

Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München

**Molekulare und funktionelle Analyse der
Yersiniabaktin-Transportgene von
Yersinia enterocolitica, Serotyp O:8**

Daniela Brem

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer

2. Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Heesemann
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 03.07.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 26.07.2001 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG.....	1
1. Die Gattung <i>Yersinia</i>	1
1.1 <i>Y. enterocolitica</i>	1
1.1.1 Verbreitung.....	1
1.1.2 Klinisches Bild der <i>Y. enterocolitica</i> Infektion	2
1.1.3 Pathogenitätsfaktoren	2
1.1.3.1 Adhärenz und Invasion.....	2
1.1.3.2 Enterotoxin Yst.....	3
1.1.3.3 TypIII-Sekretion bzw. -Translokation der Effektorproteine.....	3
1.1.3.4 Interaktion mit Komplement.....	4
2. Eisenaufnahme.....	4
2.1 Eisen	4
2.2 Siderophore.....	5
2.2.1 Eisenaufnahmesysteme in <i>Y. enterocolitica</i>	6
2.2.2 Yersiniabaktin.....	7
3. High-Pathogenicity Island (HPI).....	7
3.1 Sequenzierung und Charakterisierung des <i>irp6-9</i> Genclusters.....	9
3.1.1 Irp6, Irp7	9
3.1.2 Irp8.....	9
3.1.3 Irp9.....	10
4. Ziel der Arbeit.....	10
B. MATERIAL UND METHODEN	11
1. Material	11
1.1 Geräte.....	11
1.2 Chemikalien und Enzyme.....	11
2. Bakterien, Plasmide und Primer	12
2.1 Bakterien.....	12
2.2 Plasmide	13
2.3 Primer	15
3. Nährmedien, Antibiotika, Anzucht und Stammhaltung	16
3.1 Nährmedien	16
3.2 Antibiotika	16
3.3 Anzucht und Stammhaltung	16

4. Molekulargenetische Arbeitsmethoden	17
4.1 Isolierung von chromosomaler DNS mit Qiagen Genomic-tip 100/G	17
4.2 Isolierung von Plasmid-DNS	17
4.2.1 Plasmidisolierung durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979).....	17
4.2.2 Plasmidisolierung mit QIAprep Spin Miniprep Kit	18
4.2.3 Plasmidisolierung mit Nucleobond AX100 Kit.....	18
4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki <i>et al.</i> , 1988)	18
4.4 Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNS	19
4.4.1 Phenolextraktion	19
4.4.2 Ethanol-fällung	20
4.4.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNS.....	20
4.5 Enzymatische Modifikation von DNS.....	20
4.5.1 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen.....	20
4.5.2 Dephosphorylierung von linearen DNS-Fragmenten.....	21
4.5.3 Ligation linearer DNS-Moleküle.....	21
4.6 RNS-Isolierung und RT-PCR.....	22
4.6.1 RNS-Isolierung mit dem RNeasy™ Total RNA Kit.....	22
4.6.2 DNase-Behandlung.....	22
4.6.3 RT-PCR	22
4.7 Agarose-Gelelektrophorese	23
4.7.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	24
4.7.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese	24
4.7.3 Größenbestimmung von DNS-Fragmenten	24
4.8 Southern-Blot-Hybridisierung (Southern, 1975; modifiziert).....	25
4.8.1 Herstellung einer DIG-markierten Sonde.....	25
4.8.2 Vakuumblot	26
4.8.3 Hybridisierung und Detektion	27
4.9 Sequenzierung	28
4.10 Transfer von DNS.....	28
4.10.1 Elektroporation	28
4.10.2 Konjugation (Achtman <i>et al.</i> , 1978).....	29
5. Herstellung von Mutanten durch homologe Rekombination	30
5.1 Herstellung von Deletionsmutanten mit Hilfe des Suizidvektors pKNG101	30
5.2 Herstellung von Insertionsmutanten mit Hilfe des Suizidvektors pKAS32.....	30
6. Nachweis der Yersiniabaktinsynthese und -aufnahme	31
6.1 Isolierung von Kulturüberständen	31
6.2 Fütterungstest auf CDM-H-Agar (Flossman <i>et al.</i> , 1985).....	31
6.3 Siderophordetektion auf CAS-Agar (Schwyn & Neilands, 1987).....	32
6.4 Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz.....	33
6.5 Detektion der HMWPs (High Molecular Weight Proteins) (Pelludat <i>et al.</i> , 1998)....	34
7. Pestizinassay	34

8. Mausversuch	34
8.1 Nachweis des pYV-Plasmids.....	35
8.1.1 Agglutinationstest.....	35
8.1.2 Nachweis der sekretierten Proteine (Yops)	35
8.2 Mauspassage.....	36
8.3 Zellzahlbestimmung	36
8.4 Infektionsversuch.....	36
9. Proteinbiochemische Arbeitstechniken	37
9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).....	37
9.2 Immunoblot (Western-Blot) (Towbin <i>et al.</i> , 1979)	39
9.3 Quantitative Proteinbestimmung	40
9.4 Gewinnung und Reinigung von Proteinen.....	40
9.4.1 Anzucht und Induktion der Bakterien.....	40
9.4.2 Präparation des Zellextrakts	41
9.4.3 Reinigung von Gst-Fusionsproteinen	41
9.4.4 Präparation von inclusion bodies.....	41
9.4.5 Präparative SDS-PAGE, Elektroelution und Proteinfällung	42
9.4.5.1 Präparative SDS-PAGE.....	42
9.4.5.2 Elektroelution	42
9.4.5.3 Proteinfällung	42
9.5 Immunisierung von Kaninchen.....	43
C. ERGEBNISSE	44
1. Das Operon <i>irp6</i>, <i>irp7</i>, <i>irp8</i> und <i>irp9</i> von <i>Y. enterocolitica</i>	44
2. Konstruktion von Mutanten in <i>Y. enterocolitica</i>	45
2.1 WA-C $\Delta irp6$	45
2.2 WA-C $\Delta irp7$	48
2.3 WA-CS <i>irp7</i> ::Kan ^r	50
2.4 WA-C $\Delta irp6, irp7$	52
2.5 WA-CS <i>irp8</i> ::Kan ^r	54
2.6 WA-CS $\Delta irp6, irp7, irp8$::Kan ^r	56
3. Ybt-Aufnahme von <i>Y. enterocolitica</i>	56
4. Mausvirulenz von <i>Y. enterocolitica</i>	57
5. Komplementation der <i>Y. enterocolitica</i> Mutanten	58
6. Transfer der Ybt-Transportgene in <i>E. coli</i> H1884 und <i>Y. enterocolitica</i> NF-O	59
6.1 Ybt-vermitteltes Wachstum in <i>E. coli</i> H1884 (pACYC5.2).....	60
6.2 Ybt-vermitteltes Wachstum in <i>Y. enterocolitica</i> NF-O (pACYC5.2)	61
6.3 Expression bzw. Transkription von <i>fyuA</i> bzw. <i>irp6, irp7</i>	62
6.3.1 Expression von <i>fyuA</i>	62
6.3.2 Funktionalität von FyuA.....	62
6.3.3 Transkription von <i>irp6, irp7</i>	63

7. Expression der Ybt-Synthesegene und des Rezeptorgens in <i>Y. enterocolitica</i>	64
7.1 Fütterung von WA-CS <i>irp1::Kan^r</i> mit verschiedenen Kulturüberständen	65
7.2 HMWP-Synthese	66
7.3 Reporterstudien mit <i>irp2-gfp</i>	67
7.4 GFP-Messung zur Bestimmung der Ybt-Konzentration	68
7.5 Reporterstudien mit <i>fyuA-gfp</i>	69
7.6 CAS-Phänotyp und <i>fyuA-gfp</i> Expression unter CAS-Agar-Bedingungen.....	70
8. <i>irp6/ybtP-ybtA</i>-Promotorregion in der Yen- und Yps-HPI	73
8.1 Reporterstudien mit <i>irp6/ybtP-gfp</i> in <i>Y. enterocolitica</i>	74
8.2 Reporterstudien mit <i>ybtA-gfp</i> in <i>Y. enterocolitica</i>	76
9. Herstellung eines YbtA-Antikörpers und Expression von <i>ybtA</i>	78
9.1 Plasmide pGEX <i>ybtA</i> und pMOS <i>ybtA</i>	78
9.2 Reinigung des Fusionsproteins Gst-YbtA und Immunisierung eines Kaninchens.....	79
9.3 Expression von <i>ybtA</i>	82
D. DISKUSSION	84
1. Das <i>irp6-9</i> Operon und die Funktion der Gene <i>irp6</i>, <i>irp7</i> und <i>irp8</i> in <i>Y. enterocolitica</i>	84
1.1 Einfluß von Irp6/Irp7 auf die Ybt-Aufnahme und Mausvirulenz.....	84
1.2 Einfluß von Irp8 auf die Ybt-Aufnahme und Mausvirulenz	86
2. Ybt-Aufnahme in <i>E. coli</i> H1884 (pACYC5.2) und <i>Y. enterocolitica</i> NF-O (pACYC5.2)	87
3. Regulation der HPI core-Gene	89
3.1 Regulation der Ybt-Synthesegene und des Rezeptorgens <i>fyuA</i>	89
3.1.1 Einfluß von FyuA	90
3.1.2 Einfluß von Irp6/Irp7 und Irp8	91
3.2 Auswirkung des CAS-Agars auf die Ybt-Synthese und <i>fyuA</i> Expression.....	91
3.3 <i>irp6/ybtP-gfp</i> und <i>ybtA-gfp</i> Reporterstudien	92
4. Herstellung eines YbtA-Antikörpers und Untersuchung der <i>ybtA</i> Expression	95
E. ZUSAMMENFASSUNG	98
LITERATURVERZEICHNIS	100
PUBLIKATIONSLISTE	110

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin, Ampere
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ÄM	äußere Membran
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
au	arbitrary units (willkürliche Einheiten)
BCIP	5-Brom-6-chlor-3-indolylphosphat
BG	Biogruppe
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CAS	Chromazurol S
cDNS	komplementäre DNS
CFU	Colony forming unit (Kolonie bildende Einheit)
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
Cm	Chloramphenicol
CP	Zytoplasma
d	Schichtdicke
DEPC	Diäthylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)
DTT	Dithiothreitol
EDDHA	Ethylendiamin-di (o-hydroxyphenyllessigsäure)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
EtOH	Ethanol
EtOH _{abs}	absoluter EtOH
F	Farad
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	Fur-Box
Fe	Eisen
g	Gramm
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser

H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
HDTMA	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
HMWP	High Molecular Weight Protein
HPI	High-Pathogenicity Island
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IM	innere Membran
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
μ	mikro
m	milli
M	Molar
MCS	multiple Klonierungsstelle
min	Minute
mRNS	Boten-RNS
n	nano
Nal	Nalidixinsäure
NB	Nutrient Broth
NBD	Nutrient Broth mit Dipyridyl
NBT	Nitrotetrazolium Blau
Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
P	Promotor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBP	periplasmatisches Bindepotein
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIPES	Piperazidinesulfonsäure
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PP	Periplasma
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RS	repetitive Sequenzen
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase/Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sm	Streptomycin
Suc	Saccharose

T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
U	Einheiten, Uracil
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
Ybt	Yersiniabaktin
z.B.	zum Beispiel

A. EINLEITUNG

1. Die Gattung *Yersinia*

Die früher als *Pasteurella* bezeichnete Gattung erhielt 1964 ihren heutigen Namen *Yersinia*, der auf den Entdecker des Pest-Erregers A. Yersin zurückzuführen ist. Die Gattung *Yersinia* wird der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet (Frederiksen, 1964). Bisher sind 11 verschiedene Arten bekannt. Drei davon sind von humanmedizinischer Bedeutung (Brenner, 1979): *Y. pestis* ist der Erreger der Pest, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* sind enteropathogen (Knapp, 1988). Ihr Wachstumsoptimum liegt bei 28°C, jedoch können sie sich auch bei 4°C vermehren. *Y. pestis* ist unbeweglich, während die enteropathogenen Yersinien bei 28°C, aber nicht bei 37°C beweglich sind.

Die Gattung *Yersinia* kann in nicht-pathogene Gruppe und hinsichtlich der Mausvirulenz in zwei Gruppen unterschiedlicher Pathogenität eingeteilt werden (Brubaker, 1991; Perry & Fetherston, 1997). Zur hochpathogenen mausletalen Gruppe gehören *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* Biogruppe 1B und zur schwachpathogenen nicht-mausletalen Gruppe *Y. enterocolitica* der Biogruppen 2-5. Im Gegensatz zu der nicht-pathogenen Gruppe (z.B. *Y. enterocolitica* Biogruppe 1A) besitzen sowohl die schwach- als auch die hochpathogenen Yersinien ein 70kb-großes Virulenzplasmid (pYV). Da der mausvirulente Phänotyp nicht durch den Transfer des Virulenzplasmids einer hochpathogenen auf eine schwachpathogene Yersinie übertragen werden kann, wurde vermutet, daß chromosomale Gene für den hochpathogenen Phänotyp verantwortlich sind (Heesemann & Laufs, 1983).

1.1 *Y. enterocolitica*

1.1.1 Verbreitung

Y. enterocolitica ist in aquatischen Habitaten und in Tieren sehr weit verbreitet, wobei das Schwein das Hauptreservoir für die humanpathogenen Biogruppen 2-4 zu sein scheint (Bottone, 1997).

Y. enterocolitica wird aufgrund von biochemischen Merkmalen in 6 Biogruppen unterteilt (Wauters *et al.*, 1987). In Amerika dominieren die Serotypen O:4, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 (auch "amerikanische Serotypen" genannt), die zur Biogruppe 1B gehören (Aleksic & Bockemühl, 1990). Die in Europa vorkommenden, für den Menschen pathogenen Serotypen

O:3, O:5,27 und O:9 (auch "europäische Serotypen" genannt) werden den Biogruppen 2 bis 5 zugeordnet. Biogruppe 1A umfaßt verschiedene nicht-pathogene Serotypen, die in der Umwelt, als Saprophyten im Darm von Gesunden oder gelegentlich auch als Opportunisten bei Wundinfektionen vorkommen.

1.1.2 Klinisches Bild der *Y. enterocolitica* Infektion

Die Übertragung erfolgt in der Regel auf oralem Weg durch Aufnahme kontaminierter Lebensmittel (Wasser, Schweinefleisch, Milch) oder seltener parenteral durch Bluttransfusionen (Aleksic & Bockemühl, 1990; Cover & Aber, 1989). Nach einer Inkubationszeit von 7-10 Tagen kommt es zu dem klinischen Bild der Yersiniose (Bottone, 1997; Hoogkamp-Korstanje & de Koning, 1990). Diese äußert sich als akute Enteritis (Bauchschmerzen, Fieber, wäßriger Durchfall, Erbrechen u.a.), Pseudoappendizitis (mesenteriale Lymphadenitis), Ileitis ("Pseudo-Crohn") und Enterokolitis. In der Regel verläuft die Yersiniose selbstlimitierend. In seltenen Fällen kann es jedoch zur septischen Form mit Abszessbildung in Milz und Leber kommen. Die septische Yersiniose tritt v.a. bei Patienten mit Immundefizienz, Eisenüberladung durch Desferal-Behandlung, hämolytischer Anämie, Diabetes oder Leberzirrhose auf und hat eine hohe Letalität (Rabson *et al.*, 1975). Als sekundäre immunpathologische Folgeerkrankungen einer intestinalen Yersiniose werden v.a. die HLA-B27-assoziierte reaktive Arthritis und das Erythema nodosum beschrieben (Dequeker *et al.*, 1980; Winblad, 1969).

1.1.3 Pathogenitätsfaktoren

1.1.3.1 Adhärenz und Invasion

Nach oraler Aufnahme gelangen die enteropathogenen Yersinien über die M-Zellen (spezialisierte Zellen im follikelassoziierten Epithel der Peyer-Plaques) in die im terminalen Ileum reichlich vorhandenen Peyer-Plaques (Lymphfollikel). Die Adhärenz an die M-Zellen der Darmmukosa und die Invasion in das darunterliegende Gewebe wird von dem äußeren Membranprotein Inv (Invasin) vermittelt. Das Invasin interagiert mit dem β 1-Integrin der M-Zellen und löst den Transzytoseprozeß der Yersinien aus (Autenrieth & Firsching, 1996; Brett *et al.*, 1993; Schulte *et al.*, 2000). Eine *Y. enterocolitica inv*-Mutante zeigt im Mausmodell eine stark verzögerte Darminvasivität (Pepe & Miller, 1993).

Neben dem bereits erwähnten chromosomal kodierten Adhäsion Inv gibt es noch ein weiteres auf dem pYV-Virulenzplasmid kodiertes Adhäsion: das *Yersinia* Adhäsion Yada. Yada ist ein

äußeres Membranprotein und für die volle Mausvirulenz von *Y. enterocolitica* essentiell (Heesemann & Grüter, 1987; Hoiczky *et al.*, 2000; Skurnik *et al.*, 1994).

1.1.3.2 Enterotoxin Yst

Das hitzestabile chromosomal kodierte Enterotoxin Yst aktiviert die Guanylat-Cyclase und induziert wäßrigen Durchfall, was ein typisches Symptom bei *Y. enterocolitica* Infektionen ist (Delor & Cornelis, 1992).

1.1.3.3 TypIII-Sekretion bzw. -Translokation der Effektorproteine

Yersinien können die Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) und auch durch Makrophagen verhindern (Ruckdeschel *et al.*, 1996). Eine wichtige Rolle dabei spielen die auf dem pYV-Plasmid kodierten Yops (*Yersinia* outer proteins) (Cornelis & Wolf-Watz, 1997). Diese wurden zunächst als “outer membrane proteins” bezeichnet (Portnoy *et al.*, 1981). Später konnten Heesemann *et al.* (1986) zeigen, daß diese Proteine auch aus dem Kulturüberstand gewonnen werden können. Bei Kontakt der Yersinien mit der Wirtszelle (*in vivo*) bzw. bei 37°C in Kalzium-freiem Medium (*in vitro*) werden die Yops über das TypIII-Sekretionssystem in die Wirtszelle transloziert bzw. in das Medium sezerniert (Rosqvist *et al.*, 1994).

YopH ist eine Tyrosinphosphatase, die die Proteine des fokalen Adhäsionskomplexes (z.B. FAK, p130^{CAS}) dephosphoryliert und die Phagozytose und den “oxidative burst” der PMNs und Makrophagen verhindert (Persson *et al.*, 1997; Ruckdeschel *et al.*, 1996). Die Serinkinase YopO (YpkA) phosphoryliert Aktin und zerstört das Zytoskelett (Juris *et al.*, 2000). Außerdem bindet YopO an die GTPasen Rho und Rac und interferiert vermutlich mit der für die Phagozytose nötigen Signaltransduktionsmaschinerie (Barz *et al.*, 2000; Galyov *et al.*, 1993). Durch Schädigung des Zytoskeletts wirkt YopE zytotoxisch und Phagozytose-hemmend (Rosqvist *et al.*, 1991). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß YopE ein GTPase aktivierendes Protein für Rac ist und zur Inaktivierung der GTPase Rac führt (Andor *et al.*, 2001). Yop T ist durch Modifikation der GTPase RhoA an der Destabilisierung des Zytoskeletts beteiligt (Zumbihl *et al.*, 1999). YopP blockiert die NFκ-B-Aktivierung und führt zur Apoptose von Makrophagen (Orth *et al.*, 1999; Ruckdeschel *et al.*, 1998). YopM ist in der Lage die Thrombozytenaggregation zu hemmen (Leung *et al.*, 1990). Die genaue Funktion von YopN (LcrE) ist noch nicht geklärt. Es wird aber angenommen, daß YopN an der Regulation der Yop-Translokation beteiligt ist (Iriarte *et al.*, 1998).

LcrV (V-Antigen), YopB und YopD sind für die Translokation der Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle verantwortlich (Boland *et al.*, 1996). LcrV scheint die Fähigkeit zu haben, Poren in der Membran zu bilden (Holmstrom *et al.*, 2001).

Die Gene für den TypIII-Sekretionsapparat sind ebenfalls auf dem pYV-Plasmid kodiert und werden als *ysc* (Yop secretion) bezeichnet (Michiels *et al.*, 1991).

1.1.3.4 Interaktion mit Komplement

Yersinien sind Serum-resistent, d.h. sie werden z.B. nicht von dem Membranangriffskomplex (MAC) während der Komplementaktivierung lysiert. In *Y. enterocolitica* wird die Serumresistenz durch YadA und Ail vermittelt (Bliska & Falkow, 1992; Pilz *et al.*, 1992).

2. Eisenaufnahme

2.1 Eisen

Wie bei allen pathogenen Bakterien ist auch bei Yersinien eine effektive Eisenversorgung Grundvoraussetzung für die Vermehrung und Verbreitung im Wirt. Eisen ist ein essentieller Wachstumsfaktor für fast alle Bakterien (Ausnahmen: *Lactobacteriaceae*, *Borrelia burgdorferi*), da es in zahlreichen Redoxprozessen - wie z.B. dem Sauerstofftransport, dem Elektronentransport der Atmungskette oder der Nukleinsäuresynthese - benötigt wird.

Eisen ist das vierthäufigste Element in der Erdkruste und wird nur in mikromolaren Konzentrationen für das Wachstum benötigt. Trotzdem ist es für viele Organismen schwierig genug Eisen aufzunehmen, da Eisen unter aeroben Bedingungen in der oxidierten Form als Fe^{3+} vorliegt und unlösliche Fe^{3+} -Hydroxid-Komplexe bildet. Folglich beträgt die Konzentration an freiem Fe^{3+} unter aeroben Bedingungen und physiologischem pH nur 10^{-18} M (Braun *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu ist Fe^{2+} relativ gut löslich und deshalb unter anaeroben Bedingungen wesentlich leichter von Mikroorganismen aufzunehmen. Im Menschen ist Eisen entweder extrazellulär an die Carrierproteine Transferrin (im Serum) und Laktoferrin (Schleimhäute) oder intrazellulär an das Speicherprotein Ferritin gebunden (Ratledge & Dover; 2000). Auch sezernieren in infiziertes Gewebe eingewanderte Leukozyten das Fe^{3+} -bindende Protein Laktoferrin und halten dadurch die Eisenkonzentration gering (Leffell & Spitznage, 1975).

2.2 Siderophore

Bakterien haben verschiedene Strategien entwickelt, um an Eisen, das entweder in unlöslichen Komplexen vorliegt oder an Speicher- bzw. Carrierproteine gebunden ist, zu gelangen. Eine Möglichkeit ist die Produktion von Siderophoren, kleinen Molekülen, die mit hoher Affinität Fe^{3+} binden können (Braun *et al.*, 1998; Earhart, 1996). Siderophore werden unter Eisenmangel gebildet und in die Umgebung abgegeben (Abb. 1). Außerhalb der Zelle binden sie Fe^{3+} und werden dann über spezifische TonB-abhängige Rezeptoren in der äußeren Membran wieder aufgenommen. Der Komplex aus TonB, ExbB und ExbD ist für die Energieweiterleitung von der inneren Membran zu den Rezeptoren in der äußeren Membran nötig. In Gram-negativen Bakterien findet der weitere Transport über ein periplasmatisches Bindeprotein (PBP) und ABC-Transporter der Zytoplasmamembran statt (Boos & Lucht, 1996; Braun *et al.*, 1998; Earhart, 1996).

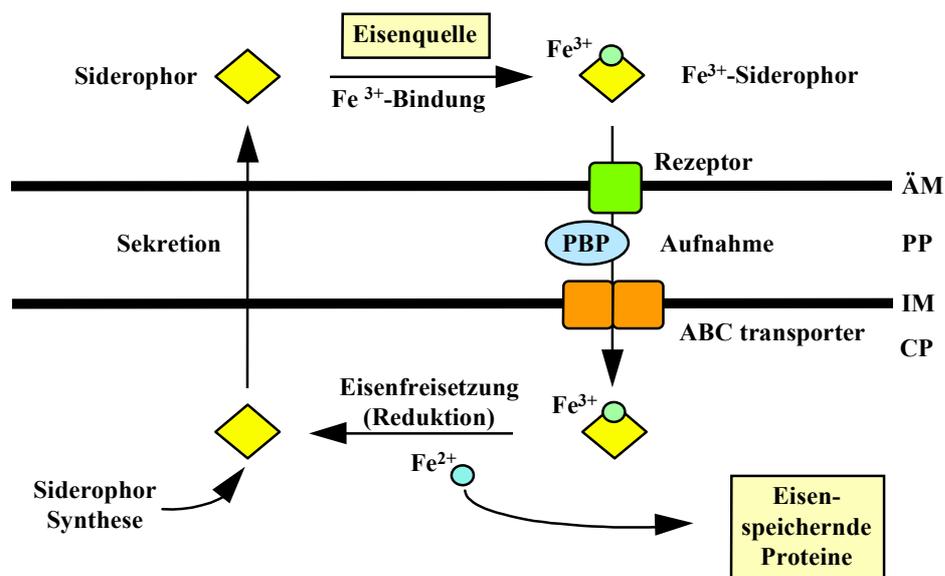


Abb. 1: Schematische Darstellung des Siderophor vermittelten Eisentransports in Gram-negativen Bakterien. Yersiniabaktin (Ybt) ist als gelbes Viereck, Eisen (III) (Fe^{3+}) als grüner Kreis und Eisen (II) (Fe^{2+}) als blauer Kreis dargestellt. Das grüne Viereck symbolisiert den TonB-abhängigen Rezeptor, die orangefarbene Vierecke die ABC-Transporter und das blaue Oval das periplasmatische Bindeprotein (PBP). Der TonB-ExbB-ExbD-Komplex ist grau dargestellt. ÄM: äußere Membran, IM: innere Membran, CP: Zytoplasma, PP: Periplasma.

Im Zytoplasma wird das Eisen dann freigesetzt und in verschiedene Proteine eingebaut. Da Siderophore eine sehr schwache Affinität für Fe^{2+} haben, geschieht die Eisenfreisetzung vermutlich durch Reduktasen, die Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren. Bisher ist nur ein Protein bekannt, das Eisen spezifisch vom Siderophor trennt. Fes (ferric enterochelin esterase) setzt Eisen aus dem *E. coli* Siderophor Enterochelin frei (Brickman & McIntosh, 1992; Schubert *et al.*, 1999). Siderophore und die Siderophor-Transportsysteme werden bei Eisenmangel im Zytosol gebildet. Bei hoher intrazellulärer Eisenkonzentration bindet Fe^{2+} an den Aporepressor Fur (ferric uptake regulation). Der Fe^{2+} -Fur Komplex bindet dann an die Fur-Box, die in der Promotorregion von eisenregulierten Genen liegt, und inhibiert die Transkription dieser Gene (Escolar *et al.*, 1999; Hantke, 1981). Unter Eisenmangel löst sich der Komplex und die Transkription der eisenregulierten Gene kann stattfinden.

2.2.1 Eisenaufnahmesysteme in *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica kann sowohl selbst produzierte (endogene) Siderophore als auch von anderen Organismen produzierte (exogene) Siderophore aufnehmen (Tab. 1). Außerdem sind Yersinien in der Lage, Hämin aufzunehmen (Stojiljkovic & Hantke, 1992 und 1994). Die Aufnahme findet über TonB-abhängige spezifische Rezeptoren in der äußeren Membran statt. Vor kurzem wurde das TonB- und Siderophor- unabhängige Eisenaufnahmesystem Yfu (yersiniae ferric uptake system) für *Y. enterocolitica* beschrieben (Saken *et al.*, 2000).

Die verschiedenen Eisenaufnahmesysteme in *Y. enterocolitica* sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 1: Eisenaufnahmesysteme in *Y. enterocolitica*

Eisenaufnahmesystem	Typ	Rezeptor	PBP	ABC-Transporter	Referenz
Yersiniabaktin	Katechol, endogen	FyuA	?	Irp6,7	Heesemann <i>et al.</i> (1993); Rakin <i>et al.</i> (1999b)
Ferrioxamin B/E	Hydroxamat, exogen	FoxA	FhuD	FhuBC	Bäumler & Hantke (1992)
Ferrichrom	Hydroxamat, exogen	FcuA	FhuD	FhuBC	Koebnik <i>et al.</i> (1993)
Enterochelin	Katechol, exogen	?	FepB	FepCDG	Schubert <i>et al.</i> (1999)
Katechol-Cephalosporine	Katechol, exogen	CccA	?	?	Bäumler <i>et al.</i> (1993)
Hämin	Porphyrin, exogen	HemR	HemT	HemUV	Stojiljkovic & Hantke (1992, 1994)
Yfu	Fe^{3+}	-	YfuA	YfuBCD	Saken <i>et al.</i> (2000)

2.2.2 Yersiniabaktin

Die Synthese eines Siderophores in pathogenen Yersinien wurde bereits 1975 von Wake *et al.* postuliert. Mit Hilfe des Siderophorindikatoragars (CAS-Agar) konnte später gezeigt werden, daß nur die hochpathogenen *Y. enterocolitica* Stämme ein Siderophor (Yersiniabaktin) produzieren (Heesemann, 1987). 1995 wurde Yersiniabaktin (Ybt) aus *Y. enterocolitica* gereinigt und die Struktur, die der von Pyochelin aus *Pseudomonas aeruginosa* ähnelt, aufgeklärt (Drechsel *et al.*, 1995). Beide Siderophore besitzen einen Phenolatriang, einen Thiazolidinring und einen (Pyochelin) bzw. zwei Thiazolinringe (Ybt) (Abb. 2).

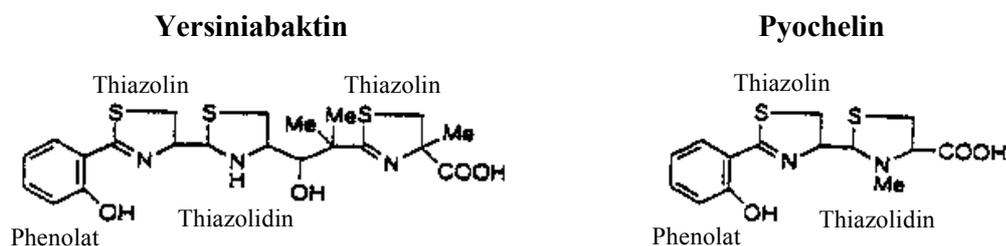


Abb. 2: Strukturformeln von Yersiniabaktin und Pyochelin (Drechsel *et al.*, 1995; Cox *et al.*, 1981).

3. High-Pathogenicity Island (HPI)

Es wurde beobachtet, daß die eisenregulierten Proteine HMWP1 und HMWP2 (High Molecular Weight Proteins; 240 kDa und 190 kDa) und das ebenfalls eisenregulierte äußere Membranprotein Irp65 (iron-repressible protein; 65 kDa) nur in hochpathogenen, mausvirulenten Yersinien exprimiert werden und daß diese Proteine für die Mausvirulenz essentiell sind (Carniel *et al.*, 1987, 1992; Heesemann *et al.*, 1993). Zudem wurde gezeigt, daß es sich bei Irp65 um den FyuA-Rezeptor (ferric yersiniabactin uptake) für das Siderophor Ybt und das *Y. pestis* Bakteriozin Pestizin handelt (Rakin *et al.*, 1994). Später konnte bewiesen werden, daß HMWP1 und HMWP2 an der Synthese von Ybt beteiligt sind (Bearden *et al.*, 1997; Pelludat *et al.*, 1998). Die Gene für HMWP1 (*irp1*) und HMWP2 (*irp2*) und auch das Rezeptorgen *fyuA* liegen in einem chromosomalen Bereich mit vom Restgenom abweichenden G+C-Gehalt, der als “High-Pathogenicity Island” (HPI) bezeichnet wird und nur in hochpathogenen Yersinien vorhanden ist (Carniel *et al.*, 1996).

Mittlerweile wurde die gesamte HPI sequenziert und festgestellt, daß die HPI aus einem “core”-Teil und einem AT-reichen Teil besteht (Rakin *et al.*, 1999a). Während der “core”-Teil in allen hochpathogenen Yersinien konserviert ist (98% DNS-Sequenzähnlichkeit), kann man aufgrund des variablen AT-reichen Teils zwei evolutionäre Linien unterscheiden: die Yen-HPI (43,3 kb) in *Y. enterocolitica* 1B und die Yps-HPI (36,1 kb) in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* (Rakin *et al.*, 1995). Der einzige signifikante Unterschied im “core”-Teil dieser HPIs ist das ERIC-Element, das in die *ybtA*-Promotorregion der Yen-HPI inseriert ist, aber in der Yps-HPI fehlt (Rakin *et al.*, 1999a).

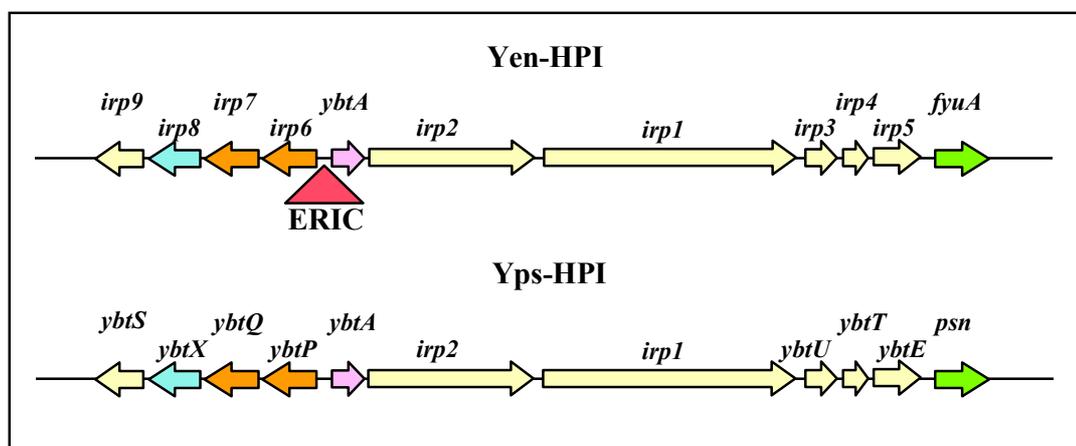


Abb. 3: Der "core"-Teil der Yen-HPI (*Y. enterocolitica* 1B) und Yps-HPI (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*). Farbige Pfeile stellen die Gene und ihre transkriptionelle Richtung dar. Das rote Dreieck gibt die Insertionsstelle des ERIC-Elements in die *ybtA*-Promotorregion der Yen-HPI an.

Der “core”-Teil umfaßt 11 Gene, die für das Ybt-System kodieren (Biosynthese, Transport und Regulation) (Abb. 3). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, daß *irp1* und *irp2* Ybt-Synthesegene, *fyuA* das Ybt-Rezeptorgen und *ybtA* das Gen für den AraC-Typ Regulator ist (Bearden *et al.*, 1997; Fetherston *et al.*, 1996; Rakin *et al.*, 1994). Die Expression der “core”-Gene unterliegt der Regulation durch den Fe²⁺-Fur Komplex (Carniel *et al.*, 1992; Heesemann *et al.*, 1993; Staggs *et al.*, 1994) und der des transkriptionellen Regulators YbtA (Fetherston *et al.*, 1996).

3.1 Sequenzierung und Charakterisierung des *irp6-9* Genclusters

Die Sequenz der Region stromaufwärts von *ybtA* war zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits bekannt, aber noch nicht veröffentlicht (Rakin *et al.*, 1999a, 1999b). Es wurden vier offene Leserahmen gefunden (*irp6,7,8,9*), von denen angenommen wurde, daß sie ein Operon von 6,2 kb bilden (Abb. 3). Diese Promotorregion scheint mit der des Regulatorgens *ybtA* zu überlappen, liegt aber in entgegengesetzter transkriptioneller Richtung.

Die Gene *irp6,7,8,9* zeigen 98-99% Homologie zu den kürzlich beschriebenen Genen *ybtP,Q,X,S* von *Y. pestis* (Fetherston *et al.* 1999; Gehring *et al.*, 1998).

3.1.1 Irp6, Irp7

Aufgrund der *irp6*- und *irp7*-Sequenzen können Proteine aus jeweils 600 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von ca. 66 kDa vorhergesagt werden. Der N-terminale Teil von Irp6 und Irp7 ist stark hydrophob und besteht vermutlich aus 6 (Irp6) bzw. 8 (Irp7) transmembranen Segmenten. Der C-terminale Teil dieser Proteine beinhaltet die ATP-bindende Domäne mit einer für ABC-Transporter typischen Konsensussequenz. ABC-Transporter bestehen in der Regel aus zwei hydrophoben Transmembrandomänen und zwei ATP-bindenden Domänen. Diese Domänen könne entweder als getrennte Proteine exprimiert werden oder auch fusioniert vorliegen (Higgins, 1992).

Eine Suche in der EMBL-Genbank mit dem BlastP Programm ergab folgende Ergebnisse:

Irp6 zeigt 48% Ähnlichkeit zu CyaB, einem Cyclolysin-sekretierenden Protein von *Bordetella pertussis*. Irp7 weist 49% Ähnlichkeit zu dem Hämolyisin-sekretierenden Protein HlyB von *E. coli* und zu dem Leukotoxin-sekretierenden Protein LktB von *Pasteurella haemolytica* auf. Bei diesen Proteinen handelt es sich um ABC-Transporter, bestehend aus einer N-terminalen hydrophoben Transmembrandomäne und einer C-terminalen ATP-bindenden Domäne, die an der Sekretion von Cyclolysin, Hämolyisin bzw. Leukotoxin beteiligt sind (Blight & Holland, 1990).

3.1.2 Irp8

irp8 kodiert vermutlich für ein stark hydrophobes Protein mit 12 transmembranen Segmenten und einer Molekularmasse von ca. 48 kDa. Die Datenbanksuche für Irp8 ergab 40% Ähnlichkeit zu AmpG von *E. coli*. AmpG fungiert vermutlich als Signaltransducer oder Permease im β -Lactamase Induktionssystem (Lindquist *et al.*, 1993).

3.1.3 Irp9

Irp9 (48 kDa) zeigt Ähnlichkeit zu der Anthranilat-Synthase PchA von *Pseudomonas aeruginosa* (Serino *et al.*, 1995) und zu der Isochorismat-Synthase EntC von *E. coli* (Ozenberger *et al.*, 1989). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Irp9 an der Ybt-Synthese beteiligt ist (Pelludat, 1999).

4. Ziel der Arbeit

Die Sequenzähnlichkeit von Irp6 und Irp7 zu ABC-Transportern und die Lage von *irp6* und *irp7* auf der HPI von *Y. enterocolitica* ließen vermuten, daß diese Proteine am Ybt-Transport beteiligt sind. Die Ähnlichkeit von Irp8 zu AmpG wies darauf hin, daß Irp8 möglicherweise an der Signaltransduktion und Regulation der HPI-Gene beteiligt ist (Rakin *et al.*, 1999a).

Folgende Fragestellungen sollten durch die Herstellung von *irp6*-, *irp7*- und *irp8*-Mutanten sowie durch *gfp*-Reporterstudien beantwortet werden:

- Sind Irp6 und Irp7 an der Aufnahme von Ybt beteiligt?
- Kommt Irp8 eine Bedeutung in der Signaltransduktion zu?
- Haben Irp6, Irp7 und Irp8 einen Einfluß auf die Mausvirulenz?
- Wie werden die HPI-Gene reguliert und welche Rolle spielt dabei das ERIC-Element in der Promotorregion von *ybtA* (kodiert für den transkriptionellen Regulator der HPI-Gene)?

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Geräte

Tab. 2: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Analysenwaagen	R160P und Pt 1200	Sartorius, Göttingen
Blotting Apparatur	LKB 2016 Vacu Gene ^R -Kammer	Pharmacia-LKB, Uppsala
Brutschränke	Typ B20	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Mini-Protean [®] -II Cell und Western-Blot Apparatur	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät	Gene-Pulser II, Pulse Controller II	Bio-Rad, München Bio-Rad, München
Elektroelutionsgerät	Biotrap	Schleicher & Schuell, Dassel
Durchflußzytometer	Coulter epics XL-MCL	Beckman Coulter, Krefeld
French press	French pressure cell 40K	SLM Aminco
Hybridisierungsöfen	Personal Hyb.	Stratagene, Amsterdam
PCR-Cycler	PCR System 2400	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
pH-Meter	320 pH Meter	Mettler, Toledo
Photometer	Ultrospec 3000	Pharmacia Biotec
Pipetten	Research P10-P1000	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	Braun, Melsungen
Sequenziermaschine	ABI 377 DNA Sequencer	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Spannungsquellen	Power Pac 200 und 300	Bio-Rad, München
Sterilwerkbank	Herasafe HS12	Heraeus, Hanau
Transilluminator	UVT-20M/W	Herolab, Wiesloch
Videophotoanlage	E. A. S. Y. (Enhanced Analysis System)	Herolab, Wiesloch
Zentrifugen	1K1S, Tischzentrifuge; 3K30 mit Rotoren Nr.12156 und 19776	Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen

1.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Antibiotika stammten von den Firmen Biochrom (Berlin), Roche (Mannheim), E. Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen).

Medien für die Bakterienkulturen stammten von der Firma Difco (Detroit, MI, USA).

Verwendete Restriktionsenzyme, Alkalische Phosphatase und T4-DNS-Ligase wurden von den Firmen Roche (Mannheim) und Gibco (Eggenstein) bezogen.

2. Bakterien, Plasmide und Primer

2.1 Bakterien

Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
S17-1 λ pir	Tp ^f Sm ^r , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> ⁻ M ⁺ [RP4-2-Tc::Mu:Kan ^r Tn7], λ pir	Miller & Mekalanos (1988); Simon <i>et al.</i> (1988)
SM10 λ pir	Km ^r , <i>thi</i> -1, <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu, λ pir	Miller & Mekalanos (1988)
MOS	<i>endA1 hsdR17 (r_{k12}⁻m_{k12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F[']proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15 :Tn10(Tc^r)]</i>	Amersham
H1884	<i>entD,F</i>	K. Hantke
HB101	<i>supE44 hsdS20(r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Bolivar & Backman (1979)
BL21	F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal</i>	Studier & Moffat (1986)
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal (λcIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i>)</i>	Studier & Moffat (1986)
CAG9294	Tn10 in Hsp60	Young <i>et al.</i> (1989)
<i>Y. enterocolitica</i>		
NF-O	klinisches Isolat, Serotyp O:5; Biogruppe 1A	Heesemann (1987)
WA-C	plasmidloses Derivat von WA-314, Serotyp O:8, Biogruppe 1B. Nal ^r	Heesemann (1987)
WA-CS	Sm-resistente Mutante von WA-C, Nal ^r , Sm ^r	Pelludat <i>et al.</i> (1998)
WA-CS <i>irp1</i> ::Kan ^r	<i>irp1</i> -Mutante von WA-CS, Nal ^r , Sm ^r , Kan ^r	Pelludat <i>et al.</i> (1998)
WA <i>fyuA2</i>	<i>fyuA</i> -Mutante von WA-CS, Nal ^r , Sm ^r , Kan ^r ; entspricht WA-CS <i>fyuA</i> ::Kan ^r	Brem <i>et al.</i> (2001); Pelludat (1999)
WA-CS <i>ybtA</i> ::Kan ^r	<i>ybtA</i> -Mutante von WA-CS, Nal ^r , Sm ^r , Kan ^r	Pelludat (1999)
WA-C Δ <i>irp7</i>	<i>irp7</i> -Mutante von WA-C, Nal ^r	diese Arbeit
WA-CS <i>irp7</i> ::Kan ^r	<i>irp7</i> -Mutante von WA-CS, Nal ^r , Sm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
WA-C Δ <i>irp6,irp7</i>	<i>irp6,irp7</i> -Mutante von WA-C, Nal ^r	diese Arbeit
WA-CS Δ <i>irp6,irp7</i>	Sm-resistente Mutante von WA-C Δ <i>irp6,irp7</i> , Nal ^r , Sm ^r	diese Arbeit
WA-CS <i>irp8</i> ::Kan ^r	<i>irp8</i> -Mutante von WA-CS, Nal ^r , Sm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
WA-CS Δ <i>irp6,irp7,irp8</i> ::Kan ^r	<i>irp6,irp7,irp8</i> -Mutante von WA-CS, Nal ^r , Sm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
WA-CH ^r	WA-C, in dem die HPI core-Gene <i>irp9-fyuA</i> deletiert wurden; Nal ^r , Kan ^r	Pelludat (1999)

2.2 Plasmide

Tab. 4: Verwendete Plasmide

Plasmide	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pRK290B8-5::pO:8	Kointegrat aus pYVO:8 Virulenzplasmid und dem Vektor pRK290B8-5, Tet ^r	Heesemann & Laufs (1983)
pRK2013	Helferplasmid mit <i>tra</i> -Genen, Kan ^r	Heesemann & Laufs (1983)
pLAFR2 12H2	Tet ^r , Mob ⁺ pLAFR2 mit einem ca. 23 kb Insert der chromosomalen DNS von WA-C (<i>irp6-irp9</i> Operon, <i>ybtA</i> und <i>irp2</i>), Tet ^r	Friedmann <i>et al.</i> (1982) Rakin & Heesemann (1995)
pMOSBlue	Klonierungsvektor, Amp ^r	Amersham
pMOS1.5	pMOSBlue mit ybtA6507-S360 PCR-Produkt, Amp ^r	diese Arbeit
pMOS1.1	pMOSBlue mit ybtA6507-S360 PCR-Produkt mit 465 bp Deletion in <i>irp6</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pMOS2.4	pMOSBlue mit S368-ybtA355 PCR-Produkt, Amp ^r	diese Arbeit
pMOS2.0	pMOSBlue mit ybtA355-S368 PCR-Produkt mit 402 bp Deletion in <i>irp7</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pMOS <i>irp7</i> ::Kan ^r	pMOSBlue mit S368-ybtA355 PCR-Produkt mit Kanamycinkassette in <i>NruI</i> Seite von <i>irp7</i> , Amp ^r , Kan ^r	diese Arbeit
pMOS3.5	pMOSBlue mit S452-8354Eco PCR-Produkt, Amp ^r	diese Arbeit
pMOS1.2	pMOSBlue mit S452-8354Eco PCR-Produkt mit 2313 bp Deletion in <i>irp6</i> und <i>irp7</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pMOSybtA	pMOSBlue mit ybtA380-ybtARHind PCR-Produkt (<i>ybtA</i>), Amp ^r	diese Arbeit
pBAD18	Klonierungsvektor, Amp ^r	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBAD <i>irp8</i>	pBAD18 mit <i>irp8Xba-irp8Hind</i> PCR-Produkt, Amp ^r	Pelludat
pBAD <i>irp8</i> ::Kan ^r	pBAD18 mit <i>irp8Xba-irp8Hind</i> PCR-Produkt mit Kanamycinkassette in <i>SphI</i> Seite von <i>irp8</i> , Amp ^r , Kan ^r	Pelludat
pKNG101	Suizidvektor mit <i>sacBR</i> Genen, Sm ^r	Kaniga <i>et al.</i> (1991)
pKNG1.1	pKNG101 mit <i>BamHI-XbaI</i> Fragment aus pMOS1.1, Sm ^r	diese Arbeit
pKNG2.0	pKNG101 mit <i>BamHI-XbaI</i> Fragment aus pMOS2.0, Sm ^r	diese Arbeit
pKNG1.2	pKNG101 mit <i>BamHI-XbaI</i> Fragment aus pMOS1.2, Sm ^r	diese Arbeit
pKAS32	Suizidvektor mit <i>rpsL</i> Gen, Amp ^r	Skorupski & Taylor (1996)
pKAS <i>irp7</i> ::Kan ^r	pKAS32 mit <i>XbaI-SacI</i> Fragment aus pMOS <i>irp7</i> ::Kan ^r , Amp ^r , Kan ^r	diese Arbeit
pKAS <i>irp8</i> ::Kan ^r	pKAS32 mit <i>irp8Xba-irp8Bam</i> PCR-Produkt aus pBAD <i>irp8</i> ::Kan ^r , Amp ^r , Kan ^r	diese Arbeit
pSB315	enthält Kanamycinkassette ohne transkriptionellen Terminator, Amp ^r , Kan ^r	Galan <i>et al.</i> (1992)
pT7-5 pHM6	Klonierungsvektor, Amp ^r pT7-5 mit <i>fyuA</i> , Amp ^r	Tabor & Richardson (1985) Rakin <i>et al.</i> (1994)

Plasmide	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pACYC184	Klonierungsvektor, Cm ^r , Tet ^r	Chang & Cohen (1978)
pACYC5.1	pACYC184 mit <i>irp6</i> und <i>irp7</i> enthaltendem 5,1 kb <i>SphI</i> Fragment aus 12H2, Cm ^r	diese Arbeit
pACYC5.2	pACYC5.1 mit <i>fyuA</i> enthaltendem 2,6 kb <i>XbaI-HindIII</i> Fragment aus pHM6, Cm ^r	diese Arbeit
pACYC5.3	pACYC5.2 mit <i>ybtA</i> enthaltendem 1,3 kb <i>ClaI-HindIII</i> Fragment aus pMOSybtA	
pHM10	pACYC184 mit <i>fyuA</i> , Cm ^r	Rakin <i>et al.</i> (1994)
pCJFY5G3	pACYC184 mit <i>fyuA5-gfp3</i> Fragment (153 bp der <i>fyuA</i> -Promotor Region und 5 Kodons von <i>fyuA</i> fusioniert an <i>gfp3</i>)	Jacobi (1999)
pGFP $irp6_{Y_{en}}$	pCJFY5G3 mit <i>irp6_{Y_{en}}</i> -Promotor Region anstelle von <i>fyuA</i> -Promotor	diese Arbeit
pGFP $ybtP_{Y_{ps}}$	pCJFY5G3 mit <i>ybtP_{Y_{ps}}</i> -Promotor Region anstelle von <i>fyuA</i> -Promotor	diese Arbeit
pGFP $ybtA_{Y_{en}}$	pCJFY5G3 mit <i>ybtA_{Y_{en}}</i> -Promotor Region anstelle von <i>fyuA</i> -Promotor	diese Arbeit
pGFP $ybtA_{Y_{ps}}$	pCJFY5G3 mit <i>ybtA_{Y_{ps}}</i> -Promotor Region anstelle von <i>fyuA</i> -Promotor	diese Arbeit
pGFP $irp2$	pCJFY5G3 mit <i>irp2</i> -Promotor Region anstelle von <i>fyuA</i> -Promotor	diese Arbeit
pGEX-4T-3	Amp ^r , <i>gst</i>	Pharmacia
pGEX $irp6$	pGEX-4T-3 mit <i>irp6</i> enthaltendem 8301Bam-6515Sma PCR-Produkt, Amp ^r	diese Arbeit
pGEX $irp7$	pGEX-4T-3 mit <i>irp7</i> enthaltendem 6509Bam-4727Sma PCR-Produkt, Amp ^r	diese Arbeit
pGEX $ybtA$	pGEX-4T-3 mit <i>ybtA</i> enthaltendem ybtAF-ybtAR PCR-Produkt, Amp ^r	Jacobi
pBR325	Klonierungsvektor, Amp ^r , Cm ^r , Tet ^r	Prentki <i>et al.</i> (1981)
pOF39	pBR325-Derivat mit <i>groEL</i> und <i>groES</i> , Amp ^r	Fayet <i>et al.</i> (1986)

2.3 Primer

Die Primer (entsalzt, lyophilisiert) wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Sie wurden in H₂O_{bidest} gelöst, so daß die Konzentration 100 pmol/µl beträgt.

Tab. 5: Verwendete Primer

Primer	5'-.....-3' Sequenz*	Beschreibung
8354Eco	TTT GAATTC CTGAATTGTCGCTTTTGGTG	Start von <i>irp6</i> mit <i>EcoRI</i> Seite, vorwärts
S360	CATTACGGGCTTTTCATCTG	in <i>irp6</i> , vorwärts
ybtA355	CTGACCCGAAAAACGAAGC	in <i>irp6</i> , vorwärts
ybtA380	AATGTCGCGCAGGCTCCAC	in <i>irp6</i> , rückwärts
ybtA6507	TCCGCAGGATTATTGTCTTTT	Ende von <i>irp6</i> , rückwärts
ybtA376	CGGCGATGCGGCGACAAATG	in <i>irp7</i> , vorwärts
irp7-4900	TCACCGTTTATCCACCATCG	in <i>irp7</i> , vorwärts
ybtA6451	CCTGACTGCCAACGCTGGAGA	in <i>irp7</i> , rückwärts
S452	CCCCGGCGATGGTGGATAAAC	in <i>irp7</i> , rückwärts
S368	AATCCCCCTTCTCGCCAAAC	in <i>irp8</i> , rückwärts
S156	TCTGCTGCTGCCGATTCTCC	in <i>irp8</i> , vorwärts
irp8Xba	GCAT CTAGAC GGTTATCAGGCGCTGTGGCAG	Start von <i>irp8</i> mit <i>XbaI</i> Seite, vorwärts
irp8Hind	CGC AAGCTT TCTGTGTTATTCCCGGATCA	Ende von <i>irp8</i> mit <i>HindIII</i> Seite, rückwärts
irp8Bam	AGC GGATCCT TCTGTTTATTCCCGGATCA	Ende von <i>irp8</i> mit <i>BamHI</i> Seite, rückwärts
C15-291	ACGGTGACATTTCCCTTTTC	in <i>irp9</i> , rückwärts
8301Bam	GTT GGATCC ATGTAATCTCAATCATC	Start von <i>irp6</i> mit <i>BamHI</i> Seite, vorwärts
6515Sma	AT CCCCGGGAT TATTGTCCTTTCATTTT	Ende von <i>irp6</i> mit <i>SmaI</i> Seite, rückwärts
4727Sma	TTT CCCCGGG TCACTCATGCACCCACTC	Ende von <i>irp7</i> mit <i>SmaI</i> Seite, rückwärts
6509Bam	TA AGGATCC ATGAAAGACAATAATCCTGCG	Start von <i>irp7</i> mit <i>BamHI</i> Seite, vorwärts
8621Hind	ATTT TAAGCTT TGACTCCGTCATGACTTGGT	<i>irp6</i> _{Y_{en}} -Promotor, vorwärts
8307Bam	ATTT GGATCCT TGAGATAACATGGGAGTAA	<i>irp6</i> _{Y_{en}} -Promotor, rückwärts
8621YpsHind	ATTT TAAGCTT TGACTCTGTCATGACCTGGT	<i>ybtP</i> _{Y_{ps}} -Promotor, vorwärts
8307YpsBam	ATTT GGATCCT TGAGATGACATGGGAGTAA	<i>ybtP</i> _{Y_{ps}} -Promotor, rückwärts
8307Hind	ATTT TAAGCTT TGAGATAACATGGGAGTAA	<i>ybtA</i> _{Y_{en}} -Promotor, vorwärts
8621Bam	ATTT GGATCCT TGACTCCGTCATGACTTGGT	<i>ybtA</i> _{Y_{en}} -Promotor, rückwärts
8307YpsHind	ATTT TAAGCTT TGAGATGACATGGGAGTAA	<i>ybtA</i> _{Y_{ps}} -Promotor, vorwärts
8621YpsBam	ATTT GGATCCT TGACTCTGTCATGACCTGGT	<i>ybtA</i> _{Y_{ps}} -Promotor, rückwärts
9585Hind	ATTT TAAGCTT CCTAAATTCCTCCCTGACAG	<i>irp2</i> -Promotor, vorwärts
9782Bam	ATTT GGATCC AGAAATCATTTTTCTCCTG	<i>irp2</i> -Promotor, rückwärts
ybtAF _{Eco}	ACGT GAATTC CATGACAGAGTCACCGCAA	Start von <i>ybtA</i> mit <i>EcoRI</i> Seite, vorwärts
ybtAR _{Xho}	GCCG CTCGAG TTACATCACGCGTTTAAAGG	Ende von <i>ybtA</i> mit <i>XhoI</i> Seite, rückwärts
ybtAR _{Hind}	GCCG AAGCTT TTACATCACGCGTTTAAAGG	Ende von <i>ybtA</i> mit <i>HindIII</i> Seite, rückwärts
aph157	CTCACCGAGGCAGTTCCATAG	in Kanamycinkassette
aph606	CGACCATCAAGCATTTTATCC	in Kanamycinkassette
YopP8+60F	GAGACCAGTTCTTTAATCAG	in <i>yopP</i> auf pYV-Plasmid, vorwärts
YopP9 500R	GCCAGTGCCAAACTAAAAAT	in <i>yopP</i> auf pYV-Plasmid, rückwärts

*Restriktionsschnittstellen sind dick gedruckt.

3. Nährmedien, Antibiotika, Anzucht und Stammhaltung

3.1 Nährmedien

Die Sterilisation der Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren (121°C, 1 bar, 20 min). Festmedium entstand durch Zugabe von 15 g Agar pro Liter Medium.

Luria-Bertani-(LB)-Medium 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 ad 1 L H₂O_{dest}
 pH 7,4 - 7,6 mit NaOH einstellen

Nutrient Broth-(NB)-Medium 8 g Nutrient Broth
 5 g NaCl
 ad 1 L H₂O_{dest}

NBD-Medium NB-Medium mit 200 µM Dipyrindyl (in 70% EtOH).
 (Dipyrindyl wird zur intrazellulären Komplexierung von Fe²⁺ zugesetzt.)

3.2 Antibiotika

Die Zugabe der sterilfiltrierten (0,22 µm) Antibiotika zum Medium erfolgte erst nach dem Autoklavieren (zum Agar bei einer Temperatur von ca. 50°C, zu Flüssigmedium erst kurz vor Verwendung).

Tab. 6: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Nalidixin	Nal	0,5 N NaOH	100	100
Ampicillin	Amp	H ₂ O _{dest}	100	100 (<i>E. coli</i>) 500 (<i>Yersinia</i>)
Kanamycin	Kan	H ₂ O _{dest}	50	50
Streptomycin	Sm	H ₂ O _{dest}	100	100
Chloramphenicol	Cm	70% Ethanol	20	20
Tetracyclin	Tet	70% Ethanol	15	15

3.3 Anzucht und Stammhaltung

Die Anzucht von *E. coli*/*Yersinia* erfolgte aerob bei 37°C/27°C. Flüssigkulturen wurden zur besseren Belüftung im Schüttelkolben inkubiert (100-200 rpm).

Die Bakterienstämme können auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsdruck ca. 6 Wochen bei 4°C gelagert werden. Zur Langzeit-Stammhaltung wurden die Bakterien in LB-Medium mit 10% Glycerin bei -80°C gelagert.

4. Molekulargenetische Arbeitsmethoden

4.1 Isolierung von chromosomaler DNS mit Qiagen Genomic-tip 100/G

Die Isolierung von bis zu 100 µg chromosomaler DNS erfolgte mit Qiagen Genomic-tip 100/G (Qiagen, Hilden) laut Anleitung des Herstellers. Alle benötigten Puffer und Lösungen werden vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert.

4.2 Isolierung von Plasmid-DNS

4.2.1 Plasmidisolierung durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979)

Mit Hilfe der alkalischen Lyse können nur kleine Mengen an Plasmid-DNS erhalten werden. Um sehr viele Klone gleichzeitig zu untersuchen, ist diese Methode bestens geeignet. Nach Lyse der Bakterien werden Zellreste, die chromosomale DNS und Proteine präzipitiert. Die Plasmid-DNS bleibt in Lösung und wird anschließend durch Ethanol-fällung aus der Lösung gewonnen.

Lösung 1 50 mM Glukose
 25 mM Tris
 10 mM EDTA
 pH 8,0 mit HCl einstellen und 10 min autoklavieren

Lösung 2 0,2 N NaOH
 1% (w/v) SDS
 aus Stammlösungen (2 N NaOH; 10% SDS) frisch herstellen

Lösung 3 60,0 ml Kaliumacetat (5 M)
 11,5 ml Eisessig
 28,5 ml H₂O_{bidest}
 frisch herstellen und kühlen

TE-Puffer 10 mM Tris
 1 mM EDTA
 pH 8,0 mit HCl einstellen

- 1 ml einer ÜN-Kultur abzentrifugieren (6000 rpm; 5 min)
- Zellpellet in 100 µl Lösung 1 vollständig resuspendieren
- 200 µl Lösung 2 zugeben, vorsichtig mischen und 5 min auf Eis inkubieren
- durch Zugabe von 150 µl Lösung 3 neutralisieren, wiederum vorsichtig mischen und 5 min auf Eis stellen
- 15 min bei 14000 rpm (4°C) zentrifugieren

- ÜS abheben, in neues ERG überführen und mit 2 Vol. EtOH_{abs} fällen (-20°C, 10 min)
- durch Zentrifugieren (14000 rpm, 10 min, 4°C) Plasmid-DNS pelletieren
- mit 1 ml 70% EtOH waschen und Pellet trocknen lassen
- Pellet in 20 µl TE-Puffer oder sterilem H₂O_{bidest} aufnehmen

4.2.2 Plasmidisolierung mit QIAprep Spin Miniprep Kit

Zur Gewinnung von kleinen Mengen (bis 20 µg) qualitativ hochwertiger Plasmid-DNS wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der alkalischen Lyse mit anschließender Anionenaustauschchromatographie. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller angegeben.

4.2.3 Plasmidisolierung mit Nucleobond AX100 Kit

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNS (bis 100 µg) wurde die DNS über Austauscher Säulen (AX100) der Firma Macherey-Nagel (Düren) aufgereinigt. Das Prinzip dieses Kits basiert ebenfalls auf alkalischer Lyse mit anschließender Reinigung über Anionenaustauschchromatographie. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller angegeben.

4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der spezifischen Vervielfältigung eines DNS-Abschnittes. Zunächst wird die DNS durch Erhitzen aufgeschmolzen (Denaturierung). Zwei einzelsträngige Primer binden dann spezifisch an die komplementäre einzelsträngige DNS (Annealing). Die thermostabile DNS-Polymerase verlängert in Gegenwart von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der DNS-Matrize (Elongation). Dies führt zu DNS-Doppelsträngen, die für die weitere Synthese erneut aufgeschmolzen werden müssen (Denaturierung). Diese drei Schritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) werden 30-35mal wiederholt und führen schließlich zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNS-Abschnittes. Am Ende erfolgt eine 7-minütige Elongation, um alle DNS-Stränge in voller Länge zu erhalten.

Die Vervielfältigung eines bestimmten DNS-Abschnittes erfolgte entweder aus einem Gesamtzelllysat von Bakterien oder aus isolierter DNS:

- Gesamtzelllysat: eine Kolonie wurde in 70 µl H₂O_{bidest} aufgekocht (10 min) und abzentrifugiert (3 min, 12000 rpm)
- isolierte DNS: 1:20 - 1:50 verdünnt

Reaktionsansatz	DNS		5 µl
	Primer 1 (100 µM)		1 µl
	Primer 2 (100 µM)		1 µl
	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (2 mM)		10 µl
	10x Taq-Reaktionspuffer		10 µl
	Taq-Polymerase		0,5 µl
	H ₂ O _{bidest}		ad 100 µl
Reaktionsprogramm	Denaturierung	94°C	5 min
	*Denaturierung	94°C	30 sec
	*Annealing	x°C	30 sec
	*Elongation	72°C	x min
	Elongation	72°C	7 min

*30-35 Zyklen

*Annealing erfolgte 2°C unter Schmelzpunkt der Primer (x°C)

*Elongation: 1 min pro 1 kb zu amplifizierende DNS (x min)

PCR-Produkte wurden zur Klonierung mit Hilfe des Qiagen PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

4.4 Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNS

4.4.1 Phenolextraktion

Die Phenolextraktion dient der Entfernung von störenden Proteinen aus DNS-Lösungen. Mit Hilfe der anschließenden Chisomextraktion werden Phenolreste aus der wässrigen DNS-Lösung entfernt.

Phenol Phenol ist zur Äquilibrierung mit TE (pH 8,0) überschichtet

Chisom Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1

- DNS-Lösung mit 1 Vol. Phenol:Chisom (1:1) versetzen und mischen
- 5 min bei 14000 rpm zentrifugieren, um die Phasen zu trennen
- untere phenolische Phase in frisches Gefäß überführen und eventuell verschleppte DNS-Reste mit 1 Vol. TE extrahieren (mischen, zentrifugieren)
- phenolische Phase verwerfen, obere Phase mit der wässrigen Phase der ersten Extraktion vereinen

- zweimal hintereinander wäßrige Phase mit 1 Vol. Chisom versetzen, mischen und zentrifugieren (14 000 rpm, 5 min)
- die DNS durch Ethanol-fällung (s. B.4.4.2.) aus der wäßrigen Phase isolieren

4.4.2 Ethanol-fällung

Die Ethanol-fällung dient der Entfernung unerwünschter Salze oder der Konzentrierung von DNS-Lösungen.

- DNS-Lösung mit $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Kaliumacetat (pH 5,2) aufsalzen und gut mischen
- 2 bis 3 Vol. EtOH_{abs} zugeben, mischen und 15 min bis 2 h bei -20°C inkubieren
- 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugieren
- ÜS verwerfen, Pellet mit 70% EtOH waschen und 5 min zentrifugieren (14000 rpm)
- Pellet etwa 10 min in der Vakuumzentrifuge oder länger an der Luft trocknen
- Pellet in TE oder H₂O_{bidest} aufnehmen und bei -20°C aufbewahren

4.4.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNS

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die DNS wurde in einer Quarzküvette (d = 1 cm) 1:20 - 1:100 mit H₂O_{bidest} verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O_{bidest} photometrisch bestimmt. Die Berechnung der Konzentration doppelsträngiger DNS erfolgte gemäß folgender Näherung:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Die Reinheitsbestimmung der DNS erfolgte durch Bildung des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀, da bei Verunreinigungen mit Protein die Absorption bei 280 nm erhöht wird. Der Absorptionskoeffizient OD₂₆₀/OD₂₈₀ nicht verunreinigter DNS liegt über 1,8.

4.5 Enzymatische Modifikation von DNS

4.5.1 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme vom Typ II erkennen spezifische - meist palindromische - Basensequenzen in einer DNS-Doppelhelix und schneiden die doppelsträngige DNS, so daß spezifische Fragmente mit definierten Enden entstehen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme stammten von den Firmen Roche (Mannheim) und Gibco (Eggenstein). Die Inkubationsbedingungen und Konzentrationen sind den Katalogen zu entnehmen.

Analytischer Ansatz	DNS-Lösung	x µl
	10x Inkubationspuffer	1 µl
	H ₂ O _{bidest} (steril)	ad 10 µl
	Restriktionsenzym	2-3 U/µg DNS
	Inkubation	2 h bei optimaler Temperatur

Die Glycerinmenge im Ansatz (Restriktionsenzyme werden in 50% Glycerin aufbewahrt) darf 5% nicht überschreiten, da sonst die Enzymaktivität gehemmt wird. Für präparative Zwecke wurde der Ansatz in größerem Volumen durchgeführt und mehrere Stunden inkubiert (zweite Enzymzugabe nötig!).

4.5.2 Dephosphorylierung von linearen DNS-Fragmenten

Die Behandlung von linearisierter Vektor-DNS mit Alkalischer Phosphatase (Dephosphorylierung) begünstigt die intermolekulare Ligation gegenüber der intramolekularen Ligation, da die Religation des Vektors verhindert wird.

Die Dephosphorylierung von DNS-Molekülen, d.h. die Entfernung der 5'-Phosphatreste an den Enden linearisierter DNS erfolgte unter Verwendung von Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) (Gibco, Eggenstein).

Nach Restriktionsverdau wurde eine Einheit CIAP in den Restriktionsansatz gegeben und bei der unten angegebenen Temperatur inkubiert.

- überhängende 3'-Enden und glatte Enden: 50°C, 5 min
- überhängende 5'-Enden: 37°C, 5 min

Die Entfernung der CIAP erfolgte durch präparative Agarose-Gelelektrophorese des dephosphorylierten Vektors und anschließender Gelextraktion (s. B.4.7.2).

4.5.3 Ligation linearer DNS-Moleküle

Mit Hilfe der T4-DNS-Ligase lassen sich kompatible überhängende oder glatte Enden kovalent verknüpfen. Das Enzym benötigt dafür 5'-phosphorylierte Enden und ATP als Kofaktor. T4-DNS-Ligase und Inkubationspuffer stammten von Gibco (Eggenstein).

Vektor und Insert wurden im molaren Verhältnis 1:3 mit 1/10 Vol. 10x Ligase-Puffer und 1U T4-DNS-Ligase für 12 bis 24 h bei 16°C inkubiert.

Es ist zu beachten, daß die Ligation in möglichst geringem Volumen durchgeführt werden sollte.

4.6 RNS-Isolierung und RT-PCR

Für die Isolierung von RNS und die nachfolgenden Schritte wurde RNase-freies Wasser verwendet. Zur Herstellung von RNase-freiem Wasser (DEPC-H₂O_{bidest}) wurde H₂O_{bidest} mit 0,1% DEPC (Diäthylpyrocarbonat, Sigma) versetzt, einen Tag bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert. DEPC modifiziert Histidinreste und bewirkt somit eine Inaktivierung von RNasen (Leonard *et al.*, 1970; Miles, 1977).

4.6.1 RNS-Isolierung mit dem RNeasy™ Total RNA Kit

RNS wurde mit Hilfe des RNeasy™ Total RNA Kits von Qiagen (Hilden) isoliert. Mit dieser Methode kann bis zu 100 µg Gesamt-RNS aus ca. 10⁹ Bakterien gewonnen werden. Nach Lyse der Zellen wird die RNS an die Silica-Matrix der Säule gebunden, gewaschen und anschließend mit DEPC-H₂O_{bidest} (40 µl) eluiert. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

4.6.2 DNase-Behandlung

Da nach der RNS-Isolierung noch DNS nachweisbar war, wurde die RNS einer DNase-Behandlung unterzogen. Die DNase-Behandlung erfolgte mit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Gibco, Eggenstein).

Ansatz	RNS	40 µl
	10 x DNase Reaktionspuffer	5 µl
	DNase	5 µl
Inkubation		15 min, RT
Zugabe von	25 mM EDTA (pH 8,0)	5 µl
Inkubation		10 min, 65°C

4.6.3 RT-PCR

Die Reverse Transkriptase synthetisiert mit Hilfe einer RNS-Matrize, einem Primer und dNTPs einen zur RNS komplementären DNS-Strang (cDNS). Die cDNS kann anschließend mittels PCR vervielfältigt werden.

Die Reverse Transkription erfolgte mit Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase von Gibco (Eggenstein) gemäß dem Protokoll. Als Kontrolle auf DNS-Kontamination diente ein Parallelansatz ohne Reverse Transkriptase (RT).

Ansatz	DNase behandelte RNS	8 µl
	Primer (10 pmol/µl)	0,2 µl
	DEPC-H ₂ O _{bidest}	ad 12 µl
Inkubation		10 min, 70°C kurz auf Eis
Zugabe von	5 x Erststrangpuffer	4 µl
	DTT (0,1 M)	2 µl
	dNTPs (10 mM)	1 µl
Inkubation		2 min, 42°C
Zugabe von	Reverser Transkriptase	1 µl
Inkubation		50 min, 42°C 15 min, 70°C

Die entstandene cDNS wurde anschließend mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden aus dem Reversen Transkriptionsansatz 2 µl in einen 20 µl-PCR-Ansatz eingesetzt (s. B.4.3)

4.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNS-Fragmenten und ihrer Größenbestimmung. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode. Hierbei erfolgt eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe. Die Wanderungsgeschwindigkeit der linearen DNS-Fragmente ist in erster Näherung invers proportional zu dem Logarithmus ihrer Molekularmasse.

Elektrophoresepuffer (1x TAE)	40 mM Tris/HCl, pH = 8,2 20 mM Eisessig 2 mM EDTA
10x Auftragspuffer	30% Glyzerin 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
Agarosegel	0,8 - 2% Agarose in 1x TAE
Ethidiumbromid-Färbebad	1 µg Ethidiumbromid pro ml H ₂ O _{dest}

4.7.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

- 0,7 - 2% Agarose in TAE-Puffer aufkochen, bis eine klare homogene Lösung entsteht.
- Lösung nach Abkühlen auf Handwärme in einen abgeklebten Gelschlitten mit den gewünschten Kämmen gießen und auf ebener Unterlage verfestigen lassen.
- Klebestreifen lösen, den Gelschlitten mit dem erstarrten Gel in eine Elektrophorese-Kammer einsetzen, mit 1x TAE-Puffer überschichten und Kamm ziehen.
- DNS-Proben 1:10 mit Auftragspuffer mischen und in die Geltaschen pipettieren.
- Elektrophorese bei einer Stromstärke von etwa 100-140 mA pro Gel durchführen.
- Gel etwa 10 bis 30 min im Ethidiumbromid-Färbebad inkubieren und anschließend 5 bis 10 min in H₂O_{dest} entfärben.
- Das in die doppelsträngige DNS eingelagerte Ethidiumbromid fluoresziert bei UV-Bestrahlung ($\lambda=302$ nm) mittels Transilluminator. Somit kann das Bandenmuster mittels Videophotoanlage dokumentiert werden.

4.7.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Prinzipiell erfolgt die präparative Gelelektrophorese wie unter B.4.7.1. beschrieben. Zu präparativen Zwecken werden mehrere Taschen abgeklebt, um eine größere DNS-Menge auftragen zu können. Die Gele werden nur sehr kurz gefärbt und die gewünschten Fragmente unter UV-Licht knapp ausgeschnitten.

Die Isolierung der DNS aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) gemäß der Anleitung des Herstellers.

4.7.3 Größenbestimmung von DNS-Fragmenten

Durch einen internen Standard im Gel kann die Größe linearer doppelsträngiger DNS-Moleküle bestimmt werden. Es wurden der 100 bp DNA Ladder von Gibco (Eggenstein) sowie der Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder von MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) verwendet. Außerdem wurde der selbsthergestellte λ /*Hind*III-Standard benutzt.

Herstellung des λ/<i>Hind</i>III-Standards	λ -DNS (0,25 mg/ml)	200 μ l
	10x Puffer	60 μ l
	<i>Hind</i> III (10 U/ μ l)	10 μ l
	H ₂ O _{bidest}	ad 600 μ l

3 h bei 37°C inkubieren und anschließend je 200 µl H₂O_{bidest} und Probenauftragspuffer zugeben. Assoziierte „cos-sites“ werden anschließend durch 5-minütige Inkubation bei 60°C getrennt. Lagerung als Aliquots bei -20°C (ein Aliquot zur Verwendung bei 4°C aufbewahren).

Tab. 7: Fragmentgrößen der verwendeten Standards

Fragmentgröße in bp		
100 bp DNA Ladder	1 kb DNA Ladder	λ/HindIII-Standard
2 072	10 000	23 130
1 500	8 000	9 416
1 400	6 000	6 557
1 300	5 000	4361
1 200	4 000	2 322
1 100	3 500	2 027
1 000	3 000	564
900	2 500	125
800	2 000	
700	1 500	
600	1 000	
500	750	
400	500	
300	250	
200		
100		

4.8 Southern-Blot-Hybridisierung (Southern, 1975; modifiziert)

Bei dieser Methode wird DNS, die vorher auf einem Agarosegel aufgetrennt wurde, auf eine Membran (Nylon) übertragen. Die DNS wird durch aufeinanderfolgende Säure- und Alkalibehandlung fragmentiert und denaturiert. Die einzelsträngigen DNS-Fragmente werden dann mittels Vakuumblot auf die positiv geladene Nylonmembran transferiert und mit UV-Licht fixiert. Anschließend erfolgt die Hybridisierung mit einer Sonde.

4.8.1 Herstellung einer DIG-markierten Sonde

DIG-markierte DNS-Sonden wurden nach der “random primed” Methode hergestellt. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms wird ca. alle 20-25 Nukleotide DIG-11-dUTP in die DNS eingebaut. dNTP Markierungsmix und Hexanukleotid Mix stammten von Roche (Mannheim).

Ansatz	DNS (10 ng - 3 µg)	10 min kochen, kurz auf Eis stellen
Zugabe von	Hexanukleotid Mix (10x)	2 µl
	dNTP Markierungsmix (10x)	2 µl
	Klenow Enzym (2U/µl)	1 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl
Inkubation		37°C, ÜN
Zugabe von	0,2 M EDTA (pH 8,0)	2 µl
	4 M LiCl	2 µl
	eiskaltem EtOH _{abs}	50 µl
Inkubation		-70°C, 30 min

Anschließend wurde zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 15 min), das Pellet mit eiskaltem 70% EtOH gewaschen und in 50 µl H₂O_{bidest} aufgenommen.

4.8.2 Vakuumblot

Depurinierungslösung	HCl	0,25 M
Denaturierungslösung	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
Neutralisierungslösung (pH 5,0)	Tris-HCl	1 M
	NaCl	2 M
20x SSC (pH 7,0)	Na ₃ -Citrat	0,3 M
	NaCl	3 M

- Die geschnittene chromosomale DNS wurde im Agarosegel (1%) aufgetrennt (40 V, ÜN) (s. B.4.7).
- Der DNS-Transfer erfolgte entsprechend der Anleitung mit der LKB 2016 Vacu Gene^R-Kammer der Firma Pharmacia-LKB (Uppsala, Schweden). Dabei wird zuerst Depurinierungslösung (30 min, 40 mbar), dann Denaturierungslösung (30 min, 50 mbar), Neutralisierungslösung (30 min, 50 mbar) und schließlich 20x SSC (2 h, 50 mbar) direkt auf das Gel pipettiert.
- Anschließend wurde die DNS auf der Nylonmembran mit UV-Licht (0,12 J/cm²) fixiert.

4.8.3 Hybridisierung und Detektion

Hybridisierungslösung	SSC	5 x
	SDS	0,02 %
	Blockierreagenz	1 %
	N-Lauroylsarcosin (Na-Salz)	0,1 %
Waschpuffer 1	SSC	2 x
	SDS	0,1 %
Waschpuffer 2	SSC	0,1 x
	SDS	0,1 %
Blockierungslösung	1% Blockierreagenz in Puffer 1	
Puffer 1 (pH 7,5)	Tris-HCl	100 mM
	NaCl	150 mM
Substratpuffer (pH 9,6)	NaCl	100 mM
	Tris-HCl	100 mM
	MgCl ₂	50 mM
Substratlösung	NBT (1mg/ml)	5 ml
	BCIP (5 mg/ml)	500 µl
	Substratpuffer	45 ml

- Der Blot wurde 1 h bei 68°C mit Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C ÜN mit der entsprechenden DIG-markierten Sonde. Die Membran wurde 2mal 15 min mit Waschpuffer 1 bei RT, danach 2mal 30 min mit Waschpuffer 2 bei 68°C gewaschen.
- Die Membran wurde 1 h mit Blockierungslösung inkubiert und anschließend mit Puffer 1 kurz gewaschen. Dann wurde ein Anti-Digoxigenin Antikörper konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim) 1:5000 verdünnt für 30 min zugegeben und die Membran anschließend 2mal 15 min mit Puffer 1 gewaschen.
- Die Entwicklung des Blots erfolgte mit Substratlösung bei 37°C und in Dunkelheit. Nach Erscheinen der Banden wurde die Reaktion mit Wasser beendet.

4.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit dem Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die gelelektrophoretische DNS-Auftrennung, Sequenzeingabe und Speicherung erfolgte mit dem ABI 377 DNA Sequencer (ABI Prism, Applied Biosystems) und mit Unterstützung der ANALYSIS-Software. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Chromas- und DNAMAN-Software analysiert.

Ansatz	Plasmid-DNS	500 ng
	Primer	5 pmol
	Big Dye	4 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl
Programm (25 Zyklen)	96°C	10 sec
	50°C	5 sec
	60°C	4 min

Der Sequenzieransatz wurde anschließend einer Ethanol-fällung unterzogen (s. B.4.4.2, aber Fällung für 10 min auf Eis, zentrifugieren bei 15°C).

4.10 Transfer von DNS

4.10.1 Elektroporation

Kurze elektrische Pulse bewirken vermutlich die vorübergehende Entstehung von Poren in der Zellmembran, so daß die DNS-Moleküle in das Zellinnere gelangen können.

Herstellung kompetenter Zellen (Hanahan, 1983, modifiziert)

- 100 ml LB mit 1 ml einer ÜN-Kultur animpfen und bei 37/27°C (*E. coli/Yersinia*) schütteln, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht ist

Alle folgenden Schritte müssen auf Eis und steril durchgeführt werden:

- Bakteriensuspension 10-15 min auf Eis abkühlen
- Ernte der Zellen in sterilen Zentrifugenbechern: 5000 rpm, 10 min, 4°C
- 2mal Waschen der Zellen mit je 100 ml eiskaltem H₂O_{dest}
- Waschen der Zellen mit 10 ml eiskaltem 10% Glycerin
- Volumen des Pellets schätzen und in 1 Vol. 10% Glycerin resuspendieren
- Lagerung der Zellen in 50 µl Aliquots bei -80°C

Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

SOC-Medium	Caseinpepton	2,0 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glukose	20 mM

pH 7,0 mit HCl einstellen

- Zellen auf Eis auftauen lassen, mit Plasmid-DNS (in H₂O_{bidest}) mischen und in Elektroporationsküvette pipettieren
- Elektroporationsbedingungen: Spannung 2500 V, Widerstand 200 Ω, Kapazität 25 μF; (optimale Entladungszeit: 5,0 msec)
- nach dem Pulsen sofortige Zugabe von 1 ml SOC-Medium
- 1 h bei 37°C/27°C (*E. coli*/*Yersinia*) schütteln
- ausplattieren auf LB-Platten mit Selektionsdruck

4.10.2 Konjugation (Achtman *et al.*, 1978)

Durch die Konjugation wird mobilisierbare Plasmid-DNS von einem Spenderbakterium (Donor) auf ein Empfängerbakterium (Rezipient) übertragen. Dabei ist die Anwesenheit von Transfergenen, die entweder auf dem Chromosom des Donors (z.B. S17-1λ*pir*, Sm10λ*pir*) oder auf einem Helferplasmid (pRK2013) lokalisiert sind, Voraussetzung.

Herstellung von Mutanten

E. coli Donor (S17-1λ*pir* oder Sm10λ*pir* mit mobilisierbarem Suizidvektor) und *Y. enterocolitica* Rezipient wurden in LB-Medium angezogen. 1 ml Donor-Kultur wurde in der exponentiellen Phase und 1 ml Rezipienten-Kultur in der stationären Phase geerntet. Die Kulturen wurden vermischt, abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm), das Pellet in 100 μl 0,85% NaCl resuspendiert und auf eine Blutagarplatte getropft. Die Konjugation erfolgte für 24 h bei optimaler Temperatur für den Donor (37°C).

Konjugation des Kointegrates pRK290B8-5::pO:8

E. coli Donor HB101 (pRK290B8-5::pO:8), *E. coli* Helfer HB101 (pRK2013) und *Y. enterocolitica* Rezipient wurden in LB-Medium angezogen. 1 ml Donor-Kultur wurde in der exponentiellen Phase, 1 ml Rezipienten-Kultur und 0,5 ml Helfer-Kultur in der stationären

Phase geerntet. Die Kulturen wurden vermischt, abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm), das Pellet in 100 µl 0,85% NaCl resuspendiert und auf eine Blutagarplatte getropft. Die Konjugation erfolgte für 24 h bei 27°C.

Eine Impföse des jeweiligen Bakteriengemisches wurde von Blutagarplatte abgekratzt, in 1 ml 0,85% NaCl resuspendiert und davon 100 µl auf antibiotikahaltige LB-Platten ausplattiert, um auf konjugierte Rezipienten zu selektionieren.

5. Herstellung von Mutanten durch homologe Rekombination

5.1 Herstellung von Deletionsmutanten mit Hilfe des Suizidvektors pKNG101

Der Suizidvektor pKNG101 besitzt eine Streptomycin (Sm)-Resistenz (*strAB*), einen π -abhängigen R6K Replikationsstart und die Gene *sacAB* aus *Bacillus subtilis*, die bei Gram-negativen Bakterien zu Saccharose (Suc)-Sensitivität führen (Kaniga *et al.*, 1991). Integration des Suizidvektors ins Chromosom (einfaches cross-over) führt zu Sm-Resistenz und Suc-Sensitivität. Doppeltes cross-over führt dagegen zur Exzision des Vektors und somit zu Sm-Sensitivität und Suc-Resistenz.

Die Suizidvektoren mit der gewünschten Deletion wurden in *E. coli* SM10 λ *pir* transformiert (s. B.4.10.1) und anschließend in *Y. enterocolitica* O:8, Stamm WA-C (Nal^r) konjugiert (s. B.4.10.2). Die Bakterien wurden auf Nal- und Sm-haltige Platten ausplattiert, um auf Konjuganten zu selektionieren, die den gesamten Suizidvektor integriert haben (einfaches cross-over). Sm-resistente Klone wurden dann auf LB-Platten mit 5% Saccharose ausgestrichen, um Konjuganten mit doppeltem cross-over (Exzision des Vektors) zu erhalten. Die Klone wurden mit PCR (s. B.4.3) und Southern-Blot (s. B.4.8) auf Exzision des Vektors und Deletion des gewünschten Fragments überprüft.

5.2 Herstellung von Insertionsmutanten mit Hilfe des Suizidvektors pKAS32

Zur Herstellung von Mutanten durch Insertion einer Kanamycinkassette (ohne transkriptionellen Terminator; Galan *et al.*, 1992) wurde der Suizidvektor pKAS32 verwendet (Skorupski & Taylor, 1996). Dieser enthält eine Ampicillin (Amp)-Resistenz, einen π -Protein-abhängigen R6K Replikationsstart und das *rpsL*-Gen, das für die ribosomale S12 Untereinheit kodiert und bei einem Sm-resistenten Stamm Sm-Sensitivität bewirkt (dominantes Allel). Für die Selektion Sm-resistenter Stämme (WA-CS, WA-CS Δ *irp6,irp7*), wurde die entsprechende Yersinie (WA-C, WA-C Δ *irp6,irp7*) zunächst in LB-Medium mit einer Sm-Konzentration von

10 µg/ml angezogen und stufenweise in LB-Medium mit einer Sm-Konzentration von 20, 50 und 100 µg/ml überführt. Insertion des Suizidvektors - mit der Kanamycinkassette - ins Chromosom eines Sm-resistenten Stammes führt zu Kanamycin- (Kan-) Resistenz und Sm-Sensitivität (einfaches cross-over). Ein Kan-resistenter und Sm-resistenter Phänotyp entsteht nach alledem Austausch und Exzision des Vektors (doppeltes cross-over).

Die Suizidvektoren mit der gewünschten Insertion (Kanamycinkassette) wurden in *E. coli* S17-1 λ pir transformiert (s. B.4.10.1) und anschließend in Sm-resistente *Y. enterocolitica* O:8 Stämme (WA-CS, WA-CS Δ irp6,irp7) konjugiert (s. B.4.10.2). Die Mutanten wurden auf Kan-, Sm- und Nal-haltigen LB-Platten selektioniert und mit PCR (s. B.4.3) und Southern-Blot (s. B.4.8) auf korrekte Insertion der Kanamycinkassette und Exzision des Vektors überprüft.

6. Nachweis der Yersiniabaktinsynthese und -aufnahme

6.1 Isolierung von Kulturüberständen

Die Bakterien wurden in 10 ml antibiotikahaltigem NB-Medium angezogen, nach 24 h abzentrifugiert, mit 0,85% NaCl gewaschen und in 20 ml NBD-Medium (ohne Antibiotika) aufgenommen. Nach 24 h Inkubation wurden die Bakterien abzentrifugiert und der Kulturüberstand sterilfiltriert.

6.2 Fütterungstest auf CDM-H-Agar (Flossman *et al.*, 1985)

Die Bakterien wurden in den eisenarmen CDM-H-Agar eingegossen und mit Kulturüberständen, Yersiniabaktin und Desferrioxamin (aufgetragen auf Filterplättchen) gefüttert.

Lösung A

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	32,3 g
KH ₂ PO ₄	1,36 g
NaCl	1,19 g
Glukose	6,00 g
L-Cystein Hydrochlorid	0,12 g
L-Isoleucin	0,065 g
L-Leucin	0,065 g
L-Phenylalanin	0,095 g
L-Glutaminsäure	0,15 g
L-Arginin	0,20 g
L-Serin	0,20 g
H ₂ O _{dest}	ad 200 ml
	pH 7,2-7,4

Lösung B	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25 g
	L-Asparaginsäure	1,6 g
	L-Tyrosin	0,09 g
	H ₂ O _{dest}	ad 600 ml
		pH 7,2-7,4
Vitaminlösung	Vitamin B5	40 mg
	Nikotinamid	100 mg
	Vitamin B1	2 mg
	Orotsäure	30 mg
	H ₂ O _{dest}	ad 20 ml
Agar	10 g Agar in 200 ml H ₂ O _{dest}	
Hefeextrakt	25 g in 100 ml H ₂ O _{dest}	
EDDHA (Ethylendiamin- di(o-hydroxyphenyllessigsäure))	1 g in 40 ml H ₂ O _{dest} (anlösen mit etwas 1N NaOH)	

Lösungen A und B, Vitaminlösung und EDDHA wurden sterilfiltriert, Agar und Hefeextrakt autoklaviert.

Für 100 ml CDM-H-Agar wurden 20 ml Lösung A, 60 ml Lösung B, 2 ml Hefeextrakt, 200 µl Vitaminlösung und 58,5 µl der EDDHA-Lösung zusammengegeben und auf 50°C erwärmt. Anschließend wurden 20 ml Agar (aufgekocht und auf 50°C abgekühlt) dazugegeben.

20 µl einer Bakterienkultur (OD₆₀₀ 1,0) wurden in 12 ml 50°C warmen CDM-H-Agar gegeben, gut gemischt und in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurden Filterplättchen aufgelegt, die zuvor mit 3 µl gereinigtem Yersiniabaktin (3 mM) (Reissbrodt, Wernigerode), 3 µl Desferrioxamin (5mM) (Sigma, Deisenhofen) oder 10 µl Kulturüberständen (s. B.6.1) getränkt wurden. Die Platten wurden ÜN bei 27°C (*Yersinia*) bzw. 37°C (*E. coli*) inkubiert und am nächsten Tag mit 1% Triphenyltetrazoliumchlorid- (TTC-) Lösung gefärbt.

6.3 Siderophordetektion auf CAS-Agar (Schwyn & Neilands, 1987)

Der blaugrüne CAS-Agar dient der Detektion von siderophorproduzierenden Bakterien. An Chromazurol S gebundenes Eisen wird durch Siderophore aus diesem Komplex entfernt, was zu einem orangen Hof um die Bakterienkolonie führt.

CAS-Stammlösung

60,5 mg Chromazurol S (CAS) in 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ lösen. Hierzu wurden 10 ml einer 1 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ Lösung gegeben. Das Gemisch wurde in eine Lösung von 72,9 mg Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HDTMA) in 40 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gerührt. Diese ca. 100 ml CAS-Stammlösung wurden autoklaviert.

10x MM9-Medium

In 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ wurden 0,3 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl und 1,0 g NH_4Cl gelöst und anschließend autoklaviert.

10x LB-Medium

In 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ wurden 10g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl gelöst und anschließend autoklaviert.

Pipes-Agar

In 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ wurden 100 ml 10x MM9-Medium und 15 g Agar gegeben. Unter ständigem Rühren wurden 31,1 g Piperazidinesulfonsäure (PIPES) hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 4 N NaOH auf pH 6,8 eingestellt und das Volumen durch Zugabe von $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 850 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der Agar autoklaviert.

Nach Abkühlen des Pipes-Agar auf 50°C wurden unter sterilen Bedingungen 30 ml 10x LB-Medium, 10 ml 20% Glukose, 2 ml 1 M MgSO_4 , 2 ml 1 M Na_2SO_4 -Lösung, 1 ml 0,1 M CaCl_2 und 100 ml der CAS-Stammlösung eingerührt und sofort in Petrischalen gegossen.

6.4 Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz

Um Expressionsstudien durchzuführen, wurde das Gen für das "green fluorescent protein" (GFP) als Reportergen verwendet und hinter verschiedene Promotoren kloniert (Jacobi *et al.*, 1998). Die Expression von *gfp* in der Zelle führt zu einer grünen Fluoreszenz, die mit Hilfe des Coulter Epics Flow Cytometer gemessen werden kann. Der Argon Laser erzeugt einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm, so daß GFP effizient angeregt werden kann.

Die Bakterien wurden ÜN in NB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angezogen. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 1:50 in NB-, NBD- oder NBD-Medium mit Kulturüberständen (1:50 verdünnt) überimpft. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die

durchschnittliche GFP-Fluoreszenz von 10 000 Einzelbakterien pro Versuchsansatz (100 µl Kultur in 2 ml PBS) gemessen. Die Bakterien wurden mit dem *site scatter* Modus detektiert, die Auswertung erfolgte über eine logarithmische Skala.

6.5 Detektion der HMWPs (High Molecular Weight Proteins) (Pelludat *et al.*, 1998)

Die zu untersuchenden Stämme wurden 24 h in NB-Medium angezogen, abzentrifugiert, mit 0,85% NaCl gewaschen und in der doppelten Menge NBD-Medium resuspendiert. Nach 48 h wurde die OD₆₀₀ gemessen und die Bakterien abzentrifugiert. Das Pellet von 1 ml einer Kultur mit OD₆₀₀ 1,0 wurde in 50 µl Probenpuffer aufgekocht. 10 µl davon wurden auf ein SDS-PAA-Gel (7,5%) aufgetragen (s. B.9.1) und mit Roti[®]-Blue (Roth, Karlsruhe) laut Anleitung gefärbt.

7. Pestizinassay

Der Pestizin-produzierende Stamm *Y. pestis* EV76 wurde ÜN bei 27°C angezogen. Die Pestizinsynthese wurde durch Zugabe von 0,3 µg/ml Mitomycin C induziert und die Zellen weitere 16 h bei 27°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Kulturüberstand mit 0,1 % Chloroform sterilisiert und als Pestizin-haltiger Extrakt im Pestizinassay eingesetzt (Hu *et al.*, 1972).

Der Pestizinassay erfolgte mittels der “double agar layer” Technik (Heesemann *et al.*, 1993). 50 µl einer in NB-Medium gewachsenen Bakterienkultur (OD₆₀₀ ca. 0,5) wurden in 5 ml 50°C warmen 0,6% Agar gegeben, gut gemischt und auf CDM-H Agarplatten ohne EDDHA (s. B.6.2) gegossen. 20 µl des Pestizin-haltigen Extrakts wurden auf die Platten aufgetropft und die Platten 16 h bei 37°C inkubiert. Lysehöfe wurden durch Färbung mit 1% Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung hervorgehoben.

8. Mausversuch

Da die zu testenden *Y. enterocolitica* Stämme (WA-C und Derivate) kein Virulenzplasmid besitzen, wurde das Kointegrat pRK290B8-5::pO:8 (bestehend aus Vektor pRK290B8-5 und Virulenzplasmid pYVO:8 von *Y. enterocolitica* O:8) (Heesemann & Laufs, 1983) mit Hilfe des Helferplasmids pRK2013 in diese Stämme konjugiert. Dazu wurde eine Konjugation mit *E. coli* HB101 (pRK2013), *E. coli* HB101 (pRK290B8-5::pO:8) und den verschiedenen Rezipienten (WA-C, WA-C Δ *irp6,irp7*, WA-CS und WA-CS *irp8*::Kan^r) angesetzt (s. B.4.10.2). Die Exkonjuganten wurden auf die Anwesenheit des pYV-Plasmids untersucht

und einer Mauspassage unterzogen. Anschließend konnte der Infektionsversuch mit 6-8 Wochen alten, weiblichen BALB/c Mäusen stattfinden.

8.1 Nachweis des pYV-Plasmids

Der Nachweis des pYV-Plasmids erfolgte mittels PCR (s. B.4.3) mit Primern (YopP8+60F und YopP9 500R), die in einem Gen (*yopP*), das auf dem pYV-Plasmid kodiert ist, binden. Außerdem wurde das Vorhandensein des pYV-Plasmids mit dem Agglutinationstest (Test auf YadA) und dem Nachweis der sekretierten Proteine (Yops) bestätigt.

8.1.1 Agglutinationstest

YadA ist ein Oberflächenantigen, das auf dem pYV-Plasmid liegt und bei 37°C exprimiert wird. Die Zugabe von Kaninchen YadA-Antiserum zu YadA exprimierenden Yersinien führt zur Agglutination der Bakterien. Die zu untersuchenden Bakterien wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen, ÜN bei 27°C angezogen und anschließend 4-6 h bei 37°C inkubiert. Eine Kolonie wurde abgenommen und mit 10 µl des YadA-Antiserums auf einem Objektträger verrieben und das Agglutinieren der Zellen beobachtet. Als Positivkontrolle diente WA-P, als Negativkontrolle WA-C.

8.1.2 Nachweis der sekretierten Proteine (Yops)

Da die *Yersinia* Outer Proteins (Yops) auf dem pYV-Plasmid kodiert sind, ist der Nachweis dieser Proteine ein Beweis für die Anwesenheit des pYV-Plasmids. Die Sekretion der Yops wird in Brain-Heart-Infusion- (BHI-) Medium durch EGTA (Ca²⁺-Entzug) und bei 37°C induziert (Heesemann *et al.*, 1986). Nach Fällung der sekretierten Proteine werden diese in der SDS-PAGE nachgewiesen.

BHI-Medium	37 g BHI pro Liter
EGTA (Ethylenglykol- bis (2-aminoethyl)-tetraessigsäure)	0,5 M
Glukose	20%
MgCl₂	1,5 M

- Bakterien ÜN bei 27°C in BHI-Medium anziehen
- 40 ml BHI-Medium mit 1 ml ÜN-Kultur animpfen und 90 min bei 37°C schütteln
- 5 mM EGTA, 0,2% Glukose und 15 mM MgCl₂ zugeben und 2 h bei 37°C inkubieren
- zentrifugieren (6000 rpm, 10 min, 4°C)

- ÜS mit 10% Trichloressigsäure versetzen, 1h auf Eis inkubieren und zentrifugieren (15000 rpm, 30 min, 4°C)
- Pellet in 1 ml eiskaltem Aceton resuspendieren, 15 min auf Eis inkubieren und erneut zentrifugieren (15000 rpm, 10 min, 4°C)
- Pellet 3mal mit 1 ml eiskaltem Aceton waschen
- Pellet ÜN in Aceton bei -20°C inkubieren und erneut zentrifugieren (15000 rpm, 10 min, 4°C)
- Pellet in 1 ml eiskaltem H₂O_{bidest} aufnehmen, zentrifugieren (15000 rpm, 10 min, 4°C) und ÜS vorsichtig abnehmen
- Pellet in 50 µl H₂O_{bidest} resuspendieren
- 10 µl davon mit 10 µl Probenpuffer mischen und auf SDS-PAGE (s. B.9.1) auftragen

8.2 Mauspassage

10⁷ Bakterien der zu untersuchenden Stämme wurden intraperitoneal (i.p.) in die BALB/c Maus gespritzt. Nach 24 h wurde die Maus getötet und ihr Bauchraum mit 4 ml einer 0,5% BSA-, 0,5% Tergitol-PBS Lösung ausgespült. Diese Lavage wurde auf antibiotikahaltige LB-Platten ausplattiert. Die gewachsenen Yersinien wurden auf die Anwesenheit des pYV-Plasmids (s. B..8.1) und Dissoziation des Kointegrates (Tetracyclin-Sensitivität) hin untersucht. Frisches antibiotikahaltiges Medium wurde 1:20 mit einer mauspassagierten ÜN-Kultur beimpft, nach 3 h wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4°C) und in der gleichen Menge LB-Medium mit 10% Glyzerin resuspendiert. 1 ml Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

8.3 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden vor und nach Einfrieren der Zellen je 2 mal 1 ml abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4°C), in 0,85% NaCl-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt und die Pellets anschließend in 1 ml 0,85% NaCl-Lösung resuspendiert. Die Bakterienzahl wurde durch das Ausplattieren entsprechender Verdünnungen bestimmt.

8.4 Infektionsversuch

5 x 10⁶ (ca. 1000-fache LD₅₀ des Wildtypstammes WA-314) mauspassagierte pYV-Plasmidhaltige Bakterien wurden intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene injiziert. 2 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet, Leber und Milz aseptisch entnommen. Die Organe wurden in 0,5% BSA-, 0,5% Tergitol-PBS Lösung homogenisiert (Leber: 5 ml, Milz: 1 ml),

verdünnt und auf antibiotikahaltige LB-Platten ausplattiert (Doppelbestimmung). Nach 48 h Inkubation bei 27°C wurden die Kolonien ausgezählt und die Gesamtkeimzahl der Organe errechnet.

9. Proteinbiochemische Arbeitstechniken

9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine hauptsächlich aufgrund ihrer Molekularmasse trennen. Durch Zugabe von SDS und β -Mercaptoethanol werden Proteine denaturiert und gegebenenfalls in ihre Untereinheiten zerlegt. Die SDS-Anionen binden stöchiometrisch an die Polypeptide und versehen diese dadurch mit einer negativen Ladung, die der Masse des Proteins proportional ist. Je nach Molekularmasse wandern die somit stark negativ geladenen Proteine - unabhängig von der ursprünglichen Ladung und Konformation des nativen Proteins - unterschiedlich schnell zur Anode. Die aufgetrennten Proteine werden durch Bindung von Coomassie-Farbstoff als blaue Banden im Gel sichtbar gemacht. Die Molekularmassen können anhand eines Größenstandards ermittelt werden.

Acrylamid-Stammlösung	Acrylamid	30% (w/v)
	Bisacrylamid	0,8% (w/v)
Trenngel-Stammlösung	Tris-HCl	1,5 M, pH 8,8
Sammelgel-Stammlösung	Tris-HCl	0,5 M, pH 6,8
SDS		10% (w/v)
APS (Ammoniumpersulfat)		10% (w/v)
TEMED (N, N, N',N'-Tetramethylendiamin)		
10x Elektrophoresepuffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	SDS	10,0 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
4x Probenpuffer (pH 6,8)	Tris	0,4 g
	SDS	1,2 g
	Glyzerin	7,5 ml
	β -Mercaptoethanol	2,5 ml
	Bromphenolblau (2% Lösung)	0,5 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 50 ml

Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R-250	1,5 g
	Methanol	455 ml
	Eisessig	80 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
Entfärbelösung	Methanol	250 ml
	Eisessig	350 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 5000 ml

Herstellung der Gele:

- Glasplatten und Spacer reinigen (H₂O_{bidest} und 96% EtOH) und in den Gießstand einsetzen.
- Trenngel zusammenpipettieren (s. Tab. 8) und zwischen die Glasplatten gießen (bis etwa 2 cm unter die Oberkante der kleineren Platte).
- Bis zum Rand mit H₂O_{bidest} überschichten und etwa 1 h polymerisieren lassen.
- H₂O_{bidest} abgießen und Reste mit saugfähigem Papier entfernen.
- Sammelgel einfüllen und den sauberen Kamm luftblasenfrei einsetzen.
- Nach etwa 30 min ist die Polymerisation abgeschlossen und die Gele können verwendet werden (oder vor Austrocknung geschützt bei 4°C etwa eine Woche aufbewahrt werden).

Tab. 8 : Pipettierschema für zwei SDS-Polyacrylamid-Gele

	Trenngel (10%)	Sammelgel (3%)
Acrylamid-Stammlösung	4,0 ml	0,3 ml
Trenngel-Stammlösung	3,0 ml	-
Sammelgel-Stammlösung	-	0,75 ml
SDS	120 µl	30 µl
H₂O_{bidest}	5,0 ml	1,95 ml
TEMED	5 µl	5 µl
APS	60 µl	20 µl

Elektrophorese:

- Proben mit Probenpuffer mischen und 5 min bei 95°C denaturieren.
- Gele in die Apparatur einsetzen, Kathoden- und Anodenraum mit 1x Elektrophoresepuffer befüllen.
- Kamm vorsichtig herausziehen und Proteinproben einpipettieren. Je nach Anzahl der Taschen können etwa 10 µl (15 Taschen) oder 30 µl (10 Taschen) aufgetragen werden.
- Proben bei etwa 20 mA durch das Sammelgel laufen lassen und sobald sich scharfe Linien an der Oberkante des Trenngels zeigen, die Stromstärke auf etwa 50 mA erhöhen (Angaben beziehen sich auf ein Gel).

Coomassie-Färbung der Proteinbanden:

- Gel nach der Elektrophorese 30 min in Coomassie-Lösung schwenken.
- Färbelösung abgießen (mehrfach verwendbar), das Gel mit Wasser abspülen und 2 bis 3 Stunden bei 60°C oder ÜN bei ca. 30°C in Entfärbelösung schwenken.
- Zur Konservierung wird das Gel unter Vakuum bei 80°C etwa 1 h getrocknet (Slab Gel Dryer; Biorad).

Molekularmassenbestimmung

Als Standards wurden der Benchmark™ Protein Ladder und der Benchmark™ Prestained Protein Ladder von Gibco (Eggenstein) verwendet.

9.2 Immunoblot (Western-Blot) (Towbin *et al.*, 1979)

Der Immunoblot erlaubt die Detektion von Proteinen, die spezifisch mit einem Antikörper reagieren (Antikörper-Antigen Reaktion). Dabei erfolgt zunächst die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE mit anschließendem Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran. Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Proteinen (Blockierung) wird die Membran mit dem ersten Antikörper inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten erfolgt die Inkubation mit einem zweiten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Der zweite Antikörper ist an Peroxidase oder Alkalische Phosphatase gekoppelt, so daß ein spezifischer Nachweis nach Inkubation mit dem entsprechenden Substrat möglich ist.

1x Western-Blot Puffer

25 mM Tris
190 mM Glycin

Waschpuffer

0,5 % Tween 20 (v/v) in 1x PBS

Blockierungslösung

5 % BSA (w/v) in Waschpuffer

- Nach Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch in einer Minigel Blotting Kammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer erfolgte in 1x Western-Blot Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA für 1h.
- Die Membran wurde für 1 h bei RT oder ÜN im Kühlschrank in Blockierungslösung inkubiert und anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen.
- Anschließend wurde die Membran für 1,5 h mit einem gegen das gewünschte Protein gerichteten Antikörper (Ak) inkubiert und dreimal gewaschen.

- Dann wurde die Membran mit einem zweiten an Peroxidase (POD) oder Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Antikörper (1:5000), der gegen den ersten gerichtet ist, ebenfalls für 1,5 h inkubiert und dreimal gewaschen.
- Die Detektion der Peroxidase erfolgte mit dem ECL Kit (Amersham Pharmacia) und die Detektion der Alkalischen Phosphatase mit dem BCIP/NBT-Blue Liquid Substrate System (Sigma).

Tab. 9: Verwendete Antikörper

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Herkunft
Ziege-anti-GST	-	1:10000	Amersham Pharmacia, Freiburg
Kaninchen-anti-Ziege IgG	AP	1:5000	Sigma, Deisenhofen
Maus-anti- <i>Yersinia</i> -HSP60-O3-mAk (13D5)	-	1:1000	D. Pieridou, Würzburg
Ziege-anti-Maus IgG	POD	1:3000	Sigma, Deisenhofen
Esel-anti-Kaninchen IgG	POD	1:5000	Amersham Pharmacia, Freiburg

9.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Protein-Assay von BioRad. Der in saurer Lösung negativ geladene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bindet an positive Aminogruppen von Polypeptiden. Durch die Bindung an das Protein wird die rotbraune Leukoform in die intensiv blau gefärbte Form des Farbstoffes überführt, deren Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt.

Es wurde das Microassay Verfahren laut Anleitung durchgeführt und eine Eichgerade mit 1 bis 25 µg Protein (BSA) aufgestellt. Die Proteinkonzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Protein } [\mu\text{g}] = (\text{OD}_{595} - b) \times 1/m$$

m: Steigung der Eichgerade
b: Achsenabschnitt

9.4 Gewinnung und Reinigung von Proteinen

9.4.1 Anzucht und Induktion der Bakterien

E. coli BL21 oder CAG9294 mit pGEX_{ytA} wurde bei 37°C ÜN in LB-Medium mit Ampicillin angezogen. Die ÜN-Kultur wurde dann 1:100 verdünnt (LB-Medium mit Ampicillin) und bei 27°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 wurde mit 0,2 mM IPTG induziert. Nach 3-stündiger Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4°C) und das Pellet in PBS aufgenommen.

9.4.2 Präparation des Zellextrakts

Die Bakteriensuspension wurde mit 1 mM PMSF und 100 µg/ml Lysozym versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluß in der French Pressure Cell mit 1000 psi (3mal). Die unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation (15000 rpm, 30 min, 4°C) pelletiert. Der ÜS (lösliche Fraktion) wurde sterilfiltriert, um störende Partikel zu entfernen.

9.4.3 Reinigung von Gst-Fusionsproteinen

Die lösliche Fraktion mit dem Gst-Fusionsprotein wurde mit Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) gereinigt. Gst-Fusionsproteine binden unter geeigneten Bedingungen spezifisch an die Glutathion-Sepharose und können durch lösliches Glutathion im Elutionspuffer wieder von der Gelmatrix entfernt werden. Unspezifisch gebundene Proteine können zuvor durch Waschen mit PBS entfernt werden. Die Reinigung erfolgte im Batch-Verfahren laut Anleitung (Pharmacia).

9.4.4 Präparation von inclusion bodies

Die Überexpression rekombinanter Proteine im Zytosol kann zur Bildung von Protein-Aggregaten (inclusion bodies) führen. Diese lassen sich durch Zentrifugation leicht vom Bakterienlysat (lösliche Fraktion) abtrennen und finden sich dann nach Aufschluß mit der French press in der unlöslichen Fraktion (s. B.9.4.2). Durch anschließende Waschschriffe werden die inclusion bodies von anhaftenden, kontaminierenden Proteinen und Membranfragmenten gereinigt.

Waschpuffer I	50 mM Tris 60 mM EDTA 1,5 M NaCl 6% Triton-X100 pH 7,2
----------------------	--

Waschpuffer II	50 mM Tris 60 mM EDTA pH 7,2
-----------------------	------------------------------------

Das Pellet nach French press und Zentrifugation in 10 ml Waschpuffer I (pro 1 L Kultur) aufnehmen, 1 h bei RT unter Rotation inkubieren und zentrifugieren (15000 rpm, 20 min, 4°C). Waschschriffe einmal mit Waschpuffer I und dreimal mit Waschpuffer II wiederholen.

9.4.5 Präparative SDS-PAGE, Elektroelution und Proteinfällung

9.4.5.1 Präparative SDS-PAGE

Das Protein wurde mit Probenpuffer aufgekocht und auf ein präparatives SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das präparative Gel besitzt eine große Tasche für die Probe und eine kleine Tasche für den Marker. Die Durchführung erfolgte wie unter B.9.1 beschrieben. Nach dem Lauf wurde das Gel mit 0,3 M CuCl_2 -Lösung gefärbt (Negativfärbung) und die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten.

9.4.5.2 Elektroelution

Das Anlegen eines elektrischen Feldes bewirkt die Wanderung der negativ geladenen Proteine aus den Gelstücken zur Anode. Durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen Membranen, wobei die eine als Vorfilter für die Falle dient (BT2) und die andere Makromoleküle über 5000 Da quantitativ zurückhält (Dialysemembran BT1), kommt es zur Ansammlung der Proteine in der Falle. Diese können dann durch anschließende Fällung aus der Lösung gewonnen werden.

Die Elektroelution erfolgte mit dem Biotrapgerät von Schleicher & Schuell laut Anleitung.

Das ausgeschnittene Gelstück wurde mit dem Skalpell zerkleinert und in das Elektroelutionsgerät eingesetzt. Die Elektroelution fand mit 1x SDS-Laufpuffer ÜN bei 200 V statt. Vor der Entnahme des Eluats wurde kurz umgepolt, damit sich die Proteine von der Membran lösen.

9.4.5.3 Proteinfällung

Nach der Elektroelution wurden die Proteine gefällt. Dazu wurden 4 Vol. Methanol, 1 Vol. Chloroform und 3 Vol. $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zum Eluat gegeben und gemischt. Anschließend wurde bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die obere und untere Phase wurden vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Proteine, die sich in der Interphase befinden, wurden 2mal mit Methanol gewaschen und Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 8 M Harnstoff aufgenommen und mit PBS auf eine Harnstoffkonzentration von 2 M verdünnt.

9.5 Immunisierung von Kaninchen

Das Kaninchen wird mindestens dreimal im Abstand von 3 Wochen immunisiert (subkutan, 100 µl pro Injektionsstelle). In der Regel werden 100-500 µg Protein pro Immunisierung eingesetzt.

Die Grundimmunisierung erfolgte mit gereinigtem Protein und komplettem Freundschens Adjuvans im Verhältnis 1:1 (v/v). Die weiteren Immunisierungen erfolgten mit gereinigtem Protein und inkomplettem Freundschens Adjuvans im Verhältnis 1:1 (v/v). 10 Tage nach jeder Immunisierung fand eine Blutentnahme statt. Das Blut wurde zur Gerinnung einige Stunden bei RT stengelassen und anschließend 30 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Serum wurde dann abgenommen und bei -20°C gelagert.

C. ERGEBNISSE

1. Das Operon *irp6*, *irp7*, *irp8* und *irp9* von *Y. enterocolitica*

Der "core"-Teil der HPI umfaßt Gene, die für das Yersiniabaktin- (Ybt) System kodieren (Abb. 4A). Das Gen *fyuA* kodiert für den Ybt-Rezeptor, *ybtA* für den transkriptionellen Regulator und die Gene *irp2-5* für Proteine, die an der Synthese von Ybt beteiligt sind. Durch die von Rakin *et al.* (1999a) durchgeführte Sequenzierung der HPI aus *Y. enterocolitica* Biogruppe (BG) 1B, Serotyp O:8, Stamm WA-C stromaufwärts von *ybtA* wurden die Gene *irp6* (1803 bp), *irp7* (1803 bp), *irp8* (1368 bp) und *irp9* (1305 bp) entdeckt, die vermutlich ein Operon von 6,2 kb bilden (Abb. 4B).

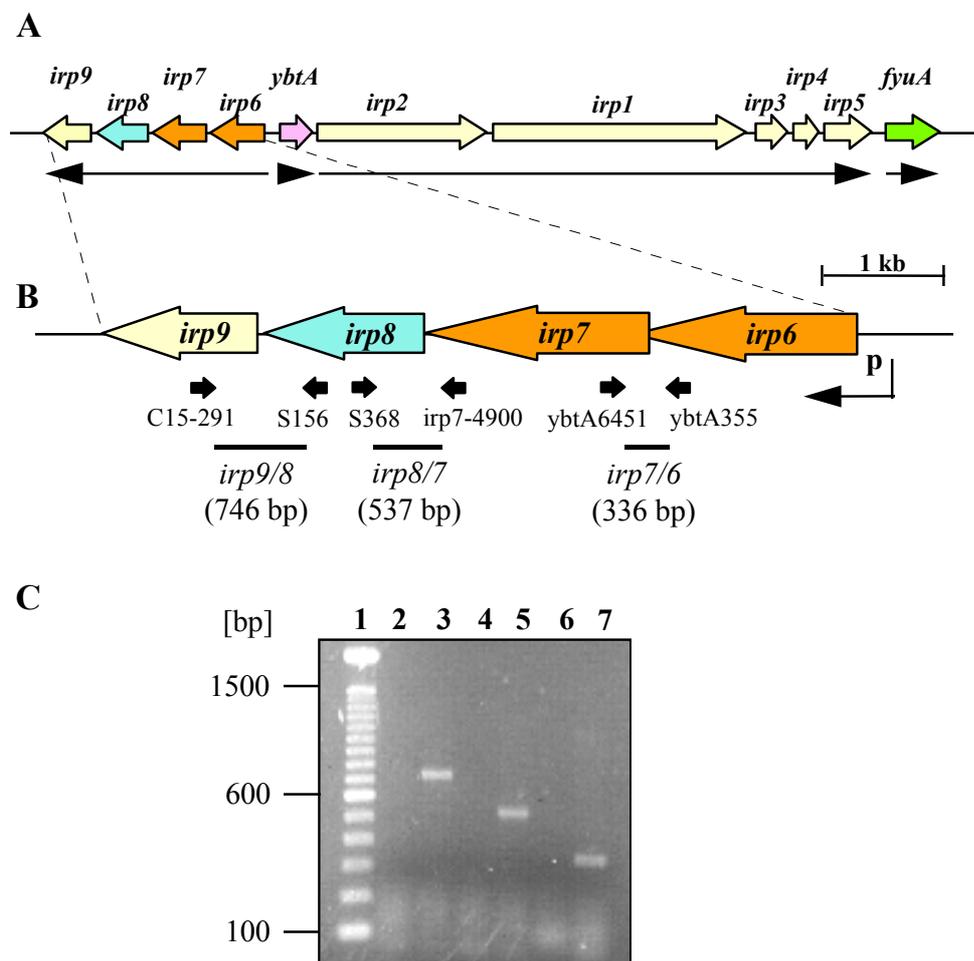


Abb. 4 : **A.** Der "core"-Teil der Yen- (*Y. enterocolitica* 1B) HPI. Farbige dicke Pfeile stellen die Gene und ihre Transkriptionsrichtung und dünne schwarze Pfeile die Operons dar. **B.** Das Operon *irp6-9*. Farbige dicke Pfeile stellen die Gene und ihre Transkriptionsrichtung, schwarze kleine Pfeile die Bindungsstellen der Primer und schwarze Linien die gebildeten RT-PCR-Produkte dar. p zeigt den Promotor und der dazugehörige Pfeil die Transkriptionsrichtung an. **C.** RT-PCR. 1. Marker; 2. *irp9/8*, RT-; 3. *irp9/8*, RT+; 4. *irp8/7*, RT-; 5. *irp8/7*, RT+; 6. *irp7/6*, RT-; 7. *irp7/6*, RT+. RT-: ohne Reverse Transkriptase, RT+: mit Reverser Transkriptase.

Um die Operonstruktur zu beweisen, wurden verschiedene RT (Reverse Transkription) -PCRs durchgeführt. Zunächst wurde die aus WA-C isolierte RNS mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in cDNS umgeschrieben. Anschließend fand eine PCR mit Primern, die in benachbarten Genen binden, statt: Primerpaar ybtA6451 und ybtA355 amplifiziert ca. 350 bp (Ende von *irp6* und Anfang von *irp7*), Primerpaar S368 und irp7-4900R ca. 550 bp (Ende von *irp7* und Anfang von *irp8*), Primerpaar C15-291 und S156 ca. 750 bp (Ende von *irp8* und Anfang von *irp9*) (Abb. 4B). Als Negativkontrolle wurde jeweils ein RT-PCR-Reaktionsansatz ohne RT durchgeführt, um eine positive PCR durch DNS-Kontamination auszuschließen. Die Ergebnisse in Abb. 4C zeigen, daß es sich bei *irp6-9* um ein Operon handelt.

2. Konstruktion von Mutanten in *Y. enterocolitica*

Aufgrund der Ähnlichkeit von Irp6 und Irp7 zu ABC-Transportern ging man davon aus, daß diese Proteine am Transport von Ybt beteiligt sein könnten. Irp8, das Ähnlichkeit zu der Permease AmpG zeigt, könnte in der Signaltransduktion eine Rolle spielen.

Um diese Vermutungen zu bestätigen, wurden *irp6*, *irp7* und *irp8* in *Y. enterocolitica* BG 1B, Serotyp O:8, Stamm WA-C inaktiviert. Da *irp6 - irp9* ein Operon bilden, mußten Mutationen eingeführt werden, die keinen polaren Effekt auf die nachfolgenden Gene ausüben. Deshalb wurden in-frame Deletionsmutanten und Insertionsmutanten mit einer Kanamycinkassette ohne transkriptionellen Terminator (Galan *et al.*, 1992) hergestellt. Suizidvektor pKNG101 wurde zur Herstellung von Deletionsmutanten und Suizidvektor pKAS32 zur Herstellung von Insertionsmutanten verwendet (s. B.5).

2.1 WA-C Δ *irp6*

Um eine *irp6*-in-frame Deletionsmutante (WA-C Δ *irp6*) herzustellen, wurde das 1,5 kb große, in *irp6* liegende ybtA6507-S360 PCR-Produkt zuerst in pMOS*Blue* kloniert (pMOS1.5) (Abb. 5). 465 bp wurden mit *NruI* deletiert und der Vektor religiert (pMOS1.1). Anschließend wurde das *Bam*HI/*Xba*I Fragment aus pMOS1.1 in Suizidvektor pKNG101 kloniert. Das entstandene Plasmid pKNG1.1 (Abb. 5) wurde mittels Restriktionsverdau (*Bam*HI/*Xba*I) und PCR überprüft. Wie erwartet zeigte die PCR mit Primerpaar ybtA6507-S360 ein Produkt von ca. 1,1 kb.

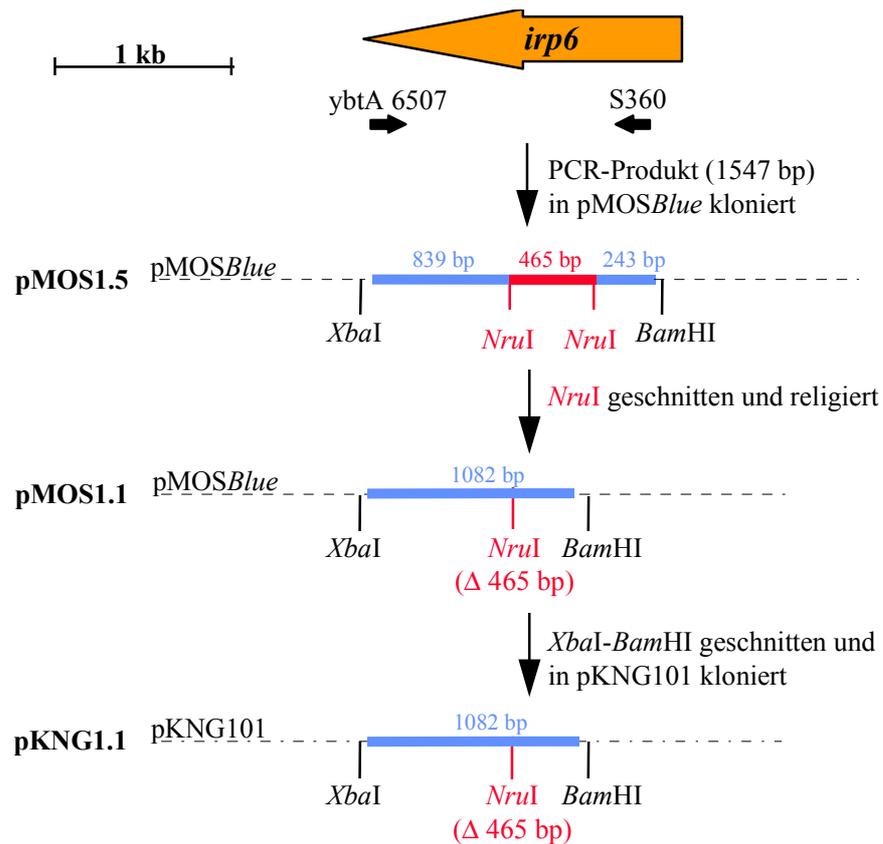


Abb. 5 : Konstruktion des Suizidvektors pKNG1.1. Der orange Pfeil stellt das Gen *irp6* dar. Kleine schwarze Pfeile zeigen die Lage der Primer an. Blaue Balken symbolisieren die klonierten Fragmente, der rote Balken das deletierte Fragment (Δ). Vektoren sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

pKNG1.1 wurde in *E. coli* SM10 λ pir transformiert und anschließend durch Konjugation in *Y. enterocolitica* WA-C transferiert (s. B.4.10.2). Die resultierende Mutante WA-C Δ *irp6* wurde zunächst mittels PCR mit dem Primerpaar ybtA6507-S360 auf die 465 bp Deletion hin überprüft. Für die Analyse im Southern-Blot wurde chromosomale DNS von *Y. enterocolitica* WA-C und WA-C Δ *irp6* isoliert, *NruI* bzw. *EcoRI/ClaI* geschnitten und mit der *irp6*-Sonde (ybtA6507-S360 PCR-Produkt) hybridisiert. Die bei WA-C vorhandene 465 bp Bande des *NruI*-Verdau fehlt bei der *irp6*-Mutante (Abb. 6). Nur die beiden benachbarten Fragmente (1398 bp, 1693 bp) können im Blot detektiert werden. Der Doppelverdau mit *EcoRI/ClaI* zeigt eine gegenüber dem Wildtyp um 465 bp verkleinerte Bande (WA-C: 4,3 kb; WA-C Δ *irp6*: 3,8 kb).

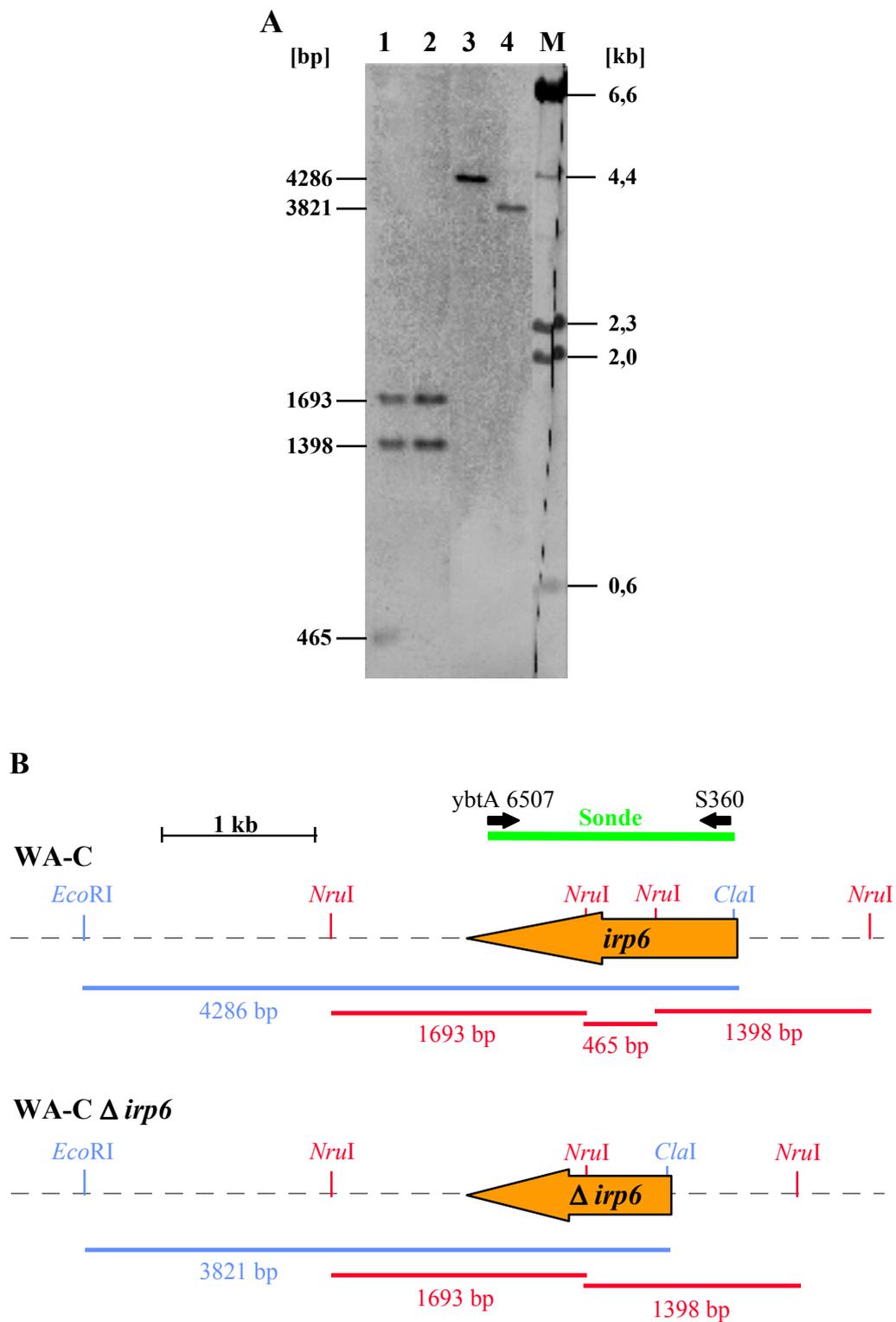


Abb. 6: Überprüfung von WA-C Δ irp6. A. Southern-Blot-Hybridisierung mit der Sonde S360-ybtA6507. 1. WA-C (*NruI*); 2. WA-C Δ irp6 (*NruI*); 3. WA-C (*EcoRI/ClaI*); 4. WA-C Δ irp6 (*EcoRI/ClaI*); M. Marker. B. Im Southern-Blot verwendete Restriktionsschnittstellen und die mit der ybtA6507-S360 Sonde hybridisierenden Fragmente in WA-C und WA-C Δ irp6. Die gestrichelte Linie stellt die chromosomale DNS und der orange Pfeil das Gen *irp6* dar. Der grüne Balken zeigt die Lage der Sonde an. Durchgezogene Linien symbolisieren die Fragmente nach Restriktionsverdau mit *EcoRI/ClaI* (blau) bzw. *NruI* (rot).

2.2 WA-C $\Delta irp7$

Zur Herstellung von WA-C $\Delta irp7$ wurde das ca. 2,4 kb große S368-ybtA355 PCR-Produkt, das *irp7* und einen Teil von *irp8* enthält, in pMOS*Blue* kloniert (pMOS2.4) (Abb. 7). 402 bp wurden mit *EcoRV* aus dem Gen *irp7* herausgeschnitten, das resultierende Plasmid religiert (pMOS2.0) und das nun ca. 2 kb große *BamHI/XbaI* Fragment in pKNG101 ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pKNG2.0 wurde durch Restriktionsverdau (*BamHI/XbaI*) und PCR (Primer S368-ybtA355) überprüft.

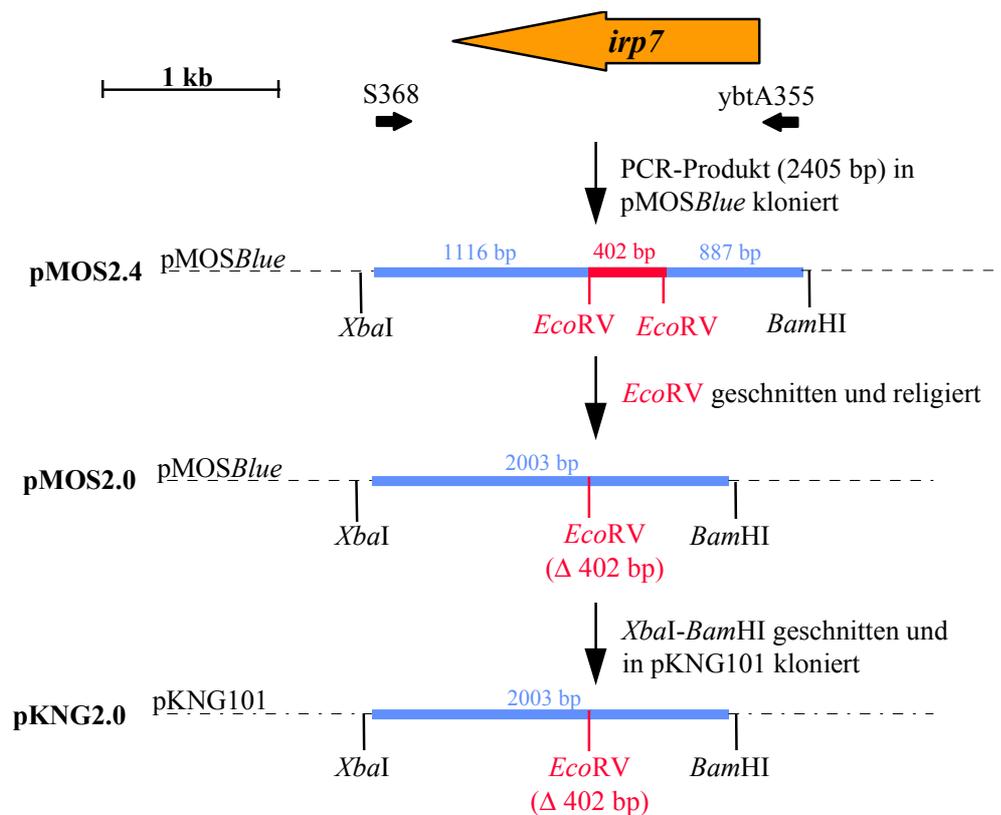


Abb. 7: Konstruktion des Suizidvektors pKNG2.0. Der orange Pfeil stellt das Gen *irp7* dar. Kleine schwarze Pfeile zeigen die Lage der Primer an. Blaue Balken symbolisieren die klonierten Fragmente, der rote Balken das deletierte Fragment (Δ). Vektoren sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

pKNG2.0 wurde in *E. coli* SM10 λ *pir* transformiert, in *Y. enterocolitica* WA-C konjugiert und die entstandene Mutante WA-C $\Delta irp7$ mittels PCR und Southern-Blot auf die Deletion hin überprüft. Das S368-ybtA355 PCR-Produkt der Mutante war gegenüber dem PCR-Produkt des Wildtyps (ca. 2,4 kb) um ca. 400 bp verkleinert.

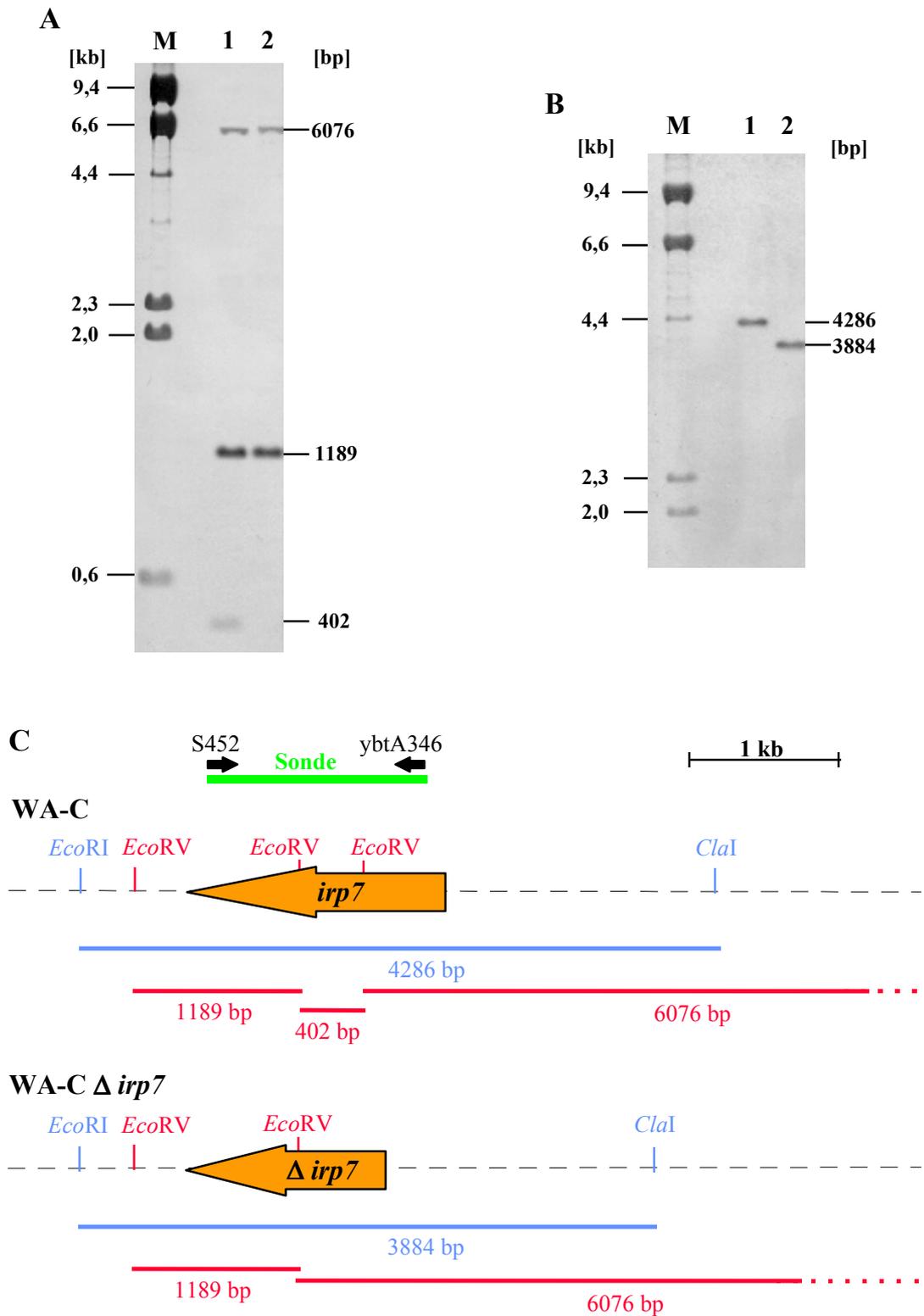


Abb. 8: Überprüfung von WA-C $\Delta irp7$. A. Southern-Blot-Hybridisierung mit der Sonde S452-ybtA346. M. Marker; 1. WA-C (*EcoRV*); 2. WA-C $\Delta irp7$ (*EcoRV*). B. Southern-Blot hybridisiert mit der Sonde S452-ybtA346. M. Marker; 1. WA-C (*EcoRI/ClaI*); 2. WA-C $\Delta irp7$ (*EcoRI/ClaI*). C. Im Southern-Blot verwendete Restriktionsschnittstellen und die mit der S452-ybtA346 Sonde hybridisierenden Fragmente in WA-C und WA-C $\Delta irp7$. Die gestrichelte Linie stellt die chromosomale DNS und der orange Pfeil das Gen *irp7* dar. Der grüne Balken zeigt die Lage der Sonde an. Durchgezogene Linien symbolisieren die Fragmente nach Restriktionsverdau mit *EcoRI/ClaI* (blau) bzw. *EcoRV* (rot).

Für die Analyse im Southern-Blot wurde die chromosomale DNS von WA-C und WA-C $\Delta irp7$ mit *EcoRV* bzw. *EcoRI/ClaI* geschnitten und mit der *irp7*-Sonde (S452-ybtA346 PCR-Produkt) hybridisiert (Abb. 8C). Der Verdau mit *EcoRV* zeigt, daß die 402 bp *EcoRV*-Bande in der *irp7*-Mutante deletiert ist, wohingegen die beiden benachbarten Fragmente (1189 bp, 6076 bp) erhalten geblieben sind (Abb. 8A). Durch den Doppelverdau mit *EcoRI/ClaI* entsteht in WA-C $\Delta irp7$ eine gegenüber dem Wildtyp um ca. 400 bp verkleinerte Bande (WA-C: 4,3 kb; WA-C $\Delta irp7$: 3,9 kb) (Abb. 8B).

2.3 WA-CS *irp7*::Kan^r

Um eine vollständige Inaktivierung von *irp7* sicherzustellen, wurde eine *HincII* geschnittene Kanamycinkassette ohne transkriptionellen Terminator (aus Vektor pSB315) in die *NruI*-Schnittstelle von pMOS2.4 inseriert (pMOS*irp7*::Kan^r) (Abb. 9).

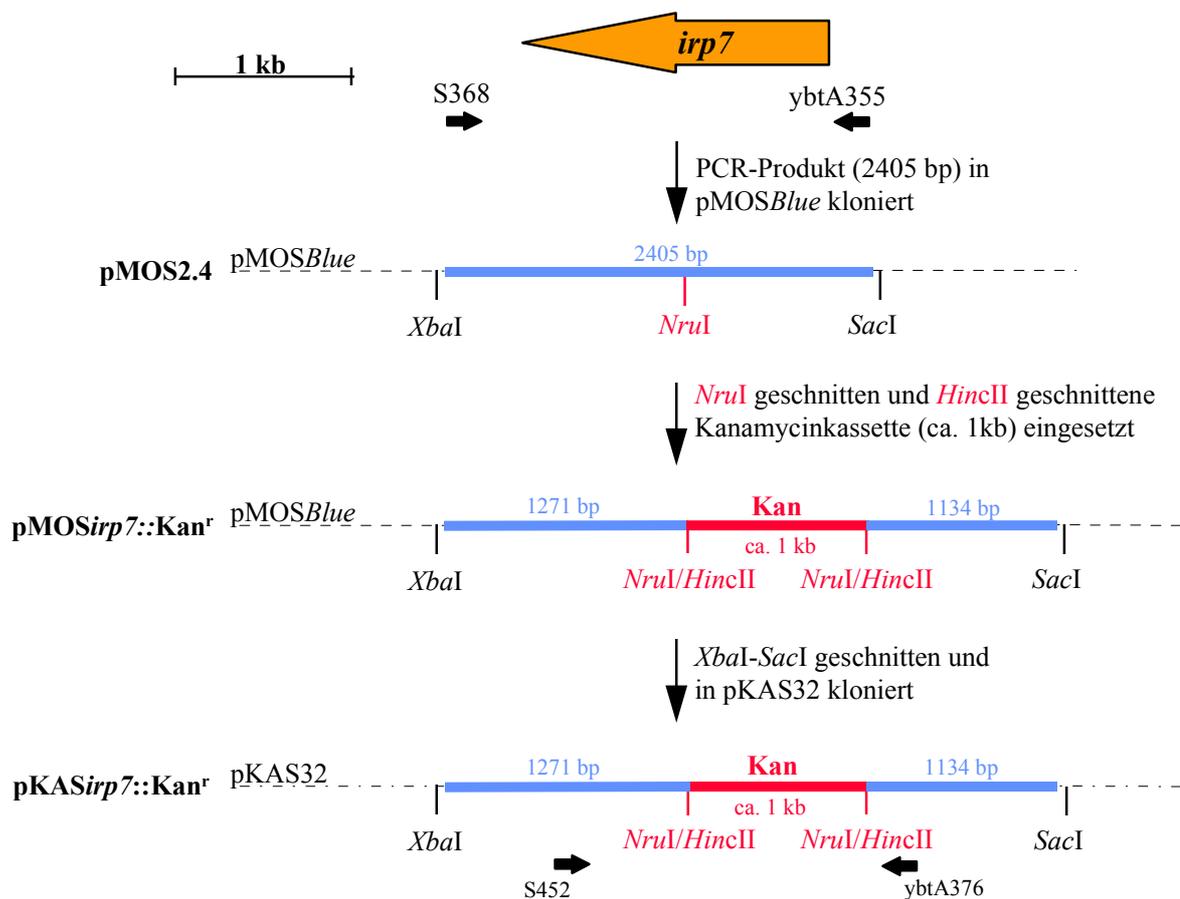
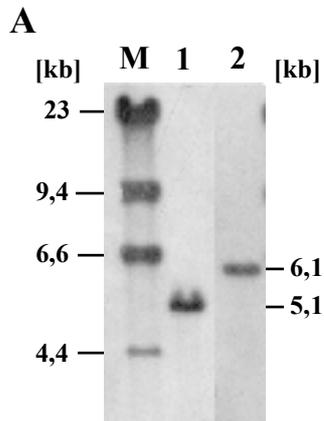


Abb. 9: Konstruktion des Suizidvektors pKAS*irp7*::Kan^r. Der orange Pfeil stellt das Gen *irp7* dar. Kleine schwarze Pfeile zeigen die Lage der Primer an. Blaue Balken symbolisieren die klonierten Fragmente, rote Balken die Kanamycinkassette (Kan). Vektoren sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

Anschließend wurde das Insert mit der Kanamycinkassette durch *XbaI/SacI* Doppelverdau herausgeschnitten und in Vektor pKAS32 inseriert. Der entstandene Suizidvektor pKAS $irp7::Kan^r$ wurde mittels Restriktionsverdau (*XbaI/SacI*) und PCR überprüft. Primerpaar ybtA376-S452 amplifiziert ein 1067 bp großes Fragment in *irp7*, das durch die Insertion der Kanamycinkassette um 1 kb vergrößert wird.



Der Suizidvektor pKAS $irp7::Kan^r$ wurde in *E. coli* S17-1 λ *pir* transformiert und anschließend in *Y. enterocolitica* WA-CS (Sm-resistenter WA-C) konjugiert (s. B.5.2). Die resultierende Mutante WA-CS $irp7::Kan^r$ wurde mittels PCR (ybtA376-S452) und Southern-Blot überprüft. Die *SphI* geschnittene chromosomale DNS wurde mit der S360-ybtA6507 Sonde hybridisiert (Abb. 10). Die Mutante zeigte eine gegenüber dem Wildtyp (5,1 kb) um 1 kb vergrößerte Bande (6,1 kb), eine Differenz, die der Größe der Kanamycinkassette entspricht.

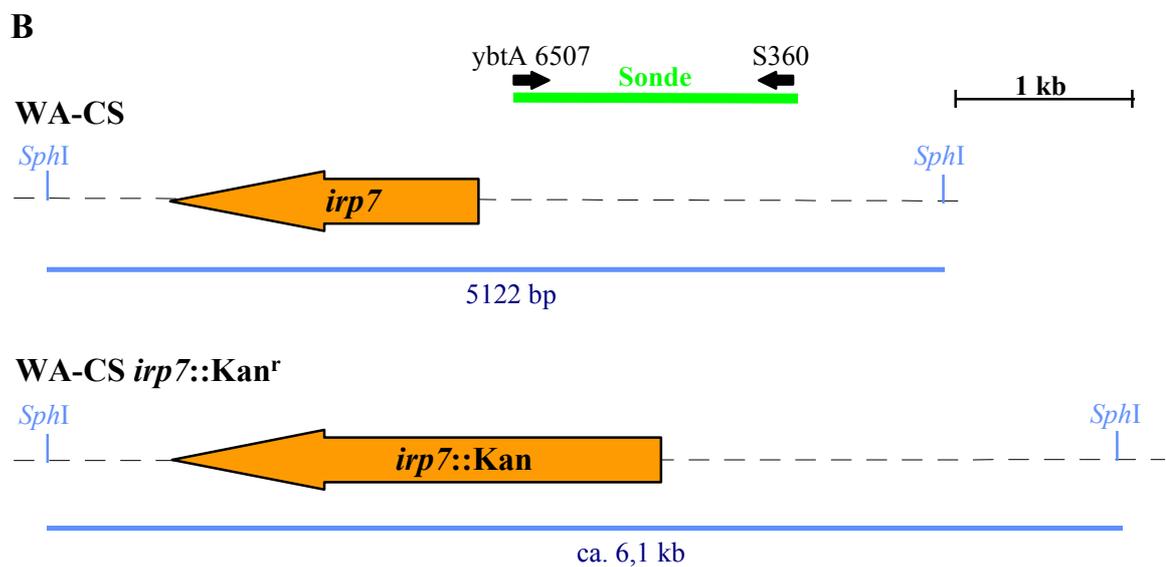


Abb. 10: Überprüfung von WA-CS $irp7::Kan^r$. **A.** Southern-Blot-Hybridisierung mit der Sonde ybtA6507-S360. M. Marker; 1. WA-CS (*SphI*); 2. WA-CS $irp7::Kan^r$ (*SphI*). **B.** Im Southern-Blot verwendete Restriktionschnittstellen und die mit der ybtA6507-S360 Sonde hybridisierenden Fragmente in WA-CS und WA-CS $irp7::Kan^r$. Die gestrichelte Linie stellt die chromosomale DNS und der orange Pfeil das Gen *irp7* dar. Der grüne Balken zeigt die Lage der Sonde an. Durchgezogene blaue Linien symbolisieren die Fragmente nach Restriktionsverdau mit *SphI*.

2.4 WA-C $\Delta irp6, irp7$

Zur Herstellung der *irp6, irp7*-Doppelmutante (WA-C $\Delta irp6, irp7$) wurde das S452-8354Eco PCR-Produkt, das *irp6* und einen großen Teil von *irp7* enthält, in pMOSBlue kloniert (pMOS3.5), 2313 bp durch Doppelverdau mit *EcoRV/NruI* deletiert und die beiden glatten Enden religiert (pMOS1.2) (Abb. 11). Anschließend wurde das Fragment mit *BamHI/XbaI* herausgeschnitten und mit dem *BamHI/XbaI* geschnittenen Vektor pKNG101 ligiert. Der entstandene Suizidvektor pKNG1.2 wurde durch Restriktionsverdau mit *BamHI/XbaI* überprüft. Zusätzlich wurde mittels PCR (S452-8354Eco) gezeigt, daß das PCR-Produkt in pKNG1.2 - verglichen mit pMOS3.5 - um 2,3 kb verkleinert ist.

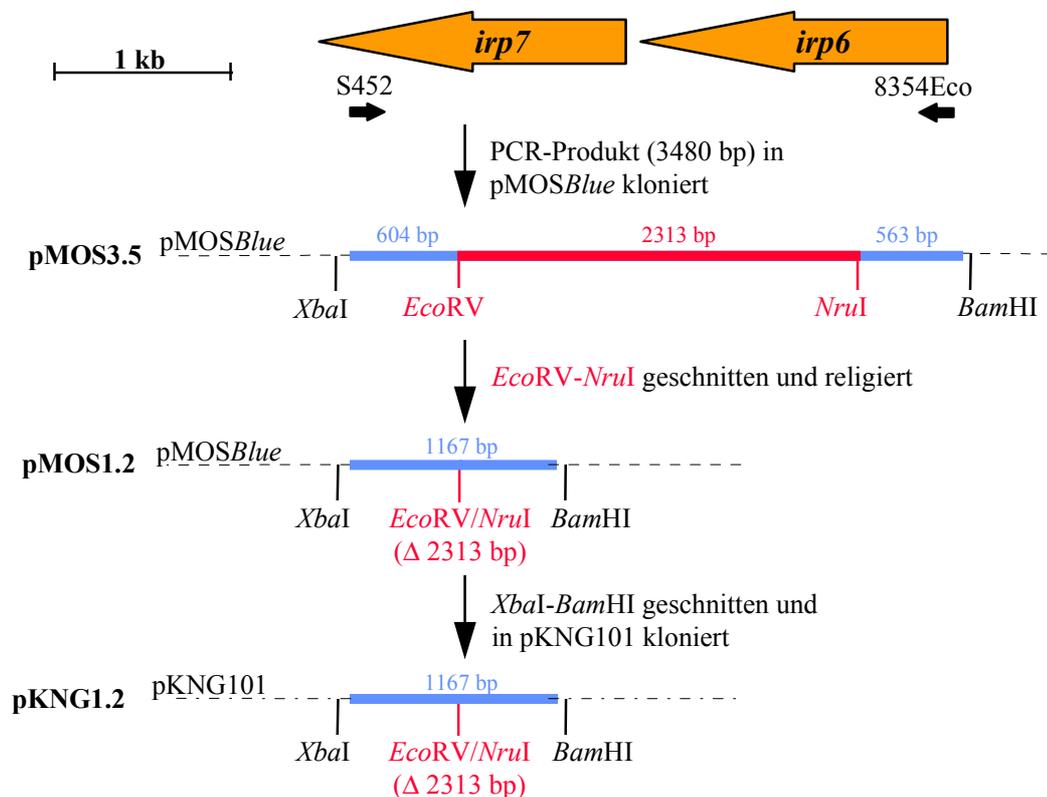


Abb. 11: Konstruktion des Suizidvektors pKNG1.2. Die orangenen Pfeile stellen die Gene *irp6* und *irp7* dar. Kleine schwarze Pfeile zeigen die Lage der Primer an. Blaue Balken symbolisieren die klonierten Fragmente, der rote Balken das deletierte Fragment (Δ). Vektoren sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

Suizidvektor pKNG1.2 wurde in *E. coli* SM10 λ pir transformiert und anschließend in *Y. enterocolitica* WA-C konjugiert. Die korrekte Deletion wurde in der PCR mit dem Primerpaar S452-8354Eco gezeigt. Für den Southern-Blot wurde die chromosomale DNS von WA-C und WA-C Δ irp6,irp7 SphI geschnitten und mit der S360-ybtA6507 Sonde hybridisiert (Abb. 12). Der Southern-Blot zeigte bei WA-C Δ irp6,irp7 eine Bande von 2,8 kb (WA-C: 5,1 kb), was der erwarteten Deletion von ca. 2,3 kb entspricht.

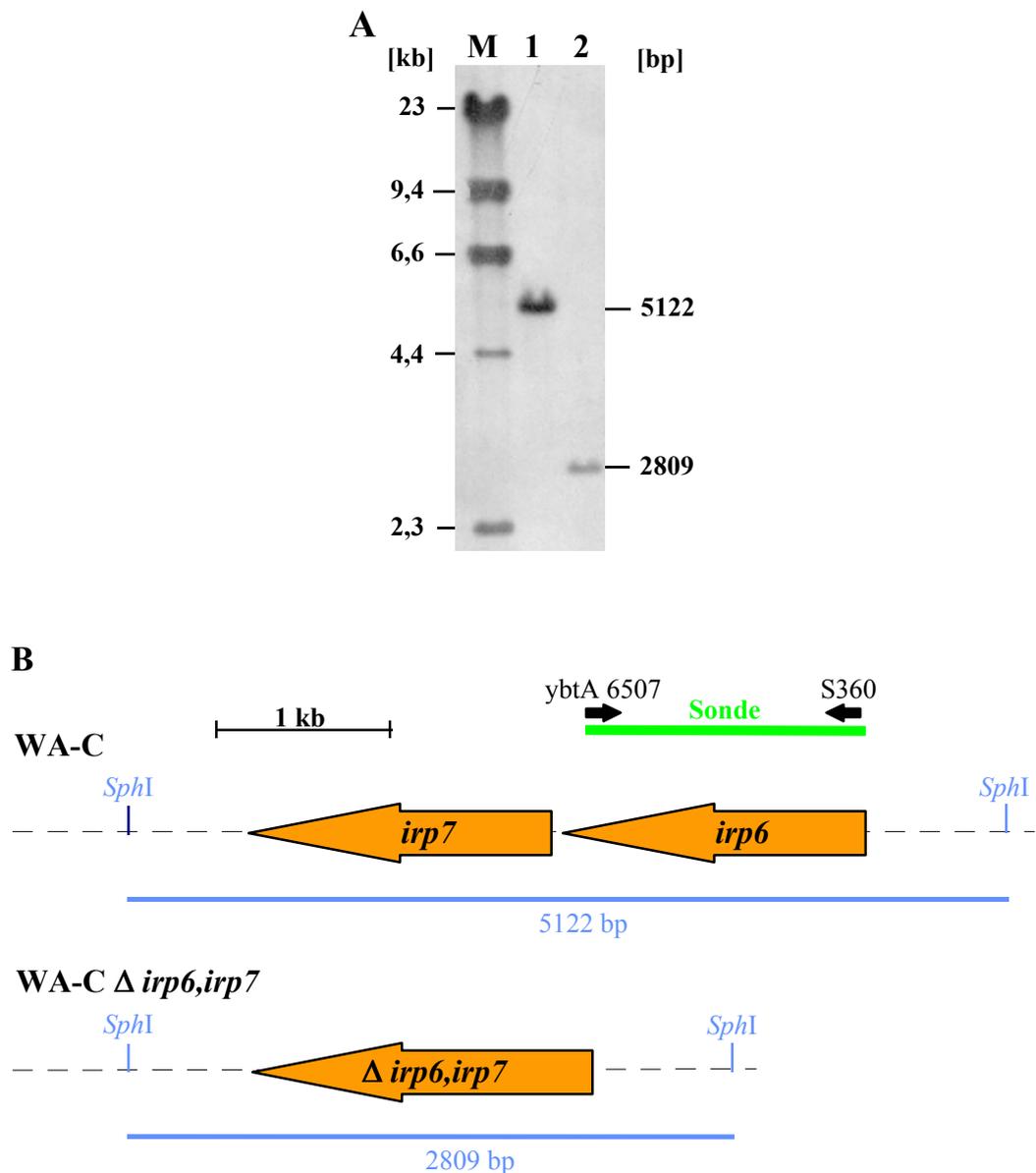


Abb. 12: Überprüfung von WA-C Δ irp6,irp7. **A.** Southern-Blot-Hybridisierung mit der Sonde ybtA6507-S360. M. Marker; 1. WA-C (*Sph*I); 2. WA-C Δ irp6,irp7 (*Sph*I). **B.** Im Southern-Blot verwendete Restriktionsschnittstellen und die mit der ybtA6507-S360 Sonde hybridisierenden Fragmente in WA-C und WA-C Δ irp6,irp7. Die gestrichelte Linie stellt die chromosomale DNS und die orangenen Pfeile die Gene *irp6* und *irp7* dar. Der grüne Balken zeigt die Lage der Sonde an. Durchgezogene blaue Linien symbolisieren die Fragmente nach Restriktionsverdau mit *Sph*I.

2.5 WA-CS *irp8*::Kan^r

Zur Herstellung der *irp8*-Mutante (WA-CS *irp8*::Kan^r) wurde das *irp8*XbaI-*irp8*HindIII PCR-Produkt (enthält das ganze *irp8* Gen) *Xba*I/*Hind*III geschnitten und in Vektor pBAD18 ligiert (Abb. 13). Eine *Hinc*II geschnittene Kanamycinkassette ohne transkriptionellen Terminator (aus pSB315) wurde in die mit Klenow-Enzym aufgefüllte *Sph*I-Schnittstelle in *irp8* kloniert (pBAD*irp8*::Kan^r) (Pelludat). Das die Kanamycinkassette enthaltende *irp8*-Gen wurde mittels PCR (Primerpaar *irp8*XbaI-*irp8*BamHI) amplifiziert, mit *Xba*I/*Bam*HI geschnitten und in den *Xba*I-*Bgl*II geschnittenen Vektor pKAS32 kloniert (pKAS*irp8*::Kan^r). Der Vektor pKAS*irp8*::Kan^r wurde mittels PCR (*irp8*XbaI-*irp8*BamHI) auf das Vorhandensein des *irp8*::Kan-Fragments überprüft und ergab wie erwartet ein ca. 2,4 kb Fragment.

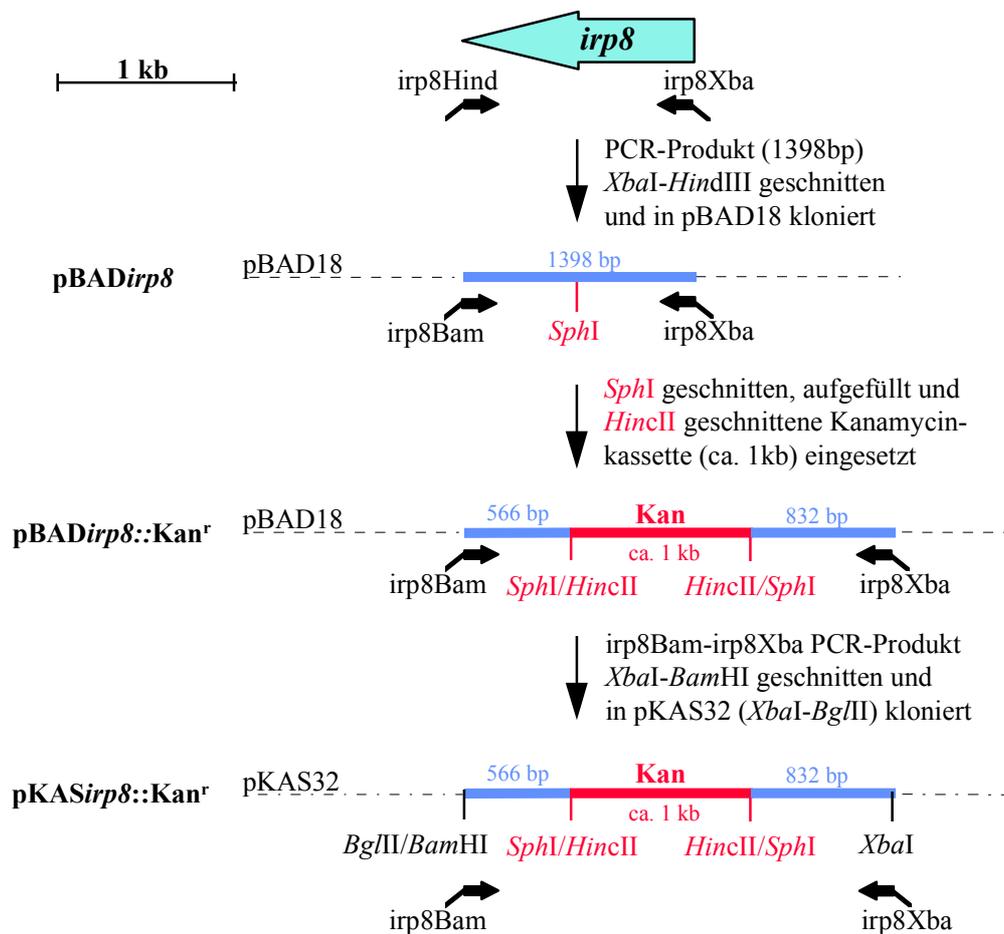
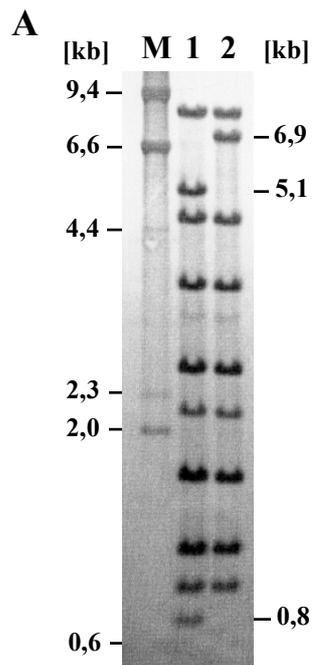


Abb. 13: Konstruktion des Suizidvektors pKAS*irp8*::Kan^r. Der türkise Pfeil stellt das Gen *irp8* dar. Kleine schwarze Pfeile zeigen die Lage der Primer an. Blaue Balken symbolisieren die klonierten Fragmente, rote Balken die Kanamycinkassette (Kan). Vektoren sind durch gestrichelte Linien dargestellt.



Der Suizidvektor pKAS $irp8::Kan^r$ wurde in *E. coli* S17-1 λpir transformiert und anschließend in *Y. enterocolitica* WA-CS konjugiert (s. B.5.2). Die resultierende Mutante WA-CS $irp8::Kan^r$ wurde zunächst mittels PCR ($irp8^{Bam}$ - $irp8^{Xba}$) überprüft. Für die Analyse im Southern-Blot wurde die *SphI* geschnittene chromosomale DNS mit einer Sonde hybridisiert, die mit der gesamten HPI reagiert (Abb. 14). Da die ca. 1 kb große Kanamycinkassette in die aufgefüllte *SphI* Schnittstelle von *irp8* kloniert wurde, kann die chromosomale DNS von WA-CS $irp8::Kan^r$ an dieser Stelle nicht mehr *SphI* geschnitten werden. Deshalb besitzt die *irp8*-Mutante eine Bande von 6,9 kb und der Wildtyp WA-CS zwei Banden von 5,1 kb und 0,8 kb. Die anderen Banden sind bei beiden Stämmen gleich, da der Rest der HPI unverändert vorliegt.

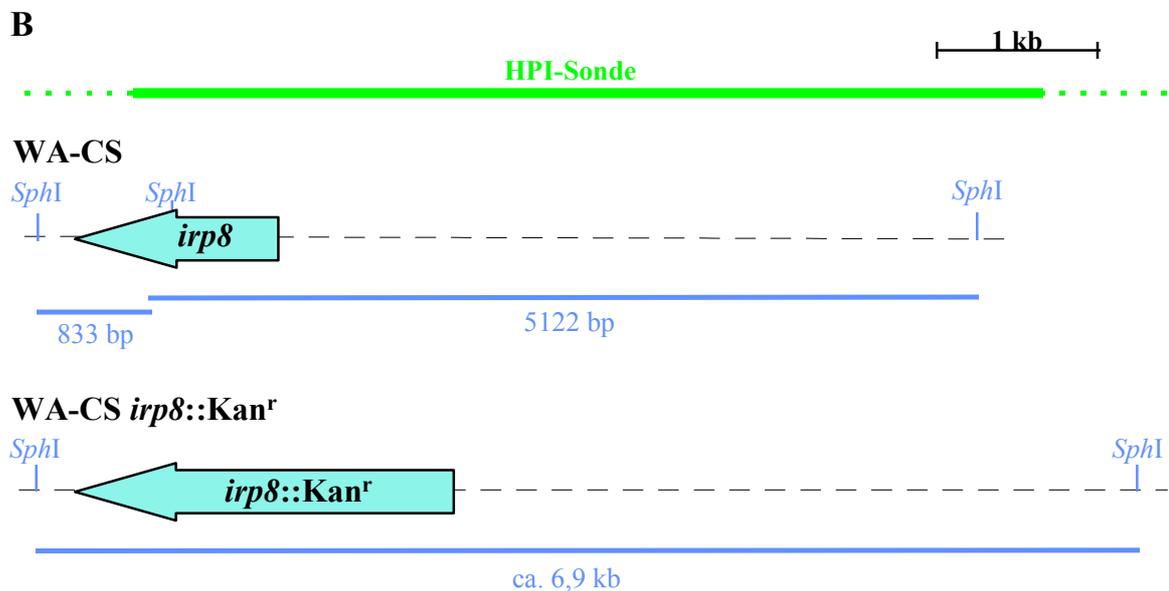


Abb. 14: Überprüfung von WA-CS $irp8::Kan^r$. **A.** Southern-Blot-Hybridisierung mit der HPI-Sonde. M. Marker; 1. WA-CS (*SphI*); 2. WA-CS $irp8::Kan^r$ (*SphI*). **B.** Im Southern-Blot verwendete Restriktionsschnittstellen und die mit der HPI-Sonde hybridisierenden Fragmente in WA-CS und WA-CS $irp8::Kan^r$. Die gestrichelte Linie stellt die chromosomale DNS und der türkise Pfeil das Gen *irp8* dar. Der grüne Balken zeigt die Lage der Sonde an. Durchgezogene blaue Linien symbolisieren die Fragmente nach Restriktionsverdau mit *SphI*.

2.6 WA-CS $\Delta irp6, irp7, irp8::Kan^r$

Für die Herstellung einer *irp6, irp7, irp8*-Dreifachmutante wurde zunächst auf eine Sm-resistente *irp6, irp7*-Doppelmutante selektioniert (s. B.5.2). Die Sm-resistente *irp6, irp7*-Doppelmutante wurde WA-CS $\Delta irp6, irp7$ genannt. Anschließend wurde Suizidvektor pKAS $irp8::Kan^r$ in diesen Stamm konjugiert und die resultierende Mutante WA-CS $\Delta irp6, irp7, irp8::Kan^r$ mittels PCR (*irp8*Bam-*irp8*Xba) überprüft.

3. Ybt-Aufnahme von *Y. enterocolitica*

Um zu untersuchen, ob Irp6, Irp7 oder Irp8 eine Rolle bei der Aufnahme von Ybt spielen, wurden die *irp6*-, *irp7*- und *irp8*- Mutanten in Eisenmangelagar (CDM-H-Agar; s. B.6.2) eingegossen und mit Yersiniabaktin (Ybt) getränkten Filterplättchen auf Fütterung getestet (Abb. 15). Um das Filterplättchen zeigte sich bei WA-C, WA-CS und WA-CS $irp8::Kan^r$ eine durch Ybt hervorgerufene Wachstumszone, die bei den *irp6*- und *irp7*- Einzelmutanten (WA-C $\Delta irp6$, WA-C $\Delta irp7$, WA-CS $irp7::Kan^r$), der *irp6, irp7*-Doppelmutante (WA-C $\Delta irp6, irp7$), der *irp6, irp7, irp8*-Dreifachmutante (WA-CS $\Delta irp6, irp7, irp8::Kan^r$) und der Rezeptormutante (WA *fyuA2*; Pelludat) nicht auftrat.

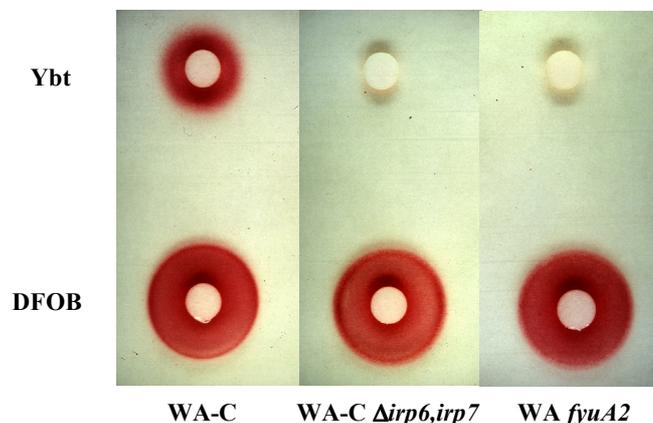


Abb. 15: Fütterung mit Yersiniabaktin (Ybt) und Desferrioxamin B (DFOB) der in CDM-H-Agar eingegossenen Stämme: *Y. enterocolitica* WA-C (Wildtyp), WA-C $\Delta irp6, irp7$ (ABC-Transportermutante) und WA *fyuA2* (Rezeptormutante).

Da sowohl der Ybt-Rezeptor (FyuA) als auch der Desferrioxamin B-Rezeptor (FoxA) TonB-abhängig sind (Bäumler & Hantke, 1992) diente ein Filterplättchen mit Desferrioxamin B als Kontrolle. Desferrioxamin B wirkte wachstumsfördernd auf alle Stämme, was funktionellen TonB-abhängigen Transport zeigt. Diese Versuche zeigen, daß - neben dem Ybt-Rezeptor

(FyuA) - sowohl Irp6 als auch Irp7 für die Aufnahme bzw. Nutzung von Ybt notwendig sind. Irp8 hingegen scheint keinen Einfluß auf die Nutzung von Ybt zu haben.

4. Mausvirulenz von *Y. enterocolitica*

Da eine *Y. pseudotuberculosis* Ybt-Synthesemutante (*irp2*) und eine *Y. enterocolitica* O:8 Rezeptormutante (*fyuA*) in ihrer Mausvirulenz attenuiert sind (Carniel *et al.*, 1992, Rakin *et al.*, 1994), stellte sich die Frage, ob die Inaktivierung der ABC-Transporter Irp6 und Irp7 oder des AmpG-ähnlichen Proteins Irp8 ebenfalls zu einer reduzierten Mausvirulenz führt.

Um den Einfluß von *irp6*, *irp7* und *irp8* auf die Mausvirulenz untersuchen zu können, mußte zunächst durch Konjugation das Kointegrat pRK290B8-5::pO:8 (bestehend aus Vektor pRK290B8-5 und Virulenzplasmid pYVO:8 von *Y. enterocolitica* O:8) (Heesemann & Laufs, 1983) mit Hilfe des Helferplasmids pRK2013 in die zu untersuchenden plasmidlosen Stämme (WA-C, WA-C Δ *irp6,irp7*, WA-CS und WA-CS *irp8*::Kan^r) transferiert werden (s. B.4.10.2). Die Kointegrat-haltigen Exkonjuganten wurden einer Mauspassage (s. B.8.2) unterzogen und anschließend auf Dissoziation des Kointegrats (Tetracyclin-Sensitivität) und Vorhandensein von pYVO:8 (Agglutinationstest, sekretierte Proteine und PCR) überprüft (s. B.8.1).

Jeweils 3 BALB/c Mäuse wurden mit 5×10^6 Bakterien (WA-C (pYVO:8), WA-C Δ *irp6,irp7* (pYVO:8), WA-CS (pYVO:8) und WA-CS *irp8*::Kan^r (pYVO:8)) intravenös (i.v.) infiziert. 2 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet, Milz und Leber entnommen und die Keimzahl (colony forming units = CFU) in diesen Organen bestimmt. Die Werte sind in Tab. 10 zusammengefaßt.

Tab. 10: CFU in Milz und Leber von infizierten Mäusen

Stamm mit pYVO:8 Plasmid	Milz [CFU]	Leber [CFU]
WA-C	$2,7 \times 10^7$	$4,5 \times 10^6$
WA-C Δ <i>irp6, irp7</i>	$2,7 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$
WA-CS	$1,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^6$
WA-CS <i>irp8</i> ::Kan ^r	$3,3 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$

Im Vergleich zu der CFU von WA-C Δ *irp6,irp7* (pYVO:8) infizierten Mäusen war die CFU in der Milz WA-C (pYVO:8) infizierter Mäuse um 10^5 erhöht. Die Differenz in der Leber lag bei 10^3 . Drei weitere mit WA-C Δ *irp6,irp7* (pYVO:8) infizierte Mäuse wurden 10 Tage nach der Infektion getötet. Weder in Milz noch in Leber konnten Bakterien nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Transportmutanten zeigte die *irp8*-Mutante WA-CS *irp8*::Kan^r (pYVO:8) im Vergleich zum Ausgangsstamm WA-CS (pYVO:8) keine reduzierte Virulenz. Es scheint also, daß für die Mausvirulenz in *Y. enterocolitica* O:8 die beiden ABC-Transporter Irp6 und Irp7, aber nicht Irp8 essentiell sind.

5. Komplementation der *Y. enterocolitica* Mutanten

Für die Komplementation der *irp6*- und *irp7*-Einfachmutanten wurden die Plasmide pGEX*irp6* und pGEX*irp7* verwendet (Abb. 16). *irp6* wurde mittels PCR mit den Primern 6515Sma und 8301Bam amplifiziert, *Sma*I/*Bam*HI geschnitten und in den *Sma*I/*Bam*HI geschnittenen Vektor pGEX-4T-3 hinter das *gst*- (Glutathion-S-Transferase) Gen kloniert (pGEX*irp6*). pGEX*irp7* entstand durch Klonierung des *Sma*I/*Bam*HI geschnittenen *irp7*-PCR-Produktes (Primer 4727Sma und 6509Bam) in den ebenfalls *Sma*I/*Bam*HI geschnittenen Vektor pGEX-4T-3.

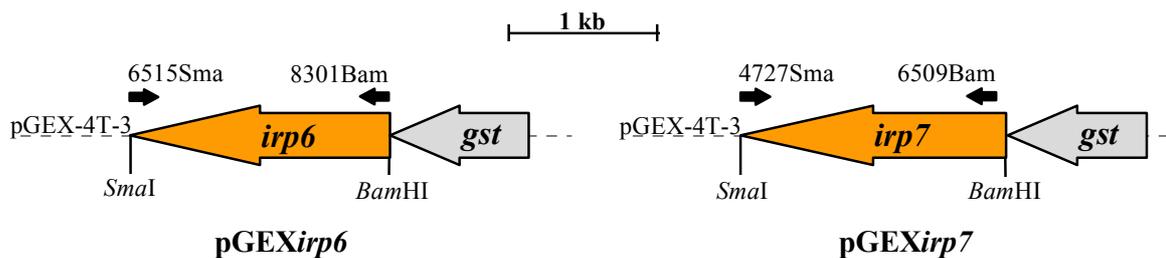


Abb. 16: Konstruktion der Plasmide pGEX*irp6* und pGEX*irp7*. Die orangenen Pfeile stellen die Gene *irp6* und *irp7*, graue Pfeile das *gst*-Gen dar. Kleine schwarze Pfeile zeigen die Lage der Primer an. Vektoren sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

Die Plasmide pGEX*irp6* und pGEX*irp7* wurden in die *irp6*- und *irp7*- Einfachmutanten und in die *irp6,irp7*-Doppelmutante transformiert und die Transformanten auf Ybt-vermitteltes Wachstum untersucht. Während WA-C Δ *irp6* (pGEX*irp6*), WA-C Δ *irp7* (pGEX*irp7*) und WA-CS *irp7*::Kan^r (pGEX*irp7*) einen Wachstumshof um die mit Ybt getränkten Filterplättchen aufwiesen, ließen sich WA-C Δ *irp6* (pGEX*irp7*), WA-C Δ *irp7* (pGEX*irp6*), WA-CS *irp7*::Kan^r (pGEX*irp6*), WA-C Δ *irp6,irp7* (pGEX*irp6*) und WA-C Δ *irp6,irp7* (pGEX*irp7*) nicht füttern. Eine Kreuzkomplementation der *irp6*-Mutante mit dem *irp7*-Gen und umgekehrt ist somit nicht möglich. Außerdem reicht eines der beiden Gene nicht aus, um die Doppelmutante zu komplementieren.

Für die Komplementation der Doppelmutante wurden die Gene *irp6* und *irp7* zusammen mit ihrem Promotor durch Restriktionsverdau mit *Sph*I aus Cosmid 12H2 (trägt das gesamte

irp6-9 Operon) herausgeschnitten und in den *SphI* geschnittenen Vektor pACYC184 kloniert (Abb. 17A). Das entstandene Plasmid pACYC5.1 konnte die Doppelmutante WA-C $\Delta irp6, irp7$ im Fütterungstest mit Ybt erfolgreich komplementieren.

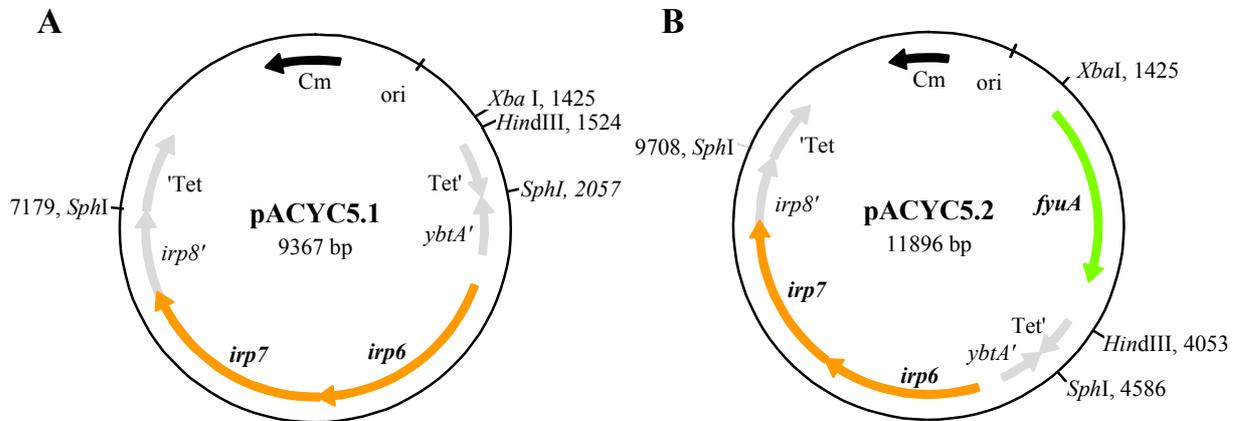


Abb. 17: Plasmide A. pACYC5.1 und B. pACYC5.2. Die Gene *irp6* und *irp7* sind als orange, das Gen *fyuA* als grüner Pfeile dargestellt. Graue Pfeile zeigen Teilstücke der Gene *irp8'* und *ybtA'*. Das Gen für die Tetracyclinresistenz (Tet) (grauer Pfeil) wird durch die Insertion des *SphI*-Fragments inaktiviert. Die Chloramphenicol-Resistenz (Cm) (schwarzer Pfeil) bleibt erhalten.

Für spätere Versuche wurde ein weiteres Plasmid konstruiert. Zu diesem Zweck wurde pHM6 (enthält das Gen für den Rezeptor FyuA) *XbaI/HindIII* geschnitten und das entstandene 2,6 kb *fyuA*-Fragment in den *XbaI/HindIII* geschnittenen Vektor pACYC5.1 ligiert (Abb. 17B). Das resultierende Plasmid pACYC5.2 konnte sowohl eine *irp6, irp7*-Doppelmutante als auch die Rezeptormutante WA *fyuA2* im Fütterungstest mit Ybt komplementieren.

6. Transfer der Ybt-Transportgene in *E. coli* H1884 und *Y. enterocolitica* NF-O

Um zu untersuchen, ob die ABC-Transporter Irp6 und Irp7 und der Ybt-Rezeptor FyuA für die Aufnahme bzw. Nutzung von Ybt ausreichend sind, wurden Plasmide, die unterschiedliche Kombinationen dieser Gene tragen, in *E. coli* H1884 und in den nicht-pathogenen *Y. enterocolitica* Stamm NF-O (BG 1A) transformiert. Beide Stämme sind HPI-negativ. *E. coli* H1884 besitzt Mutationen in den Enterochelin-Synthesegenen *entD, F*, kann deshalb sein Siderophor Enterochelin nicht synthetisieren und wächst - wie auch *Y. enterocolitica* Stamm NF-O - in Eisenmangelmedium nur schwach. Nach Erhalt der unterschiedlichen Plasmide wurden die transformierten Stämme auf Ybt-vermitteltes Wachstum hin untersucht.

6.1 Ybt-vermitteltes Wachstum in *E. coli* H1884 (pACYC5.2)

Die Plasmide pACYC184, pHM10 (*fyuA*), pACYC5.1 (*irp6*, *irp7*) und pACYC5.2 (*irp6*, *irp7*, *fyuA*) wurden in *E. coli* H1884 transformiert. Die resultierenden Stämme H1884 (pACYC184), H1884 (pHM10), H1884 (pACYC5.1) und H1884 (pACYC5.2) wurden in CDM-H-Agar eingegossen und mit Ybt bzw. Desferrioxamin B gefüttert. Weder H1884 (pHM10) noch H1884 (pACYC5.1) konnten mit Ybt wachsen. Im Gegensatz dazu zeigte H1884 mit pACYC5.2 (*fyuA*, *irp6* und *irp7*) einen deutlichen Wachstumshof (Abb. 18). Offensichtlich sind die beiden ABC-Transporter - Irp6 und Irp7 - und der Rezeptor FyuA essentiell und auch ausreichend für die Ybt-Aufnahme und -Verwertung in *E. coli* H1884. Alle Transformanten konnten ebenfalls mit Desferrioxamin B, das in geringen Mengen über den TonB-abhängigen Rezeptor FhuE (Rezeptor für Coprogen) aufgenommen werden kann (Sauer *et al.*, 1990), gefüttert werden. Diese Kontrolle beweist, daß in *E. coli* H1884 der TonB-abhängige Transport funktionell ist.

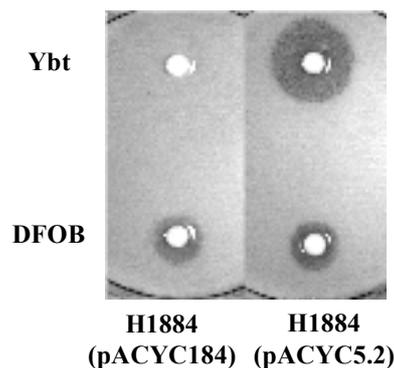


Abb. 18: Fütterung mit Yersiniabaktin (Ybt) und Desferrioxamin B (DFOB) von in CDM-H-Agar eingegossenem *E. coli* Stämmen: H1884 (pACYC184) und H1884 (pACYC5.2).

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob *E. coli* H1884 (pACYC5.2) auch in eisenarmer Flüssigkultur, die Ybt enthält, ein besseres Wachstum als der Ausgangsstamm H1884 (pACYC184) zeigt. Beide Stämme wurden in NB-Medium ÜN angezogen. NBD-Medium mit Ybt-haltigem Kulturüberstand (1:50) wurde mit den ÜN-Kulturen so angeimpft, daß die Ausgangs-OD₆₀₀ bei 0,05 lag. Messung der OD₆₀₀ zu verschiedenen Zeitpunkten zeigte, daß H1884 (pACYC5.2) in Ybt-haltigem NBD-Medium eine wesentlich höhere OD₆₀₀ (ca. 0,45) erreichte als H1884 (pACYC184) (ca. 0,1) (Abb. 19).

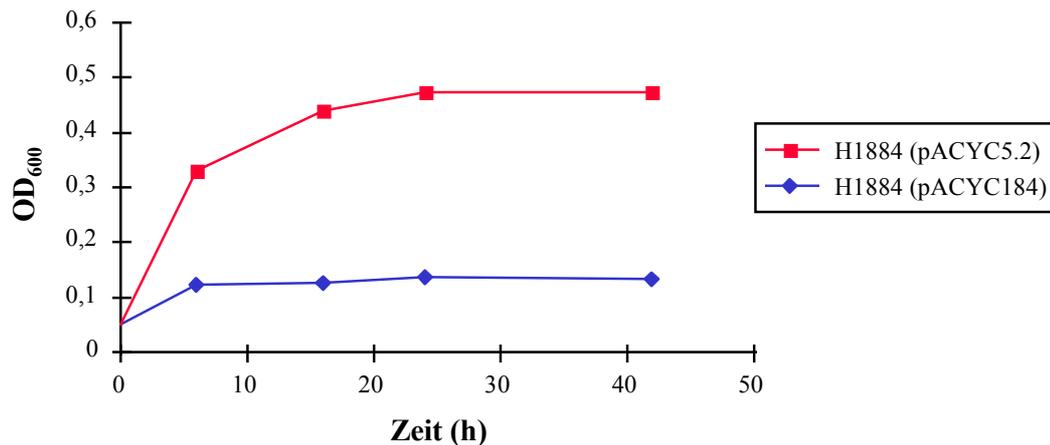


Abb. 19: Wachstumskurve von *E. coli* Stämmen: H1884 (pACYC184) (blau) und H1884 (pACYC5.2) (rot) in NBD-Medium mit Ybt-haltigem Kulturüberstand (1:50).

6.2 Ybt-vermitteltes Wachstum in *Y. enterocolitica* NF-O (pACYC5.2)

Um zu untersuchen, ob Irp6, Irp7 und FyuA auch in einer nicht-pathogenen, HPI-negativen *Yersinia* für die Ybt-Aufnahme ausreichend sind, wurden sowohl Plasmid pACYC5.2 (*irp6*, *irp7*, *fyuA*) als auch der Ausgangsvektor pACYC184 in *Y. enterocolitica* O:5, BG 1A, Stamm NF-O transformiert. Die resultierenden Stämme NF-O (pACYC5.2) und NF-O (pACYC184) wurden - analog zu dem Versuch mit *E. coli* H1884 - auf Ybt-vermitteltes Wachstum hin untersucht.

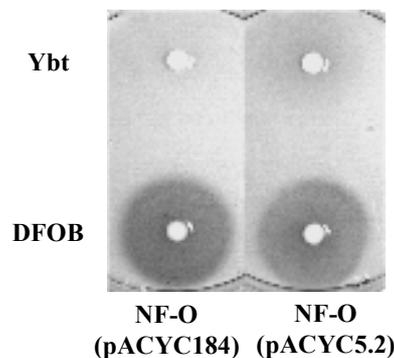


Abb. 20: Fütterung mit Yersiniabaktin (Ybt) und Desferrioxamin B (DFOB) von den in CDM-H-Agar eingegossenen *Y. enterocolitica* BG 1A Stämmen: NF-O (pACYC184) und NF-O (pACYC5.2).

NF-O (pACYC5.2) zeigte - im Vergleich zu NF-O (pACYC184) - kein signifikantes Wachstum nach Zugabe von Ybt (Abb. 20). Die Zugabe von Desferrioxamin B, das über den TonB-abhängigen Rezeptor FoxA aufgenommen wird (Bäumler & Hantke, 1992), führte bei beiden Stämmen zu großen Wachstumshöfen. Diese Kontrolle zeigt, daß der TonB-abhängige

Siderophortransport in NF-O funktionell ist. Das Ausbleiben des Wachstumshofes nach Zugabe von Ybt ist somit nicht auf einen Defekt in TonB zurückzuführen.

6.3 Expression bzw. Transkription von *fyuA* bzw. *irp6,irp7*

Da sich *E. coli* H1884 (pACYC5.2), nicht aber *Y. enterocolitica* NF-O (pACYC5.2) mit Ybt füttern ließ, stellte sich die Frage, ob eine unterschiedliche Expression der *fyuA*-, *irp6*- oder *irp7*-Gene in den Stämmen vorliegt.

6.3.1 Expression von *fyuA*

Zur Untersuchung der *fyuA* Expression in *Y. enterocolitica* NF-O (pACYC5.2) und *E. coli* H1884 (pACYC5.2) wurden diese Stämme ÜN in eisenarmem CDM-H-Flüssigmedium angezogen. Gleiche Mengen an Zellysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und anschließend mit FyuA-Antikörpern detektiert (s. B.9.2). WA-C diente als Positivkontrolle, NF-O (pACYC184) und H1884 (pACYC184) als Negativkontrollen. Der Immunoblot zeigte, daß NF-O (pACYC5.2) und H1884 (pACYC5.2) FyuA in gleichen Mengen synthetisieren, jedoch in geringerer Menge als WA-C, was auf das Fehlen des transkriptionellen Aktivators YbtA in den beiden Stämmen zurückzuführen sein könnte (Abb. 21).

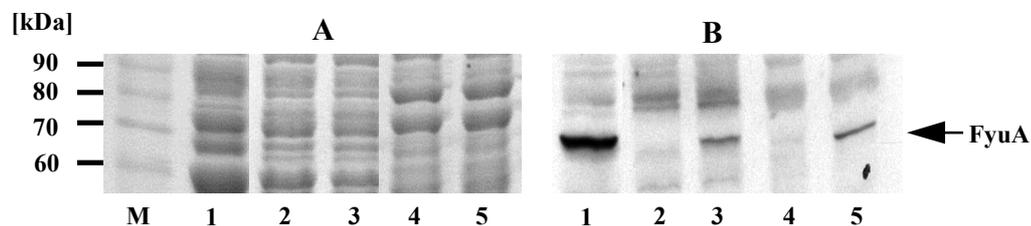


Abb. 21: Nachweis der *fyuA* Expression. A. SDS-PAGE und B. korrespondierender FyuA-Immunoblot. M. Marker; 1. WA-C; 2. NF-O (pACYC184); 3. NF-O (pACYC5.2); 4. H1884 (pACYC184); 5. H1884 (pACYC5.2). Der schwarze Pfeil deutet auf die FyuA-Bande.

6.3.2 Funktionalität von FyuA

Da FyuA nicht nur der TonB-abhängige Rezeptor für Ybt ist, sondern auch als Rezeptor für Pestizin dient, kann die Funktionalität von FyuA mit Hilfe des Pestizinassays überprüft werden (s. B.7). Die Zugabe von Pestizin führt bei Stämmen, die einen funktionellen FyuA-Rezeptor exprimieren können, zu Lysehöfen im Bakterienrasen. WA-C, NF-O (pACYC184), NF-O (pACYC5.2), H1884 (pACYC184) und H1884 (pACYC5.2) wurden im Pestizinassay untersucht. Während H1884 (pACYC184) und NF-O (pACYC184) Pestizin resistent waren, zeigten die Stämme H1884 (pACYC5.2) und NF-O (pACYC5.2) sowie die Positivkontrolle

WA-C Lysehöfe nach erfolgter Pestizinzugabe (Abb. 22). Dies zeigt, daß der Rezeptor FyuA sowohl in H1884 (pACYC5.2) als auch in NF-O (pACYC5.2) funktionell ist.

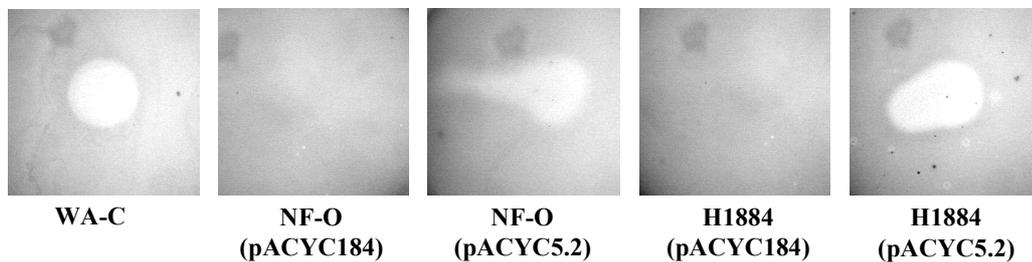


Abb. 22: Nachweis der FyuA-Funktionalität mittels Pestizinassay. Im Unterschied zu den Negativkontrollen NF-O (pACYC184) und H1884 (pACYC184), weisen die Positivkontrolle WA-C sowie NF-O (pACYC5.2) und H1884 (pACYC5.2) deutlich sichtbare Lysehöfe auf.

6.3.3 Transkription von *irp6,irp7*

Da keine Antikörper gegen Irp6 und Irp7 vorhanden waren, wurde die Transkription der korrespondierenden Gene in H1884 (pACYC5.2) und NF-O (pACYC5.2) untersucht. Beide Stämme sowie Kontrollstämme H1884 (pACYC184) und NF-O (pACYC184) (Negativkontrollen) als auch die Positivkontrolle WA-C wurden ÜN in CDM-H-Flüssigmedium angezogen und die RNS isoliert. Anschließend wurde eine RT-PCR (Primerpaar ybtA6451-ybtA355) durchgeführt, deren 350 bp Produkt das 3'-Ende von *irp6* und den Anfang von *irp7* beinhaltet.

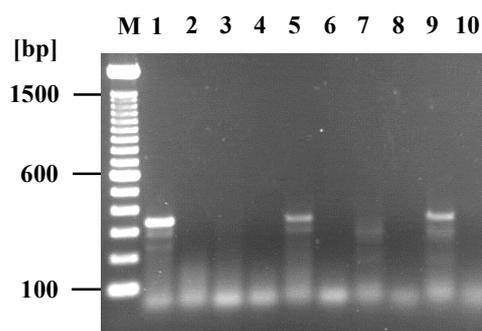


Abb. 23: Nachweis der *irp6,irp7* Transkription mittels RT-PCR. M. Marker; 1. WA-C, RT+; 2. WA-C, RT-; 3. NF-O (pACYC184), RT+; 4. NF-O (pACYC184), RT-; 5. NF-O (pACYC5.2), RT+; 6. NF-O (pACYC5.2), RT-; 7. H1884 (pACYC184), RT+; 8. H1884 (pACYC184), RT-; 9. H1884 (pACYC5.2), RT+; 10. H1884 (pACYC5.2), RT-. RT+: mit Reverse Transkriptase, RT-: ohne Reverse Transkriptase.

In dieser RT-PCR ergaben die RNS von NF-O (pACYC5.2), H1884 (pACYC5.2) und der Positivkontrolle WA-C das erwartete 350 bp Produkt, während die RT-PCR mit RNS von NF-O (pACYC184) und H1884 (pACYC184) negativ blieb (Abb. 23). Die Kontrollansätze der RT-PCR ohne Reverse Transkriptase waren bei allen Stämmen negativ, was eine Kontamination durch DNS ausschließt. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Gene *irp6* und *irp7* sowohl in H1884 (pACYC5.2) als auch in NF-O (pACYC5.2) transkribiert werden.

7. Expression der Ybt-Synthesegene und des Rezeptorgens in *Y. enterocolitica*

Die Promotoren der HPI core-Gene besitzen eine Fur-Box (FBS), eine hochkonservierte DNS-Sequenz, die in der Promotorregion eisenregulierter Gene liegt (Carniel *et al.*, 1992; Heesemann *et al.*, 1993; Staggs *et al.*, 1994). Bei hoher intrazellulärer Fe^{2+} -Konzentration bindet das Fur-Protein zusammen mit Fe^{2+} an die Fur-Box und inhibiert so die Transkription stromabwärts liegender Gene (Escobar *et al.*, 1999; Hantke, 1981). Ist die Fe^{2+} -Konzentration in der Zelle gering, dissoziiert Fe^{2+} von Fur und Fur kann durch eine Konformationsänderung nicht länger an die Fur-Box binden. Fur und Fur-Box bilden somit einen effizienten Regulationsmechanismus bei Genen, die an der Eisenversorgung der Zelle beteiligt sind.

Die Promotoren des Synthesegens *irp2* und des Rezeptorgens *fyuA* besitzen neben der Fur-Box auch repetitive Sequenzen (RS) (Abb. 24B). Es wird angenommen, daß der Komplex aus eisenhaltigem Yersiniabaktin (Fe-Ybt) und dem AraC-Typ Regulator YbtA an diese RS bindet und - unter der Voraussetzung des Eisenmangels in der Zelle - zu einer starken Expression der Gene führt (Fetherston *et al.*, 1996).

Da aufgrund dieses Modells intrazelluläres Fe-Ybt für die *irp2* und *fyuA* Expression benötigt wird, sollte das Ybt-Transportsystem, bestehend aus Irp6, Irp7 und FyuA, indirekt an der Regulation der Ybt-Synthese (Expression von *irp2*) und der *fyuA* Expression beteiligt sein (Abb. 24). Auch Irp8, das Sequenzähnlichkeit zu einer Permease (AmpG) aufweist, könnte an der Regulation beteiligt sein (Lindquist *et al.*, 1993).

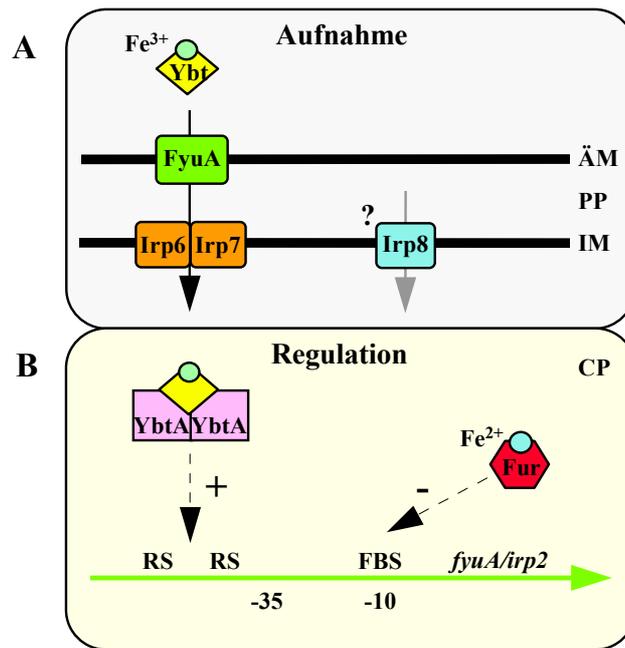


Abb. 24: A. Modell der Fe-Ybt Aufnahme (grau hinterlegt). Der schwarze Pfeil symbolisiert den Fe^{3+} -Ybt-Transport über den Rezeptor FyuA und die ABC-Transporter Irp6 und Irp7, der graue Pfeil den möglichen Fe^{3+} -Ybt-Transport durch die Permease Irp8. ÄM: äußere Membran, PP: Periplasma, IM: innere Membran. **B. Modell für die Regulation der Gene *fyuA* und *irp2*** (gelb hinterlegt). Der grüne Pfeil symbolisiert die Promotorregion von *fyuA* und *irp2*. Schwarze gestrichelte Pfeile stellen die Bindung von Fe^{3+} -Ybt-YbtA an die repetitiven Sequenzen (RS) bzw. die Bindung von Fe^{2+} -Fur an die Fur-Box (FBS) und die daraus resultierende Aktivierung (+) bzw. Inhibition (-) der Transkription dar. CP: Zytoplasma.

7.1 Fütterung von WA-CS *irp1::Kan^r* mit verschiedenen Kulturüberständen

Um die Ybt-Synthese von WA-C und den verschiedenen Mutanten zu untersuchen, wurden die Stämme in NBD-Eisenmangelmedium angezogen und nach 24 h die Kulturüberstände sterilfiltriert (s. 6.1). Der Ybt-defiziente Indikatorstamm WA-CS *irp1::Kan^r* (Mutation in Ybt-Synthesegen) wurde in CDM-H-Agar eingegossen und mit diesen Kulturüberständen gefüttert.

Tab. 11: Ybt-Produktion von *Y. enterocolitica* WA-C und Mutanten.

Stamm	Fütterung von WA-CS <i>irp1::Kan^r</i> mit Überständen
WA-C	+
WA-C $\Delta irp6, irp7$	+
WA-C $\Delta irp6$	+
WA-C $\Delta irp7$	+
WA-CS <i>irp7::Kan^r</i>	+
WA-CS $\Delta irp6, irp7, irp8::Kanr$	+
WA-CS <i>irp8::Kan^r</i>	+
WA-CS <i>irp1::Kan^r</i>	-
WA <i>fyuA2</i>	-

Die Überstände von WA-C, WA-C $\Delta irp6, irp7$, WA-C $\Delta irp6$, WA-C $\Delta irp7$, WA-CS $irp7::Kan^r$, WA-CS $irp8::Kan^r$ und WA-CS $\Delta irp6, irp7, irp8::Kan^r$ konnten ein verstärktes Wachstum des Indikatorstammes hervorrufen, während der Überstand von WA-CS $irp1::Kan^r$ - wie erwartet - nicht wachstumsfördernd wirkte (Tab. 11). Der Überstand der *fyuA*-Mutante konnte ebenfalls kein verstärktes Wachstum hervorrufen.

7.2 HMWP-Synthese

Eine Möglichkeit, die Expression der Ybt-Synthesegene zu untersuchen, ist die Darstellung und Semiquantifizierung der High Molecular Weight Proteins (HMWP) in der SDS-PAGE (Pelludat *et al.*, 1998). HMWP1 und HMWP2 (kodiert von den Genen *irp1* und *irp2*) werden in *Y. enterocolitica* nur bei Eisenmangel gebildet (Carniel *et al.*, 1987). In der SDS-PAGE zeigen sie ein Molekulargewicht von 240 kDa (HMWP1) und 190 kDa (HMWP2).

WA-C, WA-CS $irp1::Kan^r$, WA *fyuA2*, WA-C $\Delta irp6, irp7$ und WA-CS $irp8::Kan^r$ wurden 48 h in NBD-Eisenmangelmedium angezogen. Die Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE (7%) aufgetrennt und mit ROTI-Blue gefärbt (s. B.6.5).

WA *fyuA2* synthetisiert HMWP1 und HMWP2 in sehr geringen Mengen, die *irp1*-Mutante HMWP1 nicht und HMWP2 nur sehr schwach (Pelludat *et al.*, 1998). Bei WA-C, WA-C $\Delta irp6, irp7$ und WA-CS $irp8::Kan^r$ hingegen sind beide HMWP-Banden in der SDS-PAGE deutlich sichtbar (Abb. 25). Auch bei den Einfachmutanten WA-C $\Delta irp6$, WA-C $\Delta irp7$ und WA-CS $irp7::Kan^r$ zeigen sich beide HMWP (Ergebnisse nicht gezeigt).

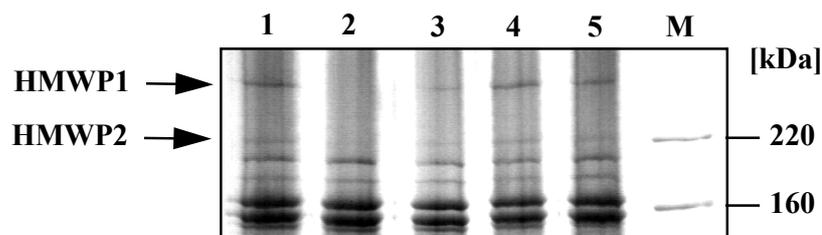


Abb. 25: Synthese der HMWP. SDS-PAGE (7%) mit Gesamtzelllysaten von 1. WA-C; 2. WA-CS $irp1::Kan^r$; 3. WA *fyuA2*; 4. WA-C $\Delta irp6, irp7$; 5. WA-CS $irp8::Kan^r$; M. Marker. Pfeile geben die Lage der HMWP an.

Die Ergebnisse dieser SDS-PAGE und der Fütterungsversuche mit Kulturüberständen stimmen somit überein. Die Stämme WA-C, WA-C $\Delta irp6, irp7$ und WA-CS $irp8::Kan^r$ synthetisieren bei Eisenmangel zwei essentielle Proteine der Ybt-Synthese (HMWP1 und HMWP2) und ihre Kulturüberstände können eine *irp1*-Mutante füttern, was auf die Synthese von Ybt hindeutet. Der Kulturüberstand der Negativkontrolle WA-CS $irp1::Kan^r$, die kein Ybt synthetisieren kann und in der SDS-PAGE nur eine schwache HMWP2- und keine HMWP1-

Bande zeigt, füttert nicht (Pelludat *et al.*, 1998). Der Überstand der *fyuA*-Mutante, für die gezeigt wurde, daß HMWP1 und HMWP2 nur sehr schwach exprimiert werden (Pelludat *et al.*, 1998), konnte WA-CS *irp1::Kan^r* ebenfalls nicht füttern.

7.3 Reporterstudien mit *irp2-gfp*

Um die Expression des Syntheseoperons *irp2-irp5* (s. Abb. 4A) in den verschiedenen Mutanten quantitativ zu untersuchen, wurde der *irp2*-Promotor mit dem Reporter gen *gfp* (green fluorescent protein) fusioniert. Dabei wurden die 188 bp stromaufwärts des *irp2*-Startkodons sowie die ersten drei Kodons von *irp2* aus WA-C mit dem Primerpaar 9585Hind/9782Bam amplifiziert, *Bam*HI/*Hind*III geschnitten und in das ebenfalls *Bam*HI/*Hind*III geschnittene Plasmid pCJFY5G3 (Jacobi, 1999) ligiert (Abb. 26). Plasmid pCJFY5G3 enthält eine translationelle Fusion von 153 bp stromaufwärts des *fyuA*-Startkodons sowie fünf Kodons des *fyuA*-Gens mit *gfp*. Durch die *Bam*HI/*Hind*III Klonierung wurde der *fyuA*-Promotor (pCJFY5G3) durch den *irp2*-Promotor (pGFP*irp2*) ersetzt. Das entstandene Plasmid pGFP*irp2* wurde mittels PCR (9585Hind/9782Bam), Restriktionsverdau (*Bam*HI/*Hind*III) und Sequenzierung überprüft.

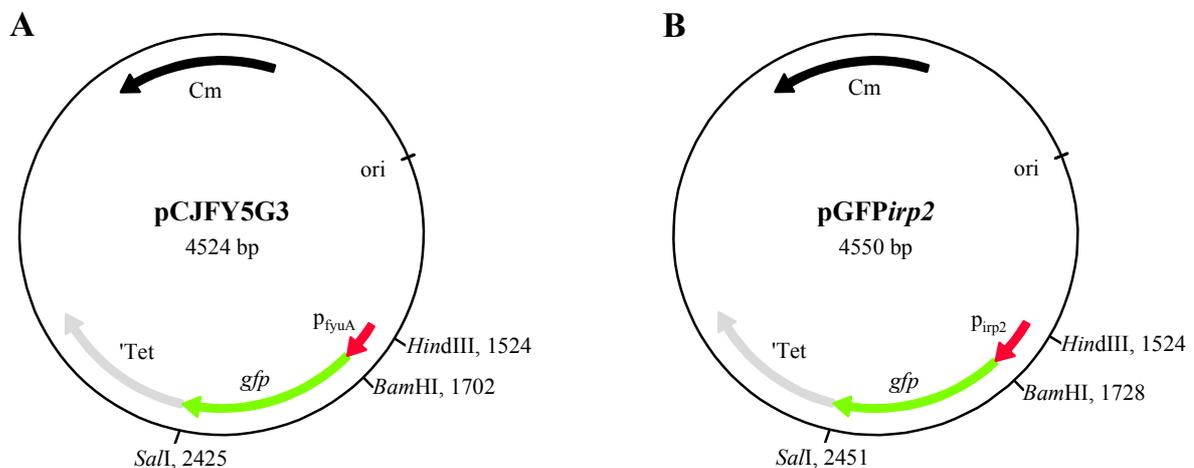


Abb. 26: Plasmide A. pCJFY5G3 (Jacobi, 1999) und B. pGFP*irp2*. Das Gen *gfp* ist als grüner, der *fyuA*- (P_{fyuA}) bzw. *irp2*- (P_{irp2}) Promotor als roter Pfeil dargestellt. Das Gen für die Tetracyclinresistenz ('Tet) (grauer Pfeil) wird durch die Insertion des *gfp*-Gens inaktiviert. Die Chloramphenicol-Resistenz (Cm) (schwarzer Pfeil) bleibt erhalten.

Y. enterocolitica WA-C, WA-CS *irp1::Kan^r*, WA-CS *irp8::Kan^r*, WA *fyuA2* und WA-C Δ *irp6,irp7* wurden mit pGFP*irp2* elektroporiert und die GFP-Fluoreszenz der Stämme in NB- und NBD-Medium gemessen. In eisenhaltigem NB-Medium ist die Expression von *irp2-gfp* durch die Eisen-Fur Repression sehr gering (Abb. 27). Unter

Eisenmangelbedingungen (NBD-Medium) ist die GFP-Fluoreszenz in WA-C, WA-CS *irp8::Kan^r* und WA-C Δ *irp6,irp7* stark erhöht, während sie in der *irp1*-Mutante - wie erwartet - weiterhin schwach bleibt. Die *fyuA*-Mutante zeigt im Gegensatz zur Ybt-Synthesemutante einen schwachen Anstieg der GFP-Fluoreszenz in eisenarmem NBD-Medium. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Inaktivierung des Ybt-Rezeptors (*fyuA*) zu einer starken Abnahme und die Inaktivierung der ABC-Transporter (*irp6,irp7*) zu einem Anstieg der *irp2* Expression führt.

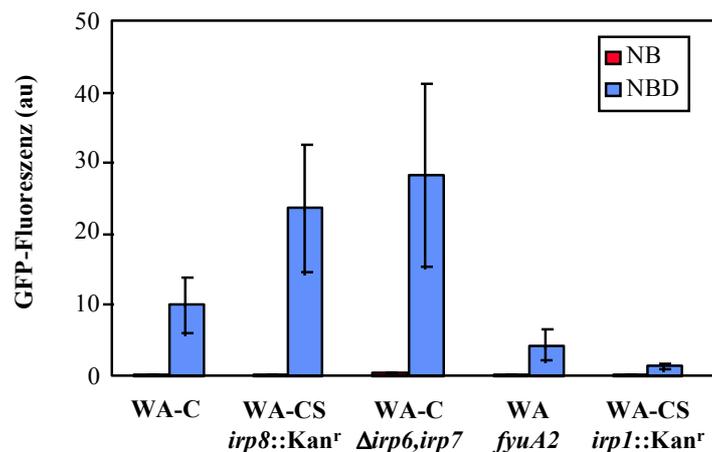


Abb. 27: *irp2-gfp* Expression. GFP-Fluoreszenz (arbitrary units [au]) von pGFP $irp2$ -tragenden *Y. enterocolitica* Stämmen (WA-C und Mutanten) angezogen in NB- (rot) und NBD- (blau) Medium. Die Graphik zeigt den Mittelwert aus fünf Meßreihen und die zugehörigen Standardabweichungen.

7.4 GFP-Messung zur Bestimmung der Ybt-Konzentration

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuche (Fütterung, HMWP-Synthese und *irp2-gfp* Expression) stimmen in den in Tab. 12 aufgeführten Stämmen - mit Ausnahme der *fyuA*-Mutante - überein. Der Kulturüberstand der *fyuA*-Mutante kann trotz schwacher HMWP-Synthese und *irp2-gfp* Expression die *irp1*-Mutante nicht füttern. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um ein Sensitivitätsproblem im Fütterungstest handelt, wurde die Ybt-Konzentration im Überstand der *fyuA*-Mutante bestimmt.

Die Ybt-Konzentration kann mit Hilfe des Indikatorstammes WA-CS *irp1::Kan^r* (pCJFY5G3), der das Reporterkonstrukt pCJFY5G3 (Jacobi, 1999; s. Abb. 26A) enthält, bestimmt werden. Gemäß dem Modell in Abb. 24 ist die GFP-Fluoreszenz Intensität, unter der Voraussetzung des Eisenmangels und der Anwesenheit des transkriptionellen Regulators YbtA, abhängig von der Ybt-Konzentration im Zytoplasma.

Um die Ybt-Konzentration in den Kulturüberständen von WA-C und WA *fyuA2* zu vergleichen, wurde WA-CS *irp1::Kan^r* (pCJFY5G3) in NBD-Medium mit unterschiedlichen Mengen beider Kulturüberstände angezogen und die GFP-Fluoreszenz gemessen. Die Titrationskurve zeigt, daß der Überstand von WA-C eine ca. 100-fach stärkere GFP-Fluoreszenz bewirkt als der Überstand von WA *fyuA2* (Abb. 28). Wahrscheinlich reicht die geringe Ybt-Konzentration im Kulturüberstand der *fyuA*-Mutante nur für eine schwache Stimulierung der HMWP-Synthese bzw. *irp2-gfp* Expression, nicht aber für die Fütterung der *irp1*-Mutante aus.

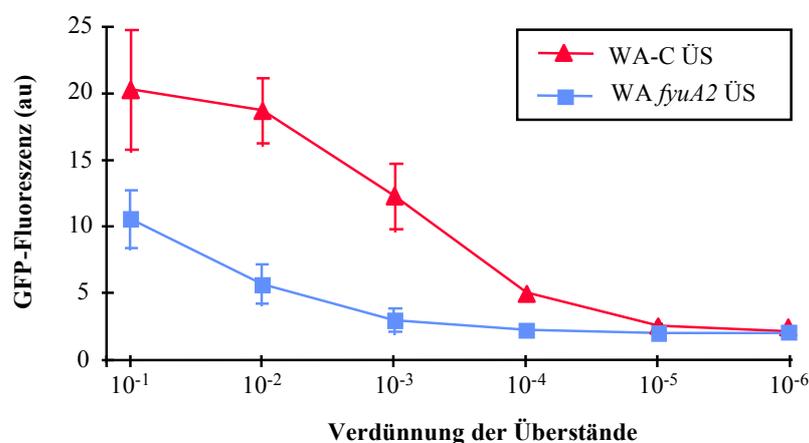


Abb. 28: Bestimmung der Ybt-Konzentration. GFP-Fluoreszenz (arbitrary units [au]) von *Y. enterocolitica* WA-CS *irp1::Kan^r* (pCJFY5G3) angezogen in NBD-Medium mit Kulturüberständen (ÜS) von WA-C (rot) und WA *fyuA2* (blau). Die Graphik zeigt den Mittelwert aus drei Meßreihen und die zugehörigen Standardabweichungen.

7.5 Reporterstudien mit *fyuA-gfp*

In einem weiteren Versuch wurde die *fyuA-gfp* Expression in WA-C und in verschiedenen Mutanten untersucht. Die Stämme, die Reporterkonstrukt pCJFY5G3 (s. Abb. 26A) besitzen, wurden in NB- sowie in eisenlimitiertem NBD-Medium angezogen und anschließend die GFP-Fluoreszenz gemessen (Abb. 29). In NB-Medium angezogene Stämme fluoreszierten nur sehr schwach, in NBD-Medium hingegen zeigten WA-C und die verschiedenen *irp6*, *irp7*- und *irp8*- Mutanten starke GFP-Fluoreszenz. Während die GFP-Fluoreszenz in WA-CS *irp8::Kan^r* so stark wie bei WA-C war, fluoreszierten WA-C Δ *irp6*, WA-C Δ *irp7*, WA-CS *irp7::Kan^r*, WA-C Δ *irp6,irp7* und WA-CS Δ *irp6,irp7,irp8::Kan^r* annähernd doppelt so stark wie der Ausgangsstamm. Wie bereits bekannt, zeigten die *fyuA*- und *irp1*-Mutante keine erhöhte GFP-Fluoreszenz (Pelludat, 1999).

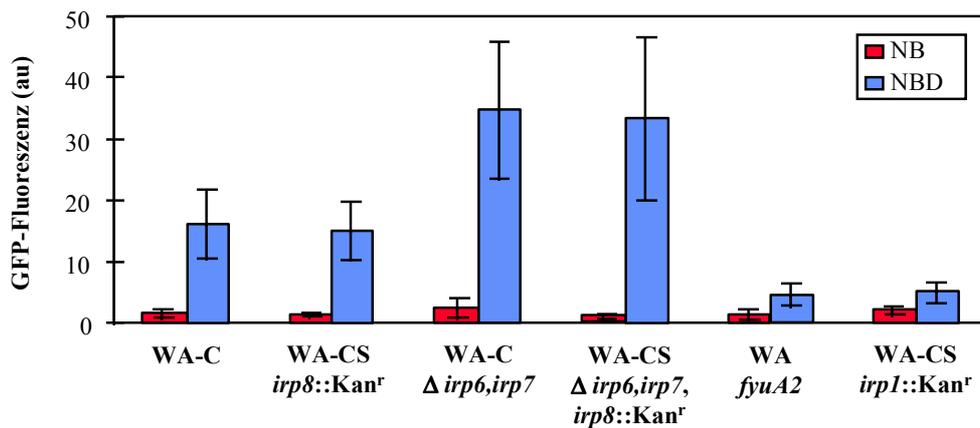


Abb. 29: *fyuA-gfp* Expression. GFP-Fluoreszenz (arbitrary units [au]) von pCJFY5G3-tragenden *Y. enterocolitica* Stämmen (WA-C und Mutanten) angezogen in NB- (rot) und NBD- (blau) Medium. Die Graphik zeigt den Mittelwert aus fünf Meßreihen und die zugehörigen Standardabweichungen.

Die Ergebnisse des Fütterungsversuches (s. C.7.1), der SDS-PAGE (HMWP; s. C.7.2) und der *irp2-gfp* Reporterstudie (s. C.7.3) stimmen somit mit der *fyuA-gfp* Reporterstudie überein (s. Tab. 12): *irp6*-, *irp7*- und *irp8*-Mutanten können sowohl die HMWP und Ybt synthetisieren als auch *irp2-gfp* und *fyuA-gfp* stark exprimieren. Die Mutation in *fyuA* hingegen führt zu verminderter HMWP- und Ybt-Synthese und auch zu verringerter *irp2-gfp* und *fyuA-gfp* Expression. Der Rezeptor FyuA könnte daher für die Hochregulation der Ybt-Synthese und *fyuA*-Expression notwendig sein.

Tab. 12: Zusammenfassung der Regulationsstudien

Stamm	Fütterung von WA-CS <i>irp1::Kan^r</i> mit ÜS	HMWP1/HMWP2-Expression	Hochregulation in NBD-Medium von <i>irp2-gfp</i>	Hochregulation in NBD-Medium von <i>fyuA-gfp</i>
WA-C	+	+/+	+	+
WA-C $\Delta irp6,irp7^*$	+	+/+	++	++
WA-CS <i>irp8::Kan^r</i>	+	+/+	+	+
WA-CS <i>irp1::Kan^r</i>	-	-/(+)	-	-
WA <i>fyuA2</i>	-	(+)/(+)	(+)	-

* *irp6*- und *irp7*-Einzelmutanten verhielten sich in allen Versuchen wie die Doppelmutante WA-C $\Delta irp6,irp7$.

7.6 CAS-Phänotyp und *fyuA-gfp* Expression unter CAS-Agar-Bedingungen

Mit Hilfe des CAS-Siderophorindikatoragars können Bakterien auf die Produktion von Siderophoren hin getestet werden. Der Farbstoff Chromazurol S (CAS) bildet mit Fe^{3+} einen blau-grünen Komplex. Siderophorproduktion führt zum Eisenentzug des Agars und zu einem gelb-orangen Hof um die Kolonien.

WA-C und die verschiedenen Mutanten wurden auf CAS-Agar ausgestrichen und die Hofbildung nach 24 h dokumentiert (s. B.6.3).

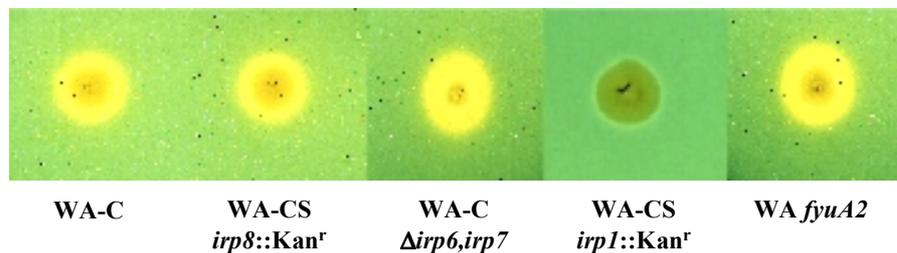


Abb. 30: Nachweis der Siderophorproduktion von *Y. enterocolitica* Stämmen (WA-C und Mutanten) auf CAS-Agar. Siderophorproduktion führt zu einem gelb-orangen Hof um die Bakterienkolonie (CAS-positiv).

Während der Hof der *irp8*-Mutante vergleichbar mit dem von WA-C war, bildeten die unterschiedlichen *irp6*-, *irp7*-Mutanten (WA-C $\Delta irp6, irp7$, WA-C $\Delta irp6$, WA-C $\Delta irp7$, WA-CS *irp7::Kan^r* und WA-CS $\Delta irp6, irp7, irp8::Kan^r$) einen vergrößerten Hof (bezogen auf die Koloniegröße), was auf eine Ybt-Überproduktion dieser Stämme hinweist (Abb. 30). Die Synthesemutante WA-CS *irp1::Kan^r* bildete keinen Hof (Pelludat *et al.*, 1998). Der CAS-Phänotyp (Produktion von Ybt) stimmt also mit den Ergebnissen aus dem Fütterungstest überein: CAS-positive Stämme bilden Ybt und sind somit in der Lage den Indikatorstamm WA-CS *irp1::Kan^r* zu füttern. Eine Ausnahme bildet die *fyuA*-Mutante, mit deren NBD-Kulturüberstand der Indikatorstamm nicht gefüttert werden konnte, obwohl bereits seit langem bekannt ist, daß *fyuA*-Mutanten einen vergrößerten CAS-Hof bilden (Pelludat, 1999; Rakin *et al.*, 1994). Aufgrund dieses unerwarteten und widersprüchlichen Ergebnisses wurde die *fyuA-gfp* Expression von WA *fyuA2* auf CAS-Agar untersucht.

Die Stämme wurden 24 h auf CAS-Agar-Platten angezogen, die Kolonien in PBS resuspendiert und die GFP-Fluoreszenz gemessen (Abb. 31). Die CAS-negative *irp1*-Mutante zeigte, wie auch in NBD-Medium, keine erhöhte GFP-Fluoreszenz. Der Wildtyp WA-C und die verschiedenen *irp6, irp7*- und *irp8*-Mutanten zeigten erhöhte GFP-Fluoreszenz. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in NBD-Medium (s. Abb. 29) zeigte die auf CAS-Agar angezogene *fyuA*-Mutante einen Anstieg der GFP-Fluoreszenz. Dies läßt vermuten, daß der CAS-Agar Substanzen enthält, die eine erhöhte Expression von *fyuA-gfp* trotz inaktiviertem Rezeptor bewirken.

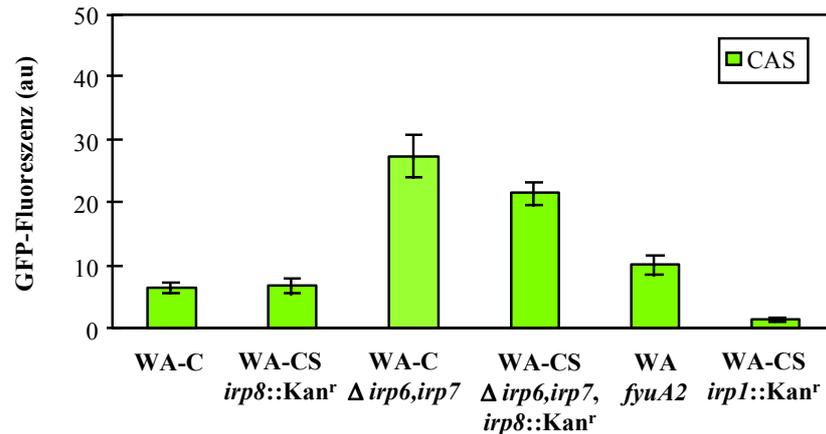


Abb. 31: *fyuA-gfp* Expression auf CAS-Agar. GFP-Fluoreszenz (arbitrary units [au]) von pCJFY5G3-tragenden *Y. enterocolitica* Stämmen (WA-C und Mutanten) angezogen auf CAS-Agar. Die Graphik zeigt den Mittelwert aus drei Meßreihen und die zugehörigen Standardabweichungen.

Um dieses näher zu untersuchen, wurde WA *fyuA2* (pCJFY5G3) in NBD-Medium unter Zusatz der verschiedenen Komponenten des CAS-Agars (HDTMA-CAS-FeCl₃, CAS-FeCl₃ oder CAS) und zusätzlich mit Fe-Citrat angezogen und nach 24 h die GFP-Fluoreszenz gemessen.

Tab. 13: GFP-Fluoreszenz in arbitrary units (au) von WA *fyuA2* (pCJFY5G3) in NBD-Medium mit verschiedenen Zusätzen.

Zusatz	GFP-Fluoreszenz [au]
-	5,5 (1,4) [†]
HDTMA [°]	-
HDTMA, CAS, FeCl ₃ *	15,1 (3,8)
CAS, FeCl ₃ *	9,4 (1,6)
CAS*	5,5 (0,7)
Fe-Citrat*	9,7 (0,8)

[†] Standardabweichungen in Klammern. [°] HDTMA (N-Hexadecyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid, 20 µM oder 200 µM) hatte einen letalen Effekt auf die Bakterien. * HDTMA (200µM); CAS (Chromazurol S, 60,5 mg/L); FeCl₃ (10µM); Fe-Citrat (10 µM).

Wie aus Tab. 13 ersichtlich, bewirkt der Zusatz des Komplexes aus dem kationischen Detergens HDTMA, dem Eisenindikatorfarbstoff CAS und FeCl₃ eine dreifach erhöhte Induktion von *fyuA-gfp* in der *fyuA*-Mutante gegenüber NBD-Medium ohne Zusätze. Mit CAS-FeCl₃ und Fe-Citrat wurde ebenfalls eine Hochregulation beobachtet. Der Farbstoff CAS allein hatte keinen Einfluß auf die Fluoreszenz. Der Zusatz von HDTMA (20 µM oder 200 µM) hatte einen letalen Effekt auf die Bakterien. Eine Rezeptormutante kann somit nach Zugabe von CAS-Agar Komponenten zu NBD-Medium *fyuA-gfp* hochregulieren. Dies läßt

vermuten, daß der Rezeptor weder für die *fyuA*-Hochregulation noch für die Ybt-Synthese im Sinne eines Signaltransducers unbedingt erforderlich ist.

8. *irp6/ybtP-ybtA*-Promotorregion in der Yen- und Yps-HPI

Die HPI besteht aus einem “core”-Teil und einem AT-reichen Teil (Rakin *et al.*, 1999a). Aufgrund des variablen AT-reichen Teils kann man zwei evolutionäre Linien unterscheiden: die Yen-HPI in *Y. enterocolitica* 1B und die Yps-HPI in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* (Rakin *et al.*, 1995). Der “core”-Teil hingegen ist - mit Ausnahme der *ybtA*-Promotorregion - bei beiden evolutionären Linien hochkonserviert (98% Sequenzähnlichkeit). Die *ybtA*-Promotorregion überlappt mit der Promotorregion des *irp6-9* Operons, das in entgegengesetzter transkriptioneller Richtung zu *ybtA* liegt (s. Abb. 4A). Auch diese Promotorregion der HPI besitzt eine Fur-Box (FBS) und repetitive Sequenzen (RS1 und RS2), die vermutlich die Bindungsstelle für den transkriptionellen Regulator YbtA darstellen (Abb. 32).

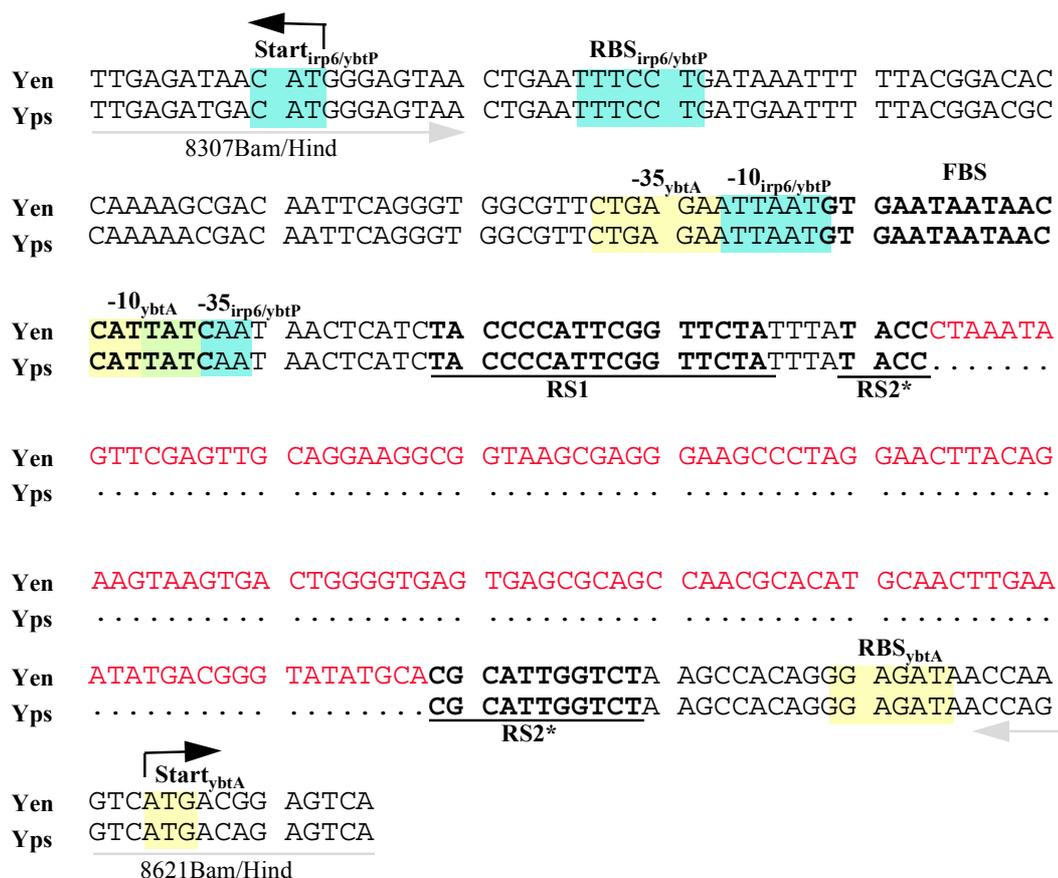


Abb. 32: Promotor-Operator-Region zwischen *irp6* (in *Y. pestis* als *ybtP* bezeichnet) und *ybtA* in Yen- und Yps-HPI. Die Fur-Box (FBS) ist dick gedruckt, die repetitiven Sequenzen (RS) unterstrichen. Startcodons (Start), mögliche Ribosomenbindungsstellen (RBS) und die -35 und -10 Regionen sind farblich unterlegt (blau: *irp6/ybtP*; gelb: *ybtA*). Die Bindungsstellen für die Primer (8307Bam/Hind und 8621Bam/Hind) sind als graue Pfeile dargestellt. Die Sequenz des ERIC-Elements in der Yen-HPI ist rot hervorgehoben.

Im Gegensatz zur Yps-HPI besitzt die *irp6-ybtA*-Promotor-Operator-Region der Yen-HPI eine 125 bp Insertion (ERIC-Element) in der zweiten repetitiven Sequenz. Dadurch könnte die mögliche Bindungsstelle für den AraC-Typ Regulator YbtA verändert werden, was zu einer unterschiedlichen Expression von *ybtA* und dem *irp6-9* (in *Y. pestis* als *ybtP-S* bezeichnet) Operon in der Yen- und Yps-HPI führen kann.

8.1 Reporterstudien mit *irp6/ybtP-gfp* in *Y. enterocolitica*

Um die Regulation von *irp6-9* zu untersuchen, wurde die Promotor-Operator-Region des Operons vor *gfp* kloniert. Dazu wurden die 302 bp stromaufwärts von *irp6* und die ersten 4 Kodons von *irp6* mit dem Primerpaar 8307Bam-8621Hind aus *Y. enterocolitica* WA-C amplifiziert und das PCR-Produkt *Bam*HI/*Hind*III geschnitten. Das Plasmid pCJFY5G3, das die *fyuA-gfp* Fusion enthält, wurde ebenfalls *Bam*HI/*Hind*III geschnitten, so daß der *fyuA*-Promotor deletiert wurde. Die Ligation von *Bam*HI/*Hind*III geschnittenem PCR-Produkt und *Bam*HI/*Hind*III geschnittenem Plasmid pCJFY5G3 resultierte in Plasmid pGFP*irp6*_{Yen}, das mittels PCR (8307Bam-8621Hind) und Restriktionsverdau (*Bam*HI/*Hind*III) überprüft wurde. Die Sequenzierung der Promotorregion und der ersten 20 bp des *gfp*-Gens bestätigte die in-frame Fusion von *gfp* mit dem *irp6-9* Promotor, der keine Mutationen aufwies.

Das Plasmid pGFP*irp6*_{Yen} wurde in WA-C, WA-CS *irp1*::Kan^r, WA-CS *ybtA*::Kan^r, WA *fyuA2* und WA-C Δ *irp6,irp7* elektroporiert. Die Stämme wurden in NB- und NBD-Medium angezogen und nach 24 h die GFP-Fluoreszenz gemessen (Abb. 33). Im Vergleich zu den Stämmen mit pCJFY5G3 (*fyuA-gfp*) (Abb. 29) sind die Meßwerte wesentlich niedriger, d.h. die Expression von *irp6-9* ist sehr viel schwächer (ca. Faktor 10) als die von *fyuA*. Jedoch zeigt sich auch hier der deutliche Unterschied zwischen NB- und NBD-Medium. Der Promotor des *irp6-9* Operons scheint somit - wie aufgrund seiner Fur-Box zu erwarten - durch eine hohe Eisenkonzentration im Medium reprimiert zu werden. Die Stämme WA-CS *irp1*::Kan^r, WA-CS *ybtA*::Kan^r, WA *fyuA2* und WA-C Δ *irp6,irp7*, die das Reporterkonstrukt pGFP*irp6*_{Yen} tragen, zeigen bei Messung der GFP-Fluoreszenz nach Wachstum in NB- und NBD-Medium die gleiche Tendenz wie pCJFY5G3- (*fyuA*-Promotor) tragende Stämme: *irp6*_{Yen}-*gfp* ist in der *irp1*-, *fyuA*- und *ybtA*-Mutante in NBD-Medium nicht hochreguliert, während es in der *irp6,irp7*-Mutante sogar die Expression im Wildtyp übertrifft (Abb. 33).

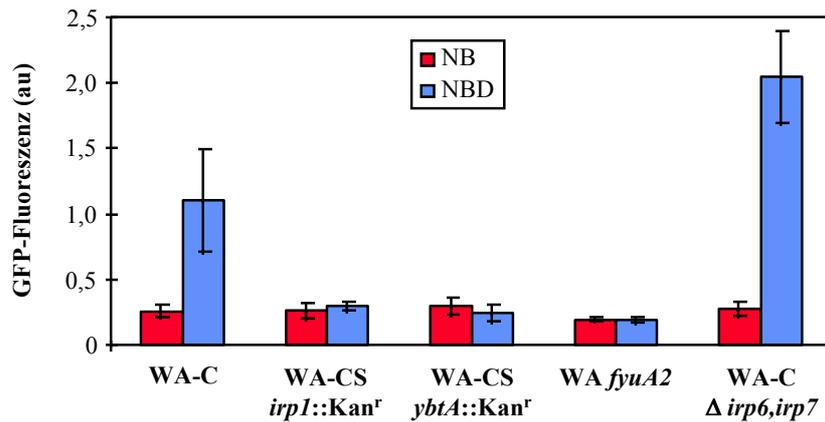


Abb. 33: *irp6_{Yen}-gfp* Expression. GFP-Fluoreszenz (arbitrary units [au]) von pGFP*irp6_{Yen}*-tragenden *Y. enterocolitica* Stämmen (WA-C und Mutanten) angezogen in NB- und NBD-Medium. Die Graphik zeigt den Mittelwert aus fünf Meßreihen und die zugehörigen Standardabweichungen.

Zur Prüfung, ob das 125 bp ERIC-Element in der *irp6*-Promotorregion der Yen-HPI einen Einfluß auf die *irp6-9* Expression hat, wurde die Promotorregion des *ybtP-S* Operons der Yps-HPI (*ybtP_{Yps}*) (besitzt kein ERIC-Element) ebenfalls vor *gfp* kloniert. Dazu wurden 177 bp stromaufwärts von *ybtP* und die ersten 4 Kodons von *ybtP* mit dem Primerpaar 8307YpsBam-8621YpsHind aus *Y. pestis* KUMA amplifiziert, *Bam*HI/*Hind*III geschnitten und in pCJFY5G3 kloniert. Das entstandene Plasmid, pGFP*ybtP_{Yps}*, wurde mittels PCR (8307YpsBam-8621YpsHind) und Restriktionsverdau (*Bam*HI/*Hind*III) überprüft. Nach Sequenzierung des Promotorbereichs wurde pGFP*ybtP_{Yps}* in WA-C elektroporiert.

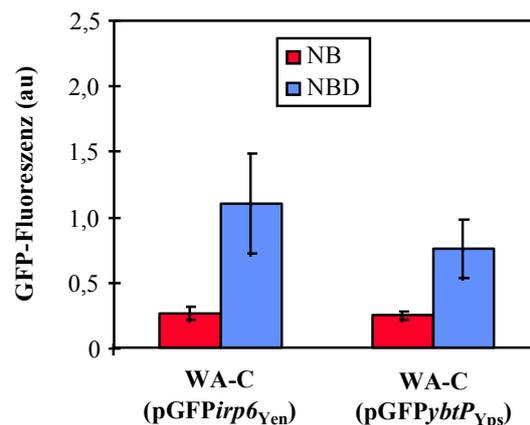


Abb. 34: *irp6/ybtP-gfp* Expression. GFP-Fluoreszenz (arbitrary units [au]) von pGFP*irp6_{Yen}*- und pGFP*ybtP_{Yps}*-tragendem *Y. enterocolitica* Stamm WA-C angezogen in NB- und NBD-Medium. Die Graphik zeigt den Mittelwert aus fünf Meßreihen und die zugehörigen Standardabweichungen.

WA-C (pGFP*irp6_{Yen}*) und WA-C (pGFP*ybtP_{Yps}*) wurden in NBD-Medium angezogen und die GFP-Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenz von WA-C (pGFP*irp6_{Yen}*) und WA-C

(pGFPybtP_{Yps}) war annähernd gleich. Dies zeigt, daß das ERIC-Element keinen signifikanten Einfluß auf die *irp6-9* Expression hat (Abb. 34).

8.2 Reporterstudien mit *ybtA-gfp* in *Y. enterocolitica*

Die Ergebnisse von Fetherston *et al.* (1996) weisen darauf hin, daß der transkriptionelle Regulator YbtA in *Y. pestis* die Expression seines eigenen Gens reprimiert (negative Autoregulation). Um die Regulation von YbtA in *Y. enterocolitica* zu untersuchen, wurde die *ybtA*_{Yen}-Promotorregion vor *gfp* kloniert. 302 bp stromaufwärts von *ybtA* und die ersten 4 Kodons von *ybtA* wurden mit dem Primerpaar 8307Hind-8621Bam aus WA-C amplifiziert, *Bam*HI/*Hind*III geschnitten und in pCJFY5G3 kloniert. Das entstandene Plasmid pGFPybtA_{Yen} wurde mittels PCR (8307Hind-8621Bam) und Restriktionsverdau (*Bam*HI/*Hind*III) überprüft und die *ybtA*_{Yen}-Promotorregion sequenziert. Dann wurde das Plasmid pGFPybtA_{Yen} in die verschiedenen *Y. enterocolitica* Stämme elektroporiert. Die pGFPybtA_{Yen}-haltigen Stämme WA-C (pGFPybtA_{Yen}), WA-CS *irp1*::Kan^r (pGFPybtA_{Yen}), WA-CS *ybtA*::Kan^r (pGFPybtA_{Yen}), WA *fyuA2* (pGFPybtA_{Yen}) und WA-C Δ *irp6,irp7* (pGFPybtA_{Yen}) wurden 24 h in NB- und NBD-Medium angezogen und anschließend die GFP-Fluoreszenz gemessen.

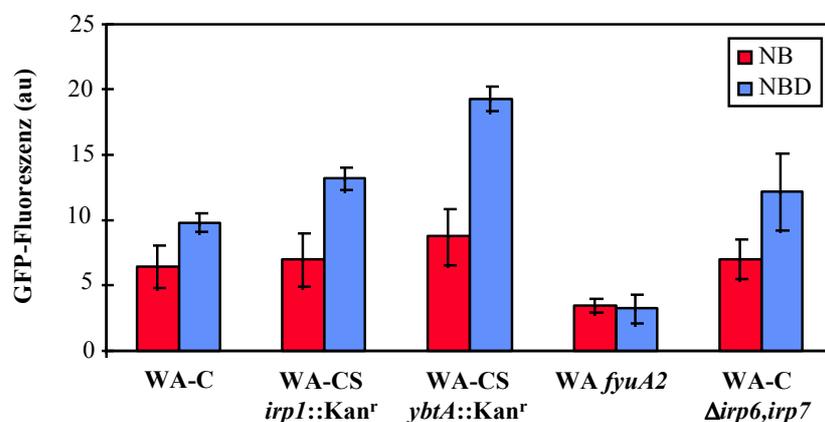


Abb. 35: *ybtA*_{Yen}-*gfp* Expression. GFP-Fluoreszenz (arbitrary units [au]) von pGFPybtA_{Yen}-tragenden *Y. enterocolitica* Stämmen (WA-C und Mutanten) angezogen in NB- und NBD-Medium. Die Graphik zeigt den Mittelwert aus fünf Meßreihen und die zugehörigen Standardabweichungen.

Die Fluoreszenz von WA-C (pGFPybtA_{Yen}) in NB-Medium ist - wie erwartet - niedrig, aber etwas höher als in WA-C (pCJFY5G3) (vgl. Abb. 29 und Abb. 35). WA-C (pGFPybtA_{Yen}) zeigt erhöhte Fluoreszenz in NBD-Medium durch Eisenderegulation. Im Gegensatz zur *fyuA-gfp* und *irp6-gfp* Expression ist die *ybtA-gfp* Expression auch in der Ybt-Synthesemutante WA-CS *irp1*::Kan^r hochreguliert. Die Fluoreszenz der *ybtA*-Mutante (WA-CS *ybtA*::Kan^r) ist

im Vergleich zum Wildtyp (WA-C) sogar wesentlich höher. Dies weist auf eine negative Autoregulation des AraC-Typ Regulators YbtA in *Y. enterocolitica* hin. Auffallend ist, daß die *irp6,irp7*-Mutante hochreguliert ist, während die *fyuA*-Mutante keine erhöhte Fluoreszenz in NBD-Medium zeigt. FyuA scheint deshalb die Expression von *ybtA* zu beeinflussen.

Das ERIC-Element zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die *irp6-9* Expression. Dennoch ist nicht auszuschließen, daß die Insertion einen Einfluß auf den *ybtA*-Promotor hat. Deshalb wurde der ERIC-freie *ybtA*-Promotor (177 bp stromaufwärts von *ybtA* und die ersten 4 Kodons von *ybtA*) aus *Y. pestis* KUMA (*ybtA*_{Yps}) mit dem Primerpaar 8307YpsHind-8621YpsBam amplifiziert und ebenfalls in pCJFY5G3 kloniert. Das entstandene Plasmid pGFPybtA_{Yps} wurde mittels PCR (8307YpsHind-8621YpsBam) und Restriktionsverdau (*Bam*HI/*Hind*III) überprüft, sequenziert und in WA-C elektroporiert. Die GFP-Fluoreszenz des resultierenden Stammes WA-C (pGFPybtA_{Yps}) war nach 24-stündigem Wachstum in NB- und NBD-Medium im Vergleich zu WA-C (pGFPybtA_{Yen}) wesentlich niedriger (Faktor 5) (Abb. 36). Dieser Unterschied könnte auf das ERIC-Element, das in die *ybtA*-Promotorregion der Yen-HPI inseriert ist, zurückzuführen sein.

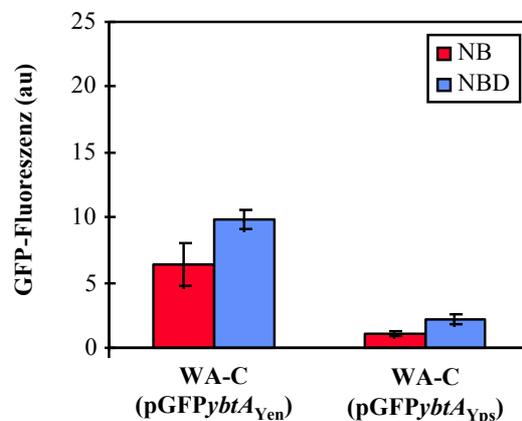


Abb. 36: *ybtA-gfp* Expression. GFP-Fluoreszenz (arbitrary units [au]) von pGFPybtA_{Yen}- und pGFPybtA_{Yps}-tragendem *Y. enterocolitica* Stamm WA-C angezogen in NB- und NBD-Medium. Die Graphik zeigt den Mittelwert aus fünf Meßreihen und die zugehörigen Standardabweichungen.

9. Herstellung eines YbtA-Antikörpers und Expression von *ybtA*

Die Herstellung eines YbtA-Antikörpers erfolgte, um den zeitlichen Verlauf der Synthese des transkriptionellen Regulators YbtA zu analysieren. Da für die Herstellung von Antikörpern große Mengen an gereinigtem Protein benötigt werden, mußte YbtA rekombinant hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde das *ybtA*-Gen in den Expressionsvektor pGEX-4T-3 kloniert. Dieser Vektor enthält das Gen für die Glutathion-S-Transferase (*gst*) unter der Kontrolle des mit IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Der Vektor enthält außerdem den lac-Repressor (*lacI^q*) und eine Ampicillin-Resistenz. Stromabwärts von *gst* befindet sich eine MCS, in die *ybtA* kloniert wurde, so daß ein Fusionsprotein (ca. 60 kDa) aus Gst (26 kDa) und YbtA (35 kDa) synthetisiert werden kann. Gst-Fusionsproteine binden unter geeigneten Bedingungen spezifisch an Glutathion-Sepharose, während unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen mit PBS entfernt werden können.

9.1 Plasmide pGEX*ybtA* und pMOS*ybtA*

Plasmid pGEX*ybtA* (Jacobi) beinhaltet ein 980 bp *ybtA*-PCR-Produkt (ybtAF-ybtAR), das über *EcoRI/XhoI* in-frame hinter das Gen für die Glutathion-S-Transferase (*gst*) kloniert wurde (Abb. 37).

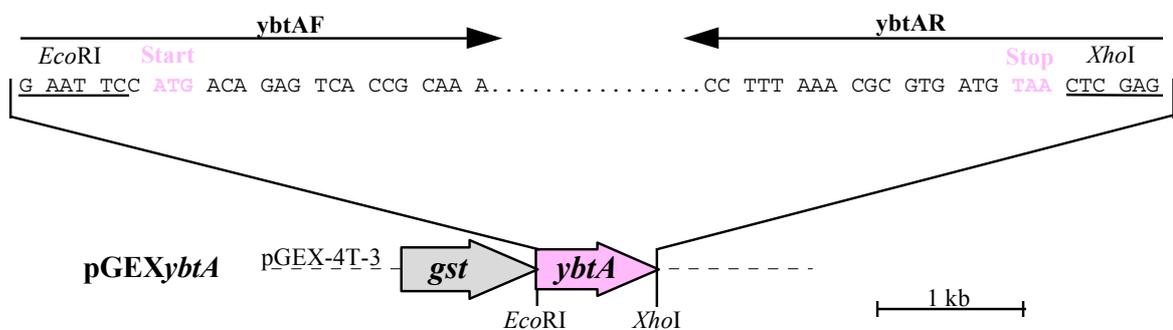


Abb. 37: Konstruktion des Expressionsvektors pGEX*ybtA* (Jacobi). Dicke Pfeile stellen die Gene *gst* (grau) und *ybtA* (rosa) dar. Schwarze Pfeile zeigen die Lage der Primer. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Das Start- und Stopcodon von *ybtA* ist rosa hervorgehoben.

Für weitere Versuche wurde *ybtA* mit dem Primerpaar ybtA380/ybtARHind amplifiziert und in pMOS*Blue* kloniert. Das resultierende Plasmid pMOS*ybtA* wurde mittels PCR (ybtA380/ybtARHind) und Restriktionsverdau (*HindIII*) überprüft. Der Restriktionsverdau mit *HindIII* zeigte außerdem, daß *ybtA* in der richtigen Orientierung hinter dem T7-Promotor liegt.

9.2 Reinigung des Fusionsproteins Gst-YbtA und Immunisierung eines Kaninchens

pGEX $ybtA$ wurde in den Expressionsstamm BL21 transferiert und die *gst-ybtA* Expression durch Zugabe von IPTG induziert (s. B.9.4.1). Im Gegensatz zum Ausgangsstamm BL21 zeigte BL21 (pGEX $ybtA$) eine deutliche Bande bei ca. 60 kDa, die auch mit Gst-Antikörpern detektiert werden konnte.

Nach Aufschluß einer 4L-Kultur BL21 (pGEX $ybtA$) mit Hilfe der French press (s. B.9.4.2) und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand (lösliche Fraktion) mit Glutathion-Sepharose (Pharmacia) gereinigt (s. B. 9.4.3). Da das Fusionsprotein Gst-YbtA nach der Glutathion-Sepharose Behandlung noch Verunreinigungen aufwies, wurden die Glutathion-Sepharose beads (mit dem gebundenen Fusionsprotein) einer präparativen SDS-PAGE mit anschließender Elektroelution unterzogen (s. B.9.4.5). Die Menge an gereinigtem Protein (Gst-YbtA) nach der Elektroelution betrug ca. 400 μ g. Die Immunisierung erfolgte dreimal mit je 100 μ g dieses gereinigten Proteins (s. B.9.5 und Tab. 14). Nach der 3. Immunisierung wurde das Antiserum im Western-Blot eingesetzt, um das Vorhandensein von YbtA-Antikörpern zu überprüfen.

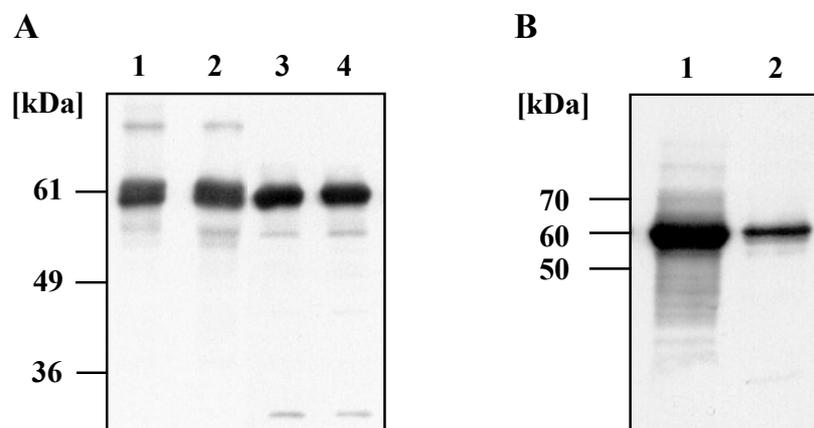


Abb. 38: Überprüfung des 3. Antiserums. Die Detektion des Western-Blots erfolgte mit dem Antiserum aus der 3. Immunisierung (1:100 000). Die Zellysate folgender *E. coli* Stämme wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. **A.** 1. BL21 (pGEX-4T-3); 2. BL21 (pGEX $ybtA$); 3. BL21(DE3) (pMOS $Blue$); 4. BL21(DE3) (pMOS $ybtA$). **B.** 1. BL21 (pOF39); 2. BL21.

Alle Zellysate zeigten im Western-Blot eine Bande von ca. 60 kDa, die der Molekularmasse von Gst-YbtA entspricht. Da auch die Negativkontrollen BL21 (pGEX-4-T-3) und BL21 (pMOS $Blue$) diese Bande aufwies, mußte es sich um ein anderes Protein gleicher Molekularmasse handeln. Da bereits beschrieben wurde, daß das Chaperon GroEL (gehört zur Hsp60 Familie) manchmal mit Gst-Fusionsproteinen aufgereinigt wird, wurde diese

Möglichkeit näher untersucht. Das Plasmid pOF39 (Fayet *et al.*, 1986), das die Gene *groEL* und *groES* enthält, wurde in BL21 elektroporiert. BL21 (pOF39) und BL21 wurden ÜN bei 27°C angezogen und - um die Expression von *groEL* zu erhöhen - 1 h bei 42°C geschüttelt. Der Stamm BL21 (pOF39), der *groEL* überexprimiert, zeigte im Vergleich zu BL21 eine wesentlich stärkere Reaktion mit dem Antiserum aus der 3. Immunisierung (Abb. 38 B). Dies bestätigte die Annahme, daß Gst-YbtA zusammen mit GroEL aufgereinigt wurde.

Um für die weiteren Immunisierungen gereinigtes Gst-YbtA ohne GroEL-Kontamination zu erhalten, wurde eine *E. coli groEL*-Mutante (CAG9294; Young *et al.*, 1989) verwendet. Der Stamm wurde mit dem monoklonalen Maus-anti-Yersinia-Hsp60-Antikörper (erkennt Hsp60 von allen *Enterobacteriaceae*) überprüft und zeigte im Gegensatz zu BL21 keine Bande (Abb. 39).

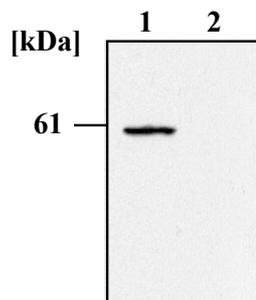


Abb. 39: Überprüfung der *E. coli groEL*-Mutante CAG9294. Die Detektion des Western-Blots erfolgte mit dem monoklonalen Maus-anti-Yersinia-Hsp60-Antikörper (1:1000). Die Zelllysate folgender *E. coli* Stämme wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. 1. BL21; 2. CAG9294.

Anschließend wurde das Plasmid pGEXybtA in CAG9294 elektroporiert und die Expression dieses Stammes untersucht. Gst-YbtA konnte zwar im Zelllysate mit dem Gst-Antikörper detektiert werden, aber ein Großteil des Fusionsproteins befand sich nach dem Zellaufschluß (French press) in der unlöslichen Fraktion (inclusion bodies). Deshalb wurde diese gewaschen, über präparative SDS-PAGE aufgetrennt, ausgeschnitten und elektroeluiert (s. B.9.4.4 und B.9.4.5). Für die Immunisierung mit Gst-YbtA aus CAG9294 (pGEXybtA) wurden ca. 150 µg Protein (4. Immunisierung) eingesetzt. 10 Tage nach der Immunisierung wurde dieses Antiserum aus der 4. Immunisierung mit Zelllysaten der Stämme BL21 (pGEX-4T-3), BL21 (pGEXybtA), BL21(DE3) (pMOSBlue) und BL21(DE3) (pMOSybtA) im Western-Blot untersucht.

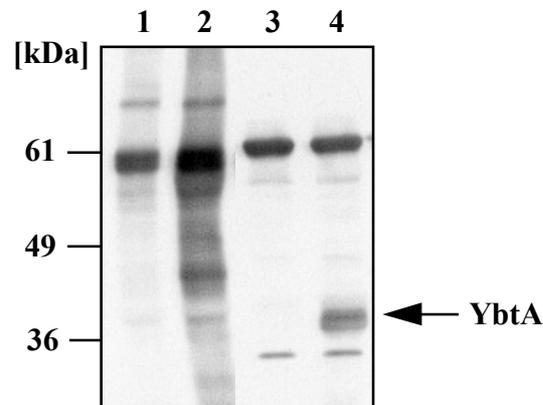


Abb. 40: Überprüfung des 4. Antiserums. Die Detektion des Western-Blots erfolgte mit dem Antiserum aus der 4. Immunisierung (1:100 000). Die Zellysate folgender *E. coli* Stämme wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. 1. BL21 (pGEX-4T-3); 2. BL21 (pGEXybtA); 3. BL21(DE3) (pMOSBlue); 4. BL21(DE3) (pMOSybtA). Der schwarze Pfeil deutet auf YbtA.

Während alle Zellysate eine Bande bei ca. 60 kDa (GroEL) zeigten, ergab nur das Lysat von BL21(DE3) (pMOSybtA) auch eine Bande bei ca. 35 kDa (YbtA) (Abb. 40). Da die Immunisierung mit Gst-YbtA aus CAG9294 somit erfolgreich war, fand - um die Ausbeute an YbtA-Antikörpern zu erhöhen - eine weitere Immunisierung (5.) mit 30 µg Gst-YbtA aus CAG9294 (pGEXybtA) statt. Da der entsprechende Western-Blot mit Antiseren aus der 4. und 5. Immunisierung jedoch keinen Unterschied zeigte, wurde die Immunisierung beendet.

Tab. 14: Immunisierungsschema

Immunisierung	Protein	Stamm
1	100 µg Gst-YbtA (lösliche Fraktion)	BL21 (pGEXybtA)
2	100 µg Gst-YbtA (lösliche Fraktion)	BL21 (pGEXybtA)
3	100 µg Gst-YbtA (lösliche Fraktion)	BL21 (pGEXybtA)
4	150 µg Gst-YbtA (unlösliche Fraktion)	CAG9294 (pGEXybtA)
5	30 µg Gst-YbtA (unlösliche Fraktion)	CAG9294 (pGEXybtA)

9.3 Expression von *ybtA*

Mit Hilfe des YbtA-Antiserums sollte im Folgenden die *ybtA*-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten in *Y. enterocolitica* untersucht werden. Die Stämme WA-C und WA-CS *ybtA::Kan^r* (Negativkontrolle) wurden in eisenlimitiertem NBD-Medium angezogen. Nach 0, 2, 4, 6, 8 und 24 h erfolgte die Entnahme von Proben, die anschließend im Western-Blot mit dem 4. Antiserum (1:1000) detektiert wurden. Alle Proben - außer der Positivkontrolle BL21 (pMOS*ybtA*) - waren negativ. Vermutlich ist die Expression des AraC-Typ Regulators YbtA in WA-C so gering, daß sie mit dem zur Verfügung stehenden YbtA-Antiserum nicht detektiert werden kann.

Um die YbtA-Konzentration zu erhöhen, wurde das Plasmid pACYC5.3 (ca. 15 Kopien pro Zelle) verwendet (Abb. 41). Das Plasmid pACYC5.3 entstand durch Klonierung des 1300 bp *ClaI/HindIII* Fragments (*ybtA*) aus pMOS*ybtA* in das *ClaI/HindIII* geschnittene Plasmid pACYC5.2 (Abb. 17B).

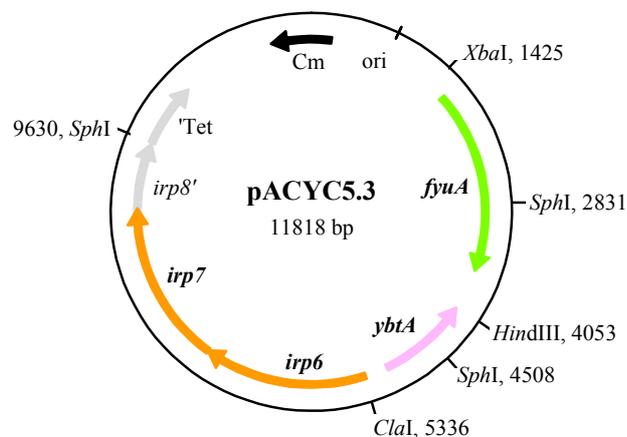


Abb. 41: Plasmid pACYC5.3. Die Gene *irp6* und *irp7* sind als orange, das Gen *fyuA* als grüner und das Gen *ybtA* als rosa Pfeile dargestellt. Der graue Pfeil zeigt ein Teilstück des Gens *irp8'*. Das Gen für die Tetracyclinresistenz (Tet) (grauer Pfeil) wird bei der Klonierung inaktiviert. Die Chloramphenicol-Resistenz (Cm) (schwarzer Pfeil) bleibt erhalten.

Das Plasmid pACYC5.3 wurde in den Ybt-defizienten *Y. enterocolitica* Stamm WA-CH⁻ (WA-C, in dem das gesamte HPI-core (*irp9* - *fyuA*) deletiert wurde; Pelludat, 1999) transferiert. Da das Plasmid pACYC5.3 die für die Ybt-Aufnahme essentiellen Gene (*irp6*, *irp7* und *fyuA*) enthält, kann durch dieses Plasmid die Expression von *ybtA* in Stamm WA-CH⁻ in Abhängigkeit von Zeit und Ybt-Zugabe untersucht werden. WA-CH⁻ (pACYC5.3) wurde ÜN in NB-Medium angezogen und dann in NBD-Medium (1:20)

überimpft. Nach 4 h Wachstum in NBD-Medium wurde der einen Hälfte der NBD-Kultur Ybt-haltiger Kulturüberstand (1:50) zugegeben, während die andere Hälfte unverändert blieb. Beide Ansätze wurden weiter bei 27°C inkubiert und Proben nach 1, 4 und 20 h gezogen. Gleiche Mengen an Gesamzelllysaten dieser Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem 4. YbtA-Antiserum (1:1000) im Western-Blot detektiert (Abb. 42). Alle Proben - unabhängig von der Zeit und der Zugabe von Ybt - zeigten eine Bande bei ca. 35 kDa, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der YbtA-Bande zu erkennen waren. Die Negativkontrolle WA-CH⁻ (pACYC5.2), die die Gene *irp6*, *irp7* und *fyuA*, aber nicht *ybtA*, besitzt, zeigte keine Bande bei 35 kDa.

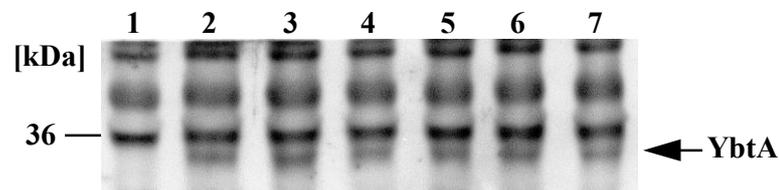


Abb. 42: *ybtA* Expression in *Y. enterocolitica* WA-CH⁻ (pACYC5.3). Die Detektion des Western-Blots erfolgte mit dem 4. Antiserum (1:1000). Die Zelllysate von folgenden Stämmen wurden nach 1, 4 und 20 h Wachstum in NBD-Medium (NBD) und ÜS-haltigem NBD-Medium (NBD+ÜS) über SDS-PAGE aufgetrennt. 1. WA-CH⁻ (pACYC5.2), NBD (Negativkontrolle); 2. - 7. WA-CH⁻ (pACYC5.3); 2. 1 h in NBD; 3. 4 h in NBD; 4. 20 h in NBD; 5. 1 h in NBD+ÜS; 6. 4 h in NBD+ÜS; 7. 20 h in NBD+ÜS.

D. DISKUSSION

1. Das *irp6-9* Operon und die Funktion der Gene *irp6*, *irp7* und *irp8* in *Y. enterocolitica*

Die HPI von *Yersinia* besteht aus einem hochkonservierten „core“-Teil und einem AT-reichen variablen Teil. Der „core“-Teil umfaßt die Gene für die Biosynthese des Siderophors Yersiniabaktin (Ybt), die Ybt-Aufnahme und den AraC-Typ Regulator YbtA (s. Abb. 4A).

Die von Rakin *et al.* (1999a) durchgeführte Sequenzierung der stromaufwärts von *ybtA* gelegenen Region in *Y. enterocolitica* O:8, WA-C ergab ein Gencluster von vier weiteren offenen Leserahmen (*irp6-9*), die vermutlich ein Operon von 6,2 kb bilden (Abb. 43). Der Promotor dieses Operons überlappt wahrscheinlich mit dem *ybtA*-Promotor, wird aber in entgegengesetzter Richtung transkribiert. Mit Hilfe der RT-PCR und Primern, die in benachbarten Genen binden, konnte gezeigt werden, daß die Gene *irp6*, *irp7*, *irp8* und *irp9* in einem Operon liegen (s. C.1).

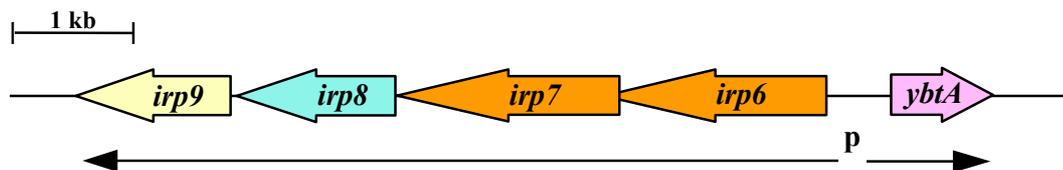


Abb. 43: Das stromaufwärts von *ybtA* gelegene Operon *irp6-9*. p: Promotorregion von *ybtA* und *irp6-9*. Dicke farbige Pfeile symbolisieren die Gene und ihre transkriptionelle Richtung. Dünne schwarze Pfeile stellen die beiden Operons dar.

1.1 Einfluß von Irp6/Irp7 auf die Ybt-Aufnahme und Mausvirulenz

Analysen der Proteinsequenz haben gezeigt, daß Irp6 und Irp7 eine N-terminale hydrophobe Transmembrandomäne und eine C-terminale ATP-bindende Domäne besitzen und somit Ähnlichkeit zu ABC-Transportern (Irp6: 48% zu CyaB von *B. pertussis*; Irp7: 49% zu HlyB von *E. coli* und LktB von *P. haemolytica*) aufweisen. Da Siderophore generell über einen Rezeptor in der äußeren Membran und über ABC-Transporter in der inneren Membran aufgenommen werden (Boos & Lucht, 1996; Braun *et al.*, 1998; Earhart, 1996) und der Ybt-Rezeptor FyuA bereits identifiziert worden war (Rakin *et al.*, 1994), lag die Vermutung nahe, daß Irp6 und Irp7 für die Ybt-Aufnahme durch die innere Membran hindurch verantwortlich sind. Jedoch besitzen alle bisher bekannten Siderophor ABC-Transporter die Transmembran-

und ATP-bindende Domäne in getrennten Proteinen, so daß die Fusion von Transmembran- und ATP-bindender Domäne in Irp6 und Irp7 eine Ausnahme darstellt. Aufgrund der Sequenzhomologie von Irp6/Irp7 zu Substrat-exportierenden ABC-Transportern (HlyB: Hämolyisin; LktB: Leukotoxin; CyaB: Cyclolysin) (Blight & Holland, 1990), könnte es sich bei Irp6/Irp7 auch um ABC-Transporter handeln, die am Ybt-Export beteiligt sind. Dabei ist aber zu bedenken, daß bisher kein Siderophor-Exportsystem beschrieben wurde.

Zur Prüfung ihrer Transportfunktion wurden die Gene *irp6* und *irp7* inaktiviert. *irp6*- und *irp7*- Einzel- wie auch Doppelmutanten wurden in einem Fütterungstest auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Ybt aufzunehmen (s. C.3). Es zeigte sich, daß - außer dem Ybt-Rezeptor FyuA - sowohl Irp6 als auch Irp7 für die Ybt-Aufnahme in *Y. enterocolitica* O:8, WA-C essentiell sind. Da sich die Einzelmutanten wie die Doppelmutante verhielten und eine *irp6*-Mutante nicht durch das *irp7*-Gen - und umgekehrt - komplementiert werden konnte, handelt es sich vermutlich um einen heterodimeren Irp6/Irp7 ABC-Transporter. Der CAS-positive Phänotyp der *irp6*- und *irp7*-Mutanten (s. C.7.6) hat außerdem gezeigt, daß Irp6 und Irp7 nicht am Ybt-Export oder an der Ybt-Synthese beteiligt sein können. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den in *Y. pestis* erhaltenen Ergebnissen für die orthologen Gene *ybtP* und *ybtQ* (Fetherston *et al.*, 1999). *ybtP*- oder *ybtQ*- Mutanten können Ybt produzieren, aber zeigen vermindertes Wachstum bei Eisenmangel und reduzierte Eisenaufnahme.

Da *Y. pestis* das funktionelle Ybt-System (für *psn*, *irp2* und *ybtP* gezeigt) für die Mausvirulenz nach subkutaner Injektion benötigt (Bearden *et al.*, 1997; Fetherston *et al.*, 1999) und eine *Y. pseudotuberculosis irp2*-Synthesemutante sowie eine *Y. enterocolitica* O:8 *fyuA*-Rezeptormutante verringerte Mausvirulenz nach intravenöser oder oraler Applikation zeigen (Carniel *et al.*, 1992; Rakin *et al.*, 1994), wurde angenommen, daß die ABC-Transporter Irp6 und Irp7 für die Mausvirulenz auch in *Y. enterocolitica* O:8 essentiell sind. Die Inaktivierung von *irp6* und *irp7* in *Y. enterocolitica* O:8, WA-C führte zu stark reduzierter Mausvirulenz nach intravenöser Injektion (WA-C: $2,7 \times 10^7$ CFU in Milz und $4,5 \times 10^6$ CFU in Leber; WA-C $\Delta irp6, irp7$: $2,7 \times 10^2$ CFU in Milz und $1,3 \times 10^3$ CFU in Leber) (s. C.4). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Hypothese, daß die Ybt-Aufnahme für das Überleben und die Vermehrung der Yersinien in der Maus essentiell ist.

1.2 Einfluß von Irp8 auf die Ybt-Aufnahme und Mausvirulenz

Irp8 besitzt vermutlich 12 transmembrane Segmente und weist signifikante Ähnlichkeit (40%) zu AmpG (10 transmembrane Segmente) von *E. coli* auf (Lindquist *et al.*, 1993). AmpG transportiert vermutlich Peptidoglykanfragmente, die beim Mureinabbau durch β -Lactamasen entstehen, vom Periplasma ins Zytoplasma (Jacobs *et al.*, 1997). Dort binden diese an den transkriptionellen Regulator AmpR und führen dadurch zur Transkriptionsaktivierung der β -Lactamase (AmpC). Aufgrund der Ähnlichkeit zu AmpG könnte Irp8 als Ybt-Permease in der inneren Membran fungieren und somit an der Signaltransduktion beteiligt sein.

Zur Ermittlung der Funktion wurde *irp8* inaktiviert und die *irp8*-Mutante im Fütterungstest (s. C.3) hinsichtlich ihrer Ybt-Aufnahme untersucht. Die Inaktivierung von *irp8* hatte jedoch keine Auswirkung auf die Ybt-Aufnahme, so daß die ABC-Transporter Irp6 und Irp7 vermutlich unabhängig von Irp8 sind. Da die *irp8*-Mutante WA-CS *irp8*::Kan^r im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Ybt-Synthese (CAS-Phänotyp; s. C.7.6) oder Regulation (*gfp*-Reporterstudien; s. C.7.3 und C.7.5) aufwies, scheint Irp8 keine wichtige Rolle im Ybt-System zu spielen.

Auch in *Y. pestis* ergab die Inaktivierung von *ybtX* (ortholog zu *irp8*) keinen Hinweis auf die *in vitro* Funktion von YbtX (Fetherston *et al.*, 1999). Eine *in vivo* Untersuchung (Mausversuch) der *Y. pestis* *ybtX*-Mutante wurde jedoch von dieser Arbeitsgruppe nicht unternommen.

Deshalb wurde zur Untersuchung der *in vivo*-Bedeutung von Irp8 in *Y. enterocolitica* ein Mausversuch mit WA-CS und WA-CS *irp8*::Kan^r durchgeführt (s. C.4). Jedoch verhielt sich die *irp8*-Mutante (WA-CS *irp8*::Kan^r) - wie schon bei den *in vitro* Versuchen - gleich dem Ausgangsstamm WA-CS. Somit kann eine essentielle Funktion von Irp8 unter Infektionsbedingungen ebenfalls ausgeschlossen werden.

Auch wenn für Irp8 bisher keine Funktion gefunden werden konnte, kann eine Beteiligung von Irp8 an der Ybt-vermittelten Signaltransduktion oder Genregulation nicht völlig ausgeschlossen werden. Irp8 könnte aber auch am "cross-talk" mit einem anderen Siderophorsystem beteiligt sein. In *Y. enterocolitica* O:8 ist jedoch nur das Ybt-System bekannt. Da die HPI aber auch in anderen Bakterien (z.B. *E. coli*) vorkommt, die weitere Siderophorsysteme (z.B. das Enterochelinsystem) besitzen, wäre eine gegenseitige Regulation dieser Siderophorsysteme denkbar.

2. Ybt-Aufnahme in *E. coli* H1884 (pACYC5.2) und *Y. enterocolitica* NF-O (pACYC5.2)

Um festzustellen, ob die Fähigkeit zur Ybt-Nutzung durch Transfer der Transportgene *fyuA*, *irp6* und *irp7* auf *E. coli* H1884 (Mutationen in den Enterochelin-Synthesegenen *entD,F*) oder den nicht-pathogenen *Y. enterocolitica* Stamm NF-O (beide Stämme sind HPI-negativ) übertragen werden kann, wurden die Transportgene subkloniert (pACYC5.2) und in die beiden Stämme transferiert (s. C.6). *E. coli* H1884 (pACYC5.2), nicht aber *Y. enterocolitica* NF-O (pACYC5.2), zeigte im Fütterungsversuch Wachstum nach Zugabe von Ybt. Western-Blot, RT-PCR und Pestizinassay zeigten in beiden Stämmen sowohl *irp6*, *irp7* und *fyuA* Transkription bzw. Expression als auch funktionelles FyuA (Pestizinempfindlichkeit).

Generell benötigen Gram-negative Bakterien für die Siderophoraufnahme und -nutzung folgende Komponenten (Boos & Lucht, 1996; Braun *et al.*, 1998; Earhart, 1996):

- einen TonB-abhängigen Rezeptor für den Transport durch die äußere Membran
- ein periplasmatisches Bindeprotein (PBP) und ABC-Transporter für den Transport vom Periplasma ins Zytoplasma (PBP-abhängiges Transportsystem)
- Proteine für die Dissoziation des Eisen-Siderophor Komplexes (z.B. Siderophorreduktase oder -esterase) (Schubert *et al.*, 1999)

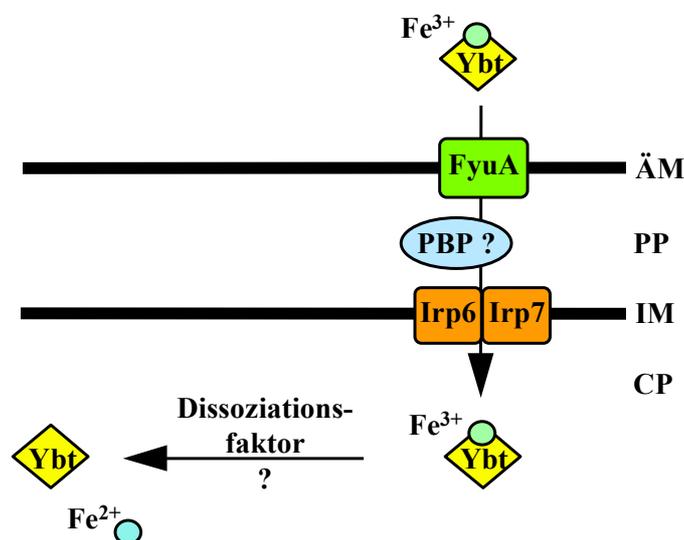
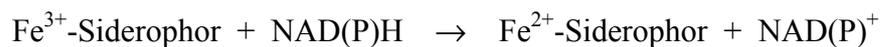


Abb. 44: Modell der Ybt-Aufnahme. Pfeile symbolisieren die Ybt-Aufnahme bzw. Dissoziation von Fe^{3+} -Ybt. Yersiniabaktin (Ybt) ist als gelbes Viereck, Eisen (III) (Fe^{3+}) als grüner Kreis und Eisen (II) (Fe^{2+}) als blauer Kreis dargestellt. Das grüne Viereck symbolisiert den Rezeptor FyuA, die orangefarbene Vierecke die ABC-Transporter Irp6 und Irp7 und das blaue Oval das fehlende periplasmatische Bindeprotein (PBP). ÄM: äußere Membran, IM: innere Membran, CP: Zytoplasma, PP: Periplasma.

Da sowohl in *E. coli* H1884 (pACYC5.2) als auch in *Y. enterocolitica* NF-O (pACYC5.2) die ABC-Transportergene *irp6* und *irp7* und das Rezeptorgen *fyuA* transkribiert bzw. exprimiert werden, könnte der entscheidende Unterschied darin bestehen, daß *E. coli* H1884, aber nicht *Y. enterocolitica* NF-O, ein PBP für Ybt oder einen Fe-Ybt-Dissoziationsfaktor besitzt (Abb. 44).

Es wird angenommen, daß Eisen aus den Siderophoren durch einfache Reduktion mit NAD(P)H freigesetzt wird, wobei das lösliche Fe²⁺ vom Siderophor getrennt wird.



Diese Reaktion ist aber bei Fe³⁺-Enterochelin aufgrund seines stark negativen Redoxpotentials von -750 mV gegenüber -324 mV von NAD(P)H/NAD(P)⁺ nicht möglich. Deshalb ist die Esterase Fes (ferric enterochelin esterase), die eine Eisenfreisetzung aus Enterochelin durch Hydrolyse ermöglicht, der bisher einzige beschriebene Fe-Siderophor-Dissoziationsfaktor (Brickman & McIntosh, 1992; Schubert *et al.*, 1999).

PBP hingegen sind bei allen bekannten Siderophoraufnahmesystemen vorhanden. Da PBP in der Regel alle Mitglieder einer Siderophorfamilie binden, während die Rezeptoren der äußeren Membran für ein bestimmtes Siderophor spezifisch sind, ist die Nutzung des PBP eines anderen Siderophor-Transportsystems durchaus denkbar. Außerdem ist zu erwähnen, daß nur die *irp6,irp7*-ABC-Transportermutanten ein sichtbar verringertes Wachstum auf CAS-Agar aufweisen (s. Abb. 30). Geht man von einem PBP aus, das sowohl für sein PBP-abhängiges Transportsystem als auch für die Ybt-Aufnahme essentiell ist, so könnte dieses PBP durch Ybt, das in der ABC-Transportermutante nicht weiter transportiert werden kann, blockiert werden. Dadurch kann das eigentliche Substrat nicht mehr gebunden und weitertransportiert werden, so daß es zu verschlechtertem Wachstum kommen kann. Somit besteht der begründete Verdacht, daß das PBP, über das Ybt aufgenommen wird, außerhalb der HPI liegt.

Die Anwesenheit von außerhalb der HPI liegenden Genen, die für die Fe-Ybt Aufnahme essentiell sind (z.B. PBP), könnte im Hinblick auf die Entwicklung neuer Pathotypen durch horizontalen Gentransfer der HPI von Bedeutung sein. Kürzlich wurde gezeigt, daß die Yps-HPI bei verschiedenen Arten der Familie der *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *E. coli* Pathotypen: EAEC, UPEC u.a.) sehr weit verbreitet ist (Schubert *et al.*, 1998 und 2000). Geht man von einem horizontalen Transfer der HPI aus, würden nur die

Stämme vom Erhalt der HPI profitieren, die bereits Gene tragen, die das Fe-Ybt Aufnahmesystem vervollständigen können.

3. Regulation der HPI core-Gene

Die Regulation der HPI Gene erfolgt über zwei transkriptionelle Regulatoren:

1. Eisenüberschuß im Zytoplasma führt zur Repression durch den Fe^{2+} -Fur Komplex, wohingegen Eisenmangel (z.B. durch α, α' -Dipyridyl im NBD-Medium) zur Derepression führt.
2. Der transkriptionelle Regulator YbtA ist ein AraC-Typ Protein, das vermutlich durch die Bindung von Fe-Ybt zum Aktivator wird und die Gencluster *irp6-9*, *irp2-irp5* und *fyuA* hochreguliert (Fetherston *et al.*, 1996). Die Expression von *ybtA* selbst wird vermutlich durch YbtA reprimiert (negative Autoregulation) (Abb. 45).

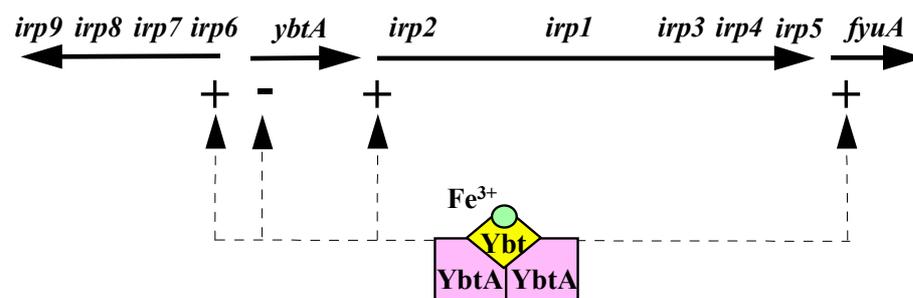


Abb. 45: Modell der Regulation der HPI core-Gene. Durchgezogene Pfeile symbolisieren die Operons und ihre transkriptionelle Richtung. Gestrichelte Pfeile stellen die Bindung des transkriptionellen Aktivators YbtA an die Promotorregionen und die daraus resultierende Aktivierung (+) bzw. Reprimierung (-) dar.

3.1 Regulation der Ybt-Synthesegene und des Rezeptorgens *fyuA*

Die Fütterungsversuche mit Kulturüberständen (s. C.7.1), die Expression der HMWP (Irp1/Irp2) (s. C.7.2) und *gfp*-Reporterstudien (s. C.7.3 und C.7.5) zeigten, daß die Ybt-Synthesegene und das Rezeptorgen *fyuA* unter den gleichen Bedingungen exprimiert werden. Beide Promotoren (*fyuA*, *irp2*) besitzen eine Fur-Box und repetitive Sequenzen. Die Expression findet deshalb nur bei Eisenmangel (in NBD-Medium) statt, d.h. unter der Bedingung, daß Fur nicht an die Fur-Box gebunden ist. Der Fe-Ybt-YbtA Komplex bindet vermutlich an die repetitiven Sequenzen (RS) und führt so zur Transkriptionsaktivierung (Fetherston *et al.*, 1996). Für eine effiziente Expression ist deshalb die Anwesenheit des transkriptionellen Regulators YbtA und Fe-Ybt im Zytoplasma erforderlich. Nach diesem Modell (s. Abb. 24) wird die HMWP- und Ybt-Synthese und die *irp2-gfp* und *fyuA-gfp*

Expression nur in den Stämmen hochreguliert, die Fe-Ybt aufnehmen können (WA-C, WA-CS *irp8::Kan^r*).

Die Ergebnisse der *fyuA-gfp* und *irp2-gfp* Reporterstudien (s. C.7.3 und C.7.5) waren nahezu identisch, was aufgrund des ähnlichen Aufbaus der beiden Promotoren nicht anders zu erwarten war. Diese parallele Regulation von Rezeptor- (*fyuA*) und Synthesegenen (*irp1-5*) macht Sinn, da die Hochregulation des Rezeptors nur nötig ist, wenn viel Ybt produziert wird.

3.1.1 Einfluß von FyuA

Wie bereits früher beschrieben, führt die Inaktivierung von *fyuA* nur zu einer schwachen Expression der HMWP (Pelludat *et al.*, 1998). Außerdem zeigte eine *fyuA*-Mutante weder eine signifikante *irp2-gfp* oder *fyuA-gfp* Hochregulation, noch konnte ihr Überstand die *irp1*-Mutante füttern (s. C.7.3; C.7.5 und C.7.1). Eine Titration mit den Überständen von WA-C und WA *fyuA2* zeigte, daß WA *fyuA2* jedoch sehr wenig Ybt produziert (s. C.7.4). Diese geringe Ybt-Produktion läßt sich durch Fur-Derepression (NBD-Medium), aber fehlende Aktivierung (durch Fe-Ybt-YbtA) des *irp2*-Promotors erklären. Aufgrund dieser Ergebnisse ist FyuA für die *irp2-gfp* und *fyuA-gfp* Hochregulation und Ybt-Synthese essentiell. Entweder ist die Hochregulation der Synthesegene und des Rezeptorgens insofern von FyuA abhängig, daß FyuA für den Fe-Ybt Transport durch die äußere Membran notwendig ist, oder aber FyuA ist an einer Fe-Ybt abhängigen Signaltransduktion beteiligt, ähnlich wie sie für die Fe-Citrat Aufnahme in *E. coli* beschrieben wurde (Braun *et al.*, 1998).

Diese Reporterergebnisse mit *Y. enterocolitica* WA-C stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen, die mit einer *Y. pestis* Rezeptormutante erhalten wurden. Die Deletion von *psn* in *Y. pestis* (*psn* ist ortholog zu *fyuA*) führte weder zu reduzierter Expression der *psn-lacZ* Reporterfusion noch zu reduzierter Expression der Ybt-Synthesegene (Bearden *et al.*, 1997; Fetherston *et al.*, 1996 und 1999). Diese Unterschiede in der Regulation könnten auf die unterschiedliche Permeabilität der äußeren Membran für Ybt zurückzuführen sein (Perry *et al.*, 1999). Tatsächlich wurde festgestellt, daß die äußere Membran von *Y. pestis* für hydrophobe Moleküle wesentlich durchlässiger ist als die von *Y. enterocolitica* (Bengoechea *et al.*, 1998). Ybt könnte deshalb trotz fehlendem Rezeptor ins Periplasma gelangen und in der *Y. pestis* *psn*-Mutante zu einer Hochregulation der Reporterfusion *psn-lacZ* und der Ybt-Synthesegene führen.

Von *Y. pestis* ist bekannt, daß die HPI für die Mausvirulenz bei subkutaner, aber nicht bei intravenöser Infektion von Bedeutung ist (Bearden *et al.*, 1997; Fetherston *et al.*, 1999; Une &

Brubaker, 1984). Bei *Y. enterocolitica* O:8 dagegen spielt die HPI als Virulenzfaktor sowohl bei oraler als auch bei intravenöser Applikation eine Rolle (Carniel *et al.*, 1992; Rakin *et al.*, 1994). Darüberhinaus zeigt *Y. pestis* - im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* - auf Siderophorindikator- (CAS-) Agar keinen Hof (Rakin *et al.*, 1999a). Diese Ergebnisse lassen unterschiedliche Regulationsmechanismen der HPI-Gene von *Y. pestis* und *Y. enterocolitica* vermuten.

3.1.2 Einfluß von Irp6/Irp7 und Irp8

Obwohl sich die verschiedenen *irp6,irp7*-Mutanten nicht mit Ybt füttern ließen, zeigten die *gfp*-Reporterstudien (s. C.7.3 und C.7.5) und die Fütterung der Ybt-Synthesemutante mit den Kulturüberständen (s. C.7.1) sowohl eine Hochregulation des Synthesegens *irp2* und des Rezeptorgens *fyuA* als auch Ybt-Produktion. Da durch Irp8 geringe Mengen an Ybt - ausreichend für eine Hochregulation von Rezeptor- und Ybt-Synthesegenen, aber nicht für die Fütterung - durch die innere Membran transportiert werden könnten, wurde eine *irp6,irp7,irp8*-Dreifachmutante hergestellt. Diese zeigte jedoch keine phänotypischen Unterschiede zur *irp6,irp7*-Doppelmutante. Irp8 scheint somit bei der Hochregulation von *fyuA* und der Ybt-Synthesegene keine Rolle zu spielen. Entweder könnte Fe-Ybt unspezifisch durch die innere Membran diffundieren und YbtA aktivieren oder Fe-Ybt könnte durch andere Eisentransportsysteme, wie z.B. das TonB-unabhängige Eisentransportsystem YfuABCD oder das erst kürzlich in *Y. enterocolitica* beschriebene Enterochelin-Transportsystem FepBCDG durch die innere Membran transportiert werden (Saken *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 1999). Die im Vergleich zum Wildtyp erhöhte *irp2-gfp* und *fyuA-gfp* Expression in den verschiedenen *irp6,7*-Mutanten kann durch erhöhte Fur Derepression zustande kommen. Da die *irp6,7*-Mutanten Fe-Ybt vermutlich nur sehr schlecht aufnehmen können - ausreichend für die Hochregulation, aber nicht für die Fütterung - sind sie trotz Ybt-Synthese sehr starkem Eisenmangel ausgesetzt.

3.2 Auswirkung des CAS-Agars auf die Ybt-Synthese und *fyuA* Expression

Reporterstudien in NBD-Medium (s. C.7.3) und Fütterungsversuche (s. C.7.1) zeigten, daß WA-C Δ *irp6,irp7* Ybt in vergleichsweise großen Mengen produziert, während WA *fyuA2* nur eine geringe Menge an Ybt synthetisieren kann. Jedoch zeigten auf CAS-Siderophorindikatoragar sowohl die *irp6,irp7*-Mutante als auch die *fyuA*-Mutante einen größeren Hof als WA-C (s. C.7.6), was auf eine sehr starke Ybt-Produktion hinweist. Außerdem wurde deutlich, daß die *fyuA-gfp* Expression einer *fyuA*-Mutante auf CAS-Agar im Vergleich zum Wildtyp erhöht

war, während sie in NBD-Medium vergleichsweise sehr niedrig war. Es wurde vermutet, daß das kationische Detergens HDTMA, das im CAS-Agar enthalten ist, die äußere Membran für Fe-Ybt durchlässig macht. Diese Hypothese konnte insofern bestätigt werden, als daß HDTMA-CAS-FeCl₃ die *fyuA-gfp* Expression in NBD-Medium erhöhte (s. Tab. 13). Trotz fehlendem FyuA könnte Ybt gebildet und sekretiert werden und mittels Detergens (HDTMA) ins Periplasma gelangen. Fe-Ybt wird dann von Irp6/Irp7 ins Zytoplasma transportiert und führt dort zusammen mit YbtA zur Hochregulation der Ybt-Synthese und *fyuA-gfp* Expression. Da FyuA unter CAS-Agar Bedingungen für die Ybt-Synthese und die Hochregulation von *fyuA-gfp* offensichtlich nicht essentiell ist, ist eine Signaltransduktion über FyuA unwahrscheinlich. FyuA sollte demnach nur für die Fe-Ybt-Aufnahme wichtig und somit nur indirekt an der Regulation der Ybt-Synthesegene und des Rezeptorgens beteiligt sein.

3.3 *irp6/ybtP-gfp* und *ybtA-gfp* Reporterstudien

Die Promotorregion zwischen *irp6* bzw. *ybtP* (*ybtP* von *Y. pestis* ist ortholog zu *irp6*) und *ybtA* enthält sowohl eine Fur-Box als auch repetitive Sequenzen (RS) (Abb. 46). Bei einer entsprechend hohen Fe²⁺-Konzentration in der Zelle bindet der Eisen-Fur Komplex an die Fur-Box und reprimiert auf diese Weise die Transkription der stromabwärts liegenden Gene (z.B. *irp6-9* und *ybtA*). Die repetitiven Sequenzen im Promotorbereich dienen vermutlich der Bindung des transkriptionellen Aktivators YbtA. Diese Promotorregion der Yen-HPI und Yps-HPI ist - bis auf die Insertion eines 125 bp großen ERIC-Elements in RS2 der Yen-HPI - nahezu identisch (98-99% Identität) (Rakin *et al.*, 1999a).

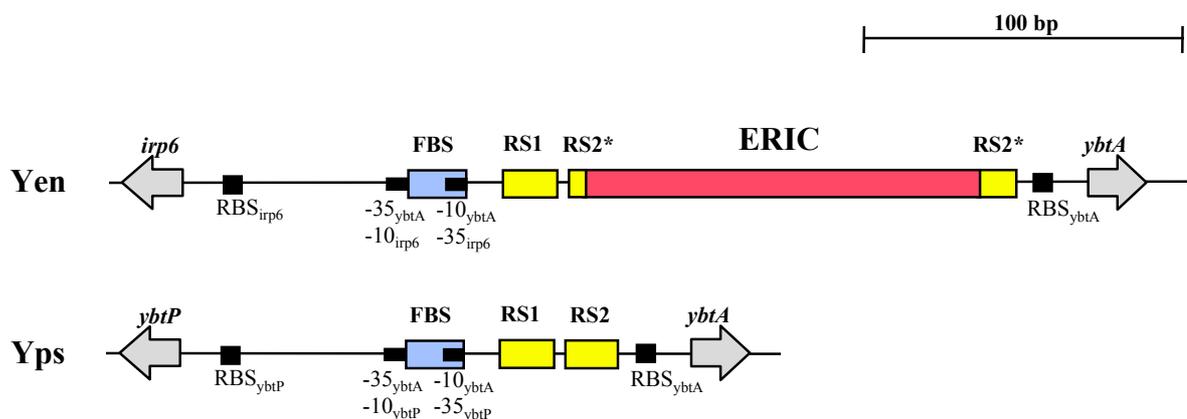


Abb. 46: Region zwischen *irp6/ybtP* und *ybtA* in Yen- (*Y. enterocolitica*) und Yps- (*Y. pestis*/*Y. pseudotuberculosis*) HPI. Gelbe Balken stellen die repetitiven Sequenzen (RS), blaue Balken die Fur-Box (FBS) und der rote Balken das ERIC-Element dar. Schwarze Kästchen symbolisieren die Ribosomenbindungsstelle (RBS) bzw. die -35 und -10 Region der Promotoren. Der Beginn der Gene *ybtA* und *irp6* bzw. *ybtP* ist als grauer Pfeil dargestellt (modifiziert nach Rakin *et al.*, 1999a).

Aufgrund der Fur-Box und der repetitiven Sequenzen wird vermutet, daß eine effiziente Expression von *irp6-9* nur unter Eisenmangel (Fur Derepression) und in Anwesenheit des Fe-Ybt-YbtA-Komplexes (Transkriptionsaktivierung) stattfindet. Die Messung der GFP-Fluoreszenz eines *irp6_{Yen}-gfp* Reporterkonstrukts (pGFP*irp6_{Yen}*) bestätigte dies (s. C.8.1). Eine signifikante GFP-Fluoreszenz konnte nur in NBD-Medium und nur in Stämmen, die YbtA besitzen und Ybt produzieren (WA-C, WA-C Δ *irp6,irp7*), gemessen werden. *fyuA*- (Rezeptor), *irp1*- (Synthese)- und *ybtA*- (Regulator) Mutanten hingegen zeigten keine erhöhte GFP-Fluoreszenz in NBD-Medium. Dies ist in Übereinstimmung mit den für den *Y. pestis ybtP*-Promotor beschriebenen Ergebnissen, die zeigen, daß sowohl Ybt als auch YbtA für die Expression essentiell sind (Fetherston *et al.*, 1999).

Um den Einfluß des ERIC-Elements in der *irp6-ybtA* Promotorregion auf das *irp6-9* Operon zu untersuchen, wurde die Expression des *ybtP*-Promotors der Yps-HPI (kein ERIC-Element) mit der Expression des *irp6*-Promotors der Yen-HPI (ERIC-Element) verglichen. Die GFP-Fluoreszenz Messungen mit den Reporterplasmiden pGFP*irp6_{Yen}* und pGFP*ybtP_{Yps}* in WA-C wurden parallel durchgeführt und ergaben ähnliche Werte (s. Abb. 34). Dies zeigt, daß das ERIC-Element keinen Einfluß auf die Expression des *irp6-9* Operons ausübt.

Beim Vergleich der Promotorregionen von *fyuA*, *irp2* und *irp6* kann man eine unterschiedliche Anordnung der repetitiven Sequenzen erkennen (Abb. 47). Während die repetitiven Sequenzen in der *fyuA*- und auch in der *irp2*-Promotorregion "inverted repeats" bilden, liegen sie in der *irp6*-Promotorregion als "direct repeats" vor. Da das ERIC-Element keinen Einfluß auf die *irp6-9* Expression ausübt, spielt vermutlich nur die RS1 eine Rolle für die Regulation von *irp6*, während aufgrund der invertierten Konfiguration von RS1 und RS2 des *fyuA*-Promotors und *irp2*-Promotors beide RS-Elemente die Expression von *fyuA* beeinflussen. Durch diese unterschiedliche RS1/RS2-Konfiguration könnte die Bindung des transkriptionellen Aktivators YbtA an die repetitiven Sequenzen beeinflußt werden, was die Expressionsunterschiede von *irp6_{Yen}-gfp* und *fyuA-gfp* bzw. *irp2-gfp* (*fyuA-gfp/irp2-gfp* ca. 10-fach stärker als *irp6_{Yen}-gfp*) erklären könnte.

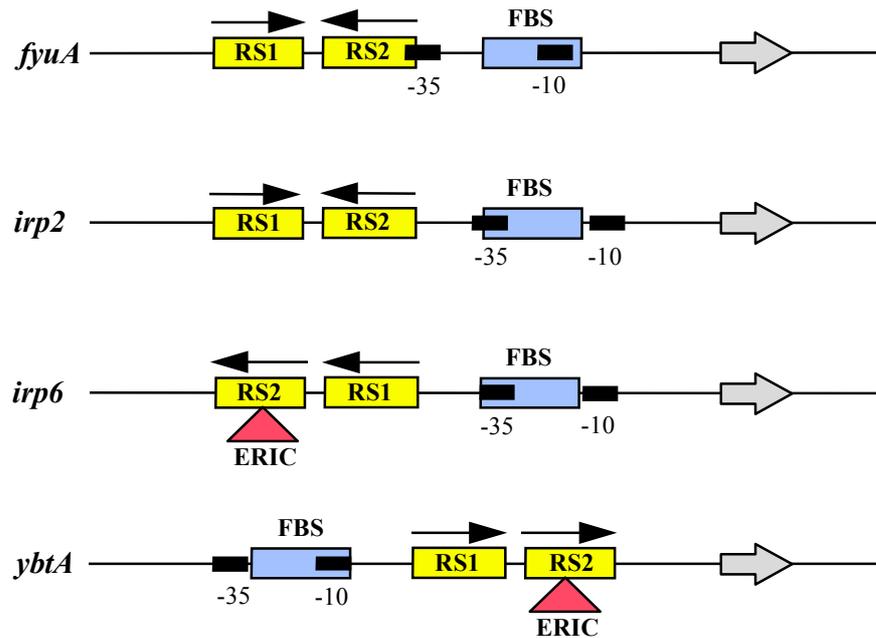


Abb. 47: Vergleich der Promotorregionen von *fyuA*, *irp2*, *irp6* und *ybtA*. Gelbe Balken stellen die repetitiven Sequenzen (RS), blaue Balken die Fur-Box (FBS) und das rote Dreieck das ERIC-Element dar. Schwarze Kästchen symbolisieren die -35 und -10 Region der Promotoren. Der Beginn der Gene *fyuA*, *irp2*, *irp6* und *ybtA* ist als grauer Pfeil dargestellt. Schwarze Pfeile geben die Richtung der RS an (Fetherston *et al.*, 1996 und 1999; Guilvout *et al.*, 1993; Rakin *et al.*, 1994).

Der *ybtA*-Promotor wird ebenfalls durch Eisen reprimiert. Die *ybtA*_{Yen}-*gfp* Expression der *irp1*-Mutante sowie der *irp6,7*-Mutante entspricht in NBD-Medium annähernd der des Wildtyps (s. C.8.2). Dies zeigt, daß weder Irp6/Irp7 noch Ybt für die Hochregulation von *ybtA* nötig sind. In der *ybtA*-Mutante ist die GFP-Fluoreszenz deutlich erhöht, was auf eine negative Autoregulation durch YbtA schließen läßt. Ein Vergleich der möglichen YbtA-Bindungsstellen in *fyuA*, *irp2*, *irp6* und *ybtA* zeigt, daß die repetitiven Sequenzen (RS) in *fyuA* und *irp2* "inverted repeats", die in *irp6* und *ybtA* jedoch "direct repeats" bilden (Fetherston *et al.*, 1996) (Abb. 47). Auffallend ist außerdem, daß die RS in der *fyuA*-, *irp2*- und *irp6*-Promotorregion stromaufwärts der -35 und -10 Region liegen, während sie sich in der *ybtA*-Promotorregion stromabwärts der -35 und -10 Region befinden. Aufgrund dieser unterschiedlichen Anordnung liegt die Vermutung nahe, daß die Bindung des transkriptionellen Aktivators YbtA an die RS der *ybtA*-Promotorregion die RNS-Polymerase bzw. die Transkription blockiert, während die Bindung von YbtA an die RS der *fyuA*-, *irp2*- und *irp6*-Promotorregion zu einer Aktivierung der Transkription (z.B. durch verstärkte Bindung der RNA-Polymerase) führt.

Die *fyuA*-Mutante zeigte eine sehr niedrige GFP-Fluoreszenz des *ybtA-gfp* Reporterkonstrukts. Dies war nicht zu erwarten, da gezeigt wurde, daß Ybt für die Hochregulation von *ybtA* nicht nötig ist (siehe *irp1*-Mutante). Dies weist darauf hin, daß FyuA in Bezug auf den *ybtA*-Promotor eine Rolle bei der Signaltransduktion - wie sie für die Fe-Citrat Aufnahme in *E. coli* beschrieben wurde - spielen könnte. Die Bindung von Fe-Citrat an den Fe-Citrat Rezeptor FecA bewirkt eine Signalweiterleitung über FecR in der inneren Membran in das Zytoplasma, wo der Sigma-Faktor FecI aktiviert wird (Angerer *et al.*, 1995; Enz *et al.*, 2000). Ein Alignment von FecA mit anderen Siderophorrezeptoren zeigte, daß FecA eine lange N-terminale Domäne (Extension) enthält, die in den anderen Rezeptoren fehlt, für die Signaltransduktion aber essentiell ist (Kim *et al.*, 1997). Jedoch besitzt der Ybt-Rezeptor FyuA weder diese Extension noch ist ein Sigma-Faktor für die Transkription der HPI-Gene bekannt.

Der direkte Vergleich zwischen *ybtA_{Yen}-gfp* und *ybtA_{Yps}-gfp* (gemessen in WA-C) zeigte eine deutlich erniedrigte GFP-Fluoreszenz des *Y. pestis* Reporterkonstrukts (s. Abb. 36). Durch die Insertion des ERIC-Elements in RS2 des *ybtA_{Yen}*-Promotors könnte die YbtA-Bindungsstelle so verändert werden, daß YbtA nicht so effektiv binden beim *ybtA_{Yps}*-Promotor und somit die Repression verringert ist. Andererseits könnte das ERIC-Element als transkribierter Teil von *ybtA_{Yen}* die Stabilität der mRNA erhöhen und somit die Translation verstärken. Dadurch kann es dann zur erhöhten Expression von *ybtA_{Yen}-gfp* im Vergleich zu *ybtA_{Yps}-gfp* kommen.

Die vermutlich mit dem ERIC-Element verbundene stärkere *ybtA* Expression in *Y. enterocolitica* im Vergleich zu *Y. pestis* könnte zu verstärkter Transkription der Ybt-Synthesegene und somit zu erhöhter Ybt-Synthese führen. Dies kann ein Grund sein, weshalb *Y. enterocolitica*, nicht aber *Y. pestis* einen Hof auf CAS-Siderophorindikatoragar ausbildet.

4. Herstellung eines YbtA-Antikörpers und Untersuchung der *ybtA* Expression

Zur Untersuchung der *ybtA* Expression in *Y. enterocolitica* O:8, WA-C sollte ein Antikörper gegen YbtA hergestellt werden.

Da AraC-Typ Regulatoren oft schlecht löslich sind (Gallegos *et al.*, 1997) und das Glutathion-S-Transferase- (Gst-) System bekannt dafür ist, die Expression von Proteinen und deren Löslichkeit zu erhöhen, wurde das Gen für den AraC-Typ Regulator YbtA an *gst* fusioniert. Zunächst erfolgte die Reinigung des Fusionsproteins Gst-YbtA aus dem *E. coli* Stamm BL21 (pGEX*ybtA*) über Glutathion-Sepharose mit anschließender präparativer SDS-PAGE. Dieses gereinigte Fusionsprotein wurde dann für die ersten drei Immunisierungen eines Kaninchens

eingesetzt. Es stellte sich heraus, daß in dem Antiserum nach der 3. Immunisierung Antikörper gegen GroEL, aber nicht gegen YbtA, vorhanden waren. In der Literatur wurde bereits mehrfach die gemeinsame Aufreinigung von Gst-Fusionsproteinen und dem 60 kDa großen *E. coli* Chaperon GroEL, das zur Hsp60 (heat-shock protein) Familie gehört, beschrieben (Keresztessy *et al.*, 1996; Thain *et al.*, 1996). Das Chaperon GroEL spielt eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung im Zytosol. 14 Untereinheiten GroEL bilden zusammen mit 7 Untereinheiten GroES (Kofaktor) einen Komplex, in den ein oder zwei Substratmoleküle mit einer Molekularmasse von bis zu 60 kDa eingelagert werden können (Hartl *et al.*, 1994; Houry *et al.*, 1999).

Die Untersuchung des für die Immunisierung gereinigten Gst-YbtA Fusionsproteins zeigte, daß GroEL zusammen mit Gst-YbtA aufgereinigt wurde. In der SDS-PAGE war jedoch aufgrund der gleichen Molekularmasse (60 kDa) von GroEL und Gst-YbtA nur eine Bande sichtbar. Da 14 GroEL-Untereinheiten mit einem oder zwei Substratmolekülen (Gst-YbtA) interagieren, bestand vermutlich der Großteil des gereinigten Proteins aus GroEL. Dies erklärt auch die starke anti-GroEL-Antikörper- bzw. die fehlende anti-Gst-YbtA-Antikörperproduktion, die im Western-Blot (s. Abb. 38A) mit YbtA (BL21(DE3) (pMOSybtA)) bzw. Gst-YbtA (BL21 (pGEXybtA)) synthetisierenden Stämmen nach Detektion mit dem Antiserum aus der 3. Immunisierung sichtbar war.

Für die weitere Reinigung von Gst-YbtA wurde eine *E. coli groEL*-Mutante (CAG9294; Young *et al.*, 1989) verwendet. Der Großteil an Gst-YbtA befand sich in den inclusion bodies, so daß diese über präparative SDS-PAGE gereinigt und in der 4. und 5. Immunisierung eingesetzt wurden. Das Serum nach der 4. und 5. Immunisierung ergab im Western-Blot mit dem YbtA exprimierenden Stamm BL21(DE3) (pMOSybtA) eine deutliche Bande bei ca. 35 kDa (s. Abb. 40). Da die Negativkontrolle BL21(DE3) (pMOSBlue) keine Bande bei 35 kDa aufwies, kann davon ausgegangen werden, daß diese Reaktion spezifisch ist. Allerdings erschien bei beiden Stämmen nach wie vor eine starke Bande bei 60 kDa, die auf den anti-GroEL-Antikörper im Serum zurückzuführen ist. Da diese beiden Banden (35 kDa und 60 kDa) aufgrund ihrer Molekularmasse gut zu unterscheiden sind, stört die Reaktion des Serums mit GroEL in den weiteren Versuchen nicht.

Perry *et al.* (1999) haben mittels SDS-PAGE gezeigt, daß in einer *Y. pestis irp2*-Synthesemutante die Zugabe von Ybt für die maximale Expression eines ca. 29 kDa Proteins essentiell ist. Da YbtA das einzige Protein innerhalb der HPI ist, das annähernd diese Molekularmasse besitzt, wurde angenommen, daß es sich um YbtA handeln könnte.

Da die meisten transkriptionellen Regulatoren in geringer Menge produziert werden (z.B. LacI: 10-20 pro Zelle; TrpR: 50-300 pro Zelle) (Hantke, 2001), ist keine starke Expression von *ybtA* zu erwarten. Andererseits liegen während der exponentiellen Wachstumsphase 5000 Moleküle des Repressors Fur pro Zelle vor (Zheng *et al.*, 1999), was vermuten läßt, daß Fur nicht nur die Genexpression reguliert, sondern auch die DNS durch das Abfangen von Eisen schützt. Dies führte zu der Frage, ob YbtA, neben seiner Funktion als transkriptionellem Regulator, auch als Speicherprotein für Fe-Ybt (wie die Bakterioferritine für Eisen) dienen könnte. Zur Beantwortung dieser Frage sollte die *ybtA* Expression mit Hilfe des YbtA-spezifischen Antiserums näher untersucht werden. Im Western-Blot konnte aber selbst unter Eisenmangel und zu verschiedenen Zeitpunkten kein YbtA in *Y. enterocolitica* WA-C detektiert werden. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß YbtA in sehr geringer Menge vorliegt und wahrscheinlich keine Funktion als Fe-Ybt-Speicher oder "Scavenger" hat.

Um die YbtA-Produktion zu erhöhen, wurde das Plasmid pACYC5.3 (s. Abb. 41), das die Ybt-Transportgene *irp6*, *irp7* und *fyuA* sowie das Gen für den transkriptionellen Regulator *ybtA* trägt, in den HPI-negativen und somit Ybt-defizienten *Y. enterocolitica* Stamm WA-CH⁻ transferiert. Da WA-CH⁻ (pACYC5.3) kein Ybt synthetisieren kann, aber mittels der Transportgene Fe-Ybt aufnehmen kann, sollte mit diesem Stamm die von Perry *et al.* (1999) angedeutete Ybt-abhängige Expression von *ybtA* untersucht werden. Im Western-Blot (s. Abb. 42) war jedoch kein Unterschied der YbtA-Produktion zwischen den verschiedenen Ybt-haltigen und den Ybt-freien Kulturen erkennbar. Dies ist in Übereinstimmung mit *gfp*-Reporterstudien, in denen gezeigt wurde, daß die *ybtA-gfp* Expression in WA-C und in der Ybt-Synthesemutante WA-CS *irp1::Kan^r* annähernd gleich (s. Abb. 35) ist. Diese Ergebnisse zeigen, daß die YbtA-Produktion gering und unabhängig von Fe-Ybt ist.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Mausvirulenz (hochpathogener Phänotyp) von *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* Biogruppe 1B wird durch die chromosomal lokalisierte "High-Pathogenicity Island" (HPI) vermittelt. Die Gene der HPI (*irp1-9*, *fyuA*, *ybtA*) kodieren für das Yersiniabaktin- (Ybt-) Siderophorsystem. In dieser Arbeit wurde das Gencluster *irp6*, *irp7* und *irp8* molekularbiologisch und funktionell analysiert. Die Genprodukte Irp6 und Irp7 weisen hohe Ähnlichkeit zu ABC-Transportern auf. Irp8 zeigt Ähnlichkeit zu einer Permease des β -Lactamase Induktionssystems von *E. coli*. Diese Homologien und die Lokalisation auf der HPI führten zu der Annahme, daß Irp6, Irp7 und Irp8 an der Ybt-Aufnahme bzw. Regulation beteiligt sind.

Durch die Herstellung verschiedener *irp6*- und *irp7*- Mutanten wurde gezeigt, daß Irp6 und Irp7 nicht nur für die Ybt-Aufnahme, sondern auch für die Mausvirulenz essentiell sind. Hingegen zeigte die Inaktivierung von *irp8* weder einen Einfluß auf die Ybt-Aufnahme noch auf die Mausvirulenz.

Im Gegensatz zu dem HPI-negativen Stamm *Y. enterocolitica* NF-O (Biogruppe 1A, nicht-pathogen) führte der Transfer der Ybt-Transportgene - *irp6*, *irp7* und *fyuA* - in *E. coli* H1884 (Mutationen in den Enterochelin-Synthesegenen *entD,F*) zur Ybt-Aufnahme und -Nutzung. Dies läßt vermuten, daß neben den bereits bekannten Transportgenen *irp6*, *irp7* und *fyuA* weitere außerhalb der HPI gelegene Gene für die Ybt-Aufnahme bzw. Nutzung essentiell sind (z.B. Gen für periplasmatisches Bindeprotein).

Die Regulation von *fyuA*, *irp6-9* und *ybtA* wurde in Abhängigkeit von Ybt und anderen Parametern mittels translationeller *gfp*-Reporterfusionen untersucht. *gfp*-Reporterstudien zeigten, daß *irp6*, *irp7* und *irp8* für die Expression von *irp2* (Ybt-Synthesegen) und *fyuA* (Gen für Ybt-Rezeptor) in Eisenmangelmedium (NBD) nicht notwendig sind. Hingegen konnte eine *fyuA*-Rezeptormutante in *gfp*-Reporterstudien erst durch Zugabe von Komponenten des Siderophorindikator- (CAS-) Agars hochreguliert werden. Dies weist darauf hin, daß auch der Ybt-Rezeptor FyuA unter CAS-Agar Wachstumsbedingungen für die Hochregulation der Ybt-Synthese und *fyuA* Expression nicht essentiell ist.

Mittels RT-PCR konnte bestätigt werden, daß die Gene *irp6*, *irp7*, *irp8* und *irp9* ein Operon bilden. Die überlappende Promotorregion von *irp6-9* und *ybtA* ist in *Y. enterocolitica* und *Y. pestis* bis auf die Insertion eines ERIC-Elements in *Y. enterocolitica* nahezu identisch. Durch *irp6-gfp* und *ybtA-gfp* Reporterstudien konnte gezeigt werden, daß das ERIC-Element keinen Einfluß auf die Expression von *irp6-9* hat, möglicherweise jedoch für die starke *ybtA* Expression in *Y. enterocolitica* verantwortlich ist. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß - wie bereits von den anderen Promotoren der HPI bekannt - für eine effiziente Expression des *irp6-9* Operons Ybt und der transkriptionelle Regulator YbtA essentiell sind. Im Falle des *ybtA*-Promotors zeigte sich eine negative Autoregulation durch den transkriptionellen Regulator YbtA. Nach Transfer der *fyuA*-, *irp6*-, *irp7*- und *ybtA*-Gene in den HPI-negativen Stamm *Y. enterocolitica* WA-CH⁻ konnte mittels Western-Blot gezeigt werden, daß *ybtA* unabhängig von Ybt exprimiert wird.

LITERATURVERZEICHNIS

- Achtman, M., G. Morelli, and S. Schwuchow.** 1978. Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of F pili and fate of mating aggregates. *J. Bacteriol.* 135:1053-1061.
- Aleksic, S. and J. Bockemühl.** 1990. Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. *Immun. Infekt.* 18:178-185.
- Andor, A., K. Trülzsch, M. Essler, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, and M. Aepfelbacher.** 2001. YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol.* 3:301-310.
- Angerer, A., S. Enz, M. Ochs, and V. Braun.** 1995. Transcriptional regulation of ferric citrate transport in *Escherichia coli* K-12. Fecl belongs to a new subfamily of sigma 70-type factors that respond to extracytoplasmic stimuli. *Mol. Microbiol.* 18:163-174.
- Autenrieth, I.B. and R. Firsching.** 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J. Med. Microbiol.* 44:285-294.
- Barz, C., T.N. Abahji, K. Truelzsch, and J. Heesemann.** 2000. The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Letters.* 482:139-143.
- Bäumler, A.J. and K. Hantke.** 1992. Ferrioxamine uptake in *Yersinia enterocolitica*: characterization of the receptor protein FoxA. *Mol. Microbiol.* 6:1309-1321.
- Bäumler, A.J., R. Koebnik, I. Stojiljkovic, J. Heesemann, V. Braun, and K. Hantke.** 1993. Survey on newly characterized iron uptake systems of *Yersinia enterocolitica*. *Zentralbl. Bakteriol.* 278:416-424.
- Bearden, S.W., J.D. Fetherston, and R.D. Perry.** 1997. Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 65:1659-1668.
- Bengoechea, J.A., K. Brandenburg, U. Seydel, R. Diaz, and I. Moriyon.** 1998. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* show increased outer membrane permeability to hydrophobic agents which correlates with lipopolysaccharide acyl-chain fluidity. *Microbiology* 144:1517-1526.
- Birnboim, H.C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 7:1513-1523.
- Blight, M.A. and I.B. Holland.** 1990. Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators. *Mol. Microbiol.* 4:873-880.
- Bliska, J.B. and S. Falkow.** 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:3561-3565.

- Boland, A., M.P. Sory, M. Iriarte, C. Kerbouch, P. Wattiau, and G.R. Cornelis.** 1996. Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J.* 15:5191-5201.
- Bolivar, F. and K. Backman.** 1979. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 682:45-67
- Boos, W. and J.M. Lucht.** 1996. Periplasmic binding protein-dependent ABC transporters. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd edn, pp.1175-1209. Edited by F.C.Neidhardt and others. Washington, D.C: American Society for Microbiology.
- Bottone, E.J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:257-276.
- Braun, V., K. Hantke, and W. Koster.** 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met. Ions. Biol. Syst.* 35:67-145.
- Brem, D., C. Pelludat, A. Rakin, C.A. Jacobi, and J. Heesemann.** 2001. Functional analysis of yersiniabactin transport genes of *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology* 147:1115-1127.
- Brenner, D.J.** 1979. Speciation in *Yersinia*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 5:33-43.
- Brett, S.J., A.V. Mazurov, I.G. Charles, and J.P. Tite.** 1993. The invasin protein of *Yersinia* spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins. *Eur. J. Immunol.* 23:1608-1614.
- Brickman, T.J. and M.A. McIntosh.** 1992. Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J. Biol. Chem.* 267:12350-12355.
- Brubaker, R.R.** 1991. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:309-324.
- Carniel, E., D. Mazigh, and H.H. Mollaret.** 1987. Expression of iron-regulated proteins in *Yersinia* species and their relation to virulence. *Infect. Immun.* 55:277-280.
- Carniel, E., A. Guiyoule, I. Guilvout, and O. Mercereau Puijalon.** 1992. Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* 6:379-388.
- Carniel, E., I. Guilvout, and M. Prentice.** 1996. Characterization of a large chromosomal high-pathogenicity island in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 178:6743-6751.
- Chang, A.C. and S.N. Cohen.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134:1141-1156.
- Cornelis, G.R. and H. Wolf-Watz.** 1997. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 23:861-867.

- Cover, T.L. and R.C. Aber.** 1989. *Yersinia enterocolitica*. N. Engl. J. Med. 321:16-24.
- Cox, C.D., K.L. Rinehart, M.L. Moore, and J.C. Cook.** 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:4256-4260.
- Delor, I. and G.R. Cornelis.** 1992. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. Infect. Immun. 60:4269-4277.
- Dequeker, J., R. Jamar, and M. Walravens.** 1980. HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. J. Rheumatol. 7:706-710.
- Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic. Acids. Res. 16:6127-6145.
- Drechsel, H., H. Stephan, R. Lotz, H. Haag, K. Zähler, H. Hantke, and G. Jung.** 1995. Structure elucidation of yersiniabactin, a siderophore from highly virulent *Yersinia* strains. Liebigs Ann. Chem. pp. 1727-1733.
- Earhart, C.F.** 1996. Uptake and metabolism of iron and molybdenum. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, 2nd edn, pp. 1075-1090. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, D.C: American Society for Microbiology.
- Enz, S., S. Mahren, U.H. Stroehrer, and V. Braun.** 2000. Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. J. Bacteriol. 182:637-646.
- Escolar, L., J. Perez-Martin, and V. de-Lorenzo.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. J. Bacteriol. 181:6223-6229.
- Fayet, O., J.M. Louarn, and C. Georgopoulos.** 1986. Suppression of the *Escherichia coli* dnaA46 mutation by amplification of the *groES* and *groEL* genes. Mol. Gen. Genet. 202:435-445.
- Fetherston, J.D., S.W. Bearden, and R.D. Perry.** 1996. YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. Mol. Microbiol. 22:315-325.
- Fetherston, J.D., V.J. Bertolino, and R.D. Perry.** 1999. YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. 32:289-299.
- Flossmann, K.D., C. Grajetzki, and H. Rosner.** 1985. Nachweis von Eisen-Transport-Aktivität in *Pasteurella multocida*-Kulturen. J. Basic. Microbiol. 25:559-567.
- Frederiksen, W.** 1964. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella X*). Proc. 14th. Scand. Congr. Path. Microbiol. 108
- Friedmann, A.M., S.R. Long, S.E. Brown, W.J. Buikema, and F.M. Ausubel.** 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. Gene 18:289-296.

- Galan, J.E., C. Ginocchio, and P. Costeas.** 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 17:4338-4349.
- Gallegos, M.T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hofmann, and J.L. Ramos.** 1997. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:393-410.
- Galyov, E.E., S. Hakansson, A. Forsberg, and H. Wolf-Watz.** 1993. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 361:730-732.
- Gehring, A.M., E. DeMoll, J.D. Fetherston, I. Mori, G.F. Mayhew, F.R. Blattner, C.T. Walsh, and R.D. Perry.** 1998. Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.* 5:573-586.
- Guilvout, I., O. Mercereau Puijalon, S. Bonnefoy, A.P. Pugsley, and E. Carniel.** 1993. High-molecular-weight protein 2 of *Yersinia enterocolitica* is homologous to AngR of *Vibrio anguillarum* and belongs to a family of proteins involved in nonribosomal peptide synthesis. *J. Bacteriol.* 175:5488-5504.
- Guzman, L.M., D. Belin, M.J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose p_{BAD} promoter. *J. Bacteriol.* 177:4121-4130.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Hantke, K.** 1981. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol. Gen. Genet.* 182:288-292.
- Hantke, K.** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:172-177.
- Hartl, F.U., R. Hlodan, and T. Langer.** (1994). Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends. Biochem. Sci.* 19:20-25.
- Heesemann, J. and R. Laufs.** 1983. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J. Bacteriol.* 155:761-767.
- Heesemann, J., U. Gross, N. Schmidt, and R. Laufs.** 1986. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect. Immun.* 54:561-567.
- Heesemann, J.** 1987. Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 48:229-233.
- Heesemann, J. and L. Grüter.** 1987. Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 40:37-41.
- Heesemann, J., K. Hantke, T. Vocke, E. Saken, A. Rakin, I. Stojiljkovic, and R. Berner.** 1993. Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production,

expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65 000 Da and pesticin sensitivity. *Mol. Microbiol.* 8:397-408.

Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:67-113.

Hoiczky, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* 19:5989-5999.

Holmstrom, A., J. Olsson, P. Cherepanov, E. Maier, R. Nordfeldth, J. Petterson, R. Benz, H. Wolf-Watz, and A. Forsberg. 2001. LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* 39:620-632.

Hoogkamp-Korstanje, J.A. and J. de-Koning. 1990. Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia enterocolitica*-Infektionen. *Immun. Infekt.* 18:192-197.

Houry, W.A., D. Frishman, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, and F.U. Hartl. 1999. Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* 402:147-154.

Hu, P.C., G.C. Yang, and R.R. Brubaker. 1972. Specificity, induction, and absorption of pesticin. *J. Bacteriol.* 112:212-219.

Iriarte, M., M.P. Sory, A. Boland, A.P. Boyd, S.D. Mills, I. Lambermont, and G.R. Cornelis. 1998. TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.* 17:1907-1918.

Jacobi, C.A. 1999. Analyse von Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica* mit den Reportergen GFP und Luziferase. Dissertation an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Jacobi, C.A., A. Roggenkamp, A. Rakin, R. Zumbühl, L. Leitritz, and J. Heesemann. 1998. *In vitro* and *in vivo* expression studies of *yopE* from *Yersinia enterocolitica* using the *gfp* reporter gene. *Mol. Microbiol.* 30:865-882.

Jacobs, C., J.M. Frere, and S. Normark. 1997. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* 88:823-832.

Juris, S.J., A.E. Rudolph, D. Huddler, K. Orth, and J.E. Dixon. 2000. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: Actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:9431-9436.

Kaniga, K., I. Delor, and G.R. Cornelis. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109:137-141.

Keresztesy, Z., J. Hughes, L. Kiss, and M.A. Hughes. 1996. Co-purification from *Escherichia coli* of a plant beta-glucosidase-glutathione S-transferase fusion protein and the bacterial chaperonin GroEL. *Biochem. J.* 31:4-7

- Kim, I., A. Stiefel, S. Plantor, A. Angerer, and V. Braun.** 1997. Transcription induction of the ferric citrate transport genes via the N-terminus of the FecA outer membrane protein, the Ton system and the electrochemical potential of the cytoplasmic membrane. *Mol. Microbiol.* 23:333-344.
- Knapp, W.** 1988. Die Gattung *Yersinia* - Yersiniosen. In H.Brandis und G.Pulverer (ed.), *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*.
- Koebnik, R., K. Hantke, and V. Braun.** 1993. The TonB-dependent ferrichrome receptor FcuA of *Yersinia enterocolitica*: evidence against a strict co-evolution of receptor structure and substrate specificity. *Mol. Microbiol.* 7:383-393.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Leffell, M.S. and J.K. Spitznagel.** 1975. Fate of human lactoferrin and myeloperoxidase in phagocytizing human neutrophils: effects of immunoglobulin G subclasses and immune complexes coated on latex beads. *Infect. Immun.* 12:813-820.
- Leonard, N.J., J.J. McDonald, and M.E. Reichmann.** 1970. Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic acid components. I. Adenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67:93-98.
- Leung, K.Y., B.S. Reisner, and S.C. Straley.** 1990. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect. Immun.* 58:3262-3271.
- Lindquist, S., K. Weston-Hafer, H. Schmidt, C. Pul, G. Korfmann, J. Erickson, C. Sanders, H.H. Martin, and S. Normark.** 1993. AmpG, a signal transducer in chromosomal β -lactamase induction. *Mol. Microbiol.* 9:703-715.
- Michiels, T., J.C. Vanooteghem, C. Lambert-de-Rouvrois, B. China, A. Gustin, P. Boudry, and G.R. Cornelis.** 1991. Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 173:4994-5009.
- Miles, E.W.** 1977. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol.* 474:31-42
- Miller, V.L. and J.J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 170:2575-2583.
- Orth, K., L.E. Palmer, Z.Q. Bao, S. Stewart, A.E. Rudolph, J.B. Bliska, and J.E. Dixon.** 1999. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* 285:1920-1923.
- Ozenberger, B.A., T.J. Brickman, and M.A. McIntosh.** 1989. Nucleotide sequence of *Escherichia coli* isochorismate synthetase gene *entC* and evolutionary relationship of isochorismate synthetase and other chorismate-utilizing enzymes. *J. Bacteriol.* 171:775-783.
- Pelludat, C., A. Rakin, C.A. Jacobi, S. Schubert, and J. Heesemann.** 1998. The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J. Bacteriol.* 180:538-546.

- Pelludat, C.** 2000. Molekulare Charakterisierung der Pathogenitätsinsel von *Yersinia enterocolitica* und ihr Einfluß auf die aktive Eisenaufnahme. Dissertation an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Pepe, J.C. and V.L. Miller.** 1993. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6473-6477.
- Perry, R.D. and J.D. Fetherston.** 1997. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague. Clin. Microbiol. Rev. 10:35-66.
- Perry, R.D., P.B. Balbo, H.A. Jones, J.D. Fetherston, and E. DeMoll.** 1999. Yersiniabactin from *Yersinia pestis* : biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. Microbiology 145:1181-1190.
- Persson, C., N. Carballeira, H. Wolf-Watz, and M. Fallman.** 1997. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130^{Cas} and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. EMBO J. 16:2307-2318.
- Pilz, D., T. Vocke, J. Heesemann, and V. Brade.** 1992. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. Infect. Immun. 60:189-195.
- Portnoy, D.A., S.L. Moseley, and S. Falkow.** 1981. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. Infect. Immun. 31:775-782.
- Prentki, P., F. Karch, S. Iida, and J. Meyer.** 1981. The plasmid cloning vector pBR325 contains a 482 base-pair-long inverted duplication. Gene 14:289-299.
- Rabson, A.R., A.F. Hallett, and H.J. Koornhof.** 1975. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. J. Infect. Dis. 131:447-451.
- Rakin, A., E. Saken, D. Harmsen, and J. Heesemann.** 1994. The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. Mol. Microbiol. 13:253-263.
- Rakin, A. and J. Heesemann.** 1995. Virulence-associated *fyuA/irp2* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* biotype 1B carries a novel insertion sequence IS1328. FEMS Microbiol. Lett. 129:287-292.
- Rakin, A., P. Urbitsch, and J. Heesemann.** 1995. Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species. J. Bacteriol. 177:2292-2298.
- Rakin, A., C. Noelting, S. Schubert, and J. Heesemann.** 1999a. Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 67:5265-5274.
- Rakin, A., S. Schubert, C. Pelludat, D. Brem, and J. Heesemann.** 1999b. The high-pathogenicity island of yersiniae. In Pathogenicity islands and other mobile virulence elements, 1st edn, pp.77-90. Edited by J.B. Kaper & J. Hacker. Washington, DC: American Society for Microbiology.

- Ratledge, C. and L.G. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881-941.
- Rosqvist, R., A. Forsberg, and H. Wolf-Watz.** 1991. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* 59:4562-4569.
- Rosqvist, R., K.E. Magnusson, and H. Wolf-Watz.** 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* 13:964-972.
- Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, S. Schubert, and J. Heesemann.** 1996. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.* 64:724-733.
- Ruckdeschel, K., S. Harb, A. Roggenkamp, M. Hornef, R. Zumbihl, S. Kohler, J. Heesemann, and B. Rouot.** 1998. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF- κ B: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage TNF- α production. *J. Exp. Med.* 187:1069-1079.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Saken, E., A. Rakin, and J. Heesemann.** 2000. Molecular characterization of a novel siderophore-independent iron transport system in *Yersinia*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:51-60.
- Sauer, M., K. Hantke, and V. Braun.** 1990. Sequence of the *fhuE* outer-membrane receptor gene of *Escherichia coli* K12 and properties of mutants. *Mol. Microbiol.* 4:427-437.
- Schubert, S., A. Rakin, H. Karch, E. Carniel, and J. Heesemann.** 1998. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.* 66:480-485.
- Schubert, S., D. Fischer, and J. Heesemann.** 1999. Ferric enterochelin transport in *Yersinia enterocolitica*: molecular and evolutionary aspects. *J. Bacteriol.* 181:6387-6395.
- Schubert, S., S. Cuenca, D. Fischer, and J. Heesemann.** 2000. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in Enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: Prevalence and functional expression. *J. Infect. Dis.* 182:1268-1271.
- Schulte, R., S. Kernels, S. Klinke, H. Bartels, S. Preger, J. Kraehenbuhl, E. Pringault, and I.B. Autenrieth.** 2000. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol.* 2:173-185.
- Schwyn, B. and J.B. Neilands.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160:47-56.
- Serino, L., C. Reimann, H. Baur, M. Beyeler, P. Visca, and D. Haas.** 1995. Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* 249:217-228.

- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler.** 1988. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology* 1:784-785.
- Skorupski, K. and R.K. Taylor.** 1996. Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* 169:47-52.
- Skurnik, M., Y. el-Tahir, M. Saarinen, S. Jalkanen, and P. Toivanen.** 1994. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect. Immun.* 62:1252-1261.
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Staggs, T.M., J.D. Fetherston, and R.D. Perry.** 1994. Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis fur* mutation. *J. Bacteriol.* 176:7614-7624.
- Stojiljkovic, I. and H. Hantke.** 1992. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria. *EMBO J.* 11:4359-4367.
- Stojiljkovic, I. and K. Hantke.** 1994. Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 13:719-732.
- Studier, F.W. and B.A. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189:113-130.
- Tabor, S. and C.C. Richardson.** 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:1074-1078.
- Thain, A., K. Gaston, O. Jenkins, and A.R. Clarke.** 1996. A method for the separation of GST fusion proteins from co-purifying GroEL. *Trends. Genet.* 12:209-210.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4350-4354.
- Une, T. and R.R. Brubaker.** 1984. *In vivo* comparison of avirulent Vwa⁻ and Pgm⁻ or Pst^f phenotypes of yersiniae. *Infect. Immun.* 43:895-900.
- Wake, A., M. Misawa, and A. Matsui.** 1975. Siderochrome production by *Yersinia pestis* and its relation to virulence. *Infect. Immun.* 12:1211-1213.
- Wauters, G., K. Kandolo, and M. Janssens.** 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9:14-21
- Winblad, S.** 1969. Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*. *Scand. J. Infect. Dis.* 1:11-16.

Young, K.D., R.J. Anderson, and R.J. Hafner. 1989. Lysis of *Escherichia coli* by the bacteriophage Φ X174 E protein: inhibition of lysis by heat shock proteins. *J. Bacteriol.* 171:4334-4341.

Zheng, M., B. Doan, T.D. Schneider, and G. Storz. 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* 181:4639-4643.

Zumbihl, R., M. Aepfelbacher, A. Andor, C.A. Jacobi, K. Ruckdeschel, B. Rouot, and J. Heesemann. 1999. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* 274:29289-29293.

PUBLIKATIONSLISTE

Brem, D., C. Pelludat, A. Rakin, C.A. Jacobi, and J. Heesemann. 2001. Functional analysis of yersiniabactin transport genes of *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology* 147:1115-1127.

Rakin, A., S. Schubert, C. Pelludat, D. Brem, and J. Heesemann. 1999. The high-pathogenicity island of yersiniae. In *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements*, 1st edn, pp.77-90. Edited by J.B. Kaper & J. Hacker. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Liebl; W., Brem, D. and A. Gotschlich. 1998. Analysis of the gene for beta-fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:55-64

Die vorliegende Arbeit wurde am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann von Oktober 1997 bis Juli 2001 angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die Bereitstellung des Themas und die vielen hilfreichen Ideen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. K.-H. Schleifer für die freundliche Betreuung von Seiten der Technischen Universität München und für seine Hilfsbereitschaft bei der schnellen Abwicklung der Formalitäten.

Herrn Dr. A. Rakin für die Vorarbeiten, die mir einen schnellen Einstieg in das Thema ermöglicht haben.

Cosima Pelludat für die zahlreichen Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sowie die kritische Korrektur meiner Doktorarbeit.

Christina Nölting ebenfalls für die gewissenhafte Korrektur meiner Doktorarbeit sowie die jahrelange sehr gute Zusammenarbeit.

Christoph Jacobi für die gute "nachbarschaftliche" Zusammenarbeit und seine Hilfe bei den Reporterstudien.

Azuka Iwobi für ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Gottfried Wilharm, der mich in allen "Proteinfragen" beraten hat.

Den Mitarbeitern der EDV für die Unterstützung im "Kampf" mit den Computern und Druckern.

Allen Mitarbeitern der Bakteriologie für das sehr angenehme Arbeitsklima sowie die vielen gelungenen Festivitäten und Unternehmungen.

Meiner Freundin Astrid Gotschlich für die zahlreichen Tips zur Abwicklung der Formalitäten an der TU München.

Meiner Mutter, die mir diese Ausbildung ermöglicht, mich unterstützt und motiviert hat.

Meinem Freund Clemens Schilling für sein Verständnis und seine Geduld während meiner Doktorarbeit.