
BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE

**Molekulare und biochemische Charakterisierung der
 β -Laktamasen von
Yersinia enterocolitica
und deren Sekretionsverhalten**



DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Eva-Maria Schriefer

aus Coburg

Würzburg, 2012

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Erstgutachter:

Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Jürgen Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung:

Ich versichere, dass die vorliegende Dissertation nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt und von mir selbständig durchgeführt und verfasst wurde.

Diese Arbeit hat weder in dieser noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologe Univ.“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Eva-Maria Schriefer

Diese Arbeit wurde am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann) angefertigt.

Success is the ability to go from one failure to another with no loss of enthusiasm

(Sir Winston Churchill)

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIV
TABELLENVERZEICHNIS	XVI
Zusammenfassung	- 1 -
Abstract.....	- 4 -
1 Einleitung.....	- 7 -
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i>	- 7 -
1.1.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	- 7 -
1.1.2 Pathogenese und Virulenzfaktoren von <i>Y. enterocolitica</i>	- 8 -
1.1.2.1 Das Typ III-Sekretionssystem.....	- 9 -
1.1.2.2 Die Yop-Effektoren	- 11 -
1.1.2.3 Sekretion und Translokation der Yops.....	- 13 -
1.2 Proteintransport über bakterielle Membranen	- 16 -
1.2.1 Sekretionssysteme in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien	- 16 -
1.2.2 Das Sec-System	- 19 -
1.2.2.1 Sec-Signalsequenzen	- 19 -
1.2.2.2 Die Sec-abhängige Proteintranslokation.....	- 20 -
1.2.3 Das Tat-System	- 22 -
1.2.3.1 Tat-Signalsequenzen	- 22 -
1.2.3.2 Faltung des Tat-Substrats im Cytoplasma und Qualitätskontrolle	- 23 -
1.2.3.3 Die Tat-Translokase und der Tat-abhängige Transport	- 24 -
1.2.3.4 Bedeutung des Tat-Systems für die Pathogenität von Bakterien	- 27 -
1.2.3.5 Das Tat-System in Yersinien	- 28 -
1.3 β -Laktam-Antibiotika und β -Laktamasen.....	- 29 -
1.3.1 β -Laktam-Antibiotika	- 29 -
1.3.1.1 Einteilung und Struktur.....	- 29 -

INHALTSVERZEICHNIS

1.3.1.2	Wirkungsmechanismus der β -Laktam-Antibiotika.....	- 31 -
1.3.2	β -Laktamasen.....	- 32 -
1.3.2.1	Einteilung der β -Laktamasen in verschiedene Gruppen.....	- 33 -
1.3.2.2	Struktur und Wirkungsmechanismus von β -Laktamasen	- 35 -
1.3.2.3	Mechanismus der Induktion von AmpC β -Laktamasen.....	- 37 -
1.3.3	β -Laktamasen in Yersinien	- 40 -
1.3.4	Transport von β -Laktamasen ins Periplasma	- 42 -
1.4	Zielsetzung.....	- 43 -
2	Material und Methoden	- 46 -
2.1	Material.....	- 46 -
2.1.1	Geräte.....	- 46 -
2.1.2	Chemikalien und Biochemikalien.....	- 47 -
2.2	Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	- 49 -
2.2.1	Bakterienstämme	- 49 -
2.2.2	Plasmide	- 50 -
2.2.3	Oligonukleotide	- 53 -
2.3	Nährmedien und Antibiotika.....	- 58 -
2.3.1	Nährmedien.....	- 58 -
2.3.2	Antibiotika	- 59 -
2.4	Antikörper	- 59 -
2.5	Proteine	- 60 -
2.6	Molekularbiologische Kits	- 60 -
2.7	Mikrobiologische Methoden	- 60 -
2.7.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Yersinia enterocolitica</i>	- 60 -

INHALTSVERZEICHNIS

2.7.2	Stammhaltung	- 61 -
2.7.3	Messung der optischen Dichte	- 61 -
2.8	Molekularbiologische und genetische Methoden	- 61 -
2.8.1	Isolierung und Konzentrationsbestimmung von DNA	- 61 -
2.8.1.1	Isolierung von Plamid-DNA	- 61 -
2.8.1.2	DNA Fällung	- 61 -
2.8.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	- 62 -
2.8.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	- 62 -
2.8.3	Kolonie-PCR.....	- 64 -
2.8.4	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	- 64 -
2.8.5	Agarosegelelektrophorese	- 65 -
2.8.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	- 65 -
2.8.7	Sequenzierung von DNA	- 66 -
2.8.8	Enzymatische Modifikation von DNA	- 66 -
2.8.8.1	Restriktionsverdau	- 66 -
2.8.8.2	Dephosphorylierung von DNA	- 66 -
2.8.8.3	Ligation linearer DNA-Fragment	- 66 -
2.8.8.4	Generierung von 3'-Adenosin-Überhängen nach der Amplifikation durch PCR	- 67 -
2.8.9	Kompetente Zellen und Elektroporation	- 67 -
2.8.9.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	- 67 -
2.8.9.2	Transformation elektrokompenter Bakterien	- 67 -
2.8.10	Herstellung von Deletionsmutanten durch homologe Rekombination („ET-Klonierung“)	- 68 -
2.8.10.1	Herstellung elektrokompenter Stämme für die Mutagenese	- 68 -
2.8.10.2	„Primerdesign“	- 69 -
2.8.10.3	Herstellung eines linearen PCR-Fragments für die Rekombination	- 69 -
2.8.10.4	Elektroporation und Selektion der Mutanten	- 69 -
2.8.10.5	Entfernen des Resistenzmarkers mittels FLP-Rekombination	- 70 -
2.8.11	Konstruktion von Stämmen und Plasmiden	- 71 -

INHALTSVERZEICHNIS

2.8.11.1	Konstruktion von Komplementanten der <i>ampC</i> und <i>blaA</i> Deletionsmutaten	- 71 -
2.8.11.2	Konstruktion verschiedener YopE-Hybride in pACYC184	- 72 -
2.8.11.3	Konstruktion eines Expressionsplasmids zur rekombinanten Herstellung von BlaA	- 73 -
2.8.11.4	Konstruktion von <i>Yersinia enterocolitica</i> Stämmen mit pWS-Plasmiden	- 73 -
2.9	Proteinbiochemische Methoden	- 75 -
2.9.1	Präparation von Gesamtzelllysaten	- 75 -
2.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (mod. nach (Bradford, 1976)	- 75 -
2.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 76 -
2.9.4	Coomassie-Färbung	- 77 -
2.9.5	Western-Blot (Immunoblot)	- 77 -
2.9.6	Isolierung von sezernierten Yop-Proteinen von <i>Yersinia</i> aus dem Kulturüberstand	- 78 -
2.9.7	Präparation von periplasmatischen Extrakten	- 79 -
2.10	Proteinexpression und Proteinreinigung	- 80 -
2.10.1	Überexpression von Proteinen mit His ₆ -„tag“	- 80 -
2.10.2	Reinigung von Proteinen mit His ₆ -„tag“ durch „Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“ (IMAC)	- 80 -
2.10.3	Gelfiltration (Größenausschluss-Chromatographie)	- 81 -
2.11	Zellbiologische Methoden	- 82 -
2.11.1	Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien (HEK-293-Zellen)	- 82 -
2.11.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	- 82 -
2.11.3	Zellzahlbestimmung	- 83 -
2.12	<i>In vitro</i> Infektion von Zellen mit Yersinien	- 83 -
2.12.1	Kultivierung von <i>Yersinia enterocolitica</i> für Infektionsversuche	- 83 -
2.12.2	Infektion von HEK-293-Zellen mit <i>Yersinia enterocolitica</i>	- 84 -
2.13	β-Laktamase Assay zum Nachweis der Translokation von YopE-Reporterfusionsproteinen	- 84 -

INHALTSVERZEICHNIS

2.14	Durchflusszytometrie-Messung (FACS-Analyse)	- 85 -
2.15	Fluoreszenzmikroskopie und Immunfluoreszenzfärbung	- 85 -
2.15.1	Fluoreszenzmikroskopie der GFP-Fusionsproteine	- 86 -
2.15.2	Immunfluoreszenzfärbung von intrazellulären und periplasmatischen Proteinen	- 86 -
2.16	Antibiotika-Sensitivitätstests	- 87 -
2.16.1	Antibiotika-Sensitivitätstest in Flüssigkultur	- 87 -
2.16.2	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Agardiffusionstest	- 88 -
2.16.3	Antibiotika-Sensitivitätstest in einer 3D extrazellulären Matrix (3D-CoG)	- 88 -
2.17	Destabilisierung des bakteriellen Cytoskeletts mit A22	- 89 -
2.18	Induktion der β -Laktamase Aktivität	- 89 -
2.19	Temperaturabhängige Aktivitätstests von β -Laktamasen	- 90 -
2.20	Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge	- 91 -
2.20.1	Circulardichroismus (CD)-Spektrometrie	- 91 -
2.20.2	Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge	- 91 -
2.21	<i>In silico</i> Analysen zur Bestimmung von Sec- oder Tat-Signalsequenzen	- 92 -
3	Ergebnisse I	- 93 -
3.1	Konstruktion von β -Laktamase-Deletionsmutanten in <i>Yersinia enterocolitica</i> und deren Charakterisierung	- 93 -
3.1.1	Konstruktion von β -Laktamase Deletionsmutanten	- 93 -
3.1.2	Ampicillin-Sensitivitätstest in Flüssigkultur	- 94 -
3.1.3	MHK-Bestimmung mittels Agardiffusionstest	- 97 -
3.1.4	Antibiotika-Sensitivitätstest mittels standardisiertem Phoenix-System	- 99 -
3.1.5	Komplementation der β -Laktamase Mutanten	- 100 -
3.1.6	Antibiotika-Sensitivitätstest im 3D Kollagengel (3D-CoG)	- 102 -
3.1.7	Induktion der β -Laktamasen	- 106 -

INHALTSVERZEICHNIS

3.2	Analyse der Translokation der <i>Yersinia</i> β -Laktamasen AmpC und BlaA ins Periplasma.....	- 108 -
3.2.1	<i>In silico</i> Analysen der <i>Yersinia</i> AmpC- und BlaA-Aminosäuresequenzen	- 108 -
3.2.1.1	Aminosäuresequenz-Vergleiche verschiedener β -Laktamasen	- 108 -
3.2.1.2	Vergleich der Signalpeptidsequenzen von BlaA mit denen der mykobakteriellen β -Laktamasen BlaC und BlaS	- 109 -
3.2.1.3	<i>In silico</i> Analysen von β -Laktamase-Signalpeptiden auf Sec- und Tat-abhängige Sekretionssignale	- 110 -
3.2.2	Funktionalität des Tat-Systems in <i>Yersinia enterocolitica</i>	- 112 -
3.2.2.1	Konstruktion einer Δ tatC Deletionsmutante.....	- 113 -
3.2.2.2	Klonierung eines <i>torA-gfp</i> -Fusionskonstrukts in den Expressionsvektor pWS.....	- 115 -
3.2.2.3	Zellfraktionierung von WA ^{RS} $\Delta\Delta$ (pWS- <i>torA</i> ₁₋₅₀ -GFP) und WA ^{RS} Δ tatC (pWS- <i>torA</i> ₁₋₅₀ -GFP) Stämmen	- 116 -
3.2.2.4	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von <i>torA-gfp</i> -exprimierenden <i>Yersinia</i> Stämmen	- 118 -
3.2.3	Ampicillin-Sensitivitätstest der Δ tatC Mutante.....	- 120 -
3.2.4	Funktionelle Charakterisierung von β -Laktamase Signalpeptid-GFP Fusionsproteinen	- 122 -
3.2.4.1	Klonierung von <i>ampC</i> - und <i>blaA</i> -Signalpeptid- <i>gfp</i> Fusionsgenen in den Expressionsvektor pWS.....	- 122 -
3.2.4.2	Wachstum von <i>Y. enterocolitica</i> Stämmen in Gegenwart von Plasmiden, die β -Laktamase Signalpeptid-GFP Fusionsgene exprimieren	- 122 -
3.2.4.3	Zellfraktionierung von WA ^{RS} $\Delta\Delta$ (pWS- <i>ampC</i> ₁₋₃₂ -GFP) und WA ^{RS} $\Delta\Delta$ (pWS- <i>blaA</i> ₁₋₄₀ -GFP) Stämmen	- 123 -
3.2.4.4	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von <i>ampC-gfp</i> und <i>blaA-gfp</i> exprimierenden WA ^{RS} $\Delta\Delta$	- 125 -
3.2.5	Substitution des „Twin-Arginin“-Motivs im BlaA ₁₋₄₀ -GFP Fusionsprotein	- 127 -
3.2.5.1	Klonierung eines <i>blaA</i> ^{QQ} -Signalpeptid- <i>gfp</i> Fusionsgens in den Expressionsvektor pWS.....	- 127 -
3.2.5.2	Zellfraktionierung von WA ^{RS} $\Delta\Delta$ (pWS- <i>blaA</i> ₁₋₄₀ ^{QQ} -GFP).....	- 128 -
3.2.5.3	Fluoreszenzmikroskopische Analyse des WA ^{RS} $\Delta\Delta$ (pWS- <i>blaA</i> ₁₋₄₀ ^{QQ} -GFP) Stammes	- 129 -

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.6	Analyse des $WA^{RS}\Delta tatC$ (pWS-blaA ₁₋₄₀ -GFP) Stammes.....	- 129 -
3.2.6.1	Zellfraktionierung des $WA^{RS}\Delta tatC$ (pWS-blaA ₁₋₄₀ -GFP) Stammes.....	- 130 -
3.2.6.2	Fluoreszenzmikroskopische Analyse des $WA^{RS}\Delta tatC$ (pWS-blaA ₁₋₄₀ -GFP) Stammes	- 131 -
3.2.7	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Translokation der β -Laktamasen AmpC und BlaA	- 131 -
3.3	BlaA kann nicht mittels der AmpC-Signalsequenz ins Periplasma transloziert werden.....	- 132 -
3.3.1	Klonierung eines ampC ₃₂ -blaA _{Δ1-32} -His Fusionsgens in den Expressionsvektor pWS.....	- 132 -
3.3.2	Wachstum von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-ampC ₃₂ -blaA _{Δ1-32} -His).....	- 133 -
3.3.3	Zellfraktionierung des $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-ampC ₃₂ -blaA _{Δ1-32} -His) Stammes.....	- 134 -
3.3.4	Klonierung eines meoA ₁₋₂₆ -blaA _{Δ1-32} -His Fusionsgens in pWS und Zellfraktionierung von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-meoA ₁₋₂₆ -blaA _{Δ1-32} -His).....	- 135 -
3.3.4.1	Klonierung eines meoA ₁₋₂₆ -blaA _{Δ1-32} -His-Fusionsgens	- 136 -
3.3.4.2	Zellfraktionierung des $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-meoA ₁₋₂₆ -blaA _{Δ1-32} -His) Stammes.....	- 136 -
3.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Sec-abhängigen Transport der β -Laktamase BlaA.....	- 137 -
3.4	Spezifische Lokalisierung von BlaA	- 137 -
3.4.1	Expression von <i>gfp</i> in $WA^{RS}\Delta\Delta$	- 137 -
3.4.1.1	Klonierung von <i>gfp</i> in den Expressionsvektor pWS	- 137 -
3.4.1.2	Zellfraktionierung des $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-GFP) Stammes	- 138 -
3.4.1.3	Fluoreszenzmikroskopie von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-GFP).....	- 139 -
3.4.2	Immunfluoreszenznachweis von BlaA-Strep.....	- 139 -
3.4.2.1	Klonierung von <i>blaA</i> -Strep, <i>dmsD</i> -Strep und <i>torA</i> -Strep in pWS.....	- 140 -
3.4.2.2	Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von BlaA-Strep, DmsD-Strep und TorA-Strep, produziert in $WA^{RS}\Delta\Delta$	- 141 -

INHALTSVERZEICHNIS

3.4.3	Destabilisierung des bakteriellen Cytoskeletts mit A22.....	143 -
3.5	Charakterisierung der β -Laktamase BlaA	144 -
3.5.1	Reinigung von BlaA.....	145 -
3.5.1.1	Klonierung von <i>blaA</i> mit C-terminalen His ₆ -„tag“ in pWS.....	145 -
3.5.1.2	Produktion und Reinigung von BlaA-His ₆	145 -
3.5.2	Reinigung von TEM-1 und MEGA	146 -
3.5.3	Thermische Entfaltungsübergänge der β -Laktamasen TEM-1, MEGA und BlaA (Ergebnisse wurden von Stephanie Hoffmann-Thoms, Universität Bayreuth, erarbeitet).....	147 -
3.5.4	Temperaturabhängige, enzymatische Aktivität der β -Laktamasen TEM-1, MEGA und BlaA.....	148 -
4	Ergebnisse II.....	151 -
4.1	Überprüfung der Sekretion verschiedener E _i -TEM-1-Reporterproteine in <i>Yersinia enterocolitica</i>	151 -
4.2	Untersuchung der Sekretionsfähigkeit der β -Laktamasen AmpC und BlaA über das Typ III-Sekretionssystem.....	154 -
4.2.1	Klonierung der Reporterstrukture E ₅₃ -ampC, E ₅₃ -blaA, E ₁₃₈ -ampC und E ₁₃₈ - blaA in pACYC184	154 -
4.2.2	Produktion und Sekretion der Reporterproteine E ₅₃ -AmpC-Strep und E ₅₃ -BlaA- Strep.....	155 -
4.2.3	Produktion und Sekretion der Reporterproteine E ₁₃₈ -AmpC-Strep und E ₁₃₈ -BlaA-Strep.....	158 -
4.2.4	Translokation der Reporterproteine in eukaryotische Zellen	161 -
4.3	Untersuchung der Sekretionsfähigkeit von unterschiedlich-thermisch stabilen β -Laktamasen über das T3SS	163 -
4.3.1	Produktion und Sekretion der Reporterproteine E ₅₃ -RLT, E ₅₃ -MEGA und E ₅₃ -TEM-1 in <i>Y. enterocolitica</i>	164 -
4.3.2	Translokation der TEM-1-Reporterproteine in eukaryotische Zellen	166 -

INHALTSVERZEICHNIS

5	Diskussion	- 168 -
5.1	Charakterisierung der β -Laktamasen AmpC und BlaA von <i>Yersinia enterocolitica</i> WA-314.....	- 168 -
5.1.1	Antibiotika-Empfindlichkeitsprofile von <i>Yersinia enterocolitica</i> WA-314 und von β -Laktamase-Deletionsmutanten.....	- 169 -
5.1.2	BlaA wird Tat-abhängig, AmpC Sec-abhängig ins Periplasma transloziert.....	- 171 -
5.1.3	Spezifische Lokalisierung von BlaA im Periplasma	- 176 -
5.1.4	Mögliche physiologische Rolle von BlaA	- 179 -
5.2	β -Laktamasen als Reporterproteine zur Untersuchung der Sekretion und Translokation von T3SS-Substraten	- 181 -
5.2.1	<i>Yersinia</i> β -Laktamasen AmpC und BlaA als T3SS-Reporterkonstrukte	- 183 -
5.2.2	Ysc-T3SS Sekretion von thermisch unterschiedlich stabilen YopE _i -TEM-1 Substratvarianten.....	- 189 -
6	Literaturverzeichnis	- 192 -
7	Anhang.....	- 213 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	Dreidimensional
3D-CoG	Dreidimensionale Kollagenmatrix
A	Adenin, Ampere
Å	Angström
A22	S-(3,4-dichlorbenzyl)-isothiourea
ABC	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette
Ail	<u>A</u> ttachment <u>i</u> nvasion <u>l</u> ocus
Amp	Ampicillin
ACA	7-Aminocephalosporinsäure
APA	6-Aminopenicillansäure
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
BHI	<u>B</u> rain- <u>H</u> eart- <u>I</u> nfusion
bp	Basenpaare
BSA	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
Ca ²⁺	Calcium Ionen
Cb	Chaperon-Bindestelle, Carbenicillin
CCF4-AM	Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein-Acetoxymethyl
CD	Circulardichroismus
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
C _p	Wärmekapazität
Cu ²⁺	Kupfer Ionen
Δ	Delta
Da	Dalton
DAP	Diaminopimelinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
dest.	Destilliert
d.h.	Das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	et alteri: und andere
FACS	<u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting
FCS	Fetales Kälberserum
Fla-T3SS	Flagellen Typ III-Sekretionssystem
FRET	<u>F</u> luoreszenz- <u>R</u> esonanz- <u>E</u> nergie- <u>T</u> ransfer
FRT	FLP recognition target
g	Gramm
G	Guanin, Glycin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GFP	Green fluorescent protein
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GDI	<u>G</u> uanidine <u>n</u> ucleotide <u>d</u> issociation <u>i</u> nhibitors
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HEK	<u>H</u> uman <u>e</u> mryonic <u>k</u> idney
His	Histidin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
IKK β	Inhibitor von NF- κ B
Inv	Invasin
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
konz.	Konzentriert
KÜPs	Präzipitierte Kulturüberstandsproteine
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Milli, Meter
M	Molar, Mega
μ	Mikro
MAP	<u>M</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein
MHA	<u>M</u> ueller- <u>H</u> inton <u>A</u> gar
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MFP	<u>M</u> embrane <u>f</u> usion <u>p</u> rotein
min	Minute
MOI	<u>M</u> ultiplicity of <u>i</u> nfection

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mod.	Modifiziert
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
Myf	Mucoid <i>Yersinia</i> factor
n	Nano
N-terminal	Amino-terminal
Nal	Nalidixinsäure
Ni ²⁺	Nickel Ionen
NMR	Kernspinresonanz („nuclear magnetic resonance“)
OD	Optische Dichte
OMP	<u>O</u> uter <u>m</u> embrane <u>p</u> rotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBP	Penicillin Bindeprotein
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration in einer wässrigen Lösung
pl	pH-Wert für den isoelektrischen Punkt eines geladenen Proteins
PMF	Protonenmotorische Kraft („proton motive force“)
psi	„pounds per square inch“; 1 psi = 6,895 kPa
PTPase	Protein-Tyrosinphosphatase
P _{tac}	Hybridpromotor des <i>lac</i> - und <i>trp</i> -Operons
P _{araB}	Arabinose-induzierbarer Promotor aus <i>E. coli</i>
pYV	<i>Yersinia</i> <i>virulence</i> Plasmid
r	Resistent
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	<u>S</u> hrimp <u>A</u> lkalische <u>P</u> hosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	<u>S</u> ecretion
Sp	Spectinomycin
SRP	<u>S</u> ignal <u>r</u> ecognition <u>p</u> article
s	Sekunde
sp./spp.	Spezies
ssp	Subspezies
Syc	<u>S</u> pecific <u>Y</u> op <u>c</u> haperone
T	Thymin
T1SS	Typ I-Sekretionssystem
T2SS	Typ II-Sekretionssystem
T3SS	Typ III-Sekretionssystem
T4SS	Typ IV-Sekretionssystem

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

T5SS	Typ V-Sekretionssystem
T6SS	Typ VI-Sekretionssystem
T7SS	Typ VII-Sekretionssystem
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA
Tat	<u>T</u> win- <u>a</u> rginine <u>t</u> ranslocation
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
T _M	Schmelztemperatur
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	Unter anderem
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
usw.	Und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	Vor allem
vgl.	Vergleiche
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsion A
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
YpkA	<i>Yersinia</i> protein kinase A
Ysc	Yop secretion
Ysc-T3SS	pYV-kodierendes <i>Yersinia</i> T3SS
z.B.	Zum Beispiel
Zn ²⁺	Zink Ionen

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Darstellung des T3SS	- 11 -
Abb. 2: Schematischer Vergleich von typischen N-terminalen Signalsequenzen von Sec- und Tat-Substraten.	- 20 -
Abb. 3: Modell zum Mechanismus des Aufbaus der Tat-Translokase und der Translokation der Tat-Substrate über die Cytoplasmamembran (Bild aus Natale, <i>et al.</i> , 2008).	- 26 -
Abb. 4: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus der Spaltung des β -Laktam-Rings durch eine Serin- β -Laktamase (nach Ghuysen, 1994).	- 36 -
Abb. 5: Dreidimensionale Struktur der Klasse A β -Laktamase MFO von <i>Mycobacterium fortuitum</i> (Sauvage, <i>et al.</i> , 2006).....	- 37 -
Abb. 6: Schematische Darstellung des Mechanismus der Induktion von AmpC β -Laktamasen (nach Moya, <i>et al.</i> , 2009)	- 40 -
Abb. 7: Strategie der „ET-Klonierung“ (Datsenko & Wanner, 2000).....	- 71 -
Abb. 8: Ampicillin-Sensitivitätstest in Flüssigkultur	- 96 -
Abb. 9: Ampicillin-Sensitivitätstest der Komplementanten in Flüssigkultur	- 101 -
Abb. 10: Wachstum und Antibiotika-Empfindlichkeit von <i>Y. enterocolitica</i> Stämmen im 3D-Kollagengel.	- 104 -
Abb. 11: β -Laktamase-Induktion in Flüssigkultur.	- 107 -
Abb. 12: Vergleiche der Signalpeptidsequenzen und des „Twin-Arginin“-Motiv verschiedener β -Laktamasen	- 110 -
Abb. 13: Schematische Darstellung der Organisation des <i>tat</i> Operons und der Inaktivierung des <i>tatC</i> -Gens.	- 114 -
Abb. 14: Schematische Darstellung der verwendeten GFP-Reporterkonstrukte.	- 115 -
Abb. 15: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des TorA ₁₋₅₀ -GFP Fusionsproteins.	- 117 -
Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopie von <i>torA-gfp</i> -exprimierenden <i>Yersinia</i> Stämmen.....	- 119 -
Abb. 17: Ampicillin-Sensitivitätstest der <i>tatC</i> -Deletionsmutante in Flüssigkultur.	- 121 -
Abb. 18: Überexpression von <i>ampC</i> - und <i>blaA</i> -Signalpeptid- <i>gfp</i> Fusionsgenen in WA ^{RS} $\Delta\Delta$	- 123 -
Abb. 19: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung der AmpC ₁₋₃₂ -GFP und BlaA ₁₋₄₀ -GFP Fusionsproteine, produziert in WA ^{RS} $\Delta\Delta$	- 124 -
Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopie von <i>ampC-gfp</i> und <i>blaA-gfp</i> exprimierenden WA ^{RS} $\Delta\Delta$	- 126 -
Abb. 21: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des BlaA ₁₋₄₀ ^{QQ} -GFP Fusionsproteins produziert in WA ^{RS} $\Delta\Delta$	- 128 -
Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopie von WA ^{RS} $\Delta\Delta$ (pWS- <i>blaA</i> ₁₋₄₀ ^{QQ} -GFP).	- 129 -

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 23: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des BlaA ₁₋₄₀ -GFP Fusionsproteins im WA ^{RS} Δ <i>tatC</i> Stamm	- 130 -
Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopie von <i>blaA-gfp</i> exprimierenden WA ^{RS} Δ <i>tatC</i>	- 131 -
Abb. 25: Schematische Darstellung der BlaA-Fusionsproteine	- 133 -
Abb. 26: Überexpression des ampC ₃₂ - <i>blaA</i> Δ ₁₋₃₂ -His Fusionsgens in WA ^{RS} $\Delta\Delta$	- 134 -
Abb. 27: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des AmpC ₁₋₃₂ -BlaA Δ ₁₋₃₂ -His Fusionsproteins produziert in WA ^{RS} $\Delta\Delta$	- 135 -
Abb. 28: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des MeoA ₁₋₂₆ -BlaA Δ ₁₋₃₂ -His Fusionsproteins produziert in WA ^{RS} $\Delta\Delta$	- 136 -
Abb. 29: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des GFP-Proteins in WA ^{RS} $\Delta\Delta$	- 138 -
Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopie von WA ^{RS} $\Delta\Delta$ (pWS-GFP).	- 139 -
Abb. 31: Schematische Darstellung der verwendeten Reporterproteine mit C-terminalem Strep-„tag“.....	- 141 -
Abb. 32: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung der BlaA-Strep, DmsD-Strep und TorA-Strep Fusionsproteine in <i>Yersinia</i>	- 142 -
Abb. 33: SDS-PAGE zur Probenkontrolle bei der Aufreinigung von BlaA-His.....	- 146 -
Abb. 34: Thermische Entfaltungsübergänge der β -Laktamasen TEM-1, MEGA und BlaA (Messungen wurden von Stephanie Hoffmann-Thoms, Universität Bayreuth, durchgeführt).....	- 148 -
Abb. 35: Temperaturabhängige enzymatische Aktivitäten von TEM-1, MEGA und BlaA.	- 149 -
Abb. 36: Produktion und Sekretion von E ₇ -TEM-1-Reporterproteinen in WA ^{RS} $\Delta\Delta$	- 153 -
Abb. 37: Schematische Darstellung der YopE-Fusionsproteine	- 155 -
Abb. 38: Überprüfung der Produktion und Sekretion der E ₅₃ -AmpC-Strep und E ₅₃ -BlaA-Strep-Fusionsproteine in <i>Y. enterocolitica</i>	- 156 -
Abb. 39: Überprüfung der Produktion und Sekretion der E ₁₃₈ -AmpC-Strep und E ₁₃₈ -BlaA-Strep-Fusionsproteine in <i>Y. enterocolitica</i>	- 160 -
Abb. 40: Translokation der YopE-Reporterproteine in HEK-293 Zellen.	- 162 -
Abb. 41: Überprüfung der Produktion und Sekretion der E ₅₃ -RLT, E ₅₃ -MEGA und E ₅₃ -TEM-1 Fusionsproteine in <i>Y. enterocolitica</i>	- 165 -
Abb. 42: Translokation der E ₅₃ -X-Reporterproteine in HEK-293-Zellen.	- 166 -
Abb. 43: Aminosäuresequenz-Vergleich der Signalsequenzen von BlaA verschiedener <i>Yersinia</i> Arten (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).	- 174 -
Abb. 44: Schematische Darstellung des Ysc-T3SS zur Interpretation des Sekretionsergebnisses von Signalpeptid-Reporter-Fusionsproteinen (Details im Text).....	- 187 -

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Grundstrukturen und typische Vertreter der fünf Gruppen der β -Laktam-Antibiotika.	- 31 -
Tab. 2: Klassifizierung der β -Laktamasen nach BJM (Bush, Jacobi und Medeiros, 1995) und Ambler (1980).	- 35 -
Tab. 3: Verwendete Geräte	- 46 -
Tab. 4: Bezugsquellen für Chemikalien und Biochemikalien	- 47 -
Tab. 5: Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	- 49 -
Tab. 6: Verwendete <i>Yersinia</i> Stämme	- 49 -
Tab. 7: Verwendete Plasmide	- 50 -
Tab. 8: Rekombinante Plasmide	- 51 -
Tab. 9: Verwendete Oligonukleotide.	- 53 -
Tab. 10: Verwendete Antibiotika	- 59 -
Tab. 11: Liste der verwendeten Antikörper und ihre eingesetzte Verdünnung bzw. Konzentration.	- 59 -
Tab. 12: Verwendete Proteine	- 60 -
Tab. 13: Liste der verwendeten Kits.....	- 60 -
Tab. 14: Reaktionsansatz und -programm für den Red-Taq DNA-Polymerase 2X Master Mix, 2,0 mM MgCl ₂	- 62 -
Tab. 15: Reaktionsansatz und-programm für den Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	- 64 -
Tab. 16: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele	- 76 -
Tab. 17: MHK-Daten von <i>Y. enterocolitica</i> Stämmen (Agardiffusionstest).....	- 98 -
Tab. 18: MHK-Daten von <i>Y. enterocolitica</i> Stämmen (Phoenix).	- 99 -
Tab. 19: Aminosäuresequenz-Vergleiche verschiedener β -Laktamasen.....	- 109 -
Tab. 20: Untersuchung verschiedener β -Laktamase-Signalpeptide mit Tat-Signalsequenz- Vorhersage-Programmen.	- 111 -
Tab. 21: Liste der vorhergesagten Signalpeptidasespaltstellen der Proteine mit N-terminaler Signalsequenz.....	- 112 -
Tab. 22: Liste der berechneten Molekulargewichte der verwendeten rekombinanten Proteine.	- 117 -

Zusammenfassung

Bereits 1975 wurden in *Yersinia enterocolitica* zwei chromosomal kodierte β -Laktamasen beschrieben: die konstitutiv exprimierte BlaA und die induzierbare AmpC. *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, die neben *Y. enterocolitica* zu den drei humanpathogenen *Yersinia* Arten gehören, fehlen hingegen Gene für β -Laktamasen. Die Produktion von ein oder zwei chromosomalen β -Laktamasen konnte außerdem bei weiteren *Yersinia* Arten wie beispielsweise *Y. intermedia*, *Y. frederikensii* und *Y. bercovieri* festgestellt werden. Es ist jedoch zu erwähnen, dass die Produktion der β -Laktamasen trotz vorhandener β -Laktamase Gene innerhalb der *Yersinia* Arten von Stamm zu Stamm variiert und phänotypisch zu unterschiedlichen MHKs gegenüber β -Laktam-Antibiotika führt. Interessanterweise reagieren die drei humanpathogenen *Yersinia* Arten im Mausinfektionsmodell (*in vivo*) nur schwach empfindlich gegenüber der Behandlung mit üblichen Penicillinen und Cephalosporinen der 1. Generation, wohingegen z.B. Tetrazykline oder Aminoglykoside die Erreger *in vivo* abtöten.

In dieser Arbeit wurden zwei Aspekte der *Yersinia* β -Laktamasen bearbeitet: **(1)** Charakterisierung der β -Laktamasen hinsichtlich β -Laktam-Antibiotikaresistenz, Sekretion und Thermostabilität. **(2)** Untersuchung der Sekretionsfähigkeit von verschiedenen thermostabilen β -Laktamasen über das *Yersinia* T3SS.

Im ersten Teil wurden β -Laktamase-Deletionsmutanten im *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 Stamm WA-314 hergestellt, um den Einfluss der chromosomalen β -Laktamasen auf die *in vitro*-Resistenz zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass WA-314 konstitutiv BlaA produziert und BlaA somit – unter nicht-induzierbaren Bedingungen – der dominante Faktor in der *in vitro*-Resistenz gegenüber Penicillinen mit erweitertem Wirkungsspektrum (z.B. Ampicillin) und Cephalosporinen der 1. Generation (z.B. Cefazolin) ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die zweite chromosomale β -Laktamase AmpC (BlaB) unter Zugabe von subinhibitorischen Konzentrationen von Imipenem stark induziert wird. Keine der β -Laktamasen ist in der Lage, *in vitro*-Resistenz gegenüber Carbapenemen und Monobactamen zu vermitteln. Die Konstruktion und Bestimmung der *in vitro* Antibiotika-Empfindlichkeit der β -Laktamase-Deletionsmutanten dient als Grundlage für nachfolgende Untersuchungen im Mausinfektionsmodell.

ZUSAMMENFASSUNG

Weiterhin wurden die Transporteigenschaften beider β -Laktamasen untersucht. In Gram-negativen Bakterien sind reife β -Laktamasen im Periplasma lokalisiert und müssen somit nach der Synthese im Cytosol über die Cytoplasmamembran transportiert werden. Bis auf drei Ausnahmen (β -Laktamasen aus *Mycobacterium smegmatis*, *M. tuberculosis* und *Stenotrophomonas maltophilia*) sind bisher nur Sec-abhängige β -Laktamasen beschrieben worden. Mittels Fusionsproteinen bestehend aus β -Laktamase-Signalpeptiden und GFP konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei *Yersinia* BlaA um ein Tat-Substrat handelt, bei *Yersinia* AmpC hingegen um ein Sec-Substrat. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal eine Tat-abhängige β -Laktamase bei einer Bakterienart aus der Familie der Enterobacteriaceae nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die β -Laktamase BlaA nicht diffus im Periplasma, sondern auf bestimmte Bereiche im Periplasma lokalisiert verteilt ist. Allerdings konnte die Art der Lokalisierung bisher nicht genau spezifiziert werden.

Die cytosolische Faltung und die Tat-abhängige Translokation von BlaA lassen vermuten, dass eine besondere Thermostabilität von BlaA vorliegt. Deshalb wurde das BlaA-Enzym hinsichtlich seiner Thermostabilität und temperaturabhängigen enzymatischen Aktivität untersucht. Im Vergleich zur *E. coli* β -Laktamase TEM-1 und der hitzestabilen TEM-1-Variante MEGA zeigte BlaA eine erhöhte Thermostabilität und einen starken Anstieg der Aktivität in einem Temperaturbereich zwischen 30 °C und 45 °C. Überträgt man das beobachtete temperaturabhängige Aktivitätsprofil von BlaA auf die *Y. enterocolitica* Infektion von Tieren, so könnte man auf eine spezifische Wirtsadaption der BlaA Aktivität unter β -Laktam-Antibiotika-Behandlung schließen. Nichtsdestotrotz gibt es keine Hinweise darauf, dass *Y. enterocolitica* das *blaA* Gen innerhalb der letzten 80 Jahre, als die Behandlung von Infektionen mit β -Laktam-Antibiotika eingeführt wurde, erworben hat. Außerdem findet man das *blaA* Gen hochkonserviert im Genom verschiedener *Yersinia* Arten, bei denen es sich eher um freilebende Umweltkeime als um Pathogene handelt (z.B. *Y. intermedia*, *Y. frederikensii*, *Y. rhodei*). Da die Struktur der β -Laktamasen signifikante Ähnlichkeiten zu Penicillin-Bindeproteinen/Transpeptidasen aufweisen, könnte BlaA von *Y. enterocolitica* auch zusätzliche Funktionen im normalen Wachstumsprozess der Zelle haben (z.B. Umlagerung von Peptidoglykan). Die Rolle der β -Laktamasen von *Y. enterocolitica* bei der β -Laktam-Antibiotika behandelten Infektion oder beim Überleben in der Umwelt bleibt bisher ungeklärt und bedarf weiterer Evaluierung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde geprüft, ob die charakterisierten *Yersinia* β -Laktamasen als Reporterkonstrukte zur Untersuchung des Typ III Sekretionssystems (T3SS) geeignet

ZUSAMMENFASSUNG

sind. *Y. enterocolitica* besitzt ein pYV Virulenzplasmid, auf dem der vollständige Satz der Gene für das Ysc-T3SS und die Effektor-Yops (*Yersinia outer protein*) lokalisiert sind. Injektion der Yops in eukaryotische Zielzellen ermöglicht das extrazelluläre Überleben der Yersinien im Wirtsorganismus. Bei YopE handelt es sich um ein gut charakterisiertes Effektor-Yop, dessen N-Terminus fusioniert an den reifen Teil der β -Laktamase TEM-1 bereits vielfach als Reporterkonstrukt eingesetzt wurde. Unter Verwendung des fluoreszierenden β -Laktamase-Substrats CCF4-AM kann die Translokation von YopE_i-TEM-1 in Zielzellen in Zellkultur-Experimenten und im Mausinfektionsmodell visualisiert werden. In dieser Arbeit sollte deshalb die T3SS-Sekretionsfähigkeit von YopE- β -Laktamase-Fusionsproteinen in Abhängigkeit von der „Schmelztemperatur“ (temperaturabhängige Stabilität, T_M) untersucht werden. Yop-Substrate werden im ungefalteten Zustand (YscN wirkt dabei vermutlich als ATP-abhängige „Unfoldase“) über das Ysc-„Injektisom“ transloziert. YopE_i-TEM-1 wird effizient sekretiert und transloziert (T_M (TEM-1) = 50,8 °C). YopE-Fusionsproteine mit thermostabilen TEM-1 Varianten, YopE_i-RLT bzw. YopE_i-MEGA (T_M (RLT) = 60,4 °C; T_M (MEGA) = 69,2 °C) werden hingegen nur schwach bzw. nicht sekretiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Sec-abhängige β -Laktamase AmpC als YopE-Fusionsprotein (YopE_i-AmpC) effizient T3SS-abhängig sekretiert und transloziert werden kann; das native Tat-Substrat BlaA (YopE_i-BlaA) kann jedoch weder sekretiert noch transloziert werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die ATPase YscN nicht in der Lage ist, BlaA und die thermostabilen TEM-1-Varianten zu entfalten und über das T3SS zu sekretieren und zu translozieren. RLT und MEGA können hingegen mithilfe ihrer nativen Signalsequenz über das Sec-System (und somit im ungefalteten Zustand) transloziert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass im Cytosol stabil gefaltete Tat-abhängige β -Laktamasen oder Sec-Substrate mit erhöhter Thermostabilität wahrscheinlich nicht mit der Sekretion über das T3SS kompatibel sind. In dieser Arbeit wurde ein Reportersystem etabliert, das Hinweise auf die Transportfähigkeit von unterschiedlich thermostabilen β -Laktamasen gibt.

ABSTRACT

Abstract

In 1975, Cornelis & Abraham described two chromosomally encoded β -lactamases in clinical isolates of *Y. enterocolitica*. BlaA has been designated as a class A constitutive penicillinase and BlaB (alternatively termed AmpC) as an inducible class C cephalosporinase. However, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis*, which belong with *Y. enterocolitica* to the three human pathogenic *Yersinia* species, do not possess genes for β -lactamases. Production of one or two β -lactamases has also been described in “environmental” *Yersinia* like *Y. intermedia*, *Y. frederikensii* and *Y. bercovieri*. Probably all *Y. enterocolitica* strains possess genes for both β -lactamases but differences in sensitivities to β -lactams are due to different expression and regulation of β -lactamase genes in strains belonging to diverse biovar/serovar combinations. Strikingly, although all *Y. enterocolitica* strains as well as *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* are weakly sensitive to treatment with common penicillins and 1st generation cephalosporins in a murine infection model (*in vivo*), treatment with e.g. tetracyclines and aminoglycosides efficiently limits bacterial growth *in vivo*.

In this work, two aspects concerning the *Yersinia* β -lactamases have been processed: **(1)** Characterization of the β -lactamases in regard of β -lactam antibiotic resistance, secretion and thermostability. **(2)** Analysis of the secretability of different thermostable β -lactamases via the *Yersinia* T3SS.

In the first part of this work we described the β -lactam sensitivity pattern of the highly mouse pathogenic *Y. enterocolitica* strain WA-314 by creating a set of β -lactamase deletion mutants and their subsequent characterization *in vitro*. In accordance to previous studies on biovar 1B, serovar O:8 strains, WA-314 produces both enzymes BlaA and AmpC (BlaB) and latter one is inducible using subinhibitory concentrations of imipenem. BlaA is dominant in providing *in vitro*-resistance towards extended-spectrum β -lactams (e.g. ampicillin) and 1st generation cephalosporins (e.g. cefazolin). None of the β -lactamases is able to mediate *in vitro*-resistance towards carbapenems and monobactams. The construction of β -lactamase deletion mutants and their *in vitro*-characterization is the basis for their subsequent analysis within a murine infection model.

Furthermore, we investigated the export mechanism of both β -lactamases. In Gram-negative bacteria β -lactamases are localized in the periplasmic space to be able to cleave the amide bond of the β -lactam ring resulting in inactivation of the antibiotic. Proteins are translocated

ABSTRACT

across the inner membrane either via the general secretory pathway (Sec system) or via the twin arginine pathway (Tat system). To date, only three β -lactamases have been described as Tat-dependently translocated namely BlaC from *Mycobacterium tuberculosis*, BlaS from *M. smegmatis* and L2 from the plant pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *In silico* studies and experimental approaches lead to the assumption that the majority of β -lactamases is translocated in a Sec-dependent manner. Analysis of β -lactamase signal sequence-GFP fusion proteins revealed that *Yersinia* AmpC is a Sec-substrate whereas *Yersinia* BlaA is a Tat-substrate. Thus, BlaA of *Y. enterocolitica* is the first reported β -lactamase within the family of Enterobacteriaceae which is secreted by the Tat system. Interestingly, closely related *blaA* genes are widely distributed within all *Y. enterocolitica* biovars and several environmental *Yersinia* species.

It is generally accepted that Tat-dependent substrates rapidly fold in the cytoplasm. To compare the BlaA protein stability with that of the Sec-dependent β -lactamases of the TEM-1 family we determined thermal unfolding transitions and temperature dependent enzymatic activities. In contrast to TEM-1 β -lactamase, BlaA shows an entire different activity profile with steep increase of activity in the temperature range of 30 °C to 45 °C and steep decrease between 50 °C to 60 °C. By translating this temperature-dependent activity profile to *Y. enterocolitica* infection of warm-blooded animals, we may suggest a specific host-adaptation of the BlaA activity under β -lactam antibiotic treatment conditions. However, there is no indication that *Y. enterocolitica* has acquired *blaA* gene within the past 80 years when β -lactam antibiotic treatment was introduced. It is conceivable that *Y. enterocolitica* is encountered with fungi producing β -lactam agents in the environment (e.g. carcass of the killed host) and the production of a β -lactamase with a high temperature stability (to resist climate fluctuation) could then be of great advantage.

By considering that β -lactamase class A amino acid sequence and crystal structures show significant similarity to penicillin binding proteins/transpeptidases it is also conceivable that *Y. enterocolitica* BlaA may be involved in peptidoglycan remodeling or inhibition in bacterial biofilm formation as has been reported recently for *Escherichia coli* TEM-1 and PBPs. The role of *Yersinia* β -lactamases in β -lactam antibiotic treated infections or in survival in the environment needs to be elucidated.

In the second part, the *Yersinia* β -lactamases AmpC and BlaA characterized in this work were tested for suitability as reporter constructs for analyzing the Ysc-T3SS. *Y. enterocolitica* harbors a pYV virulence plasmid which encodes genes for components of the Ysc-T3SS secretion machinery and the effector Yops (*Yersinia* outer protein). Injection of

ABSTRACT

Yops into the eukaryotic host cell enables the extracellular survival of *Yersinia* within the host organism. YopE is a well described effector Yop and YopE- β -lactamase (TEM-1) fusion proteins have been successfully applied to analyze translocation of YopE in cell culture experiments and in the murine mouse infection model by using the fluorescent β -lactamase substrate CCF4-AM. In this work, we aimed to analyze the T3SS-dependent secretability of YopE- β -lactamase fusion proteins in dependency on the melting temperature (temperature dependent stability, T_M). It has been described that Yop substrates are translocated in an unfolded conformation via the Ysc-“injectisom” (YscN has been discussed as an ATP-dependent unfoldase). YopE_i-TEM-1 is efficiently secreted and translocated (T_M (TEM-1) = 50.8 °C). However, YopE fusion proteins with heat stable TEM-1 variants, YopE_i-RLT and YopE_i-MEGA (T_M (RLT) = 60.4 °C; T_M (MEGA) = 69.2 °C), were weakly secreted or secretion is completely abolished, respectively. Furthermore we could show that a YopE fusion protein with the Sec-dependent β -lactamase AmpC (YopE_i-AmpC) is efficiently secreted and translocated via the T3SS. In contrast, the Tat-dependent β -lactamase BlaA (YopE_i-BlaA) can neither be secreted nor translocated T3SS-dependently. A putative explanation for that observation would be that the ATPase YscN is unable to unfold BlaA and the heat stable TEM-1 variants and therefore secretion and translocation is prevented. Interestingly, native RLT and MEGA β -lactamases can be translocated in an unfolded conformation via the Sec system.

These results indicate that stably folded Tat-dependent β -lactamases or thermally stable Sec-substrates are most likely incompatible with the T3SS. In this work, we established a reporter system which allows analysis of the secretability of different thermally stable β -lactamases.

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Dem Schweizer Arzt und Bakteriologen, Alexandre Yersin, gelang es, während der Hongkong-Pest (1894) den Erreger der Pest zu identifizieren. Ursprünglich wurde der Pesterreger als *Pasteurella pestis* bezeichnet, später jedoch durch VanLoghem (1944) zu Ehren Yersins zu *Yersinia pestis* umbenannt und somit wurde auch die Gattung *Yersinia* begründet. Die Gattung *Yersinia* umfasst derzeit 17 Arten, von denen nur drei humanpathogen sind: der bereits erwähnte Pesterreger *Yersinia pestis* sowie die enteropathogenen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*.

Yersinien, die phylogenetisch zur Familie der Enterobacteriaceae gehören (Frederiksen, 1964), sind Gram-negative, stäbchenförmige Bakterien, deren Wachstumsoptimum bei 27 °C liegt. Allerdings können sie auch bei Temperaturen zwischen 0-4 °C noch replizieren (Psychotrophie). Im Gegensatz zu *Y. pestis* sind *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* durch peritriche Begeißelung bei 27 °C beweglich, wobei diese bei 37 °C verloren geht (Sedgwick & Tilton, 1971, Straley & Perry, 1995).

1.1.1 *Yersinia enterocolitica*

Y. enterocolitica ist ein relativ häufiger Krankheitserreger, der sowohl beim Menschen als auch bei einer Reihe von Tieren eine Yersiniose verursacht. Die Symptome einer Yersiniose sind vielfältig und reichen von leichter Diarrhö bis zur Sepsis. Besonders häufig sind jedoch die Symptome einer akuten Enteritis (Bauchkrämpfe, Fieber, Durchfall, Erbrechen); in Deutschland ist nach *Salmonella enterica* und *Campylobacter jejuni* *Y. enterocolitica* der dritthäufigst gemeldete bakterielle Enteritiserreger (Robert Koch-Institut 2010). Im Gegensatz zum *Y. pestis*-Erreger, der direkt über den Flohbiss ins Blut oder durch Aerosole in die Lunge gelangt, erfolgt die Infektion mit *Y. enterocolitica* meist oral über kontaminierte Lebensmittel. Hauptreservoir für humanpathogene *Y. enterocolitica* Stämme ist das Schwein und somit ist die wichtigste Infektionsquelle kontaminiertes, nicht ausreichend erhitztes Schweinefleisch (Wauters, 1979, Bottone, 1997).

Aufgrund von biochemischen Eigenschaften werden *Y. enterocolitica* Stämme in sechs Biotypen unterteilt: 1A, 1B, 2, 3, 4 und 5 (Wauters, *et al.*, 1987). Biotyp 1A umfasst zum

EINLEITUNG

größten Teil apathogene Stämme, wohingegen Biotyp 1B (vorherrschend in Amerika) und Biotypen 2-5 (vorherrschend in Europa, Asien, Australien) hochpathogene bis mäßig-pathogene Stämme umfassen (Wauters, *et al.*, 1987). Die hier beschriebene pathogene Wirkung der *Yersinia* Stämme bezieht sich auf Infektionsversuche im Mausmodell. Die Biotypen können wiederum mittels Antiseren gegen Oberflächenantigene in verschiedene Serotypen unterteilt werden. Die O-Serotypisierung erfolgt dabei aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Lipopolysaccharide (O-Antigen) (Neubauer, *et al.*, 2001). In Europa sind v.a. die Biotypen 2 und 4 mit den Serotypen O:3, O:5, 27 und O:9, in den USA dagegen Biotyp 1B mit den Serotypen O:4,32, O:8, O:13, O:20 und O:21 von klinischer Bedeutung (Bottone, 1977). In Deutschland ist der vorherrschende *Y. enterocolitica* Serotyp mit 90 % Serotyp O:3.

1.1.2 Pathogenese und Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica*

Nach Aufnahme der Yersinien durch kontaminierte Lebensmittel gelangen die Erreger nach der Magenpassage in den Dünndarm. Die Bakterien überwinden die intestinale Barriere des Darmepithels über die M-Zellen der Peyer-Plaques und replizieren extrazellulär (Cornelis, 1998). Von dort aus gelangen die Yersinien in die mesenterialen Lymphknoten und wahrscheinlich über den Blutkreislauf in Leber und Milz. (Bottone, 1997, Fredriksson-Ahomaa, *et al.*, 2006).

Die Pathogenität von humanpathogenen Yersinien hängt von einer Vielzahl von chromosomal- und plasmidkodierten Virulenzfaktoren ab, in erster Linie jedoch vom Vorhandensein eines etwa 70 kb großen Virulenzplasmids (pYV) (Portnoy & Martinez, 1985). Auf diesem Plasmid liegen Gene, die für die Komponenten eines Typ III Sekretionssystems (T3SS) und den Substraten (Yops für *Yersinia* outer proteins) kodieren (Cornelis, *et al.*, 1989) (siehe Kapitel 1.1.2.1). Außerdem auf dem pYV Plasmid kodiert ist das Adhäsins **YadA** (Bolin, *et al.*, 1982, Bolin & Wolf-Watz, 1984): Die Expression von *yadA* erfolgt bei 37 °C in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors VirF, aber im Gegensatz zur Expression der Yops, unabhängig von der Ca²⁺-Konzentration (Bolin, *et al.*, 1982, Skurnik, *et al.*, 1984). Das YadA Protein ist in der äußeren Membran verankert und bildet trimere „Lollipop“-ähnliche Strukturen auf der bakteriellen Zelloberfläche aus (Hoiczky, *et al.*, 2000). YadA vermittelt nach Invasion der Peyer-Plaques die Adhäsion an Epithelzellen und extrazelluläre Matrixproteine und verleiht zusätzlich Resistenz gegen Komplementlyse (Heesemann &

EINLEITUNG

Gaede, 1989, Bukholm, *et al.*, 1990, Roggenkamp, *et al.*, 1995, Roggenkamp, *et al.*, 1996, Ackermann, *et al.*, 2008).

Chromosomale Virulenzfaktoren, die für die Enteropathogenität von *Y. enterocolitica* entscheidend sind, sind das Invasin *Inv*, das Enterotoxin *Yst*, das Myf-Antigen und das Membranprotein *Ail*. Das Außenmembranprotein *Inv* ist essentiell für die Invasion der M-Zellen der Peyer-Plaques, da es an β 1-Integrine auf den M-Zellen bindet und die nachfolgende Interaktion die Internalisierung der Yersinie ermöglicht (Isberg, 1990, Pepe & Miller, 1993). Das hitzestabile Enterotoxin *Yst* wird im Darm sezerniert (Takao, *et al.*, 1984), aktiviert dort die Guanylatcyclase und verursacht den bei einer akuten Yersiniose typischen wässrigen Durchfall (Delor & Cornelis, 1992). Die genaue Bedeutung der **Myf**-Fibrillen auf der Zelloberfläche und des Außenmembranproteins **Ail** („attachment and invasion locus“) für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* konnte bisher nicht geklärt werden. *Ail* vermittelt lediglich neben *YadA* Serumresistenz (Bliska & Falkow, 1992).

In Maus-virulenten Biotyp 1B Stämmen findet sich zusätzlich zu den genannten Virulenzfaktoren eine HPI („high pathogenicity island“) (Carniel, *et al.*, 1996, Schubert, *et al.*, 1998, Perry, *et al.*, 1999). Auf diesem chromosomalen Fragment liegen mehrere Gene als größere Operons vor, die entscheidend für den maus-virulenten Phänotyp dieser *Y. enterocolitica* Stämme sind. Diese Gene kodieren für die Biosynthese, den Transport und die Regulation des Siderophors Yersiniabaktin. Effektive Eisenaufnahmesysteme stellen einen wichtigen Virulenzfaktor während der Invasion durch Yersinien dar, da im Wirt die Konzentration an freiem Eisen äußerst gering ist. Yersiniabaktin bindet Eisen sehr stark (Assoziationskonstante $\sim 4 \times 10^{36}$) und ist somit in der Lage, Eisen von den meisten Eisenbindeproteinen des Wirts abzuziehen (Perry, *et al.*, 1999).

1.1.2.1 Das Typ III-Sekretionssystem

Das Typ III-Sekretionssystem (T3SS) wird von vielen Gram-negativen Erregern verwendet, um Effektorproteine über zelluläre Membranen hinweg in das Cytosol der eukaryotischen Wirtszelle zu „injizieren“ (Cornelis, 1997; Galan, 1999). Diese Effektorproteine greifen in zelluläre Signalkaskaden der Wirtszellen ein und manipulieren somit die Zelle (Eine Übersicht der Effektorproteine verschiedener Erreger und deren Funktion findet sich in Mota, *et al.*, 2005). Alle drei humanpathogenen *Yersinia*-Spezies besitzen ein solches T3SS (Iriarte & Cornelis, 1996); ebenso wie enterohämorrhagische *Escherichia coli*, *Shigella* oder *Salmonella enterica*. (Sansonetti, *et al.*, 1982, Jarvis, *et al.*, 1995, Kaniga, *et al.*, 1995) sowie

EINLEITUNG

einige Pflanzenpathogene wie *Xanthomonas* und *Erwinia* (Fenselau & Bonas, 1995, Kim, *et al.*, 1997). Das T3SS ist ein komplexer Proteinapparat, der die innere und äußere Bakterienmembran (Kubori, *et al.*, 1998) sowie die Cytoplasmamembran der Wirtszelle durchspannt (Hoiczky & Blobel, 2001). Es kann quasi als „molekulare Spritze“ angesehen werden, über die die Effektorproteine in die Wirtszelle „injiziert“ werden. Die Komponenten des T3SS sind unter den Gram-negativen Bakterien stark konserviert, die Effektorproteine und deren Wirkung jedoch Spezies-abhängig (Hueck, 1998, Tampakaki, *et al.*, 2004). Strukturell und funktionell ähnelt das T3SS dem Flagellenapparat: phylogenetische Studien zeigen, dass beide Systeme evolutionär verwandt sind und sich vermutlich aus gemeinsamen Vorläuferproteinen entwickelt haben (Gophna, *et al.*, 2003).

Das Ysc-Yop T3SS von Yersinien ist, wie bereits oben erwähnt, auf dem pYV Virulenzplasmid kodiert und besteht aus Komponenten, die den Exportapparat aufbauen bzw. regulieren, sowie den verschiedenen Effektorproteinen (Cornelis, 2002). Die Expression der Gene, die das T3SS bilden, erfolgt noch vor Kontakt mit der eukaryotischen Wirtszelle, wenn die Yersinien einen Temperaturanstieg auf 37 °C (Körpertemperatur) erfahren. Daraufhin wird der Sekretionsapparat, der aus einem Basalkörper, der die Cytoplasmamembran, das Peptidoglykan und die äußere Membran durchspannt, sowie einer nadelähnlichen Struktur besteht, an der Oberfläche des Bakteriums aufgebaut (Kubori, *et al.*, 1998, Hoiczky & Blobel, 2001). Eine schematische Darstellung des Ysc-T3SS ist in Abb. 1 gezeigt. In der inneren Membran bilden die Proteine YscD, I, J, R, S, T, U, V (YscV \triangleq LcrD) den unteren Teil des Basalkörpers (Plano & Straley, 1993, Allaoui, *et al.*, 1994, Fields, *et al.*, 1994, Plano & Straley, 1995, Crepin, *et al.*, 2005, Yip, *et al.*, 2005). Daran assoziiert ist YscQ, das vermutlich einen multimeren Ring am unteren Teil des Basalkörpers bildet (Morita-Ishihara, *et al.*, 2006) und mit der ATPase YscN und deren Regulator YscL interagiert (Jackson & Plano, 2000, Blaylock, *et al.*, 2006). YscN fungiert vermutlich als Entfaltungsmaschine, die unter ATP-Hydrolyse (Woestyn, *et al.*, 1994) die Substrate entfaltet und somit kompatibel für die T3SS-abhängige Sekretion macht (Wilharm, *et al.*, 2004). Der obere Teil des Basalkörpers bildet das Sekretin YscC, das einen Doppelring aus 12-14 YscC Monomeren formiert und die äußere Membran und das Peptidoglykan durchspannt (Plano & Straley, 1995, Koster, *et al.*, 1997, Burghout, *et al.*, 2004). Als „Pilotprotein“ dient YscW, das die Oligomerisierung und Einlagerung von YscC unterstützt und ebenfalls in der äußeren Membran verankert ist (Burghout, *et al.*, 2004). Die Nadel wird aus YscF-Untereinheiten gebildet, die helikal polymerisieren, und ist in etwa 60-80 nm lang (Hoiczky & Blobel, 2001). Den Abschluss der Nadel bildet das Protein LcrV, das vermutlich eine Basis für YopB und

EINLEITUNG

YopD bildet (Mueller, *et al.*, 2005). YopB und YopD formieren vermutlich eine Translokationspore in der Cytoplasmamembran der Wirtszelle (Cornelis & Wolf-Watz, 1997, Goure, *et al.*, 2005).

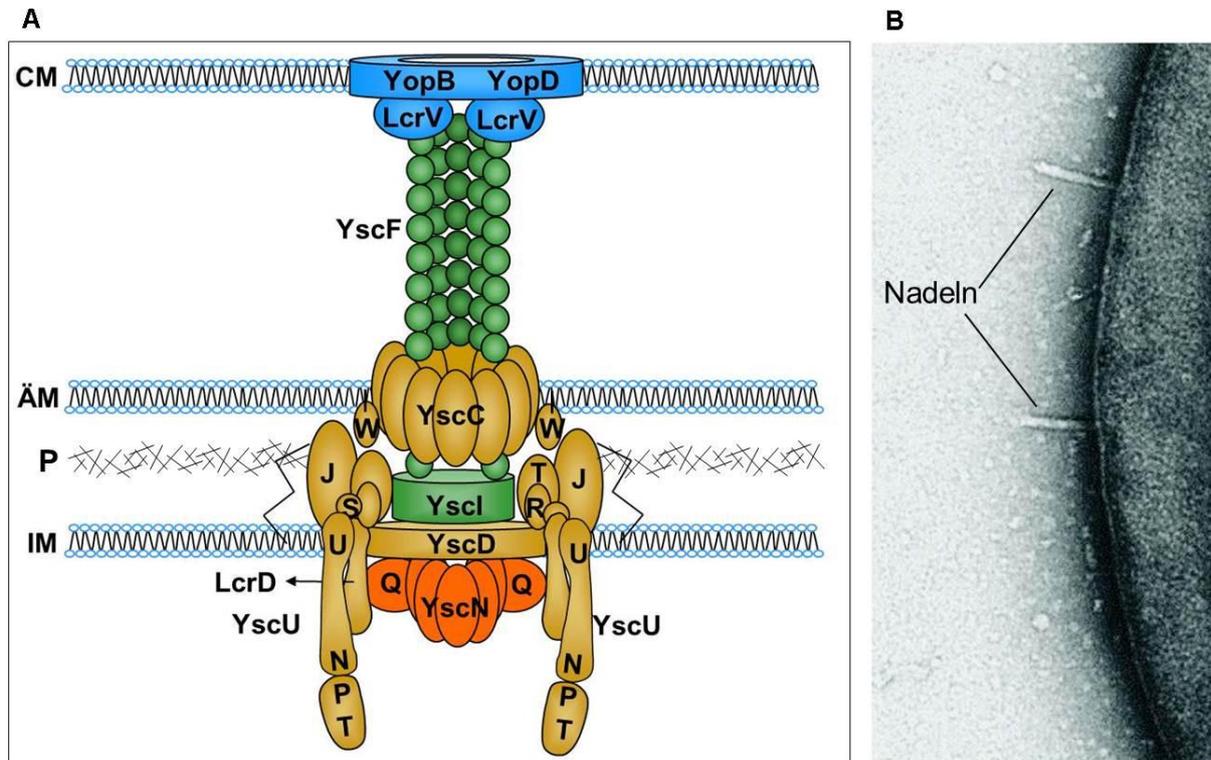


Abb. 1: Darstellung des T3SS

A: Schematische Darstellung des Ysc-Sekretionsapparats von Yersinien, der die innere und äußere Bakterienmembran sowie das dazwischenliegende Peptidoglykan durchspannt, und die Nadel auf der Oberfläche. Durch die Nadel werden die Effektorproteine in die eukaryotische Wirtszelle transloziert. YopB und YopD bilden dabei eine Translokationspore in der Cytoplasmamembran der Wirtszelle. IM=Innere Membran; ÄM=Äußere Membran; P=Peptidoglykan; CM=Cytoplasmamembran der Wirtszelle. **B:** Elektronenmikroskopische Aufnahme (Troisfontaines & Cornelis, 2005) der Zelloberfläche von *Y. enterocolitica* mit hervorstehenden Nadeln. Bei Induktion der T3SS-Gene werden ca. 50-100 Nadeln auf der Bakterienoberfläche gebildet.

1.1.2.2 Die Yop-Effektoren

Auf dem pYV Plasmid liegen 15 Gene, die für Proteine kodieren, die über das T3SS transportiert werden. Dabei unterscheidet man zwei Klassen von sekretierten Proteinen: Die Effektorproteine, die im Wesentlichen die zelluläre Wirtsabwehr schwächen und Proteine, die für die Regulation und den korrekten Ablauf des Translokationsprozesses zuständig sind. Sechs dieser translozierten Proteine wurden als Effektorproteine identifiziert, die im Cytosol

EINLEITUNG

der Wirtszelle eine Vielzahl zellulärer Prozesse beeinflussen (Cornelis, 2002, Aepfelbacher, *et al.*, 2007, Trosky, *et al.*, 2008). Die Funktion der meisten Effektoren besteht in der Unterdrückung der Phagozytose durch professionelle Phagozyten, um die angeborene Immunantwort des Wirts zu unterdrücken und das extrazelluläre Überleben und Replizieren der Yersinien zu ermöglichen. Die Effektorproteine YopE, YopT und YopO interagieren und inhibieren GTPasen der Rho-Familie, welche Signaltransduktionswege und Cytoskelettlagerung kontrollieren. Über diesen Weg verhindern sie die Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen. YopH wirkt ebenfalls antiphagozytotisch. YopP und YopM haben keinen Einfluss auf die Phagozytose, sondern wirken immunmodulatorisch.

Bei **YopH** handelt es sich um eine Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTPase) (Zhang, *et al.*, 1992), die Proteine des fokalen Adhäsionskomplexes in Neutrophilen und Makrophagen dephosphoryliert (Hamid, *et al.*, 1999). Dies führt letztendlich zur Zerstörung der Aktinstrukturen der Zellen und somit zur Unterdrückung der Phagozytose (Andersson, *et al.*, 1996, Persson, *et al.*, 1997). Außerdem verhindert YopH den „oxidativen Burst“ (Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, ROS) von Phagozyten (Ruckdeschel, *et al.*, 1996). **YopE** bindet an GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac, Cdc42) und wirkt als GTPase aktivierendes Protein (GAP), indem es diese durch Hydrolyse von GTP in die inaktive GDP-gebundene Form überführt (Black & Bliska, 2000, Wolf-Watz, *et al.*, 2000, Andor, *et al.*, 2001, Aili, *et al.*, 2006). Diese Inaktivierung der Rho-GTPasen führt zur Depolymerisierung der Aktinfilamente und somit zur Zerstörung des Cytoskeletts (Viboud, *et al.*, 2006). Das Effektorprotein **YopT** ist eine Cysteinprotease, die von den GTPasen Rho, Rac und Cdc42 den C-terminalen Prenyl-Rest abspaltet (Shao, *et al.*, 2002, Shao, *et al.*, 2003). GTPasen der Rho-Familie sind mit diesem C-terminalen Prenyl-Rest an der Plasmamembran der Zelle verankert; YopT führt also zur Freisetzung der GTPasen und somit zum Verlust ihrer Funktion und, ebenso wie YopE, zur Zerstörung des Cytoskeletts (Zumbihl, *et al.*, 1999, Sorg, *et al.*, 2001, Grosdent, *et al.*, 2002). **YopO** von *Y. enterocolitica* (YpkA in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) ist eine autophosphorylierende Serin-Threonin-Kinase (Galyov, *et al.*, 1993), die durch Aktin aktiviert wird (Juris, *et al.*, 2000, Trasak, *et al.*, 2007) und ebenfalls die Dynamik des Aktincytoskeletts moduliert. Die C-terminale Region von YopO beinhaltet eine Rac1-Bindedomäne, die strukturell den GDIs (Guanidine nucleotide dissociation inhibitors) der Rho-GTPasen ähnelt (Dukuzumuremyi, *et al.*, 2000, Juris, *et al.*, 2000, Prehna, *et al.*, 2006). YopO blockiert die Phagozytose durch Makrophagen, indem es Gαq, einen wichtigen Faktor in der für die Phagozytose notwendigen Signaltransduktionskaskade, phosphoryliert. Somit kann Gαq nicht mehr GTP binden und wird inaktiviert (Grosdent, *et al.*, 2002, Navarro, *et al.*, 2007). **YopP** (YopJ in *Y. pestis* und *Y. enterocolitica*) inhibiert die MAPK- und NF-κB-abhängigen

EINLEITUNG

Signalwege, um der proinflammatorischen Reaktion des Wirts zu entgehen (Ruckdeschel, *et al.*, 1997, Boland & Cornelis, 1998, Palmer, *et al.*, 1998, Mittal, *et al.*, 2006). YopP fungiert dabei als Acetyltransferase (Mukherjee, *et al.*, 2006), die Threonin- und Serin-Reste acetyliert und damit deren Phosphorylierung blockiert. Die Aktivierung der MAP-Kinasen wird somit inhibiert (Boland & Cornelis, 1998, Mukherjee, *et al.*, 2006). Außerdem hemmt YopP die Kinase IKK β , die den NF- κ B-Inhibitor I κ B phosphoryliert (Boland & Cornelis, 1998, Ruckdeschel, *et al.*, 1998, Schesser, *et al.*, 1998). Dadurch wird verhindert, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Nukleus transloziert und die Transkription der Gene für proinflammatorische Zytokine aktiviert wird (IL-8 durch Epithelzellen und TNF α durch Makrophagen) (Boland & Cornelis, 1998, Schesser, *et al.*, 1998, Orth, *et al.*, 1999). Durch Verlust der NF- κ B und der MAP-Kinase Aktivität wird auch die antiapoptotische Antwort unterdrückt und die Apoptose in Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) gefördert (Erfurth, *et al.*, 2004, Viboud & Bliska, 2005). Für das Effektorprotein **YopM** wurde gezeigt, dass es in den Nukleus transportiert wird (Skrzypek, *et al.*, 1998, Benabdillah, *et al.*, 2004) und dass es außerdem mit ribosomalen Proteinkinasen interagiert und diese aktiviert (McDonald, *et al.*, 2003). Eine *yopM*-Deletionsmutante ist im Mausmodell stark Virulenz-attenuiert (Leung, *et al.*, 1990). Der genaue Funktionsmechanismus von YopM und die Wirkung auf die angeborene Immunantwort sind noch nicht vollständig geklärt.

1.1.2.3 Sekretion und Translokation der Yops

Bei 37 °C erfolgt der Aufbau des Sekretionsapparates und die intrazelluläre Yop-Synthese beginnt (Cornelis, *et al.*, 1986, Michiels, *et al.*, 1991). Jedoch bleibt der Sekretionskanal in Abwesenheit von eukaryotischen Zielzellen geschlossen; es erfolgt keine Sekretion oder Translokation (Rosqvist, *et al.*, 1994). Um eine Akkumulation der Yops im Cytoplasma zu vermeiden, tritt eine „Feedback-Kontrolle“ in Kraft (Cornelis, *et al.*, 1987). An diesem negativen Rückkopplungsmechanismus sind sowohl die Regulatoren YscM1 und YscM2, die die Transkription der *yop*-Gene reprimieren (Stainier, *et al.*, 1997) als auch YopD und sein Chaperon SycD (Rimpilainen, *et al.*, 1992, Williams & Straley, 1998) sowie die Proteine YscX und YscY (Iriarte & Cornelis, 1999) beteiligt. Der genaue Regulationsmechanismus bleibt bisher aber unklar. Erst bei Zellkontakt mit der Wirtszelle, der nicht durch den Nadelapparat sondern durch Interaktion bakterieller Adhäsine mit Oberflächenstrukturen der Wirtszelle erfolgt, wird der Sekretionskanal wahrscheinlich „geöffnet“ und die Sekretion bzw. Translokation der Yops beginnt (Boyd, *et al.*, 2000). Im Cytosol der eukaryotischen Wirtszellen ist die Konzentration an Ca²⁺-Ionen sehr niedrig; daher wird angenommen, dass

EINLEITUNG

nach Zellkontakt eine niedrige Ca^{2+} -Konzentration an der Grenzfläche der Bakterienoberfläche und der Wirtszellmembran entsteht, welches die Typ III-Sekretion induziert (Lee, *et al.*, 2001). Unter *in vitro* Bedingungen kann die Sekretion von Yops in den Kulturüberstand durch Depletion der Ca^{2+} -Ionen im Medium erreicht werden (Kupferberg & Higuchi, 1958, Higuchi, *et al.*, 1959). Es konnte gezeigt werden, dass der Sekretionsapparat in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen durch die Proteine YopN, LcrG und TyeA blockiert wird; sie bilden quasi einen „Stopfen“ am unteren Teil des Basalkörpers des Sekretionsapparats und verhindern somit die Yop-Sekretion. Durch das niedrige Ca^{2+} -Signal wird YopN freigesetzt und in die Wirtszelle transloziert und der Sekretionskanal wird frei (Forsberg, *et al.*, 1991, Skrzypek & Straley, 1993, Iriarte, *et al.*, 1998).

YopB und YopD, die jeweils hydrophobe Domänen besitzen, und das hydrophile Protein LcrV sind für die Translokation der Yop-Effektoren in die Wirtszelle essentiell (Rosqvist, *et al.*, 1994, Sory & Cornelis, 1994, Persson, *et al.*, 1995, Holmstrom, *et al.*, 2001). YopB und YopD besitzen die Fähigkeit, Poren in Zellmembranen zu bilden (Hakansson, *et al.*, 1993); daher wird angenommen, dass diese beiden Proteine nach Zellkontakt mit der eukaryotischen Zielzelle in die Zellmembran inserieren und eine Pore bilden und somit die Translokation der Yops ermöglichen (Neyt & Cornelis, 1999, Montagner, *et al.*, 2011). LcrV ist vermutlich für die korrekte Einlagerung von YopB und YopD nötig (Cornelis & Wolf-Watz, 1997, Goure, *et al.*, 2005).

Für den Transport durch den Sekretionskanal benötigen die meisten Effektor-Yops und andere sekretierte Komponenten des T3SS Chaperone (Wattiau, *et al.*, 1994). Diese Chaperone binden als Dimere im Cytosol an die sogenannte Chaperon-Bindestelle (Cb) ihrer Substrate (Ghosh, 2004). Für die Effektorproteine YopE, YopH, YopO und YopT wurden die Chaperone SycE, SycH, SycO und SycT identifiziert (Wattiau & Cornelis, 1993, Woestyn, *et al.*, 1996, Iriarte & Cornelis, 1998, Letzelter, *et al.*, 2006) für YopM und YopP konnten bisher keine Chaperone gefunden werden. Weiterhin wurden die Chaperone SycD für YopB/YopD (Neyt & Cornelis, 1999), YscE/YscG für YscF (Day, *et al.*, 2000) und SycN/YscB für YopN (Day & Plano, 1998, Jackson, *et al.*, 1998) beschrieben (Syc für specific yop chaperone).

Chaperone der T3SS verschiedener Organismen besitzen keine oder nur geringe Homologien auf Aminosäuresequenzebene, weisen jedoch andere gemeinsame Merkmale wie beispielsweise ihre geringe molekulare Masse, einen sauren isoelektrischen Punkt und amphiphile α -Helices im C-terminalen Bereich auf. Man unterscheidet verschiedene Klassen von T3SS-Chaperonen: Klasse I-Chaperone binden einen (Klasse IA, z.B. SycH aus *Yersinia* oder SicP aus *Salmonella*) oder mehrere (Klasse IB, z.B. InvB aus *Salmonella*) Effektoren.

EINLEITUNG

Klasse II Chaperone assoziieren mit den Translokatoren (z.B. SycD aus *Yersinia* oder SicA aus *Salmonella*) (Parsot, *et al.*, 2003).

Die Aufgaben der T3SS-Chaperone sind vielfältig: beispielsweise verhindern die Chaperone YscG und YscE die vorzeitige Polymerisation des Nadelproteins YscF im Cytoplasma (Sun, *et al.*, 2008). Eine andere Aufgabe erfüllt das Chaperon der Translokatoren YopB und YopD, SycD, das eine vorzeitige Anlagerung von LcrV an den YopB/YopD-Komplex verhindert (Neyt & Cornelis, 1999). Weiterhin sinkt die Sekretionseffizienz der Yops stark ab, wenn ihr jeweiliges Chaperon nicht vorhanden ist (Wattiau, *et al.*, 1994).

Arbeiten an der T3SS-ATPase InvC in *Salmonella* deuten darauf hin, dass bei der Translokation die ATPase mit Chaperon-gebundenen Substraten interagiert und vermutlich das Chaperon vom Substrat ablöst (Akedo & Galan, 2005). Bislang konnte dies allerdings nicht für die *Yersinia* ATPase YscN gezeigt werden (Blaylock, *et al.*, 2006, Sorg, *et al.*, 2006). Die Chaperone werden im Cytoplasma im Yop-Translokationsprozess vermutlich wiederverwendet; nur die Substrate werden durch den Sekretionskanal transportiert (Akedo & Galan, 2005, Wilharm, *et al.*, 2007).

Proteine, die über ein Sekretionssystem transportiert werden, benötigen in der Regel ein Sekretionssignal (siehe auch Kapitel 1.2). Substrate des T3SS sind in ihrer Aminosäuresequenz sehr variabel, und es konnte bisher kein klares gemeinsames Erkennungsmotiv festgestellt werden. Gezeigt werden konnte jedoch, dass in der N-terminalen Region des Effektorproteins YopE zwei Domänen vorhanden sind, die für einen effizienten Transport wichtig sind: Das **erste Signal** befindet sich entweder im 5'-Ende der *yopE* mRNA (Ramamurthi & Schneewind, 2003) oder im N-Terminus von YopE (Lloyd, *et al.*, 2001). Ein Fusionsprotein aus den ersten 15 AS von YopE und der Adenylatcyclase als Reporterprotein kann sezerniert, nicht aber transloziert werden (Sory & Cornelis, 1994, Boyd, *et al.*, 2000). Jedoch konnte gezeigt werden, dass ein YopE₁₋₁₈-β-Laktamase (TEM-1 aus *E. coli* als Reporterprotein) Fusionsprotein sowohl sezerniert als auch transloziert werden kann (Cvetanovic, 2011). In jedem Fall ist allerdings die Effizienz der Sekretion bzw. Translokation im Vergleich zum wildtypischen YopE reduziert. Ähnliche Ergebnisse konnten für die *Yersinia* Effektoren YopH, YopQ und YopN gezeigt werden (Sory, *et al.*, 1995, Ramamurthi & Schneewind, 2002, Ramamurthi & Schneewind, 2003, Goss, *et al.*, 2004). Verschiedene Arbeiten untermauern sowohl die Theorie eines Protein-basierten Sekretionssignals als auch die eines mRNA-Signals. So konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Nukleotiden innerhalb der ersten 11 Kodons von YopE, der die mRNA-Sequenz verändert, nicht jedoch die Aminosäuresequenz, die Sekretion nicht beeinträchtigt (Lloyd, *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse deuten auf ein Signal auf Proteinebene hin. Im

EINLEITUNG

Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass eine Verschiebung des Leserasters innerhalb der ersten 15 Kodons von *yopE* und der damit verbundenen Veränderung der Aminosäuresequenz, die Sekretion von YopE nicht verhindert. Dies wiederum spricht für ein Signal auf mRNA-Ebene (Sorg, *et al.*, 2005). Das **zweite Signal** umfasst die Aminosäuren 23-78, die Chaperon-Bindestelle (Cb). In Abwesenheit des Chaperons SycE liegt der N-Terminus von YopE flexibel und ungefaltet vor. Bindet SycE jedoch an die Cb, so findet eine konformationelle Veränderung statt; nach Rodgers, *et al.* (2008) entsteht ein dreidimensionales Sekretionssignal, das den Komplex zum Sekretionskanal mit der ATPase YscN leitet (Rodgers, *et al.*, 2008). Bisher ist aber noch ungeklärt, mit welcher Komponente der Exportmaschine der Chaperon-Effektor-Komplex interagiert. Eine Interaktion mit der ATPase, wie für Salmonellen gezeigt (Akedo & Galan, 2005), konnte nicht belegt werden (Rodgers, *et al.*, 2008).

1.2 Proteintransport über bakterielle Membranen

1.2.1 Sekretionssysteme in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien

Das Cytoplasma wird bei allen Prokaryoten von einer hydrophoben Phospholipid-Doppelschicht, der Cytoplasmamembran, umgeben. Bei Gram-positiven Bakterien ist auf der Cytoplasmamembran eine Zellwand aufgelagert, die aus mehreren Schichten Peptidoglykan besteht. Dahingegen haben Gram-negative Bakterien nur eine dünne Peptidoglykanschicht, der eine äußere Membran aufgelagert ist. Aufgrund der äußeren Membran entsteht bei Gram-negativen ein zusätzliches Kompartiment, das Periplama. Eine wichtige Funktion von Membranen besteht in der Kompartimentierung von Reaktionsräumen innerhalb der Zelle. Jedes Kompartiment weist dabei eine individuelle Proteinkomposition auf. Da in Prokaryoten die Proteinbiosynthese im Cytoplasma stattfindet, müssen Proteine, die nicht für das Cytoplasma bestimmt sind, in ihren jeweiligen Reaktionsraum transportiert werden. In Prokaryoten verbleibt ein Großteil der transportierten Proteine an Membranen oder, im Falle von Gram-negativen Bakterien, löslich im Periplasma. Proteine müssen also die Cytoplasmamembran überqueren. Da über der Cytoplasmamembran ein elektrochemisches Potenzial aufgebaut wird, um Vorgänge wie beispielsweise die ATP-Synthese oder die Flagellenrotation zu energetisieren, muss die Membran undurchlässig für große und geladene Moleküle (Proteine und andere Makromoleküle) gehalten werden. Die Diffusion von kleinen, hydrophoben Substanzen ist jedoch möglich. Die Proteintranslokation über die

EINLEITUNG

innere Membran findet mittels genereller Transportsysteme statt: Dem Sec-Weg (secretion) (Wickner, *et al.*, 1991, Driessen, *et al.*, 2001, Osborne, *et al.*, 2005) und dem Tat-Weg („Twin-Arginin“-Translokationsweg) (Santini, *et al.*, 1998). In beiden Fällen besitzen die zu transportierenden Proteine eine N-terminal lokalisierte Signalsequenz, die während oder kurz nach der Translokation von einer Signalpeptidase abgespalten wird (Thanassi & Hultgren, 2000, Berks, *et al.*, 2005).

Sollen Proteine aus der Zelle in den extrazellulären Raum transportiert werden, so spricht man von Sekretion. Da Gram-negative Bakterien zusätzlich eine äußere Membran besitzen, stehen ihnen eine Reihe von Sekretionswegen zur Verfügung, die die Translokation von Proteinen über die innere und äußere Membran ermöglichen. Dabei unterscheidet man grundsätzlich Sekretionssysteme, die in einem einstufigen Prozess Proteine direkt vom Cytoplasma über beide Membranen nach außen transportieren und Sekretionssysteme, die in einem zweistufigen Prozess Proteine zunächst über die innere und anschließend über die äußere Membran transportieren. Beim Typ II- (T2SS) und Typ V (T5SS)-Sekretionssystem werden Proteine zunächst Sec- oder Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transportiert und anschließend die jeweilige N-terminale Signalsequenz abgespalten (Russel, 1998, Thanassi & Hultgren, 2000, Dautin & Bernstein, 2007). Beim T2SS erfolgt die Translokation des zu sekretierenden Proteins über Membranproteinporen der äußeren Membran, die aus einem multimeren Komplex aus 10-14 Sekretin-Untereinheiten und weiteren Proteinen besteht. Ein typisches Beispiel für ein über das T2SS sekretiertes Protein ist die Pullulanase von *Klebsiella* spp. (Russel, 1998). Proteine, die über das T5SS, auch Autotransportersystem genannt, in den extrazellulären Raum transportiert werden, besitzen neben der N-terminalen Signalsequenz (für den Sec- bzw. Tat-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran), eine C-terminale Domäne, die in die äußere Membran inseriert. Dieser C-terminale Bereich bildet eine Faß-ähnliche Pore bestehend aus β -Faltblättern in der äußeren Membran und erlaubt somit dem restlichen Protein (passenger-Domäne) an die bakterielle Zelloberfläche zu gelangen. Gewöhnlich wird der porenbildende Bereich des Proteins autokatalytisch abgespalten und das Protein somit freigesetzt. Das erste beschriebene Protein, das über das T5SS transportiert wird, war die IgA1 Protease von *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner, *et al.*, 1987). Der Prototyp des Typ IV-Sekretionssystems (T4SS) ist der VirB-Komplex von *Agrobacterium tumefaciens* (Zupan, *et al.*, 1998). Das T4SS ist homolog zum Konjugationssystem und ist in der Lage sowohl Proteine als auch DNA zu transportieren (Burns, 1999). Die meisten Substrate werden in einem einstufigen Prozess direkt vom Cytoplasma in den extrazellulären Raum transportiert, allerdings wurden auch Proteine beschrieben, die zunächst über das Sec-System ins Periplasma gelangen und

EINLEITUNG

dann weiter über die äußere Membran transloziert werden (Thanassi & Hultgren, 2000, Cascales & Christie, 2003). Beim Typ I- (T1SS) und Typ III (T3SS)-Sekretionssystem handelt es sich im Gegensatz zu den anderen oben beschriebenen Sekretionssystemen um Sec-unabhängige Systeme. Die Proteine werden direkt aus dem Cytosol durch einen geschlossenen Kanal über innere und äußere Membran transportiert. Es gibt also kein periplasmatisches Zwischenprodukt. Das T1SS ist ein einfach aufgebautes System, das aus nur drei Untereinheiten besteht: einem ABC-Protein („ATP-binding cassette“-Protein), dem MFP (membrane fusion protein) und dem OMP (outer membrane protein). Proteine, die über das T1SS sekretiert werden, besitzen ein C-terminales Sekretionssignal, das nicht abgespalten wird (Delepelaire, 2004). Typische T1SS-Substrate sind RTX-Toxine (Holland, *et al.*, 2005). Beim Typ III-Sekretionssystem erfolgt die kontaktabhängige Sekretion von Effektor-Proteinen direkt ins Cytosol der eukaryotischen Wirtszelle. Die Substrate werden aus dem Cytosol über einen Sekretionskanal transportiert, der sowohl die innere und äußere Bakterienmembran als auch die Membran der Wirtszelle durchspannt (Enninga & Rosenshine, 2009, Marlovits & Stebbins, 2010). Ein typisches Beispiel für das T3SS ist die Sekretion der Yop-Effektoren von Yersinien (Cornelis, 2006) (Details siehe 1.1.2.1).

Beim Typ VI- (T6SS) und Typ VII (T7SS)-Sekretionssystem handelt es sich um relativ neu beschriebene Systeme, die noch nicht in allen Details untersucht wurden. Das T6SS findet sich in vielen Gram-negativen Bakterien und ist an einer Vielzahl von Prozessen wie beispielsweise der Sekretion von Virulenzfaktoren, der Biofilmbildung oder der Stresswahrnehmung beteiligt (Schell, *et al.*, 2007, Suarez, *et al.*, 2008, Weber, *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass das T6SS essentiell für die Virulenz von *Vibrio cholerae* gegenüber J447 Makrophagen ist (Pukatzki, *et al.*, 2006). Weiterhin konnten Podladchikova, *et al.*, 2011 zeigen, dass eine Komponente des T6SS an der Autoagglutination von *Y. pestis* beteiligt ist. Bakterielle Autoagglutination, die durch die Bildung von festen Zellzusammenschlüssen entsteht, trägt bei vielen pathogenen Bakterien zur Kolonisierung und zum Überleben der Bakterien im Zuge der Infektion bei. Der Begriff Typ VI bezeichnet allerdings auch den Transport von Zellmaterial durch „Abschnüren“ von Vesikeln aus der äußeren Membran (Beveridge, 1999). In *Mycobacterium tuberculosis* wurde ein spezialisiertes Sekretionssystem für einige Virulenzfaktoren beschrieben, welches aufgrund seiner Zusammensetzung und Eigenschaften nicht zu den anderen Sekretionssystemen eingruppiert werden konnte und somit T7SS benannt wurde (Abdallah, *et al.*, 2007).

1.2.2 Das Sec-System

Das Sec-System kommt bei allen Lebewesen vor. Es transportiert Proteine über die innere Membran, ist aber auch in der Lage, Membranproteine in die Cytoplasmamembran zu inserieren. Proteine werden dabei in einer weitgehend ungefalteten Konformation transportiert. Die Faltung in die aktive Konformation erfolgt erst nach Abschluss des Transports (Driessen, *et al.*, 1998, Osborne, *et al.*, 2005).

1.2.2.1 Sec-Signalsequenzen

Wie bereits oben beschrieben, besitzen Sec-abhängig transportierte Proteine eine N-terminale Signalsequenz, die kurz nach oder während des Transports durch eine Signalpeptidase abgespalten wird. Dieses Signalpeptid ist notwendig, um das Protein dem korrekten Translokationsweg zuzuführen. Proteine vor der Prozessierung, d.h. vor Abspaltung der Signalsequenz, werden als Vorläuferproteine bezeichnet, nach der Prozessierung dann als reife Proteine (Paetzel, *et al.*, 2002).

Bakterielle Signalpeptide des Sec-Weges zeichnen sich durch einen hochkonservierten Aufbau aus drei Domänen aus: einer positiv-geladenen **n-Region** am N-Terminus (1-5 AS), einer hydrophoben Kern-Region (**h-Region**; 7-15 AS) und einer polaren C-terminalen Region (**c-Region**; 3-7 AS) mit einer Signalpeptidase-Erkennungsstelle (zwei kleine, neutrale Reste – meist Alanin – an Positionen -1 und -3 relativ zur Signalpeptidase-Schnittstelle) (Abb. 2). Diese dreigliedrige Struktur des Sec-Signalpeptids wird von Komponenten des Sec-Apparats erkannt; besonders bei der n- und h-Region handelt es sich um entscheidende strukturelle Elemente, die vom Motorprotein, der ATPase SecA erkannt werden (Driessen, *et al.*, 1998, Natale, *et al.*, 2008).

Die Struktur und Funktion der Sec-abhängigen Signalpeptide sind hochkonserviert, allerdings lassen sich kaum Homologien auf Ebene der Aminosäuresequenz feststellen. N-terminale Signalsequenzen können mithilfe von Programmen, wie beispielsweise SignalP (siehe 2.21), vorhergesagt werden (Bendtsen, *et al.*, 2004).

EINLEITUNG

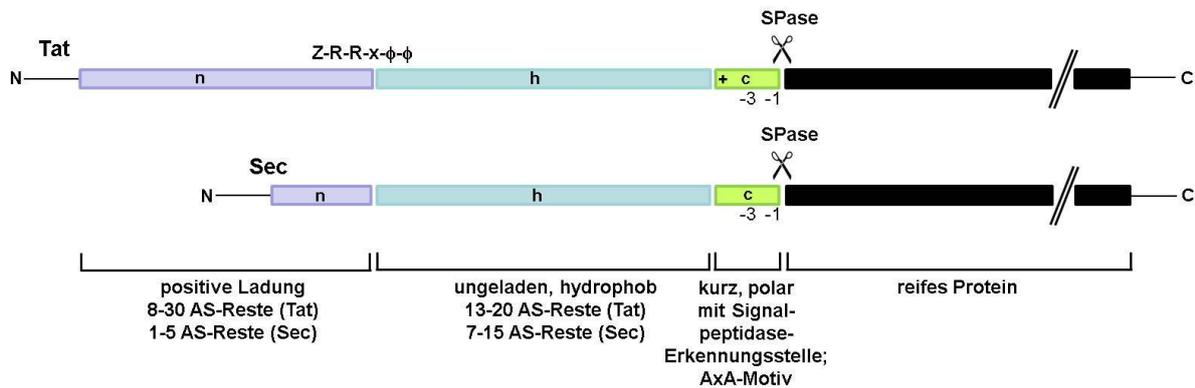


Abb. 2: Schematischer Vergleich von typischen N-terminalen Signalsequenzen von Sec- und Tat-Substraten.

Dargestellt ist der Aufbau aus drei Domänen: die positiv geladene n-Region, die hydrophobe h-Region (weniger hydrophob für Tat-Signale) und die kurze, polare c-Region mit der Signalpeptidase-Erkennungsstelle (Alanin-X-Alanin-Motiv). Das „Twin-Arginin“-Motiv und die Signalpeptidase-Erkennungsstelle (SPase) sind angezeigt. Details zum Aufbau und zu den Unterschieden zwischen Sec- und Tat-Signalpeptiden finden sich im Text. Z: polarer AS-Rest; x: keine Einschränkung; φ: hydrophober AS-Rest. + bezeichnet positiv-geladene AS-Reste in der c-Region des Tat-Signals.

1.2.2.2 Die Sec-abhängige Proteintranslokation

Proteine, die Sec-abhängig über die Cytoplasmamembran transportiert werden, befinden sich dabei in einer weitgehend ungefalteten Konformation. Exportspezifische Chaperone stellen dabei sicher, dass die Proteine im Cytoplasma im ungefalteten Zustand gehalten werden. Außerdem führen diese Chaperone die Vorläuferproteine dem Sec-Apparat in der Membran zu. In *E. coli* unterscheidet man dabei zwei verschiedene Wege: das SecB- und das SRP (signal recognition particle)-„Targeting“. Bei SecB handelt es sich um ein exportspezifisches Chaperone, das einen posttranslationalen Transport vermittelt. Das SRP hingegen ist ein Ribonukleoprotein-Komplex, der kotranslational an Signalpeptide von naszierenden Polypeptiden bindet. Zusammen mit den Ribosomen wird der gesamte Komplex zur Membran geleitet und der Transport des Proteins erfolgt über die Sec-Translokase. SecB übernimmt meist das „Targeting“ von sekretorischen Proteinen bzw. löslichen Proteinen im Periplasma (Collier, 1993), wohingegen SRP das „Targeting“ von integralen Membranproteinen übernimmt (De Gier, *et al.*, 1997). Ausnahmen bilden Sec-abhängig transportierte β-Laktamasen, die sowohl SecB- (Laminet, *et al.*, 1991) als auch SRP-unabhängig (Beha, 2003) ins Periplasma transportiert werden. Es konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass β-Laktamasen sowohl mit GroEL als auch GroES interagieren (Bochkareva, *et al.*, 1988, Laminet, *et al.*, 1991). Daher wird vermutet, dass GroEL/GroES,

EINLEITUNG

anstelle von SecB oder SRP an die β -Laktamasen binden, diese in einem ungefalteten Zustand halten und zum Sec-Apparat leiten.

Im Folgenden wird Bezug auf das SecB-Targeting, das nur bei Gram-negativen Bakterien vorkommt, genommen.

Die Sec-Translokase setzt sich aus den integralen Membranproteinen SecY, SecE und SecG zusammen, die miteinander die SecYEG-Translokationspore bilden (Collinson, *et al.*, 2001, Breyton, *et al.*, 2002, Cannon, *et al.*, 2005). Mit SecYEG sind weitere integrale Membranproteine, SecD, SecF und YajC, assoziiert, welche ihrerseits ebenfalls einen Komplex bilden (Driessen, *et al.*, 2001). Das SecA-Protein ist die zentrale Komponente während des Translokationsprozesses; SecA wechselwirkt sowohl mit dem exportspezifischen Chaperon SecB, welches an das zu exportierende Protein gebunden ist, als auch mit den membranassoziierten Komponenten der Sec-Translokase (Joly & Wickner, 1993, Manting & Driessen, 2000). Bei SecA handelt es sich um eine ATPase, die durch ATP-Hydrolyse den Transport des Sec-Substrats antreibt. Mehrere Zyklen von SecA-Bindung an das Protein und ATP-Hydrolyse sind notwendig, um die vollständige Translokation des Substrats durch die Sec-Translokase zu ermöglichen (Economou, *et al.*, 1995, van der Wolk, *et al.*, 1997). Neben dem ATP-Verbrauch durch SecA wird ebenfalls das Membranpotenzial zum aktiven Transport benötigt (Driessen, 1992). Nachdem SecB durch Wechselwirkungen mit SecA das Vorläuferprotein der Sec-Translokase zugeführt hat und die Translokation initiiert wurde, löst sich SecB und wird wieder ins Cytoplasma freigesetzt (den Blaauwen, *et al.*, 1996). Trotz einer Vielzahl an strukturellen und biochemischen Details ist der genaue Mechanismus der SecA-vermittelten Proteintranslokation bisher unbekannt und wird kontrovers diskutiert. Mehrere, sich zum Teil widersprechende Modelle, stehen zur Diskussion (für detaillierte Informationen siehe Review Kusters & Driessen, 2011). Nachdem das komplette Protein über die Cytoplasmamembran transportiert wurde, wird das reife Protein durch Prozessierung durch die Signalpeptidase freigesetzt (Schiebel, *et al.*, 1991, Paetzel, *et al.*, 2002).

Das reife, noch ungefaltete Protein muss nun auf der trans-Seite der Membran seine korrekte Konformation einnehmen. Dabei stehen extrazelluläre bzw. periplasmatische Faltungshelfer zur Verfügung, die auch als „Foldasen“ bezeichnet werden. Beispielsweise ist die Ausbildung von Disulfidbrücken essentiell für die Aktivität und Stabilität vieler Proteine. Disulfidbrücken bilden sich zwar *in vitro* auch spontan aus, jedoch ist eine sehr schnelle Ausbildung erforderlich, da ungefaltete Proteine sensitiv gegenüber dem Abbau durch Proteasen sind (Bardwell, *et al.*, 1991). In Gram-negativen Bakterien katalysieren

EINLEITUNG

Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen die Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken im Periplasma (Maskos, *et al.*, 2003, Schlapschy & Skerra, 2011).

1.2.3 Das Tat-System

Das Tat-System ist in Bacteria und Archaea weit verbreitet, jedoch im Gegensatz zum Sec-System nicht essentiell und somit auch nicht in allen Organismen zu finden. In Eukaryota wurde das Tat-System bisher nur in den Thylakoidmembranen von pflanzlichen Plastiden nachgewiesen (Muller & Klosgen, 2005). Allerdings deuten genomische Analysen mittlerweile auch auf die Anwesenheit des Tat-Systems in pflanzlichen Mitochondrien hin (Yen, *et al.*, 2002).

Die wichtigste Aufgabe des Tat-Weges ist der Transport von vollständig gefalteten Proteinen bzw. Kofaktor-gebundenen Proteinen über die Cytoplasmamembran. Diese Fähigkeit unterscheidet das Tat-System vom Sec-System, welches nur Proteine in einer weitgehend ungefalteten Konformation transportieren kann.

1.2.3.1 Tat-Signalsequenzen

Die N-terminale Signalsequenz von Tat-Substraten ähnelt in ihrem Aufbau der dreiteiligen Struktur der Sec-Signalsequenzen. Sie besitzt ebenfalls eine positiv-geladene n-Region, eine hydrophobe h-Region und eine kurze, polare c-Region mit einer Signalpeptidase-Erkennungsstelle. Dennoch gibt es einige besondere Merkmale, die die Tat- von den Sec-Signalsequenzen unterscheiden. Tat-Signalsequenzen besitzen ein hochkonserviertes AS-Motiv am Übergang zwischen n- und h-Region, welches zwei nahezu invariante Arginin-Reste (deshalb auch „Twin-Arginin“-Translokationsweg) aufweist: Z-R-R-x- ϕ - ϕ , wobei Z für einen polaren AS-Rest und ϕ für einen hydrophoben AS-Rest steht. Für x besteht keine Einschränkung (Berks, 1996, Robinson & Bolhuis, 2004). Tat-Signalpeptide mit einer Durchschnittslänge von ca. 35 AS sind in der Regel länger als Sec-Signale (Durchschnittslänge von 20 AS), was an der häufig sehr langen n-Region liegt. Außerdem ist die h-Region von Tat-Signalen in der Regel etwas länger und weniger hydrophob als von Sec-Signalpeptiden. Die c-Region enthält im Gegensatz zu Sec-Signalpeptiden häufig positiv-geladene AS-Reste, die ein sogenanntes „Sec-avoidance“-Signal darstellen (Bogsch, *et al.*, 1997). Die hier beschriebenen Charakteristika von Tat-Signalsequenzen in Kombination mit einer Datenbank aus experimentell belegten Tat-Substraten ermöglichen

die Entwicklung von Tat-Signalsequenz-Vorhersageprogrammen wie beispielsweise TatP (Bendtsen, *et al.*, 2005), TATFIND 1.2 (Rose, *et al.*, 2002) oder PRED-TAT (Bagos, *et al.*, 2010).

Das „Twin-Arginin“-Motiv ist namensgebend für den Tat-Weg und extrem konserviert; dennoch besitzen einige wenige Tat-Substrate ein nicht-perfektes Konsensusmotiv. Beispielsweise findet sich in der Signalsequenz des experimentell belegten Tat-Substrats TtrB (Tetrathionat-Reduktase) von *Salmonella typhimurium* ein KR- anstelle eines RR-Motivs (Hinsley, *et al.*, 2001). Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass konservative Austausche des RR-Motivs zu KR, RK oder KK zu einer beträchtlichen Minderung der Effizienz des Exports des Tat-Substrats führen, nicht jedoch einen kompletten Exportblock verursachen (Halbig, *et al.*, 1999, Stanley, *et al.*, 2000, Buchanan, *et al.*, 2001, DeLisa, *et al.*, 2002, Ize, *et al.*, 2002). Ein vollständiges Blockieren des Exports wird erst durch einen Ladungsverlust, durch den Austausch des RR-Motivs zu KQ oder QQ oder durch eine Ladungsumkehr (RR zu DD) erreicht (Kreutzenbeck, *et al.*, 2007). Daraus lässt sich schließen, dass das „Twin-Arginin“-Motiv nicht allein dafür verantwortlich ist, das „Targeting“ des Tat-Substrats zur Tat-Translokase zu übernehmen; zusätzliche Merkmale innerhalb des Tat-Signalpeptids scheinen notwendig zu sein, um ein Tat-Substrat erfolgreich an die Tat-Translokase zu dirigieren (Brink, *et al.*, 1998, Bruser, *et al.*, 1998, Stanley, *et al.*, 2000).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass, bis auf wenige Ausnahmen (Blaudeck, *et al.*, 2003), Tat-Substrate zwischen Bakterien ausgetauscht werden können und, sofern ein funktionelles Tat-System vorhanden ist, exportiert werden können. Ein Beispiel hierfür ist das gut-untersuchte Tat-Substrat TorA (Trimethyl-amine N-oxid Reduktase) aus *E. coli*, dessen Signalsequenz von allen bisher bekannten Tat-Translokasen erkannt wurde (Blaudeck, *et al.*, 2001, Thomas, *et al.*, 2001).

1.2.3.2 Faltung des Tat-Substrats im Cytoplasma und Qualitätskontrolle

Charakteristisch für den Tat-abhängigen Transport ist die Fähigkeit, vollständig gefaltete Proteine zu transportieren. Die Substrate falten bereits mithilfe cytoplasmatischer Chaperone bzw. binden ihre Kofaktoren oder bilden di- oder multimere Enzymkomplexe aus. Der Tat-abhängige Transport findet nur statt, wenn die Tat-Substrate richtig gefaltet sind und/oder alle Kofaktoren gebunden und Enzymkomplexe ausgebildet sind. An der Translokationspore muss also eine Art Qualitätssicherung stattfinden; das genaue Prinzip ist bisher unbekannt (Halbig, *et al.*, 1999, Rodrigue, *et al.*, 1999).

EINLEITUNG

Die oben erwähnte Qualitätssicherung findet an der Tat-Translokase statt und somit in einer späten Phase des Tat-abhängigen Transportes. Andererseits wurde das sogenannte „Proofreading“ beschrieben, welches nicht korrekt gefaltete Tat-Substrate oder fehlende Kofaktoren bereits in einer frühen Phase des Tat-Transports kontrolliert. Beispielsweise wurde für das TorA-spezifische Signalpeptid-bindende Chaperon TorD aus *E. coli* gezeigt, dass es durch Bindung an das Tat-Signalpeptid ein „Targeting“ zur Tat-Translokase verhindert, bevor nicht alle Kofaktoren gebunden sind und die korrekte Konformation eingenommen wurde (Hakansson, *et al.*, 1993, Sargent, *et al.*, 2002, Hatzixanthis, *et al.*, 2005, Hatzixanthis, *et al.*, 2005). Für das Chaperon TorD konnte außerdem gezeigt werden, dass es an die Tat-Signalsequenz von TorA bindet und somit deren Degradierung durch Proteasen innerhalb des Cytoplasmas verhindert (Genest, *et al.*, 2006, Genest, *et al.*, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TorD dazu beiträgt, das TorA-Vorläuferprotein zu stabilisieren und die Effizienz des „Targetings“ des Tat-Substrats zur Translokationspore zu erhöhen (Ilbert, *et al.*, 2003).

Neben homo- und heterooligomeren Tat-Substraten sind auch Tat-Substrate bekannt, die weder Kofaktoren binden, noch multimere Enzymkomplexe ausbilden. Beispiele sind die Amidasen AmiA und AmiC aus *E. coli* (Bernhardt & de Boer, 2003) sowie die β -Laktamasen BlaS und BlaC aus Mycobakterien (McDonough, *et al.*, 2005). Für diese Proteine konnten bisher keine Tat-spezifischen Chaperone nachgewiesen werden; es ist jedoch zu vermuten, dass an diese Proteine generelle Chaperone wie DnaK oder GroEL binden, um Aggregatbildungen zu vermeiden und die Proteine zu stabilisieren (Xu, *et al.*, 2005, Perez-Rodriguez, *et al.*, 2007).

1.2.3.3 Die Tat-Translokase und der Tat-abhängige Transport

Der Proteintransport mittels des Tat-Weges ist weit verbreitet und die zugehörigen *tat*-Gene konnten mittels Genomanalysen bei einer Vielzahl von Bakterien identifiziert werden. Im Modellorganismus *E. coli* wie auch bei anderen Arten der Familie Enterobacteriaceae liegen die *tat*-Gene in einem *tat*-Operon kodiert vor. Dieses Operon enthält die Gene *tatABCD* und wird konstitutiv exprimiert. Allerdings sind nur die TatA, TatB und TatC-Proteine am Aufbau der Tat-Translokase beteiligt; TatD kodiert für ein Tat-unabhängiges Protein mit DNase-Aktivität (Wexler, *et al.*, 2000). Bei TatA und TatB handelt es sich um sehr ähnliche Proteine, die jedoch unterschiedliche Funktionen beim Aufbau der Tat-Translokase haben (Jack, *et al.*, 2001). Außerdem ist in manchen Organismen das Produkt des monocistronischen *tatE* Gens, das in einem anderen Abschnitt des Chromosoms liegt, am Aufbau des Tat-Apparates

EINLEITUNG

beteiligt. Beim *tatE* Gen handelt es sich um ein *tatA*-Homolog, das vermutlich aus einer Genduplikation hervorging. TatE ist in manchen Bakterien wie beispielsweise *E. coli* neben TatABC Bestandteil des Tat-Apparates (Jack, *et al.*, 2001).

Die Proteine TatA, TatB und TatE sind sehr ähnlich aufgebaut, wohingegen TatC eine unterschiedliche Struktur aufweist. TatA, TatB und TatE besitzen jeweils eine N-terminale Transmembrandomäne (Settles, *et al.*, 1997, De Leeuw, *et al.*, 2001); TatC wird jedoch als ein Protein mit sechs Transmembrandomänen und einem cytoplasmatischen N- und C-Terminus beschrieben (Sargent, *et al.*, 2001). TatC ist eine essentielle Komponente des Tat-Apparates und eine Deletion führt zu einem kompletten Exportblock (Ize, *et al.*, 2002).

Tat-Substrate bzw. Tat-Substrate im Komplex mit Kofaktoren bis zu einer Größe von 140 kDa (FdnGH-Subkomplex der Formiat-Dehydrogenase von *E. coli*) wurden beschrieben (Berg, *et al.*, 1991, Stanley, *et al.*, 2002). Der Durchmesser der Translokationspore des Tat-Apparates muss in diesem Fall ca. 70 Å betragen, um in der Lage zu sein, ein solches Protein zu transportieren. Zusätzlich muss die Pore auch kleinere Tat-Substrate exportieren können und undurchlässig für andere Makromoleküle bleiben, damit das Membranpotenzial nicht zusammenbricht. Das kleinste bisher beschriebene Tat-Substrat ist HiPIP (high-potential iron sulphur protein) von *Chromatium vinosum* mit einer Größe von 9 kDa (Carter, *et al.*, 1974, Berks, *et al.*, 2000). Die Translokationspore muss also in ihrer Größe je nach Substrat variabel sein.

Anhand der Untersuchungen des Tat-Systems in der Thylakoidmembran von Chloroplasten (Mori, 2002) sowie am bakteriellen Tat-System von *E. coli* (Sargent, *et al.*, 2001, Alami, *et al.*, 2003, Kreutzenbeck, *et al.*, 2007) wird ein Modell zum Mechanismus des Aufbaus der Tat-Translokase und des Tat-abhängigen Transports vorgeschlagen (Abb. 3). Zunächst liegen die Komponenten der Translokase in getrennten TatA- und TatBC-Komplexen vor. Das Tat-Vorläuferprotein bindet über das „Twin-Arginin“-Konsensusmotiv an TatC; TatC ist also vermutlich der Rezeptor für das Tat-Signalpeptid. Daraufhin werden TatA-Moleküle zum TatBC-Komplex rekrutiert und die eigentliche Translokationspore bestehend aus TatA, TatB und TatC-Molekülen wird ausgebildet. TatABC formen dabei eine ringförmige Struktur, wobei vermutet wird, dass die Größe der Pore durch die Anzahl der rekrutierten TatA-Moleküle beeinflusst wird. Somit könnte für jedes in seiner Größe unterschiedliche Tat-Substrat eine entsprechend große Pore ausgebildet werden. Nun erfolgt der Transport des Tat-Substrats in einem vom elektrochemischen Potenzial (PMF, proton motive force, Protonenmotorische Kraft) abhängigen Prozess über die Cytoplasmamembran. Der Dreikomponenten-Translokationskomplex bleibt bis zum vollständigen Export des Tat-Substrats bestehen und dissoziiert nach Spaltung des Vorläuferproteins durch die Signalpeptidase.

EINLEITUNG

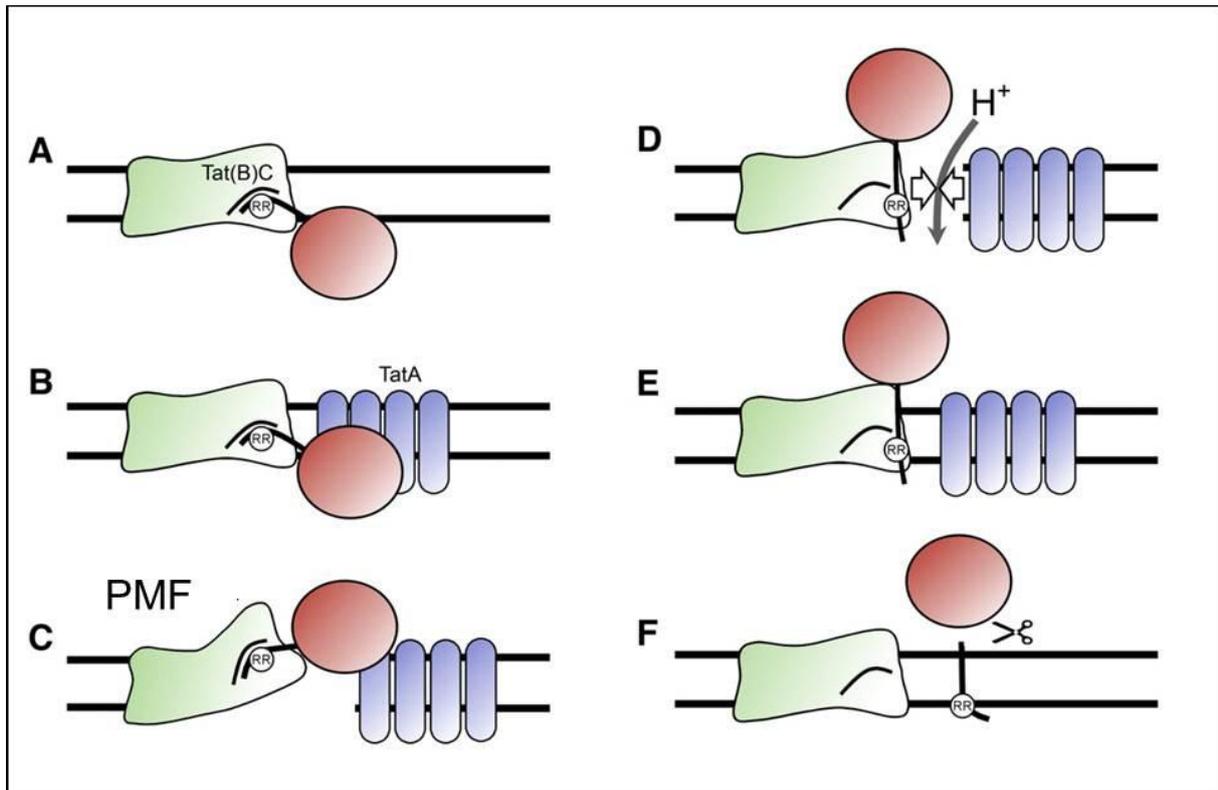


Abb. 3: Modell zum Mechanismus des Aufbaus der Tat-Translokase und der Translokation der Tat-Substrate über die Cytoplasmamembran (Bild aus Natale, *et al.*, 2008).

A: Das Tat-Substrat interagiert mittels seines „Twin-Arginin“-Konsensusmotivs mit dem TatBC-Komplex woraufhin **B:** TatA rekrutiert wird. **C:** Veränderungen in der Konformation des TatBC-Komplexes ermöglichen den **D:** Transport des Tat-Substrats über die Membran, der mit einem starken Protonenfluss einhergeht. **E:** Nach Abschluss des Transports schließt sich die Translokationspore, **F:** die Signalpeptidase prozessiert das Vorläuferprotein und setzt es somit frei. TatA dissoziiert vom TatBC-Komplex. PMF=proton motive force.

Der Tat-Transport wird über die Protonenmotorische Kraft (PMF) energetisiert (Wiegert, *et al.*, 1996, Santini, *et al.*, 1998, Cristobal, *et al.*, 1999). Der energiekonsumierende Schritt ist die Rekrutierung von TatA zum TatBC-Komplex nach der Substratbindung. Bisher ist ungewiss, ob weitere Schritte im Translokationsprozess wie die Translokation des Substrats durch die Pore oder die Dissoziation des Tat-Komplexes, Energie in Form von PMF benötigen. Im Gegensatz zum Sec-System ist keine Energie in Form von NTPs nötig. Allerdings gibt es derzeit verschiedene Meinungen darüber, ob ΔpH und $\Delta\psi$ oder ΔpH allein für den Antrieb des Tat-abhängigen Transports nötig ist (Finazzi, *et al.*, 2003, Cruz, *et al.*, 2005).

1.2.3.4 Bedeutung des Tat-Systems für die Pathogenität von Bakterien

Bakterien transportieren eine Vielzahl verschiedener Proteine über das Tat-System. Bei den meisten Tat-Substraten handelt es sich um Kofaktor-gebundene Enzyme oder Enzymkomplexe, die in Oxidations-Reduktionssystemen zur Energiekonservierung unter anaeroben Bedingungen involviert sind (Berks, 1996, Robinson & Bolhuis, 2001). Es ist jedoch hervorzuheben, dass das Tat-System auch eine Rolle in der Pathogenität von Bakterien spielt. Beispielsweise konnte für das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*, ein wichtiger Erreger von nosokomialen Infektionen, gezeigt werden, dass beide Phospholipasen C zunächst über den Tat-Weg ins Periplasma transportiert und anschließend weiter über die äußere Membran transloziert werden (Voulhoux, *et al.*, 2001). Phospholipasen sind sekretierte Virulenzfaktoren, die in *P. aeruginosa* über das T2SS transloziert werden. Wie in 1.2.1 beschrieben, handelt es sich beim T2SS um einen zweistufigen Transportprozess mit einem periplasmatischen Zwischenprodukt. Zunächst wurde angenommen, dass alle über das T2SS sekretierten Proteine in einem Sec-abhängigen Prozess über die Cytoplasmamembran transportiert werden. Die Untersuchungen am Transport der Phospholipasen zeigten zum ersten Mal, dass das Tat-System am T2SS beteiligt ist und dass die Sekretion von Virulenzfaktoren vom Tat-System abhängt. In einer weiteren Arbeit zu *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass das Tat-System an der Sekretion von Komponenten, die für die Biosynthese von Siderophoren notwendig sind (Voulhoux, *et al.*, 2006), sowie für Proteine, die für die anaerobe Atmung und Cholin-Degradation benötigt werden, beteiligt ist (Ochsner, *et al.*, 2002). Auch für *Legionella pneumophila*, dem Erreger der Legionärskrankheit, einer schweren Form von Pneumonie, konnte der Beitrag des Tat-Systems an der Sekretion von Virulenzfaktoren nachgewiesen werden. Analysen mittels Deletionsmutanten zeigten, dass das *tatB*-Gen die Sekretion der Phospholipase C und das Wachstum unter Eisen-limitierenden Bedingungen erleichtert. Das Tat-System scheint außerdem indirekt Einfluss auf die intrazelluläre Replikation der Legionellen in Amöben und Makrophagen zu haben (Rossier & Cianciotto, 2005). Auch bei einem weiteren relevanten Pathogen, dem enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), wurde der Beitrag des Tat-Systems auf die Virulenz nachgewiesen. Eine Δ *tatABC* Deletionsmutante dieses Stammes führte zu einer attenuierten Toxizität gegenüber Vero Zellen und zu einem kompletten Verlust der Motilität auf Soft-Agarplatten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion dieser Gene die Sekretion des Shiga Toxin 1 (Stx1) beeinträchtigt und die Synthese des Flagellins H7 verhindert (Pradel, 2003). Bei Shiga Toxin 1 und Flagellin H7 handelt es sich um die beiden Hauptvirulenzfaktoren von EHEC. McDonough, *et al.* (2005) konnten in

EINLEITUNG

Mycobacterium tuberculosis, dem Erreger der Tuberkulose, zeigen, dass es sich sowohl bei der chromosomal kodierten β -Laktamase BlaC als auch bei beiden Phospholipasen PlcA und PlcB um Tat-Substrate handelt. Das Tat-System in *M. tuberculosis* ist also an der Antibiotika-Resistenz und an der Sekretion von Virulenzfaktoren beteiligt.

Das Tat-System spielt bei der Sekretion von Virulenzfaktoren einiger klinischer relevanter Erreger eine wichtige Rolle. Da das Tat-System im Tier- und Pflanzenreich nicht vorkommt bzw. bisher nicht nachgewiesen wurde, stellt es ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung von antibakteriellen Substanzen dar.

1.2.3.5 Das Tat-System in Yersinien

Genom-Analysen konnten bereits zeigen, dass die Gene für den Tat-Apparat in einer Vielzahl bakterieller Erreger konserviert sind. Auch in zweien der humanpathogenen *Yersinia* Arten, *Y. pseudotuberculosis* IP32953 und *Y. pestis* KIM5, konnten Gene mit hohen Homologien zu den *E. coli* Genen *tatA*, *tatB*, *tatC* und *tatE* gefunden werden. Lavander, *et al.* (2006) konstruierten *tatC* Deletionsmutanten in beiden Stämmen und analysierten das Tat-System mithilfe von *torA*_{Signalpeptid}-*gfp* Fusionskonstrukten. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Tat-System sowohl in *Y. pseudotuberculosis* als auch in *Y. pestis* funktionell ist. Außerdem konnten sie zeigen, dass die Deletion des *tatC* Gens in *Y. pseudotuberculosis* zu einem stark Virulenz-attenuierten Stamm bei der Infektion im Maus-Modell führt. Der Grad der Attenuierung entsprach in etwa dem des pYV Virulenzplasmid-negativen WA-C Stammes. *In vitro*-Analysen der *tatC*-Deletionsmutante zeigten, dass im Vergleich zum Wildtyp Stamm das Wachstumsverhalten nicht beeinflusst wird. Ebenfalls wird das T3SS (Sekretion der Yop-Effektoren, Translokation der Yop-Effektoren in die Wirtszelle, Resistenz gegenüber Phagozytose durch Makrophagen) durch Deletion des *tatC*-Gens nicht beeinflusst. Der einzige beobachtete *in vitro*-Defekt der *tatC*-Mutante war der Verlust der Motilität bei 27 °C. Das Tat-System spielt also eine wichtige Rolle in der Virulenz von *Y. pseudotuberculosis*; es konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden, welcher Mechanismus hinter dem beobachteten Phänotyp steckt.

Auch zum Tat-System von *Y. enterocolitica* wurden Untersuchungen durchgeführt. Shi, *et al.* (2007) konstruierten eine *tatC*-Deletionsmutante im *Y. enterocolitica* O:8 CMCC52211 Stamm und analysierten dessen Phänotyp. Das Ausschalten des *tatC* Gens führte im Vergleich zum Wildtyp-Stamm zu einer Reihe von Unterschieden bei der Verstoffwechslung verschiedener Metabolite. Keine Unterschiede zwischen der Mutante und dem parental

EINLEITUNG

Stamm konnten bei der Sensitivität zu verschiedenen Antibiotika wie beispielsweise Ampicillin festgestellt werden. Ebenfalls blieb, im Gegensatz zu Beobachtungen bei *Y. pseudotuberculosis* (Lavander, *et al.*, 2006), die Motilität in der *tatC*-Deletionsmutante erhalten.

1.3 β -Laktam-Antibiotika und β -Laktamasen

1928 arbeitete der schottische Bakteriologe Alexander Fleming an Staphylokokken und bemerkte zufällig, dass ein auf die Bakterienplatten geratener Schimmelpilz der Gattung *Penicillium* eine bakterientötende Wirkung hatte. Fleming nannte den von diesem Pilz produzierten Stoff Penicillin, welches somit zum ersten beschriebenen Antibiotikum wurde (Fleming, *et al.*, 1929).

Penicillin gehört zur Gruppe der β -Laktam-Antibiotika, deren gemeinsames Strukturmerkmal der β -Laktam-Ring ist. Vertreter dieser Gruppe wirken bakterizid, indem sie die Peptidoglykansynthese inhibieren. Dies führt zum Verlust der Zellmembranintegrität und die Zellen lysieren aufgrund des osmotischen Druckunterschieds zwischen dem Zellinneren und der äußeren Umgebung (Araki, *et al.*, 1966, Izaki, *et al.*, 1968)

Bakterien haben ihrerseits Mechanismen entwickelt, um dieser Antibiotikawirkung entgegenzuwirken. Der häufigste Resistenzmechanismus ist die Produktion von Enzymen, den β -Laktamasen, die in der Lage sind durch Hydrolyse des β -Laktam-Rings das Antibiotikum zu inaktivieren. Ein weiterer Mechanismus ist die Veränderung des Angriffspunkts des β -Laktam-Antibiotikums, der Transpeptidasen, die die Quervernetzung bei der Peptidoglykansynthese katalysieren. Außerdem kann die Aufnahme des Antibiotikums durch veränderte Permeabilität oder durch aktiven Efflux verhindert werden (Kong, *et al.*, 2010).

1.3.1 β -Laktam-Antibiotika

1.3.1.1 Einteilung und Struktur

Wie bereits oben erwähnt, ist der gemeinsame Strukturbestandteil aller β -Laktam-Antibiotika der β -Laktam-Ring. Darüberhinaus werden die β -Laktam-Antibiotika aufgrund der Art der Ringstruktur innerhalb des Kerns in verschiedene Untergruppen unterteilt.

EINLEITUNG

Penicilline, die von Schimmelpilzen der Gattung *Penicillium* und *Aspergillus* produziert werden, besitzen als Grundgerüst die 6-Aminopenicillansäure (6-APA), die aus einem Thiazolidinring mit einem β -Laktam-Ring besteht (Cole, 1966). **Cephalosporine**, die unter anderen vom Pilz *Cephalosporium acremonium* produziert werden, besitzen als Kernstruktur anstatt der 6-APA eine 7-ACA (7-Aminocephalosporinsäure), die aus einem Dihydrothiazinring und einem β -Laktam-Ring besteht (Archer & Kitchell, 1966). Cephalosporine werden häufig nochmals hinsichtlich ihrer geschichtlichen Entwicklung und antimikrobiellen Eigenschaften in „Generationen“ untergliedert: Desto höher die Generation, desto breiter ist das Wirkungsspektrum. Ebenfalls zeigen Cephalosporine höherer Generationen eine erhöhte β -Laktamase-Stabilität. **Carbapeneme** unterscheiden sich in ihrer Struktur von den Penicillinen, da das Schwefelatom im Thiazolring durch ein Kohlenstoffatom ersetzt ist (daher auch der Name) und die Seitenkette ist in *trans*-Konformation an den β -Laktam-Ring gebunden (Papp-Wallace, *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu den anderen β -Laktam-Antibiotika, ist am β -Laktam-Ring der **Monobactame** kein weiterer Ring fusioniert. Es handelt sich also um monocyclische β -Laktam-Antibiotika (Cimarusti & Sykes, 1984). Darüber hinaus gibt es **β -Laktamase Inhibitoren**, die neben einem β -Laktam-Ring auch einen Thiazolring besitzen, bei dem allerdings das Schwefelatom durch ein Sauerstoffatom ersetzt ist (Oxapeneme). β -Laktamase Inhibitoren weisen im Gegensatz zu anderen Vertretern der β -Laktam-Antibiotika nur eine sehr geringe antimikrobielle Aktivität auf, allerdings sind sie in der Lage, β -Laktamasen zu inhibieren. Angewendet in Kombination mit einem β -Laktamase-sensitiven Penicillin oder Cephalosporin, wird das Wirkungsspektrum dieser Antibiotika erweitert (Baggaley, *et al.*, 1997) (Übersicht in Tab. 1). Natürlich vorkommende β -Laktam-Antibiotika sind meist in ihrer Wirkungsweise sehr beschränkt. Beispielsweise wirkt Penicillin G hauptsächlich gegen Gram-positive Bakterien, da die äußere Membran der meisten Gram-negativen Bakterien für das Antibiotikum undurchlässig ist (eine Ausnahme bildet dabei der Gram-negative Erreger *Neisseria meningitidis*). Um ein breiteres Wirkungsspektrum zu erreichen, werden vornehmlich halbsynthetische Penicilline produziert: Das mikrobiell produzierte Penicillin G wird enzymatisch gespalten, um 6-APA zu erhalten. Durch Anfügen verschiedener Seitenketten können nun die Eigenschaften des Antibiotikums verändert werden. Das Anfügen eines lipophilen Restes ermöglicht z.B. den Transport durch die äußere Zellmembran von Gram-negativen Bakterien (Ampicillin, Carbenicillin). Um die Penicilline resistent gegenüber den Angriff von β -Laktamasen zu machen, werden sperrige, voluminöse Seitenketten an 6-APA angebracht (Oxacillin, Methicillin). Weitere Eigenschaften wie Stabilität und

EINLEITUNG

Resorptionsgeschwindigkeit werden durch Anfügen verschiedener Seitenketten beeinflusst (Hamilton-Miller, 2008).

Tab. 1: Grundstrukturen und typische Vertreter der fünf Gruppen der β -Laktam-Antibiotika.

Der β -Laktam-Ring ist in der jeweiligen Grundstruktur grün hervorgehoben; R gibt Positionen an, an denen chemische Substitutionen stattfinden können.

β -Laktam Gruppe	Grundstruktur	typische Vertreter
Pename (Penicilline)		Penicillin G (β -Laktamase-sensitiv) Methicillin (β -Laktamase-resistent) Ampicillin (Breitbandpenicillin) Amoxicillin (Breitbandpenicillin) Carbenicillin („Extended-spectrum“-Penicillin)
Cepheme (Cephalosporine)		Cefazolin (1. Generation) Cefuroxim (2. Generation) Cefotaxime (3. Generation) Cefepim (4. Generation)
Carbapeneme		Imipenem Meropenem
Monobactame		Aztreonam Nocardicin
Oxapeneme (β -Laktamase Inhibitoren)		Clavulansäure Sulbactam Tazobactam

1.3.1.2 Wirkungsmechanismus der β -Laktam-Antibiotika

Bakterielle Zellwände dienen dazu, dem osmotischen Druck aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen an gelösten Stoffen zwischen dem Bakterieninneren und der äußeren Umgebung standzuhalten und dem Bakterium seine Form zu geben. Die Zellwand Gram-

EINLEITUNG

positiver Bakterien besteht aus mehreren Schichten Peptidoglykan, wohingegen die Zellwand Gram-negativer Bakterien aus einer sehr dünnen Peptidoglykanschicht, der eine äußere Membran aufgelagert ist, besteht.

Die bakterielle Zellwandsynthese ist Angriffspunkt der β -Laktam-Antibiotika. Diese Gruppe von Antibiotika inhibieren die Transpeptidierungsreaktion, die zur Vernetzung zweier benachbarter Glykanketten führt. Die Quervernetzung findet in Gram-negativen Bakterien zwischen meso-DAP (meso-Diaminopimelinsäure) in dem einen Peptid und D-Alanin in dem anderen Peptid bzw. in Gram-positiven Bakterien zwischen Lysin und D-Alanin statt (Izaki, *et al.*, 1968, Schleifer & Kandler, 1972). Während der Transpeptidierungsreaktion wird der letzte der beiden endständigen D-Alanin-Reste des Peptidoglykanvorläufers abgespalten. Die Enzyme, die diese Reaktion ausführen, die Transpeptidasen oder auch Penicillinbindeproteine (PBPs) genannt, werden durch β -Laktam-Antibiotika gebunden und inhibiert. β -Laktam-Antibiotika sind Strukturanaloga des Substrats der Transpeptidase, des D-Alanyl-D-Alanin-Restes des zu verknüpfenden Peptidoglykanrestes. Ausschlaggebend ist dabei die Struktur des β -Laktam-Rings, dessen reaktive Amidbindung an der gleichen Position wie die Amidbindung des Transpeptidasesubstrats D-Alanyl-D-Alanin liegt. Die chemische Bindung der β -Laktam-Antibiotika an PBPs ist sehr stark und die Enzyme können daraufhin die Transpeptidierungsreaktion nicht mehr katalysieren (Tipper & Strominger, 1965). Die bakteriellen Zellwandkomponenten werden zwar weiter gebildet, aber nicht mehr quervernetzt (Wise & Park, 1965). Zusätzlich stimuliert die Akkumulation von Peptidoglykanvorläufer die Freisetzung von Autolysinen, die die bestehende Zellwand abbauen. Die Zellwand wird also immer schwächer und zusätzlich abgebaut, bis die Zelle aufgrund des osmotischen Drucks lysiert (Repaske, 1958, Tomasz, 1979). Die bakterizide Wirkung der β -Laktam-Antibiotika bezieht sich somit auf wachsende, sich vermehrende Bakterien.

1.3.2 β -Laktamasen

Bakterien können durch Produktion von β -Laktamasen der Wirkungsweise von β -Laktam-Antibiotika entgegenwirken. Diese Enzyme spalten den β -Laktam-Ring, den gemeinsamen Strukturbestandteil aller β -Laktam-Antibiotika, und inaktivieren somit das Antibiotikum. Die Produktion dieser Enzyme stellt also einen wichtigen Resistenzmechanismus dar. Bei β -Laktamasen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Enzymen, die sich in

EINLEITUNG

ihrer Struktur, enzymatischen Aktivität und ihrer genetischen Lokalisation unterscheiden (Majiduddin, *et al.*, 2002, Kong, *et al.*, 2010).

1.3.2.1 Einteilung der β -Laktamasen in verschiedene Gruppen

Die Produktion von β -Laktamasen ist sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien weit verbreitet. Um nun einen Überblick über die Vielzahl verschiedener β -Laktamasen und deren unterschiedlichen Eigenschaften zu bekommen, wurden die β -Laktamasen in verschiedene Gruppen unterteilt. Dabei gibt es zwei Hauptansätze: Der ältere Ansatz ist die Klassifizierung nach Ambler (1980), die auf einer molekularen Klassifizierung aufgrund der Gen- und Aminosäuresequenz der Enzyme beruht. Bisher unterscheidet man vier Klassen von β -Laktamasen (A-D), wobei es sich bei Klassen A, C und D um Enzyme handelt, die über einen Serin-Rest im aktiven Zentrum die Hydrolyse des β -Laktam-Rings katalysieren. Bei Klasse B handelt es sich um Metallo- β -Laktamasen, die die Hydrolyse durch bivalente Kationen (z.B. Zn^{2+}) katalysieren (Ambler, 1980). Eine andere Methode ist die Klassifizierung nach Bush, Jacoby und Medeiros (1995) (kurz BJM Klassifizierung), die die β -Laktamasen aufgrund ihrer Substratprofile, ihrem Verhalten gegenüber β -Laktamase Inhibitoren, der Hydrolyserate (V_{max}), der Bindungsaffinitäten (K_m), dem isoelektrischen Punkt (pI), des Molekulargewichts und der Aminosäurezusammensetzung einteilt (Bush, *et al.*, 1995).

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die verschiedenen Klassen von β -Laktamasen nach der BJM-Klassifizierung gegeben (Tab. 2):

Typische Vertreter der Gruppe 1 der BJM-Klassifizierung bzw. Klasse C der Ambler-Klassifizierung sind die AmpC β -Laktamasen. Bei AmpC-Enzymen handelt es sich um Cephalosporinasen, die in der Lage sind, die meisten Cephalosporine der 3. Generation (1.3.2.1) zu hydrolysieren. Nicht gespalten werden hingegen Carbapeneme. Zudem sind diese Enzyme unempfindlich gegenüber β -Laktamase Inhibitoren. Chromosomal kodierte AmpC β -Laktamasen können entweder konstitutiv exprimiert sein oder durch β -Laktam-Antibiotika induziert werden (Mechanismus der Induktion siehe 1.3.2.3). Plasmidkodierte AmpC β -Laktamasen sind weniger verbreitet als ihre chromosomal kodierten Entsprechungen, jedoch stellen sie ein wichtiges Problem in der Antibiotikatherapie dar, da die Resistenzverbreitung durch Weitergabe der Plasmide zwischen Bakterien sehr rasch erfolgen kann.

Enzyme der Gruppen 2a sind Penicillinasen, die durch Clavulansäure gehemmt werden. Bei β -Laktamasen der Gruppe 2b handelt es sich um Breitspektrum- β -Laktamasen, die die

EINLEITUNG

meisten Penicilline und Cephalosporine der 1. und 2. Generation hydrolysieren können. Sie können wie Enzyme der Gruppe 2a durch Clavulansäure gehemmt werden. Zu dieser Gruppe gehört auch die plasmidkodierte TEM-1 β -Laktamase, die erstmalig aus *E. coli* isoliert wurde (Datta & Kontomichalou, 1965). TEM-1 ist die häufigste plasmidkodierte β -Laktamase und wurde als Selektionsmarker für die Ampicillin-Resistenz in zahlreiche Plasmide eingebaut. Gruppe 2b untergliedert sich nochmals in 2 Untergruppen: Gruppe 2be umfasst β -Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum („extended-spectrum“- β -Laktamasen; ESBL), die Cephalosporine der 3. Generation sowie Monobactame hydrolysieren können. Sie werden ebenfalls durch Clavulansäure gehemmt. Gruppe 2br leitet sich von Gruppe 2be ab, es handelt sich jedoch um β -Laktamasen, die eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Clavulansäure aufweisen. In der Gruppe 2c (bzw. Ambler Klasse A Enzyme) finden sich Carbenicillinasen, die durch Clavulansäure gehemmt werden. Gruppe 2c Enzyme finden sich in *Salmonella enterica* und *Pseudomonas aeruginosa* und liegen häufig in Genkassetten in Integrons oder auf Transposons kodiert vor (Sanschagrín, *et al.*, 1998, Briggs & Fratamico, 1999). Enzyme der Gruppe 2d (die meisten Enzyme fallen in Klasse D nach Ambler) sind Penicillinasen und/oder Carbenicillinasen, die ebenfalls Oxacillin und Cloxacillin hydrolysieren können. Sie werden nur schwach durch Clavulansäure inhibiert. Bei Gruppe 2e handelt es sich um Cephalosporinasen, die, im Gegensatz zu Gruppe 1 Enzymen, durch Clavulansäure gehemmt werden können. Cephalosporinasen, die ebenfalls Monobactame hydrolysieren können und nur schwach durch Clavulansäure gehemmt werden, werden in Gruppe 2f eingruppiert. Gruppe 3 umfasst Metallo- β -Laktamasen (Klasse B nach Ambler), die nicht durch Clavulansäure gehemmt werden. Hier handelt es sich um die einzige Gruppe an β -Laktamasen, die mithilfe eines zweiwertigen Metallions die Hydrolyse des β -Laktam-Rings katalysieren und nicht, wie die Vertreter der übrigen Gruppen, mittels eines katalytischen Serin-Restes im aktiven Zentrum der β -Laktamasen. Enzyme dieser Gruppe sind in der Lage, Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme zu spalten. Nicht hydrolysiert werden können Monobactame. Metallo- β -Laktamasen können durch Metallionen-Chelatoren wie EDTA gehemmt werden. Bei Gruppe 4 Enzymen handelt es sich um Penicillinasen, die nicht in andere Gruppen passen.

EINLEITUNG

Tab. 2: Klassifizierung der β -Laktamasen nach BJM (Bush, Jacobi und Medeiros, 1995) und Ambler (1980).

BJM-Gruppe	Ambler-Gruppe	Eigenschaften/Substrate	Inhibition durch CS	Beispiele
1	C	Chromosomal oder auf Plasmiden kodiert; Cephalosporine	-	AmpC von Gram-negativen Bakterien
2a	A	Penicilline	+	In Gram-positiven Bakterien; BlaZ von <i>S. aureus</i>
2b	A	Penicilline, Cephalosporine	+	TEM-1 von <i>E. coli</i> , SHV-1 von <i>K. pneumoniae</i>
2be	A	β -Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum (ESBL); Breitspektrum-Cephalosporine, Monobactame	+	TEM-3 bis TEM-20, SHV-2 bis SHV-6
2br	A	Breitspektrum β -Laktamasen	\pm	TEM-30 bis TEM-40
2c	A	Penicilline, Carbenicillin	+	PSE-4 von Enterobacteriaceae
2d	D	Auf Plasmiden, meist in Integrons kodiert; Oxacillin, Cloxacillin	\pm	OXA-Enzyme in <i>E. coli</i> und <i>Salmonella spp.</i>
2e	A	Cephalosporine	+	Cephalosporinasen aus <i>P. vulgaris</i>
2f	A	Carbapeneme	+	SME-1 von <i>S. marcescens</i>
3	B	Metallo- β -Laktamasen; werden durch EDTA gehemmt; alle β -Laktam-Antibiotika außer Monobactame	-	CcrA von <i>Bacteroides fragilis</i>
4	-	Penicillasen, die nicht in andere Gruppen passen	-	Penicillase aus <i>Pseudomonas cepacia</i>

CS= Clavulansäure

1.3.2.2 Struktur und Wirkungsmechanismus von β -Laktamasen

β -Laktamasen vermitteln Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika, indem sie die Amidbindung des viergliedrigen β -Laktam-Rings hydrolysieren. Bis auf wenige Ausnahmen besitzen Serin- β -Laktamasen (Klasse A, C und D) ein S-x-x-K-Motiv (für x besteht keine Einschränkung) im aktiven Zentrum (Ghuysen, 1991). Der Serin-Rest vollzieht einen nukleophilen Angriff auf das Carbonylkohlenstoffatom des β -Laktam-Rings und es entsteht ein Acyl-Enzym-Zwischenprodukt. Ein durch einen Glutamat-Rest aktiviertes Wassermolekül

EINLEITUNG

attackiert das Carbonylkohlenstoffatom des Acyl-Enzym-Zwischenprodukts und gibt ein Proton zurück an den Serin-Rest. Somit ist der β -Laktam-Ring gespalten und die β -Laktamase regeneriert (siehe Abb. 4) (Ghuysen, 1994).

Bei Klasse B β -Laktamasen handelt es sich um Metallo-Enzyme, die zwei Bindungsstellen für zweiwertige Kationen (Zn^{2+}) besitzen. Die Spaltung des β -Laktam-Rings erfolgt durch nukleophilen Angriff eines durch ein Zn-Ion aktiviertes Hydroxid-Ion auf die Amidbindung des β -Laktam-Rings und es entsteht ein Enzym-Substrat-Zwischenprodukt. Ein aktiviertes Wassermolekül überträgt vermutlich ein Proton auf einen Asparagin-Rest innerhalb des Enzyms, welcher anschließend das Proton auf das Stickstoffatom des gespaltenen β -Laktam-Rings überträgt. Somit werden das hydrolysierte Substrat und die regenerierte β -Laktamase freigesetzt.

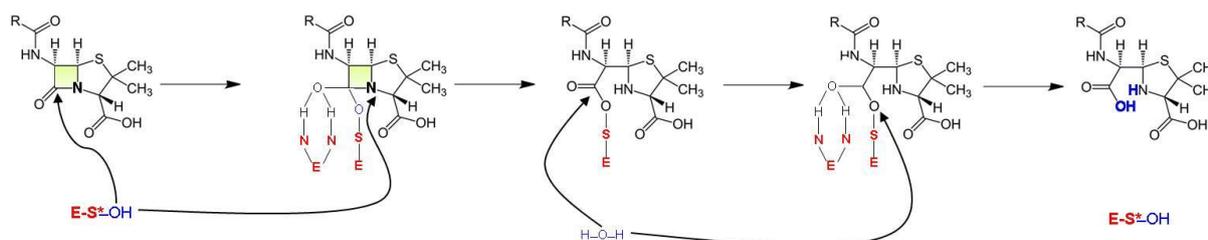


Abb. 4: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus der Spaltung des β -Laktam-Rings durch eine Serin- β -Laktamase (nach Ghuysen, 1994).
(Details zum Mechanismus siehe Text)

Die erste kristallisierte Struktur einer β -Laktamase war die der Klasse A β -Laktamase PC1 von *S. aureus* (Herzberg & Moulton, 1987). Mittlerweile sind viele weitere β -Laktamasen aus verschiedenen Organismen kristallisiert; der Hauptanteil der Kristallstrukturen machen jedoch Klasse A β -Laktamasen aus (Knox & Moews, 1991, Jelsch, *et al.*, 1993, Sauvage, *et al.*, 2006). Das aktive Zentrum von Klasse A Serin- β -Laktamasen ist zwischen einer α/β -Domäne und einer reinen α -Domäne eingebettet. Die α/β -Domäne besteht aus einem Kern aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt, der von drei α -Helices auf der einen Seite und einer α -Helix auf der anderen Seite abgedeckt ist (Abb. 5). Die Primärsequenz der einzelnen Vertreter von Klasse A β -Laktamasen kann durchaus unterschiedlich sein, die dreidimensionale Struktur ist jedoch sehr ähnlich.

Für einige β -Laktamasen ist bekannt, dass sie Disulfidbrücken ausbilden. Disulfidbrücken finden sich häufig in exportierten Proteinen, da sie zur Stabilität der Proteinkonformation beitragen (Creighton, 1986). *In vitro* bilden sich Disulfidbrücken spontan, aber sehr langsam

EINLEITUNG

aus; *in vivo* hingegen findet die Formation sehr schnell statt. In Gram-negativen Bakterien wird die Formation von Disulfidbrücken im Periplasma durch Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen katalysiert (Bardwell, *et al.*, 1991, Maskos, *et al.*, 2003). Bisher wurde die Ausbildung von Disulfidbrücken für die β -Laktamasen der TEM- und SHV-Familie (BJM-Gruppen 2b und 2be) sowie für Carbapenemasen der BJM-Gruppe 2f beschrieben (Jelsch, *et al.*, 1992, Raquet, *et al.*, 1997, Kuzin, *et al.*, 1999, Sougakoff, *et al.*, 2002). Disulfidbrücken sind für die katalytische Aktivität der β -Laktamasen nicht essentiell, jedoch erhöhen sie deren thermische Stabilität (Schultz, *et al.*, 1987, Vanhove, *et al.*, 1997).



Abb. 5: Dreidimensionale Struktur der Klasse A β -Laktamase MFO von *Mycobacterium fortuitum* (Sauvage, *et al.*, 2006)

Der katalytische Serin-Rest (S) im aktiven Zentrum ist als schwarzer Kreis dargestellt.

Klasse A, C und D β -Laktamasen zeigen große strukturelle Ähnlichkeiten mit PBPs, den Zielstrukturen der β -Laktam-Antibiotika. Die β -Laktamasen und PBPs entwickelten sich vermutlich unabhängig voneinander aus einem gemeinsamen Vorläuferenzym (Ghuysen, 1994, Knox, *et al.*, 1996).

1.3.2.3 Mechanismus der Induktion von AmpC β -Laktamasen

Bei chromosomal kodierten AmpC β -Laktamasen der BJM-Gruppe 1 unterscheidet man zwischen konstitutiv exprimierten und induzierbaren β -Laktamasen. Erstere werden in geringer Menge unter verschiedenen Wachstumsbedingungen exprimiert, während letztere

EINLEITUNG

nur in Anwesenheit eines Induktors (bestimmte β -Laktam-Antibiotika wie Imipenem oder Cefoxitin) induziert werden. Die Produktion von konstitutiv exprimierten AmpC β -Laktamasen wurde unter anderen in *E. coli* und *Shigella* spp nachgewiesen (Jaurin, *et al.*, 1981, Olsson, *et al.*, 1983), induzierbare AmpC β -Laktamasen in *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Yersinia enterocolitica* (Cornelis & Abraham, 1975, Knott-Hunziker, *et al.*, 1982, Korfmann & Wiedemann, 1988).

AmpC β -Laktamasen werden als Gruppe 1 der BJM-Gruppierung und Klasse C der Ambler-Gruppierung klassifiziert. Bei AmpC-Enzymen handelt es sich um Cephalosporinasen, die in der Lage sind, die meisten Cephalosporine der 3. Generation (1.3.2.1) zu hydrolysieren. Nicht gespalten werden hingegen Carbapeneme. Zudem sind diese Enzyme unempfindlich gegenüber β -Laktamase Inhibitoren. AmpC β -Laktamasen sind in der Regel relativ große Proteine (30-42 kDa) mit einem basischem pI (Richmond & Sykes, 1973, Saunders, *et al.*, 1986).

Induzierbare AmpC β -Laktamasen werden in Abwesenheit eines Induktors reprimiert, in Anwesenheit des Induktors jedoch stark exprimiert. Die Expression der *ampC*-Gene muss also einem Regulationsmechanismus unterworfen sein. Im Folgenden soll dieser Mechanismus am Beispiel der AmpC β -Laktamase des Gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* erläutert werden (Moya, *et al.*, 2009):

In Abwesenheit eines Induktors werden während des normalen bakteriellen Wachstums Peptidoglykanabbauprodukte (N-Acetylglucosaminyl-1,6-Dehydro-N-Acetylmuramyl Tri- und Tetrapeptide kurz MurNAc Tri- und Tetrapeptide) durch die Aktivität von PBPs und anderer Enzyme im Periplasma gebildet. Diese Produkte werden über die Permease AmpG ins Cytoplasma transportiert und dort von der β -N-Acetylglucosamidase NagZ in Dehydro-Monosaccharid-Peptide gespalten. Die N-Acetyl-Dehydromuramyl-L-Alanin-Amidase AmpD spaltet daraufhin das Tri- bzw. Tetrapeptid vom Saccharidrest ab. Die so gebildeten Peptide werden in den Peptidoglykan-Biosyntheseweg eingeschleust, um UDP-MurNAc-Pentapeptide zu bilden, die ins Periplasma exportiert werden und in die Peptidoglykanschicht eingebaut werden. Somit ist der Recycling-Prozess abgeschlossen. Unter normalen Bedingungen, also in Abwesenheit eines Induktors, bindet das UDP-MurNAc-Pentapeptid im Cytoplasma an den *ampC*-Transkriptionsregulator AmpR, der folglich als Repressor wirkt und die Expression des *ampC*-Gens unterbindet.

Bei Wachstum des Bakteriums in Anwesenheit eines Induktors dringt dieser in den periplasmatischen Raum ein und bindet an PBPs (Zielstrukturen der β -Laktam-Antibiotika). Der genaue Prozess der Induktion ist noch ungeklärt, aber es wird vermutet, dass die Bindung der PBPs durch den Induktor zu einer Störung des Gleichgewichts im Recycling-

EINLEITUNG

Prozess der Peptidoglykansynthese führt. Durch Hemmung der PBPs verlangsamt sich die Peptidoglykansynthese wohingegen die Aktivität der Autolysine nicht beeinflusst wird. Somit akkumulieren Peptidoglykanabbauprodukte (MurNAc Tri- und Tetrapeptide) im Periplasma. Nach Transport der Abbauprodukte ins Cytoplasma wird AmpD vermutlich durch die erhöhte Produktion ihres Substrats abgesättigt und es entstehen nicht genügend Peptide, die zur Biosynthese der UDP-MurNAc-Pentapeptide benötigt werden. Die angereicherten MurNAc Tri- und Tetrapeptide verdrängen wahrscheinlich die UDP-MurNAc-Pentapeptide von AmpR und wandeln diesen in einen Aktivator der *ampC*-Transkription um.

Die Induktion der AmpC β -Laktamase Produktion beruht also im Wesentlichen in der Aktivierung von AmpR, der seine Aktivität von einem negativen zu einem positiven Regulator der *ampC*-Transkription ändert.

Cefoxitin und Imipenem sind β -Laktam-Antibiotika, die als AmpC-Induktoren wirken. Allerdings kann nur Cefoxitin von der β -Laktamase hydrolysiert werden. Andere Penicilline oder Cephalosporine induzieren die AmpC-Produktion nicht, obwohl sie von AmpC sehr effektiv gespalten werden. Wichtig zu erwähnen ist, dass die Mutationsrate, die zur konstitutiven Expression der induzierbaren β -Laktamase AmpC (AmpC dereprimierte Mutanten) führt, hoch ist (Korfmann & Wiedemann, 1988). Punktmutationen in AmpD oder AmpR führen zur Expression von AmpC in Abwesenheit eines Induktors (Kopp, *et al.*, 1993, Ehrhardt, *et al.*, 1996, Bagge, *et al.*, 2002). Diese Tatsache stellt ein wichtiges Problem in der Antibiotikatherapie von Infektionen dar.

EINLEITUNG

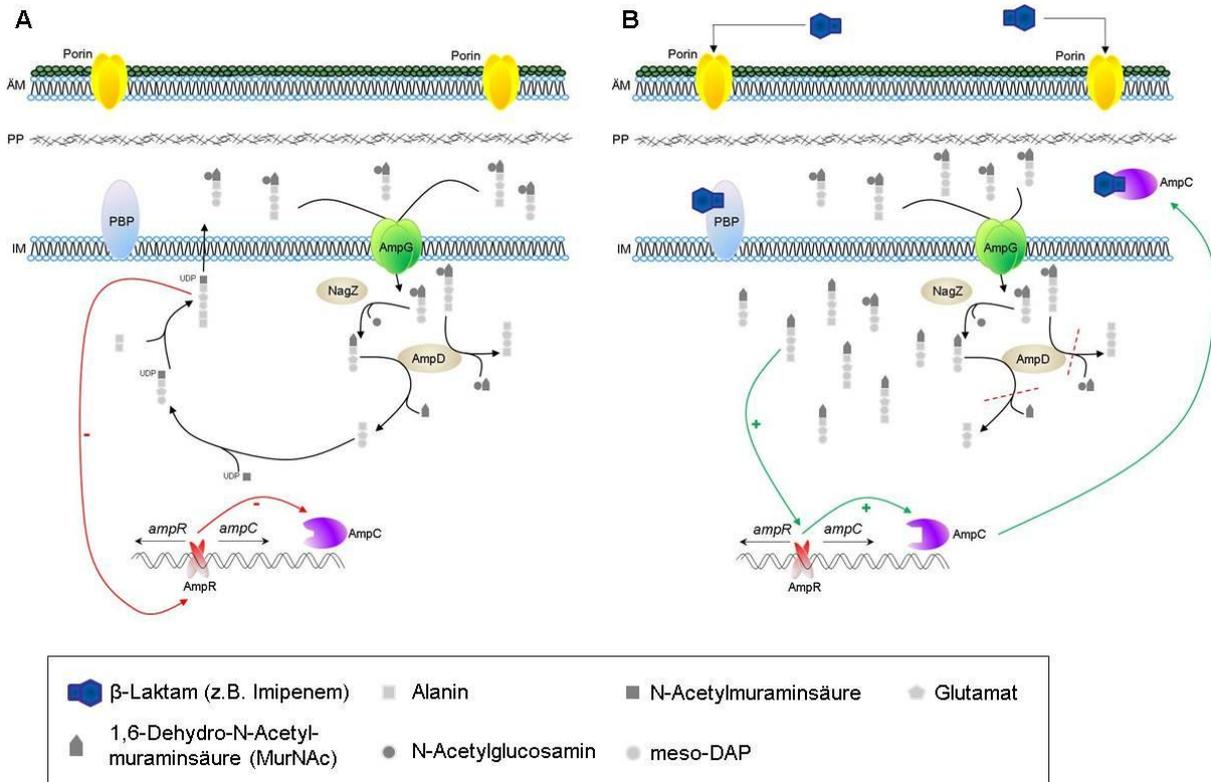


Abb. 6: Schematische Darstellung des Mechanismus der Induktion von AmpC β-Laktamasen (nach Moya, et al., 2009)

A: In Abwesenheit eines Induktors werden Peptidoglykanabbauprodukte (MurNAc- Tri- und Tetrapeptide), die durch die Aktivität von PBP's und Autolysinen im Periplasma gebildet werden, über die Permease AmpG ins Cytoplasma transportiert. NagZ und AmpD spalten die Abbauprodukte in Peptide, die anschließend in den Peptidoglykan-Biosyntheseweg eingeschleust werden. Die gebildeten UDP-MurNAc-Pentapeptide werden ins Periplasma exportiert und interagieren im Cytoplasma mit dem ampC-Transkriptionsregulator AmpR. AmpR wirkt als Repressor auf die ampC-Transkription. **B:** In Anwesenheit eines Induktors (z.B. Imipenem) bindet dieser an PBP's und hemmt deren Aktivität. Peptidoglykanabbauprodukte (MurNAc-Tri- und Tetrapeptide) akkumulieren im Periplasma und nach Transport über AmpG im Cytoplasma. AmpD wird abgesättigt und es entstehen nicht genügend Peptide für den Recycling-Prozess. Die angereicherten MurNAc-Tri- und Tetrapeptide interagieren vermutlich mit AmpR und wandeln diesen in einen Aktivator der ampC-Transkription um. Somit wird die β-Laktamase AmpC exprimiert und ins Periplasma exportiert. ÄM=Äußere Membran; IM=Innere Membran; P=Peptidoglycan.

1.3.3 β-Laktamasen in Yersinien

Von den drei humanpathogenen *Yersinia* Arten produzieren weder *Y. pestis* noch *Y. pseudotuberculosis* β-Laktamasen. Dahingegen sind die meisten *Y. enterocolitica* Stämme aufgrund der Produktion von ein oder zwei chromosomal kodierten β-Laktamasen *in vitro* resistent gegenüber einigen β-Laktam-Antibiotika. *Y. enterocolitica* Spezies sind sehr heterogen und werden in sechs Biotypen und mehr als 50 Serotypen unterteilt. Die Biotypen

EINLEITUNG

(1A, 1B, 2, 3, 4 und 5) unterscheiden sich in ihrer geographischen Verteilung, ihrer ökologischen Nische und in ihrer Pathogenität (Wauters, *et al.*, 1987) (siehe auch Kapitel 1.1.1). Unabhängig von der Zugehörigkeit zu Biotypen und Serotypen sind *Y. enterocolitica* *in vitro* sensitiv gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation und Carbapenemen. Die unterschiedliche Empfindlichkeit von *Y. enterocolitica* gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen der 1. und 2. Generation und Monobactamen hängt dagegen vom Biotyp und Serotyp ab.

Cornelis & Abraham beschrieben 1975 zwei chromosomal kodierte β -Laktamasen in klinischen Isolaten von *Y. enterocolitica*. Diese β -Laktamasen nannten sie BlaA und BlaB. Bei BlaA handelt es sich um eine konstitutiv exprimierte Klasse A β -Laktamase, die durch Clavulansäure gehemmt wird, durch Aztreonam jedoch nicht inaktiviert wird. BlaB ist eine induzierbare Klasse C β -Laktamase, die eng verwandt mit AmpC β -Laktamasen anderer Enterobacteriaceae ist. BlaB wird nicht durch Clavulansäure gehemmt, jedoch findet eine Hydrolyse durch Aztreonam statt (Cornelis & Abraham, 1975, Stock, *et al.*, 2000). Die Nomenklatur BlaB kann missverständlich sein, da es sich nicht um ein Klasse B Enzym handelt. In einigen Publikationen wird daher BlaB als AmpC β -Laktamase bezeichnet. Im Folgenden werden die *Yersinia* β -Laktamasen als AmpC und BlaA betitelt.

In mehreren Studien wurde der Zusammenhang zwischen den verschiedenen serologischen Gruppen und Biotypen von *Y. enterocolitica* und der Produktion von β -Laktamasen untersucht. Die Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber β -Laktam-Antibiotika verschiedener Biotypen wurden auf eine unterschiedliche Expression der β -Laktamase Gene zurückgeführt (Pham, *et al.*, 1991, Stock, *et al.*, 1999, Stock, *et al.*, 2000). Innerhalb der Stämme eines Biotyps bzw. Subtyps innerhalb eines Biotyps herrscht dabei jeweils ein bestimmtes β -Laktam-Antibiotika-Empfindlichkeitsmuster vor: Stämme des Biotyps 1A produzieren BlaA und AmpC-ähnliche (der isoelektrische Punkt des AmpC Enzyms aus Stämmen des Biotyps 1A ist etwas alkalischer als AmpC aus anderen Biotypen) Enzyme. Stämme des Biotyps 1B produzieren ebenfalls BlaA und AmpC. Die meisten Stämme des Biotyps 3 produzieren nur die Klasse C β -Laktamase AmpC, wobei interessanterweise in einigen Stämmen diese nicht mit Imipenem induzierbar ist. Die Expressionsprofile von BlaA und AmpC in Stämmen des Biotyps 4 sind abhängig von der geographischen Herkunft der Stämme. Biotyp 4 Isolate aus Europa, Asien, Brasilien und Südafrika produzieren BlaA und AmpC, wohingegen Isolate aus Australien und Neuseeland nur BlaA produzieren. Stämme der Biotypen 2 und 5 exprimieren die β -Laktamasen sehr unterschiedlich und die Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmungen stimmen nicht immer mit dem Expressionsprofil der β -Laktamase Gene überein.

EINLEITUNG

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass vermutlich alle *Y. enterocolitica* Stämme unabhängig von ihrem Biotyp Gene für beide β -Laktamasen BlaA und AmpC bzw. BlaA- und AmpC-homologe Enzyme besitzen, die Expression und Regulation dieser Gene jedoch vom Biotyp und von den Eigenschaften des einzelnen Stammes abhängt (de la Prieta, *et al.*, 1995).

Stämme des Biotyps 1B (Serotyp O:8; O:4,32; O:13a; O:13b; O:18; O:20; O:21) werden vor allem in den USA und Kanada, seltener in Japan und Europa, als Ursache der humanen Yersiniose isoliert. Serotyp O:8, Biotyp 1B ist dabei der mausvirulenteste Typ von *Y. enterocolitica* (Hayashidani, *et al.*, 1995). Stock, *et al.* (2000) und Pham, *et al.* (1992) beschrieben in ihren Arbeiten die Expression beider β -Laktamase Gene *blaA* und *ampC* in Serotyp O:8, Biotyp 1B Stämmen. Bottone *et al.* (1997) hingegen vermuteten die Anwesenheit anderer β -Laktamasen als BlaA und AmpC.

Bei denen in dieser Arbeit verwendeten Stämme WA-314 und 8081 handelt es sich um Serotyp O:8, Biotyp 1B Stämme, wobei es sich beim Stamm 8081 um einen sequenzierten Stamm handelt. (GenBank: AM286415) (Thomson, *et al.*, 2006). Bent & Young (2010) konnten zeigen, dass der Stamm 8081 beide β -Laktamase Gene *blaA* und *ampC* besitzt, wobei BlaA konstitutiv exprimiert wird und AmpC induziert werden kann. Zum Stamm WA-314 liegen bisher keine Daten zur β -Laktam-Antibiotika-Empfindlichkeit und zur Expression der β -Laktamase Gene vor.

1.3.4 Transport von β -Laktamasen ins Periplasma

β -Laktamasen sind in Gram-negativen Bakterien im Periplasma lokalisiert (Nichols, 1987); in Gram-positiven Bakterien werden die β -Laktamasen entweder in den extrazellulären Raum sekretiert oder sind an die cytoplasmatische Membran gebunden (Yamamoto & Lampen, 1976, Nielsen & Lampen, 1982, Jaurin, *et al.*, 1988).

Angriffspunkte der β -Laktam-Antibiotika sind PBPs (siehe 1.3.1.2), die, im Falle von Gram-negativen Bakterien, in der cytoplasmatischen Membran integriert sind und in den periplasmatischen Raum ragen. Um den β -Laktam-Ring der Antibiotika spalten zu können, müssen die β -Laktamasen also über die Cytoplasmamembran ins Periplasma transportiert werden. Dabei stehen zwei Hauptwege zur Verfügung: Der Sec- und der Tat-Weg (siehe 1.2). Der Großteil der β -Laktamasen wird über den Sec-Weg ins Periplasma transportiert (Pradel, *et al.*, 2008). Ausnahmen bilden die β -Laktamasen BlaC und BlaS von *Mycobacterium tuberculosis* und *M. smegmatis* (McDonough, *et al.*, 2005) sowie L2 von

EINLEITUNG

Stenotrophomonas maltophilia (Pradel, *et al.*, 2008) die über den Tat-Weg transportiert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass der reife Teil der TEM-1 β -Laktamase aus *E. coli*, wenn er an eine entsprechende Signalsequenz fusioniert wird, sowohl mit dem Tat- als auch mit dem Sec-System kompatibel ist.

Bei Gram-positiven Bakterien ist bisher nur ein Sec-abhängiger Transport von β -Laktamasen bekannt.

1.4 Zielsetzung

Von den humanpathogenen *Yersinia* Arten besitzen weder *Y. pseudotuberculosis* noch *Y. pestis* β -Laktamase-Gene. Dagegen sind bei *Y. enterocolitica* zwei chromosomal-kodierte β -Laktamase Gene beschrieben, die je nach Biotyp und Serotyp wahrscheinlich unterschiedlich reguliert und exprimiert werden. Bei diesen β -Laktamasen handelt es sich um eine konstitutiv exprimierte Klasse A β -Laktamase (BlaA) und um eine induzierbare Cephalosporinase (BlaB bzw. AmpC) (Cornelis & Abraham, 1975, Stock, *et al.*, 2000).

Interessanterweise besteht sowohl bei *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis* als auch bei *Y. enterocolitica* eine Diskrepanz zwischen *in vivo* und *in vitro*-Empfindlichkeit gegenüber β -Laktam-Antibiotika: So sind *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis* *in vitro* empfindlich gegenüber Penicillinen mit erweitertem Wirkungsspektrum (Ampicillin, Piperacillin), sowie Cephalosporinen der 1. und 3. Generation (z.B. Cefazolin bzw. Cefotaxim) und Carbapenemen (Imipenem, Meropenem). *In vivo* im Mausmodell hingegen zeigen sich diese *Yersinia* Arten resistent gegenüber den genannten β -Laktam-Antibiotika (Lemaitre, *et al.*, 1991, Byrne, *et al.*, 1998). *Y. enterocolitica* ist *in vitro* empfindlich gegenüber Piperacillin, Cefotaxim, Imipenem bzw. Meropenem, aber weitestgehend resistent gegenüber Ampicillin und Cefazolin. *In vivo* reagiert *Y. enterocolitica* jedoch kaum empfindlich auf die genannten β -Laktam-Antibiotika (med. Doktorarbeit E. Storz).

- (1) Ziel des ersten Teils dieser Arbeit ist es, den Beitrag der β -Laktamasen des *Y. enterocolitica* Stammes WA-314, Biotyp 1B, Serotyp O:8, in Hinsicht der *in vitro*-Resistenz gegenüber verschiedenen β -Laktam-Antibiotika zu untersuchen. Dafür sollten zunächst β -Laktamase-Deletionsmutanten hergestellt und charakterisiert werden. Analysen der *blaA*-Nukleotidsequenz bzw. abgeleitete Aminosäuresequenzen ergaben, dass sich in der Signalsequenz ein „Twin-Arginin“-Motiv befindet. Dies deutet auf einen Tat-abhängigen Transport von BlaA ins

EINLEITUNG

Periplasma hin. Daher sollte weiterhin der Translokationsmechanismus (Sec- oder Tat-abhängig) beider β -Laktamasen analysiert werden. Die Charakterisierung der β -Laktamasen hinsichtlich ihrer Antibiotika-Empfindlichkeitsprofile, ihrer Transporteigenschaften und ihrer biochemischen Eigenschaften (inklusive Temperaturabhängigkeit der Aktivität) sollte die Grundlage für nachfolgende *in vivo*-Analysen im Mausinfektionsmodell bilden.

- (2) Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit den Transporteigenschaften von β -Laktamasen mit unterschiedlichen „Schmelztemperaturen“ mittels des Typ III-Sekretionssystems. Für das Yop-Effektorprotein YopE, das über das T3SS ins Cytosol der Wirtszelle transloziert wird, konnte gezeigt werden, dass sein spezifisches Chaperon SycE als Dimer an den N-Terminus von YopE bindet. Vermutlich bildet dieses Heterotrimer ein dreidimensionales Sekretionssignal, das den Chaperon-Substrat-Komplex sekretierbar bzw. zugänglich zum T3SS macht (Rodgers, *et al.*, 2008). Weitere Analysen ergaben, dass der YopE-(SycE)₂-Komplex katalytisch aktiv ist und somit vermutlich im Cytosol funktional gefaltet vorliegt (Birtalan, *et al.*, 2002, Wilharm, *et al.*, 2004, Rodgers, *et al.*, 2008). Da der innere Durchmesser der Sekretionsnadel ungefähr 2-3 nm beträgt (Hoiczky & Blobel, 2001), müssen die Substrate vor dem Transport entfaltet werden. Für die T3SS ATPase InvC von *Salmonella* konnte gezeigt werden, dass diese das Chaperon vom Substrat ablöst und das Substrat entfaltet (Akeda & Galan, 2005); beide Schritte erfolgen ATP-abhängig. Daher ist anzunehmen, dass auch die T3SS ATPase YscN von *Yersinia* an einem Entfaltungsprozess der Substrate beteiligt ist. Bisher ist aber noch unklar, welche spezifischen Eigenschaften die Substrate haben müssen, um von der ATPase entfaltet werden zu können. Mit den unterschiedlich thermostabilen β -Laktamasen der TEM-1-Gruppe sowie *Yersinia* BlaA besteht die Möglichkeit die T3SS-Sekretierbarkeit der Substrate in Abhängigkeit der jeweiligen „Schmelztemperatur“ zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten verschiedene N-terminale YopE- β -Laktamase Fusionsproteine als Reporter hergestellt werden. β -Laktamasen vom TEM-1 Typ mit hinsichtlich unterschiedlichen Thermostabilitäten wurden von Kather, *et al.* (2008) zur Verfügung gestellt. Diese hitzestabilen TEM-1-Varianten eignen sich als Reporterproteine, um die Abhängigkeit der Ysc-T3SS-vermittelten Entfaltung/Sekretion/Translokation von der Thermostabilität zu untersuchen. Außerdem sollten β -Laktamasen als Reporter eingesetzt werden, die im nativen Zustand über das Sec- bzw. Tat-System transportiert werden (*Yersinia* AmpC bzw.

EINLEITUNG

BlaA). Die Charakterisierung dieser Reporterkonstrukte sollte Aufschluss über die Transportfähigkeit von unterschiedlich thermisch stabilen β -Laktamasen über das Ysc-T3SS liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 3: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Analysewaage	R160P, Pt 1200	Sartorius (Göttingen)
Brutschrank	INP-500	Memmert (Schwabach)
	Typ B20	Heraeus (Hanau)
Elektrophoreskammern für PAGE	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (München)
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	Bio-Rad (München)
Epifluoreszenzmikroskop	LEITZ DMDR	Leica Microsystems (Wetzlar)
Durchflusszytometer	FACSCanto II	BD (Heidelberg)
Filmentwickler	Fujifilm FPM-100A	Fuji (Düsseldorf)
Gel-Dokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad (München)
Heizblock	Typ 50126101	Liebisch (Bielefeld)
Inverses Mikroskop	Leica DM IRB	Leica Microsystems (Wetzlar)
Konfokales Mikroskop	Leica SP5	Leica Microsystems (Wetzlar)
Kühlzentrifuge	3K30, 1K15, 112	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Mixer	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Cycler	Unocycler	VWR (Darmstadt)
pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments (Kehl)
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham (Freiburg) Biosciences
Semi-Dry Blot-Apparatur	Trans-Blot SD	Bio-Rad (München)
Ultraschall-Applikator	Sonifier 250	Branson (Danbury)

Neben den in Tab. 3 aufgelisteten Geräten, wurden Laborstandardgeräte eingesetzt.

MATERIAL UND METHODEN

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Tab. 4: Bezugsquellen für Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalien/Biochemikalien	Firma
1 kb Plus DNA Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
A22 (S-(3,4-dichlorbenzyl)-isothiourea)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	Serva (Heidelberg)
Agarose	Genaxxon (Biberach)
Agar	BD Bioscience (Heidelberg)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Arabinose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Blutagarplatten	Oxoid (Wesel)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
BSA	Biomol Feinchemikalien (Hamburg)
BugBuster	Novagen (Darmstadt)
Carbenicillin	Roth (Karlsruhe)
CCF4-AM	Invitrogen (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck (Darmstadt)
DAPI-Mounting Medium Vectashield	Linaris (Wertheim)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
ECL Western Blotting Reagenz	GE Healthcare (Freiburg)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
EGTA	Roth (Karlsruhe)
ETest	Biomérieux (Nürtingen)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FCS	Invitrogen (Karlsruhe)
Fluoprep	Biomérieux (Nürtingen)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	MP Biomedicals (Eschwege)
Hefeextrakt	MP Biomedicals (Eschwege)
Immobilon Western HRP Substrat	Millipore (Schwalbach)

MATERIAL UND METHODEN

Fortsetzung Tab. 4

Chemikalien/Biochemikalien	Firma
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Lysozym	Biomol Feinchemikalien (Hamburg)
Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Merck (Darmstadt)
M.I.C.Evaluator	Oxoid (Wesel)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Mueller-Hinton Agar	Oxoid (Wesel)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Nitrocefin	Oxoid (Wesel)
PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	New England Biolabs (Frankfurt)
Probenecid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Red-Taq DNA-Polymerase 2X Master Mix	VWR (Ismaning)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot)
RPMI	Invitrogen (Karlsruhe)
SDS	Serva (Heidelberg)
Spectinomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt)
TEMED	Biomol Feinchemikalien (Hamburg)
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt)

MATERIAL UND METHODEN

2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.2.1 Bakterienstämme

Tab. 5: Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Relevanter Phäno- bzw. Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i>	Studier & Moffatt, 1986
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)	Stratagene, La Jolla

Tab. 6: Verwendete *Yersinia* Stämme

Stamm	Relevanter Phäno- bzw. Genotyp	Referenz
WA-314	Klinisches Isolat des Serotyps O:8, Biogruppe 1B mit Virulenzplasmid pYVO8, Nal ^r	Heesemann, <i>et al.</i> , 1984
WA-C	Plasmidloses Derivat von WA-314, Nal ^r	Heesemann, <i>et al.</i> , 1984
WA ^{RS}	Deletionsmutante im PstI-ähnlichen YenI Restriktions- und Modifikationssystem (R-S) von WA-C, Nal ^r	Antonenko, <i>et al.</i> , 2003
WA ^{RS} Δ <i>ampC</i>	<i>ampC</i> Deletionsmutante in WA ^{RS} , Nal ^r , Km ^r	diese Arbeit
WA ^{RS} Δ <i>blaA</i>	<i>blaA</i> Deletionsmutante in WA ^{RS} , Nal ^r , Cm ^r	diese Arbeit
WA ^{RS} $\Delta\Delta$	<i>ampC</i> und <i>blaA</i> Doppel-Deletionsmutante in WA ^{RS} , Nal ^r , Cm ^r	diese Arbeit
WA ^{RS} Δ <i>tatC</i>	<i>tatC</i> Deletionsmutante in WA ^{RS} , Nal ^r , Sp ^r	diese Arbeit

MATERIAL UND METHODEN

2.2.2 Plasmide

Tab. 7: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pYVO8	Virulenzplasmid von WA-314	Heesemann, <i>et al.</i> , 1983
pYVO8-515	pYVO8, Tn5-Insertion in <i>lcrD</i> -Gen, Km ^r	Ruckdeschel, <i>et al.</i> , 1996
pYVΔ <i>yopD</i>	pYVO8, <i>yopD</i> ⁻ , Km ^r	Hoicyk & Blobel, 2001
pYVO8::Km ^r	pYV Plasmid enthält Km ^r -Kassette in nicht-kodierender Region	Oellerich, <i>et al.</i> , 2007
pACYC177	Klonierungsvektor, Km ^r , Amp ^r	Chang & Cohen, 1978
pACYC184	Klonierungsvektor, Cm ^r , Tet ^r	Chang & Cohen, 1978
pGEM-T	Klonierungsvektor, <i>lacZ</i> , T7-Promotor, SP6-Promotor, T-Überhang, Amp ^r	Promega, Mannheim
pMBL-T/A	Klonierungsvektor, f1 ori, P _{lac} , T-Überhang, Amp ^r	Genaxxon, Biberach
pMOSBlue	Klonierungsvektor, <i>lacZ</i> , f1 ori, „blunt-end“-Enden, Amp ^r	Amersham Biosciences, Freiburg
pCDF-Duet-1	Expressionsvektor, T7-Promotor, zwei „multiple cloning sites“ (MCS), N-terminaler His ₆ -„Tag“ an der ersten mcs, C-terminaler S-„Tag“ an der zweiten mcs, Sp ^r , Sm ^r	Novagen, Darmstadt
pWS	Expressionsvektor, Derivat von pMS470Δ8; über die Schnittstellen <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> wurde ein Linker eingefügt, der durch Hybridisierung der Oligonukleotide pWS-Linker-5'-P und pWS-Linkerkompl-5'-P entstanden ist, <i>oriV</i> , <i>lacI</i> ^q -Repressor, P _{tac} , <i>rrnB</i> -Terminator, Amp ^r	Locher, <i>et al.</i> , 2005
pKD46	<i>repA</i> 101-ts, <i>araC</i> -P _{arab} , λ Red-Rekombinase-Expressionsplasmid (exo, β, γ)	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	<i>repA</i> 101-ts, FLP (<i>flp</i>), Expressionsplasmid	Cherepanov & Wackernagel, 1995
pJAMA22	Plasmid mit eGFP ORF	Jaspers, <i>et al.</i> , 2001
pBR322	Klonierungsvektor, Tet ^r , Amp ^r	Sutcliffe, 1978

MATERIAL UND METHODEN

Tab. 8: Rekombinante Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pampC	pACYC184 mit <i>ampC</i> von WA-314 (157 bp vor <i>ampC</i> und 126 bp nach <i>ampC</i>) über <i>PvuII</i>	diese Arbeit
pblaA	pACYC184 mit <i>blaA</i> von WA-314 (156 bp vor <i>blaA</i> und 52 bp nach <i>blaA</i>) über <i>PvuII</i>	diese Arbeit
pWS-GFP	pWS mit <i>gfp</i> bp 1-714 (AS 1-238)	diese Arbeit
pWS-torA ₁₋₅₀ -GFP	pWS mit Fusion <i>torA</i> bp 1-150 (AS 1-50) und <i>gfp</i> bp 1-714 (AS 1-238) über <i>HindIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sall</i>	diese Arbeit
pWS-ampC ₁₋₃₂ -GFP	pWS mit Fusion <i>ampC</i> bp 1-96 (AS 1-32) und <i>gfp</i> bp 1-714 (AS 1-238) über <i>HindIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sall</i>	diese Arbeit
pWS-blaA ₁₋₄₀ -GFP	pWS mit Fusion <i>blaA</i> bp 1-120 (AS 1-40) und <i>gfp</i> bp 1-714 (AS 1-238) über <i>HindIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sall</i>	diese Arbeit
pWS-blaA ₁₋₄₀ ^{QQ} -GFP	pWS mit Fusion <i>blaA</i> bp 1-120 (AS 1-40; Substitution Arg, Arg zu Gln, Gln an Position 7, 8) und <i>gfp</i> bp 1-714 (AS 1-238) über <i>HindIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sall</i>	diese Arbeit
pWS-ampC ₁₋₃₂ -blaA _{Δ1-32} -His	pWS mit Fusion <i>ampC</i> bp 1-96 (AS 1-32) und <i>blaA</i> bp 97-882 (AS 33-294) und C-terminalen His ₆ -„tag“ über <i>HindIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sall</i>	diese Arbeit
pWS-meoA ₁₋₂₆ -blaA _{Δ1-32} -His	pWS mit Fusion <i>meoA</i> bp 1-78 (AS 1-26) und <i>blaA</i> bp 97-882 (AS 33-294) und C-terminalen His ₆ -„tag“ über <i>HindIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sall</i>	diese Arbeit
pWS-blaA-His	pWS mit <i>blaA</i> bp 1-882 (AS 1-294) und C-terminalen His ₆ -„tag“ über <i>HindIII</i> und <i>Sall</i>	diese Arbeit
pWS-blaA-Strep	pWS mit <i>blaA</i> bp 1-882 (AS 1-294) und C-terminalen Strep-„tag“ über <i>HindIII</i> und <i>Sall</i>	diese Arbeit
pWS-dmsD-Strep	pWS mit <i>dmsD</i> bp 1-612 (AS 1-204) und C-terminalen Strep-„tag“ über <i>HindIII</i> und <i>Sall</i>	diese Arbeit
pWS-torA-Strep	pWS mit <i>torA</i> bp 1-2544 (AS 1-848) und C-terminalen Strep-„tag“ über <i>HindIII</i> und <i>Sall</i>	diese Arbeit

MATERIAL UND METHODEN

Fortsetzung Tab. 8

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pJ-E ₅₃ -ampC-Strep	pACYC184 (Tet ^r) mit Fusion <i>sycE-yopE</i> (656 bp vor <i>yopE</i> und die ersten 159 bp von <i>yopE</i> (AS 1-53 von YopE) und <i>ampC</i> bp 79-1164 (AS 27-388) und C-terminalen Strep-„tag“ über <i>PvuII</i> , <i>BamHI</i> , <i>PvuII</i>	diese Arbeit
pJ-E ₅₃ -blaA-Strep	pACYC184 (Tet ^r) mit Fusion <i>sycE-yopE</i> (656 bp vor <i>yopE</i> und die ersten 159 bp von <i>yopE</i> (AS 1-53 von YopE) und <i>blaA</i> bp 97-882 (AS 33-294) und C-terminalen Strep-„tag“ über <i>PvuII</i> , <i>BamHI</i> , <i>PvuII</i>	diese Arbeit
pTAC11-tem-1 RLT	pTAC11 (Amp ^r) mit <i>tem-1</i> (RLT Variante) bp 1-858 (AS 1-286) über <i>XbaI</i> , <i>StuI</i>	Kather, <i>et al.</i> , 2008
pTAC11-tem-1 MEGA	pTAC11 (Amp ^r) mit <i>tem-1</i> (MEGA Variante) bp 1-858 (AS 1-286) über <i>XbaI</i> , <i>StuI</i>	Kather, <i>et al.</i> , 2008
pJ-E ₅₃ -tem-1	pACYC184 (Tet ^r) mit Fusion <i>sycE-yopE</i> (656 bp vor <i>yopE</i> und die ersten 159 bp von <i>yopE</i> (AS 1-53 von YopE) und <i>tem-1</i> bp 70-858 (AS 24-286) über <i>PvuII</i> , <i>BamHI</i> , <i>PvuII</i>	diese Arbeit
pJ-E ₅₃ -RLT	pACYC184 (Tet ^r) mit Fusion <i>sycE-yopE</i> (656 bp vor <i>yopE</i> und die ersten 159 bp von <i>yopE</i> (AS 1-53 von YopE) und <i>tem-1</i> (RLT Variante) bp 70-858 (AS 24-286) über <i>PvuII</i> , <i>BamHI</i> , <i>PvuII</i>	diese Arbeit
pJ-E ₅₃ -MEGA	pACYC184 (Tet ^r) mit Fusion <i>sycE-yopE</i> (656 bp vor <i>yopE</i> und die ersten 159 bp von <i>yopE</i> (AS 1-53 von YopE) und <i>tem-1</i> (MEGA Variante) bp 70-858 (AS 24-286) über <i>PvuII</i> , <i>BamHI</i> , <i>PvuII</i>	diese Arbeit
pJ-E ₁₃₈ -ampC-Strep	pACYC184 (Tet ^r) mit Fusion <i>sycE-yopE</i> (656 bp vor <i>yopE</i> und die ersten 414 bp von <i>yopE</i> (AS 1-138 von YopE) und <i>ampC</i> bp 79-1167 (AS 27-388) und C-terminalen Strep-„tag“ über <i>PvuII</i> , <i>BamHI</i> , <i>PvuII</i>	diese Arbeit
pJ-E ₁₃₈ -blaA-Strep	pACYC184 (Tet ^r) mit Fusion <i>sycE-yopE</i> (656 bp vor <i>yopE</i> und die ersten 414 bp von <i>yopE</i> (AS 1-138 von YopE) und <i>blaA</i> bp 97-882 (AS 33-294) und C-terminalen Strep-„tag“ über <i>PvuII</i> , <i>BamHI</i> , <i>PvuII</i>	diese Arbeit

MATERIAL UND METHODEN

Fortsetzung Tab. 8

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pJ-E ₁₈ -tem-1	pACYC184 (Tet ^r) mit Fusion <i>syncE-yopE</i> (656 bp vor <i>yopE</i> und die ersten 54 bp von <i>yopE</i> (AS 1-53 von YopE) und <i>tem-1</i> bp 70-858 (AS 24-286) über <i>Pvull</i> , <i>BamHI</i> , <i>Pvull</i>)	diese Arbeit
pJ-E ₅₃ -tem-1	pACYC184 (Tet ^r) mit Fusion <i>syncE-yopE</i> (656 bp vor <i>yopE</i> und die ersten 159 bp von <i>yopE</i> (AS 1-53 von YopE) und <i>tem-1</i> bp 70-858 (AS 24-286) über <i>Pvull</i> , <i>BamHI</i> , <i>Pvull</i>)	diese Arbeit
pJ-E ₁₃₈ -tem-1	pACYC184 (Tet ^r) mit Fusion <i>syncE-yopE</i> (656 bp vor <i>yopE</i> und die ersten 414 bp von <i>yopE</i> (AS 1-53 von YopE) und <i>tem-1</i> bp 70-858 (AS 24-286) über <i>Pvull</i> , <i>BamHI</i> , <i>Pvull</i>)	diese Arbeit

2.2.3 Oligonukleotide

In Tab. 9 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer aufgelistet. Die Primer wurden von den Firmen Biomers (Ulm) und Metabion (Martinsried) im lyophilisierten, entsalzten und HPLC-gereinigten Zustand bezogen. Mutageneseprimer mit Homologiearmen wurden aufgrund der Länge von ca. 70 bp PAGE-gereinigt bezogen. Alle Oligonukleotide wurden in H₂O_{dest} gelöst und in Konzentrationen von 100 pmol/μl bei -20 °C gelagert.

Tab. 9: Verwendete Oligonukleotide.

Restriktionsschnittstellen sind in der Nukleotidsequenz unterstrichen dargestellt, Sequenzen für „tags“ sind kursiv.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
AmpC_FOR_FRT_Kan [†]	AACCATAGATTGACTTGTAGATTTTCTATT ATCAAGTGCTAAATATAATGAAGTTCCTATT CTCTAGAAAGTATAGGAACCTTCTCACTGAC ACCCTCATCAGTG	Amplifizierung der Kan ^r -Kassette und Einführung einer FRT site und eines Homologiearms zur Deletion von <i>ampC</i>
AmpC_FRT_Kan_REV [†]	TTAACTTATCTCATAGAAGCGCAGCAGAA ATGTTTAGCTATCTGTCATCGAAGTTCCTAT ACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCCGTCGAAG TCAGCGTAATGCTC	Amplifizierung der Kan ^r -Kassette und Einführung einer FRT site und eines Homologiearms zur Deletion von <i>ampC</i>
AmpC_FOR_seq	AGATTTTCCCCTTCGGTTGTG	Überprüfung der <i>ampC</i> Deletion
AmpC_REV	GTGCAAAGAAGCTGGGAAG	Überprüfung der <i>ampC</i> Deletion

MATERIAL UND METHODEN

Fortsetzung Tab. 9

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Kan_FOR_Test	GCGCAATCACGAATGAATAACGG	Überprüfung der <i>ampC</i> Deletion
BlaA_FOR_FRT_Cm [†]	AAGGCTAAATGCCACTTACCCTGCCATTTA GCCTTTTTTATTTCTGAATGAAGTTCCTAT TCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCTGACGGA AGATCACTTCGCAG	Amplifizierung der Cm ^r -Kassette und Einführung einer FRT site und eines Homolgearms zur Deletion von <i>blaA</i>
BlaA_REV_FRT_Cm [†]	GCCAAAATATCAAAAAGCATCTATAGCGGGT AACGTCACCCGCACAGGAAAGAAGTTCCT ATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCTTGAG AAGCACACGGTCACAC	Amplifizierung der Cm ^r -Kassette und Einführung einer FRT site und eines Homolgearms zur Deletion von <i>blaA</i>
BlaA_FOR_seq	CAGGTCATTTCCGACCTGTTC	Überprüfung der <i>blaA</i> Deletion
BlaA_REV	TGTCACCGAAAAACAGAGGAC	Überprüfung der <i>blaA</i> Deletion
Cm_FOR_Test	GCCTGATGAATGCTCATCCG	Überprüfung der <i>blaA</i> Deletion
TatC-Spec-FOR	CCAACCTGGCGGCGATCGGTAAACATGGC TGTTGATGATACCCAACCCCTTGGGTAAC TTGTATGTGTCC	Amplifizierung der Sp ^r -Kassette und Einführung eines Homolgearms zur Deletion von <i>tatC</i>
TatC-Spec-REV	TTAAGACTCTTTAGGATGATTATCGACTTCT TCATCCTCTTCTCAACATCTGACATTATTT GCCGACTACC	Amplifizierung der Sp ^r -Kassette und Einführung eines Homolgearms zur Deletion von <i>tatC</i>
TatC-Test-FOR	GGTTCCTGTTACGAACACAC	Überprüfung der <i>tatC</i> Deletion
TatC-Test-REV	TTGTGAGCTGGTTAAGTTACAC	Überprüfung der <i>tatC</i> Deletion
pKD46_bet_FOR	CCTTTCCTGATAAGCAGAATG	Amplifizierung von <i>bet</i> zum Nachweis von pKD46
pKD46_bet_REV	AATCCAAGAGCTTTTACTGC	Amplifizierung von <i>bet</i> zum Nachweis von pKD46
pcp20_FLP_FOR	AT GTGCTGCTGAACTAACCT	Amplifizierung von <i>flp</i> zum Nachweis von pCP20
pcp20_FLP_REV	ACGCTTGTCTTTGTCTCT	Amplifizierung von <i>flp</i> zum Nachweis von pCP20

MATERIAL UND METHODEN

Fortsetzung Tab. 9

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
AmpC-PvuII-FOR	AGCAGCTGAACGGAATATAGCTGCGAAC	Amplifizierung von <i>ampC</i> mit Promotorbereich und Einführung einer <i>PvuII</i> Schnittstelle
AmpC-PvuII-REV	AGCAGCTGGAGGTTTCGCTGAATCTCAT	Amplifizierung von <i>ampC</i> mit Terminatorbereich und Einführung einer <i>PvuII</i> Schnittstelle
BlaA-PvuII-FOR	AGCAGCTGAAACGTGTCGGCTATAAAGG	Amplifizierung von <i>blaA</i> mit Promotorbereich und Einführung einer <i>PvuII</i> Schnittstelle
BlaA-PvuII-REV	AGCAGCTGTTGCCAAAAATCAAAAGCA	Amplifizierung von <i>blaA</i> mit Terminatorbereich und Einführung einer <i>PvuII</i> Schnittstelle
SycE-PvuII-FOR	AGCAGCTGGATATTGCTGGCACCACAAAT	Amplifizierung von <i>sycE</i> mit Einführung einer <i>PvuII</i> Schnittstelle
Bla-pBR322-PvuII-REV	AGCAGCTGTTACCAATGCTTAATCAGTGG	Amplifizierung des β -Laktamase Gens <i>tem-1</i> mit Einführung einer <i>PvuII</i> Schnittstelle
eGFP_Hind_FOR	GCCAAGCTTATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTT TTC	Amplifizierung von <i>gfp</i> und Einführung einer <i>HindIII</i> Schnittstelle
Sal_eGFP_REV	AGCCCCGTCGACCTATTTGTATAGTTCATC CATGC	Amplifizierung von <i>gfp</i> und Einführung einer <i>Sall</i> Schnittstelle
Bam_eGFP_FOR	GGCGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGCT TTTC	Amplifizierung von <i>gfp</i> und Einführung einer <i>BamHI</i> Schnittstelle
TorA_1-50_Hind-pWS-FOR	GCCGAAGCTTATGAACAATAACGATCTCTT TCAGG	Amplifizierung von <i>torA</i> (AS 1-50) und Einführung einer <i>HindIII</i> Schnittstelle
TorA_1-50_Bam-pWS-REV	GCGGATCCTTTTCGAGATGACAGCGTCAGT C	Amplifizierung von <i>torA</i> (AS 1-50) und Einführung einer <i>BamHI</i> Schnittstelle
AmpC-1-32-Hind-pWS-FOR	GCCGAAGCTTATGATGAAAAAGTCTATAAT CAATACC	Amplifizierung von <i>ampC</i> (AS 1-32) und Einführung einer <i>HindIII</i> Schnittstelle
Bam_AmpC-1-32_REV	GCGGATCCCTGCTGCTGCGTAAGTTTG	Amplifizierung von <i>ampC</i> (AS 1-32) und Einführung einer <i>BamHI</i> Schnittstelle

MATERIAL UND METHODEN

Fortsetzung Tab. 9

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
BlaA-1-40-Hind-pWS-FOR	GCCGAAGCTTATGAAGCACTCTTCGCTACG	Amplifizierung von <i>blaA</i> (AS 1-40) und Einführung einer <i>HindIII</i> Schnittstelle
Bam_BlaA-1-40_REV	GCGGATCCTGCCAATTGCTTGTCTAATGAT C	Amplifizierung von <i>blaA</i> (AS 1-40) und Einführung einer <i>BamHI</i> Schnittstelle
BlaA-Subst-RR-Hind-FOR	GCCAAGCTTATGAAGCACTCTTCGCTACAG CAATCAC	Amplifizierung von <i>blaA</i> (AS 1-40) und Einführung einer Substitution Arg, Arg zu Gln, Gln an Position 7, 8 sowie einer <i>HindIII</i> Schnittstelle
MeoA-1-26-Hind-pWS-FOR	GCCAAGCTTATGAAACTTCGAGTTCTTTCC	Amplifizierung von <i>meoA</i> (AS 1-26) und Einführung einer <i>HindIII</i> Schnittstelle
Bam_MeoA-1-26_REV	GCGGATCCGTTGTAAATTTTCAGCCGC	Amplifizierung von <i>meoA</i> (AS 1-26) und Einführung einer <i>BamHI</i> Schnittstelle
BlaA-His-tag-Sal-REV	AGCCCCGTCGACTCAATGGTGATGGTGAT GGTGGGATATTTGCGACAAAATTAATTTG	Amplifizierung von <i>blaA</i> und Einführung eines C-terminalen His ₆ -„tag“ sowie einer <i>Sall</i> Schnittstelle
BlaA-Strep-tag-Sal-REV	AGCCCCGTCGACTTATTTTTCGAACTGCGG GTGGCTCCAAGCGCTGGATATTTGCGACA AAATTATTTG	Amplifizierung von <i>blaA</i> und Einführung eines C-terminalen Strep-„tag“ sowie einer <i>Sall</i> Schnittstelle
BlaA33-Bam-FOR	GCGGATCCGGATCATTAGACAAGCAATTG G	Amplifizierung von <i>blaA</i> (AS 33-294) und Einführung einer <i>BamHI</i> Schnittstelle
DmsD-Hind-pWS-FOR	GCCGAAGCTTATGACCCATTTTTACAGCA AG	Amplifizierung von <i>dmsD</i> und Einführung einer <i>HindIII</i> Schnittstelle
DmsD-Sal-Strep-pWS-REV	AGCCCCGTCGACTTATTTTTCGAACTGCGG GTGGCTCCATCGAAACAGCGGTTAACCG	Amplifizierung von <i>dmsD</i> und Einführung eines C-terminalen Strep-„tag“ sowie einer <i>Sall</i> Schnittstelle
TorA-Sal-pWS-REV	AGCCCCGTCGACTTATTTTTCGAACTGCGG GTGGCTCCAGCGCTATGATTTACCTGCG ACGCGGGAAC	Amplifizierung von <i>torA</i> und Einführung eines C-terminalen Strep-„tag“ sowie einer <i>Sall</i> Schnittstelle

MATERIAL UND METHODEN

Fortsetzung Tab. 9

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Bla-pBR322-Bam-FOR	GGCGGATCCCACCCAGAAACGCTGGTGA	Amplifizierung von <i>bla</i> auf Plasmid pBR322 ohne Signalsequenz und Einführung einer <i>BamHI</i> Schnittstelle
pACYC184_PvuII_FOR	GAAATAGGCCAGGTTTTTAC	Sequenzierung von pACYC184
pACYC184_PvuII_REV	AAGTATCTTCTGGCATCTTC	Sequenzierung von pACYC184
pWS-seq-FOR	CAGGAAACAGAATTCGAGCTCG	Sequenzierung von pWS
pWS-seq-REV	GGCTGAAAATCTTCTCTCATCC	Sequenzierung von pWS
YopE-1-53-BamHI-REV	GGCGGATCCGGAAACCCTGAGGGCTTTC	Amplifizierung von <i>yopE</i> (AS 1-53) und Einführung einer <i>BamHI</i> Schnittstelle
SycE_HindIII_FOR	GCCGAAGCTTGATATTGCTGGCACCAAA T	Amplifizierung von <i>sycE-yopE</i> und Einführung einer <i>HindIII</i> Schnittstelle
AmpC-Strep-tag-PvuII-REV	AGCAGCTGTTA TTTTTCGAACTGCGGGTGG CTCCAAGCGCTACGCAATGCTTGAAGAATA TCG	Amplifizierung von <i>ampC</i> und Einführung eines C-terminalen Strep-„tag“ sowie einer <i>PvuII</i> Schnittstelle
BlaA-Strep-tag-PvuII-REV	AGCAGCTGTTA TTTTTCGAACTGCGGGTGG CTCCAAGCGCTGGATATTTGCGACAAAATT ATTTG	Amplifizierung von <i>blaA</i> und Einführung eines C-terminalen Strep-„tag“ sowie einer <i>PvuII</i> Schnittstelle
AmpC27-Bam-FOR	GCGGATCCAAACTTACGCAGCAGCAGGTT GC	Amplifizierung von <i>ampC</i> (AS 27-388)
YopE-1-138-BamHI-REV	GGCGGATCCCGTGGCGAACTGATCATGAT TTTTC	Amplifizierung von <i>yopE</i> (AS 1-138) und Einführung einer <i>BamHI</i> Schnittstelle

† FRT-Sequenzen gleichlaufend; * FRT-Sequenzen gegenläufig

MATERIAL UND METHODEN

2.3 Nährmedien und Antibiotika

2.3.1 Nährmedien

Alle folgenden Nährmedien wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ angesetzt und für 20 min bei 121 °C und einem Überdruck von 1 bar autoklaviert.

Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	<hr/> ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$; mit NaOH pH auf 7,4 – 7,5 einstellen	
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar	
Brain-Heart-Infusion (BHI)	37 g	BHI
	<hr/> ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	
Mueller-Hinton-Agar	38 g	MHA
	<hr/> ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	
Einfriermedium	LB-Medium mit 20 % Glycerin	
SOC-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,3 g	NaCl
	0,09 g	KCl
	1,02 g	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
	1,23 g	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
	<hr/> ad 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 20 mM Glukose zugesetzt	

MATERIAL UND METHODEN

2.3.2 Antibiotika

Tab. 10: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	H ₂ O _{dest}	100 mg/ml	100 µg/ml
Carbenicillin (Cb)	H ₂ O _{dest}	250 mg/ml	250 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	70 % Ethanol	2 mg/ml	20 µg/ml
Kanamycin (Km)	H ₂ O _{dest}	5 mg/ml	50 µg/ml
Nalidixinsäure (Nal)	0,5 N NaOH	6 mg/ml	60 µg/ml
Spectinomycin (Sp)	H ₂ O _{dest}	5 mg/ml	50 µg/ml
Tetrazyklin (Tet)	70 % Ethanol	2 mg/ml	20 µg/ml

2.4 Antikörper

Tab. 11: Liste der verwendeten Antikörper und ihre eingesetzte Verdünnung bzw. Konzentration.

WB: Westernblot-Anwendung, IF: Immunfluoreszenz-Anwendung

Antikörper	Herkunft	Eingesetzte Verdünnung	Quelle/Firma
<i>Unkonjugierte Primärantikörper</i>			
anti-YopE	Kaninchen-Serum	1:5000 (WB)	Trulzsch, <i>et al.</i> , 2003
anti-β-Laktamase	Maus, monoklonal	1:1000 (WB)	Abcam (Cambridge)
anti-His	Maus, monoklonal	1:5000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
anti-Strep	Maus, monoklonal	1:5000 (WB), 1:50 (IF)	IBA BioTAGnology (Göttingen)
anti-GFP	Maus, monoklonal	1:5000 (WB)	Abcam (Cambridge)
<i>Konjugierte Sekundärantikörper</i>			
anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat	Ziege	1:10000 (WB)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat	Ziege	1:10000 (WB)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-Maus IgG Cy3 Konjugat	Ziege	1:100 (IF)	Dianova (Hamburg)
anti-Maus IgG FITC Konjugat	Ziege	1:100 (IF)	Dianova (Hamburg)

MATERIAL UND METHODEN

2.5 Proteine

Tab. 12: Verwendete Proteine

Protein	Quelle
BlaA-His ₆ -tag	diese Arbeit
TEM-1	Kather, <i>et al.</i> (2009)
TEM-1 Variante MEGA	Kather, <i>et al.</i> (2009)

2.6 Molekularbiologische Kits

Tab. 13: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin Plasmid Quick Pure	Machery-Nagel (Düren)
Plasmid DNA purification, NucleoBond PC100	
PCR clean up, NucleoSpin Extract II	
Bradford Reagent	Bio-Rad (München)

2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Kultivierung von *Escherichia coli* und *Yersinia enterocolitica*

Die Kultivierung von *E. coli* (Tab. 5) und *Yersinia* Stämmen (Tab. 6) erfolgte aerob in LB-Medium bzw. BHI-Medium in einem Schüttelinkubator (180 rpm) bei 37 °C bzw. 27 °C. Bei Bedarf wurden die Flüssig- und Festmedien mit den entsprechenden Antibiotika (Tab. 10) versehen.

2.7.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung der *E. coli* und *Yersinia* Stämme erfolgte aus flüssigen Übernachtskulturen in Einfriermedium (2.3.1) bei -80 °C.

2.7.3 Messung der optischen Dichte

Die Bestimmung der Zelldichte von Bakterien in Flüssigkultur erfolgte im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}). Als Leerwert diente das jeweilige Medium. Um eine größere Messgenauigkeit zu gewährleisten, wurden Proben ab einer $OD_{600} > 1,0$ 1:10 mit Medium verdünnt.

2.8 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.8.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von DNA

2.8.1.1 Isolierung von Plamid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit den NucleoSpin Plasmid Quick Pure und NucleoBond PC100 Kits der Firma Machery-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde nach dem empfohlenen Protokoll für Gram-negative Bakterien verfahren. Die DNA wurde in 50-100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.8.1.2 DNA Fällung

DNA wird gefällt, um sie aufzureinigen und/oder sie aufzukonzentrieren. Nach Zugabe von 180 μl EtOH und 6 μl 3 M Natriumacetat-Lösung zu 50 μl DNA-Lösung, wurde die Lösung 30 min bei -80 °C gefällt. Die DNA wurde anschließend 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und mit eiskaltem EtOH (70 % [v/v]) gewaschen. Der Alkohol wurde komplett entfernt, das Pellet für ca. 30 min bei 37 °C getrocknet und im gewünschten Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ eluiert.

MATERIAL UND METHODEN

2.8.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte bei 260 nm in einer 1:50 Verdünnung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$. Die Absorption wurde in einer Quarzküvette ($d=1$ cm) gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ bestimmt. Die Verunreinigung der DNA mit Proteinen wurde durch eine parallele Messung bei 280nm abgeschätzt. Ein Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}} > 1,8$ gilt als Kriterium für eine ausreichende Qualität der DNA.

2.8.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) können spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die zur Vervielfältigung eingesetzten Primer wurden von den Firmen Metabion (Martinsried) und Biomers (Ulm) synthetisiert und hatten einen Bindebereich von 18-25 bp an das Template. Sollten am 5'- oder 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Bereichs Restriktionsschnittstellen, „tags“ oder Homologiearme angefügt werden, so wurden diese Sequenzen zusätzlich als Überhänge am 5'-Ende des Primers integriert. Als Template diente entweder isolierte Plasmid-DNA oder Bakterienzellysat. Zur Gewinnung der DNA aus Bakterienzellysat wurden 1 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert, in 60 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ resuspendiert, gekocht (95 °C, 10 min) und anschließend abzentrifugiert. 1,5 μl des Überstandes wurden als DNA-Matrize für die PCR verwendet. Je nach Größe der zu amplifizierenden DNA-Fragmente wurden verschiedene DNA-Polymerasen eingesetzt. DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 2 kb wurden mit der Taq-Polymerase der Firma VWR (Ismaning) amplifiziert. Größere Fragmente wurden mit der Phusion High-Fidelity Polymerase der Firma New England Biolabs (Frankfurt) mit 3'-5'-Korrekturlese-Exonuklease-Aktivität („proofreading“-Aktivität) vervielfältigt. Für Klonierungen wurde grundsätzlich die Phusion High-Fidelity Polymerase verwendet. Die Reaktionsansätze und die verwendeten Programme sind in Tab. 14 und Tab. 15 dargestellt.

Tab. 14: Reaktionsansatz und -programm für den Red-Taq DNA-Polymerase 2X Master Mix, 2,0 mM MgCl_2

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
DNA	100 ng	Anfangsdenaturierung	94 °C	10 min	1
5' Primer (100 pmol/ μl)	0,5 μl	Denaturierung	94 °C	30 s	35
3' Primer (100 pmol/ μl)	0,5 μl	Annealing	x °C	30 s	
Red-Taq Master Mix	25 μl	Elongation	72 °C	30 s/kb	

MATERIAL UND METHODEN

H ₂ O _{dest} ad	50 µl	Finale Elongation	72 °C	10 min	1
-------------------------------------	-------	-------------------	-------	--------	---

MATERIAL UND METHODEN

Tab. 15: Reaktionsansatz und-programm für den Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm			Zyklen
DNA	100 ng	Anfangsdenaturierung	98 °C	10 s	1
5' Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl	Denaturierung	98 °C	1 s	30
3' Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl	Annealing	x °C	5 s	
Red-Taq Master Mix	25 µl	Elongation	72 °C	15 s/kb	
H ₂ O _{dest} ad	50 µl	Finale Elongation	72 °C	1 min	1

Die Hybridisierungstemperatur wurde unter Berücksichtigung der Schmelztemperatur T_M des Primers ausgewählt. Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgt nach folgender Formel (Suggs, *et al.*, 1981):

$$T_M [^\circ\text{C}] = 2 \times (\text{A} + \text{T}) + 4 \times (\text{G} + \text{C}) \quad (\text{A, G, C, T: Anzahl der entsprechenden Oligonukleotide})$$

Alternativ kann die T_M auch mit Hilfe des online Programms Oligo Calculator berechnet werden: <http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>

2.8.3 Kolonie-PCR

Um viele Klone ohne Flüssigkultur testen zu können, wurden Einzelkolonien auf eine frische Agarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Bakterien wurden am nächsten Tag von der Platte abgenommen, in 50 µl H₂O_{dest} resuspendiert und für 10 min bei 95 °C gekocht. Zelltrümmern wurden abzentrifugiert (11 000 rpm, 2 min) und 1,5 µl des Überstandes als Template eingesetzt. Die PCR-Reaktion erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben. Die Methode der Kolonie-PCR eignet sich besonders zur Detektion von Insert-Fragmenten in Vektoren nach Ligationsreaktionen oder zum Testen von Deletionsmutanten.

2.8.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit der Firma Machery-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 15-50 µl H₂O_{dest} eluiert und bei -20 °C gelagert.

MATERIAL UND METHODEN

2.8.5 Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle können anhand ihrer Größe im elektrischen Feld mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Nukleinsäuren wandern dabei aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat in der Agarosematrix zur Anode und werden in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse und Konformation aufgetrennt. Dafür wurden Gele mit 1,0-1,5 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer verwendet. Vor dem Lauf wurden die Proben mit 1 x DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard zur Bestimmung der Fragmentgröße diente die 1 kb plus DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe). Der Gellauf wurde in horizontalen Mini-Gelkammern bei konstant 100 V für 50-60 min durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gele im Ethidiumbromid-Färbebad für 15 min gefärbt und die Detektion und Dokumentation der getrennten DNA-Fragmente erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm.

Elektrophoresepuffer (1 x TAE)	40 mM	Tris
	40 mM	Essigsäure
	1 mM	EDTA
	<hr/>	
		pH 8,2
10 x DNA-Auftragspuffer	30 %	Glycerin
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
	<hr/>	
	in 1 x TAE	
Agarosegel	1,0-1,5 %	Agarose
	<hr/>	
	in 1 x TAE	
Ethidiumbromid-Färbebad	1 µg Ethidiumbromid pro ml H ₂ O _{dest}	

2.8.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

2.8.7 Sequenzierung von DNA

Alle in dieser Arbeit hergestellten Mutanten (Tab. 6) und Plasmide (Tab. 8) wurden durch die Firma LGC Genomics (Berlin) sequenziert. Plasmid-DNA oder PCR-Produkte wurden wie beschrieben gereinigt (2.8.1.1, 2.8.5). Zur Sequenzierung wurden 80 ng/µl Plasmid-DNA (in 10 µl Volumen) und 10-80 ng/µl PCR-Produkt (in 10 µl Volumen) benötigt. Standardprimer zur Sequenzierung wurden von LGC Genomics gestellt; spezielle Sequenzierungs-Oligonukleotide mussten dem Sequenzieransatz in einer Konzentration von 5 pmol/µl (in 4 µl Volumen) zugesetzt werden.

2.8.8 Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.8.1 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten durch Restriktionsendonukleasen erfolgte in Reaktionsansätzen von 20-50 µl bei 37 °C für 5-20 min im vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Es wurden FastDigest Enzyme der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Spaltung von Plasmid-DNA wurde im Agarosegel überprüft und entsprechende Banden aus dem Agarosegel eluiert (2.8.6). Verdaute PCR-Fragmente können nach Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen (20 min, 65-80 °C) direkt für die Ligation in den Zielvektor verwendet werden.

2.8.8.2 Dephosphorylierung von DNA

Linearisierte Vektoren wurden zur Vermeidung von Religation an den 5'-Enden mittels Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP, Roche Diagnostics, Mannheim) dephosphoryliert. Für die Dephosphorylierung wurden 20 µl Vektor-DNA mit 1 µl 10 x SAP-Puffer und 1 µl SAP-Phosphatase (1 U/µl) versetzt, für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Phosphatase anschließend bei 65 °C für 15 min inaktiviert

2.8.8.3 Ligation linearer DNA-Fragment

Die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten (Inserts) wurde mithilfe der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Das verwendete Enzym katalysiert unter Verbrauch von ATP die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-OH-

MATERIAL UND METHODEN

Gruppe in der DNA. Für die Ligation müssen die eingesetzten DNA-Moleküle entweder glatte oder zueinander komplementäre, überlappende Enden aufweisen. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 10 µl und enthielt neben Insert (mind. fünffacher Überschuss zur Vektor-DNA) und Vektor (50-200 ng) 1 µl 10 x Ligasepuffer und 0,5 µl T4-DNA-Ligase (2000000 U/ml, New England Biolabs, Frankfurt). Die Ligation erfolgte bei 21 °C für 30 min und die Ligase wurde anschließend 10 min bei 65 °C inaktiviert.

2.8.8.4 Generierung von 3'-Adenosin-Überhängen nach der Amplifikation durch PCR

„Proofreading“-Polymerasen produzieren – im Gegensatz zu *Taq*-Polymerasen – keine 3'-A-Überhänge, sondern „blunt-end“-PCR-Produkte. Bei der Ligation von PCR-Produkten in die Vektoren pMBL-T/A und pGEM-T, die vom Hersteller mit einem 5'-T-Überhang geliefert werden, erfolgt die Ligation über die 3'-A-Überhänge der PCR-Produkte. Um 3'-A-Überhänge an ein PCR-Fragment anzufügen, wurden 10 µl PCR-Produkt mit 10 µl Red-Taq Master Mix vermischt und 2 min bei 95 °C und anschließend 10 min bei 72 °C inkubiert. Das Produkt wurde mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Machery-Nagel, Düren) aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt.

2.8.9 Kompetente Zellen und Elektroporation

2.8.9.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Übernachtskulturen wurden 1:100 bis 1:50 in LB-Medium unter Zugabe entsprechender Antibiotika verdünnt und bei 37 °C (*E. coli*) oder 27 °C (*Yersinia*) unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ 0,5-0,8 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann auf Eis 20 min abgekühlt und die Zellen anschließend bei 4 °C für 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die Bakterien wurden zweimal mit 50 ml vorgekühltem H₂O_{dest} gewaschen und ein weiteres Mal mit 10 ml 10 % Glycerin gewaschen. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 0,1-1,0 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots von 50 µl bei -80 °C gelagert.

2.8.9.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis 30 min aufgetaut und mit entsprechender DNA (1 µl Ligationsansatz oder 5 ng Plasmid-DNA) gemischt. Der Elektroporationsansatz wurde in eine Elektroporationsküvette (Eurogentec, Seraing) überführt und die Transformation

MATERIAL UND METHODEN

erfolgte mit einem Bio-Rad Gene Pulser bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 μ F. Die Zellen wurden in 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium (2.3.1) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C (*E. coli*) oder 27 °C (*Yersinia*) und bei 500 rpm in einem Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. 100 μ l, 200 μ l oder der gesamte Ansatz der Bakteriensuspension wurden auf selektiven Agarplatten ausplattiert und bei entsprechender Temperatur inkubiert.

2.8.10 Herstellung von Deletionsmutanten durch homologe Rekombination („ET-Klonierung“)

Die Herstellung von Deletionsmutanten erfolgte mit der Methode der „ET-Klonierung“. Dabei wird durch homologe Rekombination ein lineares PCR-Fragment mit dem zu deletierenden Genabschnitt im Chromosom oder auf einem Plasmid ausgetauscht (siehe Abb. 7) (Datsenko & Wanner, 2000). Namensgebend für diese Methode war die ursprüngliche Verwendung der Rekombinasefunktionen RecE und RecT, die aber mittlerweile durch die effizienteren Rekombinasefunktionen Red α und Red β des Bakteriophagen λ ersetzt wurden. Aufgrund der hohen Rekombinationseffizienz der Red-Rekombinasen, ist der Einsatz kurzer homologer Strukturen (50 bp) möglich, die leicht als synthetische Oligonukleotide zur Verfügung gestellt werden können. Die beiden Rekombinasesysteme (Red α und Red β) sowie der Exonukleaseinhibitor Red γ sind auf dem Plasmid pKD46 kodiert und unterliegen der Kontrolle des durch L-Arabinose induzierbaren Promotor P_{araB}. Die Replikation des Plasmids ist temperaturabhängig, was bei Temperaturen über 30 °C zum Verlust des Plasmids führt.

2.8.10.1 Herstellung elektrokompetenter Stämme für die Mutagenese

Die Stämme wurden wie oben beschrieben (2.8.9.1) kompetent gemacht und mit dem Plasmid pKD46 transformiert. Die Selektion erfolgte auf Carbenicillin-Agarplatten über Nacht bei 27 °C. Aufgrund der intrinsischen β -Laktamase-Aktivität von *Yersinien* erfolgte die Selektion mit Carbenicillin anstatt Ampicillin. Die Kontrolle der Transformation erfolgte nach Isolierung von Einzelkolonien mittels PCR (Primer siehe 2.2.3). Mit einer positiven Einzelkolonie wurde eine ÜN-Kultur (27 °C) in BHI-Medium mit 250 μ g/ml Cb angesetzt. Am nächsten Tag wurde die ÜN-Kultur 1:50 in LB-Medium mit 250 μ g/ml Cb verdünnt und 1 h bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde die Rekombinasefunktion durch Zugabe von 0,5-2,0 % L-Arabinose induziert und die Bakteriensuspension bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Bakterien wurden elektrokompetent gemacht (2.8.9.1), mit dem Unterschied,

dass die Zellen zweimal mit 10 % Glycerin gewaschen wurden. Die Bakterien wurden am Ende in 300 µl 10 % Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.8.10.2 „Primerdesign“

Die Primer für das zur homologen Rekombination benötigte lineare PCR-Fragment setzen sich aus zwei Bereichen zusammen: Einem Homologiearm von 50 bp am 5'-Ende, dessen Sequenz mit der des flankierenden Bereichs des zu deletierenden Gens identisch ist und der 3'-Region des Primers von ~20 bp, die die Amplifikation des Selektionsmarkers ermöglicht. Damit ergaben sich Primer einer Gesamtlänge von 70 bp, die bei der Herstellung mittels PAGE gereinigt wurden. In Tab. 9 sind die Oligonukleotide für die in dieser Arbeit hergestellten Deletionsmutanten aufgelistet.

2.8.10.3 Herstellung eines linearen PCR-Fragments für die Rekombination

Die Herstellung des PCR-Fragments erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben. Zur Amplifikation wurde der Red-Taq Master Mix (VWR, Ismaning) verwendet und für die Berechnung der Annealing Temperatur wurde lediglich der Primerbereich zur Amplifikation der Resistenzgenkassette berücksichtigt. Die PCR-Ansätze betragen 2 x 50 µl und als DNA-Matrize für die Antibiotikaresistenzgenkassette diente pACYC184 (Cm^r), pACYC177 (Km^r) oder pCDF-Duet-1 (Sp^r). Das PCR-Fragment wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (2.8.5) aufgetrennt, aus dem Gel aufgereinigt (2.8.6) und in 50 µl H₂O_{dest} aufgenommen. Um Transformation von Template Plasmid und somit falsch-positive Mutanten zu vermeiden, wurde überschüssiges Template durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (siehe 2.8.8.1) sowie einem weiteren, spezifisch für das jeweilige Template, Restriktionsenzym (*BglI* für pACYC177 und pACYC184; *BglII* für pCDF-Duet-1) entfernt. Bei diesem weiteren Restriktionsverdau muss allerdings für jede einzelne Mutagenese überprüft werden, dass das jeweilige Enzym nicht innerhalb der Homologiearme schneidet. Das PCR-Produkt wurde anschließend gefällt (2.8.1.2) und in 10 µl H₂O_{dest} eluiert. Zur Kontrolle wurde 1 µl des hergestellten PCR-Produkts auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.8.10.4 Elektroporation und Selektion der Mutanten

Die elektrokompententen *Yersinia* (2.8.10.1) wurden mit 9 µl des für die homologe Rekombination hergestellten PCR-Produkts (2.8.10.3) transformiert und der

MATERIAL UND METHODEN

Transformationsansatz wurde bei 27 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf entsprechende antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und bei 27 °C für 1-2 Tage inkubiert. Die Mutagenese wurde mittels PCR und anschließender Sequenzierung überprüft. Durch Temperaturwechsel auf 37 °C wurde das Plasmid pKD46 entfernt.

2.8.10.5 Entfernen des Resistenzmarkers mittels FLP-Rekombination

Vor allem bei der Herstellung von Mehrfachmutanten ist es sinnvoll, den Antibiotika-Resistenzmarker nach Deletion des Zielgens wieder zu entfernen. Durch Flankieren des Selektionsmarkers am 5'- und 3'-Ende mit FRT (FLP recognition target)-Sequenzen, kann dieser nach der Mutagenese durch die ortsspezifische Rekombinase FLP eliminiert werden (siehe Abb. 7). Die FRT-Sequenzen (5'-GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAG GAACTTC) werden beim Primerdesign zwischen den Homologiearmen und der 3'-Region zur Amplifikation der Resistenzgenkassette in beide Oligonukleotide eingefügt. Die temperaturabhängig induzierbare FLP Rekombinase ist auf dem Plasmid pCP20 kodiert. pCP20 trägt neben der FLP Rekombinase eine Ampicillin Resistenzgenkassette und besitzt einen temperatursensitiven Replikationsursprung.

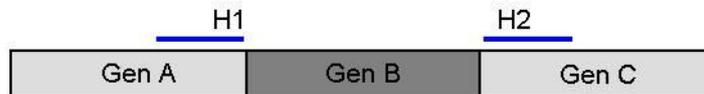
Die Deletionsmutanten mit dem zu entfernenden Resistenzmarker wurden mit pCP20 transformiert und auf Cb-Agarplatten bei 27 °C selektiert. Die Kontrolle der Transformation erfolgte mittels PCR. Die Transformanten wurden in LB-Medium 8 h bei 42 °C inkubiert, anschließend auf Blutagarplatten vereinzelt, gepickt und ÜN bei 27 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden parallel auf Agarplatten mit und ohne Selektionsantibiotika ausgestrichen. Deletionsmutanten, die nicht mehr in Gegenwart des Antibiotikums wachsen können, zu dem sie ursprünglich resistent waren, werden mittels PCR auf Verlust der Resistenzgene überprüft. Der Großteil der Klone verliert bei diesem Schritt die FRT-flankierten Resistenzgene und gleichzeitig das FLP-Helferplasmid (pCP20). Nach Eliminierung des Resistenzmarkers bleibt eine 34 bp lange FRT Sequenz im Genom zurück.

MATERIAL UND METHODEN

Schritt 1: PCR Amplifikation des FRT-flankierten Antibiotika-Resistenzgens



Schritt 2: Transformation mit einem λ Red-Rekombinase exprimierenden Stamm



Schritt 3: Selektion Antibiotika-resistenter Transformanten



Schritt 4: Eliminierung der Resistenzkassette

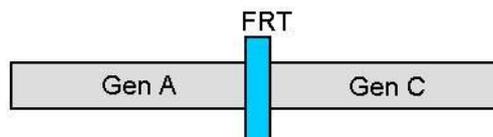


Abb. 7: Strategie der „ET-Klonierung“ (Datsenko & Wanner, 2000)

H1 und H2 entsprechen den Homologie-Bereichen

P1 und P2 sind die Primer Bindestellen zur Antibiotika Kasette

FRT ist die Erkennungssequenz der FLP Rekombinase

2.8.11 Konstruktion von Stämmen und Plasmiden

2.8.11.1 Konstruktion von Komplementanten der *ampC* und *blaA* Deletionsmutanten

Zur Komplementierung der *ampC* und *blaA* Deletionsmutanten wurden dieselben Gene in das Plasmid pACYC184 kloniert. Das *ampC* Gen wurde mit den Oligonukleotidpaaren AmpC-Pvull-FOR und AmpC-Pvull-REV, das *blaA* Gen mit den Primerpaaren BlaA-Pvull-

MATERIAL UND METHODEN

FOR und BlaA-Pvull-REV von chromosomaler DNA aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert und in *Pvull* verdauten pACYC184 kloniert. Die so entstandenen Plasmide *pampC* und *pblaA* besitzen die *ampC*-(157 bp vor *ampC*) bzw. *blaA* (156 bp vor *blaA*)-Promotorregion, das komplette *ampC* bzw. *blaA*-Gen, sowie die Terminatorregion von *ampC* (126 bp nach *ampC*) bzw. *blaA* (52 bp nach *blaA*). *pampC* wurde in elektrokompetente WA^{RS}Δ*ampC* und *pblaA* in WA^{RS}Δ*blaA* transformiert.

2.8.11.2 Konstruktion verschiedener YopE-Hybride in pACYC184

Um die Typ III-abhängige Sekretion verschiedener β-Laktamasen zu untersuchen, wurden unterschiedlich lange N-Termini von YopE an verschiedene signalpeptidlose β-Laktamasen fusioniert. Das jeweilige YopE-Fragment enthält die *yopE* Promotorregion, die Kodons für die gewünschte Anzahl an Aminosäuren von *yopE* und kodiert zusätzlich für das Chaperon von YopE, SycE. Somit wird eine Koexpression von SycE ermöglicht. SycE ist in entgegengesetzter Richtung 193 bp upstream von *yopE* auf dem pYV Virulenzplasmid kodiert.

Für die Herstellung von Hybridgenen, die das *yopE*₅₃ (bp 1-159) Fragment enthalten, wurde dieses zunächst mit dem Oligonukleotidpaar SycE_Pvull_FOR und YopE-1-53-BamHI-REV von isoliertem pYVO8 Plasmid amplifiziert. Das so entstandene Fragment enthält *sycE* sowie die Promotorregion von *yopE* (656 bp vor *yopE*) und die ersten 159 bp von *yopE*. Das Fragment wurde mit *BamHI* und *Pvull* verdaut. Das zweite Fragment der Hybridproteine besteht aus Kodons verschiedener β-Laktamasen (ohne Signalpeptid; reifer Teil der β-Laktamase). Die beiden Gene der *Yersinia* β-Laktamasen *ampC* (bp 79-1164; AS 27-388) und *blaA* (bp 97-882; AS 33-294) wurden mit den Primerpaaren AmpC27-Bam-FOR und AmpC-Strep-tag-Pvull-REV bzw. BlaA33-Bam-FOR und BlaA-Strep-tag-Pvull-REV von chromosomaler DNA aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert und jeweils mit *BamHI* und *Pvull* verdaut. Die jeweiligen Fragmente enthalten zusätzlich am 3'-Ende einen Strep-„tag“, dessen Kodons in die Oligonukleotidsequenz des REV-Primers integriert wurden, um eine spätere Detektion des Fusionsproteins mittels monoklonalem anti-Strep Antikörper zu ermöglichen. Die Kodons für den reifen Teil der temperaturstabilen *E. coli* β-Laktamase-Varianten MEGA und RLT wurden mit den Oligonukleotidpaar Bla-pBR322-Bam-FOR und Bla-pBR322-Pvull-REV von pTAC11-tem-1 MEGA bzw. pTAC11-tem-1 RLT (Kather, *et al.*, 2008) amplifiziert. Beide Fragmente wurden mit *BamHI* und *Pvull* verdaut. Das *yopE*₅₃ Fragment und die Fragmente der jeweiligen β-Laktamasen wurden anschließend in *BamHI/Pvull* verdauten Vektor pACYC184 kloniert. Die entstandenen Plasmide sind pJ-

MATERIAL UND METHODEN

E₅₃-ampC-Strep, pJ-E₅₃-blaA-Strep, pJ-E₅₃-RLT und pJ-E₅₃-MEGA. Für die Herstellung von Hybridproteinen mit N-terminalem YopE1-138 (bp 1-414) Fragment, wurden die Kodons für dieses mit dem Oligonukleotidpaar SycE_Pvull_FOR und YopE-1-138-BamHI-REV von isoliertem pYVO8 Plasmid amplifiziert. Dieses Fragment besitzt das komplette *sycE*-Gen sowie die *yopE*-Promotorregion und die ersten 414 bp von *yopE*. Das Fragment wurde mit *Pvull* und *BamHI* verdaut. Das *yopE*₁₃₈ Fragment wurde zusammen mit dem *Yersinia ampC* bzw. *blaA*-Fragment (wie oben beschrieben) und *BamHI/Pvull* verdauten Vektor ligiert. Die so konstruierten Plasmide sind pJ-E₁₃₈-ampC-Strep, pJ-E₁₃₈-blaA-Strep. Die Fusionsproteine aus N-terminalem YopE_i-Fragmenten (i= 18 AS, 53 AS, 138 AS bzw. bp 1-54, 1-159, 1-414) und des reifen Teils der β -Laktamase TEM-1 (bp 70-858; AS 24-286) aus *E. coli* wurden durch Amplifikation der Hybridgene mit den Oligonukleotiden SycE_Pvull_FOR und Bla-pBR322-Pvull-REV von pYopE_i-Bla-Plasmiden (Cvetanovic, 2011) hergestellt. Die Amplifikate wurden mit *Pvull* und *BamHI* verdaut und mit *Pvull/BamHI*-verdauten Vektor pACYC184 ligiert. Die entstanden Plasmide sind pJ-E₁₈-tem-1, pJ-E₅₃-tem-1 und pJ-E₁₃₈-tem-1. Alle beschriebenen Plasmide wurden zunächst in den *E. coli* Stamm DH5 α und anschließend entweder mit *Y. enterocolitica* WA-314 oder *Y. enterocolitica* WA^{RS} $\Delta\Delta$ transformiert.

2.8.11.3 Konstruktion eines Expressionsplasmids zur rekombinanten Herstellung von BlaA

Für die rekombinante Herstellung von BlaA wurde das *blaA*-Gen (bp 1-882; AS 1-294) mit BlaA-1-40-Hind-pWS-FOR/BlaA-His-tag-Sal-REV mittels PCR von chromosomaler DNA aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert. An das Fragment wurde C-terminal ein His₆-„tag“ angefügt, indem dessen Nukleotidsequenz in die Primersequenz des REV-Primers zur Amplifikation des Gens eingebracht wurde. Das *blaA*-Fragment wurde mit *HindIII* und *Sall* verdaut und in *HindIII/Sall* verdauten Vektor pWS ligiert. Beide Plasmide wurden erst mit dem elektrokompetenten *E. coli* Stamm DH5 α und anschließend mit elektrokompetenten *Y. enterocolitica* WA^{RS} $\Delta\Delta$ transformiert.

2.8.11.4 Konstruktion von *Yersinia enterocolitica* Stämmen mit pWS-Plasmiden

Um den Tat- bzw. Sec-abhängigen Transport verschiedener Proteine zu untersuchen, wurden Signalsequenzen verschiedener periplasmatischer oder cytoplasmatischer Proteine an GFP fusioniert. Zur Expression in Yersinien wurde das „enhanced GFP“ (eGFP)

MATERIAL UND METHODEN

verwendet, welches im Gegensatz zum Wildtyp-GFP zwei Punktmutationen (F64L, S65T) besitzt. Dadurch wird eine erhöhte Intensität der Fluoreszenz bei Expression in Bakterien erreicht (Jacobi, *et al.*, 1998, Jaspers, *et al.*, 2001). Alle nachfolgenden Konstrukte wurden in den Vektor pWS über die Schnittstellen *HindIII/BamHI/SalI* oder *HindIII/SalI* kloniert (die Restriktionsenzyme sind in Tab. 9 genannt) und zunächst in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert. Die Korrektheit der konstruierten Plasmide wurde durch DNA-Sequenzanalyse (2.8.7) überprüft. Anschließend erfolgte die Transformation in elektrokompetente *Y. enterocolitica* WA-314 oder *Y. enterocolitica* WA^{RS} $\Delta\Delta$ Stämme.

pWS-GFP entstand durch PCR-Amplifikation des *gfp*-Gens (bp 1-714; AS 1-238) vom Plasmid pJAMA22 mit den Oligonukleotiden eGFP_Hind_FOR und Sal_eGFP_REV. Das *gfp* Fragment wurde in *HindIII/SalI* verdauten Vektor pWS kloniert. Die Fusionskonstrukte pWS-torA₁₋₅₀-GFP, pWS-ampC₁₋₃₂-GFP und pWS-blaA₁₋₄₀-GFP entstanden durch Amplifikation der jeweiligen Signalsequenzen mit den Primern TorA_1-50_Hind-pWS-FOR/ TorA_1-50_Bam-pWS-REV; AmpC-1-32-Hind-pWS-FOR/ Bam_AmpC-1-32_REV und BlaA-1-40-Hind-pWS-FOR/Bam_BlaA-1-40_REV. Als Template diente chromosomale DNA von *E. coli* K12 (*torA*) und chromosomale DNA von *Y. enterocolitica* WA-314 (*ampC*, *blaA*). Die Fragmente wurden jeweils upstream eines *gfp*-Fragments (bp 1-714; AS 1-238), amplifiziert mit den Oligonukleotiden Bam_eGFP_FOR und Sal_eGFP_REV von Plasmid pJAMA22, in pWS kloniert. Die Konstruktion des Plasmids pWS-blaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP erfolgte durch Amplifikation der ersten 120 bp von *blaA* mit den Oligonukleotiden BlaA-Subst-RR-Hind-FOR und Bam_BlaA-1-40_REV. Die Nukleotidsequenz des FOR-Primer enthält eine veränderte Sequenz: anstatt der Nukleotide CGGCGT (nt 19-24) wurden die Nukleotide CAGCAA in die Primer-Sequenz eingesetzt. Dies führt zu einem Aminosäureaustausch von Arg-Arg zu Gln- Gln an Position 7 und 8 im Protein. Das substituierte *blaA* Fragment wurde zusammen mit dem oben beschriebenen *gfp* Fragment in pWS kloniert. Das Fusionskonstrukt pWS-ampC₁₋₃₂-blaA₁₋₃₂-His entstand durch Amplifikation der ersten 96 bp (AS 1-32) des *ampC*-Gens mit den Primern AmpC-1-32-Hind-pWS-FOR/ Bam_AmpC-1-32_REV sowie der Nukleotide 96-885 (AS 33-294) des *blaA*-Gens mit den Oligonukleotiden BlaA33-Bam-FOR/BlaA-His-tag-Sal-REV. Als Template beider PCR-Reaktionen diente chromosomale DNA von *Y. enterocolitica* WA-314. An das *blaA*-Fragment wurde am 3'-Ende ein His₆-„tag“ angehängt, dessen Nukleotidsequenz in den zur Amplifikation verwendeten REV-Primer eingebracht wurde. Das *ampC*-Fragment wurde upstream vom *blaA* Fragment in den Vektor pWS ligiert. Das Fusionskonstrukt pWS-meoA₁₋₂₆-blaA₁₋₃₂-His entstand durch Amplifikation der ersten 78 bp des *meoA*-Gens mit den Primern MeoA-1-26-Hind-pWS-FOR/ Bam_MeoA-1-26_REV sowie der Nukleotide 97-882 (AS 33-294) des *blaA*-Gens mit den Oligonukleotiden BlaA33-Bam-

MATERIAL UND METHODEN

FOR/BlaA-His-tag-Sal-REV. Als Template beider PCR-Reaktionen diente chromosomale DNA von *Y. enterocolitica* WA-314. An das *blaA*-Fragment wurde am 3'-Ende ein His₆-„tag“ angehängt, dessen Nukleotidsequenz in den zur Amplifikation verwendeten REV-Primer eingebracht wurde. Das *meoA*-Fragment wurde upstream vom *blaA* Fragment in den Vektor pWS ligiert. Die Plasmide pWS-*blaA*-Strep, pWS-*dmsD*-Strep und pWS-*torA*-Strep entstanden durch Amplifikation des *blaA*- (bp 1-882; AS 1-294), *dmsD* (bp 1-612; AS 1-204) und *torA* (bp 1-2544; AS 1-848)-Gens mit den Primern BlaA-1-40-Hind-pWS-FOR/BlaA-Strep-tag-Sal-REV, DmsD-Hind-pWS-FOR/DmsD-Sal-Strep-pWS-REV und TorA_1-50_Hind-pWS-FOR/TorA-Sal-pWS-REV. Als Template diente chromosomale DNA von *Y. enterocolitica* (*blaA*) und chromosomale DNA von *E. coli* K12 (*dmsD*, *torA*). In die Sequenz des jeweiligen REV-Primers wurde die Nukleotidsequenz für einen Strep-„tag“ eingebracht.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Präparation von Gesamtzelllysaten

Für die Herstellung von *Yersinia* Gesamtzelllysaten wurden 1 ml einer unter entsprechenden Bedingungen inkubierten Flüssigkultur abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm), in SDS-Auftragspuffer (2.9.3) resuspendiert und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Das Volumen an SDS-Auftragspuffer wurde je nach gemessenen OD₆₀₀-Werten der Bakterienkulturen berechnet und abgeglichen. Im Anschluss konnte die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgen (2.9.3).

2.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (mod. nach Bradford, 1976)

Proteinbestimmungen wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit (2.1.2) durchgeführt. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Brilliant Blue R250-Lösung von 465 nm auf 595 nm verschiebt, wenn eine Bindung an Proteine stattfindet. 1-5 µl des Proteins in Lösung wurden mit H₂O_{dest} auf 800 µl aufgefüllt und 200 µl des Reagenzes zugegeben. Als Nullwert wurden 800 µl H₂O_{dest} mit 200 µl des Reagenzes ohne Zugabe von Protein vermischt. Die Absorptionsmessung erfolgte nach 60 s Inkubationszeit bei Raumtemperatur bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Referenz diente eine Eichgerade, die mit BSA als Standardprotein erstellt wurde.

MATERIAL UND METHODEN

2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in einem Polyacrygel elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Für die Elektrophorese wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 8 x 7 cm in einer Minigel-Kammer von Bio-Rad (München) verwendet. Die SDS-Gele bestehen aus einem Sammelgel mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % sowie einem Trenngel, dessen Acrylamidkonzentration je nach gewünschter Auftrennung bzw. Molekulargewicht der Proteine zwischen 10 % und 12 % liegt. Als Größenstandard wurde die Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit SDS-Auftragspuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Gelkammer wurde mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt und die Proben in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150-180 V für ~60 min. Nach dem Gellauf wurden die SDS-Gele in Coomassie-Lösung gefärbt (2.9.4) oder für Immunoblot-Analysen (2.9.5) eingesetzt.

Tab. 16: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

	10 % Trenngel (10 ml)	12 % Trenngel (10 ml)	4 % Sammelgel (5 ml)
1 M Tris/HCl, pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	-
750 mM Tris/HCl pH 6,8	-	-	700 µl
30 % Acrylamid-Lösung	3,3 ml	4,0 ml	830 µl
10 % SDS	200 µl	200 µl	100 µl
H ₂ O _{dest}	2,6 ml	1,9 ml	3,2 ml
10 % APS	40 µl	40 µl	40 µl
10 % TEMED	200 µl	200 µl	200 µl

10 x SDS-Laufpuffer	30,3 g	Tris
	144,1 g	Glycin
	1 %	SDS
	ad 1 l H ₂ O _{dest}	

MATERIAL UND METHODEN

SDS-Auftragspuffer	5 ml	1 M MgCl ₂
	20 ml	10 % SDS
	5 ml	Glycerin
	2,5 ml	β-Mercaptoethanol
	25 mg	Bromphenolblau
	4,9 ml	1 M Tris, pH 8,8
	<hr/>	
ad 50 ml H ₂ O _{dest}		

2.9.4 Coomassie-Färbung

Die Visualisierung der mittels SDS-Polyacrylelektrophorese aufgetrennten Proteine, erfolgte mittels Coomassie-Färbung. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Die SDS-Gele wurden für 30-60 min unter Schwenken in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend ebenfalls schwenkend mit H₂O_{dest} entfärbt.

Coomassie-Lösung	25 %	Isopropanol
	10 %	Essigsäure
	0,05 %	Coomassie Brillant Blau R250

2.9.5 Western-Blot (Immunoblot)

Bei der Detektion von Proteinen in einem Immunoblot werden mittels SDS-PAGE (2.9.3) elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und anschließend mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.

Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen erfolgte mithilfe einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur. Hierfür wurden zunächst zwei Lagen Whatman-Papier, eine Nitrozellulose-Membran und das SDS-Gel in Transferpuffer gelegt. Anschließend wurde das SDS-Gel luftblasenfrei auf die Nitrozellulose-Membran aufgebracht, zwischen zwei Lagen von Whatman-Papier eingebracht und auf die Anodenplatte gelegt. Nach Auflegen der Kathodenplatte wurden die Proteine aus den SDS-Gele bei konstant 15 V für 45 min auf die Membran übertragen. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungen wurde die Membran für mindestens 60 min in Blockierlösung inkubiert. Der Nachweis des Proteins erfolgte durch

MATERIAL UND METHODEN

Inkubation der Membran mit spezifischen Primärantikörpern (Tab. 11) in Blockierlösung für weitere 60 min. Nach einem Waschschrift in PBS-T wurde der mit Meerrettichperoxidasegekoppelte Sekundärantikörper (Tab. 11) in Blockierlösung zugegeben und für 30-60 min inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen in PBS-T von der Membran entfernt. Die Detektion erfolgte je nach Antikörper mit dem ECL Western Blotting Reagenz (GE Healthcare, München) oder mit dem Immobilon Western HRP Substrat (Millipore, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers. Zur Detektion der Chemilumineszenz wird Peroxidasesubstrat und Luminol zum Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper gegeben. Luminol wird durch freigesetztes Peroxid oxidiert und das Reaktionsprodukt emittiert Licht, welches auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

Transferpuffer	5,82 g	Tris
	2,93 g	Glycin
	200 ml	Methanol
	<hr/> ad 1 l H ₂ O _{dest}	
PBS (10 x)	80 g	NaCl
	2 g	KCl
	14,4 g	Na ₂ HPO ₄
	2,4 g	KH ₂ PO ₄
	<hr/> ad 1 l H ₂ O _{dest} pH 7,4	
Blockierlösung	1 %	Milchpulver
	1 %	BSA
	0,5 %	Tween 20
	<hr/> in 1 x PBS	
PBS-T	0,5 % Tween 20 in 1 x PBS	

2.9.6 Isolierung von sezernierten Yop-Proteinen von *Yersinia* aus dem Kulturüberstand

Yersinia Stämme sekretieren *in vitro* bei 37 °C unter Calcium (Ca²⁺)-Mangelbedingungen Yops (*Yersinia* outer proteins) in den Kulturüberstand (Kupferberg & Higuchi, 1958, Higuchi,

MATERIAL UND METHODEN

et al., 1959). Ca^{2+} -Mangelbedingungen werden durch Zugabe von EGTA, einem Komplexbildner, der besonders stabile Chelatkomplexe mit Calcium-Ionen bildet, erzeugt. Für die Isolierung der Yops wurde eine ÜN-Kultur, die bei 27 °C geschüttelt wurde, 1:40 in BHI-Medium verdünnt und für 2 h bei 37 °C weitergeschüttelt. Durch Zugabe von 5 mM EGTA und 10 mM MgCl_2 wurde die Sekretion stimuliert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2-3 h bei 37 °C wurden 2 ml der Kultur abzentrifugiert (3 min, 7500 rpm, 4 °C) und 1,7 ml des Kulturüberstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) gefällt und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach dem Pelletieren der gefällten Proteine (14 000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und zweimal mit 1 ml eisgekühltem Aceton gewaschen (14 000 rpm, 10 min, 4 °C). Ein letzter Waschschrift erfolgte mit 1 ml eisgekühltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. Das Pellet wurde dann getrocknet und in SDS-Auftragspuffer für die SDS-PAGE (2.9.3) aufgenommen.

2.9.7 Präparation von periplasmatischen Extrakten

Periplasmatische Proteine wurden nach der Methode des kalten osmotischen Schocks, modifiziert nach Aldridge, *et al.*, 2006, gewonnen.

Yersinia Flüssigkulturen wurden unter gewünschten Bedingungen inkubiert und 5 ml der Kultur für 5 min bei 5000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal in 1 x PBS gewaschen und in 500 μl eiskaltem Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurde Lysozym (Endkonzentration von 2,5 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für ~1,5 h auf Eis inkubiert. Die Bildung von Spheroplasten (Abrunden der Bakterienzellen nach Peptidoglykanfragmentierung) wurde regelmäßig am Mikroskop kontrolliert und die Inkubationszeit mit Lysozym dementsprechend angepasst. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (4 min, 3000 g, 4 °C), der Überstand abgenommen und mit 10 % TCA gefällt (wie in 2.9.6 beschrieben), mit Aceton gewaschen und in SDS-Auftragspuffer resuspendiert.

Lysepuffer	100 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	20 %	Sucrose
	7,5 mM	EDTA

2.10 Proteinexpression und Proteinreinigung

2.10.1 Überexpression von Proteinen mit His₆-„tag“

Für die Herstellung von rekombinatem BlaA wurde der Expressionsvektor pWS verwendet. Das *blaA* Fragment wurde über *HindIII* und *Sall* direkt hinter den p_{tac}-Promotor in pWS eingefügt. C-terminal wurden zusätzlich sechs Histidine (His₆-„tag“) angefügt, dessen Kodons in die Nukleotidsequenz des 3'-Primers zur Amplifikation des *blaA* Fragments integriert wurden. Der p_{tac}-Promotor wird durch IPTG Zugabe induziert. In *Yersinia* ist dieser Promotor allerdings „leaky“, d.h. die Expression des klonierten Konstrukts erfolgt auch ohne Zugabe von IPTG in ausreichender Menge. Zur Expression von BlaA wurde daher kein IPTG zugegeben.

Für die Herstellung von rekombinatem BlaA wurde der Stamm WA^{RS}ΔΔ (pWS *blaA*-His) in BHI-Medium mit Antibiotikazusatz ÜN bei 27 °C kultiviert, am nächsten Tag 1:100 in 1 l LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika verdünnt und ~ 6 h bei 27 °C inkubiert. Die Bakterien wurden bei 6000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet wurde bei -20 °C gelagert. Die Überexpression des Proteins wurde mittels SDS-PAGE (2.9.3) überprüft.

2.10.2 Reinigung von Proteinen mit His₆-„tag“ durch „Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“ (IMAC)

Das rekombinant hergestellte Proteine BlaA mit C-terminalem His₆-„tag“ (BlaA-His) kann affinitätschromatographisch über eine Ni-Chelat-Säule aufgereinigt werden. Die Proteinreinigung mittel IMAC beruht auf der Bildung von Komplexen zwischen bestimmten Proteinresten (v.a. Histidin) und divalenten Metallionen (Ni²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺): Histidin kann aufgrund eines freien Elektronenpaares am Stickstoff des heterozyklischen Imidazolrings Metalle komplexieren. Die stationäre Phase bildet eine Agarosematrix, die über einen Chelator (z.B. NTA) an zweiwertige Metallionen (z.B. Ni²⁺) gekoppelt ist. Durch die Zugabe eines Proteins mit His₆-„tag“ auf eine beladene Matrix bindet dieses an divalenten Metallionen. Durch einen Überschuss Imidazol, dessen Struktur ähnlich der der Histidine ist, können die Proteine von der Matrix verdrängt werden und somit eluiert werden.

Für Vortests wurden BlaA-His Proteine im kleinen Maßstab mit Ni-NTA-beads (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert. Für die Affinitätschromatographie wurde das induzierte Pellet in 25 ml Puffer A, supplementiert mit 4 mM PMSF und 250 Benzoase, resuspendiert und durch drei French-Press-Zyklen

MATERIAL UND METHODEN

aufgeschlossen (1000 psi). Die Suspension wurde für 30 min bei 14 000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand wurde auf eine HisTrap HP Säule aufgetragen, die am Chelator zweiwertige Nickelionen gebunden hat. Die Ni²⁺-Matrix wurde mit Puffer A gewaschen und das Zielprotein über einen Imidazolgradienten (0-500 mM in Puffer B) eluiert. Um das Imidazol aus der Probe zu entfernen, ist ein anschließender Pufferwechsel durch Dialyse oder durch einen weiteren Reinigungsschritt (z.B. Gelfiltration, 2.10.3) sinnvoll. Die Reinigung des Zielproteins wurde mittels SDS-PAGE (2.9.3) oder Western-Blot (2.9.5) kontrolliert und die Gesamtproteinmenge wurde nach Bradford (2.9.2) bestimmt.

Puffer A	20 mM	Na ₂ HPO ₄
	500 mM	NaCl
	5 mM	Imidazol
	(6-8 M	Harnstoff)

Puffer B	20 mM	Na ₂ HPO ₄
	500 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol
	(6-8 M	Harnstoff)

2.10.3 Gelfiltration (Größenausschluss-Chromatographie)

Bei der Gelfiltration werden Proteinen nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Prinzip basiert auf der unterschiedlichen Permeation von Proteinen in einem porösen Trägermaterial: Große Proteine laufen schneller über die Säule und eluieren somit früher; kleine Proteine diffundieren in die porösen Gelpartikel und eluieren entsprechend später. Die Gelfiltration wird typischerweise als zweiter Schritt bei der Proteinaufreinigung über einen „tag“ eingesetzt, um die Reinheit weiter zu erhöhen.

2.11 Zellbiologische Methoden

2.11.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien (HEK-293-Zellen)

Die Kultivierung von HEK-293 (human embrionic kidney)-Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, CH) in 10 ml Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FCS, 1 mM Pyruvat, 2 mM Glutamin) bei 37 °C und 5 % CO₂. Zur Aufteilung des konfluenten Zellrasens auf neue Zellkulturflaschen wurde das Medium zunächst abgenommen und die adhären Zellen mit 5 ml 1 x PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA (1 x, Gibco-Invitrogen; Karlsruhe) für 2 min bei 37 °C/5 % CO₂ wurden die Zellen vom Untergrund abgelöst. Bei Trypsin handelt es sich um eine Protease, die Proteine der extrazellulären Matrix spaltet und somit die Zellen von der Kulturflasche löst bzw. die Zellen vereinzelt. EDTA wird zugefügt um zweiwertige Kationen, die Membranproteine stabilisieren, zu komplexieren. Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium inaktiviert Trypsin und bindet EDTA. Die abgelösten Zellen wurden bei 300 g für 2 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und auf Zellkulturflaschen aufgeteilt.

2.11.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Ein konfluenter Zellrasen wurden mittels Trypsinbehandlung vom Flaschenboden abgelöst und die Zellen bei 300 g für 2 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Einfriermedium (DMEM mit 10 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. DMSO dient als kryoprotektive Substanz, in dem es die Kristallbildung innerhalb der Zellen verhindert; im Gegensatz zu Glycerin diffundiert DMSO schneller in die Zellen. Um eine gleichmäßige Verringerung der Temperatur beim Einfrierprozess zu gewährleisten (Verringerung der Temperatur um -1 °C/min), wurden die befüllten Kryoröhrchen zunächst für 24 h bei -80 °C in einem Behälter mit Isopropanol eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte anschließend bei -80 °C.

Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen zunächst auf Eis gestellt. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und bei 300 g für 2 min sedimentiert. Nach einmaligem Waschen in Zellkulturmedium wurden die Zellen in der entsprechenden Verdünnung in Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C/5 % CO₂ inkubiert.

2.11.3 Zellzahlbestimmung

Zum Aussäen einer definierten Menge an Zellen für anschließende Infektionsversuche muss zunächst die Zellzahl bestimmt werden. Nach der Trypsinisierung und Sedimentierung der Zellen (siehe 2.11.1) wurde das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen wurde die Zellsuspension 1:40 mit einer Trypanblau-Lösung vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Im Lichtmikroskop wurden die lebenden Zellen pro Großquadrat (unterteilt in vier Gruppenquadrate) ausgezählt und der Mittelwert der vier Gruppenquadrate berechnet. Die Anzahl der Zellen pro ml wurden wie folgt berechnet:

Anzahl der Zellen/ml = Mittelwert aus vier Gruppenquadraten $\times 40 \times 10^4$

40 = Verdünnungsfaktor

10^4 = Volumen eines Gruppenquadrats entspricht 10^{-4} ml

2.12 *In vitro* Infektion von Zellen mit Yersinien

2.12.1 Kultivierung von *Yersinia enterocolitica* für Infektionsversuche

Jeweils eine ÜNK der entsprechenden *Y. enterocolitica* Stämme wurde 1:50 in BHI-Medium, supplementiert mit 2,5 mM CaCl_2 , verdünnt und bei 37 °C für 2 h geschüttelt. Die Zugabe von CaCl_2 inhibiert die Sekretion der Yops in den Kulturüberstand, nicht aber deren Expression. Anschließend wurden die Kulturen bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert, in 1 x PBS gewaschen und in 5 ml RPMI-Medium (Medium, in dem auch die Infektion der Zellen durchgeführt wird) resuspendiert. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgt durch Messung der Absorption mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm. Daraus lässt sich die Bakterienanzahl mit folgender Formel bestimmen:

$$1 \times 10^8 \text{ Yersinien/ml} = \frac{\text{gemessene OD}_{600}}{0,36} - 1$$

MATERIAL UND METHODEN

2.12.2 Infektion von HEK-293-Zellen mit *Yersinia enterocolitica*

Die Kultivierung von HEK-293-Zellen erfolgte wie in 2.11.1 beschrieben. Einen Tag vor dem Infektionsversuch wurde die Zellzahl bestimmt (2.11.3) und 5×10^5 Zellen/well in einer 24-well-Platte in RPMI-Medium (10 % FCS, 1 mM Pyruvat, 2 mM Glutamin) ausgesät. Die für die Infektion verwendeten *Y. enterocolitica* Stämme wurden wie unter 2.12.1 beschrieben vorbereitet. Die Infektion der HEK-293-Zellen erfolgte mit einer MOI (multiplicity of infection = Verhältnis von Bakterien zu ihren eukaryotischen Zielzellen) von 50. Die Bakterien wurden bei 300 g für 5 min auf die Zellen zentrifugiert und die Platte für 1 h bei 37 °C/5 %CO₂ inkubiert. Nach der Infektion wurden die Zellen abgelöst, indem das Medium auf und ab pipettiert wurde. Die Zellen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, zweimal in 1 x PBS gewaschen und pelletiert. Das Pellet wurde für den nachfolgenden β -Laktamase Assay eingesetzt.

2.13 β -Laktamase Assay zum Nachweis der Translokation von YopE-Reporterfusionsproteinen

Eine Methode zur Bestimmung der Translokation von Yops in eukaryotische Zielzellen ist die Verwendung von Yop- β -Laktamase-Reporterproteinen. Die fusionierte β -Laktamase kann im Falle einer erfolgreichen Translokation indirekt mit dem fluorogenen Substrat CCF4-AM nachgewiesen werden.

Das Substrat der β -Laktamase-Färbung ist CCF4-AM (Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein-Acetoxyethyl) (Invitrogen, Karlsruhe) und besteht aus den beiden Fluorophoren 7-Hydroxycoumarin und Fluorescein, die über einen Cephalosporin-Kern miteinander verbunden sind. Durch die lipophile Veresterung ist CCF4-AM gut membrangängig. Passiert das Substrat die Zellmembran, spalten cytoplasmatische Esterasen die Ester-Bindung und es entsteht ein negativ geladenes Substrat, das weniger gut über die Cytoplasmamembran zurückdiffundieren kann. Sind in der Zelle keine β -Laktamasen vorhanden, so bleibt das Substrat intakt und bei einer Anregung des Coumarin-Restes bei 409 nm wird die blaue Fluoreszenz auf das Fluorescein übertragen (FRET, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer). Das Fluorescein emittiert nun eine grüne Fluoreszenz bei 520 nm. Sind in der Zelle β -Laktamasen vorhanden, spalten diese den β -Laktam-Ring des Cephalosporin-Moleküls und das Fluorescein wird entfernt. Dies verhindert FRET, da eine Photonenübertragung auf Fluorescein kaum noch stattfindet. Daher emittiert der verbliebene Coumarin-Rest im blauen Bereich bei 447 nm.

MATERIAL UND METHODEN

Das pulverisierte CCF4-AM wurde nach Angaben des Herstellers gelöst und vor Versuchsstart frisch angesetzt. Das Zellpellet nach der Infektion (2.12.2) wurde in 300 µl CCF4-AM-Lösung resuspendiert. Zusätzlich wurde 2,5 mM Probenecid, ein Anionen-Transport-Inhibitor, zugegeben, um einen Efflux des Substrats aus der Zelle zu verhindern. Die Zellen wurden für 90 min bei 28 °C abgedunkelt unter Schütteln inkubiert. Nach der Färbung wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen und in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie (2.14).

FACS-Puffer	2 %	FCS
	0,09 %	Azid
	<hr/>	
	in 1 x PBS	

2.14 Durchflusszytometrie-Messung (FACS-Analyse)

Mit einem FACS-Gerät (fluorescence activated cell sorter) können simultan die Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von fluoreszenzmarkierten Zellen gemessen werden. Außerdem kann die relative Größe und Granularität der Zellen durch gleichzeitig Messung der Lichtstreuung bestimmt werden. Dazu werden die Zellen durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei die Lichtstreuung durch Zellgröße und Granularität beeinflusst wird und somit Aufschluss über die Beschaffenheit der Zelle gibt. Die Messung der Fluoreszenz beruht auf der Messung des emittierten Lichts: Fluorochrome absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer verschobenen Wellenlänge.

Im FACS-Gerät wird die Zellsuspension aus dem FACS-Röhrchen durch Überdruck in die Messküvette eingeführt, beschleunigt und gemessen. Für den β-Laktamase-Assay wurden 100.000 Ereignisse (i.d.R. Einzelzellen; allerdings wird nicht zwischen Bakterien und eukaryotischen Zellen unterschieden) jeder Probe gemessen. Die Analyse erfolgte am FACSCanto II-Durchflusszytometer (BD, Heidelberg) und die Auswertung mithilfe der FACSDiva Software v6.1.2 (BD, Heidelberg).

2.15 Fluoreszenzmikroskopie und Immunfluoreszenzfärbung

Alle Konstrukte, die direkt zur Fluoreszenzmikroskopie verwendet wurden (GFP-Konstrukte) oder für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet wurden, wurden im Vektor pWS exprimiert. Die Expression der Fusionsgene erfolgte ohne Zugabe von IPTG (siehe 2.10.1).

2.15.1 Fluoreszenzmikroskopie der GFP-Fusionsproteine

Yersinia Stämme, die Plasmide mit den jeweiligen GFP-Konstrukten (Tab. 8) tragen, wurden unter Antibiotika-Zugabe ÜN bei 27 °C geschüttelt, 1:50 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer $OD_{600} \sim 0.8$ kultiviert. 1 ml der Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (5 min, 4000rpm), einmal in 1 x PBS gewaschen und in 2 % PFA für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Das PFA wurde durch dreimaliges Waschen der Bakterien in 1 x PBS entfernt. 5 µl der fixierten Bakterienlösung wurden auf einen Objektträger gegeben, mit einem Tropfen Fluoprep (Biomérieux, Nürtingen) eingebettet und mit einem Deckgläschen versehen. Die mikroskopische Auswertung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop LEITZ DMDR und am konfokalen Mikroskop Leica SP5.

2.15.2 Immunfluoreszenzfärbung von intrazellulären und periplasmatischen Proteinen

Zur Bestimmung der Lokalisation von Proteinen in einer Bakterienzelle wurden die jeweils zu untersuchenden Proteine mit einem Strep-„tag“, der aus 8 Aminosäuren (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) besteht, versehen. Zusätzlich wurde zwischen dem terminalen Kodon und der „tag“-Sequenz ein Ala-Ser-Linker eingebracht. Die Kodons für den Strep„tag“ wurden direkt in die Oligonukleotidsequenz des 3'-Primers eingebracht, mit dem das jeweilige Gen amplifiziert wurde. Das jeweilige Gen wurde in verschiedenen *Yersinia* Stämmen überexprimiert und das Protein kann anschließend mit einem spezifischen Primärantikörper gegen den Strep-„tag“ markiert werden. Der Primärantikörper kann anschließend mittels Fluorochrom-konjugiertem Sekundärantikörpern nachgewiesen werden. Bei Anregung durch Licht definierter Wellenlänge, emittiert das Fluorochrom Licht und kann mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Y. enterocolitica Stämme mit entsprechend transformiertem Plasmid (Tab. 8) wurden ÜN in BHI-Medium geschüttelt, 1:50 in LB-Medium verdünnt und bei 27 °C bis zu einer $OD_{600} \sim 0,8$ inkubiert. 1 ml der Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm), in 200 µl -20 °C kaltem Aceton fixiert, zweimal in 1 x PBS gewaschen und für 10 min in 20 % Sucrose (in 1 x PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in Permeabilisierungspuffer für 1 h auf Eis inkubiert und dreimal in 1 x PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl 1 x PBS aufgenommen und 2 µl des Primärantikörpers gegen den Strep-„tag“ zugegeben (siehe Tab. 11). Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen, das Pellet in 100 µl 1 x PBS resuspendiert und 1 µl des Sekundärantikörpers (Zeige anti-Maus-Cy3

MATERIAL UND METHODEN

Konjugat) zugegeben und für 1 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde das Pellet in 100 µl 1 x PBS aufgenommen und 5 µl des Präparats auf einen Objektträger gegeben. Ein Tropfen DAPI-Mounting Medium Vectashield (Linaris, Wertheim) wurde nach Trocknen der Suspension auf den Objektträger aufgebracht, ein Deckgläschen aufgelegt und mit Nagellack fixiert. Anschließend wurden die Präparate am konfokalen Mikroskop Leica SP5 mikroskopiert.

Permeabilisierungspuffer	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1,8 mg/ml	Glukose
	5 mg/ml	Lysozym
	<hr/>	
	in 1 x PBS	

2.16 Antibiotika-Sensitivitätstests

2.16.1 Antibiotika-Sensitivitätstest in Flüssigkultur

Zur Bestimmung der Ampicillin-Empfindlichkeit des *Y. enterocolitica* WA^{RS} Stammes sowie der β -Laktamase-Deletionsmutanten (Tab. 6) und der Komplementanten (WA^{RS} $\Delta ampC$ *pampC* und WA^{RS} $\Delta blaA$ *pblaA*) wurden *Yersinia* ÜNK 1:50 in 5 ml LB-Medium verdünnt und sowohl bei 27 °C und 37 °C (bei 37 °C Zugabe von 0,2 mM CaCl₂) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 5 ml frischem LB-Medium zu einer OD₆₀₀ von 0,05 verdünnt und jeweils 1 ml dieser Bakteriensuspension in die Vertiefung einer 12-well-Platte eingebracht. Zuvor wurden verschiedene Ampicillin-Verdünnungen in LB-Medium hergestellt (Konzentration von 3 - 800 µg/ml). Jeweils 1 ml dieser Verdünnungen wurde zu den Bakteriensuspensionen in der 12-well-Platte gegeben, was in einer Ampicillin-Endkonzentration von 1,5 - 400 µg/ml resultiert. Die Bakterien wurden 12 h bei 27 °C und 37 °C unter Schütteln (100 rpm) inkubiert und anschließend die OD₆₀₀ bestimmt.

MATERIAL UND METHODEN

2.16.2 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Agardiffusionstest

Zur Bestimmung der MHK für Ampicillin, Cefotaxim, Cefoxitin, Cefuroxim, Gentamycin, Imipenem, Tetrazyklin und Ticarcillin/Clavulansäure wurden ÜNK des jeweils zu testenden *Yersinia* Stammes 1:50 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Anschließend erfolgte die Verdünnung der Bakteriensuspensionen zu einer OD₆₀₀ von 0,132 (dies entspricht in etwa einer Trübung von 0,5 nach McFarland) und die Zellen wurden mit einem Wattetupfer auf Mueller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen. Auf die beimpften Agarplatten wurde mit einer ausgeglühten Pinzette ein ETest-Streifen (Biomérieux, Nürtingen) oder ein M.I.C.Evaluator (Oxoid, Wesel) gelegt. Diese skalierten Test-Streifen (5 x 60 mm) sind mit einem Antibiotikagradienten beschichtet, der nach Auflegen des Streifens auf den Nährboden in die Agarmatrix diffundiert. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei 27 °C bewirken die Antibiotika auf den Test-Streifen eine ellipsenförmige Wachstumshemmung im Bakterienrasen. Der MHK-Wert (in µg/ml) konnte jeweils im Bereich des Schnittpunktes der Ellipse mit dem Teststreifen von der Skala abgelesen werden.

2.16.3 Antibiotika-Sensitivitätstest in einer 3D extrazellulären Matrix (3D-CoG)

Y. enterocolitica Stämme mit pYV Plasmid bilden beim Wachstum in einer dreidimensionalen (3D) Kollagen-Matrix (3D-CoG) bei 37 °C dicht-gepackte Mikrokolonien („densely packed microcolonies“). Die 3D extrazelluläre Matrix simuliert eine Gewebe-ähnliche Umgebung und ermöglicht somit Wachstumskonditionen für Bakterien, die näher an der *in vivo*-Situation sind als Wachstum in Kulturmedium (Freund, 2008).

Die gewünschten *Yersinia* Stämme wurden ÜN bei 27 °C in BHI-Medium inkubiert, 1:20 in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm) und in 1 ml RPMI-Medium resuspendiert. 1×10^5 *Yersinia* Zellen der jeweiligen Kulturen wurden mit flüssiger Kollagen-Lösung vermischt und in die Vertiefungen einer 96-well-Platte eingebracht. Diese Platte wurde 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Polymerisation des Kollagens zu ermöglichen. Anschließend wurden die in Kollagen eingebetteten Bakterien mit 200 µl RPMI-Medium bedeckt und ÜN bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das ÜN-Wachstum der Bakterien in der 3D-Matrix wurde mikroskopisch überprüft. Das RPMI-Medium wurde abgenommen und durch 200 µl RPMI-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von Ampicillin, Gentamicin und Cefotaxime ersetzt. Jeweils ein Ansatz

MATERIAL UND METHODEN

wurde mit RPMI-Medium ohne Antibiotika-Zusatz versehen (Negativ-Kontrolle). Die Bakterien in der 96-well-Platte wurden für 8 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und das Wachstum der Mikrokolonien mittels Mikroskopie (Inverses Mikroskop Leica DM IRB) dokumentiert.

2.17 Destabilisierung des bakteriellen Cytoskeletts mit A22

Das bakterielle Aktin homolog MreB kann durch die Verbindung A22 (S-(3,4-dichlorbenzyl)-isothiourea) destabilisiert werden (Iwai, *et al.*, 2002). A22, welches leicht durch Zellmembranen diffundiert, bindet direkt an MreB, wodurch die Polymerisierung der helikal unter der Cytoplasmamembran angeordneten Proteinfilamente reversibel gestört wird (Bean *et al.*, 2009; Gitai *et al.*, 2005). Durch die Destabilisierung von MreB werden indirekt auch Proteine destabilisiert, die mit MreB interagieren oder kolokalisiert sind. Exprimiert man ein mit einem Strep-„tag“ versehenes Protein, das möglicherweise mit MreB kolokalisiert, in *Yersinia* und behandelt diesen Stamm anschließend mit A22, kann mittels Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Strep-„tag“ Antikörper und Fluoreszenzmikroskopie eine mögliche Kolokalisation nachgewiesen werden.

Yersinia ÜNK, die entsprechende Konstrukte tragen, wurden 1:50 in LB-Medium verdünnt und bei 27 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 geschüttelt. Verschiedene Mengen an A22 (1,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml Endkonzentration) wurden der Kultur zugefügt und für weitere 10, 30 und 120 min inkubiert. Ein Ansatz wurde ohne Zugabe von A22 unter gleichen Bedingungen geschüttelt. Eine A22 Stammlösung (1,5 mg/ml) wurde im Lösungsmittel DMSO hergestellt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden 1 ml Proben jedes Ansatzes entnommen und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm). Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung wie oben beschrieben durchgeführt (2.15.2)

2.18 Induktion der β -Laktamase Aktivität

Einige β -Laktamasen können *in vitro* durch bestimmte β -Laktam-Antibiotika induziert werden. Einer dieser Induktoren ist Imipenem, welches aber nicht durch die β -Laktamasen von *Y. enterocolitica* gespalten werden kann. *Y. enterocolitica* ist somit sensitiv gegenüber Imipenem. Um die β -Laktamase-Produktion zu induzieren muss daher eine subinhibitorische Menge von Imipenem (0,5 µg/ml) zugegeben werden und die Bakterien werden dem Antibiotikum nur über 2,5 h ausgesetzt. Als Substrat für die β -Laktamasen wurde das

MATERIAL UND METHODEN

chromophore Cephalosporin Nitrocefin (Oxoid, Wesel) verwendet. Durch Spaltung des β -Laktam-Rings von Nitrocefin durch β -Laktamasen ändert sich die Farbe von gelb zu rot. Die β -Laktamase Aktivität kann daher durch Messung dieses Farbumschlags bei 486 nm quantitativ bestimmt werden.

Y. enterocolitica WA^{RS} und die β -Laktamase-Deletionsmutantanten (Tab. 6) wurden ÜN bei 27 °C in BHI-Medium angezogen, 1:50 in 20 ml LB-Medium unter Zugabe entsprechender Antibiotika verdünnt und bei 27 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,3 inkubiert. Alle Stämme wurden jeweils parallel in zwei Ansätzen angesetzt. Zu jeweils einer der Kulturen wurde Imipenem (Endkonzentration 0,5 μ g/ml) zugefügt und für weitere 2,5 h geschüttelt. Die anderen Kulturen wurden zur Kontrolle ohne Imipenem für den gleichen Zeitraum inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10 ml der Kulturen abzentrifugiert (15 min, 6000 rpm), einmal in 1 x PBS gewaschen, in 2 ml 1 x PBS resuspendiert und die Pellets ÜN bei -20 °C eingefroren. Vor dem Zellaufschluss wurden die Suspensionen auf Eis aufgetaut und mit 1 mM Pepstatin, 1 mM Leupeptin und 1 mM PMSF versetzt, um Proteaseaktivitäten zu inhibieren. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung für 45 s (3 x 15 s mit 30 s Pausen) auf Eis aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (45 min, 10000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und die Gesamtproteinkonzentration (2.9.2) bestimmt. Aktivitätsmessungen wurden mit 50-500 μ g/ml Protein in 1 x PBS + 1 mM EDTA (Endvolumen 1 ml) und Zugabe von 70 μ M Nitrocefin durchgeführt. Die Reaktion wurde 2 min lang anhand der Absorption bei 486 nm verfolgt und sowohl die Anfangssteigung als auch der End-Absorptionswert bestimmt.

2.19 Temperaturabhängige Aktivitätstests von β -Laktamasen

Die β -Laktamase-Aktivität wurde mittels Spaltung von Nitrocefin (wie bereits in 2.18 beschrieben) ermittelt. Aktivitätsmessungen wurden mit 2,5 nM Protein in Messpuffer und Zugabe von 70 μ M Nitrocefin (1 ml Endvolumen) bei Temperaturen von 15-70 °C durchgeführt. Messpuffer mit Protein wurden jeweils 5 min bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert und die Spaltungsreaktion wurde anschließend durch Zugabe von ebenfalls temperiertem Nitrocefin gestartet. Nach Zugabe von Nitrocefin wurde die Substratumsetzung 2 min lang anhand der Absorptionzunahme bei 486 nm registriert. Anschließend wurde für jede Temperatur die Anfangssteigung der Reaktion bestimmt.

2.21 *In silico* Analysen zur Bestimmung von Sec- oder Tat-Signalsequenzen

Computergestützte Vorhersagen zur Unterscheidung zwischen Sec- und Tat-Signalpeptiden wurden mit 4 verschiedenen Programmen durchgeführt:

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

<http://signalfind.org/tatfind.html>

<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/>

Die Programme wurden nach Angaben der Entwickler verwendet.

3 Ergebnisse I

3.1 Konstruktion von β -Laktamase-Deletionsmutanten in *Yersinia enterocolitica* und deren Charakterisierung

3.1.1 Konstruktion von β -Laktamase Deletionsmutanten

Die Gene, die für die β -Laktamasen AmpC und BlaA kodieren, wurden mit der Methode der „ET-Klonierung“ (2.8.10) (Datsenko & Wanner, 2000) deletiert. Die Konstruktion von Deletionsmutanten mit dieser Methode erfordert die Aufnahme eines linearen PCR-Fragments durch die Bakterien, das zum Austausch mittels homologer Rekombination mit dem Zielgen benötigt wird. Bakterielle Restriktions-Modifikationssysteme verdauen eingeschleuste DNA-Fragmente und erschweren somit die genetische Manipulation. Aufgrund dessen wurde zur Deletion der chromosomalen β -Laktamase-Gene der *Y. enterocolitica* Stamm WA^{RS} verwendet. Dieser Stamm ist ein Derivat von *Y. enterocolitica* WA-314, in dem das funktionelle PstI-ähnliche YenI Restriktions-Modifikationssystem deletiert wurde (Antonenko, *et al.*, 2003).

Bei der Konstruktion von *ampC* bzw. *blaA* Einzeldeletionsmutanten wurden die Gene durch eine Kanamycin- bzw. Chloramphenicol-Resistenzgenkassette ersetzt. Da zusätzlich eine *ampC/blaA* Doppeldeletionsmutante hergestellt werden sollte und verschiedene Plasmid-Konstrukte mit zusätzlichen Resistenzgenen in diese Deletionsmutanten eingebracht werden sollten, ist es sinnvoll, die Antibiotika-Selektionsmarker nach Deletion der Zielgene wieder zu entfernen. Dies wird durch Flankieren des Resistenzmarkers durch FRT (FLP recognition target)-Sequenzen ermöglicht. Diese werden durch die ortsspezifische Rekombinase FLP erkannt und die Resistenzgenkassette kann durch Rekombination entfernt werden.

Zunächst wurde jeweils ein lineares PCR-Fragment hergestellt, welches aus der jeweiligen Antibiotika-Resistenzgenkassette, zwei flankierenden Sequenzbereichen, die homolog zu den stromauf- und stromabwärts liegenden Bereichen des zu deletierenden Gens sind, sowie zwei FRT-Sequenzen, besteht. Die zur Amplifikation verwendeten Primer bestehen aus drei Bereichen: Einem Homologiearm von 50 bp am 5'-Ende des Primers, dessen Sequenz mit der des flankierenden Bereichs des zu deletierenden Gens identisch ist. Anschließend folgt eine 34 bp lange FRT Sequenz sowie eine 21 bp lange Region, die zur Amplifikation des Resistenzgenkassette dient. Die Km^r-Kassette wurde von pACYC177

ERGEBNISSE

amplifiziert, die Cm^r-Kassette von pACYC184. Die jeweiligen Resistenzgenkassetten umfassen dabei zusätzlich ihren eigenen Promotor- und Terminatorbereich.

Elektrokompetente *Y. enterocolitica* WA^{RS} wurden mit dem Plasmid pKD46 transformiert, das die beiden Rekombinasesysteme Red α und Red β sowie den Nukleaseinhibitor Red γ kodiert. Die Induktion der Expression der Rekombinasegene erfolgte durch Zugabe von 0,5 % L-Arabinose und die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 in Anwesenheit des Induktors inkubiert. Die Zellen wurden anschließend elektrokompetent gemacht und mit dem jeweiligen linearen PCR-Fragment transformiert. Die Inkubation erfolgte auf antibiotikahaltigen Platten für 1-2 Tage. Kanamycin- bzw. Chloramphenicol-resistente Klone wurden mittels PCR auf Deletion des Zielgens *ampC* bzw. *blaA* getestet und die Mutation mittels Sequenzierung verifiziert.

Trotz vorhandener FRT-Sequenzen wurde der Selektionsmarker sowohl bei der *ampC* als auch *blaA* Einzeldelentionsmutante nicht entfernt, um eine einfache Selektion mittels Antibiotikaresistenz zu ermöglichen. Bei Bedarf kann die Antibiotikakassette jedoch jederzeit entfernt werden.

Zur Herstellung der *ampC/blaA* Doppeldelentionsmutante wurde die Δ *blaA*::Cm^r Mutante verwendet, elektrokompetent gemacht und mit einem linearen PCR-Fragment transformiert, das eine Km^r-Kassette, zwei FRT-Sequenzen sowie Homologiearme flankierend zum *ampC* Gen enthält. Nachfolgend wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Deletion des *ampC* Gens wurde ebenfalls mittels PCR und Sequenzierung überprüft. Anschließend sollte der Km^r-Marker wieder aus dem Genom entfernt werden. Das Plasmid pKD46 wurde mittels Temperaturshift auf 37 °C entfernt und die Δ *ampC*/ Δ *blaA* Mutante mit dem Vektor pCP20 transformiert. Dieses Plasmid kodiert für die temperaturabhängig induzierbare FLP Rekombinase. Die Bakterien wurden bei 42 °C inkubiert und auf kanamycinhaltigen und -freien Platten selektioniert. Deletionsmutanten, die nicht mehr in Gegenwart von Kanamycin wachsen können, wurden mittels PCR und Sequenzierung auf Verlust des Resistenzgens überprüft. Nach Eliminierung des Resistenzmarkers bleibt eine 34 bp lange FRT Sequenz im Genom zurück. Die Cm-resistente Doppelmutante WA^{RS} Δ *ampC*/ Δ *blaA* wird nachfolgend als WA^{RS} $\Delta\Delta$ bezeichnet.

3.1.2 Ampicillin-Sensitivitätstest in Flüssigkultur

Um den Beitrag der β -Laktamase-Gene zur Resistenz von *Y. enterocolitica* WA-314 gegenüber Ampicillin zu untersuchen, wurde mit dem Wildtyp Stamm, den beiden

ERGEBNISSE

β -Laktamase-Einzeldelentionsmutanten sowie der Doppeldelentionsmutante ein Ampicillin-Sensitivitätstest in Flüssigkultur durchgeführt (2.16.1). Für den Test wurden die *Yersinia* Kulturen über Tag bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert, anschließend 1:10 in LB-Medium verdünnt und verschiedene Mengen an Ampicillin zugegeben. Die Ampicillin-Konzentrationen betragen bei diesem Test 1,5 - 400 $\mu\text{g/ml}$, die durch eine geometrische Verdünnungsreihe von Ampicillin in LB-Medium hergestellt wurden. Die Kulturen wurden anschließend 12 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Test wurde sowohl bei 27 °C (Wachstumsoptimum für Yersinien) als auch bei 37 °C (Temperaturbedingung bei Infektion) durchgeführt. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Expression von Genen, die auf dem pYV Virulenzplasmid kodiert liegen, Einfluss auf die Ampicillin-Empfindlichkeit der Yersinien haben. Dafür wurde das pYVO8 (Km^r)-Plasmid in die β -Laktamase-Deletionsmutanten eingebracht und diese Stämme zusammen mit pYV Plasmid-positiven WA-314 Wildtyp Stamm auf Ampicillin-Empfindlichkeit getestet. Die pYV-positiven Stämme wurden ebenfalls sowohl bei 27 °C als auch bei 37 °C getestet. Die Ergebnisse des Ampicillin-Sensitivitätstests sind in Abb. 8 zusammengefasst.

ERGEBNISSE

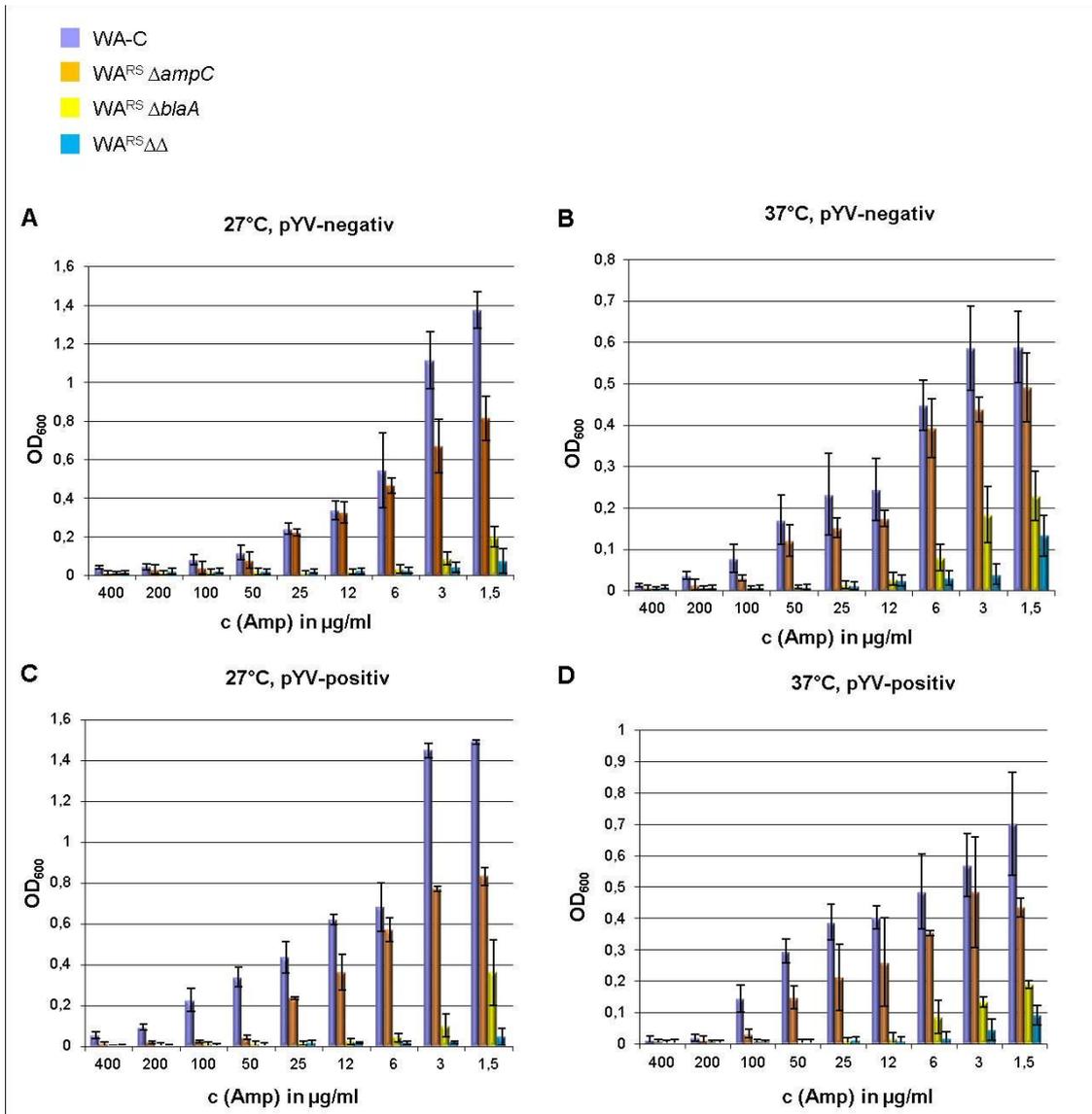


Abb. 8: Ampicillin-Sensitivitätstest in Flüssigkultur

Das Wachstum von *Y. enterocolitica* WA-314, WA^{RS}ΔampC, WA^{RS}ΔblaA und WA^{RS}ΔΔ wurde in LB-Medium in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Ampicillin (1,5 – 400 µg/ml) getestet. Tests wurden bei 27 °C (**A** und **C**) und 37 °C (**B** und **D**) sowie mit pYV Virulenzplasmid-positiven (**C** und **D**) und –negativen (**A** und **B**) Stämmen durchgeführt. Die OD wurde nach 12 h Wachstum bei 600 nm bestimmt. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt und die gemittelten Werte aufgetragen. Fehlerbalken: ±Standardabweichung.

Die Auswertung des Ampicillin-Sensitivitätstest ergibt zunächst, dass die Anwesenheit des pYV Virulenzplasmids bei beiden Temperaturen im Vergleich zu den pYV-negativen Stämmen keine Auswirkung auf die Ampicillinresistenz des Wildtyp Stamms oder der β-Laktamase-Deletionsmutanten hat. Vergleicht man das Wachstum der Stämme bei beiden Temperaturen, stellt man fest, dass die Yersinien bei 37 °C langsamer wachsen als bei

ERGEBNISSE

27 °C. Dennoch ist bei 27 °C und 37 °C kein Unterschied zwischen den Stämmen in der Ampicillin-Empfindlichkeit festzustellen.

Vergleicht man nun die Stämme bei einer Bedingung untereinander, zeigen sowohl der $WA^{RS}\Delta blaA$ als auch der $WA^{RS}\Delta\Delta$ Stamm eine deutlich herabgesetzte Ampicillinresistenz gegenüber dem Wildtyp und $WA^{RS}\Delta ampC$ Stamm. Der $WA^{RS}\Delta\Delta$ Stamm zeigt dabei eine noch höhere Empfindlichkeit als der $WA^{RS}\Delta blaA$ Stamm. Beim $WA^{RS}\Delta ampC$ Stamm ist eine geringer ausgeprägte Reduktion in der Ampicillinresistenz im Vergleich zum Wildtyp Stamm festzustellen.

3.1.3 MHK-Bestimmung mittels Agardiffusionstest

Der Ampicillin-Sensitivitätstest in Flüssigkultur (3.1.2) gibt Hinweise, inwieweit die β -Laktamase-Deletionsmutanten Unterschiede in der Ampicillinresistenz gegenüber dem Wildtyp aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die $WA^{RS}\Delta blaA$ Einzelmutante sowie die $WA^{RS}\Delta\Delta$ Doppelmutante deutlich sensitiver gegenüber Ampicillin sind als der Wildtyp. Um die einzelnen Mutanten genauer zu charakterisieren und auch die Empfindlichkeit gegenüber anderen β -Laktam-Antibiotika zu testen, wurden die MHKs (Minimale Hemmkonzentration) gegenüber verschiedener Antibiotika bestimmt. Die MHK ist definiert als die Konzentration eines Antibiotikums, die das Wachstum eines Bakteriums gerade noch hemmt (Andrews, 2001). Zur Bestimmung der MHK nach dem Agardiffusionsverfahren wurden mit dem zu testenden Bakterienstamm beimpfte Agarplatten mit einem Antibiotika-Teststreifen versehen (2.16.2). Dieser skalierte Teststreifen ist mit einem Antibiotikagradienten versehen, der nach Auflegen in den Agar diffundieren kann. Der MHK-Wert kann nach einer Inkubationszeit von 12 h bei 27 °C anhand des Schnittpunktes der ellipsenförmigen Wachstumshemmung mit dem Teststreifen bestimmt werden.

Die MHKs des pYV-negativen parentalen WA^{RS} Stammes sowie der pYV-negativen β -Laktamase-Deletionsmutanten gegenüber Tetrazyklin, Gentamicin, Ampicillin, Cefotaxim, Cefuroxim, Cefoxitin, Imipenem und Ticarcillin/Clavulonsäure wurden bestimmt und sind in Tab. 17 zusammengefasst. Die Testung mit Tetrazyklin (aromatisches Polyketid-Antibiotikum) und Gentamicin (Aminoglycosid-Antibiotikum) diente als Kontrolle, um die Empfindlichkeit der Stämme gegenüber Nicht- β -Laktam-Antibiotika nachzuweisen: Sowohl WA^{RS} als auch die Mutanten sind gleichermaßen empfindlich gegenüber Tetrazyklin (MHK=1,5 μ g/ml) und Gentamicin (MHK=2 μ g/ml). Die höchste MHK von Ampicillin wurde für den parentalen Stamm WA^{RS} bestimmt (MHK=4 μ g/ml). Im Vergleich dazu wies $WA^{RS}\Delta ampC$

ERGEBNISSE

eine 1,3-fache (MHK=3 µg/ml), $WA^{RS}\Delta blaA$ eine 10-fache (MHK=0,38 µg/ml) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ eine 21-fache (MHK=0,19 µg/ml) Reduktion in der Ampicillinresistenz auf. Keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen WA^{RS} und den Mutanten Stämmen wurden für die Cephalosporine der 2. Generation Cefuroxim (MHK=0,5-1 µg/ml) und Cefoxitin (MHK=1,5-2 µg/ml) sowie für das Cephalosporin der 3. Generation Cefotaxim (MHK=0,023-0,064 µg/ml) festgestellt. Ebenfalls zeigten sich keine Unterschiede im Antibiotika-Empfindlichkeitsprofil im Test mit dem Carbapenem Imipenem (MHK=0,38 µg/ml). Das Carboxy-Penicillin Ticarcillin in Kombination mit dem β -Laktamase-Inhibitor Clavulansäure inhibiert ebenfalls das Wachstum von WA^{RS} und den Mutanten gleichermaßen (MHK=1,5 µg/ml).

Tab. 17: MHK-Daten von *Y. enterocolitica* Stämmen (Agardiffusionstest).

Die MHK-Werte gegenüber acht ausgewählter Antibiotika für den parentalen Stammes WA^{RS} sowie die β -Laktamase-Deletionsmutanten wurden mittels des Agardiffusionstests bestimmt. Beimpfte Agarplatten wurden mit einem Antibiotika-Teststreifen versehen und der MHK-Wert nach einer Inkubationszeit von 12 h bei 27 °C abgelesen.

Antibiotikum	MHK-Werte (µg/ml)			
	Stämme			
	WA^{RS}	$WA^{RS}\Delta ampC$	$WA^{RS}\Delta blaA$	$WA^{RS}\Delta\Delta$
Tetrazyklin	1,5	1,5	1,5	1,5
Gentamicin	2	2	2	2
Ampicillin	4	3	0,38	0,19
Cefuroxim	1	1	0,75	0,5
Cefoxitin	2	1,5	2	1,5
Cefotaxim	0,064	0,032	0,023	0,032
Imipenem	0,38	0,38	0,38	0,38
Ticarcillin/ Clavulonsäure	1,5	1,5	1,5	1,5

Die Daten der MHK-Testung zeigen, dass die β -Laktamasen AmpC und BlaA einen synergistischen Effekt bei Vermittlung der Ampicillinresistenz haben, BlaA jedoch dominant zu sein scheint (vgl. Tab. 17). Da die Doppeldeletionsmutante gänzlich Ampicillin-sensitiv ist, kann davon ausgegangen werden, dass kein anderer Resistenzmechanismus involviert ist. Außerdem kann keine der β -Laktamasen Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 2. und 3. Generation sowie Imipenem vermitteln.

ERGEBNISSE

3.1.4 Antibiotika-Sensitivitätstest mittels standardisiertem Phoenix-System

Um die gewonnenen Daten aus der MHK-Bestimmung mittels Agardiffusionstest (3.1.3) zu verifizieren bzw. zu ergänzen, wurden die MHKs des pYV Plasmid-negativen Wildtyp-Stammes WA-C, des parentalen WA^{RS} Stammes und der β -Laktamase-Deletionsmutanten gegenüber einer Vielzahl verschiedener Gruppen von β -Laktam-Antibiotika (siehe auch 1.3.1.1) und weiterer Antibiotika mit einem automatisierten Antibiotika-Empfindlichkeitstestsystem, dem Phoenix System (BD Bioscience, Heidelberg) bestimmt (Tab. 18).

Tab. 18: MHK-Daten von *Y. enterocolitica* Stämmen (Phoenix).

Die MHK-Werte gegenüber ausgewählter Antibiotika für den parentalen Stammes WA^{RS} sowie die β -Laktamase-Deletionsmutanten wurden mittels des automatisierten Phoenix-Systems (Durchführung nach Herstellerangaben) ermittelt.

Antibiotikum	MHK-Werte ($\mu\text{g/ml}$)				
	Stämme				
	WA-C	WA ^{RS}	WA ^{RS} $\Delta ampC$	WA ^{RS} $\Delta blaA$	WA ^{RS} $\Delta\Delta$
Ampicillin	8	8	8	4	4
Ampicillin/ Sulbactam	4	4	4	4	4
Aztreonam	2	2	2	2	2
Cefazolin	>16	>16	>16	8	4
Cefotaxim	4	4	4	4	4
Cefuroxim	4	4	4	4	4
Cefepim	2	2	2	2	2
Ceftazidim	4	4	4	4	4
Ciprofloxacin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fosfomycin	16	16	16	16	16
Gentamicin	2	2	2	2	2
Imipenem	1	1	1	1	1
Meropenem	1	1	1	1	1
Piperacillin	4	4	4	4	4
Piperacillin/ Tazobaktam	4	4	4	4	4
Tetrazyklin	2	2	2	2	2

ERGEBNISSE

Zunächst wird aus den mittels Phoenix-System ermittelten MHK-Daten ersichtlich, dass der WA-C Stamm und WA^{RS} keinerlei Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber der hier getesteten Antibiotika aufweisen. Im Folgenden wird der WA-C Stamm bezüglich der Antibiotika-Empfindlichkeit mit WA^{RS} gleichgesetzt. In der Ampicillin-Empfindlichkeit zeigt sich ein Unterschied zwischen WA^{RS} bzw. WA^{RS} $\Delta ampC$ (MHK=8 μ g/ml) zu WA^{RS} $\Delta blaA$ bzw. WA^{RS} $\Delta\Delta$ (MHK=4 μ g/ml). Der WA^{RS} $\Delta blaA$ und der WA^{RS} $\Delta\Delta$ Stamm zeigen also eine herabgesetzte Ampicillin-Resistenz gegenüber des WA^{RS} und WA^{RS} $\Delta ampC$ Stammes. Dies konnte bereits durch die im Agardiffusionstest ermittelten MHK-Daten gezeigt werden, allerdings in einer deutlicheren Ausprägung (siehe Tab. 17). Die beim Agardiffusionstest gezeigten Unterschiede in der Ampicillin-Empfindlichkeit zwischen WA^{RS} $\Delta blaA$ und WA^{RS} $\Delta\Delta$ sowie zwischen WA^{RS} und WA^{RS} $\Delta ampC$ konnten mit dem Phoenix-System nicht gezeigt werden. Vergleicht man die MHK-Daten von Ampicillin mit den MHK-Daten von Ampicillin in Kombination mit dem β -Laktamase Hemmer Sulbactam (Tab. 18), so wird ersichtlich, dass WA^{RS} und WA^{RS} $\Delta ampC$ in Gegenwart des Hemmers (MHK=4 μ g/ml) empfindlicher gegenüber Ampicillin sind, als in Abwesenheit des Hemmers (MHK=8 μ g/ml). WA^{RS} $\Delta blaA$ und WA^{RS} $\Delta\Delta$ sind dagegen in An- oder Abwesenheit von Sulbactam gleichermaßen empfindlich gegenüber Ampicillin. Die deutlichsten Unterschiede in den MHK-Werten des parentalen Stammes und der Deletionsmutanten sind hingegen bei der Testung mit dem Cephalosporin der 1. Generation, Cefazolin, zu erkennen: WA^{RS} $\Delta blaA$ (MHK=8 μ g/ml) und WA^{RS} $\Delta\Delta$ (MHK=4 μ g/ml) sind deutlich empfindlicher als WA^{RS} und WA^{RS} $\Delta ampC$ (MHK>16 μ g/ml). Beim MHK-Test mit Cefazolin wird wie für Ampicillin im Agardiffusionstest (Tab. 17) ein Unterschied im Empfindlichkeitsprofil zwischen den Deletionsmutanten WA^{RS} $\Delta blaA$ und WA^{RS} $\Delta\Delta$ (MHK=4 μ g/ml) deutlich. Bei keinen der im Phoenix getesteten Antibiotika konnte ein Unterschied in den MHKs zwischen WA^{RS} und WA^{RS} $\Delta ampC$ festgestellt werden.

Die *Yersinia* Stämme zeigten sich im MHK-Test mit allen weiteren getesteten Antibiotika gleichermaßen empfindlich.

3.1.5 Komplementation der β -Laktamase Mutanten

Die beiden β -Laktamase Einzelmutanten WA^{RS} $\Delta ampC$ und WA^{RS} $\Delta blaA$ wurden *in trans* mit dem Plasmid pACYC184, in das das jeweilige Gen kloniert wurde, komplementiert. Für die Klonierung wurde das gesamte *ampC*- bzw. *blaA*-Gen mit Promotor- und Terminatorregion

ERGEBNISSE

(157 bp vor und 126 bp nach *ampC* bzw. 156 bp vor und 52 bp nach *blaA*) von chromosomaler DNA aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert. Dabei wurden die Restriktionsschnittstellen für *PvuII* durch Überhänge der Primer stromauf- und stromabwärts der Gensequenz angefügt. Die jeweiligen PCR-Fragmente wurden mit *PvuII* verdaut und in *PvuII* verdauten pACYC184 kloniert. Die korrekte Sequenz der so entstandenen Plasmide *pampC* und *pblaA* wurde durch Sequenzierung bestätigt. *pampC* wurde in elektrokompetente $WA^{RS}\Delta ampC$ und *pblaA* in $WA^{RS}\Delta blaA$ transformiert und die Ampicillin-Sensitivität der so entstandenen Stämme in Flüssigkultur und mittels Agardiffusionstest bestimmt. Die Ergebnisse des Tests in Flüssigkultur sind in Abb. 9 gezeigt. Die Ergebnisse des Agardiffusionstests sind: WA^{RS} (MHK=4 µg/ml), $WA^{RS}\Delta ampC$ (*pampC*) (MHK=4 µg/ml) und $WA^{RS}\Delta blaA$ (*pblaA*) (MHK=32 µg/ml).

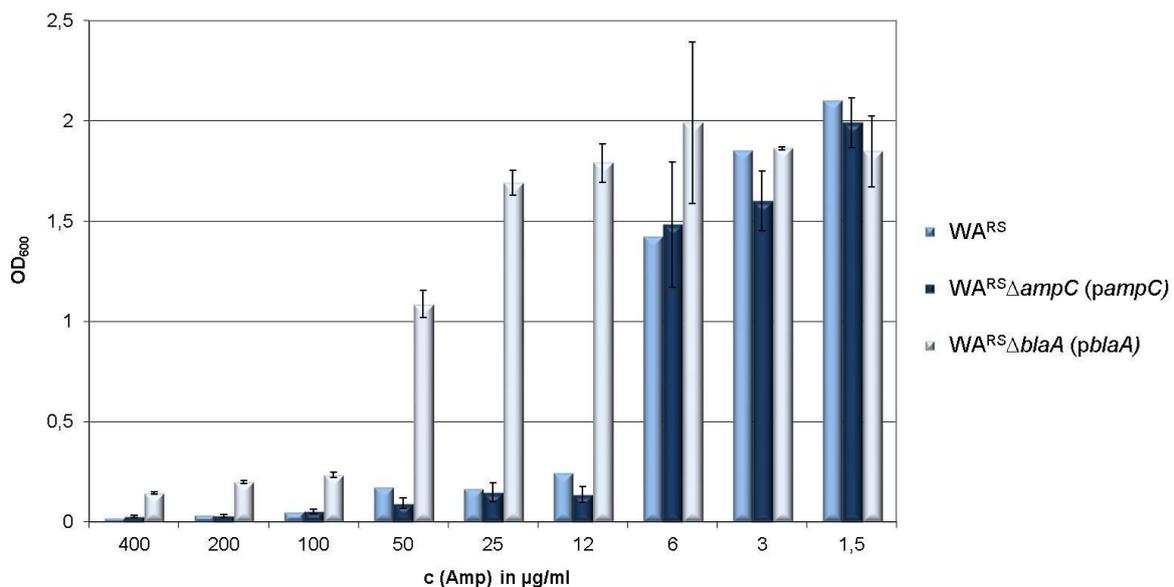


Abb. 9: Ampicillin-Sensitivitätstest der Komplementanten in Flüssigkultur

Das Wachstum von *Y. enterocolitica* WA^{RS} , $WA^{RS}\Delta ampC$ (*pampC*) und $WA^{RS}\Delta blaA$ (*pblaA*) erfolgte in LB-Medium in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Ampicillin (1,5-400 µg/ml). Die Tests wurden bei 27 °C mit pYV Plasmid-negativen Stämmen durchgeführt. Die OD wurde nach 12 h Wachstum bei 600 nm bestimmt. Drei Datenreihen von unabhängigen Kulturen wurden gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: ±Standardabweichung.

Sowohl aus den MHK-Bestimmungen mittels Agardiffusionstest als auch beim Antibiotika-Sensitivitätstest in Flüssigkultur ist ersichtlich, dass der $WA^{RS}\Delta ampC$ (*pampC*) Stamm in der Lage ist, den WA^{RS} Phänotyp hinsichtlich der Ampicillin-Resistenz wiederherzustellen. Dahingegen zeigt der $WA^{RS}\Delta blaA$ (*pblaA*) Stamm eine deutliche erhöhte Ampicillin-

ERGEBNISSE

Resistenz. Der MHK-Wert beträgt 32 µg/ml (im Vergleich: WA^{RS} MHK=4 µg/ml) und beim Sensitivitätstest in Flüssigkultur ist bei Ampicillin-Konzentrationen zwischen 12 und 50 µg/ml ein deutlich stärkeres Wachstum im Vergleich zu WA^{RS} zu erkennen. Dieser trans-komplementierte Phänotyp von WA^{RS}Δ*blaA* (*pblaA*) könnte dadurch zu erklären sein, dass das Klonierungsplasmid pACYC184 mit 10-12 Kopien in der Bakterienzelle vorliegt. Somit ist auch *blaA* – welches für die konstitutiv exprimierte β-Laktamase BlaA (Pham, *et al.*, 2000, Bent & Young, 2010) kodiert – in höherer Kopienzahl vorhanden und könnte somit den stark Ampicillin-resistenten Phänotyp verursachen.

3.1.6 Antibiotika-Sensitivitätstest im 3D Kollagengel (3D-CoG)

Scavizzi, *et al.* beschrieben 1987 eine Widersprüchlichkeit zwischen der β-Laktam-Antibiotika Empfindlichkeit von *Y. enterocolitica* O:8 *in vitro* und *in vivo*: Imipenem und Cefotaxim können das Wachstum der Bakterien *in vitro* hemmen, die Vermehrung der Bakterien *in vivo* im Mausmodell wird jedoch bei Verabreichung dieser Antibiotika nicht beeinträchtigt. Yersinien, die nach der Mausinfektion aus dem Tier isoliert wurden, zeigten erneut Empfindlichkeit gegenüber beiden Antibiotika *in vitro*. Scavizzi, *et al.* (1987) beschrieben dieses Phänomen, konnten aber keinen Mechanismus zur Erklärung dieser Beobachtung liefern.

Mit denen in dieser Arbeit konstruierten β-Laktamase-Deletionsmutanten kann die *in vitro/in vivo*-Widersprüchlichkeit in der β-Laktam-Antibiotika-Empfindlichkeit erneut untersucht werden. Dazu wurden zunächst Antibiotika-Sensitivitätstests im 3D-CoG durchgeführt. Das 3D Kollagengel simuliert Gewebe-ähnliche Bedingungen und damit die *in vivo* Situation. *Y. enterocolitica* Stämme, die das pYV Virulenzplasmid tragen, bilden beim Wachstum im 3D Kollagengel bei 37 °C dicht gepackte Mikrokolonien („densely packed microcolonies“) aus (Freund, *et al.*, 2008). Das Wachstumsverhalten von Yersinien im 3D-CoG ähnelt dem Wachstumsverhalten der Bakterien im infizierten Mausgewebe (Mikrokolonien).

pYV-positive *Y. enterocolitica* WA^{RS} (pYV) und die Deletionsmutanten wurden bei 37 °C im 3D-CoG ÜN inkubiert und die Bildung von dicht gepackten Mikrokolonien wurde am nächsten Tag am Mikroskop (Inverses Mikroskop DM IRB) überprüft und dokumentiert. RPMI-Medium mit verschiedenen Verdünnungen von Ampicillin (1; 10 und 100 µg/ml) oder Cefotaxim (0,5; 2; 10 und 50 µg/ml) wurde auf die Bakterien innerhalb der 3D-Matrix gegeben und 8 h bei 37 °C inkubiert. Die Ampicillin-Empfindlichkeit im 3D-CoG wurde für WA^{RS} (pYV) sowie für alle drei β-Laktamase-Deletionsmutanten (jeweils pYV-positiv)

ERGEBNISSE

getestet; Cefotaxim-Empfindlichkeit wurde für WA^{RS} (pYV) und die Doppeldeletionsmutante $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) bestimmt. Um das kontinuierliche Wachstum der Bakterien innerhalb des 3D-CoG zu überprüfen, wurden als Kontrollen jeweils WA^{RS} (pYV) und die pYV-positiven Mutanten ohne Antibiotika-Zugabe für 8 h bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum ohne Antibiotika diente gleichzeitig auch als Referenz, um die Auswirkungen des jeweiligen Antibiotikums bzw. dessen Konzentration auf das Wachstum der Mikrokolonien zu bestimmen. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Empfindlichkeit der Yersinien gegenüber einem Nicht- β -Laktam-Antibiotikum innerhalb des 3D-CoG getestet: Die Bakterien wurden über 8 h bei 37 °C in Anwesenheit von 20 μ g/ml Gentamicin inkubiert. Gentamicin-Sensitivität von WA^{RS} (pYV) und der Deletionsmutanten *in vitro* wurde in 3.1.3 gezeigt.

ERGEBNISSE

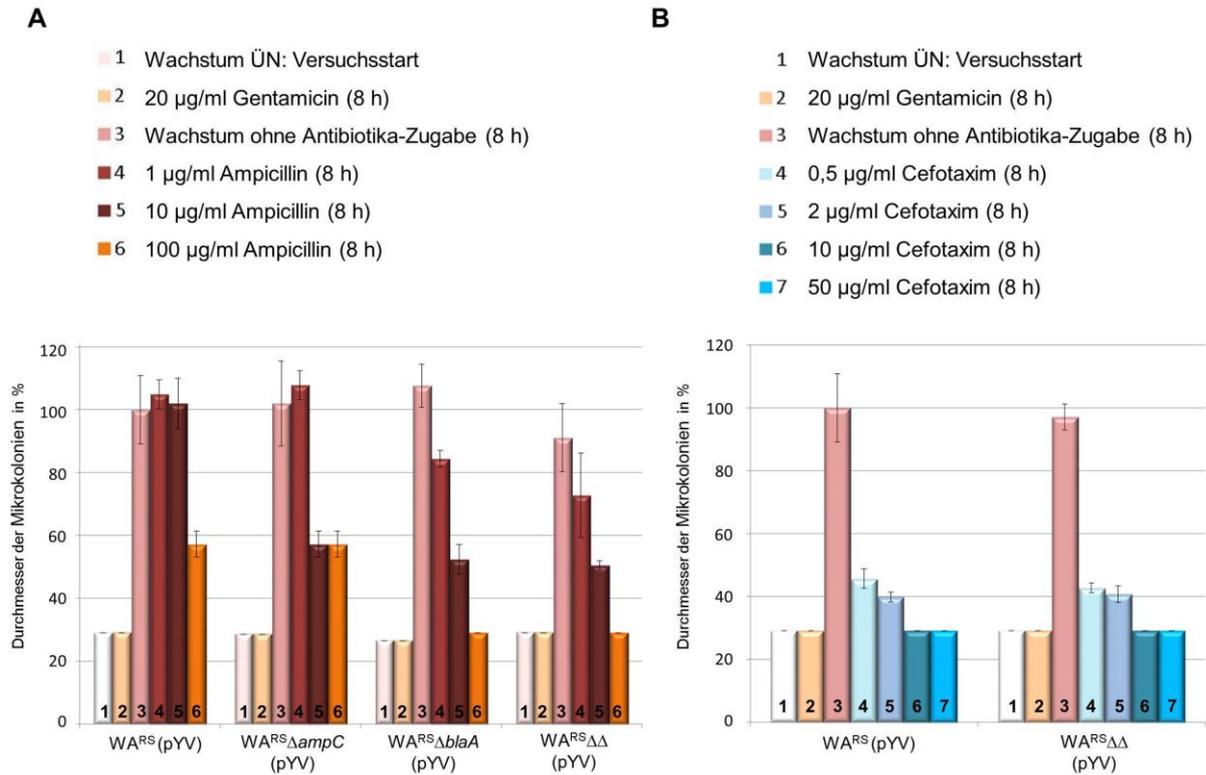


Abb. 10: Wachstum und Antibiotika-Empfindlichkeit von *Y. enterocolitica* Stämmen im 3D-Kollagen gel.

A: Das Wachstum von *Y. enterocolitica* WA^{RS} (pYV), WA^{RS} Δ ampC (pYV), WA^{RS} Δ blaA (pYV) und WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV) wurde in einer 3D-Kollagenmatrix unter Zugabe verschiedener Verdünnungen von Ampicillin wie angegeben untersucht und **B:** das Wachstum von WA^{RS} (pYV) und WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV) wurden unter Zugabe verschiedener Verdünnungen von Cefotaxim wie angegeben untersucht. Zugabe von 20 µg/ml Gentamicin diente jeweils als Referenz für hohe Bakterizidität. Die Bakterien wurden bei 37 °C zunächst ÜN (Versuchsstart) und anschließend unter Zugabe verschiedener Konzentrationen an Ampicillin und Cefotaxim für 8 h bei 37 °C im 3D-CoG inkubiert. Das Wachstum der Mikrokolonien wurde am Mikroskop beobachtet und der Durchmesser der Mikrokolonien bestimmt. Der Durchmesser der Mikrokolonien nach 8 h Wachstum nach Versuchsstart ohne Antibiotika-Zugabe wurde als 100 % festgesetzt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung

Die Auswertung der Ergebnisse des Antibiotika-Sensitivitätstests im 3D-CoG sind in Abb. 10 gezeigt. Die Durchmesser der Mikrokolonien wurden graphisch dargestellt, wobei der Durchmesser der Mikrokolonien nach 8 h Wachstum nach Versuchsstart ohne Antibiotika-Zugabe als Referenz auf 100 % festgesetzt wurde. Vergleicht man die Größe der jeweiligen Mikrokolonien des ÜN-Wachstums (Versuchsstart) und nach 8 h über Tag, so ergibt sich für alle getesteten Stämme eine Größenzunahme um das ungefähr 4-fache. Als bakterizide Kontrolle wurde das Wachstum der Bakterien unter Zugabe von Gentamicin getestet. Es wurde bereits gezeigt, dass WA-C und die Deletionsmutanten beim Agardiffusionstest

ERGEBNISSE

gleichermaßen hoch Gentamicin-sensibel sind (Tab. 17). Auch beim Wachstum im Kollagengel unter Zugabe von 20 µg/ml Gentamicin für 8 h zeigte sich, dass alle getesteten Stämme Gentamicin-sensibel sind. Die Größe der Mikrokolonien entsprach in etwa dem ÜN-Wachstum, d.h. nach Zugabe von Gentamicin erfolgte kein Wachstum. Die Mikrokoloniegröße von WA^{RS} (pYV) in Gegenwart von 1 und 10 µg/ml Ampicillin war nahezu identisch mit der Mikrokoloniegröße ohne Ampicillin-Zugabe. Bei Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin war nach 8 h eine Wachstumshemmung im Vergleich zum Wachstum von WA^{RS} (pYV) ohne Ampicillin festzustellen; die Mikrokolonien waren in etwa halb so groß.

In Gegenwart von 1 µg/ml Ampicillin waren keine Unterschiede zwischen der Mikrokoloniegröße von WA^{RS}Δ*ampC* (pYV), WA^{RS}Δ*blaA* (pYV) und WA^{RS}ΔΔ (pYV) festzustellen und nur eine leichte Reduktion der Mikrokoloniegröße im Vergleich zu den Stämmen ohne Antibiotikazugabe zu verzeichnen. Bei Zugabe von 10 µg/ml Ampicillin verhielten sich alle drei β-Laktamase-Deletionsmutanten im Wachstum ebenfalls identisch, es ist jedoch Reduktion der Mikrokoloniegröße im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Ampicillin-Zugabe zu sehen: die Mikrokolonien bei Zugabe von 10 µg/ml Ampicillin waren in etwa halb so groß wie die Mikrokolonien ohne Ampicillin-Zugabe. Zugabe von 100 µg/ml führte bei WA^{RS}Δ*ampC* (pYV) zu einer Reduktion der Mikrokoloniegröße, die der Hemmung von WA^{RS} (pYV) bei gleicher Ampicillin-Zugabe entspricht. Im Vergleich zu den Mikrokolonien ohne Ampicillin-Zugabe waren in beiden Fällen die Kolonien nur halb so groß. Zugabe von 100 µg/ml führte hingegen bei WA^{RS}Δ*blaA* (pYV) und WA^{RS}ΔΔ (pYV) zu einer signifikanten Reduktion der Mikrokoloniegröße: Die Größe der Mikrokolonien entsprach dem ÜN-Wachstum, d.h. Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin zu diesen Deletionsmutanten inhibierte das Wachstum vollständig.

WA^{RS} (pYV) und WA^{RS}ΔΔ (pYV) zeigten beim Wachstum in Gegenwart von Cefotaxim bei allen Konzentrationen keine Unterschiede: Alle Stämme sind gleichermaßen Cefotaxim-empfindlich. Bei beiden Stämmen zeigte sich in Gegenwart von 0,5 µg/ml und 2 µg/ml Cefotaxim eine Wachstumshemmung: Die Mikrokolonien waren in etwa ein Drittel so groß wie die der Kontrollgruppen ohne Antibiotika-Zugabe. Zugabe von 10 µg/ml und 50 µg/ml führte bei beiden Stämmen zu einer erheblichen Beeinträchtigung im Wachstum. Die Mikrokolonien waren in etwa so groß wie nach dem ÜN Wachstum (Versuchsstart).

Vergleicht man die Ergebnisse aus dem 3D-CoG mit denen aus dem Ampicillin-Sensitivitätstest in Flüssigkultur (Abb. 8) bei Zugabe von 10 µg/ml bzw. 12 µg/ml Ampicillin, so sind Unterschiede erkennbar: Im 3D-CoG zeigten sich alle drei β-Laktamase Deletionsmutanten in Gegenwart von 10 µg/ml Ampicillin gleichermaßen sensibel, wobei im

ERGEBNISSE

Vergleich zu WA^{RS} (pYV) eine Reduktion der Mikrokoloniegröße von ca. 50 % beobachtet wurde. Beim Sensitivitätstest in Flüssigkultur (pYV-positiv, 37 °C, Abb. 8D) hingegen wurden $WA^{RS}\Delta blaA$ (pYV) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) bei Zugabe von 12 µg/ml im Vergleich zu WA^{RS} (pYV) in ihrem Wachstum nahezu komplett inhibiert. $WA^{RS}\Delta ampC$ (pYV) zeigte bei dieser Ampicillin-Konzentration im Vergleich zu $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) lediglich eine Wachstumshemmung um ca. 35 %. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass Zugabe von 10-12 µg/ml Ampicillin das Wachstum der β -Laktamase-Deletionsmutanten in Flüssigkultur und in der 3D-CoG unterschiedlich beeinflusst.

Keine Unterschiede waren im 3D-CoG und im Agardiffusionstest (Tab. 17) bei Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von Cefotaxim zu erkennen: Cefotaxim hemmt das Wachstum von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) und der β -Laktamase-Deletionsmutanten gleichermaßen.

3.1.7 Induktion der β -Laktamasen

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass *Y. enterocolitica* Biovar 1B Stämme eine konstitutiv exprimierte Klasse A β -Laktamase BlaA sowie eine induzierbare Cephalosporinase AmpC besitzen (Pham, *et al.*, 2000, Bent & Young, 2010). Charakteristisch für eine induzierbare β -Laktamase ist, dass sie unter normalen Wachstumsbedingungen nur sehr schwach exprimiert wird, die Expression in Anwesenheit bestimmter β -Laktam-Antibiotika jedoch hochreguliert wird. β -Laktamase Induktoren sind z.B. Imipenem. Yersinien sind jedoch Imipenem-sensibel, d.h. Imipenem kann nicht durch die β -Laktamasen gespalten werden. Um die Anwesenheit von induzierbaren β -Laktamasen in Flüssigkultur nachweisen zu können, muss daher eine subinhibitorische Menge an Imipenem (0,5 µg/ml) zugegeben werden und die Bakterien werden nur für 2,5 h in Anwesenheit des Antibiotikums inkubiert (Pham & Bell, 1992, Stock & Wiedemann, 2000). Zum Nachweis der β -Laktamase-Aktivität wurde das chromophore Cephalosporin Nitrocefin verwendet. Bei Spaltung von Nitrocefin durch β -Laktamasen ändert sich die Farbe von gelb zu rot und die Substratumsetzung kann daher spektrometrisch bei 486 nm bestimmt werden.

Die Anwesenheit einer induzierbaren β -Laktamase wurde im *Y. enterocolitica* WA^{RS} Stamm sowie in den drei β -Laktamase-Deletionsmutanten getestet. Yersinien ÜNK wurden in LB-Medium verdünnt und unter Zugabe entsprechender Antibiotika bis zu einer OD_{600} von 0,2-0,3 kultiviert. Nach Zugabe von Imipenem (Endkonzentration 0,5 µg/ml) erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt von 2,5 h. Parallel wurde jeweils ein Ansatz ohne Imipenem-Zugabe über den gleichen Zeitraum inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen zentrifugiert, mittels

ERGEBNISSE

Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Zellysate für β -Laktamase-Aktivitätsmessungen mit Nitrocefin als Substrat verwendet. Die enzymatische Reaktion wurde nach Zugabe von Nitrocefin über 2 min bei 486 nm gemessen und anschließend die Aktivitäten (in $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$) berechnet.

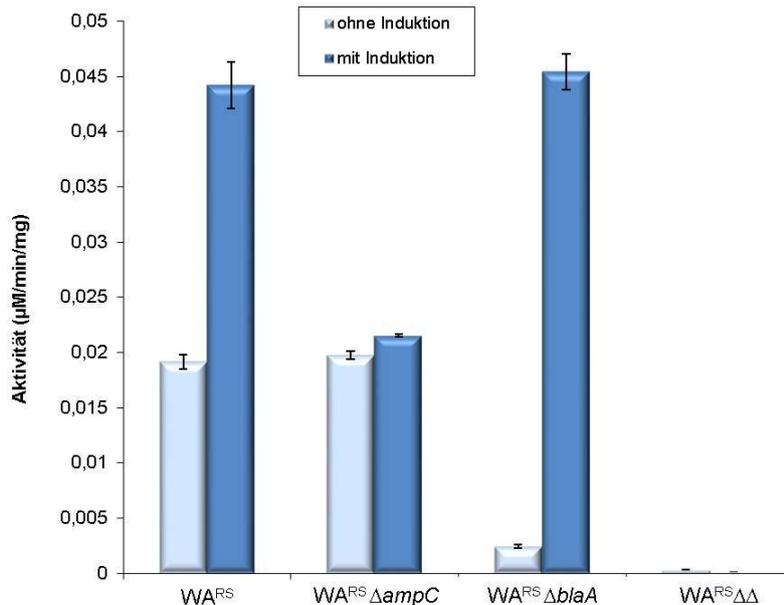


Abb. 11: β -Laktamase-Induktion in Flüssigkultur.

Y. enterocolitica W^{RS} , $W^{RS}\Delta ampC$, $W^{RS}\Delta blaA$ und $W^{RS}\Delta\Delta$ wurden in LB-Medium bei 27 °C bis zu einer OD_{600} von 0,2-0,3 kultiviert und anschließend jeweils ein Ansatz mit Imipenem (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und ohne Imipenem für 2,5 h weiter inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert, mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Zellysate in Aktivitäts-Assays eingesetzt. Als β -Laktamase-Substrat wurde Nitrocefin verwendet. Die Reaktion wurde über 2 min bei 486 nm gemessen und anschließend die Aktivitäten (in $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$) berechnet. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt und gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

Der induzierte W^{RS} Stamm zeigte eine 2,5-fache Erhöhung der β -Laktamase-Aktivität im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen. In Abwesenheit der β -Laktamase AmpC ($W^{RS}\Delta ampC$) ist kein Unterschied zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen zu beobachten. Vergleicht man induzierte und nicht-induzierte Zellen des $W^{RS}\Delta blaA$ Stammes, so lässt sich eine 18-fache Erhöhung der β -Laktamase-Aktivität im induzierten Zustand feststellen. Im $W^{RS}\Delta\Delta$ Stamm ist keine β -Laktamase-Aktivität festzustellen (Abb. 11). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl im W^{RS} als auch im $W^{RS}\Delta blaA$ Stamm die β -Laktamase AmpC induziert werden kann. Im $W^{RS}\Delta blaA$ Stamm ist der Effekt zwischen induzierten und nicht-

induzierten Zellen noch deutlicher zu erkennen, da die Umsetzung von Nitrocefin durch die konstitutiv exprimierte β -Laktamase BlaA wegfällt.

3.2 Analyse der Translokation der *Yersinia* β -Laktamasen AmpC und BlaA ins Periplasma

β -Laktam-Antibiotika inhibieren die Peptidoglykansynthese, indem sie an PBPs (Penicillin-Bindeproteine) irreversibel binden. In Gram-negativen Bakterien sind die PBPs in der cytoplasmatischen Membran verankert und ragen ins Periplasma. β -Laktamasen vermitteln Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika, indem sie den β -Laktam-Ring, den gemeinsamen strukturellen Bestandteil der β -Laktam-Antibiotika, hydrolysieren. β -Laktamasen müssen daher vom bakteriellen Cytosol über die Cytoplasmamembran ins Periplasma transportiert werden, um Resistenz zu vermitteln.

Der Transport von Proteinen über die Cytoplasmamembran erfolgt bei Bakterien über zwei Hauptwege: der generelle Sekretionsweg (Sec-abhängiger Weg) und der Tat-abhängige Weg („twin arginine translocation“). Beim Sec-abhängigen Weg erfolgt der Transport von ungefalteten Proteinen über die Cytoplasmamembran wohingegen beim Tat-abhängigen Weg gefaltete Proteine transportiert werden. In beiden Fällen besitzen die zu transportierenden Proteine eine N-terminale Signalsequenz, die nach dem Transport abgespalten wird und somit das reife Protein entsteht. Charakteristisch für Tat-abhängig transportierte Proteine ist die Anwesenheit eines konservierten „Twin-Arginin“-Motivs innerhalb der geladenen n-Region des Signalpeptids: Z-R-R-x- ϕ - ϕ (Z steht für einen polaren AS-Rest, ϕ für einen hydrophoben AS-Rest und für x gilt keine Einschränkung) (siehe auch 1.2.3).

3.2.1 *In silico* Analysen der *Yersinia* AmpC- und BlaA-Aminosäuresequenzen

3.2.1.1 Aminosäuresequenz-Vergleiche verschiedener β -Laktamasen

Aminosäuresequenz-Vergleiche der β -Laktamasen AmpC und BlaA von *Y. enterocolitica* ergeben eine Ähnlichkeit von 10 %. Vergleicht man die Aminosäure-Sequenzen von AmpC und BlaA mit der *E. coli* β -Laktamase TEM-1, so ergibt sich eine Ähnlichkeit von 11 % bzw. 36 %, mit der *E. coli* β -Laktamase AmpC eine Ähnlichkeit von 57 % bzw. 10 %. Interessanterweise zeigen die Aminosäuresequenzen der β -Laktamasen BlaC von *Mycobacterium tuberculosis* und BlaA von *Y. enterocolitica* eine Ähnlichkeit von 42 % sowie

ERGEBNISSE

eine Ähnlichkeit von 40 % zwischen BlaS von *Mycobacterium smegmatis* und BlaA von *Y. enterocolitica* (siehe Tab. 19).

Tab. 19: Aminosäuresequenz-Vergleiche verschiedener β -Laktamasen

Die Aminosäuresequenzen der Yersinien β -Laktamasen AmpC und BlaA wurden sowohl untereinander als auch mit β -Laktamasen aus *E. coli* (TEM-1 und AmpC), *M. tuberculosis* (BlaC) und *M. smegmatis* (BlaS) verglichen. Die jeweiligen Sequenzhomologien wurden mit der DNAMAN Software berechnet und sind in % angegeben. GenBank Zugangsnummern sind wie folgt: *Y. enterocolitica* AmpC (CAL12487.1), *Y. enterocolitica* BlaA (HE647714, diese Arbeit), *E. coli* TEM-1 (AAR25033.1), *E. coli* AmpC (ABM69263.1), *M. tuberculosis* BlaC (CAA98216.1), *M. smegmatis* (AAP97895.1).

	AmpC (<i>Y. enterocolitica</i>)	BlaA (<i>Y. enterocolitica</i>)
AmpC (<i>Y. enterocolitica</i>)	100 %	10 %
BlaA (<i>Y. enterocolitica</i>)	10 %	100 %
TEM-1 (<i>E. coli</i>)	11 %	36 %
AmpC (<i>E. coli</i>)	57 %	10 %
BlaC (<i>M. tuberculosis</i>)	12 %	42 %
BlaS (<i>M. smegmatis</i>)	10 %	40 %

3.2.1.2 Vergleich der Signalpeptidsequenzen von BlaA mit denen der mykobakteriellen β -Laktamasen BlaC und BlaS

Es wurde gezeigt, dass die meisten beschriebenen β -Laktamasen über den generellen Sec-Weg transportiert werden (Pradel, *et al.*, 2008). Ausnahmen bilden die mykobakteriellen β -Laktamasen BlaC und BlaS, die Tat-abhängig transportiert werden (McDonough, *et al.*, 2005). Wie oben beschrieben, besitzt die β -Laktamase BlaA von *Y. enterocolitica* eine hohe Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene zu den beiden mykobakteriellen β -Laktamasen BlaC und BlaS. Besonders auffällig ist, dass alle drei β -Laktamasen ein „Twin-Arginin“-Motiv besitzen (Abb. 12).

ERGEBNISSE



Abb. 12: Vergleiche der Signalpeptidsequenzen und des „Twin-Arginin“-Motivs verschiedener β -Laktamasen

Die aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Signalsequenzen der β -Laktamasen BlaA (*Y. enterocolitica*), BlaS (*M. smegmatis*) und BlaC (*M. tuberculosis*) und die potenziellen „Twin-Arginin“-Motive wurden miteinander verglichen. Signalsequenzen sind rot dargestellt, die möglichen „Twin-Arginin“-Motive grün eingekastet. GenBank Zugangsnummern sind wie folgt: *Y. enterocolitica* BlaA (HE647714, diese Arbeit), *M. tuberculosis* BlaC (CAA98216.1), *M. smegmatis* (AAP97895.1).

3.2.1.3 *In silico* Analysen von β -Laktamase-Signalpeptiden auf Sec- und Tat-abhängige Sekretionssignale

Da BlaS und BlaC beide als Tat-abhängig transportiert beschrieben wurden, stellt sich die Frage, ob BlaA aus *Y. enterocolitica* ebenfalls über diesen Sekretionsweg transportiert wird. Sowohl die Signalsequenz von BlaA als auch die der induzierbaren *Yersinia* β -Laktamase AmpC, in deren Aminosäuresequenz kein „Twin-Arginin“-Motiv festgestellt wurde sowie die Signalsequenz von TEM-1 aus *E. coli* untersucht werden. TEM-1 wurde als Sec-abhängig transportierte β -Laktamase beschrieben (Smith, *et al.*, 1987, Pradel, *et al.*, 2008).

ERGEBNISSE

Zur *in silico* Untersuchung der Signalpeptide auf ein mögliches Tat-abhängiges Sekretionssignal stehen verschiedene Programme zur Verfügung: TatP (Bendtsen, *et al.*, 2005), TATFIND 1.2 (Rose, *et al.*, 2002) und PRED-TAT (Bagos, *et al.*, 2010). Diese Programme berechnen aus verschiedenen Parametern, ob es sich bei den Signalpeptiden um ein Tat-abhängiges Sekretionssignal handeln könnte. Sec- und Tat-abhängige Signalpeptide unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und Eigenschaften. Beispielsweise sind die Hydrophobizität der h-Region, die Länge des Signalpeptids und die Aminosäurekomposition der c-Region unterschiedlich (vgl. 1.2.2.1 und 1.2.3.1). Außerdem können diese Programme die wahrscheinliche Signalpeptidaschnittstelle vorhersagen.

Die Signalsequenzen der β -Laktamasen aus *Y. enterocolitica* AmpC und BlaA, BlaC und BlaS aus *Mycobacterium* spp. sowie TEM-1 aus *E. coli* wurden mit allen drei Programmen untersucht; die Ergebnisse sind in Tab. 20 zusammengefasst.

Tab. 20: Untersuchung verschiedener β -Laktamase-Signalpeptide mit Tat-Signalsequenz-Vorhersage-Programmen.

Die Signalpeptidsequenzen der β -Laktamasen AmpC und BlaA (*Y. enterocolitica*), BlaC und BlaS (*M. tuberculosis* und *M. smegmatis*) und TEM-1 (*E. coli*) wurden mit der Software TatP, TATFIND und PRED-TAT untersucht. Als Tat-abhängig identifizierte Signalpeptide wurden mit „+“ angegeben; als nicht-Tat-abhängig identifizierte Signalpeptide wurden mit „-“ gekennzeichnet.

	TatP	TATFIND	PRED-TAT
AmpC (Y.e.)	-	-	-
BlaA (Y.e.)	+	-	+
BlaC (M.t.)	+	+	+
BlaS (M.s.)	-	+	+
TEM-1 (E. c.)	-	-	-

Die Signalpeptide der *Yersinia* β -Laktamasen AmpC und der *E. coli* TEM-1 wurden beide von allen drei Programmen als nicht-Tat-abhängige Sekretionssignale identifiziert. Die der BlaC und BlaS wurden von allen drei bzw. von zwei Programmen als Tat-abhängig identifiziert. Das Signalpeptid der *Yersinia* BlaA wurde von zwei Programmen als Tat-abhängig beschrieben. Ein weiteres Programm – SignalP – sagt Sec-abhängige Signalpeptide voraus (Bendtsen, *et al.*, 2004). Sowohl *Yersinia* AmpC als auch TEM-1 wurden von diesem Programm als Sec-Substrat identifiziert. Die Ergebnisse aus den Programmen bestätigen bereits experimentell belegte Daten: TEM-1 ist ein Sec-abhängig

ERGEBNISSE

transportiertes Protein; BlaC und BlaS Tat-abhängige Proteine. Bezüglich der *Yersinia* β -Laktamasen geben die Programme Hinweise darauf, dass AmpC Sec-abhängig transportiert wird, wohingegen BlaA vermutlich ein Tat-abhängiges Protein ist. Die Daten der *in silico* Analysen müssen jedoch experimentell bestätigt werden.

Tab. 21: Liste der vorhergesagten Signalpeptidasespaltstellen der Proteine mit N-terminaler Signalsequenz.

Die Spaltstellen wurden anhand der Aminosäuresequenz mittels SignalP (AmpC, MeoA; TEM-1) und TatP (BlaA, TorA)-Software berechnet. AS: Aminosäuren.

Protein	Vorhergesagte Signalpeptidasespaltstelle
AmpC	AS 24/25: TLA-QT
BlaA	AS 30/31: AAA-IP
MeoA	AS 21/22: AGA-AE
TEM-1	AS 23/24: VFA-HP
TorA	AS 39/40: ATA-AQ

Tab. 21 gibt eine Übersicht über die von SignalP und TatP vorhergesagten Signalpeptidasespaltstellen der in dieser Arbeit verwendeten Proteine mit N-terminaler Signalsequenz.

3.2.2 Funktionalität des Tat-Systems in *Yersinia enterocolitica*

Lavander, *et al.* (2005) beschrieben in ihrer Arbeit, dass *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* ein funktionelles Tat-System besitzen. Die Analyse der Genomsequenz von *Y. enterocolitica* 8081 zeigte, dass Gene mit hohen Homologien zu Komponenten des *E. coli* Tat-Systems vorhanden sind: die Gene *tatA*, *tatB*, *tatC*, die in einem Operon organisiert sind, sowie das monocystronische *tatE* Gen, welches für das TatE Protein kodiert, das ebenfalls beim Aufbau des Tat-Apparates beteiligt ist. Beim *tatD* Gen, das stromabwärts des *tatABC* Operons kodiert liegt, handelt es sich um ein am Tat-System unbeteiligtes cytoplasmatisches Protein mit DNase-Aktivität (Wexler, *et al.*, 2000). Die Organisation des *tat* Operons ist in der Familie der Enterobacteriaceae konserviert.

3.2.2.1 Konstruktion einer Δ *tatC* Deletionsmutante

Um zu untersuchen, ob ein Protein in *Y. enterocolitica* Tat-abhängig exportiert wird, soll das Tat-System ausgeschaltet werden. Das TatC Protein stellt eine essentielle Komponente innerhalb des Tat-Export-Apparates dar, dessen Deletion zu einer Blockade des Exports von Tat-Substraten führt (Ize, *et al.*, 2002).

Zur Herstellung einer chromosomalen Deletion des *tatC*-Gens wurde die Methode der „ET-Klonierung“ angewendet. Wie bereits für die β -Laktamase-Deletionsmutanten beschrieben, wurde für die genetische Manipulation der *Y. enterocolitica* Stamm WA^{RS} verwendet, um eine höhere Effizienz der DNA-Aufnahme zu erzielen (3.1.1). Anders als bei den β -Laktamase-Genen liegt das *tatC* Gen in einem Operon kodiert vor. Aufgrund dessen muss berücksichtigt werden, dass trotz Einbringens einer Resistenzgenkassette in dieses Operon, alle anderen Gene stromauf und -stromabwärts von *tatC* exprimiert werden. Es dürfen keine Start- oder Stoppkodons von angrenzenden Genen deletiert werden.

Das *tatC* Gen wurde durch eine Spectinomycin-Resistenzgenkassette (Sp^r-Kassette) ersetzt. Mittels PCR-Amplifikation von pCDF-Duet-1-Plasmid-DNA wurde ein lineares PCR-Fragment hergestellt, das die Sp^r-Kassette sowie zwei *tatC*-flankierende Sequenzbereiche enthält. In diesem Fall wurden die Homologiearme so gewählt, dass der stromaufwärts liegende homologe Bereich mit dem Startkodon von *tatC* beginnt sowie nachfolgende 47 bp innerhalb der kodierenden Region von *tatC*. Der stromabwärts liegende Homologiearm endet mit dem Stoppkodon von *tatC* sowie 49 bp stromaufwärts des Stoppkodons (Abb. 13A). Die Primerbereiche, die zur Amplifikation der Sp^r-Kassette dienten, waren stromaufwärts 18 bp und stromabwärts 20 bp lang. Die Sp^r-Kassette enthielt keinen Terminatorbereich, um die Transkription der stromabwärts liegenden Gene von *tatC* nicht zu unterbinden.

Elektrokompetente *Y. enterocolitica* WA^{RS} wurden mit dem Plasmid pKD46 transformiert und die Induktion der Rekombinasegene erfolgte mit 2 % L-Arabinose. Die Zellen wurden anschließend elektrokompetent gemacht und mit dem linearen PCR-Fragment, das die Sp^r-Kassette und die Homologiebereiche besitzt, transformiert. Die Inkubation erfolgte auf Spectinomycin-haltigen Platten bei 27 °C. Spectinomycin-resistente Klone wurden mittels PCR auf Deletion von *tatC* getestet und anschließend mittels Sequenzierung überprüft. Eine schematische Darstellung der Inaktivierung des *tatC*-Gens ist in Abb. 13B zu sehen.

ERGEBNISSE

3.2.2.2 Klonierung eines *torA-gfp*-Fusionskonstrukts in den Expressionsvektor pWS

Um die Funktionalität des Tat-Systems in *Y. enterocolitica* WA-314 zu untersuchen, wurde als Reporterkonstrukt die Signalsequenz (Kodons für AS 1-50) des beschriebenen *E. coli* Tat-Substrats TorA (kodiert für die Trimethyl-amine N-oxid Reduktase) an GFP fusioniert. Für die Klonierung wurden die Kodons für die TorA-Aminosäuren 1-50 mittels PCR von chromosomaler DNA von *E. coli* K12 mit Primer mit *HindIII* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen an den Enden amplifiziert. *HindIII* liegt dabei am 5'-Ende, *BamHI* am 3'-Ende. Das gesamte *gfp*-Gen wurde mittels PCR von pJAMA23-Plasmid-DNA mit Primern mit *BamHI* und *Sall* Restriktionsschnittstellen an den Enden amplifiziert. Die *BamHI*-Schnittstelle liegt dabei am 5'-Ende des PCR-Produkts, *Sall* am 3'-Ende. Das *torA*-PCR-Fragment wurde mit *HindIII/BamHI* und das *gfp*-Fragment mit *BamHI/Sall* verdaut. Beide Fragmente wurden zusammen mit *HindIII/Sall* verdauten Vektor pWS ligiert. Das so entstandene Plasmid pWS-*torA*₁₋₅₀-GFP wurde mittels PCR und Sequenzierung überprüft und in *Y. enterocolitica* WA^{RS} $\Delta\Delta$ und in WA^{RS} Δ *tatC* eingebracht. Abb. 14 zeigt schematisch die Zusammensetzung des Fusionsproteins TorA₁₋₅₀-GFP sowie weiterer in dieser Arbeit klonierten GFP-Fusionsproteine.

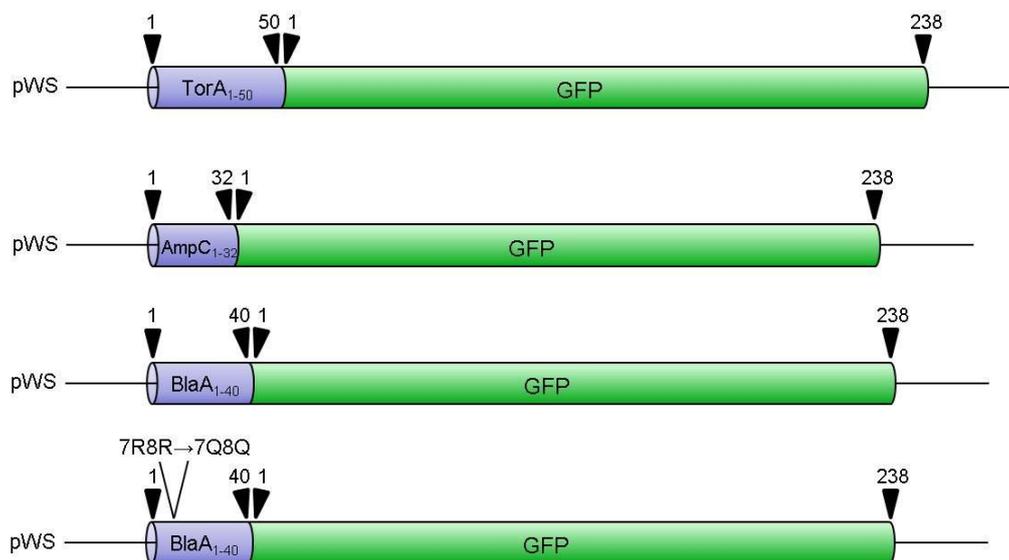


Abb. 14: Schematische Darstellung der verwendeten GFP-Reporterkonstrukte.

Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine bestehend aus N-terminalen Signalsequenzen und GFP. Die Pfeile und angegebenen Zahlenwerte repräsentieren die jeweiligen Kodons bzw. Aminosäuren der klonierten Fragmente.

3.2.2.3 Zellfraktionierung von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) und $WA^{RS}\Delta\text{tatC}$ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) Stämmen

Um zu zeigen, dass das Tat-System von *Y. enterocolitica* funktionell ist, soll der Export des Tat-Substrats TorA in $WA^{RS}\Delta\Delta$ und in $WA^{RS}\Delta\text{tatC}$ Stämmen untersucht werden. Das Fusionsprotein TorA₁₋₅₀-GFP besteht aus dem Signalpeptid der Tat-abhängig transportierten TMAO-Reduktase aus *E. coli* und GFP. Es wurde bereits gezeigt, dass die Signalsequenz von TorA ausreicht, um den Reporter GFP (Molekulargewicht ~ 27 kDa) über die Cytoplasmamembran ins Periplasma zu transportieren (Santini, 2000, Thomas, *et al.*, 2001). Die Klonierung dieses Konstrukts in den Expressionsvektor pWS wurde in 3.2.2.2 beschrieben und das Plasmid wurde in $WA^{RS}\Delta\Delta$ und in $WA^{RS}\Delta\text{tatC}$ eingebracht. Zur Untersuchung der Exporteigenschaften des TorA₁₋₅₀-GFP Fusionsproteins wurden Gesamtzelllysate und periplasmatische Extrakte präpariert (siehe 2.9.1 und 2.9.7). Die das Fusionskonstrukt tragenden Stämmen wurden ÜN bei 27 °C geschüttelt, die Kulturen 1:50 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Die Expression des Fusionsproteins erfolgte bei 27 °C und ohne Zugabe von IPTG, da der p_{tac}-Promotor von pWS in *Yersinia* „leaky“ ist (2.10.1). Die Zellen wurden zentrifugiert, Gesamtzelllysate hergestellt sowie die periplasmatische Fraktion mittels kaltem osmotischem Schock präpariert. Die Fraktionen wurden in SDS-Auftragspuffer resuspendiert und die Proben mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Die Detektion des Fusionsproteins im Westernblot erfolgte mit anti-GFP Antikörper. Das Fusionsprotein hat im unprozessierten Zustand, d.h. mit Signalpeptid (Vorläuferprotein), ein berechnetes Molekulargewicht von 32,2 kDa und im reifen Zustand, d.h. nach Abspaltung des Signalpeptids, ein Molekulargewicht von 28,1 kDa. Tab. 22 gibt eine Übersicht über die Molekulargewichte der Vorläuferproteine und der reifen Proteine der in dieser Arbeit klonierten Konstrukte.

ERGEBNISSE

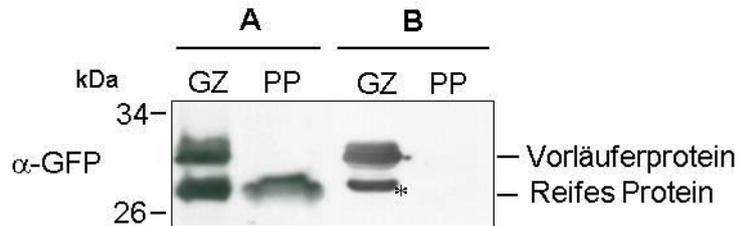


Abb. 15: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des TorA₁₋₅₀-GFP Fusionsproteins.

Die Zellfraktionierung von **A:** WA^{RS}ΔΔ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) und **B:** WA^{RS}ΔtatC (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) Stämmen in Gesamtzelllysat (GZ) und periplasmatische Fraktion (PP) erfolgte mittels der Methode des kalten osmotischen Schocks (siehe 2.9.7). Die Proben wurden mittels einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und nach Westernblot mit anti-GFP Antikörper detektiert. * cytosolisches Abbauprodukt.

Tab. 22: Liste der berechneten Molekulargewichte der verwendeten rekombinanten Proteine.

Das Molekulargewicht des Vorläuferproteins bzw. des reifen Proteins wurde anhand der Aminosäuresequenz mittels DNAMAN Software berechnet.

Rekombinantes Protein	Molekulargewicht Vorläuferprotein (kDa)	Molekulargewicht reifes Protein (kDa)
TorA ₁₋₅₀ -GFP	32,2	28,1
AmpC ₁₋₃₂ -GFP	30,6	27,9
BlaA ₁₋₄₀ -GFP	31,2	28,1
BlaA ₁₋₄₀ (RR→QQ)-GFP	31,2	28,1
AmpC ₃₂ -BlaA _{Δ1-32} -His	32,7	30,1
MeoA ₂₆ -BlaA _{Δ1-32} -His	31,7	29,7
GFP	27	-
BlaA-His	32,4	29,3
BlaA-Strep	32,8	29,7
DmsD-Strep	23,3	-
TorA-Strep	95,4	91,2

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, wird das TorA₁₋₅₀-GFP Fusionsprotein in WA^{RS}ΔΔ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) synthetisiert und als Doppelbande im Gesamtzelllysat (GZ) detektiert. Die zwei Polypeptide unterschiedlichen Molekulargewichts im GZ werden im etwa gleichen Mengenverhältnis zueinander produziert. In der periplasmatischen Fraktion (PP) ist nur noch das Polypeptid mit dem niedrigeren Molekulargewicht nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Proteinform mit dem höheren Molekulargewicht um das unprozessierte

ERGEBNISSE

Vorläuferprotein im Cytoplasma handelt und bei der Proteinform mit dem niedrigeren Molekulargewicht um das reife Protein im Periplasma. Im GZ des $WA^{RS}\Delta tatC$ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) Stammes erscheinen ebenfalls zwei Polypeptide, wobei die Proteinform mit dem niedrigeren Molekulargewicht weniger stark produziert wird. Die beiden Proteinformen scheinen das gleiche Molekulargewicht zu haben, wie die beiden Proteinformen im GZ des $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) Stammes. Da jedoch in der PP kein Polypeptid detektiert wurde, ist anzunehmen, dass es sich beim Polypeptid mit höherem Molekulargewicht im GZ um das unprozessierte Vorläuferprotein und bei der Proteinform mit niedrigerem Molekulargewicht um ein cytosolisches Abbauprodukt des Vorläuferproteins handelt. Vermutlich sind beide Polypeptide im Cytoplasma lokalisiert. Cytosolische Abbauprodukte von Tat-abhängig transportierten Proteinen im $\Delta tatC$ Hintergrund wurden bereits in anderen Arbeiten beschrieben und nachgewiesen (Meissner, *et al.*, 2007).

Die Ergebnisse der Zellfraktionierung zeigen, dass das TorA₁₋₅₀-GFP Fusionsprotein im $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) Stamm über die Cytoplasmamembran ins Periplasma transloziert wird. Im $WA^{RS}\Delta tatC$ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) Stamm hingegen findet keine Translokation ins Periplasma statt und das Vorläuferprotein wird im Cytoplasma partiell degradiert. Somit kann gezeigt werden, dass das Tat-Substrat TorA Tat-abhängig transportiert wird und das Tat-System in *Y. enterocolitica* WA-314 funktionell ist.

3.2.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von *torA-gfp*-exprimierenden *Yersinia* Stämmen

Um einen Tat-abhängigen Export des TorA₁₋₅₀-GFP Fusionsproteins nachzuweisen, kann neben der Zellfraktionierung (3.2.2.3) auch direkt die GFP-Fluoreszenz genutzt werden. In Studien mit *E. coli* wurde gezeigt, dass GFP nur im Cytoplasma in seine aktive Konformation falten kann; somit kann eine Translokation von funktionellem GFP nur über den Tat-Weg und nicht über den Sec-Weg erfolgen. GFP wird zwar auch Sec-abhängig ins Periplasma transloziert, allerdings in einer nicht-aktiven Konformation. Wird GFP also an ein Sec-abhängiges Substrat fusioniert, so ist eine diffuse cytoplasmatische Fluoreszenz zu beobachten; wird GFP an ein Tat-abhängiges Substrat fusioniert, so fluoresziert GFP im Periplasma (membranlokalisierte Fluoreszenz) (Santini, 2000, Thomas, *et al.*, 2001).

Der Export des TorA₁₋₅₀-GFP Fusionsproteins soll nun in $WA^{RS}\Delta\Delta$ und in $WA^{RS}\Delta tatC$ Stämmen anhand der GFP-Fluoreszenz untersucht werden. $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) und $WA^{RS}\Delta tatC$ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP), wurden ÜN bei 27 °C geschüttelt, 1:50 in LB-Medium

ERGEBNISSE

verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,8 inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert, mit 2 % PFA fixiert und am konfokalen Mikroskop bei 395 nm visualisiert.

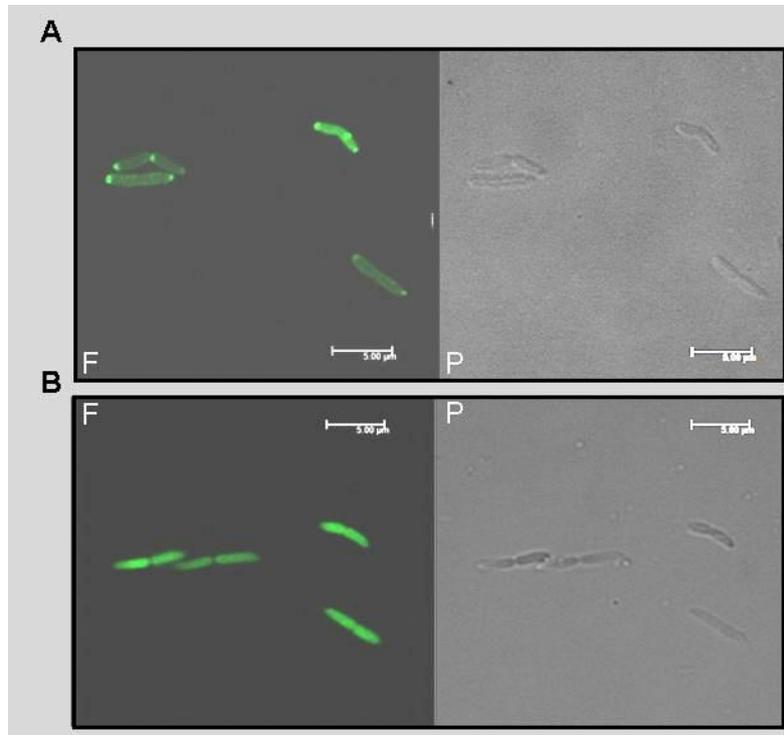


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopie von *torA-gfp*-exprimierenden *Yersinia* Stämmen.

A: $WA^{RS}\Delta\Delta$ (*pWS-torA₁₋₅₀-GFP*) und **B:** $WA^{RS}\Delta tatC$ (*pWS-torA₁₋₅₀-GFP*) Stämme wurden in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,8 inkubiert und mit 2 % PFA fixiert. Die Bakterien wurden am konfokalen Mikroskop visualisiert. F: Fluoreszenzmikroskopie. P: Phasenkontrastmikroskopie. Der Größenbalken entspricht 5 µm.

Wird *torA-gfp* in $WA^{RS}\Delta\Delta$ exprimiert, ist eine periphere bzw. eine stärkere polar-lokalisierte Fluoreszenz zu erkennen. Dahingegen zeichnet sich bei Expression in der $WA^{RS}\Delta tatC$ Mutante eine diffus-verteilte Fluoreszenz ab (siehe Abb. 16). Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zeigen also, dass im $WA^{RS}\Delta\Delta$ Hintergrund GFP mittels der TorA-Signalsequenz Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran ins Periplasma transportiert wird. Das reife GFP befindet sich in der aktiven Konformation und fluoresziert daher im Periplasma. In der $WA^{RS}\Delta tatC$ (*pWS-torA₁₋₅₀-GFP*) Mutante kann das GFP-Protein nicht transloziert werden und somit ist nur die cytoplasmatische Fluoreszenz des TorA₁₋₅₀-GFP Vorläuferproteins sichtbar.

ERGEBNISSE

Sowohl die Ergebnisse der Zellfraktionierung als auch die Fluoreszenz-Analysen zeigen eindeutig, dass TorA₁₋₅₀-GFP in *Y. enterocolitica* Tat-abhängig transloziert wird und somit ein funktionelles Tat-System vorhanden ist.

3.2.3 Ampicillin-Sensitivitätstest der Δ *tatC* Mutante

In 3.2.2.3 und 3.2.2.4 wurde gezeigt, dass *Y. enterocolitica* ein funktionelles Tat-System besitzt. Die *in silico*-Analysen der BlaA Signalsequenz ergaben Hinweise darauf, dass die β -Laktamase BlaA vermutlich ein Tat-abhängiges Protein ist (3.2.1). Um nun experimentell zu zeigen, ob BlaA tatsächlich Tat-abhängig transloziert wird, sollte zunächst der Einfluss der Deletion von *tatC* auf die Ampicillin-Resistenz untersucht. Folglich wurde ein Ampicillin-Sensitivitätstest in Flüssigkultur sowie eine MHK-Bestimmung von Ampicillin mittels Agardiffusionstest durchgeführt. Die Tests wurden wie unter 3.1.2 bzw. 3.1.3 beschrieben durchgeführt. Getestet wurden der parentale Stamm WA^{RS} sowie die Deletionsmutante WA^{RS} Δ *tatC*.

ERGEBNISSE

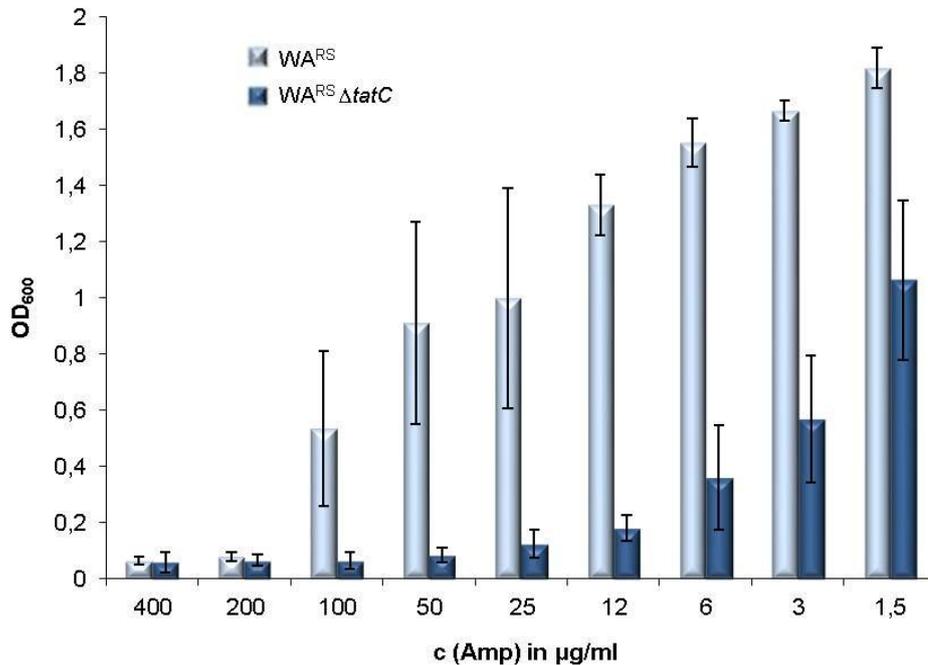


Abb. 17: Ampicillin-Sensitivitätstest der *tatC*-Deletionsmutante in Flüssigkultur.

Das Wachstum der WA^{RS} Δ*tatC* Mutante und des parentalen Stammes WA^{RS} erfolgte in LB-Medium in Anwesenheit verschiedener Verdünnungen von Ampicillin (400-1,5 µg/ml). Der Test wurde bei 27 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt und für 12 h inkubiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt und die OD₆₀₀ gemittelt. Fehlerbalken: ±Standardabweichung.

Die Auswertung des Ampicillin-Sensitivitätstests in Flüssigkultur zeigt, dass der WA^{RS} Δ*tatC* Stamm eine deutlich herabgesetzte Ampicillin-Resistenz im Vergleich zu WA^{RS} aufweist (Abb. 17). Die MHK-Bestimmung von Ampicillin mittels Agardiffusionstest bestätigten die Ergebnisse in Flüssigkultur: WA^{RS} Δ*tatC* (MHK=0,5 µg/ml) zeigt eine 8-fache Reduktion der Ampicillin-Resistenz im Vergleich zum parentalen Stamm (MHK=4 µg/ml).

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass der Ampicillin-sensible Phänotyp der WA^{RS} Δ*tatC* Mutante durch die Blockade des möglicherweise Tat-abhängigen Exports der β-Laktamase BlaA verursacht wird. BlaA wird konstitutiv exprimiert, wohingegen AmpC nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird (unter induzierenden Bedingungen wird die Expression jedoch hochreguliert) (3.1.7). Da der Antibiotika-Sensitivitätstest und die MHK-Bestimmung unter nicht-induzierenden Bedingungen durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass die β-Laktamase AmpC auf die Ergebnisse dieser Versuche keinen Einfluss hatte. Die Ergebnisse zeigen auch, dass cytosolisch lokalisierte β-Laktamasen in der lebenden Zelle keinen Beitrag zur β-Laktam-Resistenz leisten.

ERGEBNISSE

Der Ampicillin-sensible Phänotyp der $WA^{RS}\Delta tatC$ Mutante gibt einen ersten Hinweis auf einen möglichen Transport von BlaA über den Tat-Weg. Um eine Tat-abhängige Translokation nachweisen zu können, wurden β -Laktamase-Signalpeptid-GFP Fusionen untersucht (3.2.4).

3.2.4 Funktionelle Charakterisierung von β -Laktamase Signalpeptid-GFP Fusionsproteinen

3.2.4.1 Klonierung von *ampC*- und *blaA*-Signalpeptid-*gfp* Fusionsgenen in den Expressionsvektor pWS

Die Ergebnisse des Ampicillin-Sensitivitätstests der $WA^{RS}\Delta tatC$ Mutante sowie die *in silico* Analysen des Signalpeptids von BlaA deuten darauf hin, dass BlaA möglicherweise Tat-abhängig transportiert wird (3.2.3). Die *in silico* Analyse der AmpC Signalsequenz deutet dahingegen darauf hin, dass AmpC ein Sec-abhängiges Protein ist (3.2.1). Um den Transportweg beider β -Laktamasen zu untersuchen, wurden Fusionen zwischen der Signalsequenz von *ampC* (Kodons für AS 1-32) sowie der Signalsequenz von *blaA* (Kodons für AS 1-40) mit *gfp* hergestellt. Die Klonierung erfolgte analog und mit denselben Restriktionsschnittstellen wie für das Fusionsgen *torA-gfp* beschrieben (3.2.2.2 und 2.8.11.4). Die Fusionsgene wurden ebenfalls in den Expressionsvektor pWS ligiert. Die entstandenen Plasmide pWS-*ampC*₁₋₃₂-GFP und pWS-*blaA*₁₋₄₀-GFP (schematische Darstellung siehe Abb. 14) wurden mittels PCR und Sequenzierung überprüft und in *Y. enterocolitica* $WA^{RS}\Delta\Delta$ mittels Elektroporation eingebracht.

3.2.4.2 Wachstum von *Y. enterocolitica* Stämmen in Gegenwart von Plasmiden, die β -Laktamase Signalpeptid-GFP Fusionsgene exprimieren

Um die Signalpeptid-GFP Fusionsproteine zu charakterisieren, wurden die Stämme $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-*ampC*₁₋₃₂-GFP) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-*blaA*₁₋₄₀-GFP) zunächst in einem Wachstumsversuch untersucht. Als Kontrolle diente mit Leervektor pWS transformierte $WA^{RS}\Delta\Delta$. Der Wachstumsversuch wurde in LB-Medium bei 27 °C unter Schütteln durchgeführt. Die Kulturen wurden auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt und das Wachstum über 10 h jede Stunde protokolliert. Da der *p_{tac}*-Promotor des pWS Vektors „leaky“ ist, war auch beim Wachstumsversuch keine IPTG-Zugabe nötig, um die Expression

ERGEBNISSE

der Fusionsgene zu induzieren. Das Wachstum wurde in drei unabhängigen Experimenten untersucht.

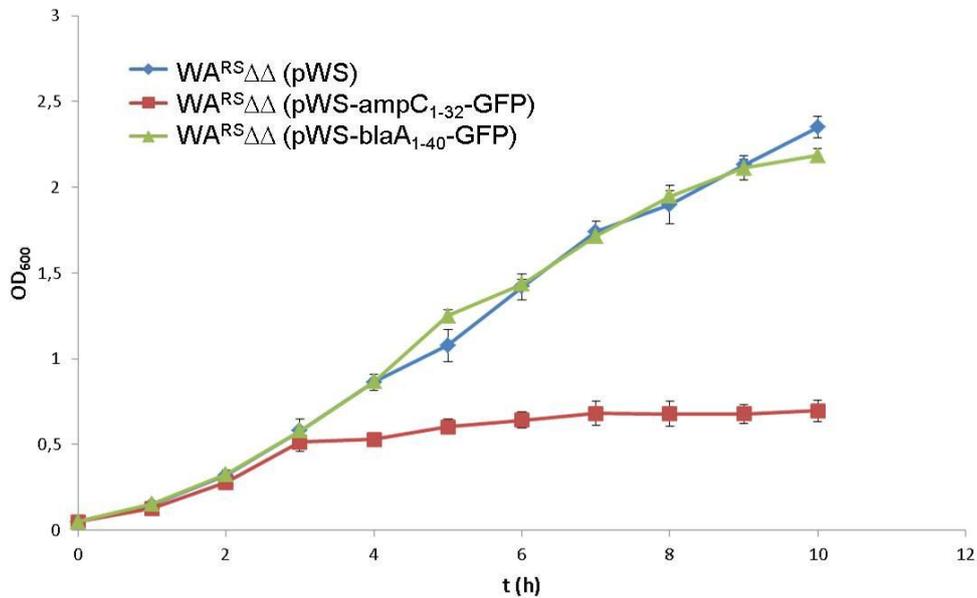


Abb. 18: Überexpression von *ampC*- und *blaA*-Signalpeptid-*gfp* Fusionsgenen in WA^{RS}ΔΔ.

Das Wachstum von WA^{RS}ΔΔ (pWS), WA^{RS}ΔΔ (pWS-ampC₁₋₃₂-GFP) und WA^{RS}ΔΔ (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP) erfolgte in LB-Medium bei 27 °C. Die OD wurde über einen Zeitraum von 10 h jede Stunde bei 600 nm gemessen. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt und gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: ±Standardabweichung.

In Abb. 18 ist zu sehen, dass die Überproduktion von BlaA₁₋₄₀-GFP keinen Einfluss auf das Wachstum hat; das Wachstum von WA^{RS}ΔΔ (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP) entspricht dem Wachstum von *Yersinia* mit Vektor pWS. Dahingegen inhibiert die Überproduktion von AmpC₁₋₃₂-GFP das Wachstum stark; *Yersinia* Stämme, die dieses Fusionsprotein produzieren, erreichen nur eine OD₆₀₀ von 0,6.

3.2.4.3 Zellfraktionierung von WA^{RS}ΔΔ (pWS-ampC₁₋₃₂-GFP) und WA^{RS}ΔΔ (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP) Stämmen

Um die Exporteigenschaften der AmpC₁₋₃₂-GFP und BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsproteine in WA^{RS}ΔΔ zu untersuchen, wurden Zellfraktionierungen durchgeführt (2.9.1 und 2.9.7). Zelllysate (GZ) und periplasmatische Fraktionen (PP) wurden in SDS-Auftragspuffer solubilisiert und 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Westernblotanalysen mit anti-GFP Antikörper analysiert. Das berechnete Molekulargewicht

ERGEBNISSE

des AmpC₁₋₃₂-GFP Fusionsproteins im unprozessierten Zustand beträgt 30,7 kDa, das Molekulargewicht von BlaA₁₋₄₀-GFP im unprozessierten Zustand 31,2 kDa.

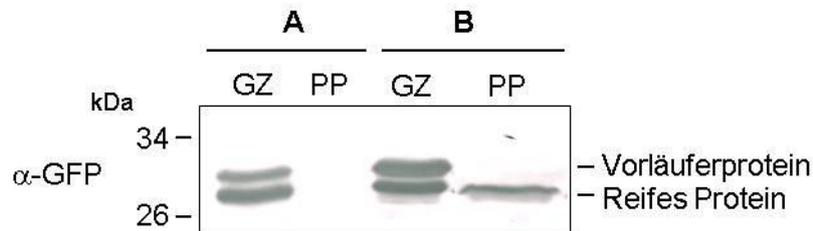


Abb. 19: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung der AmpC₁₋₃₂-GFP und BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsproteine, produziert in WA^{RS} $\Delta\Delta$.

Die Zellfraktionierung von **A:** WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pWS-ampC₁₋₃₂-GFP) und **B:** WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP) Stämmen in Gesamtzelllysat (GZ) und periplasmatische Fraktion (PP) erfolgte mit der Methode des kalten osmotischen Schocks. Die Proben wurden mittels einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und die GFP-Fusionsproteine mittels Immunoblot mit anti-GFP Antikörper dargestellt.

Sowohl das AmpC₁₋₃₂-GFP als auch das BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsprotein werden in WA^{RS} $\Delta\Delta$ im Gesamtzelllysat als Doppelbande detektiert. Die beiden Proteinformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht im jeweiligen GZ werden praktisch im gleichen Mengenverhältnis produziert. In der PP ist kein AmpC₁₋₃₂-GFP detektierbar, wohingegen BlaA₁₋₄₀-GFP als verkürztes Protein nachgewiesen wird. Das Molekulargewicht der Proteinbande in der PP entspricht der Proteinbande mit niedrigerem Molekulargewicht in der Doppelbande im GZ.

Aus den Ergebnissen der Zellfraktionierung (Abb. 19) lässt sich schließen, dass es sich jeweils bei der Proteinbande mit dem höheren Molekulargewicht im GZ wahrscheinlich um das unprozessierte Vorläuferprotein handelt. Da in der PP BlaA₁₋₄₀-GFP nur noch als Polypeptid mit niedrigerem Molekulargewicht nachweisbar ist, lässt dies vermuten, dass es sich bei dieser Proteinbande um das reife Protein nach Abspaltung der Signalsequenz handelt. Allerdings konnte diese Proteinspezies mit niedrigerem Molekulargewicht in der PP von AmpC₁₋₃₂-GFP nicht nachgewiesen werden.

Die in diesem Versuch durchgeführten Zellfraktionierungen geben Hinweise auf die Produktion der Signalpeptid-GFP Proteine und ob ein Transport über die Cytoplasmamembran stattfindet. Nicht jedoch welcher der Exportwege – Tat- oder Sec-Weg – benutzt wird. Wie bereits in 3.2.2.4 beschrieben, kann GFP sowohl mittels einer Sec-abhängigen Signalsequenz als auch mittels einer Tat-abhängigen Signalsequenz über die Cytoplasmamembran transportiert werden. Nur beim Tat-abhängigen Transport erfolgt die Translokation von GFP in seiner funktionellen Form. Die Zellfraktionierungen in diesem

ERGEBNISSE

Versuch sollten also, unabhängig ob GFP an eine Sec- oder Tat-abhängige Signalsequenz fusioniert wurde, das reife GFP in der PP zeigen. Jedoch ist dies bei Bakterien, die das AmpC₁₋₃₂-GFP Fusionsprotein produzieren, nicht der Fall.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der *in silico* Analysen (AmpC wurde als Sec-abhängig transportiertes Protein identifiziert), des Wachstumsversuchs von Bakterien, die das AmpC₁₋₃₂-GFP Fusionsprotein produzieren (starke Wachstumshemmung) und der Zellfraktionierung (keine Detektion eines reifen AmpC₁₋₃₂-GFP Proteins in der PP), dass die β -Laktamase AmpC wahrscheinlich Sec-abhängig transportiert wird. Vermutlich „verstopft“ das AmpC₁₋₃₂-GFP Fusionsprotein beim Transport die Sec-Poren und hemmt somit das Wachstum, da damit auch der Transport anderer Sec-abhängiger Proteine beeinflusst wird. Die „Verstopfung“ der Sec-Poren könnte dazu führen, dass kein Transport stattfindet und somit das reife Protein nicht in der PP bei der Zellfraktionierung nachgewiesen werden kann. Möglicherweise aggregieren nicht-transportfähige Fusionsproteine und werden von cytoplasmatischen Proteasen abgebaut.

3.2.4.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von *ampC-gfp* und *blaA-gfp* exprimierenden WA^{RS} $\Delta\Delta$

Die Ergebnisse des Wachstumsversuchs (3.2.4.2) und der Zellfraktionierungen (3.2.4.3) ergeben erste Hinweise, dass AmpC eine funktionelle Sec-abhängige Signalsequenz besitzt. Über die Exporteigenschaften der Signalsequenz von BlaA ließ sich noch keine Schlussfolgerung ziehen, lediglich dass sich Bakterien, die die Fusionsproteine AmpC₁₋₃₂-GFP oder BlaA₁₋₄₀-GFP exprimieren, in ihrem Wachstum und bei der Zellfraktionierung unterscheiden.

Um nun zu untersuchen, ob die Fusionsproteine Sec- oder Tat-abhängig transportiert werden, soll der Export der AmpC₁₋₃₂-GFP und BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsproteine in WA^{RS} $\Delta\Delta$ anhand der GFP-Fluoreszenz überprüft werden. Die Grundlagen zum Unterschied zwischen der Sec- und Tat-abhängigen Translokation von GFP sowie die Versuchsdurchführung zur Fluoreszenzmikroskopie sind in 3.2.2.4 anhand des TorA₁₋₅₀-GFP Fusionsproteins beschrieben.

ERGEBNISSE

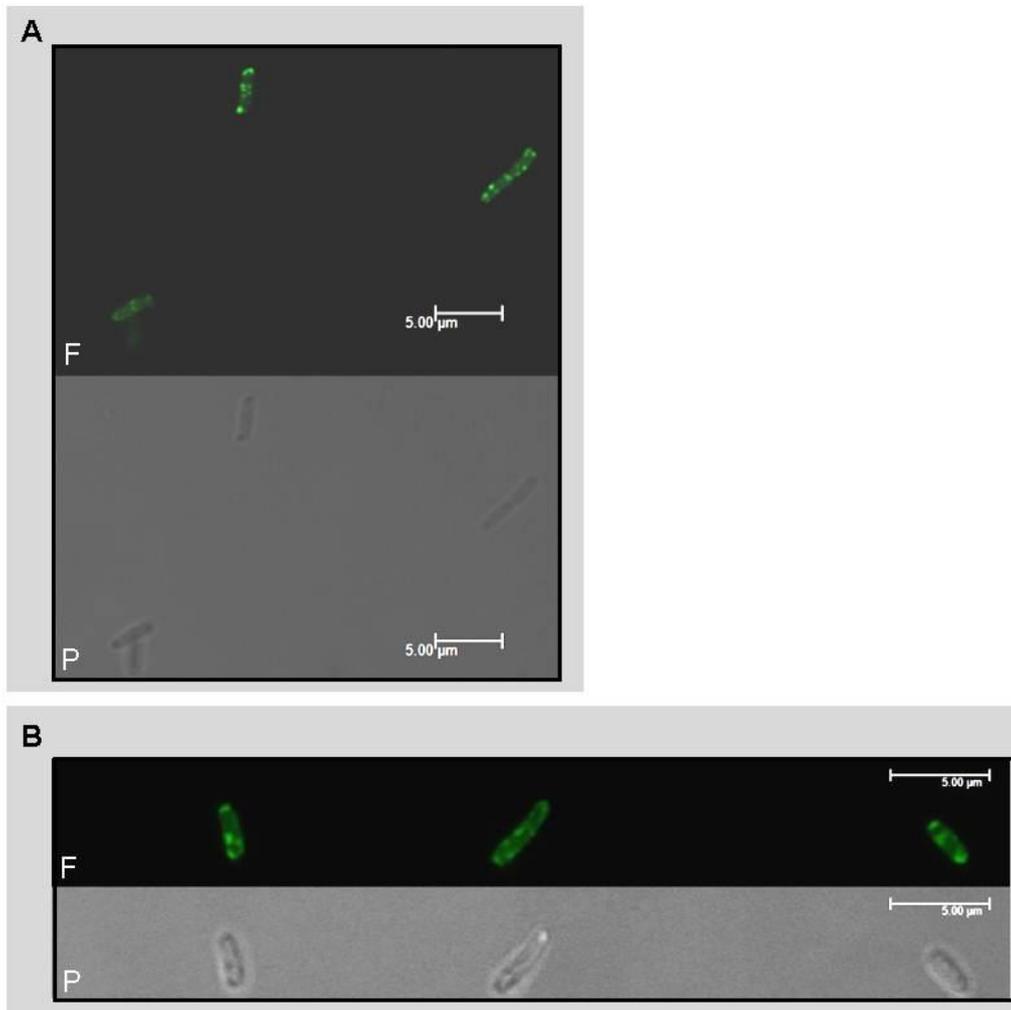


Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopie von *ampC-gfp* und *blaA-gfp* exprimierenden *WA^{RS}ΔΔ*.

A: *WA^{RS}ΔΔ* (pWS-ampC₁₋₃₂-GFP) und **B:** *WA^{RS}ΔΔ* (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP) Stämme wurden in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert und mit 2 % PFA fixiert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Mikroskop. F: Fluoreszenzmikroskopie. P: Phasenkontrastmikroskopie. Der Größensbalken entspricht 5 μm.

Wie in 3.2.2.4 beschrieben und für die Tat-abhängige Signalsequenz TorA gezeigt, sollte der Tat-abhängige Transport von GFP in einer peripheren Fluoreszenz resultieren. Der Sec-abhängige Transport von GFP hingegen in einer diffusen, cytoplasmatischen Fluoreszenz. In Abb. 20 ist zu erkennen, dass keiner dieser beiden Fälle für die Fusionsproteine AmpC₁₋₃₂-GFP und BlaA₁₋₄₀-GFP zutrifft; stattdessen ist eine granuläre GFP-Fluoreszenz zu erkennen. Weiterhin ist festzustellen, dass die Intensität der Fluoreszenz des BlaA₁₋₄₀-GFP produzierenden Stammes deutlich stärker ist als die des AmpC₁₋₃₂-GFP produzierenden Stammes.

ERGEBNISSE

Die beobachtete Fluoreszenz der AmpC₁₋₃₂-GFP und BlaA₁₋₄₀-GFP Proteine ist atypisch und kann nicht einem Sec- oder Tat-abhängigen Transport zugeordnet werden.

3.2.5 Substitution des „Twin-Arginin“-Motivs im BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsprotein

Da die Untersuchungen des BlaA₁₋₄₀-GFP Proteins bisher keine eindeutigen Beweise für einen der beiden Exportwege geliefert haben, soll nun das „Twin-Arginin“-Motiv an den Positionen 7 und 8 (7R8R) innerhalb der BlaA-Signalsequenz mutiert werden. Die Mutation des „Twin-Arginin“-Motivs wurde zuvor bei der Untersuchung von *E. coli* Tat-Substraten beschrieben: Austausch der hoch konservierten Argininreste (RR) führt zu einem Exportblock. In vielen Arbeiten wurden die Argininreste gegen Lysinreste (KK) ausgetauscht. Allerdings wurde inzwischen gezeigt, dass der Tat-Apparat Austausche des RR-Motivs zu KR, RK oder KK tolerieren kann (Ize, *et al.*, 2002). Die Austausche beeinträchtigen zwar die Effizienz des Exports, jedoch findet der Export statt. Weiterhin wurde gezeigt, dass erst ein Ladungsverlust an den Positionen der Argininreste zu einem kompletten Exportblock führt (Vollstedt, 2003). Daher soll ein Fusionsprotein aus der BlaA Signalsequenz und GFP hergestellt werden, wobei innerhalb der BlaA-Signalsequenz das „Twin-Arginin“-Motiv zu einem „Twin-Glutamin“-Motiv mutiert wird.

3.2.5.1 Klonierung eines *blaA*^{QQ}-Signalpeptid-*gfp* Fusionsgens in den Expressionsvektor pWS

Die Konstruktion eines *blaA*₁₋₄₀-*gfp* Fusionsgens mit mutierten Argininresten erfolgte durch Amplifikation der Signalsequenz von *blaA* (Kodons für AS 1-40) mittels PCR mit den Oligonukleotiden BlaA-Subst-RR-Hind-FOR und Bam_BlaA-1-40_REV mit *HindIII* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen an den Enden von chromosomaler DNA von *Y. enterocolitica* WA-314. Der FOR-Primer enthält im Vergleich zur *blaA*-Sequenz eine alternierte Nukleotidfolge: anstatt der Nukleotide CGGCGT (nt 19-24) wurden die Nukleotide CAGCAA in die Primersequenz eingesetzt. Dies führt zu einem Aminosäureaustausch von Arg, Arg zu Gln, Gln an Position 7 und 8 im Protein. Die *HindIII* Schnittstelle liegt am 5'-Ende des PCR-Produkts, die *BamHI* Schnittstelle am 3'-Ende. Das gesamte *gfp*-Gen wurde mittels PCR von pJAMA23-Plasmid-DNA mit Primern mit *BamHI* und *Sall* Restriktionsschnittstellen an den Enden amplifiziert. Die *BamHI*-Schnittstelle liegt dabei am 5'-Ende des PCR-Produkts, *Sall* am 3'-Ende. Das *blaA* (mit veränderter Nukleotidfolge)-PCR-Fragment wurde mit *HindIII/BamHI* und das *gfp*-Fragment mit *BamHI/Sall* verdaut. Beide Fragmente wurden

ERGEBNISSE

zusammen mit *HindIII/Sall* verdauten Vektor pWS ligiert. Das konstruierte Plasmid pWS-blaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP (schematische Darstellung siehe Abb. 14) wurde mittels PCR und Sequenzierung verifiziert und in WA^{RS}ΔΔ mittels Elektroporation eingebracht.

3.2.5.2 Zellfraktionierung von WA^{RS}ΔΔ (pWS-blaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP)

Mittels Zellfraktionierung wurde überprüft, inwieweit die veränderte Signalsequenz von BlaA den Transport von GFP über die Cytoplasmamembran in WA^{RS}ΔΔ vermitteln kann. Die Zellfraktionierung wurde wie in 3.2.2.3 und 3.2.4.3 beschrieben durchgeführt. GZ und PP wurden mittels 12 %-iger SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Immunoblot mit anti-GFP Antikörper analysiert. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins mit veränderter Signalsequenz entspricht dem des BlaA₁₋₄₀-GFP Proteins von 31,2 kDa.



Abb. 21: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des BlaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP Fusionsproteins produziert in WA^{RS}ΔΔ

Die Zellfraktionierung des WA^{RS}ΔΔ (pWS-blaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP) Stammes in Gesamtzelllysate (GZ) und periplasmatische Fraktion (PP) erfolgte mit der Methode des kalten osmotischen Schocks. Die Proben wurden mittels einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und BlaA₁₋₄₀(RR→QQ)-GFP mittels Immunoblot nachgewiesen. * cytosolisches Abbauprodukt.

In Abb. 21 ist zu sehen, dass das BlaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP Protein bei Produktion in WA^{RS}ΔΔ im GZ als Doppelbande detektiert wird, wobei die langsamer migrierende Proteinform ungefähr doppelt so stark produziert wird wie die schneller migrierende Proteinform. In der PP ist kein Polypeptid detektierbar. Da in der PP kein Fusionsprotein nachweisbar ist und im GZ die Proteinspezies mit dem höheren Molekulargewicht signifikant stärker produziert wird, ist anzunehmen, dass es sich bei der langsamer migrierenden Proteinbande um das Vorläuferprotein und bei der schneller migrierenden Proteinbande um ein verkürztes Fusionsprotein handelt. Der mögliche cytosolische Abbau des Vorläuferproteins wurde bereits in 3.2.2.3 bei der Zellfraktionierung des TorA₁₋₅₀-GFP Fusionsproteins, produziert in WA^{RS}ΔtatC, beschrieben.

ERGEBNISSE

3.2.5.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse des $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-*blaA*₁₋₄₀^{QQ}-GFP) Stammes

Die Ergebnisse der Zellfraktionierung (3.2.5.2) zeigen, dass die Substitution des „Twin-Arginin“-Motivs innerhalb des BlaA-Signalpeptids die Translokation des BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsproteins ins Periplasma verhindert. Die Lokalisierung des BlaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP Fusionsproteins soll nun anhand der GFP-Fluoreszenz analysiert werden. Der Versuch wurde wie in 3.2.2.4 beschrieben durchgeführt.

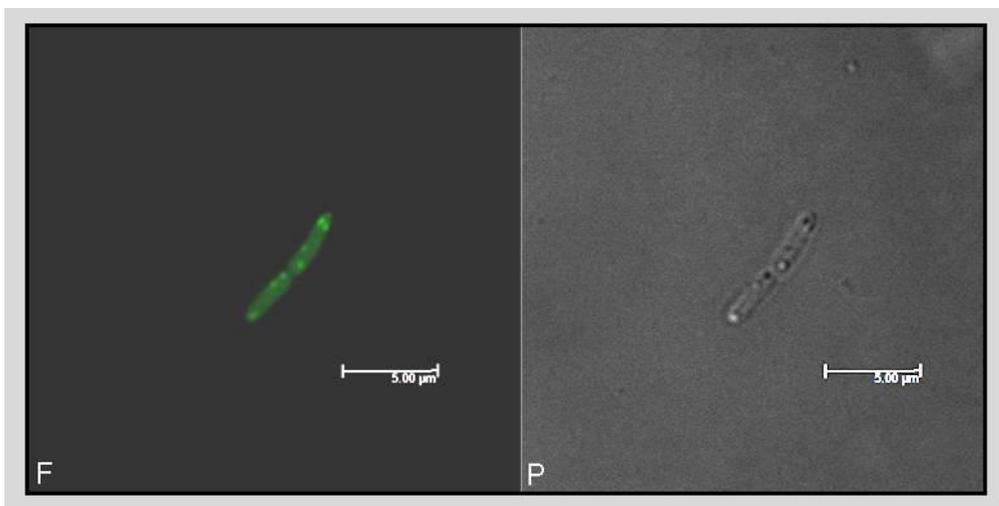


Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopie von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-*blaA*₁₋₄₀^{QQ}-GFP).

$WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-*blaA*₁₋₄₀^{QQ}-*gfp*) exprimieren, wurden in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert und mit 2 % PFA fixiert. Die Visualisierung der Bakterien erfolgte am konfokalen Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung. F: Fluoreszenzmikroskopie. H: Hellfeldmikroskopie. Der Größenbalken entspricht 5 μ m.

Wie bereits für die Fusionsproteine AmpC₁₋₃₂-GFP und BlaA₁₋₄₀-GFP beobachtet (3.2.4.4), ist auch bei der Expression von BlaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP in $WA^{RS}\Delta\Delta$ eine granuläre GFP-Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 24).

3.2.6 Analyse des $WA^{RS}\Delta$ *tatC* (pWS-*blaA*₁₋₄₀-GFP) Stammes

Wie in 3.2.5 beschrieben, führt die Veränderung des „Twin-Arginin“-Motivs innerhalb der BlaA-Signalsequenz zu einem Exportblock des BlaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP Fusionsproteins. Dies deutet darauf hin, dass das „Twin-Arginin“-Motiv essentiell ist und somit ein Tat-abhängiger Transport von BlaA vorliegt. Um jedoch auszuschließen, dass die Substitution des „Twin-

ERGEBNISSE

Arginin“-Motivs zu einem kompletten Funktionsverlust des Signalpeptids führt, wurde das BlaA₁₋₄₀-GFP Protein im WA^{RS}Δ*tatC* Hintergrund exprimiert.

3.2.6.1 Zellfraktionierung des WA^{RS}Δ*tatC* (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP) Stammes

Das Plasmid pWS-blaA₁₋₄₀-GFP wurde mittels Elektroporation in WA^{RS}Δ*tatC* eingebracht und wie in 3.2.2.3 beschrieben exprimiert und eine Zellfraktionierung durchgeführt. Das Gesamtzelllysat (GZ) und die periplasmatische Fraktion (PP) wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Fusionsproteine mittels Immunoblot identifiziert.



Abb. 23: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsproteins im WA^{RS}Δ*tatC* Stamm

Die Zellfraktionierung des WA^{RS}Δ*tatC* (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP) Stammes in Gesamtzelllysat (GZ) und periplasmatische Fraktion (PP) erfolgte mittels der Methode des kalten osmotischen Schocks (2.9.7). Die Proben wurden mittels einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Fusionsproteine im Immunoblot detektiert. * cytosolisches Abbauprodukt.

Abb. 23 zeigt, dass das BlaA₁₋₄₀-GFP Protein im WA^{RS}Δ*tatC* Hintergrund im GZ als Doppelbande detektiert wird. Das Polypeptid mit höherem Molekulargewicht wird im Vergleich zum Polypeptid mit niedrigerem Molekulargewicht etwas stärker produziert. In der PP kann der anti-GFP Antikörper kein Polypeptid detektieren (Abb. 23). Wie bereits in 3.2.2.3 und 3.2.5.2 beschrieben, handelt es sich bei den beiden Polypeptiden unterschiedlichen Molekulargewichts im GZ vermutlich um das Vorläuferprotein (langsamer migrierende Proteinspezies) und um ein cytosolisches Abbauprodukt des Vorläuferproteins (schneller migrierende Proteinspezies).

Die Ergebnisse der Zellfraktionierung zeigen, dass das reife BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsprotein in der WA^{RS}Δ*tatC* Mutante nicht ins Periplasma transloziert wird. Dahingegen findet sich das reife BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsprotein im WA^{RS}ΔΔ Stamm in der PP wieder (siehe Zellfraktionierung 3.2.4.3). Es kann also geschlossen werden, dass BlaA₁₋₄₀-GFP Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transportiert wird.

ERGEBNISSE

3.2.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse des $WA^{RS}\Delta tatC$ (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP) Stammes

Die Lokalisierung des BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsproteins im $WA^{RS}\Delta tatC$ Hintergrund soll nun anhand der GFP-Fluoreszenz analysiert werden. Der Versuch wurde wie in 3.2.2.4 beschrieben durchgeführt.

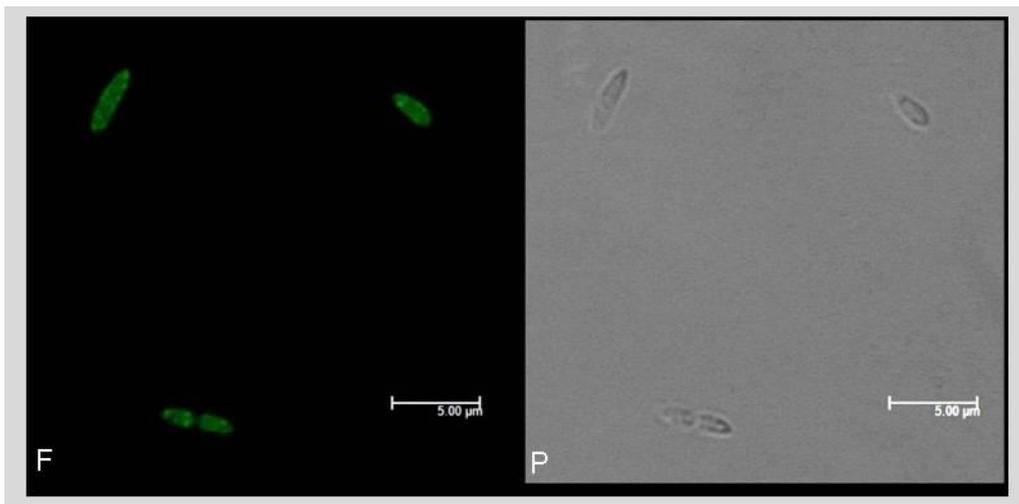


Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopie von *blaA-gfp* exprimierenden $WA^{RS}\Delta tatC$.

Der $WA^{RS}\Delta tatC$ (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP) Stamm wurden in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert und mit 2 % PFA fixiert. Die Visualisierung der Bakterien erfolgte am konfokalen Mikroskop. F: Fluoreszenzmikroskopie. H: Hellfeldmikroskopie. Der Größenbalken entspricht 5 µm.

Wie in Abb. 24 dargestellt, ist das BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsprotein diffus und teilweise granulär im Cytosol der *Yersinia* Zelle verteilt. Eine periplasmatische Lokalisierung ist unwahrscheinlich.

3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Translokation der β -Laktamasen AmpC und BlaA

Die Untersuchung der Transportwege der *Yersinia* β -Laktamasen AmpC und BlaA erfolgte mittels der Fusionsproteine AmpC₁₋₃₂-GFP und BlaA₁₋₄₀-GFP, die jeweils aus der β -Laktamase Signalsequenz und GFP bestehen. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass das Fusionsprotein AmpC₁₋₃₂-GFP vermutlich über den Sec-Weg, BlaA₁₋₄₀-GFP allerdings über den Tat-Weg exportiert wird. Für beide Fusionsproteine ergab die Analyse der GFP-

ERGEBNISSE

Fluoreszenz allerdings keine eindeutigen Hinweise auf einen der beiden Exportwege. Es konnte jeweils nur eine granuläre GFP-Fluoreszenz festgestellt werden, die weiterer Untersuchung bedarf (3.4).

3.3 BlaA kann nicht mittels der AmpC-Signalsequenz ins Periplasma transloziert werden

Y. enterocolitica WA-314 besitzt zwei funktionelle β -Laktamasen. In Kapitel 3.2 konnte gezeigt werden, dass diese β -Laktamasen über zwei unterschiedliche Exportwege ins Periplasma transloziert werden. AmpC wird vermutlich über den generellen Sec-Weg transportiert, BlaA hingegen wird Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran ins Periplasma exportiert.

Die meisten bekannten β -Laktamasen werden Sec-abhängig exportiert. Ausnahmen bilden die β -Laktamasen BlaS und BlaC von *Mycobacterium smegmatis* und *M. tuberculosis* sowie L2 von *Stenotrophomonas maltophilia* (McDonough, *et al.*, 2005, Pradel, *et al.*, 2008). Ein möglicher Grund für den Tat-abhängigen Transport von BlaA könnte sein, dass BlaA sehr schnell im Cytoplasma gefaltet wird. Cytoplasmatische Chaperone sind eventuell nicht in der Lage, ungefaltetes BlaA zu binden und dieses in einer ungefalteten Konformation zu halten. Somit kann der Transport nicht über den generellen Sec-Weg erfolgen, sondern muss sich über den Tat-abhängigen Weg ereignen, der den Export von gefalteten Proteinen erlaubt.

McDonough *et al.* (2005) konnten für die mykobakterielle, Tat-abhängig transportierte β -Laktamase BlaC zeigen, dass diese nicht mittels einer Sec-abhängigen Signalsequenz in ihrer aktiven Form ins Periplasma transportiert werden kann. Jedoch konnte nicht gezeigt werden, ob die Translokation ins Periplasma völlig verhindert wird oder ob BlaC in einer enzymatisch inaktiven Form ins Periplasma transportiert wird.

Um zu überprüfen, ob *Yersinia* BlaA Sec-abhängig über die Cytoplasmamembran transportiert werden kann, wurde ein Fusionsprotein mit der Signalsequenz von AmpC und dem reifen Teil von BlaA sowie einem C-terminalen His₆-„tag“ hergestellt.

3.3.1 Klonierung eines ampC₃₂-blaA₁₋₃₂-His Fusionsgens in den Expressionsvektor pWS

Zur Analyse eines möglichen Exports der β -Laktamase BlaA über den Sec-Weg, sollte ein Fusionsprotein hergestellt werden, das aus einem Sec-abhängigen Signalpeptid und dem reifen Teil von BlaA besteht. Wie in 3.2 gezeigt wurde, wird die β -Laktamase AmpC

ERGEBNISSE

höchstwahrscheinlich Sec-abhängig über die Cytoplasmamembran transportiert. Die Signalsequenz (Kodons für AS 1-32) von *ampC* wurde mittels PCR von chromosomaler DNA von *Y. enterocolitica* mit Primern mit *HindIII* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen an den Enden amplifiziert. *HindIII* liegt dabei am 5'-Ende des PCR-Produkts, *BamHI* am 3'-Ende. Die Kodons für die BlaA-Aminosäuren 33-294 wurden mittels PCR von chromosomaler DNA von *Y. enterocolitica* mit Primern mit *BamHI* und *Sall* Schnittstellen an den Enden amplifiziert. An das *blaA*-Fragment wurde am 3'-Ende zusätzlich die Kodons für einen His₆-„tag“ fusioniert, dessen Nukleotidsequenz in den zur Amplifikation verwendeten REV-Primer eingebracht wurde. Die *BamHI*-Schnittstelle liegt am 5'-Ende, *Sall* am 3'-Ende. Der His₆-„tag“ wird benötigt, um bei nachfolgenden Zellfraktionierungen das Fusionsprotein mittels Immunoblot mit anti-His Antikörper detektieren zu können. Das *ampC*-Fragment wurde mit *HindIII/BamHI*, das *blaA*-Fragment mit *BamHI/Sall* verdaut. Beide Fragmente wurden zusammen in *HindIII/Sall* verdauten Vektor pWS ligiert. Das so entstandene Plasmid pWS-ampC₃₂-blaA_{Δ1-32}-His wurde mittels PCR und Sequenzierung überprüft und in *Y. enterocolitica* WA^{RS}ΔΔ mittels Elektroporation eingebracht. Abb. 25 zeigt schematisch das klonierte AmpC₃₂-BlaA-His Fusionsprotein.

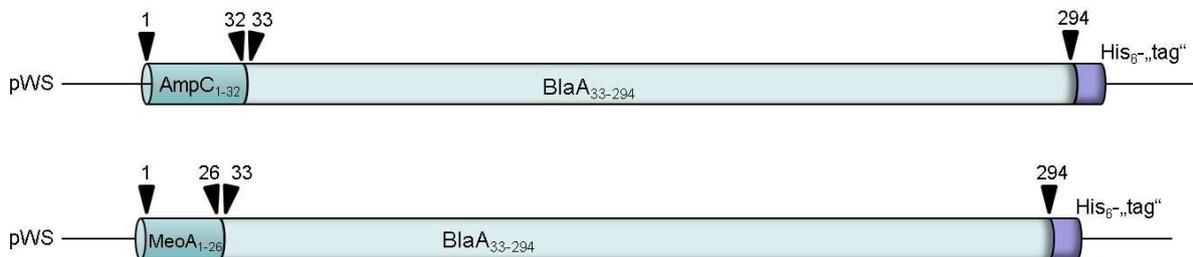


Abb. 25: Schematische Darstellung der BlaA-Fusionsproteine

Dargestellt sind die Fusionsproteine bestehend aus dem Signalpeptid von AmpC (AS 1-32) bzw. dem Signalpeptid von MeoA (AS 1-26) mit dem reifen Teil von BlaA (AS 33-294), jeweils mit C-terminalem His₆-„tag“. Die Pfeile und angegebenen Zahlenwerte repräsentieren die jeweiligen Kodons bzw. Aminosäuren der klonierten Fragmente. Details zur Klonierungen finden sich im Text.

3.3.2 Wachstum von WA^{RS}ΔΔ (pWS-ampC₃₂-blaA_{Δ1-32}-His)

Um den WA^{RS}ΔΔ (pWS-ampC₃₂-blaA_{Δ1-32}-His) Stamm zu charakterisieren, wurde zunächst ein Wachstumsversuch in LB-Medium durchgeführt. Als Kontrolle diente WA^{RS}ΔΔ, der mit dem Leervektor pWS transformiert wurde. Der Wachstumsversuch wurde wie in 3.2.4.2 für

ERGEBNISSE

die Signalpeptid-GFP Fusionsproteine in $WA^{RS}\Delta\Delta$ beschrieben durchgeführt. Es wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

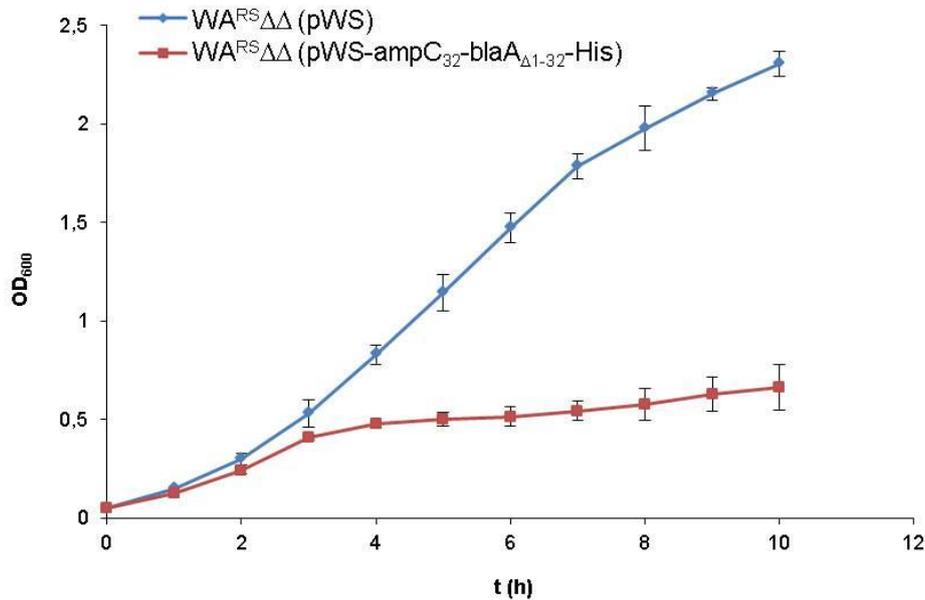


Abb. 26: Überexpression des ampC₃₂-blaA_{Δ1-32}-His Fusionsgens in $WA^{RS}\Delta\Delta$.

Das Wachstum von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-ampC₁₋₃₂-blaA_{Δ1-32}-His) erfolgte in LB-Medium bei 27 °C. Die OD wurde über einen Zeitraum von 10 h jede Stunde bei 600 nm gemessen. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt und gemittelt aufgetragen. Fehlerbalken: ±Standardabweichung.

Im Vergleich zum Wachstum von *Yersinia* Stämmen, die den Vektor pWS tragen, inhibiert die Produktion des Fusionsproteins AmpC₁₋₃₂-BlaA_{Δ1-32}-His das Wachstum von $WA^{RS}\Delta\Delta$ nahezu komplett. Interessanterweise wurde eine ähnliche Wachstumshemmung für *Yersinia* Stämme, die das AmpC₁₋₃₂-GFP Fusionsprotein tragen, beobachtet. (siehe Abb. 18 und 3.2.4.2).

3.3.3 Zellfraktionierung des $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-ampC₃₂-blaA_{Δ1-32}-His) Stammes

Mittels Zellfraktionierung sollte analysiert werden, ob das Signalpeptid von AmpC in der Lage ist, den reifen Teil von BlaA ins Periplasma zu translozieren. Die Zellfraktionierung wurde wie in 3.2.2.3 und 3.2.4.3 beschrieben durchgeführt. Das Gesamtzelllysat (GZ) und die periplasmatische Fraktion (PP) wurden mittels 12 %-iger SDS-PAGE aufgetrennt und das

ERGEBNISSE

Fusionsprotein im Immunoblot mit anti-His Antikörper identifiziert. Das Molekulargewicht des AmpC₁₋₃₂-BlaA_{Δ1-32}-His Fusionsproteins beträgt 33 kDa.

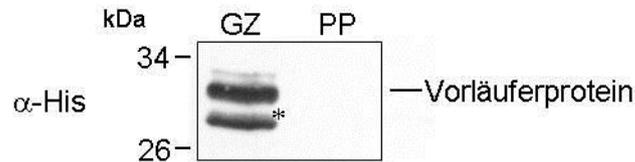


Abb. 27: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des AmpC₁₋₃₂-BlaA_{Δ1-32}-His Fusionsproteins produziert in WA^{RS}ΔΔ.

Die Zellfraktionierung des WA^{RS}ΔΔ (pWS-ampC₁₋₃₂-blaA_{Δ1-32}-His) Stammes in Gesamtzelllysat (GZ) und periplasmatische Fraktion (PP) erfolgte mit der Methode des kalten osmotischen Schocks. Die Proben wurden mittels einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Fusionsproteine mittels Immunoblot identifiziert. * cytosolisches Abbauprodukt.

Das Fusionsprotein wird bei Produktion in WA^{RS}ΔΔ im Immunoblot im GZ als Doppelbande detektiert. Die beiden Proteinspezies zeigen unterschiedliche Molekulargewichte und werden im etwa gleichen Mengenverhältnis produziert. In der PP ist kein Polypeptid detektierbar. Wie schon bei der Analyse der Fusionsprotein BlaA₁₋₄₀-GFP und TorA₁₋₅₀-GFP in WA^{RS}ΔtatC sowie bei Produktion von BlaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP in WA^{RS}ΔΔ wurden auch in diesem Versuch zwei Polypeptide im GZ detektiert, obwohl in der PP keine der Proteinspezies nachgewiesen werden konnte. Wie bereits in 3.2.2.3, 3.2.5.2 und 3.2.6.1 erwähnt, handelt es sich bei der Proteinspezies mit dem höheren Molekulargewicht wahrscheinlich um das unprozessierte Vorläuferprotein im Cytoplasma; das Polypeptid mit dem niedrigeren Molekulargewicht im GZ ist vermutlich ein cytosolisches Abbauprodukt.

Die Ergebnisse der Zellfraktionierung zeigen somit, dass das reife AmpC₁₋₃₂-BlaA_{Δ1-32}-His Fusionsprotein nicht ins Periplasma transportiert werden kann. Das Vorläuferprotein wird zwar produziert und im GZ detektiert, jedoch wird es vermutlich im Cytosol partiell degradiert.

3.3.4 Klonierung eines meoA₁₋₂₆-blaA_{Δ1-32}-His Fusionsgens in pWS und Zellfraktionierung von WA^{RS}ΔΔ (pWS-meoA₁₋₂₆-blaA_{Δ1-32}-His)

Die in 3.2 durchgeführten Experimente deuten stark darauf hin, dass die β-Laktamase AmpC Sec-abhängig exportiert wird. Dennoch soll zur Überprüfung, ob das Tat-Substrat BlaA tatsächlich nicht mit dem Sec-System kompatibel ist, die Signalsequenz eines bereits beschriebenen Sec-Substrats an den reifen Teil von BlaA fusioniert werden. Dafür wurde die

ERGEBNISSE

Signalsequenz von *meoA* verwendet, das für das „Outer membrane porin protein C“ (OmpC) kodiert (Tommassen, 2010).

3.3.4.1 Klonierung eines *meoA*₁₋₂₆-*blaA*_{Δ1-32}-His-Fusionsgens

Um zu bestätigen, dass der reife Teil von BlaA nicht über den Sec-Weg ins Periplasma transportiert werden kann, sollte ein Fusionsprotein aus dem Signalpeptid von MeoA und BlaA hergestellt werden. Die Signalsequenz (Kodons für AS 1-26) von *meoA* wurde mittels PCR von chromosomaler DNA von *Y. enterocolitica* mit Primern mit *HindIII* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen an den Enden amplifiziert. *HindIII* liegt dabei am 5'-Ende des PCR-Produkts, *BamHI* am 3'-Ende. Die Amplifikation der Kodons für den reifen Teil von BlaA sowie die Ligation der *meoA*- und *blaA*-Fragmente in pWS erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben. Das so entstandene Plasmid pWS-*meoA*₁₋₂₆-*blaA*_{Δ1-32}-His (schematische Darstellung in Abb. 25) wurde mittels PCR und Sequenzierung überprüft und in *Y. enterocolitica* WA^{RS}ΔΔ mittels Elektroporation eingebracht.

3.3.4.2 Zellfraktionierung des WA^{RS}ΔΔ (pWS-*meoA*₁₋₂₆-*blaA*_{Δ1-32}-His) Stammes

Die Zellfraktionierung in GZ und PP erfolgte wie bereits beschrieben (3.2.4.3). Das Molekulargewicht des MeoA₁₋₂₆-BlaA_{Δ1-32}-His Fusionsproteins beträgt 31,6 kDa.



Abb. 28: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des MeoA₁₋₂₆-BlaA_{Δ1-32}-His Fusionsproteins produziert in WA^{RS}ΔΔ.

Die Zellfraktionierung des WA^{RS}ΔΔ (pWS-*meoA*₁₋₂₆-*blaA*_{Δ1-32}-His) Stammes in Gesamtzelllysate (GZ) und periplasmatische Fraktion (PP) erfolgte mit der Methode des kalten osmotischen Schocks. Die Proben wurden mittels einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und das Fusionsprotein mittels Immunoblot identifiziert. * cytosolisches Abbauprodukt.

Die Zellfraktionierung ergab ähnliche Resultate wie bereits für das Fusionsprotein AmpC₁₋₃₂-BlaA_{Δ1-32}-His beschrieben: das reife MeoA₁₋₂₆-BlaA_{Δ1-32}-His Fusionsprotein wird nicht ins Periplasma transloziert. Das Vorläuferprotein wird produziert, jedoch im Cytosol partiell degradiert.

3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Sec-abhängigen Transport der β -Laktamase BlaA

Die Sec-abhängige Signalsequenz sowohl von AmpC als auch von MeoA ist nicht in der Lage, das reife BlaA Protein ins Periplasma zu translozieren. Dies deutet darauf hin, dass BlaA vermutlich schnell und stabil im Cytoplasma faltet und von daher nicht über den Sec-Weg exportiert werden kann. Die Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass ein kompletter Exportblock von BlaA vorliegt, wenn dieses an ein Sec-Signalpeptid fusioniert wird.

3.4 Spezifische Lokalisierung von BlaA

In 3.2 konnte mittels der Stämme $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP), $WA^{RS}\Delta\Delta$ tatC (pWS-blaA₁₋₄₀-GFP) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-blaA₁₋₄₀^{QQ}-GFP) eindeutig gezeigt werden, dass die β -Laktamase BlaA Tat-abhängig ins Periplasma transportiert wird. Allerdings konnte bei genauerer Betrachtung der GFP-Fluoreszenz der Stämme keine klare Aussage über den Transportweg gemacht werden; in alle Fällen war eine granuläre Fluoreszenz auszumachen (Abb. 20). Bei Betrachtung der GFP-Fluoreszenz des $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-torA₁₋₅₀-GFP) Stammes hingegen war eine klare periplasmatische Lokalisation und somit ein Tat-abhängiger Export des Fusionsproteins nachweisbar (siehe 3.2.2.4 und Abb. 16).

In nachfolgenden Experimenten soll nun überprüft werden, ob die beobachtete granuläre Fluoreszenz des BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsproteins möglicherweise auf eine spezifische Lokalisierung von BlaA im Periplasma zurückzuführen ist oder ob es sich um ein Artefakt, verursacht durch die Fusion mit GFP, handelt.

3.4.1 Expression von *gfp* in $WA^{RS}\Delta\Delta$

Zunächst soll ausgeschlossen werden, dass bereits die Überexpression von *gfp* zu einer cytosolischen Aggregation in Einschlusskörperchen und somit zu einer Misslokalisierung führt.

3.4.1.1 Klonierung von *gfp* in den Expressionsvektor pWS

Die gesamte kodierende Region von *gfp* soll unter Kontrolle des p_{tac} Promotors in pWS kloniert werden. Das *gfp*-Gen wurde mit den Oligonukleotiden eGFP_Hind_FOR und Sal_eGFP_REV mittels PCR von pJAMA23 Plasmid-DNA amplifiziert. Die Primer enthalten

ERGEBNISSE

HindIII bzw. *Sall* Restriktionsschnittstellen an den Enden. Die *HindIII* Schnittstelle liegt am 5'-Ende des PCR-Produkts, die *Sall* Schnittstelle am 3'-Ende. Das *gfp*-PCR-Fragment wurde mit *HindIII/Sall* verdaut und in Vektor pWS kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen verdaut wurde. Das so entstandene Plasmid pWS-GFP wurde mittels PCR und Sequenzierung überprüft und mittels Elektroporation in *Y. enterocolitica* WA^{RS}ΔΔ eingebracht.

3.4.1.2 Zellfraktionierung des WA^{RS}ΔΔ (pWS-GFP) Stammes

Mittels Fraktionierung der zellulären Komponenten soll überprüft werden, ob das klonierte *gfp*-Fragment exprimiert wird und in welcher zellulären Fraktion das Protein lokalisiert ist. Die Zellfraktionierung wurde wie in 3.2.2.3 und 3.2.4.3 beschrieben durchgeführt. Das Gesamtzelllysat (GZ) und die periplasmatische Fraktion (PP) wurden mittels 12 %-iger SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein im Immunoblot mit anti-GFP Antikörper identifiziert. Das Molekulargewicht des GFP Proteins beträgt 27 kDa.



Abb. 29: Immunoblot zum Nachweis der zellulären Verteilung des GFP-Proteins in WA^{RS}ΔΔ.

Die Zellfraktionierung des WA^{RS}ΔΔ (pWS-GFP) Stammes in Gesamtzelllysat (GZ) und periplasmatische Fraktion (PP) erfolgte mit der Methode des kalten osmotischen Schocks. Die Proben wurden mittels einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein im Immunoblot identifiziert.

Das GFP-Konstrukt wird in WA^{RS}ΔΔ exprimiert und das Protein im Immunoblot als Einzelbande im GZ detektiert. In der PP ist kein Polypeptid nachweisbar (Abb. 29). Wie zu erwarten war, wird GFP – im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen GFP-Fusionsproteinen – nicht als Doppelbande detektiert, da GFP keine abspaltbare Signalsequenz besitzt. Daher findet auch keine Translokation ins Periplasma statt. Außerdem ist keine cytosolische Degradierung des Proteins im GZ festzustellen.

ERGEBNISSE

3.4.1.3 Fluoreszenzmikroskopie von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-GFP)

Die Ergebnisse der Zellfraktionierung (3.4.1.2) zeigen, dass GFP zwar produziert wird, aber keine Translokation ins Periplasma stattfindet. Nun soll anhand der GFP-Fluoreszenz untersucht werden, ob allein die Überproduktion von GFP zu einer Aggregation und somit zur granulären Fluoreszenz führt.

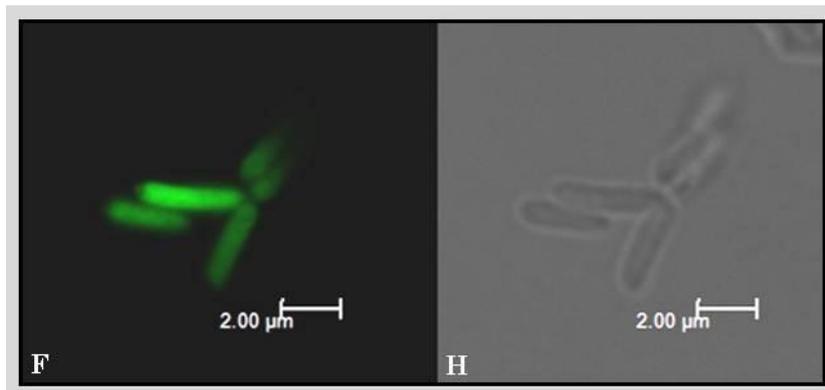


Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopie von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-GFP).

Der $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-GFP) Stamm wurden in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,8 inkubiert und mit 2 % PFA fixiert. Die Visualisierung der Bakterien erfolgte am konfokalen Mikroskop. F: Fluoreszenzmikroskopie. H: Hellfeldmikroskopie. Der Größenbalken entspricht 2 μm .

Abb. 30 zeigt, dass die Überproduktion von GFP in $WA^{RS}\Delta\Delta$ in einer diffusen, cytoplasmatischen Fluoreszenz resultiert. Die für das $BlaA_{1-40}$ -GFP Fusionsprotein beobachtete granuläre Fluoreszenz konnte nicht festgestellt werden. Die von GFP führt also nicht zu einer Aggregation der GFP-Proteine in Einschlusskörperchen. GFP-Artefakte, verursacht durch die Überproduktion von GFP im Cytoplasma können somit ausgeschlossen werden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die starke Produktion einer Fusionsproteins bestehend aus GFP mit einer N-terminalen Signalsequenz zu Artefakten führt.

3.4.2 Immunfluoreszenznachweis von BlaA-Strep

In mehreren Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass die Verwendung von GFP-Fusionsproteinen zwar eine einfache, aber fehleranfällige Methode zur Untersuchung der Lokalisierung von Proteinen ist (Bardy & Maddock, 2007). GFP besitzt eine Fass-ähnliche

ERGEBNISSE

Struktur bestehend aus β -Faltblättern mit einem Durchmesser von 24 Å und einer Länge von 42 Å (Ormo, *et al.*, 1996). Die Überproduktion von GFP kann zur Aggregation in Einschlusskörperchen führen oder zum Verstopfen von Transportporen, wenn GFP an ein sekretierfähiges Protein fusioniert wird (Buddelmeijer, *et al.*, 2006, Bardy & Maddock, 2007). Als Alternative zum GFP-Fusionsprotein soll das gesamte *blaA*-Gen mit den Kodons für einen C-terminalen Strep-„tag“ kloniert werden. Der Strep-„tag“ dient als Marker, um sowohl die Produktion als auch die Lokalisation des BlaA Proteins nachweisen zu können. Im Gegensatz zum 27 kDa großen GFP Protein, besteht der Strep-„tag“ nur aus acht Aminosäuren und sollte somit das native BlaA Protein nicht in seinen Eigenschaften beeinflussen. Als Kontrollen wurden die Gene *dmsD* und *torA* ebenfalls jeweils zusammen mit den Kodons für einen C-terminalen Strep-„tag“ in pWS kloniert. Das *E. coli* Gen *dmsD* kodiert für DmsD, das Chaperon der Dimethyl-Sulfoxid Reduktase (DmsA). DmsD wurde als cytoplasmatisch lokalisiertes Protein beschrieben (Turner, *et al.*, 2004). Als periplasmatisches Kontrollkonstrukt wurde das bereits beschriebene Protein TorA verwendet (3.2.2).

3.4.2.1 Klonierung von *blaA*-Strep, *dmsD*-Strep und *torA*-Strep in pWS

Das Plasmid pWS-*blaA*-Strep wurde durch Ligation des PCR-Amplifikats des gesamten *blaA*-Gens mit den Primern BlaA-1-40-Hind-pWS-FOR/BlaA-Strep-tag-Sal-REV von chromosomaler DNA aus *Y. enterocolitica* WA-314 in pWS hergestellt. Die Kodons für den C-terminalen Strep-„tag“ wurden durch einen Überhang am REV-Primer an das Gen angefügt. Außerdem wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *Sall* als Überhänge an die zur Amplifikation eingesetzten FOR bzw. REV-Primer angefügt. Das PCR-Fragment wurde mit *HindIII/Sall* verdaut und anschließend mit dem *HindIII/Sall*-verdauten Vektor pWS ligiert. Die korrekte Sequenz wurde mittels PCR und Sequenzierung verifiziert. Die Klonierung der Plasmide pWS-*dmsD*-Strep und pWS-*torA*-Strep erfolgte analog zu pWS-*blaA*-Strep, allerdings wurden die Gene von chromosomaler DNA aus *E. coli* K12 mittels PCR vervielfältigt (siehe auch 2.8.11.4). Abb. 31 zeigt eine schematische Darstellung der klonierten Konstrukte.

ERGEBNISSE

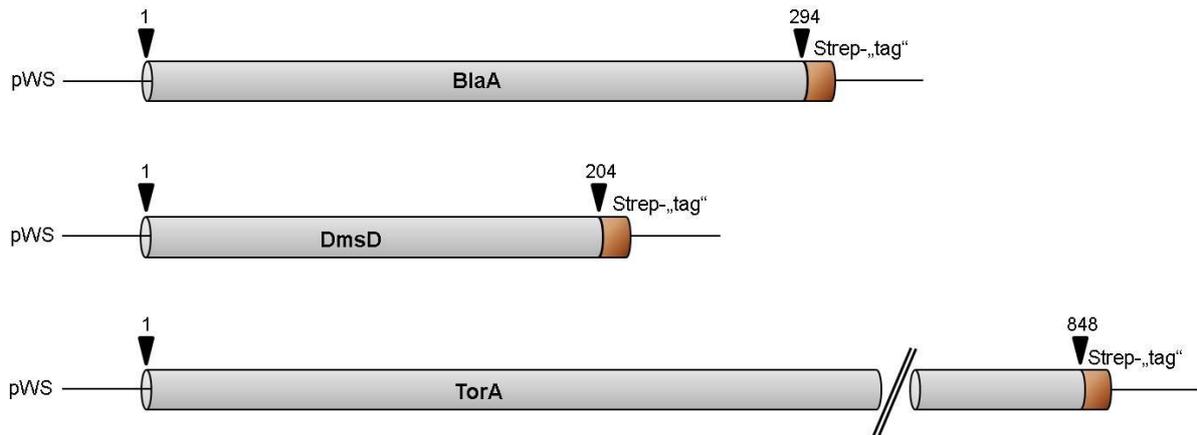


Abb. 31: Schematische Darstellung der verwendeten Reporterproteine mit C-terminalem Strep-„tag“.

Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine bestehend aus BlaA, DmsD und TorA, jeweils mit C-terminalem Strep-„tag“. Die Pfeile und angegebenen Zahlenwerte repräsentieren die jeweiligen Kodons bzw. Aminosäuren der klonierten Fragmente. Details zur Klonierungen finden sich im Text.

3.4.2.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von BlaA-Strep, DmsD-Strep und TorA-Strep, produziert in $WA^{RS}\Delta\Delta$

Die Bestimmung der Lokalisierung der Strep-„tag“-Proteine innerhalb der Bakterienzelle erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung (2.15.2). *Y. enterocolitica* $WA^{RS}\Delta\Delta$, transformiert mit pWS-blaA-Strep, pWS-dmsD-Strep oder pWS-torA-Strep, wurden bis zu einer OD_{600} von 0,8 inkubiert, mit Aceton fixiert und mit Lysozym permeabilisiert. Zum Nachweis des Fusionsproteins wurden die Bakterien mit anti-Strep Antikörper und Ziege anti-Maus IgG Cy3 Konjugat inkubiert. Die Visualisierung erfolgte am konfokalen Mikroskop.

ERGEBNISSE

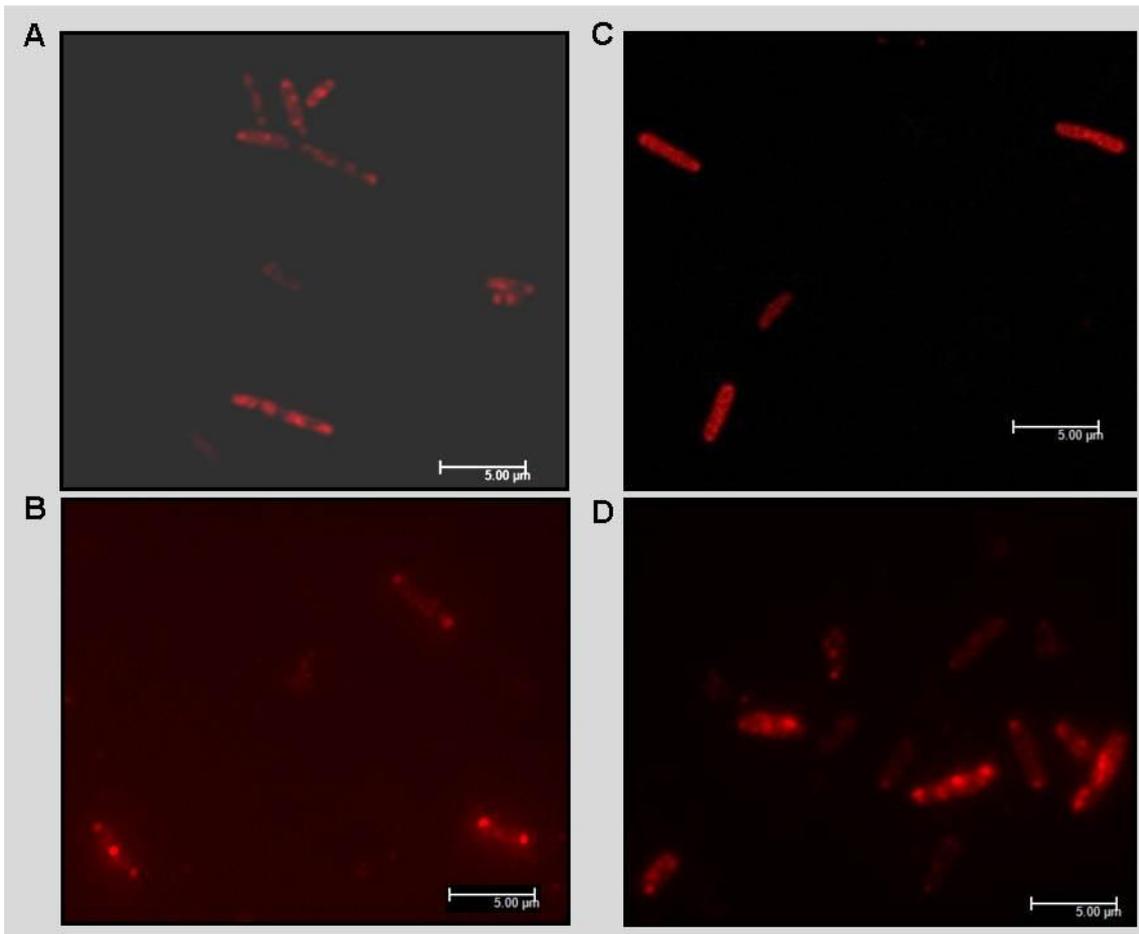


Abb. 32: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung der BlaA-Strep, DmsD-Strep und TorA-Strep Fusionsproteine in *Yersinia*.

Fixierte **A:** $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-blaA-Strep), **B:** $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-torA-Strep), **C:** $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-dmsD-Strep), **D:** $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pWS-blaA-Strep) (behandelt mit 10 µg/ml A22 für 2 h) Stämme wurden mit anti-Strep Antikörper (1:50) und Ziege anti-Maus Cy3-Konjugat (1:100) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte am konfokalen Mikroskop. Der Größenbalken entspricht 5 µm.

Wie Abb. 32 zeigt, kann das BlaA-Strep Fusionsprotein in Form von rot fluoreszierenden Strukturen detektiert werden. Ähnlich wie bereits bei der GFP-Fluoreszenz des BlaA₁₋₄₀-GFP Proteins beobachtet (Abb. 20), ist eine granuläre Fluoreszenz festzustellen. Als Kontrollen wurden das cytoplasmatische DmsD-Strep und das Tat-exportierte TorA-Strep detektiert. Immunfluoreszenzfärbung von DmsD-Strep ergab eine diffuse rote Fluoreszenz (Abb. 32), wie für ein cytoplasmatisches Protein erwartet. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten mit TorA-GFP Fusionen war bei Färbung von TorA-Strep eine starke Fluoreszenz an den Zellpolen zu beobachten (Pradel, *et al.*, 2008).

ERGEBNISSE

Zusammengefasst zeigten die drei ausgewählten Proteine spezifische Fluoreszenzmuster:

DmsD-Strep: cytoplasmatisch diffus

TorA-Strep: polare Membranassoziation

BlaA-Strep: kompartimentiert/granulär

3.4.3 Destabilisierung des bakteriellen Cytoskeletts mit A22

Eine granuläre Fluoreszenz bei Beobachtung von GFP-Fusionsproteinen oder von Proteinen, die mittels Immunfluoreszenz visualisiert wurden, wurde bereits für eine Reihe bakterieller Cytoskelettproteine beschrieben. Diese Proteine sind in einer spiralähnlichen Struktur innerhalb der Bakterienzelle organisiert. Beispiele sind die Aktinhomologe MreB und MreC, wobei diese beiden Proteine unabhängig voneinander spiralförmig in der Bakterienzelle lokalisiert sind (Jones, *et al.*, 2001, Gitai, *et al.*, 2004, Dye, 2005). Proteine, die mit Bestandteilen des bakteriellen Cytoskeletts interagieren, sind ebenfalls in einer spiralähnlichen Struktur organisiert (Dominguez-Escobar, *et al.*, 2011).

Pradel, *et al.* (2008) untersuchten in ihrer Arbeit im *E. coli*-Modell den Sec- und Tat-abhängigen Transport verschiedener β -Laktamasen über die Cytoplasmamembran ins Periplasma. Dabei wurden β -Laktamase-Signalpeptid-GFP Fusionsproteine verwendet und der Sec- bzw. Tat-abhängige Export mittels Zellfraktionierung GFP-Fluoreszenz nachgewiesen. Die β -Laktamase TEM-1 diente dabei als Kontrolle zum Sec-abhängigen Transport. Allerdings konnte bei Beobachtung der GFP-Fluoreszenz des TEM-1-GFP Fusionsproteins festgestellt werden, dass ca. 20 % der TEM-1-GFP produzierenden *E. coli* Zellen, eine granuläre Fluoreszenz aufweisen. Da ein ähnliches Lokalisationsmuster bereits für Cytoskelettproteine beschrieben wurde, vermuteten Pradel *et al.* (2008) eine mögliche MreB-abhängige Lokalisierung der β -Laktamase TEM-1. Aufgrund dessen exprimierten sie das TEM-1-GFP Fusionsprotein in einem *E. coli* $\Delta mreB$ Stamm. Die Prozessierung des TEM-1-GFP Proteins und der Export ins Periplasma war bei Produktion in diesem Hintergrundstamm nicht möglich. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Deletion von *mreB* direkt oder indirekt einen Einfluss auf die Prozessierung der TEM-1 β -Laktamase hat. Da auch für die *Yersinia* β -Laktamase BlaA eine ähnliche granuläre Lokalisierung nachgewiesen werden konnte (3.4.2.2), sollte nun überprüft werden, ob BlaA mit MreB interagiert.

Es wurde bereits beschrieben, dass eine *mreB* Deletionsmutante in vielen Bakterien mit Ausnahme von *E. coli* letal ist (Wachi, *et al.*, 1987, Doi, *et al.*, 1988, Kobayashi, *et al.*, 2003,

ERGEBNISSE

Carballido-Lopez, 2006, Carballido-Lopez, 2006). Daher wurde ein anderer Versuchsansatz gewählt, um eine mögliche Interaktion zwischen MreB und BlaA nachzuweisen. Das Aktinohomolog MreB kann innerhalb der Bakterienzelle durch das antibakteriell wirkende Agens A22 (S-(3,4-dichlorbenzyl)-isothiourea) destabilisiert werden (Iwai, *et al.*, 2002). A22 diffundiert durch die Zellmembran, bindet an MreB und verhindert somit die Polymerisierung der helikal unter der Cytoplasmamembran angeordneten Proteinfilamente. Diese Störung des Cytoskeletts ist reversibel und kann durch Auswaschen von A22 rückgängig gemacht werden (Gitai, *et al.*, 2005, Bean, *et al.*, 2009). Da A22 MreB destabilisiert und somit dessen helikale Anordnung in der Bakterienzelle stört, werden indirekt auch Proteine beeinflusst, die mit MreB interagieren.

Y. enterocolitica WA^{RS}ΔΔ (pWS-blaA-Strep) wurde bei 27 °C in LB-Medium unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert, verschiedene Mengen an A22 (1,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml Endkonzentration) zugegeben und weiter inkubiert (5 min bis 2 h). Ein Kontrollansatz wurde ohne Zugabe von A22 ebenso inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Strep Antikörper und Ziege anti-Maus IgG Cy3 Konjugat durchgeführt (2.15.2). In Abb. 32D ist zu sehen, dass die Behandlung von WA^{RS}ΔΔ (pWS-blaA-Strep) mit A22 die granulär-fluoreszierenden Strukturen bei Immunfluoreszenzfärbung von BlaA-Strep nicht beeinflusst. Die Störung des Cytoskeletts scheint also keinen Einfluss auf die Lokalisierung von BlaA-Strep zu haben.

3.5 Charakterisierung der β-Laktamase BlaA

In 3.2 konnte gezeigt werden, dass die beiden *Yersinia* β-Laktamasen AmpC und BlaA über zwei verschiedene Transportwege ins Periplasma transloziert werden: AmpC Sec-abhängig, BlaA Tat-abhängig. Es stellt sich nun die Frage, warum zwei unterschiedliche Sekretionsformen für die *Yersinia* β-Laktamasen notwendig sind. Ein möglicher Grund wäre, dass sich BlaA extrem schnell im Cytoplasma faltet. Somit könnte BlaA von cytoplasmatischen Chaperons nicht im entfalteten Zustand gehalten werden und wäre für das Sec-Exportsystem unzugänglich. Bei BlaA sollte es sich also um ein sehr stabil gefaltetes Protein handeln.

Eine Vielzahl von β-Laktamasen aus verschiedenen Organismen wurde bereits charakterisiert und kristallisiert. Dabei ist festzustellen, dass trotz sehr unterschiedlicher Primärsequenzen der β-Laktamasen, die Struktur der Enzyme jedoch sehr ähnlich ist (Herzberg, 1991, Knox & Moews, 1991, Jelsch, *et al.*, 1993, Sauvage, *et al.*, 2006). Kather,

ERGEBNISSE

et al. (2009) untersuchten in ihrer Arbeit die Stabilitäten der *E. coli* β -Laktamase TEM-1 und von thermostabilen TEM-1 Varianten. Diese TEM-1 Varianten wurden durch Aminosäuresubstitutionen und anschließender Selektion auf Hitzestabilität hergestellt. Die hitzestabilste TEM-1 β -Laktamase Variante wurde als MEGA bezeichnet.

Da nun angenommen werden kann, dass sich BlaA sehr stabil und schnell im Cytoplasma faltet, sollte dessen thermische Stabilität untersucht werden. Vergleichend zu BlaA sollten Wildtyp TEM-1 und die stabilste Variante MEGA untersucht werden. Die Messungen der thermischen Entfaltungsübergänge wurden in Kooperation mit Franz X. Schmid und Stephanie Hoffmann-Thoms von der Universität Bayreuth mittels CD-Spektrometrie durchgeführt.

3.5.1 Reinigung von BlaA

Um die Stabilität und enzymatischen Eigenschaften von BlaA charakterisieren zu können, musste BlaA zunächst gereinigt werden. Mittels eines bei der Klonierung angefügten C-terminalen His₆-„tag“, konnte BlaA durch IMAC aufgereinigt werden.

3.5.1.1 Klonierung von *blaA* mit C-terminalen His₆-„tag“ in pWS

Für die Klonierung mit C-terminalem His₆-„tag“ wurde das gesamte *blaA*-Gen mit den Oligonukleotiden BlaA-1-40-Hind-pWS-FOR/BlaA-His-tag-Sal-REV mittels PCR von chromosomaler DNA aus *Y. enterocolitica* WA-314 amplifiziert. Der C-terminale His₆-„tag“ wurde durch einen Überhang am REV-Primer an das Gen angefügt. Ebenfalls wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *Sall* als Überhänge an die zur Amplifikation eingesetzten FOR bzw. REV-Primer angefügt. Das PCR-Fragment wurde mit *HindIII/Sall* verdaut und anschließend mit dem Vektor pWS ligiert, der mit denselben Enzymen verdaut worden war. Die Richtigkeit der Sequenz des so entstandenen Plasmids pWS-*blaA*-His wurde mittels PCR und Sequenzierung überprüft.

3.5.1.2 Produktion und Reinigung von BlaA-His₆

Für die Produktion von rekombinantem BlaA wurde der Stamm WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pWS-*blaA*-His) in 1 l LB-Medium mit Antibiotikazusatz über 6 h bei 27 °C inkubiert. Der erste Reinigungsschritt erfolgte affinitätschromatographisch über eine His-Trap HP-Säule (2.10.2). Die Elution

ERGEBNISSE

erfolgte in 20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl und 500 mM Imidazol. Die Fraktionen 8-10 wurden vereinigt und in einer anschließenden Gelfiltration (Superdex 75) (2.10.3) wurden restliche Verunreinigungen entfernt. Proben aus den einzelnen Schritten der Aufreinigung mittels Ni-Chelat-Säule und der Gelfiltration wurden durch SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 33). Die BlaA-haltigen Fraktionen nach der Gelfiltration wurden vereinigt (Fraktionen 4-6) und die Proteinmenge mittels Bradford Assay bestimmt.

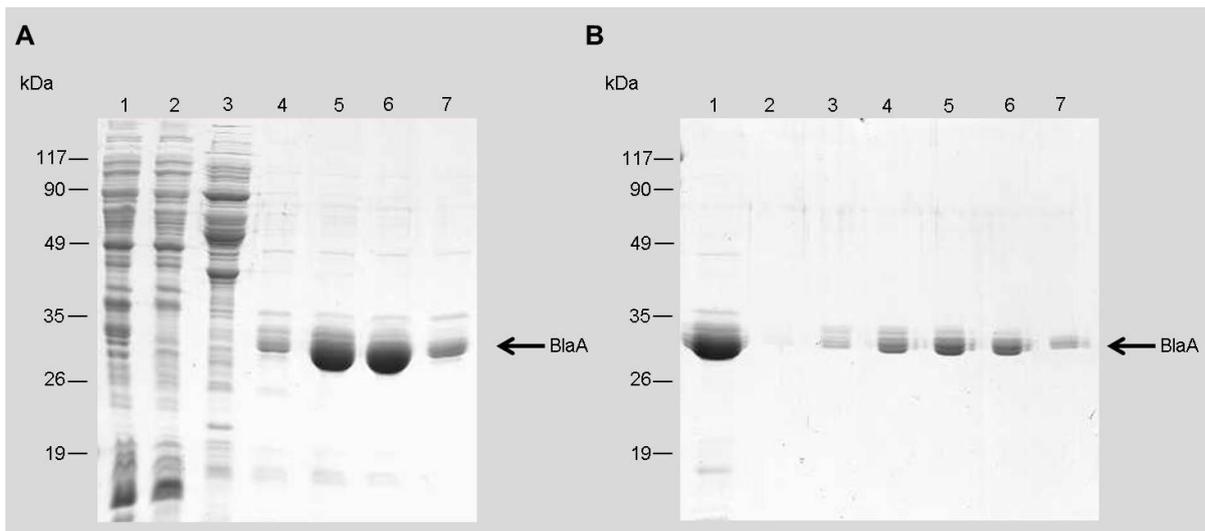


Abb. 33: SDS-PAGE zur Probenkontrolle bei der Aufreinigung von BlaA-His.

BlaA wurde als His₆-tag Fusionsprotein in WA^{RS} ΔΔ überproduziert, mittels **A**: Ni-Sepharose-Chromatographie und **B**: Gelfiltration aufgereinigt und die Fraktionen jeweils mit einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. **A**: Spur 1: Gesamtzelllysat; Spur 2: Sediment nach French Press; Spur 3: Durchlauf nach Ni-Sepharose-Chromatographie; Spur 4-7: eluierte Fraktionen 7-10 nach Ni-Sepharose-Chromatographie. **B**: Spur 1: vereinigte Fraktionen 8-10 nach Ni-Sepharose-Chromatographie; Spur 2-7: Fraktionen 2-7 nach Gelfiltration.

3.5.2 Reinigung von TEM-1 und MEGA

Die *E. coli* β-Laktamasen TEM-1 und die Variante MEGA wurden wie bereits beschrieben aufgereinigt (Kather, *et al.*, 2008).

3.5.3 Thermische Entfaltungsübergänge der β -Laktamasen TEM-1, MEGA und BlaA (Ergebnisse wurden von Stephanie Hoffmann-Thoms, Universität Bayreuth, erarbeitet)

Die *Yersinia* β -Laktamase BlaA sollte im Vergleich zur *E. coli* TEM-1 und der stabilisierten TEM-1 Variante MEGA bezüglich ihrer thermodynamischen Stabilität untersucht werden. Die Bestimmung der thermischen Stabilität der verschiedenen β -Laktamasen erfolgte durch Messung der thermischen Entfaltungsübergänge mittels Fern-UV-CD-Spektren. Die thermische Entfaltung bei steigender Temperatur wurde anhand der Zunahme des CD-Signals bei 223 nm verfolgt und anhand eines Zweizustandsmodells analysiert. Dabei wurde im Falle von TEM-1 und MEGA die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p auf 30 000 J/mol/K festgelegt. Zur Auswertung des thermischen Übergangs von BlaA wurde ΔC_p allerdings nicht mehr fixiert, sondern als freier Parameter behandelt. Eine sinnvolle Auswertung mit einem ΔC_p von 30 000 J/mol/K war nicht möglich. Für die Messungen wurden jeweils 2,5 nM Protein in 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 und 1 M GdmCl eingesetzt. Zugabe von 1 M des Denaturierungsmittels GdmCl war nötig, da BlaA bei steigender Temperatur aggregiert und ausfällt. Um die Messwerte vergleichen zu können, mussten von daher auch die Messungen der thermischen Übergänge der anderen β -Laktamasen in Gegenwart von GdmCl vorgenommen werden. In Abb. 34 sind die thermischen Entfaltungsübergänge sowie die zugehörigen T_M -Werte dargestellt.

ERGEBNISSE

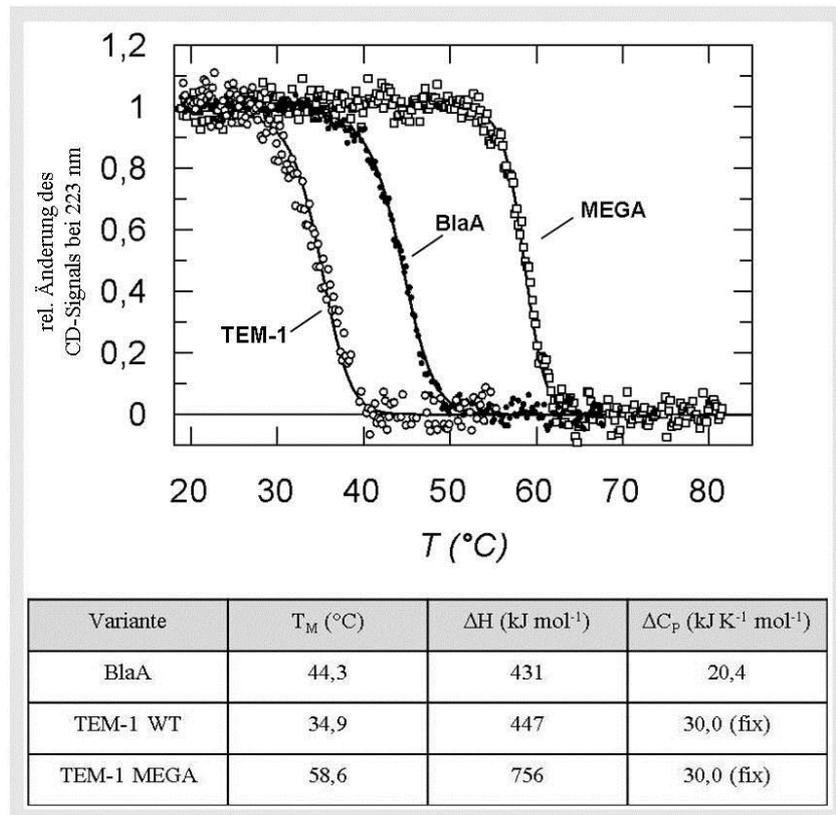


Abb. 34: Thermische Entfaltungsübergänge der β -Laktamasen TEM-1, MEGA und BlaA (Messungen wurden von Stephanie Hoffmann-Thoms, Universität Bayreuth, durchgeführt).

Dargestellt ist die relative Änderung des CD-Signals bei 223 nm in Abhängigkeit der Temperatur (20-80 °C). Die Messungen wurden mit 0,25 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 in Anwesenheit von 1 M GdmCl durchgeführt. Die jeweiligen T_M -Werte sind in der Tabelle unterhalb des Graphen angegeben.

Der Schmelzpunkt von BlaA ($T_M=44,3$ °C) liegt in etwa 10 °C höher als der von TEM-1 ($T_M=34,9$ °C) und 14 °C tiefer als der der stabilisierten TEM-1 Variante MEGA ($T_M=58,6$ °C). BlaA ist also hinsichtlich der Thermostabilität weniger stabil als MEGA, aber stabiler als TEM-1.

3.5.4 Temperaturabhängige, enzymatische Aktivität der β -Laktamasen TEM-1, MEGA und BlaA

Die Daten zur Messung der thermischen Entfaltungsübergänge der β -Laktamasen geben Aufschluss über die Stabilität der Proteine bei verschiedenen Temperaturen. Von weiterem besonderen Interesse ist jedoch die enzymatische Aktivität der β -Laktamasen bei verschiedenen Temperaturen. Die temperaturabhängige Aktivität von BlaA soll im Vergleich

ERGEBNISSE

zur Wildtyp TEM-1 sowie der Variante MEGA untersucht werden. Die Aktivitäten wurden in einem Temperaturspektrum von 15-70 °C mit 2,5 nM Protein in 1 x PBS, 1 mM EDTA, pH 7,0 mit Nitrocefin als Substrat bestimmt. Die Proben wurden 5 min bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 70 µM Nitrocefin gestartet. Die Reaktion wurde über 2 min anhand der Absorption bei 486 nm verfolgt und anschließend für jede Temperatur die Anfangssteigung ($\Delta A_{486}/t$) berechnet. Abb. 35 zeigt die Ergebnisse der temperaturabhängigen Aktivitätsmessungen.

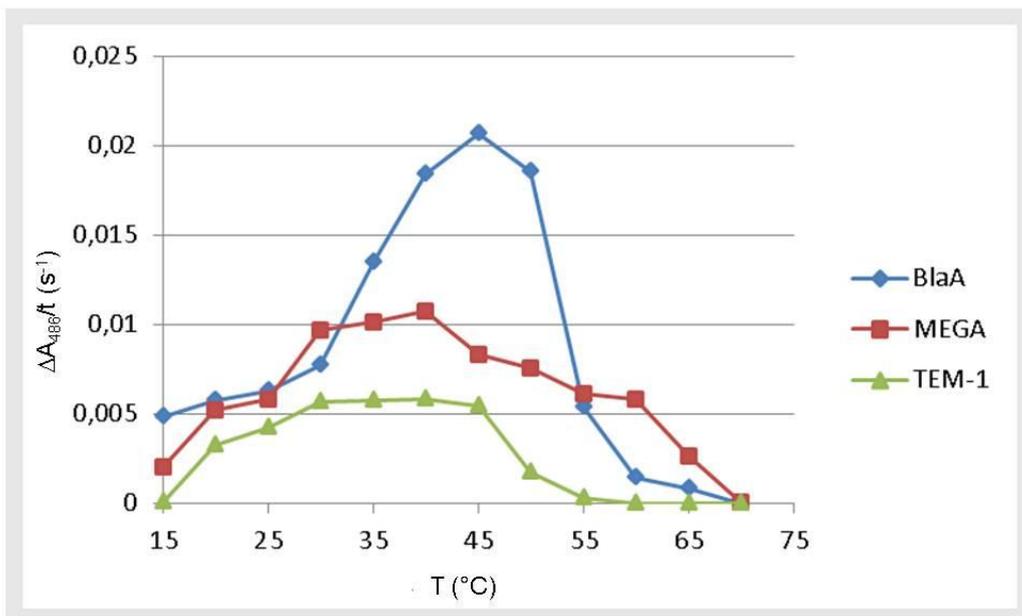


Abb. 35: Temperaturabhängige enzymatische Aktivitäten von TEM-1, MEGA und BlaA.

Die Aktivitäten wurden anhand der Absorptionsänderung bei 486 nm unter Einsatz von 2,5 nM Protein in 1 x PBS, 1 mM EDTA, pH 7,0 durch Zugabe von 70 µM Nitrocefin bestimmt. Die Reaktion wurde über 2 min gemessen und die Anfangssteigung der Spaltreaktion bei verschiedenen Temperaturen graphisch dargestellt.

Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen zeigen deutlich, dass BlaA bei Temperaturen zwischen 35 °C und 50 °C sehr aktiv ist. Innerhalb dieser Temperaturspanne ist BlaA im Vergleich zum Wildtyp TEM-1 Protein etwa dreimal, im Vergleich zur stabilisierten MEGA Variante doppelt so aktiv. Das Maximum der Aktivität von BlaA liegt bei 45 °C; das Maximum von TEM-1 und MEGA bei etwa 40 °C. Es ist auch ersichtlich, dass die stabilisierte Variante MEGA bei Temperaturen über 55 °C noch deutlich aktiv ist. Dahingegen ist die Aktivität des Wildtyp-Proteins TEM-1 bei 55 °C nahezu nicht mehr vorhanden; die Aktivität von BlaA ist zwischen 55 °C und 70 °C im Vergleich zu MEGA deutlich erniedrigt. Die hier beobachtete

ERGEBNISSE

verringerte Aktivität bei Temperaturen über 55 °C gehen mit den Ergebnissen der thermischen Stabilitäten der β -Laktamasen konform (3.5.3).

4 Ergebnisse II

Die β -Laktamase TEM-1 aus *E. coli* hat sich als Reporterprotein für das *Yersinia*-T3SS bewährt (Koberle, *et al.*, 2009, Dewoody, *et al.*, 2011). Translationale Fusionproteine bestehend aus verschiedenen YopE N-Termini und dem reifen Teil von TEM-1 werden über das T3SS sekretiert und in die Wirtszelle transloziert; sie eignen sich also Reporter für die Yop-Sekretion und die „Injektion“ in Wirtszellen. Da die Ysc-T3SS Substrate sehr wahrscheinlich während der Sekretion/Translokation entfaltet werden müssen (ATPase YscN wird als „Unfoldase“ diskutiert) (Wilharm, *et al.*, 2004, Akeda & Galan, 2005), sollte die Substratsekretions- bzw. Substrattranslokationseffizienz von der Substratstrukturstabilität bzw. der Entfaltungsenergie abhängen. Um diese Frage zu beantworten, sollten verschiedene Reporterproteine eingesetzt werden und an N-Termini von YopE fusioniert werden. Die *Yersinia* β -Laktamasen eignen sich als Reporter, da AmpC als Sec-abhängiges Protein im ungefalteten Zustand transportiert wird, wohingegen BlaA als natives Tat-Substrat gefaltet transportiert wird. Weiterhin eignen sich die hitzestabilen TEM-1 Varianten RLT und MEGA als Substratkandidaten, um die Frage zur Rolle der Strukturstabilitäten der Ysc-T3SS Substrate für die Ysc-T3SS Sekretionsfähigkeit zu beantworten.

4.1 Überprüfung der Sekretion verschiedener E_i-TEM-1-Reporterproteine in *Yersinia enterocolitica*

YopE ist gut charakterisiertes T3SS-Substrat, dessen Sekretionssignal im N-Terminus kodiert liegt (Lloyd, *et al.*, 2001, Ramamurthi & Schneewind, 2005). Die Sekretions- und Translokationsfähigkeit von Fusionsproteinen bestehend aus verschiedenen langen YopE_i N-Termini (i=18 AS, 53 AS und 138 AS) und GFP (kurz E_i-GFP) wurde bereits beschrieben (Jacobi, *et al.*, 1998). Dabei zeigte sich, dass E₅₃-GFP (Woestyn, *et al.*, 1996) im Vergleich zu den anderen beiden Fusionsproteinen (E₁₈-GFP und E₁₃₈-GFP) am effizientesten in den Kulturüberstand sekretiert wird. Inzwischen wurde die Kristallstruktur des YopE-(SycE)₂-Komplexes publiziert und es zeigte sich, dass die gesamte SycE-Bindestelle (Cb-Domäne) die ersten 78 AS von YopE umfasst. Ein E₅₃-Fragment enthält nur eine partielle Cb-Domäne; ein E₁₃₈-Fragment umfasst hingegen die komplette Cb-Domäne (Rodgers, *et al.*, 2008). Ebenfalls untersucht wurden Reporterproteine, die aus den oben erwähnten E_i N-Termini und der TEM-1 β -Laktamase (ohne Signalsequenz) bestehen (kurz E_i-TEM-1) (Cvetanovic, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass alle E_i-TEM-1-Fusionsproteine von *Yersinia* in den

ERGEBNISSE

Kulturüberstand sekretiert und in eukaryotische Wirtszellen transloziert werden. Ebenso wie für die E_i-GFP-Fusionen gezeigt, wird E₅₃-TEM-1 effizienter in den Kulturüberstand sekretiert als E₁₃₈-TEM-1.

In der vorliegenden Arbeit dienen die E_i-TEM-1-Fusionsproteine als Kontrollen für Sekretions- und Translokationsassays. Die bereits vorhandenen E_i-TEM-1-Reporterproteine, die in das Tetrazyklinresistenzgen von pACYC184 kloniert wurden (Cvetanovic, 2011), wurden in das Chloramphenicolresistenzgen von pACYC184 umklontiert (2.8.11.2). Die dabei entstandenen Reporterkonstrukte pJ-E₁₈-tem-1, pJ-E₅₃-tem-1 und pJ-E₁₃₈-tem-1, wurden in WA^{RS}ΔΔ (pYV) eingebracht.

Zusammen mit WA^{RS}ΔΔ (pYV) wurde die Yop-Sekretionsfähigkeit von WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₁₈-tem-1), WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₅₃-tem-1), WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₁₃₈-tem-1) getestet. Präzipitierte Kulturüberstandsproteine (KÜPs) wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen und sowohl mittels Coomassie-Färbung als auch im Immunoblot (anti-YopE und anti-β-Laktamase Antikörper) analysiert. Die von der Aminosäuresequenz abgeleiteten Molekulargewichte von E₁₈-TEM-1, E₅₃-TEM-1 und E₁₃₈-TEM-1 betragen 33 kDa, 36 kDa und 44 kDa.

ERGEBNISSE

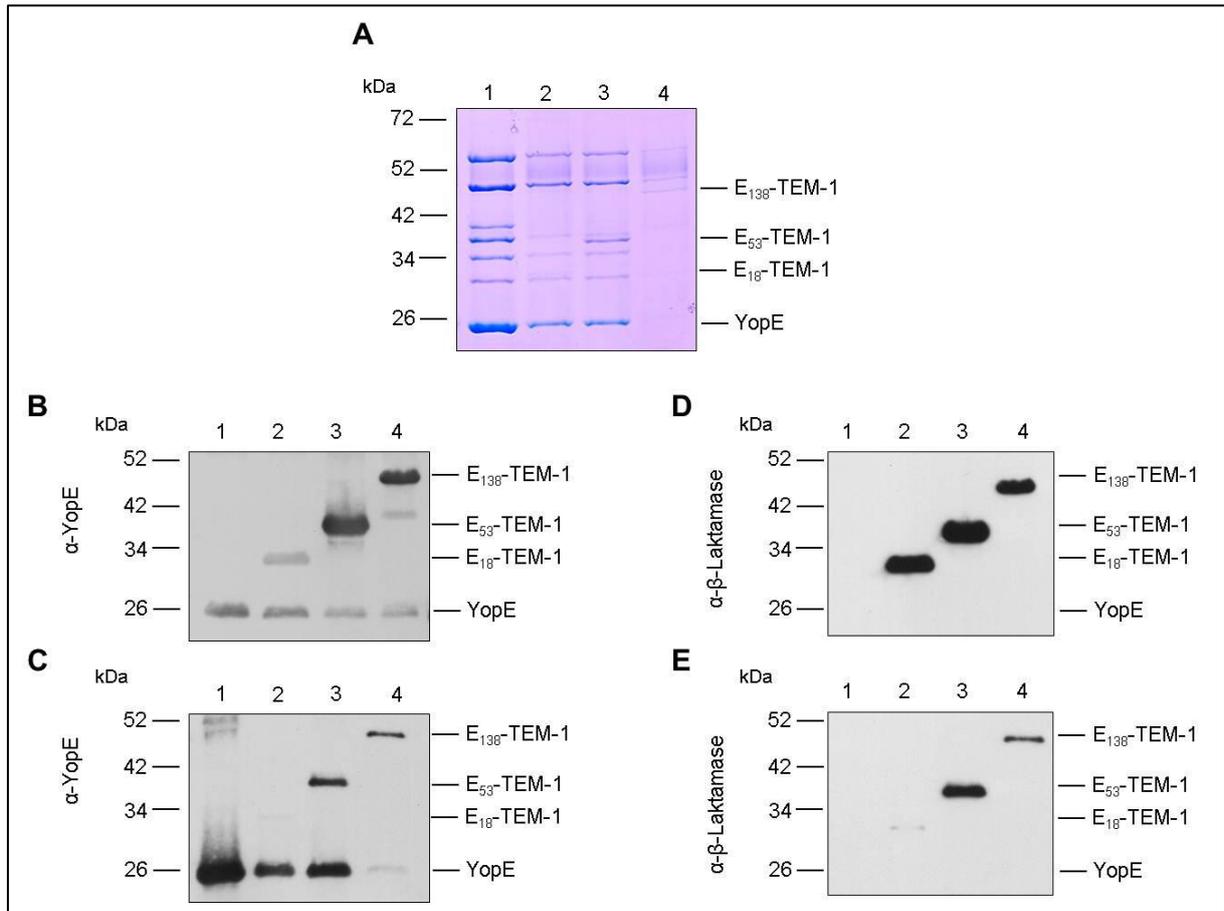


Abb. 36: Produktion und Sekretion von E_i-TEM-1-Reporterproteinen in WA^{RS}ΔΔ.

Die Fusionsgene E_i-tem-1 wurden in WA^{RS}ΔΔ (pYV) unter Kontrolle des endogenen YopE-Promotors exprimiert. Proteine im Gesamtzelllysate und präzipitierte Kulturüberstandsproteine (KÜPs) wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Immunoblot detektiert. **A:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der KÜPs. **B,D:** Immunoblot der Proteine im Gesamtzelllysate. **C,E:** Immunoblot der KÜPs. **B,C:** Immunoblot mit anti-YopE Antikörper. **D,E:** Immunoblot mit anti-β-Laktamase Antikörper. Spur 1: WA^{RS}ΔΔ (pYV); Spur 2: WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₁₈-tem-1); Spur 3: WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₅₃-tem-1); Spur 4: WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₁₃₈-tem-1).

Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel sind Extrabanden beim Auftrag der KÜPs der E_i-TEM-1 produzierenden Yersinien-Stämme zu erkennen, die der Größe der berechneten Molekulargewichte der E_i-TEM-1-Fusionsproteinen entsprechen und die nicht beim Auftrag der KÜPs des WA^{RS}ΔΔ Stammes detektiert werden (Abb. 36A). Immunoblots der Proteine im Gesamtzelllysate und der KÜPs mit anti-YopE und anti-β-Laktamase Antikörper bestätigen die Produktion und Sekretion von E_i-TEM-1 (Abb. 36B-E). Wie bereits von Jacobi, *et al.* (1998) und Cvetanovic (2011) gezeigt, wird das E₅₃-Fusionsprotein effizienter in den Kulturüberstand sekretiert als das E₁₃₈-Fusionsprotein. E₁₈-TEM-1 kann nur in sehr geringen Mengen im Überstand nachgewiesen werden. Die Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der

ERGEBNISSE

KÜPs zeigt ebenfalls, dass die übrigen Yops von E₇-TEM-1 exprimierenden Yersinien in den Überstand sekretiert werden, allerdings in signifikant niedrigerer Menge im Vergleich zu WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV). Auffällig ist, dass beim Auftrag der KÜPs von WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-tem-1) kaum Yops in der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE nachweisbar sind. Eine reduzierte Sekretion von YopE in WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-tem-1) bestätigt der Immunoblot der KÜPs mit anti-YopE Antikörper (Abb. 36D).

4.2 Untersuchung der Sekretionsfähigkeit der β -Laktamasen AmpC und BlaA über das Typ III-Sekretionssystem

4.2.1 Klonierung der Reporterkonstrukte E₅₃-ampC, E₅₃-blaA, E₁₃₈-ampC und E₁₃₈-blaA in pACYC184

Um die Sekretionsfähigkeit der β -Laktamasen AmpC und BlaA über das Ysc-T3SS zu untersuchen, wurden *Yersinia* β -Laktamasen ohne Signalsequenz an den N-Terminus von YopE fusioniert. Um zu überprüfen, ob das Vorhandensein der vollständigen Chaperon-Bindestelle (Cb) die Sekretions- und Translokationseffizienz der Reporterproteine beeinflusst, wurden sowohl YopE₅₃- und YopE₁₃₈- β -Laktamase Fusionsproteine hergestellt.

Ein DNA-Fragment, das das gesamte *sycE*-Gen, die Promotorregion von *yopE* sowie die Kodons für die ersten 53 AS bzw. 138 AS von *yopE* enthält, wurde mittels PCR von chromosomaler *Y. enterocolitica* DNA amplifiziert. Die Kodons für das *ampC* (AS 27-388) bzw. *blaA* (AS 33-294) Gen wurden ebenfalls von chromosomaler *Y. enterocolitica* DNA amplifiziert. Die Fragmente mit den signalpeptidlosen β -Laktamasen wurden zusätzlich mit einen Strep-„tag“ versehen, dessen Oligonukleotidsequenz in die Primersequenz des zur Amplifikation eingesetzten REV-Primers integriert wurde. Der C-terminale Strep-„tag“ dient zur Detektion des Fusionsproteins mit einem monoklonalen anti-Strep Antikörper. Das Fusionsprotein wurde wie in 2.8.11.2 beschrieben in den Klonierungsvektor pACYC184 ligiert. Die Korrektheit der daraus resultierenden Plasmide pJ-E₅₃-ampC, pJ-E₁₃₈-ampC, pJ-E₅₃-blaA und pJ-E₁₃₈-blaA wurde mittels Sequenzierung überprüft. Eine schematische Darstellung der klonierten Konstrukte zeigt Abb. 37.

ERGEBNISSE

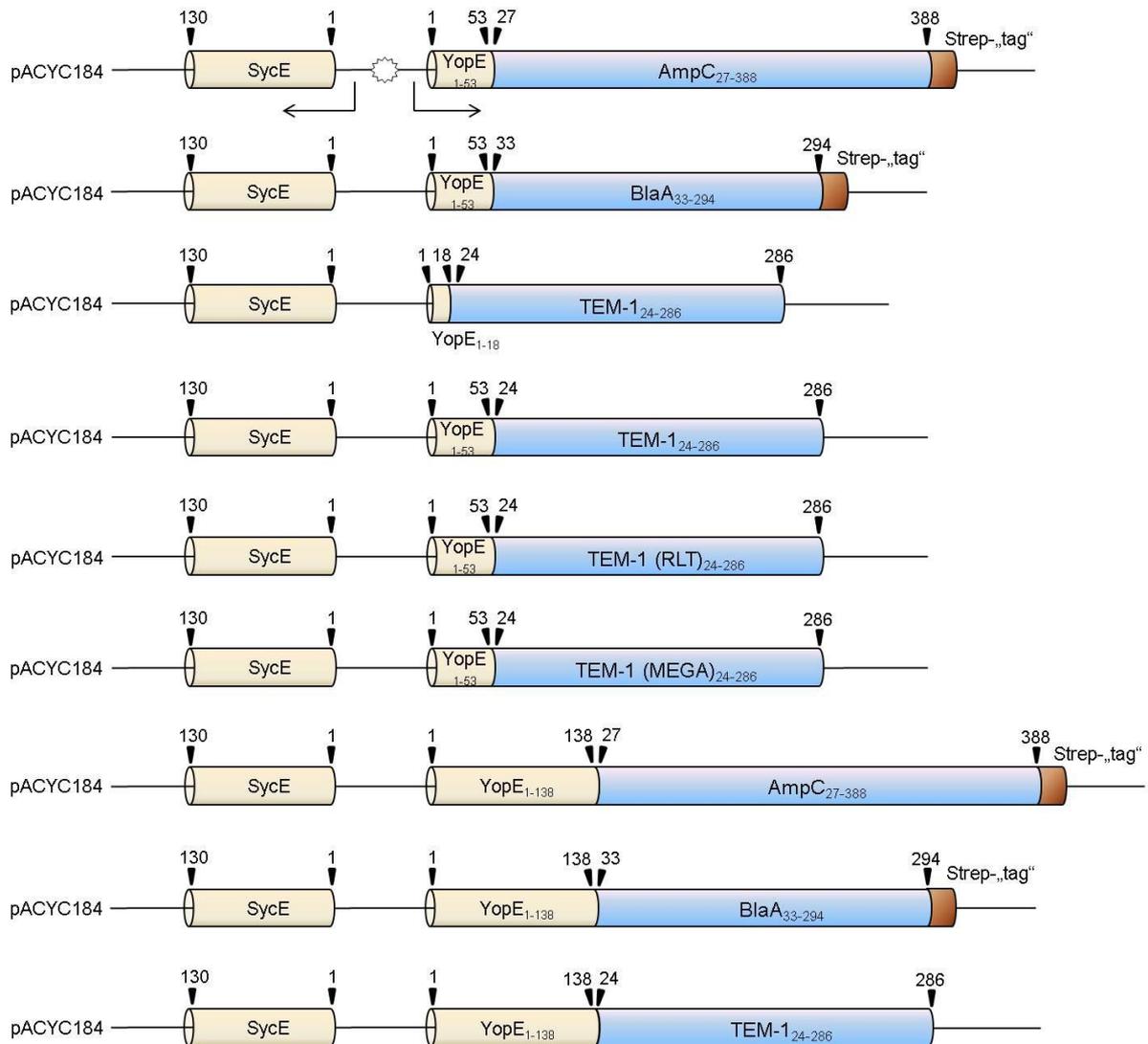


Abb. 37: Schematische Darstellung der YopE-Fusionsproteine

Dargestellt sind die Fusionsproteine bestehend aus verschiedenen YopE N-Termini (E_i , $i=53$ AS, 138 AS) und signalsequenzlosen β -Laktamasen. Die Pfeile und angegebenen Zahlenwerte repräsentieren die jeweiligen Kodons bzw. Aminosäuren der klonierten Fragmente.

4.2.2 Produktion und Sekretion der Reporterproteine E_{53} -AmpC-Strep und E_{53} -BlaA-Strep

Zunächst sollte überprüft werden, ob die Reporterproteine produziert und in den Kulturüberstand sekretiert werden. Dafür wurden die Plasmide pJ- E_{53} -ampC und pJ- E_{53} -blaA jeweils in $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV), in WA (pYVO8-515) sowie WA (pYV Δ yopD) eingebracht. Bei WA (pYVO8-515) handelt es sich um eine *Yersinia* Mutante, bei der das *lcrD*-Gen durch eine Tn5-Insertion inaktiviert wurde und somit kein funktionsfähiges T3SS aufgebaut werden

ERGEBNISSE

kann. Diese Mutante ist in der Lage Yop-Effektoren zu produzieren, jedoch nicht zu sekretieren oder zu translozieren. Im Vergleich dazu ist die Mutante WA (pYV Δ yopD) in der Lage Yops zu produzieren und zu sekretieren, jedoch nicht zu translozieren, da die Translokationspore bestehend aus YopB/YopD nicht gebildet werden kann. Als Kontrollen wurden der pYV-positive Stamm WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV) und der pYV-negative Stamm WA^{RS} $\Delta\Delta$ verwendet. Die Yersinien wurden unter T3SS induzierenden Bedingungen (Ca²⁺-Depletion durch Zugabe von EGTA/MgCl₂) kultiviert und die Proteine aus 2 ml BHI-EGTA Kulturüberstand präzipitiert (2.9.6). Die KÜPs wurden mittels Coomassie-gefärbter SDS-PAGE (Abb. 38A) sowie im Immunoblot mit anti-Strep Antikörper (Abb. 38C) analysiert. Die Proteine im Gesamtzelllysate wurden ebenfalls im Immunoblot mit anti-Strep Antikörper (Abb. 38B) analysiert. Das berechnete Molekulargewicht von E₅₃-AmpC-Strep und E₅₃-BlaA-Strep beträgt 47 kDa bzw. 36 kDa.

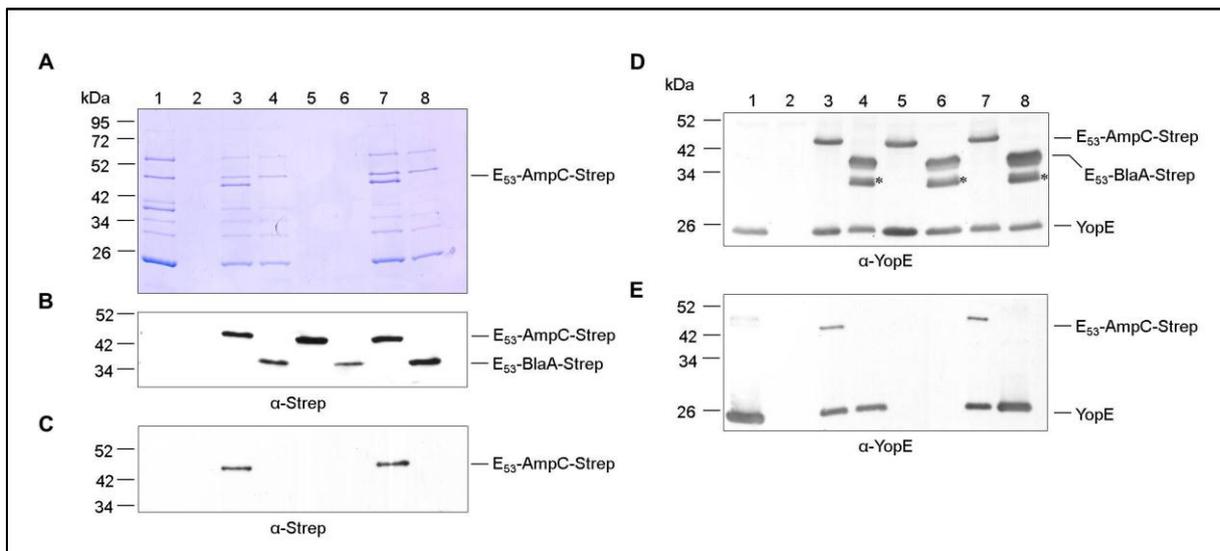


Abb. 38: Überprüfung der Produktion und Sekretion der E₅₃-AmpC-Strep und E₅₃-BlaA-Strep-Fusionsproteine in *Y. enterocolitica*.

Die Expression erfolgte in WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV), im sekretionsdefizienten Stamm WA (pYVO8-515) (Tn5-Insertion in *lcrD*-Gen) und im translokationsdefizienten Stamm WA (pYV Δ yopD). Proteine im Gesamtzelllysate und KÜPs wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Immunoblot detektiert. **A:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der KÜPs. **B:** Immunoblot der Proteine im Gesamtzelllysate mit anti-Strep Antikörper. **C:** Immunoblot der KÜPs mit anti-Strep Antikörper. **D:** Immunoblot der Proteine im Gesamtzelllysate mit anti-YopE Antikörper. **E:** Immunoblot der KÜPs mit anti-YopE Antikörper. Spur 1: WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV); Spur 2: WA^{RS} $\Delta\Delta$; Spur 3: WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₅₃-ampC); Spur 4: WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₅₃-blaA); Spur 5: WA (pYVO8-515, pJ-E₅₃-ampC); Spur 6: WA (pYVO8-515, pJ-E₅₃-blaA); Spur 7: WA (pYV Δ yopD, pJ-E₅₃-ampC); Spur 8: WA (pYV Δ yopD, pJ-E₅₃-blaA). * cytosolisches Abbauprodukt.

ERGEBNISSE

Die KÜPs von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) zeigten im Coomassie-gefärbten Gel das typische Yop-Sekretionsmuster von pYV-positiven Yersinien (Abb. 38A, Spur 1). Keine Yops sind bei Auftrag der KÜPs des pYV-negativen $WA^{RS}\Delta\Delta$ Stammes nachzuweisen (Spur 2). Bei E_{53} -AmpC-Strep und E_{53} -BlaA-Strep produzierenden $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) und WA (pYV $\Delta yopD$) Stämmen sind ebenfalls die Yops beim Auftrag der KÜPs nachweisbar, allerdings in leicht verringerter Menge (Spuren 3 und 4 sowie 7 und 8). Keine Yops bei Auftrag der KÜPs finden sich wie erwartet bei Produktion der Fusionsproteine in WA (pYVO8-515) (Spuren 4 und 5). Im Coomassie-gefärbten Gel ist ebenfalls ersichtlich, dass beim Auftrag der KÜPs von E_{53} -AmpC-Strep produzierenden $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) (Spur 3) und WA (pYV $\Delta yopB$) Stämmen (Spur 7) eine Extrabande im Vergleich zu den Überstandsproteinen von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) (Spur 1) festzustellen ist. Das Laufverhalten dieser Extrabande entspricht in etwa dem berechneten Molekulargewicht des Fusionsproteins E_{53} -AmpC-Strep von 47 kDa. Im Überstandsprofil von E_{53} -BlaA-Strep produzierenden $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) und WA (pYV $\Delta yopD$) Stämmen hingegen ist keine Extrabande zu erkennen, d.h. dass das Fusionsprotein vermutlich nicht sekretiert wird. Interessanterweise beeinflusst die Produktion des nicht-sekretierbaren Fusionsproteins E_{53} -BlaA-Strep die Sekretion der übrigen Yops nur geringfügig. Produktion des sekretierbaren Fusionsproteins E_{53} -AmpC-Strep beeinflusst die Yop-Sekretion nicht.

In Abb. 38B sind die Ergebnisse des Immunoblots der Proteine im Gesamtzelllysate dargestellt. Wie erwartet konnte im Immunoblot mittels anti-Strep Antikörper weder für $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) noch für $WA^{RS}\Delta\Delta$ ein Polypeptid detektiert werden (Abb. 38B, Spur 1 und 2). Die Fusionsproteine E_{53} -AmpC-Strep (47 kDa) und E_{53} -BlaA-Strep (36 kDa) sind in allen Hintergrundstämmen nachweisbar bzw. werden von allen Ysc-T3SS-positiven Stämmen produziert (Spuren 3-8). Im Immunoblot der Proteine des Gesamtzelllysats konnte für keines der Fusionsproteine eine cytoplasmatische Degradierung festgestellt werden. Abb. 38C zeigt die Analyse der KÜPs im Immunoblot und bestätigt die Beobachtungen im Coomassie-gefärbten Gel: Nur das E_{53} -AmpC-Strep Fusionsprotein in den sekretionskompetenten Hintergrundstämmen $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) und WA (pYV $\Delta yopD$) kann nachgewiesen werden. E_{53} -BlaA-Strep wird zwar produziert, nicht aber in den Kulturüberstand sekretiert.

Mittels des anti-Strep Antikörpers konnte keine cytoplasmatische Degradierung der Fusionsproteine im Gesamtzelllysate nachgewiesen werden (Abb. 38B); ein N-terminaler Abbau der Fusionsproteine im Cytoplasma durch Proteasen wie von Jacobi, *et al.* (1998) beschrieben, konnte somit ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, ob eine mögliche C-terminale Degradierung der Fusionsproteine im Cytosol stattfindet, wurden die Proteine im Gesamtzelllysate und die KÜPs im Immunoblot mit anti-YopE Antikörper untersucht (Abb.

ERGEBNISSE

38D-E). Es wurde in anderen Arbeiten bereits gezeigt, dass die ersten 53 AS von YopE ausreichen, um vom polyklonalen anti-YopE Antikörper in der Immunoblotanalyse nachgewiesen werden zu können (Jacobi, *et al.*, 1998, Wolke, *et al.*, 2011). Auch die Analyse der KÜPs im Immunoblot mit anti YopE Antikörper (Abb. 38E) zeigte, dass nur das Fusionsprotein E₅₃-AmpC-Strep bei Produktion in sekretionskompetenten Stämmen (WA^{RS}ΔΔ (pYV) und WA (pYVΔyopD)) nachweisbar ist (Spuren 3 und 7); das 36 kDa große E₅₃-BlaA-Strep kann nicht detektiert werden. Ebenfalls detektiert wird YopE (26 kDa); die Menge an YopE, die von E₅₃-AmpC-Strep und E₅₃-BlaA-Strep produzierenden Stämmen sekretiert wird, ist im Vergleich zum sekretierten YopE von WA^{RS}ΔΔ (pYV) etwas reduziert. Betrachtet man die Proteine im Gesamtzelllysate (Abb. 38D), so sind die Fusionsproteine E₅₃-AmpC-Strep und E₅₃-BlaA-Strep in allen Stämmen etwa gleich stark nachweisbar. E₅₃-AmpC-Strep wird in allen Fällen als Einzelbande vom anti-YopE Antikörper detektiert, wohingegen E₅₃-BlaA-Strep in allen Fällen als Doppelbande nachgewiesen wird. Die zwei Polypeptide unterschiedlichen Molekulargewichts werden in etwa im gleichen Mengenverhältnis produziert. Die Proteinspezies mit höherem Molekulargewicht entspricht im Laufverhalten in etwa der berechneten Größe des E₅₃-BlaA-Strep Fusionsproteins. Bei dieser Proteinspezies handelt es sich also vermutlich um das komplette E₅₃-BlaA-Strep. Bei der Proteinspezies mit dem niedrigeren Molekulargewicht kann von einem cytosolischen Abbauprodukt ausgegangen werden. Das E₅₃-BlaA-Strep Fusionsprotein ist nicht kompatibel mit dem T3SS, kann somit nicht in den Überstand sekretiert werden und wird daher vermutlich im Cytoplasma durch Proteasen C-terminal degradiert.

4.2.3 Produktion und Sekretion der Reporterproteine E₁₃₈-AmpC-Strep und E₁₃₈-BlaA-Strep

Wie in 4.2.1 bereits beschrieben, enthält ein E₅₃-Fragment nur eine partielle SycE-Bindestelle. Ein E₁₃₈-Fragment umfasst hingegen die vollständige SycE-Bindestelle. Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit der vollständigen Cb-Domäne von YopE die Sekretionseffizienz der Reporterproteine im Gegensatz zu den E₅₃-Fusionsproteinen beeinflusst, wurden die Plasmide pJ-E₁₃₈-ampC und pJ-E₁₃₈-blaA konstruiert (siehe 4.2.1 und Abb. 37). Zur Untersuchung der Produktion und Sekretion der Reporterproteine wurden die jeweiligen Plasmide in WA^{RS}ΔΔ (pYV) mittels Elektroporation eingebracht. Als Kontrolle diente wiederum WA^{RS}ΔΔ (pYV). Die Expression der Konstrukte in den Ysc-T3SS-defizienten Kontrollstämmen WA (pYVO8-515) und WA (pYVΔyopD) wurde nicht durchgeführt, da die

ERGEBNISSE

Sekretionsdefizienz dieser Stämme bereits in 4.2.2 gezeigt wurde. $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV), $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-ampC) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-blaA) wurden jeweils unter T3SS induzierenden Bedingungen kultiviert und die Überstandsproteine präzipitiert. Proteine im Gesamtzelllysats und KÜPs wurden mittels einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Immunoblot mittels anti-Strep und anti-YopE Antikörper detektiert. Die Kulturüberstände wurden zusätzlich mittels Coomassie-gefärbter SDS-PAGE analysiert. Das berechnete Molekulargewicht von E₁₃₈-AmpC-Strep und E₁₃₈-BlaA-Strep beträgt 56 kDa bzw. 44 kDa.

Im Coomassie-gefärbten Gel ist bei Auftrag der KÜPs zunächst zu erkennen, dass die Sekretion der Yops in den $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-ampC) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-blaA) Stämmen im Vergleich zu $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) sehr stark reduziert ist (Abb. 39A). Dagegen war die Yop-Sekretion der Stämme mit E₅₃-AmpC-Strep und E₅₃-BlaA-Strep nicht beeinträchtigt (Abb. 38A). Außerdem kann im Coomassie-gefärbten Gel bei Auftrag der KÜPs von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-ampC) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-blaA) keine Extrabande ausgemacht werden. Der Immunoblot der Proteine im Gesamtzelllysate mit anti-YopE Antikörper (Abb. 39B) zeigt zunächst, dass beide Fusionsproteine produziert werden. Ebenfalls detektiert wird YopE, das in gleicher Menge produziert wird wie YopE in $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV). Interessanterweise wird im Gegensatz zum E₅₃-BlaA-Strep-Fusionsprotein bei E₁₃₈-BlaA-Strep kein cytosolisches Abbauprodukt nachgewiesen; eine C-terminale Degradierung im Cytosol scheint also nicht stattzufinden. Der Immunoblot der Proteine im Gesamtzelllysate mit anti-Strep Antikörper bestätigt, dass beide Fusionsproteine produziert werden (Abb. 39D). Analyse der KÜPs im Immunoblot mit anti-YopE Antikörper (Abb. 39C) zeigt, dass nur E₁₃₈-AmpC-Strep, aber nicht E₁₃₈-BlaA-nachweisbar sind. YopE wird sowohl von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-ampC) als auch von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-blaA) sekretiert, allerdings in signifikant niedrigerer Menge im Vergleich zur YopE-Sekretion von $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV). Dies bestätigt die Beobachtungen im Coomassie-gefärbten Gel der KÜPs (Abb. 39A). Auch im Immunoblot der KÜPs mit anti-Strep Antikörper kann lediglich E₁₃₈-AmpC-Strep detektiert werden.

ERGEBNISSE

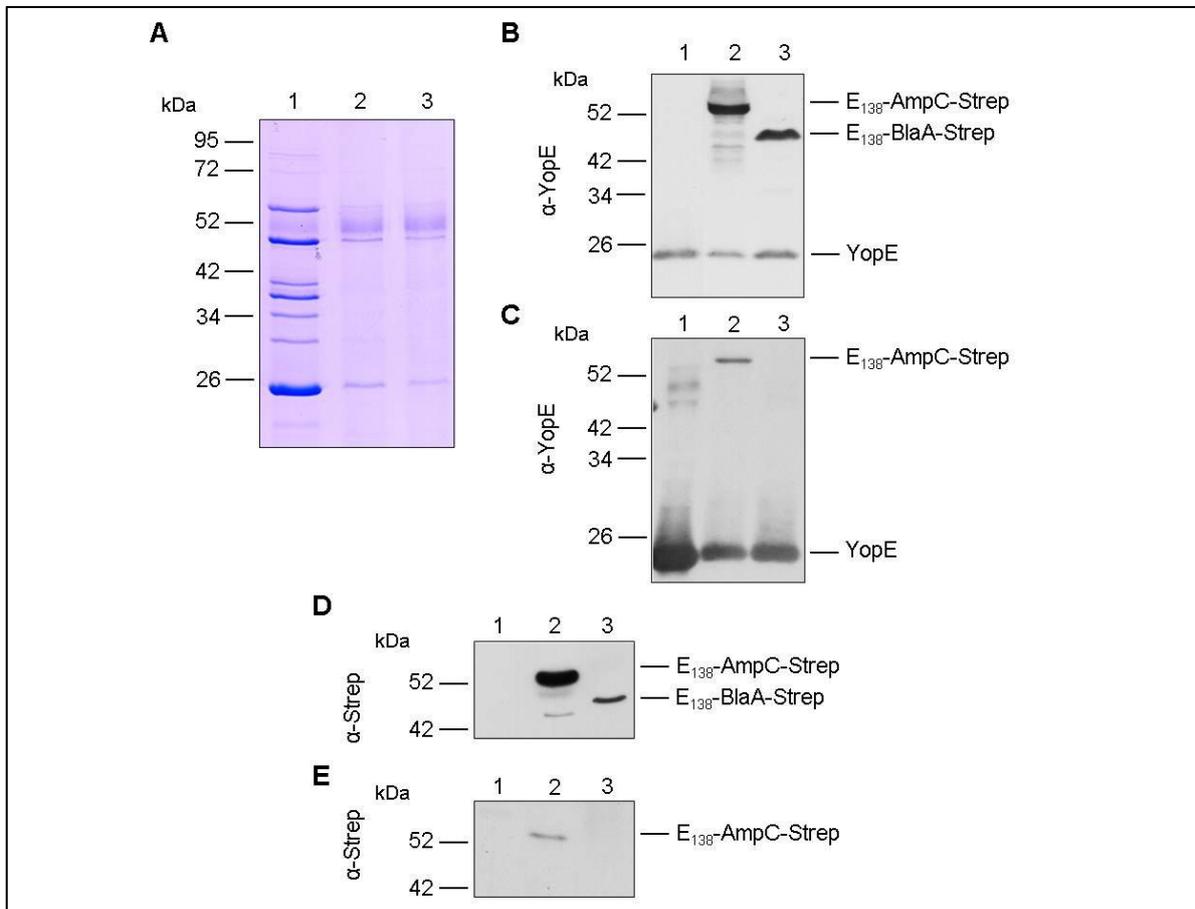


Abb. 39: Überprüfung der Produktion und Sekretion der E₁₃₈-AmpC-Strep und E₁₃₈-BlaA-Strep-Fusionsproteine in *Y. enterocolitica*

Proteine im Gesamtzelllysate und KÜPs wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Immunoblot identifiziert. **A:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der KÜPs **B:** Immunoblot der Proteine im Gesamtzelllysate mit anti-YopE Antikörper. **C:** Immunoblot der KÜPs mit anti-YopE Antikörper. **D:** Immunoblot der Proteine im Gesamtzelllysate mit anti-Strep Antikörper. **E:** Immunoblot der KÜPs mit anti-Strep Antikörper Spur 1: WA^{RS}ΔΔ (pYV); Spur 2: WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₁₃₈-ampC); Spur 3: WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₁₃₈-blaA).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Fusionsproteine E₅₃-AmpC-Strep und E₁₃₈-AmpC-Strep sowie E₅₃-BlaA-Strep und E₁₃₈-BlaA-Strep in ihrem Sekretionsverhalten nicht wesentlich unterscheiden. Unabhängig von der Vollständigkeit der Cb-Domäne von YopE kann AmpC über das T3SS sekretiert werden, BlaA hingegen nicht. Ein Unterschied ist jedoch in der Stabilität zwischen E₅₃-BlaA-Strep und E₁₃₈-BlaA-Strep festzustellen: E₁₃₈-BlaA-Strep wird im Gegensatz zu E₅₃-BlaA-Strep nicht im Cytoplasma abgebaut (Abb. 38D und Abb. 39). E₅₃-BlaA-Strep wird im Gegensatz zu E₁₃₈-BlaA-Strep im Cytosol um ca. 7 kDa (entspricht ~ 60 AS) C-terminal degradiert.

4.2.4 Translokation der Reporterproteine in eukaryotische Zellen

In 4.2.2 und 4.2.3 wurde die Sekretion der β -Laktamase-Reporterproteine in den Kulturüberstand untersucht. Dabei zeigte sich, dass E_{53} -AmpC-Strep und E_{138} -AmpC-Strep über das T3SS sekretiert werden können; nicht jedoch E_{53} -BlaA-Strep und E_{138} -BlaA-Strep. Die Tat-abhängige β -Laktamase BlaA scheint also als Substrat nicht kompatibel mit dem Ysc-T3SS zu sein. In Zellkultur-Infektionsversuchen sollte untersucht werden, ob die Reporterproteine in eukaryotische Zellen transloziert werden können. Falls die Ysc-T3SS Substrate auch kotranskriptional transloziert werden, würde man für E_{i} -BlaA-Strep Translokation in die Wirtszelle erwarten können. Um die Translokation der Proteine nachweisen zu können, wurde das FRET- β -Laktamase-Substrat CCF4-AM verwendet, welches die Substratspaltung der β -Laktamasen innerhalb der Zielzellen sichtbar macht. Ungespaltenes CCF4 emittiert bei Anregung eine grüne Fluoreszenz. Die an YopE fusionierten β -Laktamasen spalten CCF4 und der verbleibende Rest emittiert bei Anregung eine blaue Fluoreszenz. Das CCF4 Substrat und seine Spaltung kann am Durchflusszytometer ratiometrisch analysiert werden (Details siehe 2.13 und 2.14).

Zur Untersuchung der Translokation der YopE-Reporterproteine wurden die folgenden Stämme verwendet: $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV), $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ- E_{53} -ampC), $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ- E_{53} -blaA), $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ- E_{138} -ampC) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ- E_{138} -blaA) sowie als Positiv-Kontrollen $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ- E_{53} -TEM-1) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ- E_{138} -TEM-1). Es konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass E_{53} -TEM-1 und E_{138} -TEM-1 von translokationskompetenten Yersinien in eukaryotische Zielzellen transloziert werden und mittels des Substrats CCF4-AM nachgewiesen werden können (Koberle, *et al.*, 2009). Ebenfalls getestet wurden die sekretionsdefizienten Kontrollstämme WA (pYVO8-515, pJ- E_{53} -ampC) und WA (pYVO8-515, pJ- E_{53} -blaA) sowie die translokationsdefizienten Kontrollstämme WA (pYV Δ yopD, pJ- E_{53} -ampC) und WA (pYV Δ yopD, pJ- E_{53} -blaA).

HEK-293-Zellen wurden für 1 h mit den jeweiligen Yersinien-Stämmen mit einer MOI von 50 infiziert (2.12.2) und anschließend mit CCF4-AM gefärbt (2.13). Die CCF4-beladenen Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert (2.14).

ERGEBNISSE

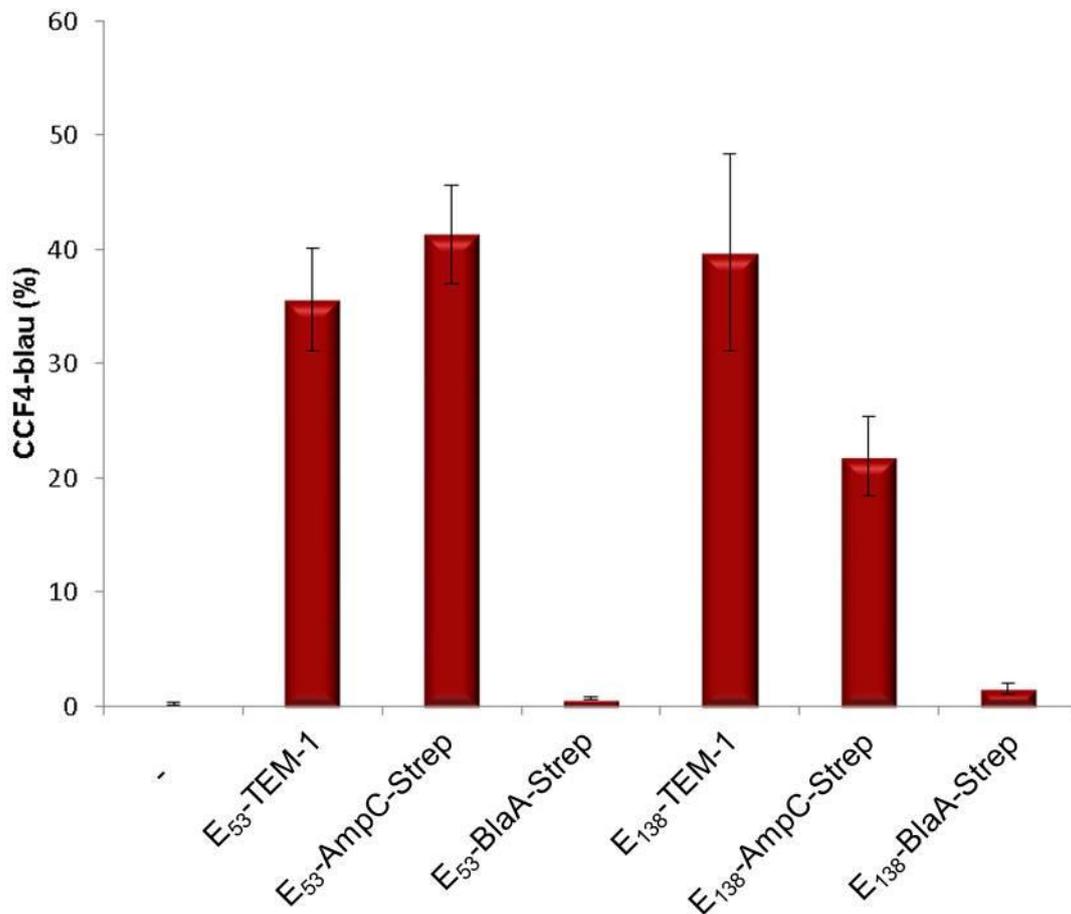


Abb. 40: Translokation der YopE-Reporterproteine in HEK-293 Zellen.

HEK-293-Zellen wurden mit $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) (dargestellt als „-“), $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₅₃-TEM-1), $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₅₃-ampC), $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₅₃-blaA), $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₅₃-TEM-1), $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-ampC) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₁₃₈-blaA) mit einer MOI von 50 für 1 h bei 37 °C infiziert. Die Zellen wurden mit CCF4-AM beladen und die CCF4 Fluoreszenzen im Durchflusszytometer ratiometrisch ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an CCF4-blauen Zellen von der Gesamtzellpopulation. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt und die gemittelten Werte aufgetragen. Fehlerbalken: ±Standardabweichung.

Die FACS-Analyse ergab zunächst, dass die Negativ-Kontrolle $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) (-) das Substrat nicht umsetzt; der Anteil an CCF4-blauen Zellen liegt bei <0,1 %. Die Positiv-Kontrolle $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ-E₅₃-tem-1) zeigte einen CCF4-blau-Anteil von ~ 36 %. E₅₃-TEM-1 konnte also das Substrat CCF4 innerhalb der Zelle spalten und wurde somit transloziert. E₅₃-AmpC-Strep konnte bei Expression in $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) in die Zielzellen transloziert werden; der Anteil an CCF4-blauen Zellen betrug ~ 41 % und ist somit vergleichbar mit der Positiv-Kontrolle. Keine Translokation konnte für das Fusionsprotein E₅₃-BlaA-Strep festgestellt

ERGEBNISSE

werden; der Anteil an CCF4-blauen Zellen lag bei ~ 0,5 % und ist somit vernachlässigbar gering. Bei keinem der sekretions- oder translokationsdefizienten Stämme, die die Reporterproteine exprimieren, konnte eine Translokation in die Zielzellen nachgewiesen werden; der prozentuale CCF4-blau-Anteil war mit < 0,1 % vergleichbar zur Negativ-Kontrolle (Ergebnisse nicht dargestellt). Wie bereits beschrieben (Cvetanovic, 2011), wurde auch das Fusionsprotein E₁₃₈-TEM-1 in die Zielzellen transloziert; der prozentuale Anteil an CCF4-blauen Zellen betrug ~ 39 %. Auch E₁₃₈-AmpC-Strep konnte bei Produktion im pYV Plasmid-positiven Stamm WA^{RS}ΔΔ in die eukaryotischen Zielzellen transloziert werden. Der Anteil an CCF4-blauen Zellen betrug ~ 22 % und ist somit signifikant geringer als der Anteil der CCF4-blauen Zellen bei Translokation von E₁₃₈-TEM-1. E₁₃₈-BlaA-1 konnte nicht in die Zielzellen transloziert werden (CCF4-blau-Anteil ~ 1,5 %).

4.3 Untersuchung der Sekretionsfähigkeit von unterschiedlich-thermisch stabilen β-Laktamasen über das T3SS

In 4.2 konnte gezeigt werden, dass ein Fusionsprotein aus einem 53 AS langen N-Terminus von YopE und der *Yersinia* β-Laktamase AmpC ohne Signalsequenz (AS 27-388) über das T3SS in den Kulturüberstand sekretiert werden kann. In einem Zellkultur-Translokationsexperiment konnte ebenfalls gezeigt werden, dass E₅₃-AmpC-Strep in eukaryotische Zielzellen transloziert wird. Dahingegen wird ein Fusionsprotein aus den ersten 53 AS von YopE und der *Yersinia* β-Laktamase BlaA (AS 33-294) zwar produziert, aber weder in den Überstand sekretiert noch in Zielzellen transloziert. Die Sec-abhängige β-Laktamase AmpC (ebenso wie die Sec-abhängige β-Laktamase TEM-1 aus *E. coli*) ist also kompatibel mit dem T3SS, wohingegen die Tat-abhängige β-Laktamase BlaA nicht über das T3SS transportiert werden kann.

In weiteren Versuchen sollte nun untersucht werden, inwiefern eine Korrelation zwischen der thermischen Stabilität von β-Laktamasen und ihrer Fähigkeit, über das T3SS transportiert zu werden, besteht. Wie bereits in 3.5 beschrieben, konstruierten Kather, *et al.* (2009) in ihrer Arbeit hitzestabile TEM-1 Varianten. Die hitzestabilste Variante MEGA mit einem T_M-Wert von 69,2 °C liegt 20 °C höher als die der Wildtyp TEM-1 (T_M=50,8). Es stellt sich nun die Frage, ob diese β-Laktamase Variante MEGA, die sich durch eine starke thermische Stabilität auszeichnet, genau wie die wildtypische TEM-1 über das T3SS transportiert werden kann. Ebenfalls untersucht werden soll eine β-Laktamase Variante, deren Schmelzpunkt zwischen denen der Wildtyp TEM-1 und MEGA liegt: RLT (T_M=60,4 °C). Analog zu den pJ-E₅₃-ampC und pJ-E₅₃-blaA Fusionskonstrukten (4.2.1), sollen die Kodons

ERGEBNISSE

der β -Laktamasen TEM-1, RLT und MEGA ohne Signalsequenz an die Kodons für das Sekretionssignal von YopE (ersten 53 AS) fusioniert werden. Die Klonierung wird detailliert in 2.8.11.2 beschrieben.

4.3.1 Produktion und Sekretion der Reporterproteine E₅₃-RLT, E₅₃-MEGA und E₅₃-TEM-1 in *Y. enterocolitica*

Um zu untersuchen, ob die Fusionsproteine produziert und sekretiert werden, wurden die Plasmide pJ-E₅₃-RLT, pJ-E₅₃-MEGA und pJ-E₅₃-TEM-1 in WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV) mittels Elektroporation eingebracht. Die Induktion der T3SS erfolgte wie in 4.2.2 und 2.9.6 beschrieben. Als Kontrolle wurde wiederum WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV) verwendet. Die jeweiligen KÜPs wurden mit einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt (Abb. 41A) oder die Proteine im Immunoblot mit anti- β -Laktamase Antikörper (Abb. 41C) sowie anti-YopE Antikörper (Abb. 41E) identifiziert. Die Proteine im Gesamtzellysate wurden im Immunoblot mit anti- β -Laktamase Antikörper (Abb. 41B) sowie anti-YopE Antikörper (Abb. 41D) analysiert. Das berechnete Molekulargewicht aller TEM-1 Fusionsproteine beträgt 35 kDa.

ERGEBNISSE

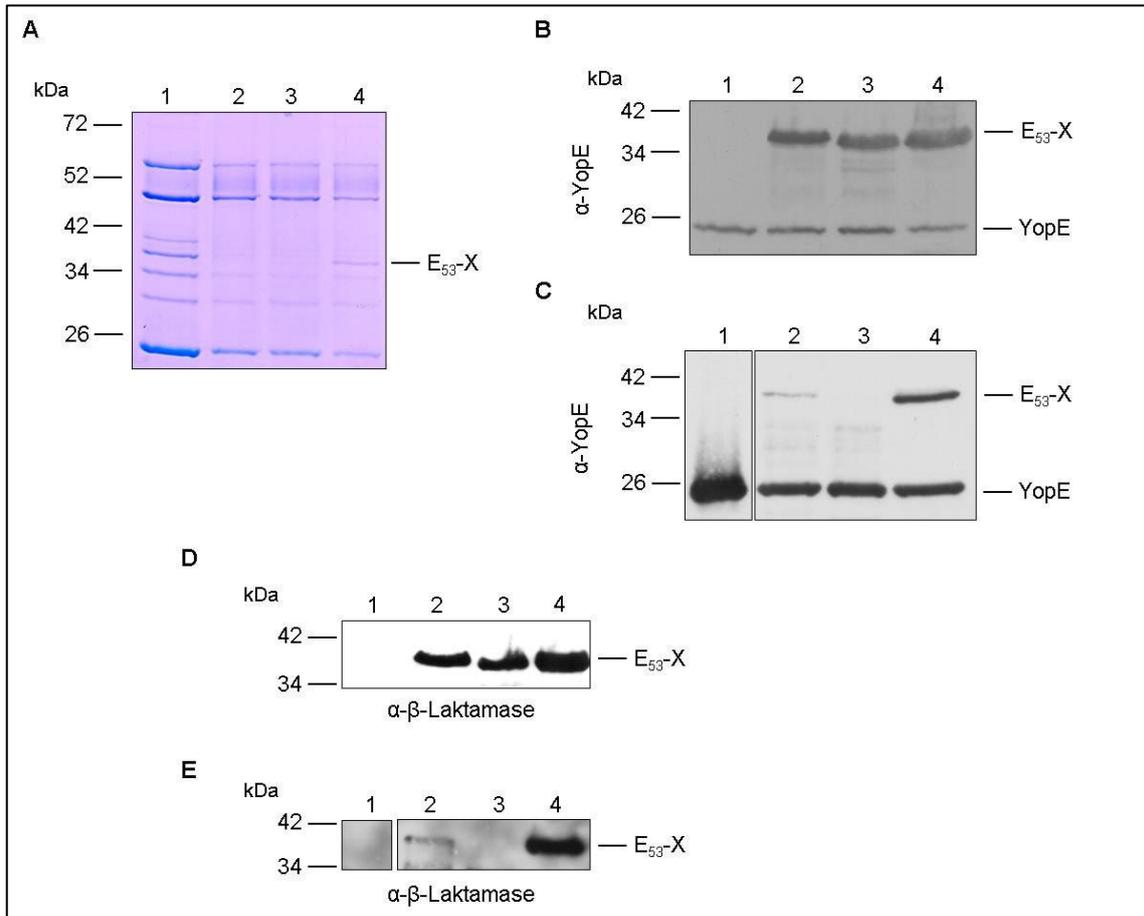


Abb. 41: Überprüfung der Produktion und Sekretion der E₅₃-RLT, E₅₃-MEGA und E₅₃-TEM-1 Fusionsproteine in *Y. enterocolitica*.

Die Fusionsproteine E₅₃-X (X= RLT, MEGA, TEM-1 ohne Signalsequenz) wurden in WA^{RS}ΔΔ (pYV) produziert. Proteine im Gesamtzelllysate und KÜPs wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Immunoblot identifiziert. **A:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der KÜPs. **B:** Immunoblot der Proteine im Gesamtzelllysate mit anti-YopE Antikörper. **C:** Immunoblot der KÜPs mit anti-YopE Antikörper. **D:** Immunoblot der Proteine im Gesamtzelllysate mit anti-β-Laktamase Antikörper. **E:** Immunoblot der KÜPs mit anti-β-Laktamase Antikörper. Spur 1: WA^{RS}ΔΔ (pYV); Spur 2: WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₅₃-RLT); Spur 3: WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₅₃-MEGA); Spur 4: WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₅₃-tem-1).

In der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE der aufgetragenen KÜPs (Abb. 41A) ist zu erkennen, dass alle untersuchten Stämme Yops sekretieren. Bei Auftrag der KÜPs von WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₅₃-RLT) und WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₅₃-tem-1) ist jeweils eine Extrabande im Vergleich zu den KÜPs von WA^{RS}ΔΔ (pYV) zu erkennen, wobei die Bande bei WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₅₃-tem-1) stärker ausgeprägt ist als bei WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₅₃-RLT). Die Größe dieser Extrabande entspricht in etwa dem berechneten Molekulargewicht der Fusionsproteine von 35 kDa. Bei WA^{RS}ΔΔ (pYV, pJ-E₅₃-MEGA) zeigt der Auftrag der KÜPs keine Extrabande. Die Menge an sekretierten Yops der E₅₃-X produzierenden Reporterstämmen ist im Vergleich zu

ERGEBNISSE

der des $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) Stammes reduziert. Analysiert man die Kulturüberstände im Immunoblot mit anti-YopE Antikörper (Abb. 41E), so ist ebenfalls ersichtlich, dass das E_{53} -TEM-1 Fusionsprotein in vergleichbarer Menge wie YopE in den Überstand sekretiert wird. E_{53} -MEGA wird nicht in den Überstand sekretiert und E_{53} -RLT ist nur sehr schwach im Überstand detektierbar. Übereinstimmende Ergebnisse liefert der Immunoblot der KÜPs mit anti- β -Laktamase Antikörper (Abb. 41C). Vergleicht man die Produktion der Fusionsproteine im Immunoblot mit anti- β -Laktamase Antikörper (Abb. 41B) bzw. anti-YopE-Antikörper (Abb. 41D), so ist zu sehen, dass alle Fusionsproteine in vergleichbarer Menge produziert werden.

4.3.2 Translokation der TEM-1-Reporterproteine in eukaryotische Zellen

Ebenso wie für die E_{53} -AmpC-Strep, E_{138} -AmpC-Strep, E_{53} -BlaA-Strep und E_{138} -BlaA-Strep Fusionsproteine (4.2.4) soll untersucht werden, ob die E_{53} -X-Reporterproteine in eukaryotische Zellen transloziert werden können.

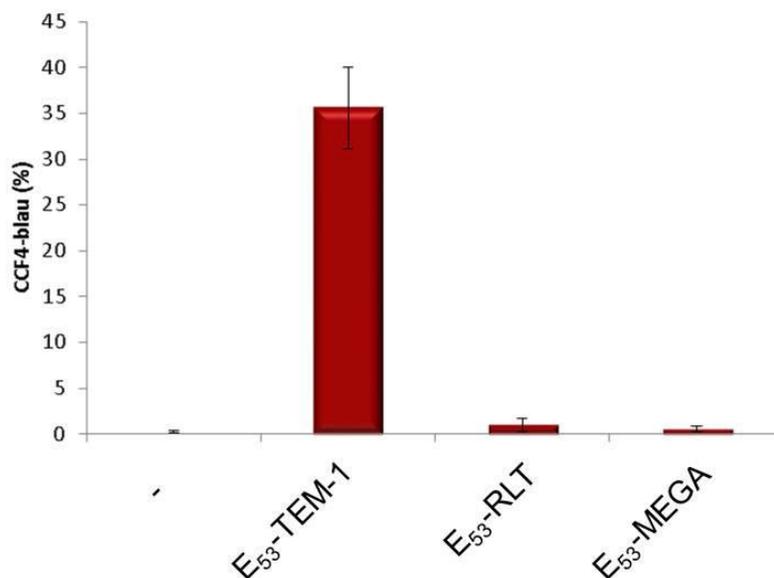


Abb. 42: Translokation der E_{53} -X-Reporterproteine in HEK-293-Zellen.

HEK-293-Zellen wurden mit $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ- E_{53} -tem-1), $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ- E_{53} -RLT) und $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV, pJ- E_{53} -MEGA) mit einer MOI von 50 für 1 h bei 37 °C infiziert. Infektion mit $WA^{RS}\Delta\Delta$ (pYV) diente als Negativ-Kontrolle (dargestellt als „-“). Die infizierten HEK-293-Zellen wurden mit CCF4-AM für 90 min beladen. Die CCF4-Fluoreszenzen wurden im FACS ratiometrisch analysiert. Dargestellt ist der CCF4-blau-Anteil der Zellen von drei unabhängigen Experimenten. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung wurden aufgetragen.

ERGEBNISSE

Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben, dass weder E₅₃-RLT noch E₅₃-MEGA in HEK-293-Zellen transloziert werden können; der CCF4-Anteil an blauen Zellen betrug ~ 1 % bzw. ~ 0,6 %. Das Fusionsprotein aus E₅₃ und wildtypischer TEM-1 hingegen wurde, wie bereits in 4.2.4 beschrieben, transloziert.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der β -Laktamasen AmpC und BlaA von *Yersinia enterocolitica* WA-314

Das Vorkommen von *Y. enterocolitica* in Assoziation mit Yersiniosen ist weltweit verbreitet, wobei die verursachenden Stämme geographisch unterschiedlich verteilt sind. So findet man bei Patientenisolaten aus den USA und Kanada häufig Biotyp 1B (Serotypen O:8; O:4,32; O:13a;O:13b; O:18; O:20; O:21), wohingegen in Isolaten aus Europa und Japan Biotypen 2-4 (Serotypen O:3; O:5,27 und O:9) vorherrschend sind (Chiesa, *et al.*, 1991, Bottone, 1997, Neubauer, *et al.*, 2000). Aufgrund der signifikanten Unterschiede in der rRNA Sequenz zwischen den Biotyp 1B Stämmen und den Stämmen der anderen Biotypen, wurde *Y. enterocolitica* in zwei Unterarten unterteilt: *Y. enterocolitica* ssp. *enterocolitica* (Biotyp 1B Stämme) und *Y. enterocolitica* ssp. *palearctica* (Biotyp 1A, 2-5) (Neubauer, *et al.*, 2000). Biotyp 1B umfasst hochpathogene Stämme (bezogen auf die Virulenz im Mausmodell), wobei es sich bei Biotyp 1B, Serotyp O:8 um den virulentesten Typ von *Y. enterocolitica* handelt (Hayashidani, *et al.*, 1995). Auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm WA-314 handelt es sich um Biotyp 1B, Serotyp O:8 (Heesemann, *et al.*, 1984).

1975 beschrieben Abraham & Cornelis zwei chromosomal kodierte β -Laktamasen in *Y. enterocolitica*: BlaA, eine konstitutiv exprimierte Klasse A β -Laktamase und BlaB (bzw. AmpC), eine induzierbare Klasse C Cephalosporinase. Vermutlich besitzen alle *Y. enterocolitica* Stämme Gene für zwei β -Laktamasen, allerdings ist die Regulation und Expression dieser Gene abhängig von Biotyp und Serotyp des jeweiligen Stammes (Stock, *et al.*, 2000).

Von den drei humanpathogenen *Yersinia* Arten ist *Y. enterocolitica* die einzige, die Gene für β -Laktamasen besitzt. Allerdings konnte sowohl für *Y. pseudotuberculosis* bzw. *Y. pestis* als auch für *Y. enterocolitica* festgestellt werden, dass die meisten β -Laktam-Antibiotika *in vitro* das Wachstum der Bakterien hemmen, *in vivo* jedoch keinerlei Hemmwirkung entfalten. Selbst Breitspektrum Carbapeneme wie Imipenem oder Meropenem, die hoch-resistent gegenüber dem Angriff von β -Laktamasen sind, wirken *in vitro* hemmend auf das Bakterienwachstum, haben jedoch keinen bakteriziden Effekt *in vivo* (Scavizzi, *et al.*, 1987, Lemaitre, *et al.*, 1991, Byrne, *et al.*, 1998). Interessanterweise sind einige *Y. enterocolitica* Stämme jedoch sowohl *in vivo* als auch *in vitro* resistent gegenüber Penicillinasen mit erweitertem Wirkungsspektrum wie Ampicillin oder Amoxicillin (Muytjens & van der Ros-van

DISKUSSION

de Repe, 1982, Scavizzi, *et al.*, 1987, Stock, *et al.*, 1999). Es stellt sich nun die Frage, inwiefern und ob die β -Laktamasen in *Y. enterocolitica* Einfluss auf die *in vivo* Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika haben. In der vorliegenden Arbeit sollten daher β -Laktamase-Deletionsmutanten im mausvirulenten *Y. enterocolitica* Stamm WA-314 hergestellt werden und diese bezüglich ihrer *in vitro* Antibiotika-Empfindlichkeit charakterisiert werden. Dies sollte die Grundlage für nachfolgende *in vivo* Untersuchungen bilden. Im Zuge der Untersuchungen stellte sich heraus, dass BlaA einige Besonderheiten aufweist. So ist in dessen Signalsequenz ein „Twin-Arginin“-Motiv zu finden, das auf einen Tat-abhängigen Transport ins Periplasma hindeutet. Die Signalsequenz von AmpC hingegen weist dieses Motiv nicht auf. Daher sollten ebenfalls die Transporteigenschaften von AmpC und BlaA untersucht werden. Außerdem sollte rekombinant hergestelltes BlaA auf seine thermische Stabilität und enzymatischen Eigenschaften hin untersucht werden.

5.1.1 Antibiotika-Empfindlichkeitsprofile von *Yersinia enterocolitica* WA-314 und von β -Laktamase-Deletionsmutanten

Stock, *et al.* (2000) und Pham, *et al.* (1992) untersuchten in ihren Arbeiten verschiedene *Y. enterocolitica* Biotyp 1B, Serotyp O:8 Patientenisolate und konnten zeigen, dass in diesen Stämmen beide β -Laktamasen produziert werden. Allerdings herrschte eine Heterogenität in den von Stock, *et al.* (2000) untersuchten Stämmen: zwar produzierten alle Stämme beide β -Laktamasen, zwei der untersuchten Biotyp 1B, Serotyp O:8 Isolate zeigten sich jedoch Amoxicillin-sensitiv, die anderen hingegen Amoxicillin-resistent. Dies zeigt, dass das Antibiotika-Empfindlichkeitsprofil von *Y. enterocolitica* nicht ausschließlich auf den zugehörigen Biotyp und Serotyp verallgemeinert werden kann, sondern immer auch charakteristische Eigenschaften des einzelnen Stammes berücksichtigt werden müssen.

Die von Stock, *et al.* (2000) und Pham, *et al.* (2000) ermittelten Daten beziehen sich ausschließlich auf Untersuchungen am *Yersinia* Wildtyp; es wurden keine Deletionsmutanten hergestellt. Die in dieser Arbeit konstruierten β -Laktamase-Deletionsmutanten erlaubten eine genauere Charakterisierung des WA-314 Stammes hinsichtlich der Antibiotika-Empfindlichkeit sowie eine Differenzierung, welche der beiden β -Laktamasen an der Resistenz gegenüber bestimmten β -Laktam-Antibiotika beteiligt ist. Bent & Young (2010) konstruierten in ihrer Arbeit ebenfalls β -Laktamase-Deletionsmutanten, um die Rolle der β -Laktamasen des Biotyp 1B, Serotyp O:8 Stamm 8081 für die β -Laktam-Antibiotikaresistenz zu analysieren. Dabei konnten sie zeigen, dass BlaA konstitutiv exprimiert wird und AmpC (bzw. BlaB) induzierbar ist. Dies stimmt sowohl mit den Daten aus dieser Arbeit, ermittelt für

DISKUSSION

WA-314, als auch mit Daten von Stock, *et al.* (2000) und Pham, *et al.* (1992) für Biotyp 1B, Serotyp O:8 Patientenisolate überein. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass WA-314 sensitiv gegenüber Cephalosporinen der 2. und 3. Generation sowie gegenüber Carbapenemen und Monobactamen ist. WA-314 ist hingegen resistent gegenüber Penicillinen mit erweitertem Wirkungsspektrum wie Ampicillin und Cephalosporinen der 1. Generation wie Cefazolin. Dies ist in Übereinstimmung mit Bent & Young (2010), Stock, *et al.* (2000) und Pham, *et al.* (1992). BlaA wird, im Gegensatz zu AmpC, konstitutiv exprimiert und ist somit der dominante Faktor in der Vermittlung der Resistenz gegenüber Ampicillin und Cefazolin.

Wie bereits oben erwähnt, verhalten sich *Y. enterocolitica* *in vitro* und *in vivo* (im Mausinfektionsmodell) schwach empfindlich gegenüber Ampicillin; gegenüber Cefotaxim sind sie jedoch *in vitro* sensitiv und *in vivo* resistent (Scavizzi, *et al.*, 1987; med. Doktorarbeit E. Storz). Die in dieser Arbeit konstruierten β -Laktamase-Deletionsmutanten sollen in nachfolgenden Arbeiten Aufschluss darüber geben, inwieweit die β -Laktamasen Einfluss auf die beobachtete *in vivo* Resistenz gegenüber Ampicillin und Cefotaxim haben oder ob ein anderer Resistenzmechanismus involviert ist.

Da Yersinien im 3D-CoG ähnlich wie im Gewebe Mikrokolonien bilden, wurden β -Laktam-Antibiotika Resistenztestungen im 3D-CoG durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte im 3D-CoG, einer Matrix, die gewebeähnliche Bedingungen simuliert und somit die *in vivo* Infektionsbedingungen nachahmt, gezeigt werden, dass bei Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin die Mikrokoloniegröße der β -Laktamase-Deletionsmutanten im Vergleich zu WA^{RS} (pYV) um 50 % reduziert wird. Dahingegen findet in Flüssigkultur bei Zugabe von 12 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin eine komplette Wachstumshemmung von WA^{RS} ΔblaA (pYV) und WA^{RS} $\Delta\Delta$ (pYV) im Vergleich zu WA^{RS} (pYV) statt. Die Bedingungen im 3D-CoG spiegeln also eher die *in vivo*-Bedingungen bei Behandlung mit Ampicillin wider als die *in vitro*-Bedingungen.

Eine mögliche Erklärung für die *in vitro/in vivo*-Diskrepanz in der β -Laktam-Antibiotika-Empfindlichkeit wäre, dass die β -Laktamasegene unter *in vivo*-Bedingungen aufgrund veränderter Genregulation überexprimiert werden. Dies könnte die *in vivo* Resistenz gegenüber Cefotaxim erklären, da AmpC-Typ β -Laktamasen von ihren enzymatischen Eigenschaften in der Lage sind, Cephalosporine der 3. Generation zu inaktivieren. Jedoch kann eine mögliche Überexpression der β -Laktamasegene *in vivo* schwer die Resistenz gegenüber Carbapenemen wie Imipenem oder Meropenem erklären: Bisher wurde eine Resistenzvermittlung gegenüber Carbapenemen nur für β -Laktamasen der BJM-Gruppe 2f und deren spezifischen Eigenschaften (Queenan, *et al.*, 2000, Pottumarthy, *et al.*, 2003) sowie für Metallo- β -Laktamasen (Livermore & Woodford, 2000) beschrieben. Weder *Yersinia*

DISKUSSION

AmpC noch BlaA gehören jedoch diesen Gruppierungen an. Dementsprechend konnte in unserem Labor im Mausinfektionsmodell gezeigt werden, dass beide *Yersinia* β -Laktamasen AmpC und BlaA keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle in der Vermittlung der *in vivo* Resistenz gegenüber Meropenem und Ampicillin spielen (med. Doktorarbeit E. Storz). Eine *in vivo* Resistenzvermittlung aufgrund der Überexpression der β -Laktamasegene ist daher unwahrscheinlich. Eine weitere Hypothese wäre, dass Yersinien unter Infektionsbedingungen die β -Laktam-Antibiotika aktiv aus der Bakterienzelle pumpen. Möglich wäre beispielsweise eine Überexpression der Gene, die für die Effluxpumpe ArcAB kodieren, unter *in vivo*-Bedingungen. Auch diese Hypothese konnte mithilfe der Konstruktion einer $\Delta ampC/\Delta blaA/\Delta arcB$ -Tripelmutante widerlegt werden (med. Doktorarbeit E. Storz).

Bei Gram-negativen Bakterien führt nicht selten eine veränderte Permeabilität der äußeren Membran zur *in vivo*-Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika. Die Expression der β -Laktam-Antibiotika permeablen Porine kann reprimiert werden und so eine Resistenz verursachen. Dies konnte für *Pseudomonas aeruginosa* (Pereira, et al., 2011) und *Klebsiella pneumoniae* (Martinez-Martinez, et al., 1996) gezeigt werden. Zum anderen könnte eine veränderte Zusammensetzung des Peptidoglykans unter Infektionsbedingungen zu einer Resistenz gegenüber Cephalosporinen und Carbapenemen führen. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Wachstumsbedingungen die Empfindlichkeit gegenüber bestimmten β -Laktam-Antibiotika abnimmt. Dieser Effekt ging mit einer veränderten Zusammensetzung des Peptidoglykans sowie einer veränderten PBP-Komposition und relativen Menge an PBPs einher und könnte somit eine Erklärung für den beobachteten β -Laktam-Antibiotika-sensitiveren Phänotyp sein (Tuomanen & Cozens, 1987). Eine weitere plausible Erklärung wäre, dass Yersinien in Mikrokolonien Biofilm-ähnliches Verhalten zeigen. So ist z.B. von *Pseudomonas aeruginosa* im Biofilm eine erhöhte Antibiotikaresistenz im Vergleich zum planktonischen Wachstum beschrieben (Hill, et al., 2005).

5.1.2 BlaA wird Tat-abhängig, AmpC Sec-abhängig ins Periplasma transloziert

Reife β -Laktamasen sind in Gram-negativen Bakterien im Periplasma lokalisiert. Dort schützen sie das Bakterium vor dem Angriff durch β -Laktam-Antibiotika, indem sie dessen β -Laktam-Ring spalten. Nach der Synthese im Cytosol müssen die Enzyme über die Cytoplasmamembran ins Periplasma transportiert werden. Dieser Transport erfolgt bei Bakterien über zwei Hauptwege, dem Sec-Weg und dem Tat-Weg. Der Hauptunterschied zwischen beiden Transportwegen besteht darin, dass beim Sec-Weg weitgehend ungefaltete

DISKUSSION

Proteine transportiert werden, wohingegen beim Tat-Weg vollständig gefaltete Proteine über die innere Membran transloziert werden. In beiden Fällen besitzen die zu transportierenden Proteine eine N-terminale Signalsequenz, die während oder kurz nach dem Transport abgespalten wird. Proteine mit Signalsequenz bezeichnet man als Vorläuferproteine, nach Abspaltung des Signalpeptids dann als reifes Protein. Charakteristisch und namensgebend für Tat-Substrate ist ein Konsensusmotiv mit einem nahezu invarianten „Twin-Arginin“-Rest innerhalb der Signalsequenz.

Es wird angenommen, dass β -Laktamasen und Penicillin-Bindeproteine (PBPs) aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit evolutionär verwandt sind und sich aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entwickelt haben (Knox, *et al.*, 1996). PBPs sind in Gram-negativen Bakterien in der Cytoplasmamembran verankert und ragen ins Periplasma (Scheffers & Pinho, 2005); sie müssen also ebenfalls über die innere Membran transportiert werden. Bisher ist nur der Sec-abhängige Transport von PBPs bekannt; daher liegt die Vermutung nahe, dass auch β -Laktamasen Sec-abhängig transloziert werden. Bis zur erstmaligen Beschreibung der Tat-abhängig transportierten β -Laktamasen BlaC aus *Mycobacterium tuberculosis* und BlaS aus *M. smegmatis* (McDonough, *et al.*, 2005) war ausschließlich eine Sec-abhängige Translokation über die innere Membran bekannt. Es stellt sich nun die Frage, inwieweit der Tat-abhängige Transport von β -Laktamasen in Bakterien verbreitet ist. Es stehen eine Reihe von Programmen zur Verfügung, die unter Berücksichtigung verschiedener Parameter, Signalpeptide als mögliche Tat-Substrate vorhersagen können. Pradel, *et al.* (2008) haben unter Verwendung der Programme TATFIND 1.2 und TatP eine Vielzahl von Signalpeptiden verschiedener β -Laktamasen (~ 400) aus unterschiedlichen Bakterien-Gattungen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur 8 % der analysierten β -Laktamase-Signalsequenzen von beiden Programmen als mögliche Tat-Substrate beschrieben wurden. Darunter fiel auch die bereits als Tat-Substrat beschriebene BlaC aus *M. tuberculosis*. Weitere mögliche Tat-Signalpeptide wurden vor allem bei β -Laktamasen von pflanzenpathogenen Gattungen wie *Xanthomonas* und *Stenotrophomonas* identifiziert; weniger für klinisch relevante Organismen. Pradel, *et al.* (2008) konnten in ihrer Arbeit experimentell nur eine weitere Tat-abhängige β -Laktamase identifizieren: L2 aus dem pflanzenpathogenen *Stenotrophomonas maltophilia*. Bisher konnten also noch keine Tat-abhängigen β -Laktamasen aus der Familie Enterobacteriaceae nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass stark anzunehmen ist, dass die meisten β -Laktamasen in einem Sec-abhängigen Prozess über die Cytoplasmamembran transportiert werden.

DISKUSSION

In dieser Arbeit sollten nun die β -Laktamasen BlaA und AmpC aus *Y. enterocolitica* WA-314 bezüglich ihrer Transporteigenschaften sowie molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert werden. Aufgrund der *in silico* Analysen wird vermutet, dass BlaA Tat-abhängig transloziert wird. Ampicillin-Sensitivitäts-Tests in Flüssigkultur sowie MHK-Bestimmungen mittels Agardiffusionstest ergaben eindeutig, dass eine $\Delta tatC$ -Mutante im Vergleich zum parentalen Stamm WA^{RS} eine reduzierte Ampicillin-Resistenz aufweist. Untersuchungen des *Y. enterocolitica* O:8 Isolats CMCC52211 zeigten allerdings, dass keine Unterschiede zwischen dem parentalen Stamm und der $\Delta tatC$ -Mutante bezüglich der Ampicillin-Resistenz bestehen (Shi, *et al.*, 2007). Die von Shi, *et al.* (2007) publizierten Ergebnisse geben indes keine Auskunft über die exakten MHK-Daten der untersuchten Stämme. Sowohl Shi, *et al.* (2007) für *Y. enterocolitica* als auch Lavander, *et al.* (2006) für *Y. pseudotuberculosis* zeigten, dass eine Deletion von *tatC* zu pleiotropen Effekten auf den bakteriellen Metabolismus und die Virulenz führt. Daher muss berücksichtigt werden, dass der beobachtete Ampicillin-sensitive Phänotyp von WA^{RS} $\Delta tatC$ durch andere Effekte als den Transportblock von BlaA verursacht werden könnte. Westernblot-Analysen mit Fusionsproteinen aus dem Signalpeptid von BlaA und GFP zeigten jedoch ebenfalls, dass dieses bei Produktion in einer *tatC*-Deletionsmutante im Vergleich zu einem Stamm mit intaktem Tat-System, nicht ins Periplasma transloziert werden kann. In früheren Arbeiten am Tat-System in verschiedenen Bakterien Gattungen wurden ebenfalls erfolgreich Signalpeptid-GFP-Fusionsproteine verwendet, um den Tat-abhängigen Transport von Substraten nachzuweisen (Santini, 2000, Thomas, *et al.*, 2001, Lavander, *et al.*, 2006, Pradel, *et al.*, 2008). Zusammengenommen zeigen der Ampicillin-Sensitivitätstest mit der $\Delta tatC$ -Mutante und die Untersuchung der Transporteigenschaften von BlaA₁₋₄₀-GFP-Fusionsproteinen eindeutig, dass es sich bei BlaA um eine Tat-abhängige β -Laktamase handelt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Tat-abhängige Transport einer β -Laktamase in einem enteropathogenen Erreger bzw. einer Art der Familie Enterobacteriaceae nachgewiesen werden.

Pradel, *et al.* (2008) unternahmen in ihrer Arbeit *in silico* Analysen der *Y. enterocolitica* β -Laktamase „BlaC“. Beide Tat-Vorhersageprogramme lieferten negative Ergebnisse; „BlaC“ wurde daher als vermutlich Sec-abhängig transportiertes Protein eingruppiert. Allerdings handelt es sich bei der Sequenz des untersuchten Signalpeptids nicht um das Signalpeptid einer β -Laktamase aus dem sequenzierten *Y. enterocolitica* 8081 Stamm (GenBank: AM286415). Sequenzanalysen ergaben, dass es sich bei „BlaC“ um eine Klasse A β -Laktamase aus *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 handelt. BlaA (O:8) und „BlaC“ (O:3) weisen

DISKUSSION

eine Sequenzhomologie von 93 % auf; daher ist zu erwarten, dass die homologe β -Laktamase „BlaC“ von *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 ebenfalls Tat-abhängig sekretiert wird. *Y. enterocolitica* *blaA* Gene sind nicht nur innerhalb aller Biotypen der Art *Y. enterocolitica* zu finden, sondern auch innerhalb anderer *Yersinia* Arten wie beispielsweise *Y. frederiksenii* oder *Y. intermedia*. Bei letzteren *Yersinia* Arten handelt es eher um freilebende Umweltmikroorganismen als um Pathogene. Interessanterweise ergeben Aminosauere-Vergleiche der jeweiligen BlaA-Signalpeptide stark konservierte Bereiche (Abb. 43). Dieses Aminosauermotiv scheint demnach auch nach Aufspaltung der Arten stark konserviert erhalten geblieben zu sein und könnte darauf hindeuten, dass diese Region eine denkbare Chaperon-Bindestelle darstellt. Möglicherweise besitzt die Tat-abhängig transportierte *Yersinia* β -Laktamase BlaA ein spezifisches Chaperon. Tat-spezifische Chaperone wurden bereits für die *E. coli* Tat-Substrate DmsA und TorA beschrieben (Jack, *et al.*, 2001, Turner, *et al.*, 2004).

```

Y.ent_1A      MKHSSLRRALLLAGITLPLVNFSLPTWAAAIPGSLDK 37
Y.ent_1B_WA-314 MKHSSLRRSLLLAGITLPLVNFAPPTWAAAIPGSLDK 37
Y.ent_1B_8081 MKHSSLRRSLLLAGITLPLVNFALPTWAAAIPGSLDK 37
Y.ent_Y11_O3  MKHSSLRRSLLLAGITLPLVNFALPAWANALPASVDK 37
Y.ent_Y56_O4  MKHSSLRRSLLLAGITLPLVNFALPAWANALPASVDK 37
Y.ent_W22703_O9 MKHSSLRRSLLLAGITLPLVNFALPAWANALPASVDK 37
Y.intem      MKHSPRRSLLLAGITVPLLNFFALPSWAVGAKMSLDN 37
Y.fred       MKHSPRRSLLLAGITLPLVNFSLPAWAVPTSDDLGN 37
****.***:*****:***:.*: **  :.:

```

Abb. 43: Aminosauerequenz-Vergleich der Signalsequenzen von BlaA verschiedener *Yersinia* Arten (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Y.ent_1A (*Y. enterocolitica* Biotyp 1A; GenBank: AAX55643), Y.ent_1B_WA-314 (*Y. enterocolitica* WA-314 Biotyp 1B), Y.ent_1B_8081 (*Y. enterocolitica* 8081 Biotyp 1B; GenBank: CAL12097.1), Y.ent_Y56_O4 (*Y. enterocolitica* Y56 Biotyp 4; GenBank: CAA40357), Y.ent_Y11_O3 (*Y. enterocolitica* Y11 Serotyp O:3; GenBank: CBY27190.1), Y.ent_W22703_O9 (*Y. enterocolitica* W22703 Serotyp O:9; GenBank: FR718488-FR718797), Y.intem (*Y. intermedia* ATCC_29909; GenBank: AALF00000000) Y.fred (*Y. frederiksenii* ATCC_33641; GenBank: AALE00000000). * identische Aminosaueren. Rot, kleiner hydrophober AS-Rest; blau, saurer AS-Rest; magenta, basischer AS-Rest, grün, hydroxyl- oder sulfhydroxyl-AS-Rest.

Untersuchungen der AmpC β -Laktamase gestalteten sich als schwierig, da ein Fusionsprotein aus dem Signalpeptid von AmpC und GFP selbst im Wildtyp-Stamm nicht über die Cytoplasmamembran transportiert wird. Wachstumsversuche mit Stämmen, die AmpC₁₋₃₂-GFP produzieren, zeigten, dass diese Stämme in ihrem Wachstum nahezu komplett inhibiert werden; Überproduktion von AmpC₁₋₃₂-GFP scheint also cytotoxisch zu wirken. Für cytoplasmatische Proteine, wie beispielsweise die β -Galactosidase konnte

DISKUSSION

gezeigt werden, dass diese nicht mittels eines Sec-Signalpeptids über den Sec-Weg transloziert werden kann; die gefalteten Proteine führen vermutlich zu einer Blockade des Sec-Apparats und wirken dadurch cytotoxisch (Tommassen, *et al.*, 1985, Ito, *et al.*, 1986, Kiino, *et al.*, 1990, Snyder & Silhavy, 1995). Daher ist anzunehmen, dass es sich beim Signalpeptid von AmpC um eine Sec-abhängige Signalsequenz handelt und die Überproduktion eines AmpC₁₋₃₂-GFP Fusionsproteins zu einer Akkumulation am Sec-Apparat und somit zu einer „Verstopfung“ der Sec-Pore führt. Eine Vielzahl essentieller Proteine wird Sec-abhängig transportiert (Pohlschroder, *et al.*, 1997, du Plessis, *et al.*, 2011) und eine Blockade des Sec-Weges kann zu Störungen im Metabolismus und zur Beeinträchtigung des Wachstums führen. Charakteristische Eigenschaften des AmpC-Signalpeptids könnten dazu führen, dass dieses, im Gegensatz zu anderen Sec-abhängigen Signalpeptiden wie beispielsweise das der TEM-1 aus *E. coli*, die Akkumulation des Fusionsproteins an der Sec-Pore begünstigt.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Tat-abhängige β -Laktamase BlaA nicht mit dem Sec-System kompatibel ist. Für die mykobakterielle, Tat-abhängige β -Laktamase BlaC konnte gezeigt werden, dass diese, bei Fusion an ein Sec-abhängiges Signalpeptid, nicht mehr in der Lage ist, das Bakterium vor dem β -Laktam-Antibiotikum Carbenicillin zu schützen (McDonough *et al.*, 2005). Allerdings wurde nicht gezeigt, ob entweder ein Transportblock von BlaC vorliegt oder ob BlaC zwar transportiert wird, aber aufgrund von Missfaltung nicht aktiv ist. Letzteres wurde beispielsweise beim Sec-abhängigen Export von GFP beschrieben (Santini, 2000, Thomas, *et al.*, 2001). Analysen der Transporteigenschaften von Fusionsproteinen bestehend aus der Signalsequenz von AmpC bzw. der Signalsequenz von MeoA, einem bereits beschriebenen Sec-Substrat, und dem reifen Teil von BlaA, zeigten eindeutig, dass keine Translokation ins Periplasma stattfindet; BlaA ist mit dem Sec-Apparat inkompatibel.

Nichtsdestotrotz ist nicht nur die Signalsequenz entscheidend dafür, über welches Transportsystem ein Protein exportiert wird; auch die Eigenschaften des Proteins spielen eine Rolle. Sec-abhängige Proteine wie beispielsweise die β -Laktamase TEM-1 oder die Chloramphenicol-Acetyltransferase können mittels eines Tat-Signalpeptids über den Tat-Weg transportiert werden; der reife Teil dieser Proteine ist für beide Systeme kompatibel (Stanley, *et al.*, 2002, McCann, *et al.*, 2007). Andere Sec-abhängige Proteine wie das Ribosebindeprotein (Pradel, 2003) oder LepB (*E. coli* Signalpeptidase) (Cristobal, *et al.*, 1999) können hingegen bei Fusion an ein Tat-Signalpeptid nicht über den Tat-Weg exportiert werden. Außerdem konnte anhand von Untersuchungen des Tat- bzw. Sec-abhängigen

DISKUSSION

Transports von Cytochrom c in *E. coli* gezeigt werden, dass ein Signalpeptid vermutlich direkt oder indirekt die Faltung eines Proteins hemmt oder fördert (Sanders, *et al.*, 2001).

Die Signalsequenz eines Proteins ist also nicht allein bestimmend für den Sekretionsweg, sondern weitere Eigenschaften des Substratproteins können von Bedeutung sein: Parameter wie die Faltungskinetik des Proteins, die Effektivität des Export, die Effizienz von cytoplasmatischen Proteasen und ein möglicher cytotoxischer Effekt von akkumulierenden Substraten im Cytosol ebenso wie spezifische Eigenschaften des Tat- oder Sec-Signalpeptids determinieren den Transportweg eines Proteins.

5.1.3 Spezifische Lokalisierung von BlaA im Periplasma

In dieser Arbeit konnte, wie bereits für *Y. pseudotuberculosis* gezeigt (Lavander, *et al.*, 2006), die Funktionalität des Tat-Systems in *Y. enterocolitica* (Stamm WA-314) mittels Nachweis der GFP-Fluoreszenz eines TorA₁₋₅₀-GFP-Fusionsproteins im Periplasma belegt werden: Wird TorA₁₋₅₀-GFP in WA-314 mit intaktem Tat-System produziert, so fluoresziert GFP als peripherer Ring bzw. polar lokalisiert im Periplasma; bei Produktion in einer *tatC*-Deletionsmutante hingegen ist eine diffuse cytoplasmatische Fluoreszenz zu beobachten. Die polare Lokalisation von TorA-GFP bei Tat-abhängigem Transport ins Periplasma wurde bereits von Santini, *et al.* (2000) beschrieben. Sie vermuteten, dass dies auf eine Relokalisierung des periplasmatischen GFPs an die Zellpole aufgrund von osmotischen Bedingungen (z.B. Resuspendieren der zu mikroskopierenden Zellen in PBS) zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Arbeiten vorgeschlagen, dass die Komponenten der Tat-Translokase vornehmlich an den Zellpolen lokalisiert sind und somit auch GFP-fusionierte Tat-Signalpeptide zunächst polar lokalisieren (Berthelmann & Brüser, 2004, Kostecki, *et al.*, 2010). Jedoch konnte in einer weiteren Arbeit gezeigt werden, dass TatABC-Komplexe gleichmäßig über die Cytoplasmamembran verteilt sind (Ray, *et al.*, 2005).

In *Y. enterocolitica* (WA-314) konnten wir allerdings für AmpC₁₋₃₂-GFP und BlaA₁₋₄₀-GFP weder eine periphere Fluoreszenz, noch eine polare Lokalisation oder eine diffuse cytoplasmatische Fluoreszenz sehen; stattdessen konnten ausnahmslos fluoreszierende Punkte bzw. Aggregate innerhalb der Zelle identifiziert werden. Der Vergleich beider GFP-Fusionsproteine zeigt jedoch, dass BlaA₁₋₄₀-GFP intensiver fluoresziert als AmpC₁₋₃₂-GFP. Wie bereits oben erwähnt, wirkt das Sec-abhängig transportierte Fusionsprotein AmpC₁₋₃₂-GFP vermutlich toxisch auf die Zelle. Es ist daher stark anzunehmen, dass die punktuelle

DISKUSSION

Fluoreszenz in diesem Fall durch die Aggregation an der Sec-Pore verursacht wird. Die schwächere Fluoreszenz könnte durch Abbau der nicht transportierbaren GFP-Fusionsproteine durch Proteasen zu erklären sein. Die granulierte Fluoreszenz von BlaA₁₋₄₀-GFP könnte hingegen auf eine mögliche spezifische Lokalisierung des Fusionsproteins hindeuten. Pradel, *et al.* (2008) beobachteten in ihrer Arbeit zum Tat- und Sec-abhängigen Transport verschiedener β -Laktamasen im *E. coli*-Modell eine granulierte Fluoreszenz bei ca. 20 % von Zellen, die ein TEM-1_{Signalpeptid}-GFP-Fusionsprotein produzieren.

Eine asymmetrische Verteilung von Proteinen innerhalb der Bakterienzelle wurde bereits für viele verschiedene Proteine beschrieben. Proteine können dabei entweder polar, am Septum oder helikal verteilt sein. Die korrekte Lokalisierung der Proteine spielt dabei häufig eine essentielle Rolle in der Ausübung der jeweiligen Funktionen. Chemotaxis-Proteine in *E. coli* und *Caulobacter crescentus* sind beispielsweise in Clustern an den Zellpolen lokalisiert. Kurz vor der Zellteilung erscheinen diese Cluster allerdings am Septum, um sich nach der Zellteilung auf die neuen Zellpole zu verteilen (Alley, *et al.*, 1992, Maddock, *et al.*, 1993, Kentner & Sourjik, 2006, Thiem, *et al.*, 2007). Für MreB, ein bakterielles Aktin-Homolog, bzw. MreB-assoziierte Proteine ebenso für Min-Proteine, die an der korrekten Zellteilung beteiligt sind, und für PBPs konnte in *E. coli*, *C. crescentus* und *B. subtilis* eine dynamische helikale Verteilung festgestellt werden (Raskin & de Boer, 1999, Jones, *et al.*, 2001, Gitai, *et al.*, 2004, Scheffers, *et al.*, 2004, Carballido-Lopez, 2006). Die meisten dieser Lokalisierungsstudien wurden mit GFP-Fusionsproteinen durchgeführt. Es ist jedoch anzumerken, dass ein gut untersuchtes GFP-Artefakt eine Misslokalisierung der GFP-Fusionsproteine innerhalb der Bakterienzelle aufgrund der Einlagerung als unlösliche Proteinaggregate in Einschlusskörperchen sein kann (Buddelmeijer, *et al.*, 2006, Bardy & Maddock, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass trotz Einlagerung in Einschlusskörperchen ein signifikanter Anteil der Proteine korrekt gefaltet ist und somit beispielsweise im Falle von GFP das Fluorochrom ausbilden kann (Ventura & Villaverde, 2006). Eine mögliche Erklärung für die beobachtete granulierte Fluoreszenz des BlaA₁₋₄₀-GFP Fusionsproteins könnte also eine Misslokalisierung aufgrund der Aggregation in Einschlusskörperchen sein. Außerdem bleibt zu berücksichtigen, dass nur die Signalsequenz von BlaA an GFP fusioniert ist und somit eine mögliche spezifische Lokalisierung von BlaA₁₋₄₀-GFP lediglich auf die absplittbare Signalsequenz bzw. die ersten 10 AS des reifen Proteins zurückzuführen ist.

In dieser Arbeit konnte jedoch die spezifische periplasmatische Lokalisierung eines BlaA-Strep Fusionsproteins mittels Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden: Die Antikörperfärbung zeigte ebenfalls eine granulierte Fluoreszenz, die sich helikal über die Bakterienzelle verteilte. Bereits in anderen Arbeiten konnte die spezifische Lokalisierung von

DISKUSSION

Proteinen innerhalb der Bakterienzelle mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden; beispielsweise das DnaA-Protein, der Initiator der chromosomalen Replikation in *E. coli*, bildet innerhalb der Bakterienzelle helikale Strukturen aus (Boeneman, *et al.*, 2009). Die Antikörper-Färbung stellt eine Methode dar, um Artefakte verursacht durch Fusion mit GFP, zu überprüfen. Es bleibt zu berücksichtigen, dass nicht nur überproduzierte GFP-Fusionsproteine, sondern allgemein überproduzierte Proteine sich als Einschlusskörperchen im Cytosol anreichern und somit Artefakte verursachen können. Allerdings konnte in dieser Arbeit für die überproduzierten und antikörpergefärbten Kontrollproteine (DmsD-Strep als cytoplasmatische Kontrolle und TorA-Strep als periplasmatische Kontrolle) kein granuliertes Lokalisierungsmuster festgestellt werden. Somit kann geschlossen werden, dass BlaA-Strep spezifisch im Periplasma lokalisiert ist. Es stellt sich nun die Frage, wie diese helikale Organisation von BlaA zustande kommt; ob und mit welchen Komponenten BlaA interagiert. Wie bereits oben beschrieben, beobachteten Pradel, *et al.* (2008) eine granuliert fluoreszierende TEM-1_{Signalpeptid}-GFP-Fusionsproteins. Sie untersuchten daraufhin den Einfluss einer $\Delta mreB$ -Mutante auf den Transport von TEM-1_{Signalpeptid}-GFP, da für GFP-Fusionen mit MreB ein ähnliches Lokalisierungsmuster beobachtet wurde (Dye, 2005). So konnte gezeigt werden, dass TEM-1_{Signalpeptid}-GFP bei Expression im $\Delta mreB$ -Hintergrund nicht prozessiert werden kann. Außerdem weisen $\Delta mreB$ -Stämme eine höhere Empfindlichkeit β -Laktam-Antibiotika als der Wildtyp auf. Sie vermuteten daher eine direkte oder indirekte Rolle des Aktin homologs MreB, auf die Prozessierung und/oder Aktivität von TEM-1.

Da eine *mreB*-Deletionsmutante in der Regel letal ist (*E. coli* bildet dabei eine Ausnahme) (Wachi, *et al.*, 1987, Jones, *et al.*, 2001, Kruse, *et al.*, 2003), wurde in dieser Arbeit die antimikrobielle Komponente A22, die MreB reversibel inhibiert, verwendet, um eine mögliche Interaktion von BlaA und MreB nachzuweisen. Zugabe von A22 zu einer Bakterienkultur führt zu einer Störung der Lokalisierung des helikal in der Bakterienzelle angeordneten Aktin homologen MreB. Dies führt somit auch indirekt zu einer Misslokalisierung von Proteinen, die mit MreB interagieren. Allerdings zeigten die Daten in dieser Arbeit, dass BlaA nicht mit MreB kolokalisiert oder direkt oder indirekt von MreB abhängt. In der Arbeit von Pradel, *et al.* (2008) bleibt zu berücksichtigen, dass eine Deletion des *mreB*-Gens schwerwiegende Effekte auf die Bakterienzelle hat. Es wäre möglich, dass der beobachtete β -Laktam-sensitive Phänotyp des $\Delta mreB$ Stammes bzw. die ausbleibende Prozessierung von TEM-1_{Signalpeptid}-GFP bei Produktion im $\Delta mreB$ -Hintergrund durch andere Effekte entsteht, z.B. als Folge der Deletion der strukturgebenden Komponente der Bakterienzelle. Weiterhin wäre möglich, dass die β -Laktamasen TEM-1 und BlaA zwar beide spezifisch

DISKUSSION

lokalisiert sind, aber die Lokalisierung von unterschiedlichen Komponenten der Bakterienzelle abhängt.

Dennoch gibt es eine Vielzahl weitere Komponenten innerhalb der Bakterienzelle, die helikal verteilt sind und somit mögliche Interaktionspartner von BlaA darstellen. In *C. crescentus* konnte gezeigt werden, dass MreC beispielsweise ebenfalls spiralförmig verteilt ist, allerdings unabhängig von MreB (Dye, 2005). Auch für verschiedene PBPs konnte gezeigt werden, dass sie teilweise unabhängig von MreB helikal lokalisiert sind (Den Blaauwen, *et al.*, 2003, Scheffers, *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch kein Interaktionspartner oder die Art der spezifischen Lokalisation von BlaA nachgewiesen werden.

5.1.4 Mögliche physiologische Rolle von BlaA

Im Unterschied zu chromosomal-kodierten β -Laktamasen (bei fehlender Induktion), werden plasmid-kodierte β -Laktamasen häufig in relativ großen Mengen produziert. *Y. enterocolitica* WA-314 besitzt zwei chromosomal-kodierte β -Laktamasen. Bei AmpC handelt es sich um eine induzierbare Cephalosporinase. Induzierbare Klasse C β -Laktamasen sind weit verbreitet unter Gram-negativen Bakterien wie beispielweise *Enterobacter cloacae* und *Pseudomonas aeruginosa* (Knott-Hunziker, *et al.*, 1982, Korfmann & Wiedemann, 1988, Moya, *et al.*, 2009). Bei BlaA handelt es sich um eine Klasse A β -Laktamase, die konstitutiv exprimiert wird. *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*, die anderen beiden humanpathogenen *Yersinia* Arten, besitzen hingegen keine Gene für β -Laktamasen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass beide β -Laktamasen unter Infektionsbedingungen keinen Einfluss auf die Resistenzvermittlung gegenüber β -Laktam-Antibiotika haben (vgl. 5.1.1). Es stellt sich also die Frage, ob die Hauptaufgabe der β -Laktamasen in *Y. enterocolitica* in der Inaktivierung von β -Laktam-Antibiotika besteht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AmpC Sec-abhängig, BlaA hingegen Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transportiert wird. Bisher wurden nur drei weitere β -Laktamasen beschrieben, die über den Tat-Weg transportiert werden. BlaA ist die erste beschriebene Tat-abhängige β -Laktamase innerhalb der Familie Enterobacteriaceae. Der Tat-abhängige Transport, der einen Transport von gefalteten Proteinen impliziert, ist für β -Laktamasen also eher ungewöhnlich. Weiterhin deutet der Tat-abhängige Transport von BlaA darauf hin, dass sich BlaA vermutlich sehr schnell und stabil im Cytoplasma faltet. Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft des BlaA Enzyms ist seine thermische Stabilität und seine starke enzymatische Aktivität. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass im *in vitro*-

DISKUSSION

Test BlaA über einen breiten Temperaturbereich (30-50 °C) hinweg enzymatisch sehr aktiv ist und das Maximum der Aktivität bei einer Temperatur von 45 °C liegt. Das Wachstumsoptimum der Yersinien liegt hingegen bei 27 °C bzw. beträgt im Infektionsfall die Körpertemperatur von Warmblütern von 37 °C. Darüber hinaus gehört *Y. enterocolitica* zu den psychophilen (kälteliebenden) Bakterien, die auf tiefere Temperaturen mit einer Kälteschockadaption antworten (Neuhaus, *et al.*, 2003, Bresolin, *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die BlaA Enzymaktivität im Vergleich zur Aktivität der TEM-1 bei einer Temperatur von 15 °C (Umwelttemperatur) noch relativ hoch ist.

Warum produzieren Yersinien also konstitutiv ein Enzym, das sowohl bei höheren als auch bei tieferen Temperaturen besonders stabil und enzymatisch aktiv ist und außerdem, wie bereits oben beschrieben, spezifisch lokalisiert und nicht diffus im Periplasma verteilt ist? Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass BlaA neben seiner Aktivität als β -Laktamase auch physiologische Aufgaben im normalen Wachstum der Bakterienzelle erfüllt; β -Laktamasen sind hinsichtlich ihrer Enzymfunktion spezialisierte Peptidasen. Hinweise, dass β -Laktamasen andere Eigenschaften bzw. Funktionen in der Zelle übernehmen, finden sich auch in anderen Arbeiten: β -Laktamasen und PBPs haben sich aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entwickelt. Im Gegensatz zu PBPs haben β -Laktamasen jedoch die Fähigkeit, den Acylkomplex aus β -Laktam-Antibiotika und β -Laktamase zu hydrolysieren und somit den gespaltenen β -Laktam-Ring freizusetzen (Green, 2002). Im Vergleich dazu haben β -Laktamasen die Fähigkeit der PBPs zur D-Alanyl-D-Alanin-Transpeptidierung verloren (Green, 2002). Diese Beobachtungen beziehen sich allerdings auf zwei Extremfälle; einige Enzyme weisen jedoch einen gemischten Phänotyp auf. So konnte für die PBPs 5 und 6 in *E. coli* gezeigt werden, dass sie mit geringer Effizienz Penicillin G hydrolysieren können (Amanuma & Strominger, 1980, Broome-Smith & Spratt, 1984). Weiterhin wurde beschrieben, dass β -Laktamasen in der Lage sind, geringe Mengen an N-acetylierten Di- und Tripeptiden bzw. D-Alanyl-D-Alanin-Peptide zu hydrolysieren (Chang, *et al.*, 1990, Rhazi, *et al.*, 1999). In einer weiteren Arbeit wird berichtet, dass die β -Laktamase AmpC als chromosomal-kodierte, nicht-induzierbare Klasse C β -Laktamase in *E. coli* eine Rolle in der Peptidoglykansynthese oder -Recycling spielt. Diese Hypothese beruhte auf dem beobachteten Phänotyp einer *ampC*-Deletionsmutante (in Kombination mit einer *ampH*-Deletion), die unter bestimmten Bedingungen die Zellmorphologie beeinflusst (Henderson, *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Klasse A und D β -Laktamasen die bakterielle Biofilmbildung in *E. coli* und *P. aeruginosa* inhibieren (Gallant, *et al.*, 2005). Es wurde die These aufgestellt, dass diese β -Laktamasen, die evolutionär mit LMW („low molecular weight“) PBPs verwandt sind, teilweise an den D-Alanyl-D-Alanin-Baustein des

DISKUSSION

Peptidoglykane binden und dieser somit als eigentliches Substrat für die LMW PBPs unzugänglich wird. Dies verhindert eine gewisse Umlagerung des Peptidoglykane, die notwendig ist, um die korrekte Assemblierung großer makromolekularer Komplexe für die Biofilmbildung zu ermöglichen. In diesem Fall ist die Wirkung der β -Laktamase als nachteilig für die Bakterienzelle anzusehen. Dennoch ist die Arbeitshypothese darin begründet, dass β -Laktamasen mit Substraten der Peptidoglykansynthese interagieren können.

Zusammengefasst untermauern die Resultate aus oben erwähnten Arbeiten sowie die aus dieser Arbeit ermittelten Daten für BlaA die Hypothese, dass β -Laktamasen neben ihrer katalytischen Aktivität der Hydrolyse des β -Laktam-Rings auch mit Bestandteilen des Peptidoglykane interagieren und somit eine Funktion im normalen Wachstumsprozess der Zelle ausüben könnten.

Mit denen aus dieser Arbeit gewonnenen Daten kann im Falle der Yersinien β -Laktamasen vermutet werden, dass die induzierbare β -Laktamase AmpC tatsächlich in erster Linie das Bakterium vor dem Angriff durch β -Laktam-Antibiotika schützt. Dabei kann spekuliert werden, dass dieser Resistenzmechanismus weniger relevant bei der Infektion von Tier und Mensch ist, sondern wichtig beim Überleben der Yersinien in der Umwelt. Beispielsweise könnte es die Yersinien vor β -Laktam-Antibiotika schützen, die von Pilzen in enger Nachbarschaft sezerniert werden. Bei der konstitutiv-exprimierten, stabilen und enzymatisch sehr aktiven β -Laktamase BlaA hingegen könnte es sich um ein Enzym handeln, das an der Peptidoglykansynthese beteiligt ist; also zusätzlich zu ihrer β -Laktamase-Aktivität eine physiologische Rolle im normalen Wachstum der Zelle inne hat. Weiterhin könnte die Spaltung von D-Alanyl-D-Alanin durch die β -Laktamase BlaA zur Versorgung der Zelle mit Alanin, z.B. bei altruistischem Suizid, dienen (Lam, *et al.*, 2009, Cava, *et al.*, 2011).

5.2 β -Laktamasen als Reporterproteine zur Untersuchung der Sekretion und Translokation von T3SS-Substraten

Beim Typ III-Sekretionssystem handelt es sich um einen komplex aufgebauten Injektionsapparat, der von verschiedenen Gram-negativen pflanzen- und tierpathogenen Bakterien (z.B. *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Xanthomonas* spp.) verwendet wird, um Effektorproteine in eukaryotische Wirtszellen zu translozieren (Sansone, *et al.*, 1982, Kaniga, *et al.*, 1995, Baggaley, *et al.*, 1997, Kim, *et al.*, 1997, Buttner & He, 2009, Buttner & Bonas, 2010). Das Typ III „Injektisom“ ähnelt in Struktur und Funktion der Basisstruktur des bakteriellen Flagellenapparates. Bei den meisten Fla-T3SS-Komponenten

DISKUSSION

handelt es sich um homologe T3SS-Proteine, die ähnliche Aufgaben beim Aufbau des jeweiligen Sekretionsapparates der Erreger übernehmen (Kubori, *et al.*, 1998, Cornelis, 2006).

Alle drei humanpathogenen *Yersinia* Arten besitzen ein Ysc-T3SS, das von einem Virulenzplasmid kodiert wird (pYV bei *Y. enterocolitica*, pCD1 in *Y. pestis* und pIB1 bei *Y. pseudotuberculosis*). Die Injektion von Effektorproteinen (Yops) in Wirtszellen über dieses Ysc-T3SS ermöglicht den Yersinien, der Immunabwehr des infizierten Organismus zu entgehen und erlaubt es ihnen, extrazellulär zu replizieren (Heesemann, *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zur Proteintranslokation über die innere Membran mittels des Sec- oder Tat-Systems, die mit Abspaltung einer N-terminalen Signalsequenz verbunden ist, besitzen die Substrate des T3SS keine klassische Konsensus-Signalsequenz und es erfolgt keine Prozessierung durch eine Signalpeptidase. Über die Eigenschaften des Yop-Sekretionssignals wird bisher kontrovers diskutiert: es konnte gezeigt werden, dass im Falle von YopE die ersten 15 Aminosäuren (Lloyd, *et al.*, 2001) bzw. die ersten 15 mRNA-Kodons (Anderson & Schneewind, 1997, Ramamurthi & Schneewind, 2003) ausreichen, um ein Reporterprotein über das Ysc-T3SS zu sekretieren. Ähnliches konnte auch mit anderen Yops gezeigt werden (Sory, *et al.*, 1995, Ramamurthi & Schneewind, 2002, Ramamurthi & Schneewind, 2003, Goss, *et al.*, 2004). Die meisten Yops benötigen zusätzlich spezifische Chaperone, um effektiv sekretiert und in die Wirtszelle transloziert zu werden (Wattiau, *et al.*, 1994).

Bei der Proteinsekretion über den Sec-Weg müssen die zu transportierenden Proteine in einer exportkompetenten Form gehalten werden: Im Falle der posttranslationalen Sekretion binden Chaperone (z.B. SecB oder unspezifische Chaperone wie GroEL oder DnaK) (Bochkareva, *et al.*, 1988, Bochkareva, *et al.*, 1999, Moran-Barrio, *et al.*, 2009) an das Vorläuferprotein und halten es in einer ungefalteten Konformation. Anschließend bindet der Protein-Chaperon-Komplex an die ATPase SecA. Diese initiiert die Insertion der Signalsequenz des Vorläuferproteins in den SecYEG Kanal in der inneren Membran und katalysiert anschließend die sequentielle Translokation des Proteins (du Plessis, *et al.*, 2011). Im Gegensatz zum Sec-System, das nur ungefaltete Protein transportieren kann, ist das Tat-System in der Lage, vollständig gefaltete Proteine oder sogar Enzymkomplexe über die innere Membran zu transportieren. Die Vorläuferproteine falten bereits vollständig im Cytoplasma und werden in einem von der protonenmotorischen Kraft (PMF) abhängigen Prozess durch die Translokationspore TatABC über die innere Membran transportiert (Natale, *et al.*, 2008). Der Transportprozess von T3SS Substraten unterscheidet sich wesentlich vom Transport von Proteinen über das Tat- oder Sec-System.

DISKUSSION

Kristallstrukturanalysen und biochemische Untersuchungen des YopE-(SycE)₂-Komplexes zeigten, dass dieser Komplex katalytisch aktiv ist (Birtalan, *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass der Chaperon-Effektor-Komplex im Cytosol bereits funktional gefaltet vorliegt. Untersuchungen von Fusionsproteinen bestehend aus YopE und Faltungsreportern untermauern ebenfalls die Hypothese, dass Ysc-T3SS Substrate bereits im Cytoplasma falten (Wilharm, *et al.*, 2004, Rodgers, *et al.*, 2008). Da der innere Durchmesser der T3SS Nadel nur 25 Å beträgt (Blocker, *et al.*, 2001, Hoiczky & Blobel, 2001, Marlovits & Stebbins, 2010) müssen die zu transportierenden Substrate wieder entfaltet werden. Der wahrscheinlichste Kandidat für diesen „Unfolding“-Prozess ist die mit dem Ysc-T3SS assoziierte ATPase YscN. Für das *Salmonella* T3SS konnte gezeigt werden, dass die ATPase InvC das Chaperone SicP vom Chaperon-Substrat-Komplex SicP/SptP ATP-abhängig ablöst und anschließend SptP ebenfalls ATP-abhängig entfaltet (Akedo & Galan, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Transport von Ysc-T3SS Substraten neben der ATPase-Aktivität von YscN auch eine polarisierte Membran in Form der PMF voraussetzt (Wilharm, *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass die ATPase YscN in erster Linie als „Unfoldase“ wirkt und das „Schieben“ der gerade entfalteten Polypeptidkette des Substrats in den Transportkanal durch die PMF vorangetrieben wird. Die Beteiligung der PMF am Transportprozess von Substraten konnte ebenfalls für das Fla-T3SS in *Salmonella enterica* gezeigt werden (Minamino & Namba, 2008, Paul, *et al.*, 2008).

Da die T3SS Substrate in ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Struktur sehr unterschiedlich sind, stellt sich die Frage, was die spezifischen Beschaffenheiten der Substrate sind, um über das T3SS transportiert bzw. von der ATPase YscN entfaltet zu werden. In dieser Arbeit sollte ein Reportersystem etabliert werden, das Aufschluss über die Transportfähigkeit von unterschiedlich thermostabilen β -Laktamasen gibt.

5.2.1 *Yersinia* β -Laktamasen AmpC und BlaA als T3SS-Reporterkonstrukte

Die Effektorproteine des Ysc-T3SS üben bei Translokation in die eukaryotischen Zielzellen verschiedene katalytische Funktionen aus und sind daher strukturell sehr unterschiedlich aufgebaut. Gleiches gilt auch für Effektorproteine bei *Salmonella enterica* oder *Pseudomonas aeruginosa*. Nichtsdestotrotz müssen alle Effektorproteine im entfaltenen Zustand durch die „Injektionsnadel“ transportiert werden. Es stellt sich also die Frage, welche speziellen strukturellen Eigenschaften eines Substrats erforderlich sind, um von der ATPase entfaltet werden zu können.

DISKUSSION

Bei YopE handelt es sich um ein bereits vielfach charakterisiertes Effektorprotein; Fusionen von verschiedenen Reporterproteinen an den N-Terminus von YopE wurden erfolgreich zur Charakterisierung der YopE-Sekretion und -Translokation eingesetzt (Feldman, *et al.*, 2002, Lee & Schneewind, 2002, Wilharm, *et al.*, 2004, Sorg, *et al.*, 2005). Eines dieser verwendeten Reporterproteine ist die *E. coli* β -Laktamase TEM-1. Diese kann effizient mittels verschiedener YopE-N-Termini (E_i; i=18 AS, 53 AS, 138 AS) sowohl in den Überstand sekretiert als auch in Wirtszellen transloziert werden (Koberle, *et al.*, 2009, Dewoody, *et al.*, 2011). Bei TEM-1 handelt es sich im nativen Zustand um ein Sec-abhängiges Substrat, dessen N-terminale Signalsequenz beim Transport über die innere Membran abgespalten wird. Darüber hinaus benötigt TEM-1 für die anschließende Faltung außerhalb des Cytosols kein Chaperon (Lamiet & Pluckthun, 1989). Wie bereits oben erwähnt, ist das Sec-System nur für ungefaltete Proteine kompatibel. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es sich bei den *Yersinia* β -Laktamasen AmpC und BlaA um ein Sec-Substrat bzw. um ein Tat-Substrat handelt. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich BlaA durch eine besondere Thermostabilität auszeichnet. Da es sich bei BlaA um ein natürliches Tat-Substrat handelt, liegt es bereits im Cytoplasma stabil gefaltet vor und wird auch im gefalteten Zustand über die TatABC Translokase transportiert. Es stellt sich nun die Frage, ob diese beiden unterschiedlich transportierten *Yersinia* β -Laktamasen mit dem Ysc-T3SS kompatibel sind bzw. ob sie von der ATPase entfaltet werden können.

Untersucht man die Yop-Sekretion von E₅₃-AmpC-Strep und E₅₃-BlaA-Strep Fusionsprotein produzierenden Yersinien, so zeigt sich, dass nur E₅₃-AmpC-Strep Ysc-T3SS-abhängig in den Überstand sekretiert werden kann (beide Konstrukte werden produziert bzw. sind im Cytoplasma nachweisbar). Die *Yersinia* β -Laktamase AmpC ist also kompatibel mit dem Ysc-T3SS, BlaA hingegen nicht. Die ATPase YscN ist somit wahrscheinlich in der Lage, AmpC zu entfalten, die thermisch stabile BlaA allerdings nicht. Interessanterweise erfolgt bei Produktion des nicht-sekretierbaren E₅₃-BlaA-Strep Fusionsproteins die Sekretion der übrigen Yops nahezu unbeeinflusst; es ist nur eine geringfügig verringerte Yop-Sekretion festzustellen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass sich E₅₃-BlaA-Strep nach Interaktion mit der ATPase bzw. dem T3SS Apparat wieder von diesem lösen kann und somit eine ungehinderte Sekretion der übrigen Yops ermöglicht wird. Ähnliche Beobachtungen wurden für die unpassierbaren YopE-Fusionsproteine E₁₅-Ub-Npt (Ub=Ubiquitin, Npt=Neomycin Phosphotransferase) in *Y. enterocolitica* Serotyp O:9, E₁₅-DHFR (DHFR=Dehydrofolat Reduktase) in *Y. enterocolitica* Serotyp O:9 (Lee & Schneewind, 2002), und E₁₆-DHFR in *Y. pseudotuberculosis* (Feldman, *et al.*, 2002) gemacht. Wilharm, *et al.* (2004) zeigten hingegen, dass in *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 das nicht-sekretierbare

DISKUSSION

YopE-Fusionsprotein E₁₈-DHFR zu einer starken Verringerung der Yop-Sekretion führt. Daraus wurde geschlussfolgert, dass E₁₈-DHFR zu einer Blockade des Ysc-T3SS Kanals führt. Feldman, *et al.* (2002) zeigten in *Y. pseudotuberculosis*, dass das unpassierbare E₅₂-DHFR Fusionsprotein (in Abwesenheit von SycE) den Transportkanal nicht blockiert. Sekretierbare YopE-Fusionsproteine (somit Analoge zu E₅₃-AmpC-Strep) wie E₅₂-DHFR (in Anwesenheit von SycE) (Feldman, *et al.*, 2002), E₅₃-DHFR (Wilharm, *et al.*, 2004) oder E₅₃-GFP (Jacobi, *et al.*, 1998) führen – ebenso wie für E₅₃-AmpC-Strep beobachtet – zu keiner Blockade des Transportkanals.

Die Chaperon-Bindestelle (Cb) von YopE befindet sich innerhalb der Aminosäurereste 23-78 (Sory, *et al.*, 1995, Rodgers, *et al.*, 2008). Die getesteten Reporterproteine E₅₃-AmpC-Strep und E₅₃-BlaA-Strep umfassen somit nur eine verkürzte Cb-Domäne. Jacobi, *et al.* (1998) konnten mit E₁-GFP Reportern zeigen, dass das E₅₃-GFP (verkürzte Cb) im Vergleich zum E₁₃₈-GFP Konstrukt (vollständige Cb) effektiver sekretiert, aber weniger effektiv transloziert wird als E₁₃₈-GFP. Wir haben deshalb überprüft, ob die Anwesenheit der vollständigen YopE Cb-Domäne möglicherweise 1) die Sekretion von AmpC verhindert oder 2) die Sekretion von BlaA ermöglicht. Feldman, *et al.* (2002) verglichen in ihrer Arbeit das Sekretionsverhalten von E₅₂-DHFR, E₈₀-DHFR und E₂₁₉-DHFR (gesamtes YopE) Fusionsproteinen und zeigten, dass, in Anwesenheit von SycE, E₅₂-DHFR in den Überstand sekretiert wird, E₈₀-DHFR und E₂₁₉-DHFR hingegen nicht. Ähnliches wurde von Wilharm, *et al.* (2004) gezeigt: E₅₂-DHFR und E₅₃-DHFR werden sekretiert, E₁₃₈-DHFR hingegen nicht.

Untersuchungen zur Sekretion von E₁₃₈-AmpC-Strep und E₁₃₈-BlaA-Strep ergaben, dass, wie auch für E₅₃-AmpC-Strep und E₅₃-BlaA-Strep beobachtet, nur das E₁₃₈-AmpC-Strep Fusionsprotein in den Überstand sekretiert wird. Auffallend ist, dass die Sekretion von E₁₃₈-AmpC-Strep im Vergleich zu E₅₃-AmpC-Strep in verringerter Menge erfolgt. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Sekretion der übrigen Yops sowohl bei Produktion des sekretierbaren E₁₃₈-AmpC-Strep Konstrukts als auch des nicht-sekretierbaren E₁₃₈-BlaA-Strep Fusionsproteins stark gehemmt ist. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die cytosolische Menge von YopE in E₁₃₈-AmpC-Strep bzw. E₁₃₈-BlaA-Strep produzierenden Stämmen der des Kontrollstammes WA^{RS}ΔΔ entspricht. Die Reduktion der YopE-Sekretion scheint also nicht auf eine verringerte cytosolische YopE-Menge zurückzuführen zu sein. Weder E₅₃-BlaA-Strep noch E₁₃₈-BlaA-Strep können über das Ysc-T3SS sekretiert werden. Dennoch sind signifikante Unterschiede in der Stabilität auszumachen: E₅₃-BlaA-Strep wird im Cytoplasma C-terminal degradiert, E₁₃₈-BlaA-Strep scheint hingegen stabil gegenüber cytosolischer Proteasen zu sein. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass

DISKUSSION

sich das Chaperon SycE vom nicht-sekretierbaren E₅₃-BlaA-Strep ablöst, die Fusionsproteine aggregieren und werden von cytosolischen Proteasen abgebaut. Dahingegen bindet SycE aufgrund des Vorhandenseins der vollständigen Cb-Domäne stabil an E₁₃₈-BlaA-Strep; das Fusionsprotein bleibt somit löslich im Cytosol und wird nicht durch Proteasen abgebaut.

Die Fähigkeit des T3SS nicht-passierbare Substrate „abzuweisen“ und somit den Transportkanal für passierbare Substrate kompatibel zu halten, scheint eine besondere Eigenschaft des T3SS zu sein. Für das Sec-System konnte hingegen gezeigt werden, dass Signalpeptid-Fusionsproteine mit einem unpassierbaren Reporterprotein (z.B. lacZ, kodiert für die β -Galaktosidase) irreversibel an die Sec-Pore binden und den Transportkanal verstopfen (Bassford & Beckwith, 1979, Blobel, 1980, Eilers & Schatz, 1986). Das „Abweisen“ von unpassierbaren Substraten ist im Falle von YopE-Fusionsproteinen allerdings nur dann möglich, wenn maximal die ersten 53 AS von YopE an das jeweilige Reporterprotein fusioniert vorliegen. Werden längere Fragmente von YopE (80 AS oder 138 AS) oder das gesamte YopE an nicht-sekretierbaren Reporterproteine fusioniert, so wird der Transportkanal blockiert und die Sekretion der übrigen Yops erfolgt stark vermindert (Feldman, *et al.*, 2002, Lee & Schneewind, 2002, Wilharm, *et al.*, 2004). Diese Beobachtung könnte man mit einem „Ventileffekt“ erklären: Möglicherweise befindet sich innerhalb des Transportkanals ein Ventil, nach dessen Passage die Substrate nicht mehr aus dem Kanal „ausgefädelt“ werden können. Kürzere E_i Fragmente (i=15, 16, 18, 52, 53 AS) werden nach Interaktion mit Komponenten des Basalkörpers und/oder der ATPase nicht tief genug in den Transportkanal eingefädelt, da bereits das Reporterkonstrukt den Transport blockiert; sie erreichen also nicht das „Ventil“. Somit kann das N-terminale Signal wieder „ausgefädelt“ werden, das Fusionsprotein löst sich vom Transportkanal und dieser ist für den Transport von passierbaren Substraten frei. Längere YopE-Fragmente hingegen dringen zu tief in den Sekretionskanal ein bevor der Transport durch das nicht-sekretierbare Reporterproteine blockiert wird; das „Ventil“ wurde passiert und greift das Substrat. Das bereits eingeführte YopE-Fragment kann nicht mehr aus dem Kanal gelöst werden und das Reporterprotein bildet quasi einen Verschluss am Basalkörper des T3SS; somit ist der Transportkanal für weitere Yops nicht mehr zugänglich. Eine Übersicht über die verschiedenen Möglichkeiten des Transports von Signalpeptid-Reporter-Fusionsproteinen ist in Abb. 44 dargestellt.

DISKUSSION

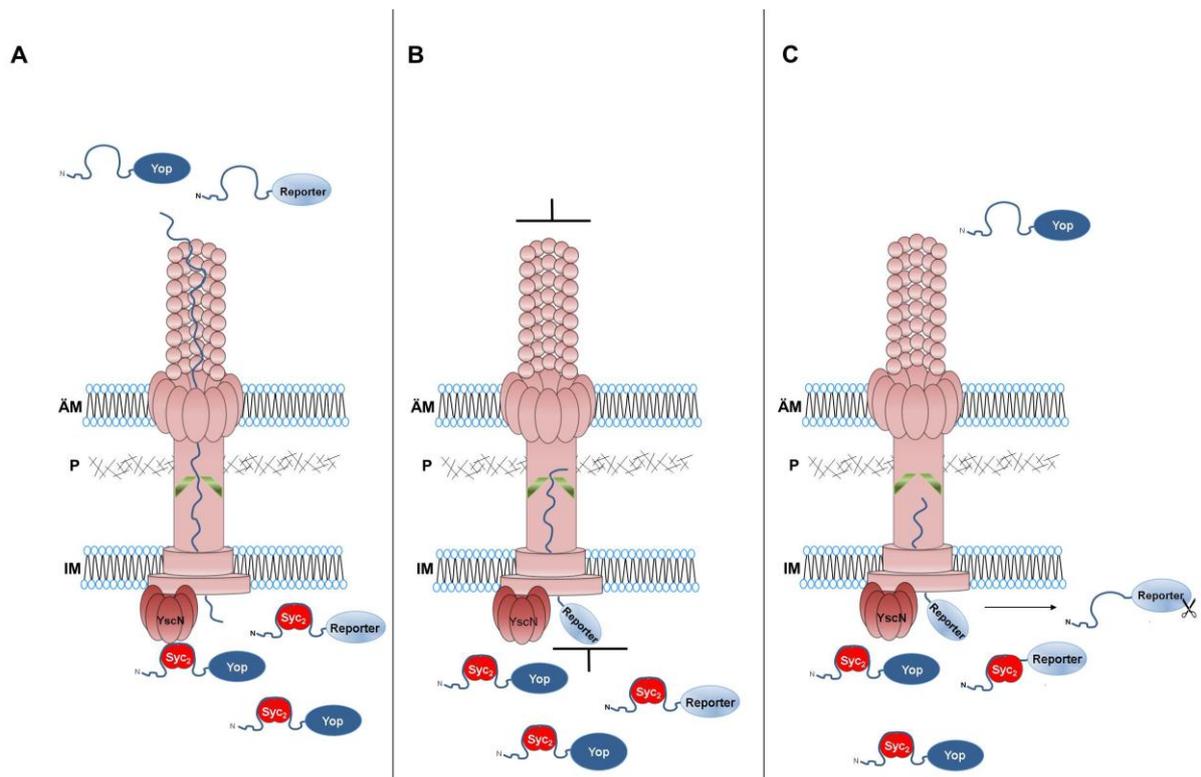


Abb. 44: Schematische Darstellung des Ysc-T3SS zur Interpretation des Sekretionsergebnisses von Signalpeptid-Reporter-Fusionsproteinen (Details im Text).

A: Transport von passierbaren Reportern (z.B. E₁₃₈-AmpC-Strep) **B:** Blockade des Transportkanals durch unpassierbare Reporter (z.B. E₁₃₈-BlaA-Strep) **C:** „Ablösen“ von unpassierbaren Reportern (und somit keine Blockade bei der Sekretion der übrigen Substrate) vom Transportkanal (z.B. E₅₃-AmpC-Strep). „Abgelöste“ Fusionsproteine werden von cytosolischen Proteasen C-terminal abgebaut. IM=Innere Membran; ÄM=Äußere Membran; P=Peptidoglykan

Allerdings widerspricht dieser Erklärungsansatz der Beobachtung, dass die Yop-Sekretion auch bei Produktion und Sekretion von sekretierbaren YopE-Fusionen wie E₁₃₈-AmpC-Strep (diese Arbeit), E₁₃₈-TEM-1 (diese Arbeit, Cvetanovic, 2011) und E₁₃₈-LUC (LUC=Luciferase) (Jacobi, *et al.*, 1998) im Vergleich zum Yop-Sekretionsmuster des Wildtyp Stammes stark verringert ist.

Lee, *et al.* (2002) konnten zeigen, dass nicht-passierbare YopE-Fusionsproteine löslich im Cytoplasma vorhanden sind und somit vermutlich keine membranassoziierten Aggregate bilden. Dies widerspricht der Annahme, dass nicht-sekretierbare Fusionsproteine mit dem Transportkanal interagieren und diesen verstopfen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die verringerte Yop-Sekretion bei Produktion der nicht-sekretierbaren Fusionsproteine E₂₁₉-DHFR und E₂₁₉-LacZ nicht durch den Verschluss des Transportkanals, sondern durch eine verringerte Expression der *yop* Gene verursacht wird (Sorg, *et al.*, 2005). Dies wurde dadurch belegt, dass Mutationen in Genen, die als posttranskriptionale Repressoren der *yop*

DISKUSSION

Expression fungieren (*yopD*, *lcrH*, *yscM1* und *yscM2*), die Yop-Sekretion auf Wildtyp-Level wiederherstellen können. Dies würde bedeuten, dass die unpassierbaren YopE-Fusionsproteine nicht in den Transportkanal eingefädelt werden und das „Abweisen“ dieser Konstrukte in einem Rückkopplungsmechanismus die Expression der übrigen Yops inhibiert. Allerdings liefert diese Argumentation keine Erklärung, warum 1) auch passierbare YopE-Fusionen zu einer verringerten Yop-Sekretion führen und 2) warum nicht-passierbare YopE-Fusionsproteine mit kürzeren YopE-Fragmenten ($E_i=15, 16, 18, 52, 53$) die Yop-Sekretion nur unwesentlich beeinflussen, längere Fragmente ($E_i=80$, volle Länge) hingegen die Yop-Sekretion nahezu komplett inhibieren.

Die hier vorgeschlagenen Erklärungsansätze zum Exportblock von Yops durch Produktion von unpassierbaren Yop-Fusionsproteinen liefern jeweils nur Teilerklärungen für die beobachteten Phänotypen bzw. können nicht alle Effekte erklären. Man sollte berücksichtigen, dass unterschiedliche Arbeitsgruppen verschiedene Plasmide (unterschiedliche Kopienzahl in der Zelle) zur Klonierung der Reporterkonstrukte oder verschiedene *Yersinia* Arten und Stämme für ihre Untersuchungen verwenden und somit die Ergebnisse nicht unbedingt vergleichbar sind.

Um zu überprüfen, ob die sekretierbaren E_{53} -AmpC-Strep bzw. E_{138} -AmpC-Strep Fusionsproteine ebenfalls in eukaryotische Zellen transloziert werden können, wurden Zellkultur-Infektionsversuche durchgeführt. Der Nachweis der Translokation erfolgte mithilfe der katalytischen Eigenschaften der fusionierten β -Laktamasen. Diese spalten ein fluorogenes Substrat, mit denen die eukaryotischen Zellen zuvor beladen wurden. Die Spaltung des Substrats resultiert in einer Änderung der emittierten Fluoreszenz und kann durchflusszytometrisch analysiert werden. Dieses System wurde bereits mit verschiedenen E_i -TEM-1 Fusionsproteinen etabliert (Koberle, *et al.*, 2009, Dewoody, *et al.*, 2011). Die E_{53} -TEM-1 und E_{138} -TEM-1 Fusionsproteine dienten in dieser Arbeit als Positiv-Kontrollen. Die Daten ermittelt aus den Sekretionsversuchen korrelieren mit den Daten ermittelt aus den Translokationsversuchen: E_{53} -AmpC-Strep und E_{138} -AmpC-Strep werden sowohl in den Überstand sekretiert, als auch in eukaryotische Zielzellen transloziert. Wie erwartet werden weder E_{53} -BlaA-Strep noch E_{138} -BlaA-Strep transloziert.

Die *Yersinia* β -Laktamasen AmpC und BlaA eignen sich von daher als Reportermoleküle zur Untersuchung der Substratstabilität von T3SS-Effektoren, da es sich bei diesen um zwei Enzyme mit den gleichen katalytischen Eigenschaften und somit mit einem ähnlichen Proteinaufbau handelt. Dennoch unterscheiden sich die beiden Proteine unter nativen

DISKUSSION

Bedingungen in ihrem Sekretionsverhalten: AmpC wird als Sec-Substrat entfaltet transportiert, wohingegen BlaA als Tat-Substrat bereits im Cytosol faltet und in einer vollständig gefalteten Konformation transportiert wird. Die vergleichenden Untersuchungen des T3SS-abhängigen Transports dieser β -Laktamasen zeigen, dass die Stabilität der Faltung oder die Faltungskinetik zu Unterschieden in der T3SS-abhängigen Sekretierbarkeit führt.

5.2.2 Ysc-T3SS Sekretion von thermisch unterschiedlich stabilen YopE_i-TEM-1 Substratvarianten

Um die Sekretierbarkeit von β -Laktamasen besser vergleichen zu können, haben wir einen Satz von drei TEM-1-Varianten mit unterschiedlichen Thermostabilitäten getestet. Es wird vermutet, dass die Struktur der Region zwischen der Cb-Domäne und der ersten zu entfaltenden Domäne des Substrats entscheidend dafür sind, ob die ATPase ein Protein entfalten kann oder nicht (Matouschek, 2003, Wilharm, *et al.*, 2007). Um diese Fragestellung zu erörtern sollten Reporterkonstrukte eingesetzt werden, die sich in ihrer Proteinstruktur kaum unterscheiden, aber dennoch unterschiedliche Thermostabilitäten aufweisen.

Wie bereits erwähnt, wurde die β -Laktamase TEM-1 bereits mehrfach als Reporterkonstrukt zur Untersuchung der Yop-Sekretion und –Translokation eingesetzt. TEM-1 kann mittels verschiedener YopE-N-Termini (E_i=18, 53, 138) effizient sekretiert und in Zielzellen transloziert werden. Kather, *et al.* (2008) stellten in ihrer Arbeit durch Aminosäuresubstitutionen TEM-1 Varianten her, die sich durch eine erhöhte Faltungsstabilität und eine erhöhte thermische Stabilität auszeichnen. Die Mutationen, die besonders stabil auf TEM-1 wirkten, wurden zusammen in wildtypische TEM-1 integriert und resultierten in der stabilsten Variante MEGA.

Die Arbeitshypothese besteht nun darin, ob diese stabilisierten TEM-1 Varianten, die sich nur durch wenige Aminosäuresubstitutionen unterscheiden, genauso effizient über das Ysc-T3SS sekretiert werden bzw. von der ATPase entfaltet werden können wie wildtypische TEM-1. Es wurden zwei stabilisierte Varianten, RLT (T_M=60,4 °C) und MEGA (T_M=69,2 °C), sowie wildtypische TEM-1 (T_M=50,8 °C) an die ersten 53 AS von YopE fusioniert und die Sekretion und Translokation dieser Fusionsproteine untersucht. Es zeigte sich, dass E₅₃-MEGA weder sekretiert noch transloziert wird. E₅₃-RLT ist in geringer Menge im Überstand nachweisbar, kann jedoch nicht in Wirtszellen transloziert werden. Das Kontrollprotein E₅₃-TEM-1 kann effizient in den Überstand sekretiert und in eukaryotische Zellen transloziert werden. Auffallend ist ebenfalls, dass die Sekretion der übrigen Yops (ersichtlich im

DISKUSSION

Coomassie-gefärbten SDS-Gel bei Auftrag der KÜPs) bei Produktion der E₅₃-X-Proteine reduziert ist.

Die Beobachtung, dass bereits drei Aminosäureaustausche (Variante RLT) ausreichen, um die Sekretionsfähigkeit der TEM-1 β -Laktamase über das T3SS signifikant zu reduzieren und die Translokation komplett zu inhibieren, ist überraschend und Bedarf genauerer Betrachtung. Zwei (M182T/R275L) der drei (K146R/M182T/R275L) AS-Substitutionen der RLT Variante finden sich ebenfalls in der MEGA Variante. Interessanterweise befinden sich diese beiden Substitutionen im C-terminalen Bereich der β -Laktamase. Im Falle von RLT entsprechen also die ersten 145 AS exakt der wildtypischen TEM-1. Die Hypothese, dass der Bereich zwischen der Cb-Domäne und der ersten zu entfaltenden Region des T3SS-Substrat kritisch für die Entfaltung ist, kann mit diesem Versuchsansatz nicht bestätigt werden. Im Falle der M182T und R275L Substitution konnte gezeigt werden, dass diese sich jeweils im N-Terminus einer α -Helix befindet und die Mutation zu einer starken Stabilisierung dieser Helix führt (K146R führt zu keiner stabilisierenden Mutation) (Kather, *et al.*, 2008). Es kann daher vermutet werden (sofern man die K146R Substitution vernachlässigt, die nicht in MEGA zu finden ist), dass die ATPase YscN den reifen Teil von RLT, MEGA und TEM-1 zunächst gleichermaßen entfalten kann und der entfaltete Polypeptidstrang in den Transportkanal eingefädelt wird. Bei TEM-1 kann dieser Prozess vollständig vollzogen werden; das Protein wird komplett entfaltet und sekretiert. Im Falle der RLT kann bis zur ersten kritischen AS (M182T) entfaltet werden; da jedoch diese Mutation stabilisierend auf die nachfolgende α -Helix wirkt, kann die Helix nicht entfaltet werden und der Transport wird unterbrochen. Da bei Produktion von E₅₃-RLT eine geringfügige Sekretion des Fusionsproteins in den Kulturüberstand festgestellt wird und auch die Sekretion der übrigen Yops, wenn auch reduziert, stattfindet, liegt die Vermutung nahe, dass sich unpassierbare E₅₃-RLT Proteine wieder vom Transportkanal lösen können und diesen für den Export anderer Substrate frei halten. Dies ist ein interessanter Aspekt, da das E₅₃-RLT Fusionsprotein anscheinend bis mindestens AS 145 der β -Laktamase (identische AS-Sequenz zwischen TEM-1 und RLT) entfaltet wird und dann der Transport abgebrochen wird. Beim E₅₃-MEGA Fusionsprotein kann hingegen keine Sekretion in den Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die Interpretation dieses Ergebnisses ist schwierig, da sich sieben der neun Mutationen der MEGA Variante im C-terminalen Bereich des Proteins befinden. Da bei der RLT Variante die erste AS Substitution erst bei AS 146 liegt, bleibt festzustellen, dass die N-terminale Domäne eines T3SS-Substrats nicht entscheidend für die Entfaltung zu sein scheint. Dennoch bleibt zu berücksichtigen, dass im Falle der TEM-1 Varianten bestimmte AS-Substitutionen dazu führen, dass die Kooperativität der Entfaltung erhöht wird; d.h. die

DISKUSSION

Stabilisierung bestimmter lokaler Strukturen wie z.B. von einzelnen α -Helices erhöht die Stabilität des gesamten Proteins.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die β -Laktamase TEM-1 und ihre stabilen Varianten vielversprechende Reporter darstellen, um die kritischen Parameter zur Strukturstabilität von T3SS-Substraten zu identifizieren. Anscheinend ist die Stabilität von lokalen Strukturen innerhalb eines Proteins entscheidend dafür, ob die ATPase in der Lage ist, das Substrat zu entfalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich diese kritischen lokalen Strukturen nicht im N-terminalen Bereich eines Proteins befinden müssen.

6 Literaturverzeichnis

- Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, *et al.* (2007) Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* **5**: 883-891.
- Ackermann N, Tiller M, Anding G, Roggenkamp A & Heesemann J (2008) Contribution of trimeric autotransporter C-terminal domains of oligomeric coiled-coil adhesin (Oca) family members YadA, UspA1, EibA, and Hia to translocation of the YadA passenger domain and virulence of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **190**: 5031-5043.
- Aepfelbacher M, Trasak C & Ruckdeschel K (2007) Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb Haemost* **98**: 521-529.
- Aili M, Isaksson EL, Hallberg B, Wolf-Watz H & Rosqvist R (2006) Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Cell Microbiol* **8**: 1020-1033.
- Akeda Y & Galan JE (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911-915.
- Alami M, Luke I, Deitermann S, Eisner G, Koch HG, Brunner J & Muller M (2003) Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **12**: 937-946.
- Aldridge P, Karlinsey JE, Becker E, Chevance FF & Hughes KT (2006) Flk prevents premature secretion of the anti-sigma factor FlgM into the periplasm. *Mol Microbiol* **60**: 630-643.
- Allaoui A, Woestyn S, Sluiter C & Cornelis GR (1994) YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol* **176**: 4534-4542.
- Alley MR, Maddock JR & Shapiro L (1992) Polar localization of a bacterial chemoreceptor. *Genes Dev* **6**: 825-836.
- Amanuma H & Strominger JL (1980) Purification and properties of penicillin-binding proteins 5 and 6 from *Escherichia coli* membranes. *J Biol Chem* **255**: 11173-11180.
- Ambler RP (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**: 321-331.
- Anderson DM & Schneewind O (1997) A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**: 1140-1143.
- Andersson K, Carballeira N, Magnusson KE, Persson C, Stendahl O, Wolf-Watz H & Fallman M (1996) YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol Microbiol* **20**: 1057-1069.
- Andor A, Trulzsch K, Essler M, Roggenkamp A, Wiedemann A, Heesemann J & Aepfelbacher M (2001) YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* **3**: 301-310.
- Andrews JM (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* **48 Suppl 1**: 5-16.
- Antonenko V, Pawlow V, Heesemann J & Rakin A (2003) Characterization of a novel unique restriction-“ modification system from *Yersinia enterocolitica* O:8 1B. *FEMS Microbiology Letters* **219**: 249-252.
- Araki Y, Shirai R, Shimada A, Ishimoto N & Ito E (1966) Enzymatic synthesis of cell wall mucopeptide in a particulate preparation of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **23**: 466-472.
- Archer RA & Kitchell BS (1966) Chemistry of cephalosporin antibiotics. VI. Carbamate formation in aqueous bicarbonate solutions of 7-ACA. *J Org Chem* **31**: 3409-3411.
- Baggaley KH, Brown AG & Schofield CJ (1997) Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Nat Prod Rep* **14**: 309-333.

LITERATURVERZEICHNIS

- Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M & Hoiby N (2002) Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3406-3411.
- Bagos PG, Nikolaou EP, Liakopoulos TD & Tsirigos KD (2010) Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. *Bioinformatics* **26**: 2811-2817.
- Bardwell JC, McGovern K & Beckwith J (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* **67**: 581-589.
- Bardy SL & Maddock JR (2007) Polar explorations. *Current Opinion in Microbiology* **10**: 617-623.
- Bassford P & Beckwith J (1979) *Escherichia coli* mutants accumulating the precursor of a secreted protein in the cytoplasm. *Nature* **277**: 538-541.
- Bean GJ, Flickinger ST, Westler WM, McCully ME, Sept D, Weibel DB & Amann KJ (2009) A22 Disrupts the Bacterial Actin Cytoskeleton by Directly Binding and Inducing a Low-Affinity State in MreB. *Biochemistry* **48**: 4852-4857.
- Beha D (2003) Export of β -Lactamase Is Independent of the Signal Recognition Particle. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 22161-22167.
- Benabdillah R, Mota LJ, Lutzelschwab S, Demoinet E & Cornelis GR (2004) Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. *Microb Pathog* **36**: 247-261.
- Bendtsen J, Nielsen H, Widdick D, Palmer T & Brunak S (2005) *BMC Bioinformatics* **6**: 167.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G & Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795.
- Bent ZW & Young GM (2010) Contribution of BlaA and BlaB β -Lactamases to Antibiotic Susceptibility of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**: 4000-4002.
- Berg BL, Baron C & Stewart V (1991) Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. II. Evidence that a mRNA stem-loop structure is essential for decoding opal (UGA) as selenocysteine. *J Biol Chem* **266**: 22386-22391.
- Berks BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**: 393-404.
- Berks BC, Sargent F & Palmer T (2000) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**: 260-274.
- Berks BC, Palmer T & Sargent F (2005) Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* **8**: 174-181.
- Bernhardt TG & de Boer PA (2003) The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol* **48**: 1171-1182.
- Berthelmann F & Brüser T (2004) Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **569**: 82-88.
- Beveridge TJ (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**: 4725-4733.
- Birtalan SC, Phillips RM & Ghosh P (2002) Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell* **9**: 971-980.
- Black DS & Bliska JB (2000) The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* **37**: 515-527.
- Blaudeck N, Sprenger GA, Freudl R & Wiegert T (2001) Specificity of signal peptide recognition in tat-dependent bacterial protein translocation. *J Bacteriol* **183**: 604-610.
- Blaudeck N, Kreutzenbeck P, Freudl R & Sprenger GA (2003) Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol* **185**: 2811-2819.

LITERATURVERZEICHNIS

- Blaylock B, Riordan KE, Missiakas DM & Schneewind O (2006) Characterization of the Yersinia enterocolitica Type III Secretion ATPase YscN and Its Regulator, YscL. *Journal of Bacteriology* **188**: 3525-3534.
- Blaylock B, Riordan KE, Missiakas DM & Schneewind O (2006) Characterization of the Yersinia enterocolitica type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol* **188**: 3525-3534.
- Bliska JB & Falkow S (1992) Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of Yersinia enterocolitica. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3561-3565.
- Blobel G (1980) Regulation of intracellular protein traffic. *Harvey Lect* **76**: 125-147.
- Blocker A, Jouihri N, Larquet E, et al. (2001) Structure and composition of the Shigella flexneri "needle complex", a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* **39**: 652-663.
- Bochkareva E, Safro M & Girshovich A (1999) Interaction of 4,4'-dithiodipyridine with Cys(458) triggers disassembly of GroEL. *J Biol Chem* **274**: 20756-20758.
- Bochkareva ES, Lissin NM & Girshovich AS (1988) Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. *Nature* **336**: 254-257.
- Boeneman K, Fossum S, Yang Y, Finland N, Skarstad K & Crooke E (2009) Escherichia coli DnaA forms helical structures along the longitudinal cell axis distinct from MreB filaments. *Mol Microbiol* **72**: 645-657.
- Bogsch E, Brink S & Robinson C (1997) Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *EMBO J* **16**: 3851-3859.
- Boland A & Cornelis GR (1998) Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect Immun* **66**: 1878-1884.
- Bolin I & Wolf-Watz H (1984) Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of Yersinia pseudotuberculosis. *Infect Immun* **43**: 72-78.
- Bolin I, Norlander L & Wolf-Watz H (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* **37**: 506-512.
- Bottone EJ (1977) Yersinia enterocolitica: a panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Crit Rev Microbiol* **5**: 211-241.
- Bottone EJ (1997) Yersinia enterocolitica: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* **10**: 257-276.
- Boyd AP, Lambermont I & Cornelis GR (2000) Competition between the Yops of Yersinia enterocolitica for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* **182**: 4811-4821.
- Boyd AP, Grosdent N, Totemeyer S, et al. (2000) Yersinia enterocolitica can deliver Yop proteins into a wide range of cell types: development of a delivery system for heterologous proteins. *Eur J Cell Biol* **79**: 659-671.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bresolin G, Neuhaus K, Scherer S & Fuchs TM (2006) Transcriptional analysis of long-term adaptation of Yersinia enterocolitica to low-temperature growth. *J Bacteriol* **188**: 2945-2958.
- Breyton C, Haase W, Rapoport TA, Kuhlbrandt W & Collinson I (2002) Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* **418**: 662-665.
- Briggs CE & Fratamico PM (1999) Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of Salmonella typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 846-849.
- Brink S, Bogsch EG, Edwards WR, Hynds PJ & Robinson C (1998) Targeting of thylakoid proteins by the delta pH-driven twin-arginine translocation pathway requires a specific

LITERATURVERZEICHNIS

- signal in the hydrophobic domain in conjunction with the twin-arginine motif. *FEBS Lett* **434**: 425-430.
- Broome-Smith J & Spratt BG (1984) An amino acid substitution that blocks the deacylation step in the enzyme mechanism of penicillin-binding protein 5 of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **165**: 185-189.
- Bruser T, Deutzmann R & Dahl C (1998) Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **164**: 329-336.
- Buchanan G, Sargent F, Berks BC & Palmer T (2001) A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif. *Arch Microbiol* **177**: 107-112.
- Buddelmeijer N, Francetic O & Pugsley AP (2006) Green fluorescent chimeras indicate nonpolar localization of pullulanase secretion components PulL and PulM. *J Bacteriol* **188**: 2928-2935.
- Bukholm G, Kapperud G & Skurnik M (1990) Genetic evidence that the yopA gene-encoded *Yersinia* outer membrane protein Yop1 mediates inhibition of the anti-invasive effect of interferon. *Infect Immun* **58**: 2245-2251.
- Burghout P, van Boxtel R, Van Gelder P, Ringler P, Muller SA, Tommassen J & Koster M (2004) Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **186**: 4645-4654.
- Burghout P, Beckers F, de Wit E, van Boxtel R, Cornelis GR, Tommassen J & Koster M (2004) Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **186**: 5366-5375.
- Burns DL (1999) Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol* **2**: 25-29.
- Bush K, Jacoby GA & Medeiros AA (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1211-1233.
- Buttner D & He SY (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol* **150**: 1656-1664.
- Buttner D & Bonas U (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 107-133.
- Byrne WR, Welkos SL, Pitt ML, *et al.* (1998) Antibiotic treatment of experimental pneumonic plague in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 675-681.
- Cannon KS, Or E, Clemons WM, Jr., Shibata Y & Rapoport TA (2005) Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *J Cell Biol* **169**: 219-225.
- Carballido-Lopez R (2006) Orchestrating bacterial cell morphogenesis. *Mol Microbiol* **60**: 815-819.
- Carballido-Lopez R (2006) The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 888-909.
- Carniel E, Guilvout I & Prentice M (1996) Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **178**: 6743-6751.
- Carter CW, Jr., Kraut J, Freer ST, Nguyen Huu X, Alden RA & Bartsch RG (1974) Two-Angstrom crystal structure of oxidized Chromatium high potential iron protein. *J Biol Chem* **249**: 4212-4225.
- Cascales E & Christie PJ (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**: 137-149.
- Cava F, Lam H, de Pedro MA & Waldor MK (2011) Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **68**: 817-831.
- Chang AC & Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**: 1141-1156.

LITERATURVERZEICHNIS

- Chang YH, Labgold MR & Richards JH (1990) Altering enzymatic activity: recruitment of carboxypeptidase activity into an RTEM beta-lactamase/penicillin-binding protein 5 chimera. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 2823-2827.
- Cherepanov PP & Wackernagel W (1995) Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14.
- Chiesa C, Pacifico L & Ravagnan G (1991) Isolation of Yersinia enterocolitica serogroup O:8, biogroup 1B. *J Clin Microbiol* **29**: 2680.
- Cimarusti CM & Sykes RB (1984) Monocyclic beta-lactam antibiotics. *Med Res Rev* **4**: 1-24.
- Cole M (1966) Formation of 6-aminopenicillanic acid, penicillins, and penicillin acylase by various fungi. *Appl Microbiol* **14**: 98-104.
- Collier DN (1993) SecB: a molecular chaperone of Escherichia coli protein secretion pathway. *Adv Protein Chem* **44**: 151-193.
- Collinson I, Breyton C, Duong F, et al. (2001) Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase. *EMBO J* **20**: 2462-2471.
- Cornelis G & Abraham EP (1975) Beta-lactamases from Yersinia enterocolitica. *J Gen Microbiol* **87**: 273-284.
- Cornelis G, Sory MP, Laroche Y & Derclaye I (1986) Genetic analysis of the plasmid region controlling virulence in Yersinia enterocolitica O:9 by Mini-Mu insertions and lac gene fusions. *Microb Pathog* **1**: 349-359.
- Cornelis G, Laroche Y, Balligand G, Sory MP & Wauters G (1987) Yersinia enterocolitica, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev Infect Dis* **9**: 64-87.
- Cornelis GR (1998) The Yersinia deadly kiss. *J Bacteriol* **180**: 5495-5504.
- Cornelis GR (2002) The Yersinia Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 742-752.
- Cornelis GR (2002) Yersinia type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* **158**: 401-408.
- Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811-825.
- Cornelis GR & Wolf-Watz H (1997) The Yersinia Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**: 861-867.
- Cornelis GR, Biot T, Lambert de Rouvroit C, et al. (1989) The Yersinia yop regulon. *Mol Microbiol* **3**: 1455-1459.
- Creighton TE (1986) Disulfide bonds as probes of protein folding pathways. *Methods Enzymol* **131**: 83-106.
- Crepin VF, Prasannan S, Shaw RK, et al. (2005) Structural and functional studies of the enteropathogenic Escherichia coli type III needle complex protein EscJ. *Mol Microbiol* **55**: 1658-1670.
- Cristobal S, de Gier JW, Nielsen H & von Heijne G (1999) Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in Escherichia coli. *EMBO J* **18**: 2982-2990.
- Cruz JA, Kanazawa A, Treff N & Kramer DM (2005) Storage of light-driven trans-thylakoid proton motive force as an electric field (Deltapsi) under steady-state conditions in intact cells of Chlamydomonas reinhardtii. *Photosynth Res* **85**: 221-233.
- Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- Datta N & Kontomichalou P (1965) Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* **208**: 239-241.
- Dautin N & Bernstein HD (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**: 89-112.
- Day JB & Plano GV (1998) A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in Yersinia pestis. *Mol Microbiol* **30**: 777-788.
- Day JB, Guller I & Plano GV (2000) Yersinia pestis YscG protein is a Syc-like chaperone that directly binds yscE. *Infect Immun* **68**: 6466-6471.
- De Gier JW, Valent QA, Von Heijne G & Lührink J (1997) The E. coli SRP: preferences of a targeting factor. *FEBS Lett* **408**: 1-4.

LITERATURVERZEICHNIS

- de la Prieta MC, Seoame A, Diaz J, Navas J & Garcia-Lobo JM (1995) Beta-lactamase genes and beta-lactamic susceptibility in *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **13**: 184-187.
- De Leeuw E, Porcelli I, Sargent F, Palmer T & Berks BC (2001) Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. *FEBS Lett* **506**: 143-148.
- Delepelaire P (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 149-161.
- DeLisa MP, Samuelson P, Palmer T & Georgiou G (2002) Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J Biol Chem* **277**: 29825-29831.
- Delor I & Cornelis GR (1992) Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* **60**: 4269-4277.
- Den Blaauwen T, Aarsman ME, Vischer NO & Nanninga N (2003) Penicillin-binding protein PBP2 of *Escherichia coli* localizes preferentially in the lateral wall and at mid-cell in comparison with the old cell pole. *Mol Microbiol* **47**: 539-547.
- den Blaauwen T, Fekkes P, de Wit JG, Kuiper W & Driessen AJ (1996) Domain interactions of the peripheral preprotein Translocase subunit SecA. *Biochemistry* **35**: 11994-12004.
- Dewoody R, Merritt PM, Houppert AS & Marketon MM (2011) YopK regulates the *Yersinia pestis* type III secretion system from within host cells. *Mol Microbiol* **79**: 1445-1461.
- Doi M, Wachi M, Ishino F, *et al.* (1988) Determinations of the DNA sequence of the mreB gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **170**: 4619-4624.
- Dominguez-Escobar J, Chastanet A, Crevenna AH, Fromion V, Wedlich-Soldner R & Carballido-Lopez R (2011) Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* **333**: 225-228.
- Driessen AJ (1992) Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the protonmotive force. *EMBO J* **11**: 847-853.
- Driessen AJ, Fekkes P & van der Wolk JP (1998) The Sec system. *Curr Opin Microbiol* **1**: 216-222.
- Driessen AJ, Manting EH & van der Does C (2001) The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol* **8**: 492-498.
- du Plessis DJ, Nouwen N & Driessen AJ (2011) The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta* **1808**: 851-865.
- Dukuzumuremyi JM, Rosqvist R, Hallberg B, Akerstrom B, Wolf-Watz H & Schesser K (2000) The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem* **275**: 35281-35290.
- Dye NA (2005) Two independent spiral structures control cell shape in *Caulobacter*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 18608-18613.
- Economou A, Pogliano JA, Beckwith J, Oliver DB & Wickner W (1995) SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE. *Cell* **83**: 1171-1181.
- Ehrhardt AF, Sanders CC, Romero JR & Leser JS (1996) Sequencing and analysis of four new *Enterobacter ampD* Alleles. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1953-1956.
- Eilers M & Schatz G (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* **322**: 228-232.
- Enninga J & Rosenshine I (2009) Imaging the assembly, structure and activity of type III secretion systems. *Cell Microbiol* **11**: 1462-1470.
- Erfurth SE, Grobner S, Kramer U, *et al.* (2004) *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun* **72**: 7045-7054.

LITERATURVERZEICHNIS

- Feldman MF, Muller S, Wuest E & Cornelis GR (2002) SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol* **46**: 1183-1197.
- Fenselau S & Bonas U (1995) Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 845-854.
- Fields KA, Plano GV & Straley SC (1994) A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (*ysc*) locus lies within the *lcrB* region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **176**: 569-579.
- Finazzi G, Chasen C, Wollman FA & de Vitry C (2003) Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no delta pH dependence in vivo. *EMBO J* **22**: 807-815.
- Forsberg A, Viitanen AM, Skurnik M & Wolf-Watz H (1991) The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **5**: 977-986.
- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A & Korkeala H (2006) Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**: 315-329.
- Freund S, Czech B, Trulzsch K, Ackermann N & Heesemann J (2008) Unusual, Virulence Plasmid-Dependent Growth Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Three-Dimensional Collagen Gels. *Journal of Bacteriology* **190**: 4111-4120.
- Gallant CV, Daniels C, Leung JM, Ghosh AS, Young KD, Kotra LP & Burrows LL (2005) Common β -lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Molecular Microbiology* **58**: 1012-1024.
- Galyov EE, Hakansson S, Forsberg A & Wolf-Watz H (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730-732.
- Genest O, Seduk F, Theraulaz L, Mejean V & Iobbi-Nivol C (2006) Chaperone protection of immature molybdoenzyme during molybdenum cofactor limitation. *FEMS Microbiol Lett* **265**: 51-55.
- Genest O, Seduk F, Ilbert M, Mejean V & Iobbi-Nivol C (2006) Signal peptide protection by specific chaperone. *Biochem Biophys Res Commun* **339**: 991-995.
- Ghosh P (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 771-795.
- Ghuysen JM (1991) Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* **45**: 37-67.
- Ghuysen JM (1994) Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol* **2**: 372-380.
- Gitai Z, Dye N & Shapiro L (2004) An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8643-8648.
- Gitai Z, Dye NA, Reisenauer A, Wachi M & Shapiro L (2005) MreB Actin-Mediated Segregation of a Specific Region of a Bacterial Chromosome. *Cell* **120**: 329-341.
- Gophna U, Ron EZ & Graur D (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**: 151-163.
- Goss JW, Sorg JA, Ramamurthi KS, Ton-That H & Schneewind O (2004) The secretion signal of YopN, a regulatory protein of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion pathway. *J Bacteriol* **186**: 6320-6324.
- Goure J, Broz P, Attree O, Cornelis GR & Attree I (2005) Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis* **192**: 218-225.
- Green DW (2002) The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin Ther Targets* **6**: 1-19.

LITERATURVERZEICHNIS

- Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP & Cornelis GR (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* **70**: 4165-4176.
- Hakansson S, Bergman T, Vanooteghem JC, Cornelis G & Wolf-Watz H (1993) YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infect Immun* **61**: 71-80.
- Halbig D, Hou B, Freudl R, Sprenger GA & Klosgen RB (1999) Bacterial proteins carrying twin-R signal peptides are specifically targeted by the delta pH-dependent transport machinery of the thylakoid membrane system. *FEBS Lett* **447**: 95-98.
- Halbig D, Wiegert T, Blaudeck N, Freudl R & Sprenger GA (1999) The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding. *Eur J Biochem* **263**: 543-551.
- Hamid N, Gustavsson A, Andersson K, McGee K, Persson C, Rudd CE & Fallman M (1999) YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb Pathog* **27**: 231-242.
- Hamilton-Miller JM (2008) Development of the semi-synthetic penicillins and cephalosporins. *Int J Antimicrob Agents* **31**: 189-192.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hatzixanthis K, Richardson DJ & Sargent F (2005) Chaperones involved in assembly and export of N-oxide reductases. *Biochem Soc Trans* **33**: 124-126.
- Hatzixanthis K, Clarke TA, Oubrie A, Richardson DJ, Turner RJ & Sargent F (2005) Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8460-8465.
- Hayashidani H, Ohtomo Y, Toyokawa Y, *et al.* (1995) Sources of sporadic human infection with *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 in Aomori Prefecture, Japan. *Contrib Microbiol Immunol* **13**: 29-32.
- Heesemann J & Gaede K (1989) Mechanisms involved in the pathogenesis of *Yersinia* infections. *Rheumatol Int* **9**: 213-217.
- Heesemann J, Algermissen B & Laufs R (1984) Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **46**: 105-110.
- Heesemann J, Sing A & Trulzsch K (2006) *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol* **9**: 55-61.
- Heesemann J, Keller C, Morawa R, Schmidt N, Siemens HJ & Laufs R (1983) Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* **147**: 107-115.
- Henderson TA, Young KD, Denome SA & Elf PK (1997) AmpC and AmpH, proteins related to the class C beta-lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 6112-6121.
- Herzberg O (1991) Refined crystal structure of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **217**: 701-719.
- Herzberg O & Moulton J (1987) Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: crystal structure of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5 Å resolution. *Science* **236**: 694-701.
- Higuchi K, Kupferberg LL & Smith JL (1959) Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. III. Effects of calcium ions on the growth of virulent and avirulent strains of *Pasteurella pestis*. *J Bacteriol* **77**: 317-321.
- Hill D, Rose B, Pajkos A, *et al.* (2005) Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* **43**: 5085-5090.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hinsley AP, Stanley NR, Palmer T & Berks BC (2001) A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett* **497**: 45-49.
- Hoiczky E & Blobel G (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4669-4674.
- Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A & Heesemann J (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**: 5989-5999.
- Holland IB, Schmitt L & Young J (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* **22**: 29-39.
- Holmstrom A, Olsson J, Cherepanov P, *et al.* (2001) LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* **39**: 620-632.
- Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Ilbert M, Mejean V, Giudici-Ortoni MT, Samama JP & Iobbi-Nivol C (2003) Involvement of a mate chaperone (TorD) in the maturation pathway of molybdoenzyme TorA. *J Biol Chem* **278**: 28787-28792.
- Iriarte M & Cornelis GR (1996) Molecular determinants of *Yersinia* pathogenesis. *Microbiologia* **12**: 267-280.
- Iriarte M & Cornelis GR (1998) YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* **29**: 915-929.
- Iriarte M & Cornelis GR (1999) Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia* yop virulon. *J Bacteriol* **181**: 675-680.
- Iriarte M, Sory MP, Boland A, Boyd AP, Mills SD, Lambermont I & Cornelis GR (1998) TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J* **17**: 1907-1918.
- Isberg RR (1990) Pathways for the penetration of enteroinvasive *Yersinia* into mammalian cells. *Mol Biol Med* **7**: 73-82.
- Ito K, Akiyama Y, Yura T & Shiba K (1986) Diverse effects of the MalE-LacZ hybrid protein on *Escherichia coli* cell physiology. *J Bacteriol* **167**: 201-204.
- Iwai N, Nagai K & Wachi M (2002) Novel S-benzylisothiourea compound that induces spherical cells in *Escherichia coli* probably by acting on a rod-shape-determining protein(s) other than penicillin-binding protein 2. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 2658-2662.
- Izaki K, Matsushashi M & Strominger JL (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. 8. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **243**: 3180-3192.
- Ize B, x000E, reng, re, rard F & Wu L-F (2002) In vivo assessment of the Tat signal peptide specificity in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* **178**: 548-553.
- Jack RL, Sargent F, Berks BC, Sawers G & Palmer T (2001) Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *J Bacteriol* **183**: 1801-1804.
- Jackson MW & Plano GV (2000) Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 85-90.
- Jackson MW, Day JB & Plano GV (1998) YscB of *Yersinia pestis* functions as a specific chaperone for YopN. *J Bacteriol* **180**: 4912-4921.
- Jacobi CA, Roggenkamp A, Rakin A, Zumbihl R, Leitritz L & Heesemann J (1998) In vitro and in vivo expression studies of yopE from *Yersinia enterocolitica* using the gfp reporter gene. *Mol Microbiol* **30**: 865-882.

LITERATURVERZEICHNIS

- Jarvis KG, Giron JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS & Kaper JB (1995) Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7996-8000.
- Jaspers MC, Meier C, Zehnder AJ, Harms H & van der Meer JR (2001) Measuring mass transfer processes of octane with the help of an alkSalkB::gfp-tagged *Escherichia coli*. *Environ Microbiol* **3**: 512-524.
- Jaurin B, Forsman M & Haggstrom B (1988) Beta-lactamase genes of *Streptomyces badius*, *Streptomyces cacaoi* and *Streptomyces fradiae*: cloning and expression in *Streptomyces lividans*. *Biochim Biophys Acta* **949**: 288-296.
- Jaurin B, Grundstrom T, Edlund T & Normark S (1981) The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* **290**: 221-225.
- Jelsch C, Lenfant F, Masson JM & Samama JP (1992) Beta-lactamase TEM1 of *E. coli*. Crystal structure determination at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett* **299**: 135-142.
- Jelsch C, Mourey L, Masson JM & Samama JP (1993) Crystal structure of *Escherichia coli* TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins* **16**: 364-383.
- Joly JC & Wickner W (1993) The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *EMBO J* **12**: 255-263.
- Jones LJ, Carballido-Lopez R & Errington J (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- Juris SJ, Rudolph AE, Huddler D, Orth K & Dixon JE (2000) A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9431-9436.
- Kaniga K, Trollinger D & Galan JE (1995) Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. *J Bacteriol* **177**: 7078-7085.
- Kather I, Jakob RP, Dobbek H & Schmid FX (2008) Increased Folding Stability of TEM-1 β -Lactamase by In Vitro Selection. *Journal of Molecular Biology* **383**: 238-251.
- Kentner D & Sourjik V (2006) Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. *Curr Opin Microbiol* **9**: 619-624.
- Kiino DR, Phillips GJ & Silhavy TJ (1990) Increased expression of the bifunctional protein PrIF suppresses overproduction lethality associated with exported beta-galactosidase hybrid proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 185-192.
- Kim JF, Wei ZM & Beer SV (1997) The *hrpA* and *hrpC* operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin. *J Bacteriol* **179**: 1690-1697.
- Knott-Hunziker V, Petursson S, Jayatilake GS, Waley SG, Jaurin B & Grundstrom T (1982) Active sites of beta-lactamases. The chromosomal beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Biochem J* **201**: 621-627.
- Knox JR & Moews PC (1991) Beta-lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C. Refinement at 2 Å resolution and analysis of hydration. *J Mol Biol* **220**: 435-455.
- Knox JR, Moews PC & Frere JM (1996) Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. *Chem Biol* **3**: 937-947.
- Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, et al. (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4678-4683.
- Koberle M, Klein-Gunther A, Schutz M, et al. (2009) *Yersinia enterocolitica* targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model. *PLoS Pathog* **5**: e1000551.
- Kong KF, Schneper L & Mathee K (2010) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis* **118**: 1-36.
- Kopp U, Wiedemann B, Lindquist S & Normark S (1993) Sequences of wild-type and mutant *ampD* genes of *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 224-228.

LITERATURVERZEICHNIS

- Korfmann G & Wiedemann B (1988) Genetic control of beta-lactamase production in *Enterobacter cloacae*. *Rev Infect Dis* **10**: 793-799.
- Kostecki JS, Li H, Turner RJ & DeLisa MP (2010) Visualizing interactions along the *Escherichia coli* twin-arginine translocation pathway using protein fragment complementation. *PLoS One* **5**: e9225.
- Koster M, Bitter W, de Cock H, Allaoui A, Cornelis GR & Tommassen J (1997) The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* **26**: 789-797.
- Kreutzenbeck P, Kroger C, Lausberg F, Blaudeck N, Sprenger GA & Freudl R (2007) *Escherichia coli* twin arginine (Tat) mutant translocases possessing relaxed signal peptide recognition specificities. *J Biol Chem* **282**: 7903-7911.
- Kruse T, Møller-Jensen J, Lobner-Olesen A & Gerdes K (2003) Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J* **22**: 5283-5292.
- Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, *et al.* (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Kupferberg LL & Higuchi K (1958) Role of calcium ions in the stimulation of growth of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *J Bacteriol* **76**: 120-121.
- Kusters I & Driessen AJ (2011) SecA, a remarkable nanomachine. *Cell Mol Life Sci* **68**: 2053-2066.
- Kuzin AP, Nukaga M, Nukaga Y, Hujer AM, Bonomo RA & Knox JR (1999) Structure of the SHV-1 beta-lactamase. *Biochemistry* **38**: 5720-5727.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lam H, Oh DC, Cava F, Takacs CN, Clardy J, de Pedro MA & Waldor MK (2009) D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* **325**: 1552-1555.
- Laminet AA & Pluckthun A (1989) The precursor of beta-lactamase: purification, properties and folding kinetics. *EMBO J* **8**: 1469-1477.
- Laminet AA, Kumamoto CA & Pluckthun A (1991) Folding in vitro and transport in vivo of pre-beta-lactamase are SecB independent. *Mol Microbiol* **5**: 117-122.
- Lavander M, Ericsson SK, Broms JE & Forsberg A (2006) The twin arginine translocation system is essential for virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **74**: 1768-1776.
- Lee VT & Schneewind O (2002) Yop fusions to tightly folded protein domains and their effects on *Yersinia enterocolitica* type III secretion. *J Bacteriol* **184**: 3740-3745.
- Lee VT, Mazmanian SK & Schneewind O (2001) A program of *Yersinia enterocolitica* type III secretion reactions is activated by specific signals. *J Bacteriol* **183**: 4970-4978.
- Lemaitre BC, Mazigh DA & Scavizzi MR (1991) Failure of beta-lactam antibiotics and marked efficacy of fluoroquinolones in treatment of murine *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 1785-1790.
- Letzelter M, Sorg I, Mota LJ, *et al.* (2006) The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J* **25**: 3223-3233.
- Leung KY, Reisner BS & Straley SC (1990) YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* **58**: 3262-3271.
- Livermore DM & Woodford N (2000) Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* **3**: 489-495.
- Lloyd SA, Norman M, Rosqvist R & Wolf-Watz H (2001) *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol* **39**: 520-531.
- Lloyd SA, Forsberg A, Wolf-Watz H & Francis MS (2001) Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol* **9**: 367-371.

LITERATURVERZEICHNIS

- Locher M, Lehnert B, Krauss K, Heesemann J, Groll M & Wilharm G (2005) Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *J Biol Chem* **280**: 31149-31155.
- Maddock JR, Alley MR & Shapiro L (1993) Polarized cells, polar actions. *J Bacteriol* **175**: 7125-7129.
- Majiduddin FK, Materon IC & Palzkill TG (2002) Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int J Med Microbiol* **292**: 127-137.
- Manting EH & Driessen AJ (2000) Escherichia coli translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**: 226-238.
- Marlovits TC & Stebbins CE (2010) Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr Opin Microbiol* **13**: 47-52.
- Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ & Jacoby GA (1996) In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 342-348.
- Maskos K, Huber-Wunderlich M & Glockshuber R (2003) DsbA and DsbC-catalyzed oxidative folding of proteins with complex disulfide bridge patterns in vitro and in vivo. *J Mol Biol* **325**: 495-513.
- Matouschek A (2003) Protein unfolding--an important process in vivo? *Curr Opin Struct Biol* **13**: 98-109.
- McCann JR, McDonough JA, Pavelka MS & Braunstein M (2007) beta-Lactamase can function as a reporter of bacterial protein export during *Mycobacterium tuberculosis* infection of host cells. *Microbiology* **153**: 3350-3359.
- McDonald C, Vacratsis PO, Bliska JB & Dixon JE (2003) The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* **278**: 18514-18523.
- McDonough JA, Hacker KE, Flores AR, Pavelka MS & Braunstein M (2005) The Twin-Arginine Translocation Pathway of *Mycobacterium smegmatis* Is Functional and Required for the Export of Mycobacterial β -Lactamases. *Journal of Bacteriology* **187**: 7667-7679.
- Meissner D, Vollstedt A, van Dijl JM & Freudl R (2007) Comparative analysis of twin-arginine (Tat)-dependent protein secretion of a heterologous model protein (GFP) in three different Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 633-642.
- Michiels T, Vanooteghem JC, Lambert de Rouvroit C, China B, Gustin A, Boudry P & Cornelis GR (1991) Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **173**: 4994-5009.
- Minamino T & Namba K (2008) Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**: 485-488.
- Mittal R, Peak-Chew SY & McMahon HT (2006) Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18574-18579.
- Montagner C, Arquint C & Cornelis GR (2011) Translocators YopB and YopD from *Yersinia enterocolitica* Form a Multimeric Integral Membrane Complex in Eukaryotic Cell Membranes. *J Bacteriol* **193**: 6923-6928.
- Moran-Barrio J, Limansky AS & Viale AM (2009) Secretion of GOB metallo-beta-lactamase in *Escherichia coli* depends strictly on the cooperation between the cytoplasmic DnaK chaperone system and the Sec machinery: completion of folding and Zn(II) ion acquisition occur in the bacterial periplasm. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2908-2917.
- Mori H (2002) A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid DeltapH/Tat translocase. *The Journal of Cell Biology* **157**: 205-210.

LITERATURVERZEICHNIS

- Morita-Ishihara T, Ogawa M, Sagara H, Yoshida M, Katayama E & Sasakawa C (2006) Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem* **281**: 599-607.
- Moya B, Dotsch A, Juan C, Blazquez J, Zamorano L, Haussler S & Oliver A (2009) Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog* **5**: e1000353.
- Mueller CA, Broz P, Muller SA, *et al.* (2005) The V-antigen of Yersinia forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* **310**: 674-676.
- Mukherjee S, Keitany G, Li Y, Wang Y, Ball HL, Goldsmith EJ & Orth K (2006) Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**: 1211-1214.
- Muller M & Klosgen RB (2005) The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review). *Mol Membr Biol* **22**: 113-121.
- Muytjens HL & van der Ros-van de Repe J (1982) Comparative activities of 13 beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **21**: 925-934.
- Natale P, Brüser T & Driessen AJM (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**: 1735-1756.
- Navarro L, Koller A, Nordfelth R, Wolf-Watz H, Taylor S & Dixon JE (2007) Identification of a molecular target for the Yersinia protein kinase A. *Mol Cell* **26**: 465-477.
- Neubauer H, Sprague LD, Scholz H & Hensel A (2001) [Diagnosis of Yersinia enterocolitica infections: a review on classical identification techniques and new molecular biological methods]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **114**: 1-7.
- Neubauer H, Aleksic S, Hensel A, Finke EJ & Meyer H (2000) Yersinia enterocolitica 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol* **290**: 61-64.
- Neuhaus K, Anastasov N, Kabardin V, Francis KP, Miller VL & Scherer S (2003) The AGUAAA motif in cspA1/A2 mRNA is important for adaptation of Yersinia enterocolitica to grow at low temperature. *Mol Microbiol* **50**: 1629-1645.
- Neyt C & Cornelis GR (1999) Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by Yersinia enterocolitica: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* **33**: 971-981.
- Neyt C & Cornelis GR (1999) Role of SycD, the chaperone of the Yersinia Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol* **31**: 143-156.
- Nichols WW (1987) The time course of hydrolysis of a beta-lactam antibiotic by intact gram-negative bacteria possessing a periplasmic beta-lactamase. *Biochem J* **244**: 509-513.
- Nielsen JB & Lampen JO (1982) Membrane-bound penicillinases in Gram-positive bacteria. *J Biol Chem* **257**: 4490-4495.
- Ochsner UA, Snyder A, Vasil AI & Vasil ML (2002) Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8312-8317.
- Oellerich MF, Jacobi CA, Freund S, Niedung K, Bach A, Heesemann J & Trulzsch K (2007) Yersinia enterocolitica infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect Immun* **75**: 3802-3811.
- Olsson O, Bergstrom S, Lindberg FP & Normark S (1983) ampC beta-lactamase hyperproduction in Escherichia coli: natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from Shigella. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 7556-7560.
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY & Remington SJ (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392-1395.
- Orth K, Palmer LE, Bao ZQ, Stewart S, Rudolph AE, Bliska JB & Dixon JE (1999) Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* **285**: 1920-1923.

LITERATURVERZEICHNIS

- Osborne AR, Rapoport TA & van den Berg B (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 529-550.
- Paetzel M, Karla A, Strynadka NC & Dalbey RE (2002) Signal peptidases. *Chem Rev* **102**: 4549-4580.
- Palmer LE, Hobbie S, Galan JE & Bliska JB (1998) YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* **27**: 953-965.
- Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA & Bonomo RA (2011) Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Parsot C, Hamiaux C & Page AL (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**: 7-14.
- Paul K, Erhardt M, Hirano T, Blair DF & Hughes KT (2008) Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* **451**: 489-492.
- Pepe JC & Miller VL (1993) *Yersinia enterocolitica* invasins: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6473-6477.
- Pereira SG, Paixao J, Leitao R & Cardoso O (2011) *Pseudomonas aeruginosa* in a hydrophobic facility: diversity, susceptibility and imipenem resistance mutation. *Lett Appl Microbiol* **53**: 518-524.
- Perez-Rodriguez R, Fisher AC, Perlmutter JD, *et al.* (2007) An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway. *J Mol Biol* **367**: 715-730.
- Perry RD, Balbo PB, Jones HA, Fetherston JD & DeMoll E (1999) Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology* **145 (Pt 5)**: 1181-1190.
- Persson C, Carballeira N, Wolf-Watz H & Fallman M (1997) The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* **16**: 2307-2318.
- Persson C, Nordfelth R, Holmstrom A, Hakansson S, Rosqvist R & Wolf-Watz H (1995) Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. *Mol Microbiol* **18**: 135-150.
- Pham JN & Bell SM (1992) Beta-lactamase induction by imipenem in *Yersinia enterocolitica*. *Pathology* **24**: 201-204.
- Pham JN, Bell SM & Lanzarone JY (1991) A study of the beta-lactamases of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J Antimicrob Chemother* **28**: 19-24.
- Pham JN, Bell SM, Martin L & Carniel E (2000) The beta-lactamases and beta-lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*. *J Antimicrob Chemother* **46**: 951-957.
- Plano GV & Straley SC (1993) Multiple effects of IcrD mutations in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **175**: 3536-3545.
- Plano GV & Straley SC (1995) Mutations in yscC, yscD, and yscG prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **177**: 3843-3854.
- Podladchikova O, Antonenka U, Heesemann J & Rakin A (2011) *Yersinia pestis* autoagglutination factor is a component of the type six secretion system. *Int J Med Microbiol*.
- Pohlner J, Halter R & Meyer TF (1987) *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Secretion and implications for pathogenesis. *Antonie Van Leeuwenhoek* **53**: 479-484.
- Pohlschroder M, Prinz WA, Hartmann E & Beckwith J (1997) Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* **91**: 563-566.
- Portnoy DA & Martinez RJ (1985) Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. *Curr Top Microbiol Immunol* **118**: 29-51.

LITERATURVERZEICHNIS

- Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS & Fritsche TR (2003) NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis* **9**: 999-1002.
- Pradel N (2003) Influence of tat mutations on the ribose-binding protein translocation in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **306**: 786-791.
- Pradel N, Delmas J, Wu LF, Santini CL & Bonnet R (2008) Sec- and Tat-Dependent Translocation of β -Lactamases across the *Escherichia coli* Inner Membrane. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 242-248.
- Prehna G, Ivanov MI, Bliska JB & Stebbins CE (2006) *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* **126**: 869-880.
- Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, *et al.* (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1528-1533.
- Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, *et al.* (2000) SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3035-3039.
- Ramamurthi KS & Schneewind O (2002) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: mutational analysis of the yopQ secretion signal. *J Bacteriol* **184**: 3321-3328.
- Ramamurthi KS & Schneewind O (2003) Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. *Mol Microbiol* **50**: 1095-1102.
- Ramamurthi KS & Schneewind O (2003) *Yersinia* yopQ mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. *Mol Microbiol* **50**: 1189-1198.
- Ramamurthi KS & Schneewind O (2005) A synonymous mutation in *Yersinia enterocolitica* yopE affects the function of the YopE type III secretion signal. *J Bacteriol* **187**: 707-715.
- Raquet X, Lounnas V, Lamotte-Brasseur J, Frere JM & Wade RC (1997) pKa calculations for class A β -lactamases: methodological and mechanistic implications. *Biophys J* **73**: 2416-2426.
- Raskin DM & de Boer PA (1999) MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 6419-6424.
- Ray N, Nenninger A, Mullineaux CW & Robinson C (2005) Location and mobility of twin arginine translocase subunits in the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Biol Chem* **280**: 17961-17968.
- Repaske R (1958) Lysis of gram-negative organisms and the role of versene. *Biochim Biophys Acta* **30**: 225-232.
- Rhazi N, Galleni M, Page MI & Frere JM (1999) Peptidase activity of β -lactamases. *Biochem J* **341** (Pt 2): 409-413.
- Richmond MH & Sykes RB (1973) The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* **9**: 31-88.
- Rimpilainen M, Forsberg A & Wolf-Watz H (1992) A novel protein, LcrQ, involved in the low-calcium response of *Yersinia pseudotuberculosis* shows extensive homology to YopH. *J Bacteriol* **174**: 3355-3363.
- Robinson C & Bolhuis A (2001) Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 350-356.
- Robinson C & Bolhuis A (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 135-147.
- Rodgers L, Gamez A, Riek R & Ghosh P (2008) The Type III Secretion Chaperone SycE Promotes a Localized Disorder-to-Order Transition in the Natively Unfolded Effector YopE. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 20857-20863.
- Rodrigue A, Chanal A, Beck K, Muller M & Wu LF (1999) Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J Biol Chem* **274**: 13223-13228.

LITERATURVERZEICHNIS

- Roggenkamp A, Neuberger HR, Flugel A, Schmoll T & Heesemann J (1995) Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**: 1207-1219.
- Roggenkamp A, Ruckdeschel K, Leitritz L, Schmitt R & Heesemann J (1996) Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* **64**: 2506-2514.
- Rose RW, Bruser T, Kissinger JC & Pohlschroder M (2002) Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol* **45**: 943-950.
- Rosqvist R, Magnusson KE & Wolf-Watz H (1994) Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* **13**: 964-972.
- Rossier O & Cianciotto NP (2005) The *Legionella pneumophila* tatB gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infect Immun* **73**: 2020-2032.
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S & Heesemann J (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* **64**: 724-733.
- Ruckdeschel K, Harb S, Roggenkamp A, *et al.* (1998) *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* **187**: 1069-1079.
- Ruckdeschel K, Machold J, Roggenkamp A, *et al.* (1997) *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production. *J Biol Chem* **272**: 15920-15927.
- Russel M (1998) Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol* **279**: 485-499.
- Sanders C, Wethkamp N & Lill H (2001) Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial Tat protein translocation system. *Mol Microbiol* **41**: 241-246.
- Sanschagrin F, Bejaoui N & Levesque RC (1998) Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1966-1972.
- Sansonetti PJ, Kopecko DJ & Formal SB (1982) Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **35**: 852-860.
- Santini CL (2000) Translocation of Jellyfish Green Fluorescent Protein via the Tat System of *Escherichia coli* and Change of Its Periplasmic Localization in Response to Osmotic Up-shock. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 8159-8164.
- Santini CL, Ize B, Chanal A, Muller M, Giordano G & Wu LF (1998) A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J* **17**: 101-112.
- Sargent F, Berks BC & Palmer T (2002) Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein-transport system. *Arch Microbiol* **178**: 77-84.
- Sargent F, Gohlke U, De Leeuw E, Stanley NR, Palmer T, Saibil HR & Berks BC (2001) Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. *Eur J Biochem* **268**: 3361-3367.
- Saunders JR, Hart CA & Saunders VA (1986) Plasmid-mediated resistance to beta-lactam antibiotics in gram-negative bacteria: the role of in-vivo recyclization reactions in plasmid evolution. *J Antimicrob Chemother* **18 Suppl C**: 57-66.
- Sauvage E, Fonce E, Quinting B, Galleni M, Frere JM & Charlier P (2006) Crystal Structure of the *Mycobacterium fortuitum* Class A -Lactamase: Structural Basis for Broad Substrate Specificity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**: 2516-2521.

LITERATURVERZEICHNIS

- Scavizzi MR, Alonso JM, Philippon AM, Jugeau-Vessieres AM & Guiyole A (1987) Failure of newer beta-lactam antibiotics for murine *Yersinia enterocolitica* infection. *Antimicrob Agents Chemother* **31**: 523-526.
- Scheffers DJ & Pinho MG (2005) Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 585-607.
- Scheffers DJ, Jones LJ & Errington J (2004) Several distinct localization patterns for penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **51**: 749-764.
- Schell MA, Ulrich RL, Ribot WJ, *et al.* (2007) Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Mol Microbiol* **64**: 1466-1485.
- Schesser K, Spiik AK, Dukuzumuremyi JM, Neurath MF, Pettersson S & Wolf-Watz H (1998) The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* **28**: 1067-1079.
- Schiebel E, Driessen AJ, Hartl FU & Wickner W (1991) Delta mu H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* **64**: 927-939.
- Schlapschy M & Skerra A (2011) Periplasmic chaperones used to enhance functional secretion of proteins in *E. coli*. *Methods Mol Biol* **705**: 211-224.
- Schleifer KH & Kandler O (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**: 407-477.
- Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E & Heesemann J (1998) Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* **66**: 480-485.
- Schultz SC, Dalbadie-McFarland G, Neitzel JJ & Richards JH (1987) Stability of wild-type and mutant RTEM-1 beta-lactamases: effect of the disulfide bond. *Proteins* **2**: 290-297.
- Sedgwick AK & Tilton RC (1971) Biochemical and serological characteristics of a *Yersinia enterocolitica* isolate. *Appl Microbiol* **21**: 383-384.
- Settles AM, Yonetani A, Baron A, Bush DR, Cline K & Martienssen R (1997) Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* **278**: 1467-1470.
- Shao F, Merritt PM, Bao Z, Innes RW & Dixon JE (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**: 575-588.
- Shao F, Vacratsis PO, Bao Z, Bowers KE, Fierke CA & Dixon JE (2003) Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 904-909.
- Shi ZY, Wang H, Gu L, *et al.* (2007) Pleiotropic effect of tatC mutation on metabolism of pathogen *Yersinia enterocolitica*. *Biomed Environ Sci* **20**: 445-449.
- Skryzpek E & Straley SC (1993) LcrG, a secreted protein involved in negative regulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **175**: 3520-3528.
- Skryzpek E, Cowan C & Straley SC (1998) Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* **30**: 1051-1065.
- Skurnik M, Bolin I, Heikkinen H, Piha S & Wolf-Watz H (1984) Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* **158**: 1033-1036.
- Smith H, Bron S, Van Ee J & Venema G (1987) Construction and use of signal sequence selection vectors in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **169**: 3321-3328.
- Snyder WB & Silhavy TJ (1995) Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 953-963.
- Sorg I, Goehring UM, Aktories K & Schmidt G (2001) Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infect Immun* **69**: 7535-7543.
- Sorg JA, Miller NC & Schneewind O (2005) Substrate recognition of type III secretion machines--testing the RNA signal hypothesis. *Cell Microbiol* **7**: 1217-1225.

LITERATURVERZEICHNIS

- Sorg JA, Blaylock B & Schneewind O (2006) Secretion signal recognition by YscN, the Yersinia type III secretion ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16490-16495.
- Sorg JA, Miller NC, Marketon MM & Schneewind O (2005) Rejection of impassable substrates by Yersinia type III secretion machines. *J Bacteriol* **187**: 7090-7102.
- Sory MP & Cornelis GR (1994) Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from Yersinia enterocolitica into HeLa cells. *Mol Microbiol* **14**: 583-594.
- Sory MP, Boland A, Lambermont I & Cornelis GR (1995) Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the cyaA gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11998-12002.
- Sougakoff W, L'Hermite G, Pernet L, *et al.* (2002) Structure of the imipenem-hydrolyzing class A beta-lactamase SME-1 from Serratia marcescens. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 267-274.
- Stainier I, Iriarte M & Cornelis GR (1997) YscM1 and YscM2, two Yersinia enterocolitica proteins causing downregulation of yop transcription. *Mol Microbiol* **26**: 833-843.
- Stanley NR, Palmer T & Berks BC (2000) The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in Escherichia coli. *J Biol Chem* **275**: 11591-11596.
- Stanley NR, Sargent F, Buchanan G, Shi J, Stewart V, Palmer T & Berks BC (2002) Behaviour of topological marker proteins targeted to the Tat protein transport pathway. *Mol Microbiol* **43**: 1005-1021.
- Stock I & Wiedemann B (2000) Natural beta-lactam susceptibility and mechanisms of beta-lactam resistance in Yersinia enterocolitica. *Reviews in Medical Microbiology* **11**: 197-210.
- Stock I, Heisig P & Wiedemann B (1999) Expression of beta-lactamases in Yersinia enterocolitica strains of biovars 2, 4 and 5. *J Med Microbiol* **48**: 1023-1027.
- Stock I, Heisig P & Wiedemann B (2000) Beta-lactamase expression in Yersinia enterocolitica biovars 1A, 1B, and 3. *J Med Microbiol* **49**: 403-408.
- Straley SC & Perry RD (1995) Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in Yersinia. *Trends Microbiol* **3**: 310-317.
- Suarez G, Sierra JC, Sha J, *et al.* (2008) Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of Aeromonas hydrophila. *Microb Pathog* **44**: 344-361.
- Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH & Itakura K (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6613-6617.
- Sun P, Tropea JE, Austin BP, Cherry S & Waugh DS (2008) Structural characterization of the Yersinia pestis type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. *J Mol Biol* **377**: 819-830.
- Sutcliffe JG (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of Escherichia coli plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 3737-3741.
- Takao T, Tominaga N, Shimonishi Y, Hara S, Inoue T & Miyama A (1984) Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by Yersinia enterocolitica. *Biochem Biophys Res Commun* **125**: 845-851.
- Tampakaki AP, Fadoulglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ & Kokkinidis M (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**: 805-816.
- Thanassi DG & Hultgren SJ (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 420-430.
- Thiem S, Kentner D & Sourjik V (2007) Positioning of chemosensory clusters in E. coli and its relation to cell division. *EMBO J* **26**: 1615-1623.
- Thomas JD, Daniel RA, Errington J & Robinson C (2001) Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **39**: 47-53.

LITERATURVERZEICHNIS

- Thomson NR, Howard S, Wren BW, *et al.* (2006) The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet* **2**: e206.
- Tipper DJ & Strominger JL (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**: 1133-1141.
- Tomasz A (1979) The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol* **33**: 113-137.
- Tomassen J (2010) Assembly of outer-membrane proteins in bacteria and mitochondria. *Microbiology* **156**: 2587-2596.
- Tomassen J, Leunissen J, van Damme-Jongsten M & Overduin P (1985) Failure of *E. coli* K-12 to transport PhoE-LacZ hybrid proteins out of the cytoplasm. *EMBO J* **4**: 1041-1047.
- Trasak C, Zenner G, Vogel A, *et al.* (2007) *Yersinia* protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process. *J Biol Chem* **282**: 2268-2277.
- Troisfontaines P & Cornelis GR (2005) Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* **20**: 326-339.
- Trosky JE, Liverman AD & Orth K (2008) *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* **10**: 557-565.
- Trulzsch K, Roggenkamp A, Aepfelbacher M, Wilharm G, Ruckdeschel K & Heesemann J (2003) Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int J Med Microbiol* **293**: 167-177.
- Tuomanen E & Cozens R (1987) Changes in peptidoglycan composition and penicillin-binding proteins in slowly growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 5308-5310.
- Turner RJ, Papish AL & Sargent F (2004) Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Can J Microbiol* **50**: 225-238.
- van der Wolk JP, de Wit JG & Driessen AJ (1997) The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J* **16**: 7297-7304.
- Vanhove M, Guillaume G, Ledent P, Richards JH, Pain RH & Frere JM (1997) Kinetic and thermodynamic consequences of the removal of the Cys-77-Cys-123 disulphide bond for the folding of TEM-1 beta-lactamase. *Biochem J* **321 (Pt 2)**: 413-417.
- Ventura S & Villaverde A (2006) Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol* **24**: 179-185.
- Viboud GI & Bliska JB (2005) *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **59**: 69-89.
- Viboud GI, Mejia E & Bliska JB (2006) Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Cell Microbiol* **8**: 1504-1515.
- Voulhoux R, Filloux A & Schalk IJ (2006) Pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: the Tat system is required for PvdN but not for FpvA transport. *J Bacteriol* **188**: 3317-3323.
- Voulhoux R, Ball G, Ize B, Vasil ML, Lazdunski A, Wu LF & Filloux A (2001) Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J* **20**: 6735-6741.
- Wachi M, Doi M, Tamaki S, Park W, Nakajima-Iijima S & Matsubashi M (1987) Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 4935-4940.
- Wattiau P & Cornelis GR (1993) SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ohe secretion of YopE. *Mol Microbiol* **8**: 123-131.

LITERATURVERZEICHNIS

- Wattiau P, Bernier B, Deslee P, Michiels T & Cornelis GR (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10493-10497.
- Wauters G (1979) Carriage of *Yersinia enterocolitica* serotype 3 by pigs as a source of human infection. *Contrib Microbiol Immunol* **5**: 249-252.
- Wauters G, Kandolo K & Janssens M (1987) Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 14-21.
- Weber B, Hasic M, Chen C, Wai SN & Milton DL (2009) Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. *Environ Microbiol* **11**: 3018-3028.
- Wexler M, Sargent F, Jack RL, *et al.* (2000) TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J Biol Chem* **275**: 16717-16722.
- Wickner W, Driessen AJ & Hartl FU (1991) The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu Rev Biochem* **60**: 101-124.
- Wiegert T, Sahm H & Sprenger GA (1996) Export of the periplasmic NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Arch Microbiol* **166**: 32-41.
- Wilharm G, Dittmann S, Schmid A & Heesemann J (2007) On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int J Med Microbiol* **297**: 27-36.
- Wilharm G, Lehmann V, Neumayer W, Trcek J & Heesemann J (2004) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: evidence for the ability to transport proteins that are folded prior to secretion. *BMC Microbiol* **4**: 27.
- Wilharm G, Lehmann V, Krauss K, *et al.* (2004) *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect Immun* **72**: 4004-4009.
- Williams AW & Straley SC (1998) YopD of *Yersinia pestis* plays a role in negative regulation of the low-calcium response in addition to its role in translocation of Yops. *J Bacteriol* **180**: 350-358.
- Wise EM, Jr. & Park JT (1965) Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**: 75-81.
- Woestyn S, Allaoui A, Wattiau P & Cornelis GR (1994) YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol* **176**: 1561-1569.
- Woestyn S, Sory MP, Boland A, Lequenne O & Cornelis GR (1996) The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol* **20**: 1261-1271.
- Wolf-Watz H, von Pawel-Rammingen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K & Rosqvist R (2000) GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Molecular Microbiology* **36**: 737-748.
- Wolke S, Ackermann N & Heesemann J (2011) The *Yersinia enterocolitica* type 3 secretion system (T3SS) as toolbox for studying the cell biological effects of bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins. *Cell Microbiol* **13**: 1339-1357.
- Xu Y, Weng CL, Narayanan N, *et al.* (2005) Chaperone-mediated folding and maturation of the penicillin acylase precursor in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6247-6253.
- Yamamoto S & Lampen JO (1976) The hydrophobic membrane penicillinase of *Bacillus licheniformis* 749/C. Characterization of the hydrophilic enzyme and phospholipopeptide produced by trypsin cleavage. *J Biol Chem* **251**: 4102-4110.
- Yen MR, Tseng YH, Nguyen EH, Wu LF & Saier MH, Jr. (2002) Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch Microbiol* **177**: 441-450.
- Yip CK, Kimbrough TG, Felise HB, *et al.* (2005) Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**: 702-707.

LITERATURVERZEICHNIS

- Zhang ZY, Clemens JC, Schubert HL, *et al.* (1992) Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **267**: 23759-23766.
- Zumbihl R, Aepfelbacher M, Andor A, Jacobi CA, Ruckdeschel K, Rouot B & Heesemann J (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.
- Zupan JR, Ward D & Zambryski P (1998) Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Curr Opin Microbiol* **1**: 649-655.

7 Anhang

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Eva-Maria Schriefer
Geburtsdatum: 04.03.1983
Geburtsort: Coburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

seit April 2008

Dissertation

Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Bakteriologie im Max von Pettenkofer-
Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

Betreuer: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Prof. J. Kreft

Titel: Molekulare und biochemische
Charakterisierung der β -Laktamasen von
Yersinia enterocolitica und deren
Sekretionsverhalten

Okt. 2007

Diplom in Biologie

Hauptfach: Mikrobiologie

Nebenfächer: Biochemie, Humangenetik

Dez. 2006 – Okt. 2007

Diplomarbeit

Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Lehrstuhl
für Mikrobiologie und University of Cambridge,
Department of Pathology

Betreuer: Prof. J. Kreft, Prof. C. Hughes

Titel: Protein-tyrosine phosphatases and
listerial gene expression

Okt. 2002 – Okt. 2007

Studiengang Diplom Biologie

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

ANHANG

SCHULAUSBILDUNG

Mai 2002

Sept. 1993 – Mai 2002

Abitur

Frankenwald-Gymnasium Kronach

VERÖFFENTLICHUNGEN

PUBLIKATIONEN

Schriefer, E.M., Hoffmann-Thoms, S., Schmid, FX., Schmid, A., Storz, E. Heesemann, J.
Yersinia enterocolitica β -lactamase BlaA is exported by the twin-arginine pathway: Molecular and biochemical characterization. *PLoS Pathog.* Eingereicht am 13.01.2012.

Gopal, S., Berg, D., Hagen, N., **Schriefer, E.M.**, Stoll, R., Goebel, W., Kreft, J.
Maltose and maltodextrin utilization by *Listeria monocytogenes* depend on an inducible ABC transporter which is repressed by glucose. *PLoS One*, 27;5(4).

VORTRÄGE

Schriefer, E.M., Heesemann, J.
The *Yersinia* Type 3 Secretion System: β -lactamase fusion proteins of defined folding stability as secretion/translocation probes.
SFB 594 Mitgliederversammlung, 5-6. Mai 2011, Martinsried, Deutschland

Schriefer, E.M., Heesemann, J.
Characterization of AmpC and BlaA β -lactamases in *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B
2. Nationales *Yersinia* Meeting, 17-18. September 2010, Herrsching, Deutschland

POSTER

Schriefer, E.M., Heesemann, J.
Sec- and Tat-dependent export of two β -lactamases in *Yersinia enterocolitica*
62. Jahrestagung der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie), 28.-31. März 2010, Hannover, Deutschland

Schriefer, E.M., Heesemann, J.
Molecular characterization of β -lactamase genes *ampC* and *blaA* of *Yersinia enterocolitica*
61. Jahrestagung der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie), 20-23 September 2009, Göttingen, Deutschland

Schriefer, E.M., Heesemann, J.
Construction of a mini-Type III secretion system in *Yersinia enterocolitica*
Annual meeting of the EGA (EuroPathoGenomics Graduate Academy, Network of Excellence), 27.-29. April 2009, Palma de Mallorca, Spanien

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann möchte ich ganz besonders für die Bereitstellung des interessanten Themas danken, die ständige Diskussionsbereitschaft und die stetig neuen Anregungen und Vorschläge sowie für die Möglichkeit, den eigenen wissenschaftlichen Interessen und Schwerpunkten zu folgen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Kreft danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die Unterstützung, das immer offene Ohr und die vielen guten Ratschläge während der gesamten Promotion.

Meinen Kooperationspartnern von der Uni Bayreuth, Stephanie Hoffmann-Thoms und Prof. Dr. Franz X. Schmid, möchte ich herzlich für die CD-Analysen meiner β -Laktamase danken. Außerdem vielen Dank für die Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen des Papers.

Ganz herzlich möchte ich meinen Kollegen vom Max von Pettenkofer-Institut danken, die für ein immer angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Besonders meinen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen aus dem Labor 403/404 für die Hilfsbereitschaft und die schöne Atmosphäre: Dr. Annika Schmid, Julia Batzilla, Lukas Schneider, Dr. Uladzimir Antonenka, Dr. Julia Niefnecker und Debora Garzetti. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Anette Schulz, Kathrin Berschl, Dr. Katja Lenk, Steffi Böllner, Nico Jäger, Dr. Christoph Guggenberger, Susanna Röder und Dr. Ombeline Rossier für die schöne gemeinsame Zeit.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Ludwig Heesen, der sich die Zeit genommen und die Mühe gemacht hat, die über 200 Seiten meiner Dissertation Korrektur zu lesen.

Vielen Dank an meine Münchner Freunde für die lustige Zeit außerhalb des Labors und für die Motivation vor allem die stressige Endphase zu überstehen. Danke auch an meine „alten“ Freunde aus Schul- und Studienzeiten, die mittlerweile über ganz Deutschland verteilt sind, aber trotzdem noch den Kontakt halten. Besonders möchte ich mich bei Stefan Beßlein bedanken, der mich immer bestärkt und unterstützt hat und mich somit voran gebracht hat.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meiner Familie, allen voran meiner Mutter, für die immer währende Unterstützung und vor allem für die Geduld und das Verständnis während der anstrengenden Phasen bedanken.

