59**(2): 503-512.
- Briers Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C. W., Hertveldt, K. and Lavigne, R.** (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. *Mol Microbiol* **65**(5): 1334-1344.

- Brown, S. E., Cao, A. T., Dobson, P., Hines, E. R., Akhurst, R. J. and East, P. D.** (2006). Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. *Appl Environ Microbiol* **72**(2): 1653-1662.
- Brubaker, R. R.** (1972). The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence. *Curr Top Microbiol Immunol* **57**: 111-158.
- Cafferkey, M. T., Sloane, A., McCrae, S. and O'Morain, C. A.** (1993). *Yersinia frederiksenii* infection and colonization in hospital staff. *J Hosp Infect* **24**(2): 109-115.
- Carniel, E., Guilvout, I. and Prentice, M.** (1996). Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **178**(23): 6743-6751.
- Chain, P. S., Carniel, E., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Stoutland, P. O., Regala, W. M., Georgescu, A. M., Vergez, L. M., Land, M. L., Motin, V. L., Brubaker, R. R., Fowler, J., Hinnebusch, J., Marceau, M., Medigue, C., Simonet, M., Chenal-Francisque, V., Souza, B., Dacheux, D., Elliott, J. M., Derbise, A., Hauser, L. J. and Garcia, E.** (2004). Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(38): 13826-13831.
- Champion, O. L., Cooper, I., James, S. L., Ford, D., Karlyshev, A., Wren, B. W., Duffield, M., Oyston, P. and Titball, R. W.** (2009). *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology* **155**: 1516-1522.
- Charbonnier, T., Le Coq, D., McGovern, S., Calabre, M., Delumeau, O., Aymerich, S. and Jules, M.** (2017). Molecular and physiological logics of the pyruvate-induced response of a novel transporter in *Bacillus subtilis*. *mBio* **8**(5): e00976-17.
- Chen, Y. and Young, R.** (2016). The Last r Locus Unveiled: T4 RIII Is a Cytoplasmic Antiholin. *J Bacteriol* **198**(18): 2448-2457.
- Chen, Y. T., Peng, H. L., Shia, W. C., Hsu, F. R., Ken, C. F., Tsao, Y. M., Chen, C. H., Liu, C. E., Hsieh, M. F., Chen, H. C., Tang, C. Y. and Ku, T. H.** (2012). Whole-genome sequencing and identification of *Morganella morganii* KT pathogenicity-related genes. *BMC genomics* **13**(Suppl 7): S4. doi:10.1186/1471-2164-13-S7-S4
- Ciche, T. A. and Ensign, J. C.** (2003). For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Appl Environ Microbiol* **69**(4): 1890-1897.
- Cornelis G. R.** (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**(11): 811-825.

- Cornelis, G. R., Sluiter, C., Delor, I., Geib, D., Kaniga, K., Lambert de Rouvroit, C., Sory, M. P., Vanooteghem, J. C. and Michiels, T.** (1991). *YmoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol Microbiol* **5**(5): 1023-1034.
- Coughlan, A., Scanlon, K., Mahon, B. P. and Towler, M. R.** (2010). Zinc and silver glass polyalkenoate cements: an evaluation of their antibacterial nature. *Biomed Mater Eng* **20**(2): 99-106.
- Daborn, P. J., Waterfield, N., Silva, C. P., Au, C. P., Sharma, S. and Ffrench-Constant, R. H.** (2002). A single *Photographus* gene, *makes caterpillars floppy (mcf)*, allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10742-10747.
- De Koning-Ward, T. F. and Robins-Browne, R. M.** (1995). Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **63**(10): 3790-3795.
- Delor, I. and Cornelis, G. R.** (1992). Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* **60**(10): 4269-4277.
- Delor, I., Kaeckenbeeck, A., Wauters, G. and Cornelis, G. R.** (1990). Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic *yersiniae*. *Infect Immun* **58**(9): 2983-2988.
- Dewey, J. S., Savva, C. G., White, R. L., Vitha, S., Holzenburg, A. and Young, R.** (2010). Micron-scale holes terminate the phage infection cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(5): 2219-2223.
- Dodd, S. J., Hurst, M. R., Glare, T. R., O'Callaghan, M. and Ronson, C. W.** (2006). Occurrence of *sep* insecticidal toxin complex genes in *Serratia* spp. and *Yersinia frederiksenii*. *Appl Environ Microbiol* **72**(10): 6584-6592.
- Dow, J.A.** (1984). Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am J Physiol* **246**(4 Part 2): R633-636.
- Du, Y., Rosqvist, R. and Forsberg, A.** (2002). Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect Immun* **70**(3): 1453-1460.
- Ellison, D. W., Young, B., Nelson, K. and Miller, V. L.** (2003). *YmoA* negatively regulates expression of invasin from *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **185**(24): 7153-7159.
- Erickson, D. L., Jarrett, C. O., Callison, J. A., Fischer, E. R. and Hinnebusch, B. J.** (2008). Loss of a biofilm-inhibiting glycosyl hydrolase during the emergence of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **190**(24): 8163-8170.

- Erickson, D. L., Waterfield, N. R., Vadyvaloo, V., Long, D., Fischer, E. R., Ffrench-Constant, R. and Hinnebusch, B. J.** (2007). Acute oral toxicity of *Yersinia pseudotuberculosis* to fleas: implications for the evolution of vector-borne transmission of plague. *Cell Microbiol* **9**(11): 2658-2666.
- Enright, M. R. and Griffin, C. T.** (2005). Effects of *Paenibacillus nematophilus* on the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis*. *J Invertebr Pathol* **88**(1): 40-48.
- Evans, B. A. and Rozen, D. E.** (2012). A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**(10): 2653-2660.
- Felek, S. and Krukonis, E. S.** (2009). The *Yersinia pestis* Ail protein mediates binding and Yop delivery to host cells required for plague virulence. *Infect Immun* **77**(2): 825-836.
- Ferracci, F., Schubot, F. D., Waugh, D. S. and Plano, G. V.** (2005). Selection and characterization of *Yersinia pestis* YopN mutants that constitutively block Yop secretion. *Mol Microbiol* **57**(4): 970-987.
- ffrench-Constant, R. H., Dowling, A. and Waterfield, N. R.** (2007). Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon* **49**: 436-451.
- Fischetti, V. A.** (2005). Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol* **13**(10): 491-496.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N. and Stackebrandt, E.** (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu Rev Microbiol* **51**: 47-72.
- Frederiksen, W.** (1963). A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria, '*Bacterium enterocoliticum*' and '*Pasteurella X*'. *Proceedings of the 14<sup>th</sup> Scandinavian Congress on Pathology and Microbiology*. Oslo, Norway: 103-104.
- Fuchs, T. M., Brandt, K., Starke, M. and Rattei T.** (2011). Shotgun sequencing of *Yersinia enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O:9): genomic evidence for oscillation between invertebrates and mammals. *BMC Genom* **12**(1): 168.
- Fuchs, T. M., Bresolin, G., Marcinowski, L., Schachtner, J. and Scherer, S.** (2008). Insecticidal genes of *Yersinia* spp.: taxonomical distribution, contribution of toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution. *BMC Microbiol* **8**: 214.
- Galyov, E. E., Smirnov, OYu, Karlishchev, A. V., Volkovoy, K. I., Denesyuk, A. I., Nazimov, I. V., Rubtsov, K. S., Abramov, V. M., Dalvadyanz, S. M. and Zav'yalov, V. P.** (1990). Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of the protein. Putative T and B cell epitopes. *FEBS Lett* **277**(1-2): 230-232.

- Gatsogiannis, C., Lang, A. E., Meusch, D., Pfaumann, V., Hofnagel O, Benz, R., Aktories, K. and Raunser, S.** (2013). A syringe-like injection mechanism in *Photorhabdus luminescens* toxins. *Nature* **495**(7442): 520–523.
- Gatsogiannis, C., Merino, F., Prumbaum, D., Roderer, D., Leidreiter, F., Meusch, D. and Raunser, S.** (2016). Membrane insertion of a Tc toxin in near-atomic detail. *Nat Struct Mol Biol* **23**(10): 884-890.
- Gatsogiannis, C., Merino, F., Roderer, D., Balchin, D., Schubert, E., Kuhlee, A., Hayer-Hartl, M. and Raunser, S.** (2018). Tc toxin activation requires unfolding and refolding of a  $\beta$ -propeller. *Nature* **563**(7730): 209-213.
- Geiger, T., Lara-Tejero, M., Xiong, Y. and Galán, J. E.** (2020). Mechanisms of substrate recognition by a typhoid toxin secretion-associated muramidase. *eLife* **9**: e53473.
- Geiger, T., Pazos, M., Lara-Tejero, M., Vollmer, W. and Galán, J. E.** (2018). Peptidoglycan editing by a specific LD-transpeptidase controls the muramidase-dependent secretion of typhoid toxin. *Nat Microbiol* **3**(11): 1243-1254.
- Gemski, P., Lazere, J. R. and Casey, T.** (1980). Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **27**(2): 682-685.
- Gendlina, I., Held, K. G., Bartra, S. S., Gallis, B. M., Doneanu, C. E., Goodlett, D. R., Plano, G. V. and Collins, C. M.** (2007). Identification and type III-dependent secretion of the *Yersinia pestis* insecticidal-like proteins. *Mol Microbiol* **64**(5): 1214-1227.
- Gottesman, S.** (2003). Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 565-587.
- Gottesman, S., Wickner, S. and Maurizi, M. R.** (1997). Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev* **11**(7): 815-823.
- Govind, R. and Dupuy, B.** (2012). Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. *PLoS Pathog* **8**(6): e1002727.
- Govind, R., Fitzwater, L. and Nichols, R.** (2015). Observations on the role of TcdE isoforms in *Clostridium difficile* toxin secretion. *J Bacteriol* **197**(15): 2600-2609.
- Grant, T., Bennett-Wood, V. and Robins-Browne, R. M.** (1998). Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers. *Infect Immun* **66**(3): 1113-1120.
- Gründling, A., Bläsi, U. and Young, R.** (2000a) Biochemical and genetic evidence for three transmembrane domains in the class I holin, lambda S. *J Biol Chem* **275**(2): 769-776.

- Gründling, A., Smith, D. L., Bläsi, U. and Young, R.** (2000b). Dimerization between the holin and holin inhibitor of phage lambda. *J Bacteriol* **182**(21): 6075-6081.
- Hamilton, J. J., Marlow, V. L., Owen, R. A., Costa, M., Guo, M., Buchanan, G., Chandra, G., Trost, M., Coulthurst, S. J., Palmer, T., Stanley-Wall, N. R. and Sargent, F.** (2014). A holin and an endopeptidase are essential for chitinolytic protein secretion in *Serratia marcescens*. *J Cell Biol* **207**(5): 615-626.
- Hammond, G. A. and Johnson, J. L.** (1995). The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. *Microb Pathog* **19**(4): 203-213.
- Hares, M. C., Hinchliffe, S. J., Strong, P. C., Eleftherianos, I., Dowling, A. J., ffrench-Constant, R. H. and Waterfield, N.** (2008). The *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* toxin complex is active against cultured mammalian cells. *Microbiology* **154**: 3503-3517.
- Heesemann, J. and Grüter, L.** (1987). Genetic evidence that the outer membrane protein YOP1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **40**(1): 37-41.
- Heesemann, J., Algermissen, B. and Laufs, R.** (1984). Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immu* **46**(1): 105-110.
- Henrich, B., Binischofer, B. and Bläsi, U.** (1995). Primary structure and functional analysis of the lysis genes of *Lactobacillus gasseri* bacteriophage phi adh. *J Bacteriol* **177**(3): 723-732.
- Herbst, K., Bujara, M., Heroven, A. K., Opitz, W., Weichert, M., Zimmermann, A. and Dersch, P.** (2009). Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA. *PLoS Pathog* **5**(5), e1000435.
- Heroven, A. K., Nagel, G., Tran, H. J., Parr, S. and Dersch, P.** (2004). RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **53**(3): 871-888.
- Hinnebusch, B. J. and Erickson, D. L.** (2008). *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 229-248.
- Hinnebusch, B. J., Rudolph, A. E., Cherepanov, P., Dixon, J. E., Schwan, T. G. and Forsberg, A.** (2002). Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science* **296**(5568): 733-735.
- Hinchliffe, S. J., Hares, M. C., Dowling, A. J. and ffrench-Constant, R. H.** (2010). Insecticidal Toxins from the *Phototribus* and *Xenorhabdus* Bacteria. *The open Toxinology Journal* **3**: 101-118. doi: 10.2174/1875414701003010083

- Hodak, H. and Galán, J. E.** (2013) A *Salmonella* Typhi homologue of bacteriophage muramidases controls typhoid toxin secretion. *EMBO Rep* **14**(1): 95-102.
- Holmström, A., Petterson, J., Rosqvist, R., Håkansson, S., Tafazoli, F., Fällman, M., Magnusson, K. E., Wolf-Watz, H. and Forsberg, A.** (1997). YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol Microbiol* **24**(1): 73-91.
- Hueck, C. J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(2): 379-433.
- Huovinen, E., Sihvonen, L. M., Virtanen, M. J., Haukka, K., Siitonen, A. and Kuusi, M.** (2010). Symptoms and sources of *Yersinia enterocolitica*-infection: a case-control study. *BMC Infect Dis* **10**: 122.
- Hurst, M. R. H., Becher, S. A., Young, S. D., Nelson, T. L. and Glare, T. R.** (2010). *Yersinia entomophaga* sp. nov. isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 844-849.
- Hurst, M. R. H., Glare, T. R., Jackson, T. A. and Ronson, C. W.** (2000). Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photobacterium luminescens*. *J Bacteriol* **182**(18): 5127-5138.
- Hurst, M. R. H., Jones, S. A., Binglin, T., Harper, L. A., Jackson, T. A. and Glare, T. R.** (2011). The main virulence determinant of *Yersinia entomophaga* MH96 is a broad-host-range toxin complex active against insects. *J Bacteriol* **193**(8): 1966-1980.
- Hurst, M. R. H., Jones, S. M., Tan, B. and Jackson, T. A.** (2007). Induced expression of the *Serratia entomophila* Sep proteins shows activity towards the larvae of the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *FEMS Microbiol Lett* **275**(1): 160-167.
- Imori, P. F., Passaglia, J., Souza, R. A., Rocha, L. B. and Falcão, J. P.** (2017). Virulence-related genes, adhesion and invasion of some *Yersinia enterocolitica*-like strains suggests its pathogenic potential. *Microb Pathog* **104**: 72-77.
- Iriarte, M., Vanooteghem, J. C., Delor, I., Díaz, R., Knutton, S. and Cornelis, G. R.** (1993). The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **9**(3): 507-520.
- Jackson, M. W., Silva-Herzog, E. and Plano, G. V.** (2004). The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. *Mol Microbiol* **54**(5): 1364-1378.



- Jacobs, A. C., Didone, L., Jobson, J., Sofia, M. K., Krysan, D. and Dunman, P. M.** (2013). Adenylate kinase release as a high-throughput-screening-compatible reporter of bacterial lysis for identification of antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **57**(1): 26-36.
- Jakob, F. and Fuerst, C. R.** (1985). The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria. *J gen Microbiol* **18**: 518-526.
- Jander, G., Rahme, L. G. and Ausubel, F. M.** (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* **182**(13): 3843-3845.
- Joyce, S. A. and Gahan, C. G. M.** (2010). Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. *Microbiology* **156**: 3456-3468.
- Junqueira, J. C.** (2012). *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence* **3**(6): 474-476.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. and Ladant, D.** (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5752-5756.
- Kavanagh, K. and Reeves, E. P.** (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **28**(1): 101-112.
- Kenniston, J. A., Baker, T. A., Fernandez, J. M. and Sauer, R. T.** (2003). Linkage between ATP consumption and mechanical unfolding during the protein processing reactions of an AAA+ degradation machine. *Cell* **114**(4): 511-520.
- Krachler, A. M., Sirisaengtaksin, N., Monteith, P., Paine, C., Coates, C. J. and Lim, J.** (2021). Defective phagocyte association during infection of *Galleria mellonella* with *Yersinia pseudotuberculosis* is detrimental to both insect host and microbe. *Virulence* **12**(1): 638-653.
- Krezdorn, J., Adams, S. and Coote, P. J.** (2014). A *Galleria mellonella* infection model reveals double and triple antibiotic combination therapies with enhanced efficacy versus a multidrug-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* **63**: 945-955.
- Kwadha, C. A., Ong'amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K. and Fombong, A. T.** (2017). The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects* **8**(2): 61.
- Lähteenmäki, K., Virkola, R., Sarén, A., Emödy, L. and Korhonen, T. K.** (1998). Expression of plasminogen activator *pla* of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun* **66**(12): 5755-5762.
- Laird, W. J. and Cavanaugh, D. C.** (1980). Correlation of autoagglutination and virulence of *yersiniae*. *J Clin Microbiol* **11**(4): 430-432.

- Lambert de Rouvroit, C., Sluifers, C. and Cornelis, G. R.** (1992). Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **6**(3): 395-409.
- Lang, A. and Beatty, J.** (2001) The gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus* and "constitutive transduction" in prokaryotes. *Arch Microbiol* **175**: 241-249.
- Lang, A. E., Schmidt, G., Schlosser, A., Hey, T. D., Larrinua, I. M., Sheets, J. J., Mannherz, H. G. and Aktories, K.** (2010). *Photobacterium luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science* **327**(5969): 1139-1142.
- La Rosa, S. L., Diep, D. B., Nes, I. F. and Brede, D. A.** (2012). Construction and application of a *luxABCDE* reporter system for real-time monitoring of *Enterococcus faecalis* gene expression and growth. *Appl Environ Microbiol* **78**(19): 7003-7011.
- La Rosa, S. L., Casey, P. G., Hill, C., Diep, D. B., Nes, I. F. and Brede, D. A.** (2013). In vivo assessment of growth and virulence gene expression during commensal and pathogenic lifestyles of *luxABCDE*-tagged *Enterococcus faecalis* strains in murine gastrointestinal and intravenous infection models. *Appl Environ Microbiol* **79**(13): 3986-3997.
- Lathem, W. W., Price, P. A., Miller, V. L. and Goldman, W. E.** (2007). A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. *Science* **315**(5811): 509-513.
- Lawrenz, M. B., Lenz, J. D. and Miller, V. L.** (2009). A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infect Immun* **77**(1): 317-326.
- Leidreiter, F., Roderer, D., Meusch, D., Gatsogiannis, C., Benz, R. and Raunser, S.** (2019). Common architecture of Tc toxins from human and insect pathogenic bacteria. *Sci Adv* **5**: eaax6497.
- Licht, S. and Lee, I.** (2008). Resolving individual steps in the operation of ATP-dependent proteolytic molecular machines: from conformational changes to substrate translocation and processivity. *Biochemistry* **47**(12): 3595-3605.
- Lindler, L. E., Klempner, M. S. and Straley, S. C.** (1990). *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. *Infect Immun* **58**(8): 2569-2577.
- Liu, F., Chen, H., Galván, E. M., Lasaro, M. A. and Schifferli, D. M.** (2006). Effects of Psa and F1 on the adhesive and invasive interactions of *Yersinia pestis* with human respiratory tract epithelial cells. *Infect Immun* **74**(10): 5636-5644.

- Loessner, M. J.** (2005). Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* **8**(4): 480-487.
- Loessner, M. J., Gaeng, S., Wendlinger, G., Maier, S. K. and Scherer, S.** (1998). The two-component lysis system of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Twort: a large TTG-start holin and an associated amidase endolysin. *FEMS Microbiol Lett* **162**(2): 265-274.
- Luther, M. K., Arvanitis, M., Mylonakis, E. and LaPlante, K. L.** (2014). Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming *Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an in vitro pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an in vivo survival assay using *Galleria mellonella* larvae. *Antimicrob Agents Chemother* **58**(8): 4612-4620.
- Marketon, M. M., DePaolo, R. W., DeBord, K. L., Jabri, B. and Schneewind, O.** (2005). Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* **309**(5741): 1739-1741.
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J. C. and Wold, A. E.** (2008). Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect Immun* **76**(9): 4079-4087.
- Matson, E. G., Thompson, M. G., Humphrey, S. B., Zuerner, R. L. and Stanton, T.B.** (2005). Identification of genes of VSH-1, a prophage-like gene transfer agent of *Brachyspira hyodysenteriae*. *J Bacteriol* **187**: 5885-5892.
- McGhee, J. D.** (2007). The *C. elegans* intestine. *WormBook* **Mar 27**: 1-36.
- McIver, M. A. and Pike, R. M.** (1934). Chronic glanders-like infection of face caused by an organism resembling *Flavobacterium pseudomallei*: Whitmore. *Clinical miscellany Vol 1, Mary imogene Basset Hospital Cooperstown NY*: 16-21.
- McNally, A., Dalton, T., La Ragione, R. M., Stapleton, K., Manning, G. and Newell, D. G.** (2006). *Yersinia enterocolitica* isolates of differing biotypes from humans and animals are adherent, invasive and persist in macrophages, but differ in cytokine secretion profiles *in vitro*. *J Med Microbiol* **55**: 1725-1734.
- McNally, A., La Ragione, R. M., Best, A., Manning, G. and Newell, D. G.** (2007). An aflagellate mutant *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain displays altered invasion of epithelial cells, persistence in macrophages, and cytokine secretion profiles *in vitro*. *Microbiology* **153**: 1339-1349.
- McQuade, R. and Stock, S. P.** (2018). Secretion systems and secreted proteins in Gram-negative entomopathogenic bacteria: Their roles in insect virulence and beyond. *Insects* **9**(2): 68.

- Mehner-Breitfeld, D., Rathmann, C., Riedel, T., Just, I., Gerhard, R., Overmann, J. and Brüser, T.** (2018). Evidence for an adaptation of a phage-derived holin/endolysin system to toxin transport in *Clostridioides difficile*. *Front Microbiol* **9**: 2446.
- Mekalanos, J. J.** (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**(1): 1-7.
- Meusch, D., Gatsogiannis, C., Efremov, R. G., Lang, A. E., Hofnagel, O., Vetter, I. R., Aktories, K. and Raunser, S.** (2014). Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. *Nature* **508**(7494): 61–65.
- Miller, V. L., Farmer, J. J., 3rd, Hill, W. E. and Falkow, S.** (1989). The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun* **57**(1): 121-131.
- Morgan, J. A. W., Sergeant, M., Ellis, D., Ousley, M. and Jarrett, P.** (2001). Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMF1296. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2062-2069.
- Morton, D. B., Dunphy, G. B. and Chadwick, J. S.** (1987). Reactions of hemocytes of immune and non-immune *Galleria mellonella* larvae to *Proteus mirabilis*. *Dev Comp Immunol* **11**(1): 47-55.
- Motin, V. L., Georgescu, A. M., Fitch, J. P., Gu, P. P., Nelson, D. O., Mabery, S. L., Garnham, J. B., Sokhansanj, B. A., Ott, L. L., Coleman, M. A., Elliott, J. M., Kegelmeyer, L. M., Wyrobek, A. J., Slezak, T. R., Brubaker, R. R. and Garcia, E.** (2004). Temporal global changes in gene expression during temperature transition in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **186**(18): 6298-6305.
- Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskis, A. and Chakraborty, T.** (2010). *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* **76**(1): 310-317.
- Mukherjee, K., Hain, T., Fischer, R., Chakraborty, T. and Vilcinskis, A.** (2013). Brain infection and activation of neuronal repair mechanisms by the human pathogen *Listeria monocytogenes* in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Virulence* **4**(4): 324-332.
- Mulder, B., Michiels T., Simonet M., Sory, M. P. and Cornelis, G.** (1989). Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun* **57**(8): 2534-2541.
- Münch, A., Stingl, L., Jung, K. and Heermann, R.** (2008). *Photobacterium luminescens* genes induced upon insect infection. *BMC Genom* **9**: 229.

- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. and Koonin, E. V. (1999).** AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**(1): 27-43.
- Nguyen, S. V., Greig, D. R., Hurley, D., Donoghue, O., Cao, Y., McCabe, E., Mitchell, M., Schaffer, K., Jenkins, C. and Fanning, S. (2020).** *Yersinia canariae* sp. nov., isolated from a human yersiniosis case. *Int J Syst Evol Microbiol* **70**(4): 2382-2387.
- Nguyen, S. V., Muthappa, D. M., Hurley, D., Donoghue, O., McCabe, E., Anes, J., Schaffer, K., Murphy, B. P., Buckley, J. F. and Fanning, S. (2019)** *Yersinia hibernica* sp. nov., isolated from pig-production environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **69**: 2023–2027.
- Oki, M., Kakikawa, M., Nakamura, S., Yamamura, E. T., Watanabe, K., Sasamoto, M., Taketo, A. and Kodaira, K. (1997).** Functional and structural features of the holin HOL protein of the *Lactobacillus plantarum* phage phi gle: analysis in *Escherichia coli* system. *Gene* **197**(1-2): 137-145.
- Oliveira, H, Melo L. D. R., Santos, S. B., Nóbrega, F. L., Ferreira, E. C., Cerca, N., Azeredo, J. and Kluskens, L. D. (2013).** Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. *J Virol* **87**(8): 4558-4570.
- Olling, A., Seehase, S., Minton, N. P., Tatge, H., Schröter, S., Kohlscheen, S., Pich, A., Just, I. and Gerhard, R. (2012).** Release of TcdA and TcdB from *Clostridium difficile* cdi 630 is not affected by functional inactivation of the *tcdE* gene. *Microb Pathog* **52**(1): 92-100.
- Owen, R. A., Fyfe, P. K., Lodge, A., Biboy, J., Vollmer, W., Hunter, W. N. and Sargent, F. (2018).** Structure and activity of ChiX: a peptidoglycan hydrolase required for chitinase secretion by *Serratia marcescens*. *Biochem J* **475**(2): 415-428.
- Paddison, P., Abedon, S. T., Dressman, H. K., Gailbreath, K., Tracy, J., Mosser, E., Neitzel, J., Guttman, B. and Kutter, E. (1998).** The roles of the bacteriophage T4 *r* genes in lysis inhibition and fine-structure genetics: a new perspective. *Genetics* **148**(4): 1539-1550.
- Palmer, T., Finney, A. J., Saha, C. K., Atkinson, G. C. and Sargent, F. (2021).** A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system. *Mol Microbiol* **115**(3): 345-355.
- Panayidou, S., Ioannidou, E. and Apidianakis, Y. (2014).** Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*: disease modeling, lessons, and shortcomings. *Virulence* **5**(2): 253-269.
- Pang, T., Savva, C. G., Fleming, K. G., Struck, D. K. and Young, R. (2009).** Structure of the lethal phage pinhole. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(45): 18966-18971.

- Park, S. Y., Kim, K. M., Lee, J. H., Seo, S. J. and Lee, I. H.** (2007). Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun* **75**(4): 1861-1869.
- Park, T., Struck, D. K., Dankenbring, C. A. and Young, R.** (2007). The pinholin of lambdoid phage 21: control of lysis by membrane depolarization. *J Bacteriol* **189**(24): 9135-9139.
- Park, T., Struck, D. K., Deaton, J. F. and Young, R.** (2006). Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(52): 19713-19718.
- Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R., Titball, R. W., Holden, M. T., Prentice, M. B., Sebahia, M., James, K. D., Churcher, C., Mungall, K. L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S. D., Brooks, K., Cerdeño-Tárraga, A. M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R. M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P. C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G.** (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**(6855): 523-527.
- Péchy-Tarr, M., Borel, N., Kupferschmid, P., Turner, V., Binggeli, O., Radovanovic, D., Maurhofer, M. and Keel, C.** (2013). Control and host-dependent activation of insect toxin expression in a root-associated biocontrol pseudomonad. *Environ Microbiol* **15**(3): 736-750.
- Pepe, J. C. and Miller, V. L.** (1993). *Yersinia enterocolitica* invasins: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14): 6473-6477.
- Perry, R. D. and Fetherston, J. D.** (1997). *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**(1): 35-66.
- Perry, R. D., Balbo, P. B., Jones, H. A., Fetherston, J. D. and 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, R. D., Bobrov, A. G., Kirillina, O., Rhodes, E. R., Actis, L. A. and Fetherston, J. D.** (2012). *Yersinia pestis* transition metal divalent cation transporters. *Adv Exp Med Biol* **954**: 267-279.
- Portnoy, D. A. and Martinez, R. J.** (1985). Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. *Curr Top Microbiol Immunol* **118**: 29-51.
- Portnoy, D. A., Moseley, S. L. and Falkow, S.** (1981). Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect Immun* **31**(2): 775-782.

- Rajaure, M., Berry, J., Kongari, R., Cahill, J. and Young, R.** (2015) Membrane fusion during phage lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(17): 5497-5502.
- Ramanculov, E. and Young, R.** (2001a). An ancient player unmasked: T4 *rl* encodes a t-specific antiholin. *Mol Microbiol* **41**(3): 575-583.
- Ramanculov, E. and Young, R.** (2001b). Genetic analysis of the T4 holin: timing and topology. *Gene* **265**(1-2): 25-36.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C. and Lereclus, D.** (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp* (70): e4392. doi:10.3791/4392
- Reader, R. W. and Siminovitch, L.** (1971). Lysis defective mutants of bacteriophage lambda: on the role of the S function in lysis. *Virology* **43**(3): 623-637.
- Real, G., Pinto, S. M., Schyns, G., Costa, T., Henriques, A. O. and Moran, C. P., Jr** (2005). A gene encoding a holin-like protein involved in spore morphogenesis and spore germination in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**(18): 6443-6453.
- Reddy, B. L. and Saier, M. H., Jr** (2013). Topological and phylogenetic analyses of bacterial holin families and superfamilies. *Biochim Biophys Acta* **1828**(11): 2654-2671.
- Reuter, S.** (2008). Funktion und Regulation der Lyse-Gene der *tc*-PAI<sup>Ye</sup> in *Yersinia enterocolitica*. *Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie*. München, Technische Universität München.
- Reuter S., Connor, T. R., Barquist, L., Walker, D., Feltwell, T., Harris, S. R., Fookes, M., Hall, M. E., Petty N. K., Fuchs, T. M., Corander, J., Dufour, M., Ringwood, T., Savin, C., Bouchier, C., Martin, L., Miettinen, M., Shubin, M., Riehm, J. M., Laukkanen-Ninios, R., Sihvonen, L. M., Siitonen, A., Skurnik, M., Falcão, J. P., Fukushima, H., Scholz, H. C., Prentice, M. B., Wren, B. W., Parkhill, J., Carniel, E., Achtman, M., McNally, A. and Thomson, N. R.** (2014). Parallel independent evolution of pathogenicity within the genus *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(18): 6768-6773.
- Revell, P. A. and Miller, V. L.** (2000). A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol* **35**(3): 677-685.
- Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S. and Bayles, K. W.** (2007). The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(19): 8113-8118.
- Richter, M.** (2008). Regulation insektizider Gene von *Yersinia enterocolitica*. *Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie*. München, Technische Universität München.

- Roberts, J. W.** (1975). Transcription termination and late control in phage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(9): 3300-3304.
- Robins-Browne, R. M., Cianciosi, S., Bordun, A. M. and Wauters, G.** (1991). Pathogenicity of *Yersinia kristensenii* for mice. *Infect Immun* **59**(1): 162-167.
- Robins-Browne, R. M., Takeda, T., Fasano, A., Bordun, A. M., Dohi, S., Kasuga, H., Fang, G., Prado, V. Guerrant, R. L. and Morris, J. G. Jr.** (1993). Assessment of enterotoxin production by *Yersinia enterocolitica* and identification of a novel heat-stable enterotoxin produced by a noninvasive *Y. enterocolitica* strain isolated from clinical material. *Infect Immun* **61**(7), 764-767.
- Roderer, D. and Raunser, S.** (2019). Tc toxin complexes: Assembly, membrane permeation, and protein translocation. *Annu Rev Microbiol* **73**: 247-265.
- Rosqvist, R., Forsberg, A., Rimpiläinen, M., Bergman, T. and Wolf-Watz, H.** (1990). The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol Microbiol* **4**(4): 657-667.
- Rosqvist, R., Persson, C., Håkansson, S., Nordfeldt, R. and Wolf-Watz, H.** (1995). Translocation of the *Yersinia* YopE and YopH virulence proteins into target cells is mediated by YopB and YopD. *Contrib Microbiol Immunol* **13**: 230-234.
- Rosqvist, R., Skurnik, M. and Wolf-Watz, H.** (1988). Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature* **334**(6182): 522-524.
- Salzet, M.** (2001). Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol* **22**(6): 285-288.
- Savin, C., Criscuolo, A., Guglielmini, J., Le Guern, A. S., Carniel, E., Pizarro-Cerdá, J. and Brisse S.** (2019). Genus-wide *Yersinia* core-genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization. *Microb Genom* **5**(10): e000301.
- Savva, C. G., Dewey, J. S., Deaton, J., White, R. L., Struck, D. K., Holzenburg, A. and Young, R.** (2008). The holin of bacteriophage lambda forms rings with large diameter. *Mol Microbiol* **69**(4): 784-793.
- Schwechheimer, C., Kulp, A. and Kuehn, M. J.** (2014). Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. *BMC Microbiol* **14**: 324.
- Sebbane, F., Jarrett, C. O., Gardner, D., Long, D. and Hinnebusch, B. J.** (2006). Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14): 5526-5530.



- Sergeant, M., Jarrett, P., Ousley, M. and Morgan, J.A.** (2003). Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Appl Environ Microbiol* **69**(6): 3344-3349.
- Simon, N. C., Aktories, K. and Barbieri, J. T.** (2014). Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. *Nat Rev Microbiol* **12**(9): 599-611.
- Simonet, M., Riot, B., Fortineau, N. and Berche, P.** (1996). Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect Immun* **64**(1): 375-379.
- Singh, I. and Viridi, J. S.** (2004). Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *J Med Microbiol* **53**: 1065-1068.
- Skurnik, M. and Wolf-Watz, H.** (1989). Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* **3**(4): 517-529.
- Skurnik, M., Bölin, I., Heikkinen, H., Piha, S. and Wolf-Watz, H.** (1984). Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* **158**(3): 1033-1036.
- Smego, R. A., Frean, J. and Koornhof, H. J.** (1999). Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague *Yersinia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**(1): 1-15.
- Sodeinde, O. A. and Goguen, J. D.** (1988). Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **56**(10): 2743-2748.
- Song, J., Gao, X. and Galán, J. E.** (2013). Structure and function of the *Salmonella* Typhi chimaeric A<sub>2</sub>B<sub>5</sub> typhoid toxin. *Nature* **499**(7458): 350-354.
- Song, N., Chen, L., Zhou, Z., Ren, X., Liu, B., Zhou, S., Wang, C., Wu, Y., Waterfield, N. R., Yang, J. and Yang, G.** (2021). Genome-wide dissection reveals diverse pathogenic roles of bacterial Tc toxins. *PLoS Pathog* **17**(2): e1009102.
- Spanier, B., Starke, M., Higel, F., Scherer, S. and Fuchs, T. M.** (2010). *Yersinia enterocolitica* infection and *tcaA*-dependent killing of *Caenorhabditis elegans*. *Appl Environ Microbiol* **76**(18): 6277-6285.
- Spinner, J. L., Jarrett, C. O., LaRock, D. L., Miller, S. I., Collins, C. M. and Hinnebusch, B. J.** (2012). *Yersinia pestis* insecticidal-like toxin complex (Tc) family proteins: characterization of expression, subcellular localization, and potential role in infection of the flea vector. *BMC Microbiol* **12**: 296.

- Starke, M.** (2015). Regulation und Freisetzung des insektiziden Komplexes in *Yersinia enterocolitica*. *Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie*. München, Technische Universität München.
- Starke, M. and Fuchs, T. M.** (2014). YmoA negatively controls the expression of insecticidal genes in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **92**(2): 287-301.
- Starke, M., Richter, M. and Fuchs, T. M.** (2013). The insecticidal toxin genes of *Yersinia enterocolitica* are activated by the thermolabile LTTR-like regulator TcaR2 at low temperatures. *Mol Microbiol* **89**(4): 596-611.
- Stock, I. and Wiedemann, B.** (2003). Natural antimicrobial susceptibilities and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica*-like strains: *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* and *Y. rohdei*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**(2): 139-152.
- Sulakvelidze, A., Kreger, A., Joseph, A., Robins-Browne, R. M., Fasano, A., Wauters, G., Harnett, N., DeTolla, L. and Morris, J. G., Jr** (1999). Production of enterotoxin by *Yersinia bercovieri*, a recently identified *Yersinia enterocolitica*-like species. *Infect Immun* **67**(2): 968-971.
- Summer, E. J., Berry, J., Tran, T. A., Niu, L., Struck, D. K. and Young, R.** (2007) Rz/Rz1 lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts. *J Mol Biol* **373**: 1098-1112.
- Sun, Y. C., Guo, X. P., Hinnebusch, B. J. and Darby, C.** (2012). The *Yersinia pestis* Rcs phosphorelay inhibits biofilm formation by repressing transcription of the diguanylate cyclase gene *hmsT*. *J Bacteriol* **194**(8): 2020-2026.
- Sun, Y. C., Jarrett, C. O., Bosio, C. F. and Hinnebusch, B. J.** (2014). Retracing the evolutionary path that led to flea-borne transmission of *Yersinia pestis*. *Cell Host Microbe* **15**(5): 578-586.
- Sun, Y. C., Koumoutsis, A., Jarrett, C., Lawrence, K., Gherardini, F. C., Darby, C. and Hinnebusch, B. J.** (2011). Differential control of *Yersinia pestis* biofilm formation *in vitro* and in the flea vector by two c-di-GMP diguanylate cyclases. *PLoS One* **6**(4): e19267.
- Takao, T., Tominaga, N., Shimonishi, Y., Hara, S., Inoue, T. and Miyama, A.** (1984). Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Biochem Biophys Res Commun* **125**(3): 845-851.
- Tan, K. S., Wee, B. Y. and Song, K. P.** (2001). Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* **50**(7): 613-619.
- Tauxe, R. V., Vandepitte, J., Wauters, G., Martin, S. M., Goossens, V., De Mol, P., Van Noyen, R. and Thiers, G.** (1987) *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* **1**(8542): 1129-1132.

- Tennant, S. M., Grant, T. H. and Robins-Browne, R. M.** (2003a). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**(2): 127-137.
- Tennant, S. M., Skinner, N. A., Joe, A. and Robins-Browne, R. M.** (2003b). *Yersinia enterocolitica* biotype 1A: not as harmless as you think. *Adv Exp Med Biol* **529**: 125-128.
- Tennant, S. M., Skinner, N. A., Joe, A. and Robins-Browne, R. M.** (2005). Homologues of insecticidal toxin complex genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and their contribution to virulence. *Infect Immun* **73**(10): 6860-6867.
- Tran, T. A., Struck, D. K. and Young, R.** (2005). Periplasmic domains define holin-antiholin interactions in t4 lysis inhibition. *J Bacteriol* **187**(19): 6631-6640.
- Tsai, C. J., Loh, J. M. and Proft, T.** (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* **7**(3): 214-229.
- Ursing, J., Don Brennert, J., Bercovier, H., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., Brault, J. and Mollaret, H. H.** (1980). *Yersinia frederiksenii*: A new species of *enterobacteriaceae* composed of rhamnose-positive strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-Like). *Curr Microbiol* **4**: 213-217.
- van den Esker, M. H., Kovács, Á. T. and Kuipers, O. P.** (2017). YsbA and LytST are essential for pyruvate utilization in *Bacillus subtilis*. *Environ microbiol* **19**(1): 83-94.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaitre, B., Medigue, C. and Bocard, F.** (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol* **24**: 673-679.
- Wagner, P. L., Livny, J., Neely, M. N., Acheson, D. W., Friedman, D. I. and Waldor, M. K.** (2002). Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**(4): 957-970.
- Walters, J. B. and Ratcliffe, N. A.** (1983). Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: Fate of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodules. *J Insect Physiol* **29**(5): 417-424.
- Wang, I. N., Smith, D. L. and Young, R.** (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol* **54**: 799-825.
- Waterfield, N. R., Bowen, D. J., Fetherston, J. D., Perry, R. D. and French-Constant, R. H.** (2001a). The *tc* genes of *Photobacterium*: a growing family. *Trends Microbiol* **9**(4): 185-191.

- Waterfield, N., Dowling, A., Sharma, S., Daborn, P. J., Potter, U. and Ffrench-Constant, R. H.** (2001b). Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **67**(11): 5017-5024.
- Waterfield, N. R., Hares, M., Hinchliffe, S. Wren, B. and ffrench-Constant, R.** (2007). The insect toxin complex of *Yersinia*. *Adv Exp Med Biol* **603**: 247-257.
- Waterfield, N. R., Hares, M., Yang, G., Dowling, A. and ffrench-Constant, R.** (2005). Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal Toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. *Cell Microbiol* **7**(3): 373-382.
- Waterfield, N. R., Wren, B. W. and Ffrench-Constant, R. H.** (2004). Invertebrates as a source of emerging human pathogens. *Nat Rev Microbiol* **2**(10): 833-841.
- Wauters, G., Kandolo, K. and Janssens, M.** (1987). Revised biogrouping schema of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 14-21.
- White, R., Chiba, S., Pang, T., Dewey, J. S., Savva, C. G., Holzenburg, A., Pogliano, K. and Young, R.** (2011) Holin triggering in real time. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**(2): 798-803.
- Wilkinson, P., Waterfield, N. R., Crossman, L., Corton, C., Sanchez-Contreras, M., Vlisidou, I., Barron, A., Bignell, A., Clark, L., Ormond, D., Mayho, M., Bason, N., Smith, F., Simmonds, M., Churcher, C., Harris, D., Thompson, N. R., Quail, M., Parkhill, J. and ffrench-Constant, R.** (2009). Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*. *BMC Genom* **10**(1): 302.
- Wilson, D. B.** (1982). Effect of the lambda S gene product on properties of the *Escherichia coli* inner membrane. *J Bacteriol* **151**(3): 1403-1410.
- Wydau-Dematteis, S., El Meouche, I., Courtin, P., Hamiot, A., Lai-Kuen, R., Saubaméa, B., Fenaille, F., Butel, M. J., Pons, J. L., Dupuy, B., Chapot-Chartier, M. P. and Peltier, J.** (2018). Cwp19 is a novel lytic transglycosylase involved in stationary-phase autolysis resulting in toxin release in *Clostridium difficile*. *mBio* **9**(3): e00648-18.
- Xu, M., Struck, D. K., Deaton, J., Wang, I. N. and Young, R.** (2004). A signal-arrest-release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6415-6420.
- Xu, M., Arulandu, A., Struck, D. K., Swanson, S., Sacchettini, J. C. and Young, R.** (2005). Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science* **307**(5706): 113-117.

- Yang, Y., Merriam, J. J., Mueller, J. P. and Isberg, R. R.** (1996). The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infect Immun* **64**(7): 2483-2489.
- Yang, Q., Zhang, J., Li, T., Liu, S., Song, P., Nangong, Z. and Wang, Q.** (2017). PirAB protein from *Xenorhabdus nematophila* HB310 exhibits a binary toxin with insecticidal activity and cytotoxicity in *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* **148**: 43-50.
- Yoshino, K., Huang, X., Miyachi, M., Hong Y., Takao, T., Nakao, H., Takeda, T. and Shimonishi, Y.** (1994). Amino acid sequence of a novel heat-stable enterotoxin produced by a *yst* gene-negative strain of *Yersinia enterocolitica*. *Lett Peptide Sci* **1**: 95-105.
- Yoshino, K., Takao, T., Huang, X., Murata, H., Nakao, H., Takeda, T. and Shimonishi, Y.** (1995). Characterization of a highly toxic, large molecular size heat-stable enterotoxin produced by a clinical isolate of *Yersinia enterocolitica*. *FEBS Lett* **362**(3): 319-322.
- Young, G. M., Amid, D. and Miller, V. L.** (1996). A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. *J Bacteriol* **178**(22): 6487-6495.
- Young, R.** (1992). Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Rev* **56**(3): 430-481.
- Young, R.** (2014). Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol* **52**(3): 243-258.
- Young, R. and Bläsi, U.** (1995). Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol Rev* **17**(1-2): 191-205.
- Young, R., Wang, I. and Roof, W. D.** (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* **8**(3): 120-128.
- Zhan, Z., Qiu, X. and Han, R.** (2016). Horizontal transfer of the C-termini of *tccC* genes in *Photobacterium* and *Xenorhabdus*. *Genes Genom* **38**(8): 685-692.
- Zhang, X., Hu, X., Li, Y., Ding, X., Yang, Q., Sun, Y., Yu, Z., Xia, L. and Hu, S.** (2014). XaxAB-like binary toxin from *Photobacterium luminescens* exhibits both insecticidal activity and cytotoxicity. *FEMS Microbiol Lett* **350**(1): 48-56.

## Konferenzbeiträge

### Vorträge

Springer, K., Fuchs, T. M.: Characterization of lysis cassette from the insecticidal pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. 5<sup>th</sup> National *Yersinia*-Meeting. 30 – 31 Mai 2016, Münster.

### Poster-Präsentationen

Springer, K., Fuchs, T. M.: Functionality of a holin-endolysin cassette within the pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. Microbiology and Infection 2017: 5<sup>th</sup> Joint Conference of the DGHM & VAAM, 5 – 8 March 2017, Würzburg

## Eidesstattliche Erklärung

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

### **Der Einfluss phagenverwandter Lysegene und eines neuen Enterotoxins auf die insektizide Aktivität von Yersinien**

am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, ZIEL – Institute for Food & Health, Department für Grundlagen der Biowissenschaften unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Thilo M. Fuchs ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angebotenen Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

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

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

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

---

Ort, Datum, Unterschrift

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich auf dem langen Weg unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thilo M. Fuchs für die Möglichkeit, unter seiner Anleitung und Betreuung zu promovieren. Ich bedanke mich für wiederkehrende konstruktive Diskussionen und den anhaltenden fachlichen Austausch. Beides hat entscheidend zu meiner akademischen Entwicklung beigetragen. Ohne seine Geduld und Hartnäckigkeit – und auch sein schnelles Korrekturlesen auf den letzten Metern – wäre ein erfolgreicher Abschluss der Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer, für die Möglichkeit, meine Arbeit an seinem Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie anfertigen zu können. Seine Menschlichkeit und seine Begeisterung für die Wissenschaft haben eine Atmosphäre geschaffen, in der ich stets gern gearbeitet habe.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein herzlicher Dank geht an alle ehemaligen Kollegen, mit denen ich während meiner Zeit am Lehrstuhl zusammenarbeiten durfte und die zu einem angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben. Es war mir allzeit eine Freude, Zeit am Lehrstuhl zu verbringen. Neben den gegenseitigen Hilfestellungen im Labor und dem Erfahrungsaustausch sorgten nette Gespräche auf dem Flur, der gemeinsame Gang zur Mensa oder auch die vielen Lehrstuhlfeiern für ein wunderbares Gemeinschaftsgefühl. Danke Sarah Hücker, Andrea Rütschle, Marlies Böhm, Barbara Zehentner, Michaela Kreitmeier, Genia Lücking, Mareike Wenning, Chris Huptas, Anna Dettling.

Ebenso danke ich meinen Studenten Svenja Lorenz, Felix Bayerl, Lukas Schmauder und Lisa Streb für ihr Interesse an meiner Forschung und ihre tatkräftige Mitarbeit.

Hervorzuhaben ist die unentwegte Hilfe bei der Bewältigung der organisatorischen Dinge – Danke Maria Thole und Brigitte Stable. Ich danke auch für die Unterstützung bei Bestellungen und bei Problemen mit technischen Geräten – Danke Patrick Schiwiek und Romy Wecko.

Besonders hervorzuheben ist die wertvolle Unterstützung und unermüdliche Hilfsbereitschaft von Angela Felsl. Danke für die hervorragende technische Assistenz im Labor und das fortwährend offene Ohr.



Für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit im Labor danke ich allen ehemaligen Mitgliedern der AG Fuchs: Johannes Rothhardt, Tanja Kern, Jessica Hellinckx, Nicoletta Nolle und Jakob Schardt. Ich danke auch Mandy Knüpfer dafür, dass sie mich für dieses interessante Forschungsthema begeistert hat sowie für ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit.

Ich danke Etienne Doll und Lena Staib für ihren Beistand und ihr Verständnis auch über den kollegialen Zusammenhang hinaus und freue mich, dass daraus eine wertvolle Freundschaft entstanden ist.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für ihre fortwährende Unterstützung und Bestärkung. Im Besonderen danke ich meinem Mann Felix für das unermüdliche Ermutigen und Rücken freihalten, gerade in der letzten Zeit.