
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie

Lehrstuhl für Mikrobiologie

**Funktionelle Analyse von bakteriellen W-xxx-E Rho GTPasen
GEF Mimetika mittels Typ 3 Sekretionssystems von
*Yersinia enterocolitica***



DISSERTATION

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

vorgelegt von

Stefan Wölke

aus Erfurt

Würzburg, 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender:

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Roy Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel „**Funktionelle Analyse von bakteriellen W-xxx-E Rho GTPasen GEF Mimetika mittels Typ 3 Sekretionssystem von *Yersinia enterocolitica***“ wurde von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Bis heute habe ich neben dem akademischen Grad „Diplom Biologe univ.“ keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

München, 2010

Stefan Wölke

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung Deutsch.....	9
Zusammenfassung Englisch (Summary)	12
1.) Einleitung.....	15
1.1) Rho GTPasen als Teil der Ras Superfamilie.....	15
1.1.1) Die Rho Familie	16
1.1.2) Zelluläre und molekulare Funktion der Rho GTPasen.....	17
1.1.2.1) Zelluläre Funktion der Rho GTPasen.....	17
1.1.2.2) Molekulare Funktion der Rho GTPasen	19
1.1.3) Rho GTPasen als molekulare Zielstruktur bakterieller Erreger	22
1.2) Rho GTPasen- / GEF Mimetika.....	24
1.3) Enteropathogene bakterielle Erreger	24
1.3.1) <i>Salmonella enterica</i> Serotyp Typhimurium (<i>Salmonella</i> Typhimurium)	25
1.3.2) <i>Yersinia enterocolitica</i>	26
1.3.3) Pathogenese der <i>Yersinia enterocolitica</i> Infektion	27
1.3.4) Das Yersinien T3SS und dessen Effektoren.....	27
1.3.5) Die Oberflächenproteine YadA und Invasin	30
1.3.5) <i>Yersinia enterocolitica</i> als „Toolbox-System“	31
1.4.) Infektionsmodelle	32
1.5) Konditionale knockout-Mäuse	33
1.6) Zielsetzung dieser Arbeit.....	36
2.) Material und Methoden.....	37
2.1) Geräte und Verbrauchsmaterial.....	37
2.1.1) Geräte	37
2.1.2) Verbrauchsmaterial	38
2.2) Chemikalien und Kits	39
2.2.1) Chemikalien und Biochemikalien	39
2.2.2) Kits 40	
2.2.3) Antikörper	40
2.3) Stämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	41
2.3.1) Verwendete Bakterienstämme	41
2.3.2) verwendete Plasmide.....	42
2.3.3) Oligonukleotide	42
2.4.) Nährmedien und Antibiotika	44
2.4.1) Nährmedien (Bakterien)	44
2.4.2) Antibiotika	45
2.5) Eukaryotische Zellen und Nährmedien	45

2.6)	Molekularbiologische Methoden.....	46
2.6.1)	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
2.6.2)	Konstruktion von <i>Yersinia</i> spezifischen T3SS Substraten (Klonieren).....	46
2.6.3)	Ligation.....	47
2.6.4)	Protein Präzipitation.....	47
2.6.5)	SDS-PAGE und Westernblot.....	48
2.6.6)	Sekretion und zelluläre Translokation der Hybridproteine.....	50
2.6.7)	Zelllysate von „bone marrow derived macrophages“ (BMDM).....	51
2.6.8)	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry.....	52
2.7)	Mikrobiologische Methoden.....	52
2.7.1)	Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien.....	52
2.7.1.1)	<i>E. coli</i>	52
2.7.1.1.1)	Herstellung Calcium-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	53
2.7.1.1.2)	Transformation Calcium-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	53
2.7.1.2)	<i>Yersinia enterocolitica</i>	54
2.7.1.2.1)	Herstellung elektrokompeter Yersinien.....	54
2.7.1.2.2)	Elektrotransformation.....	54
2.7.1.2.3)	Vorbereitung der <i>Yersinia</i> Stämme für Infektionsversuche.....	54
2.8)	Zellbiologische Methoden.....	55
2.8.1)	Kultivierung und Konservierung von Zelllinien.....	55
2.8.2)	Kryokonservierung von Zelllinien.....	55
2.8.3)	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	55
2.8.4)	In vitro Infektionen mit Yersinien.....	56
2.8.4.1)	Infektionen von HeLa Zellen.....	56
2.8.4.1.1)	Untersuchung der Yersinien-Invasion von HeLa-Zellen.....	56
2.8.4.1.2)	Visualisierung des zellulären Aktinzytoskeletts.....	57
2.8.4.1.3)	Zytotoxizitätsbestimmung / Lactatdehydrogenase (LDH) Freisetzung.....	57
2.8.4.1.4)	Propidiumiodid Färbung.....	58
2.8.4.2)	Infektion von MDCK Zellen mit Yersinien.....	58
2.8.4.2.1)	Transepitheliale Resistenz (TER) Messung.....	59
2.8.5)	„Fluoreszenz activated cell sorting“ (FACS).....	59
2.9)	Mauszucht, Mausinfektionsversuche und Isolierung primärer Zellen.....	60
2.9.1)	Mauslinien und Zuchtbedingung.....	60
2.9.2)	Genotypisierung und Biopsieentnahme.....	63
2.9.3)	Mausinfektionsversuche.....	64
2.9.4)	Gewinnung von Knochenmarkszellen und Differenzierung zu Knochenmarksmakrophagen (BMDM).....	65
2.10)	Statistik.....	65
3.)	Ergebnisse I.....	66
3.1)	Herstellung von Ysc-T3SS-Hybridsubstraten auf YopE-Basis.....	66
3.2)	Biologische Aktivität in Zellen, Effekt auf das Aktin-Zytoskelett.....	69
3.3)	Einfluss der Rho GTPasen GEF-Mimetika auf die Zellinvasion in nicht-phagozytierende Zellen.....	70
3.3.1)	Invasionsstudien.....	70
3.3.2)	Co-Infektions-Invasionsstudien.....	72
3.3.3)	Einfluss chemischer Inhibitoren auf die Invasionsrate.....	80
3.4.)	Beeinflussung der Zytoplasmamembranintegrität durch den T3SS Apparat von <i>Yersinia enterocolitica</i>.....	83
3.5)	Beeinflussung der MDCK-Epithelschichtintegrität durch die Hybridproteine YopE₁₃₈-IpgB₁, YopE₁₃₈-IpgB₂ und YopE₁₃₈-Map.....	88

3.6)	Fazit I.....	89
4.)	Ergebnisse II	90
4.1)	Konstruktion von konditionalen Rho GTPasen knockout Mäusen.....	90
4.2)	Nachweis der Deletion von RhoA, Cdc42 und Rac1 in Makrophagen	91
4.3)	Mausinfektionsversuche.....	93
4.5)	Fazit II.....	97
5.)	Diskussion	98
5.1)	Yersinia Toolbox	98
5.1.1)	Sekretion und Translokation der YopE _Y -X Hybridproteine	98
5.1.2)	Biologische Aktivität der YopE _Y -X Hybridproteine	100
5.1.3)	Einfluss der YopE _Y -X-Hybridproteine auf die zelluläre Invasion.....	101
5.1.4)	T3SS-vermittelte Beeinflussung der zellulären Membranintegrität.....	109
5.1.5)	Epithelschichtintegrität.....	111
5.1.6)	Fazit der <i>Yersinia</i> -Toolbox	112
5.2)	Konditionale knockout Mäuse	112
6.)	Publikationen	116
7.)	Danksagung	117
8.)	Referenzen.....	118

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	
aa	engl.: amino acid = Aminosäure
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AJK	<u>A</u> pikaler <u>J</u> unktionaler <u>K</u> omplex
AJ	engl.: Adherence junction
BCIP	5-Brom,4-Chlor,3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BMDM	engl.: Bone Marrow Derived Macrophages (Knochenmarksmakrophagen)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kapazität (elektrisch)
CaaX	C = Cys = Cystein, a = Aliphatisch, X = terminale Aminosäure
Cm	Chloramphenicol
Cb	engl.: Chaperone binding site
CFU	engl.: <u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nits
CIN Agar	<u>C</u> efsulodin- <u>I</u> rgasan- <u>N</u> ovobiocin Agar
CuSO ₄ *5H ₂ O	Kupfer (-II) Sulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Ribonukleotid-5'-triphosphat
FKS	Fötales Kälber Serum
g	Gramm
GAP	engl.: <u>G</u> TPase <u>A</u> ctivating <u>P</u> rotein
GEF	engl.: <u>G</u> uanine <u>E</u> xchange <u>F</u> actor
GDI	engl.: <u>G</u> uanine <u>D</u> issociation <u>I</u> nhibitor
GGTase	Geranylgeranyltransferase
h	engl.: hour = Stunde
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
Inv	Invasin
IgX	Immunglobuline der Klasse X
IR	engl.: <u>I</u> nverted <u>R</u> epeats
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo Dalton
l	Liter
LDH	<u>L</u> actat <u>D</u> ehydrogenase
LB-Medium	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium
<i>lysM</i>	Gen <i>lysozymM</i>
M	Molarität
mm	Millimeter

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

min	Minute
ml	Milliliter
MLD	engl.: Membrane localization domain
MOI	engl.: Multiplicity of Infection
ng	Nanogramm
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
OD x	Optische Dichte der Wellenlänge x nm
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>g</u> ele <u>l</u> ektrophorese
PBS	engl.: <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (Phosphat gepufferte NaCl Lösung)
PCR	engl.: <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	<u>P</u> araform <u>a</u> ldehyd
PI	Propidiumjodid
PI-3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat = PtdIns(4,5)P ₂
PIP ₃	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat = PtdIns(3,4,5)P ₃
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PTEN	Phosphoinositol-Phosphatase
RbCl ₂	Rubidiumchlorid
R	Widerstand (elektrisch)
rpm	engl.: <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute
RE	Restriktionsenzym
RT	Raumtemperatur
SCV	engl.: <u>S</u> almonella <u>c</u> ontaining <u>v</u> acuole
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPI	engl.: <i>Salmonella</i> Pathogenicity Island
t	engl.: time
Tab.	Tabelle
TJ	engl.: <u>T</u> ight <u>j</u> unction
T3SS	Typ-3 Sekretionssystem
T4SS	Typ-4 Sekretionssystem
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TER	<u>T</u> ranse <u>p</u> itheliale <u>R</u> esistenz (transepithelialer elektrischer Widerstand)
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Spannung (elektrisch)
ÜN	Über Nacht
V	Volt, Einheit
Vol	Volumen
W-xxx-E	W = Trp = Tryptophan, E = Glu = Glutamat, x = jede aa ist möglich
WT	Wildtyp
YadA	engl.: <i>Yersinia adhesin A</i>
Yops	engl.: <i>Yersinia outer proteins</i>
z.B.	Zum Beispiel

Zusammenfassung Deutsch

Die zellulären Rho GTPasen kontrollieren und regulieren zentrale elementare Zellvorgänge wie Phagozytose, Migration und epitheliale Integrität. Aufgrund ihrer zentralen Stellung, interagiert eine Vielzahl von bakteriellen Cytotoxinen und Modulinen mit den Rho GTPasen und wirken so als Pathogenitätsfaktoren. Die zur W-xxx-E Familie gehörenden Effektoren IpgB₁ und IpgB₂ von *Shigella* und Map von *E. coli* (Pathotypen EHEC und EPEC) werden über ein Typ 3 Sekretionssystem (T3SS) in Wirtszellen injiziert und wirken als Rac1, RhoA bzw. Cdc42 GEF Mimetikum. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effektor Funktionen von IpgB₁, IpgB₂ und Map mit Hilfe des *Yersinia* (Ysc)-T3SS untersucht, was zur Etablierung der „*Yersinia*-Toolbox“ führte. *Y. enterocolitica* ist für ein T3SS-Toolbox-System besonders geeignet, weil (1) der für das Ysc-T3SS kodierende Abschnitt des Virulenzplasmids ohne Gene für Effektorproteine auf einem Plasmid (pT3SS) kloniert vorliegt, (2) bei *Yersinia* im Unterschied zu Salmonellen und *E. coli* (EPEC/EHEC) Gene für T3SS-Effektorproteine nicht chromosomal lokalisiert sind und (3) heterologe Proteine durch Fusion mit dem Ysc-T3SS-Effektor YopE sezerniert und in Zellen injiziert werden können. Damit können heterologe Effektoren isoliert im physiologischen Kontext der Erreger-Zell-Interaktion zellbiologisch untersucht werden unter Vermeidung von simultaner Injektion redundanter oder unbekannter Effektoren.

Zur Etablierung der *Yersinia*-Toolbox wurden zunächst die Gene für die Rho GTPasen modulierenden *Shigella* Effektoren IpgB₁ und IpgB₂ sowie der *E. coli* (EHEC)-Effektor Map mit unterschiedlich langen Gensequenzen der N-terminalen Bereiche des *Yersinia*-Effektorproteins YopE fusioniert (Hybridproteine: YopE_i-X: i = 18, 53 bzw. 138 Aminosäurereste, X = IpgB₁, IpgB₂ bzw. Map). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Hybridproteine YopE₅₃-X und YopE₁₃₈-X (X=IpgB₁, IpgB₂, Map) in den Kulturüberstand sezerniert bzw. in Zielzellen injiziert wurden. In einem weiteren Schritt konnte die zellbiologische Aktivität der heterologen Proteine fluoreszenzmikroskopisch durch Aktinzytoskelettlagerungen gezeigt werden. So wurden „Membrane Ruffles“ (Rac1-Aktivierung) durch YopE₁₃₈-IpgB₁, Stressfasern (RhoA-Aktivierung) durch E₁₃₈-IpgB₂ und „Mikrospikes“ (Cdc42-Aktivierung) durch YopE₁₃₈-Map nachgewiesen.

Invasionstudien zeigten, dass YopE_i-IpgB₁ (i = 53, 138) die *Yersinia*-Invasion induzierte, wohingegen YopE_i-IpgB₂ die Invasionsrate der Stämme WA (pT3SS, pE_i-IpgB₂) (i=53, 138) verglichen mit dem Stamm WA (pT3SS) reduziert war. Durch Kombination verschiedener *Yersinia*-Toolbox-Stämme konnte im Co-Infektionsmodell mit HeLa-Zellen gezeigt werden, dass (1) die YopE₁₃₈-IpgB₁ vermittelte Invasion durch YopE₁₃₈-IpgB₂ signifikant inhibiert werden kann, was auf eine antagonistische Wirkung zwischen IpgB₁ und IpgB₂ schließen lässt, dass (2) YopT ebenfalls die IpgB₁ vermittelte Invasionsrate reduziert (inhibitorische Wirkung auf Rac1), und dass (3) YopE als GAP für RhoG/Rac1 (bevorzugt RhoG) praktisch nicht die IpgB₁-vermittelte Invasion hemmt. Durch Klonierung der YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-IpgB₂ kodierenden Fusionsgene in zwei kompatible Plasmidvektoren konnten die Hybridproteine simultan transloziert werden und die Co-Infektionsergebnisse bestätigt werden.

In der Literatur ist beschrieben, dass die Ysc-Translokationspore YopB/YopD Rho-abhängig Membranporen-bedingte Zellschädigungen verursacht (LDH-Freisetzung, PI-Kernfärbung). Mit der *Yersinia*-Toolbox konnte mit dem Stamm WA (pT3SS) Zytoplasmamembranschädigung / Zytotoxizität nachgewiesen werden, nicht aber mit den Stämmen WA (pE₁₃₈-X) X = IpgB₁, IpgB₂ oder Map. Co-Infektionen jedoch zeigen, dass vermehrt LDH bei der Infektion mit WA (pT3SS) + WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) detektiert wurde, wohingegen dieser Effekt von YopE₁₃₈-IpgB₂ in einer Co-Infektion von WA (pT3SS) + WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) inhibiert wurde. Auch hier wurde der Antagonismus zwischen IpgB₁ und IpgB₂ erneut sichtbar. Diese Befunde widersprechen publizierten Daten, die eine RhoA-Aktivierung/Aktinpolymerisierung mit verstärkter Porenbildung in einen Zusammenhang bringen.

Rho GTPasen sind beteiligt an der Erhaltung der polarisierten Eipithelzellschichtintegrität über Adhäsionskomplexbildung. Mittels Infektion von polarisierten MDCK-Zellschichten mit verschiedenen *Yersinia*-Stämmen und Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes/Resistenz (TER) konnte gezeigt werden, dass die Ysc-T3SS vermittelte Injektion von YopE₁₃₈-IpgB₁ (Rac1-Aktivierung) oder YopE₁₃₈-Map (Cdc42-Aktivierung) zur Abnahme der TER und damit Schädigung der Zellschichtintegrität führt, wogegen bei YopE₁₃₈-IpgB₂-Injektion der TER-Wert unverändert blieb.

Um bakterielle Rho GTPasen-modulierende Effektorproteine detailliert untersuchen zu können und um die Rolle von Rho GTPasen im Mausinfektionsmodell mit *Yersinia enterocolitica* und Salmonellen zu bestimmen, wurden Mäuse mit deletierten Genen für RhoA, Rac1 bzw. Cdc42 („gefloxten“ (fl) Rho GTPase-Gen“) in Makrophagen hergestellt (LysMCre x GTPase^{fl}). Es konnte gezeigt werden, dass Knochenmarksmakrophagen keine Expression von RhoA, Rac1 oder Cdc42 mehr aufweisen, sofern die Spendermäuse für die Kreuzung homozygot für *lysM::cre* waren.

Mausinfektionsversuche von Kontrollmäusen und Cdc42^{fl/fl} *lysM::cre* / *lysM::cre* und RhoA^{fl/fl} *lysM::cre* / *lysM::cre* Mäusen mit *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium bzw. *Yersinia enterocolitica* zeigten eine signifikant erhöhte bakterielle Kolonisation und signifikant erhöhte Monozyten-/ und Makrophagenpopulation in den Milzen der Cdc42^{fl/fl} *lysM::cre* / *lysM::cre* Mäuse im Vergleich zur Kontrolle. Für die Granulozytenpopulation konnte lediglich bei der Infektion mit *Yersinia enterocolitica* eine signifikant höhere Anzahl verglichen mit der Kontrollgruppe detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Rho GTPasen und insbesondere Cdc42 eine wichtige Rolle während der Erregerabwehr durch Neutrophile/Makrophagen spielen. Darüber hinaus wurde hiermit eine Grundlage geschaffen, die Wirkung von bakteriellen Rho GTPasen GEF-Mimetika vertiefend in Mausmakrophagen und im Mausinfektionsmodell zu untersuchen.

Zusammenfassung Englisch (Summary)

Phagocytosis, migration and regulation of epithelial integrity are central cellular aspects that are controlled by the cellular Rho GTPases. In this regard, Rac1, RhoA and Cdc42 have important regulatory roles mediating various cytoskeletal rearrangements in many cell types including epithelial cells as well as professional phagocytes. Because of the central role of the Rho GTPases in cellular integrity and function, bacterial cytotoxins and modulins targeting these cellular switches are very efficient pathogenicity factors. Recently, the T3SS effectors, IpgB₁, IpgB₂ of *Shigella* and Map of *E. coli* (pathotype EHEC/EPEC) were assembled in one protein family sharing the common motif W-xxx-E. Members of this protein family are described to act as GEF mimics for the cellular Rho GTPases. It has additionally been demonstrated that IpgB₁ is a GEF for Rac1 / RhoG, IpgB₂ for RhoA and Map for Cdc42. In this study the effector functions of IpgB₁, IpgB₂ and Map were analyzed with the *Yersinia* (Ysc)-T3SS which led to the development of the “*Yersinia*-Toolbox”. *Yersinia enterocolitica* is very suitable to be used as “T3SS-Toolbox” because (1) a plasmid solely carrying the DNA fragment encoding the Ysc-T3SS without T3SS-effectors is available, (2) in difference to *Salmonella* and *E. coli* (EPEC/EHEC) the Ysc-T3SS-effector genes of *Yersinia* are not localized on the chromosome and (3) heterologous proteins fused to the Ysc-T3SS-effector YopE are secreted and translocated into cells. This allows the analysis of single heterologous effectors without simultaneous injection of other (unknown/redundant) T3SS-effectors in a physiological context during the interaction of *Yersinia* with cells.

To develop the *Yersinia*-Toolbox, the genes of the GTPase modulating effectors IpgB₁, IpgB₂ of *Shigella* and Map of *E. coli* (EHEC) were fused to different long sections of the N-Terminus of the *Yersinia*-Ysc-T3SS-effector YopE (hybrid proteins: YopE_i-X: i = 18, 53 or 138 amino acid residues, X = IpgB₁, IpgB₂ or Map). This study demonstrates the secretion to the culture supernatant and the injection into target cells of the hybrid proteins YopE₅₃-X and YopE₁₃₈-X (X = IpgB₁, IpgB₂ and Map). Furthermore, cell biologic activity was detected for the YopE-X hybrid proteins by fluorescence microscopy as membrane ruffles (Rac1 activation), stress fibres (RhoA activation) and micro spikes (Cdc42 activation) occurred after injection of YopE₁₃₈-IpgB₁, YopE₁₃₈-IpgB₂ and YopE₁₃₈-Map, in respective.

Invasion studies showed that YopE_i-IpgB₁ (i = 53, 138) induced invasion of *Yersinia*, whereas YopE_i-IpgB₂ reduced invasion of the strains WA (pT3SS, pE_i-IpgB₂) (i = 53, 138) compared to the strain WA (pT3SS). Combination of different *Yersinia*-Toolbox strains in the co-infection model with HeLa cells showed that (1) YopE₁₃₈-IpgB₂ reduced the YopE₁₃₈-IpgB₁ induced invasion suggesting an antagonism between IpgB₁ and IpgB₂, (2) YopT also reduced the YopE₁₃₈-IpgB₁ induced invasion (inhibitory function on Rac1) and (3) that YopE as GAP for RhoG/Rac1 (predominantly RhoG) did not inhibit the YopE₁₃₈-IpgB₁ induced invasion. Because of the construction of two different compatible plasmids carrying the genes for either YopE₁₃₈-IpgB₁ or YopE₁₃₈-IpgB₂, simultaneous translocation of the hybrid proteins of one single strain was possible. These studies confirmed the results of the co-infection studies.

It has been reported that the Ysc translocation pore YopB/YopD induces Rho dependent membrane pores in cells which leads to cellular damage (LDH release, PI-staining of the nucleus). In this study cellular damage / cytotoxicity was detected after an infection of HeLa cells with the *Yersinia*-Toolbox strain WA (pT3SS). In contrast to that no cytotoxicity was detected after an infection of HeLa cells with the *Yersinia*-Toolbox strains WA (pT3SS, pE₁₃₈-X) X = IpgB₁, IpgB₂ and Map. Additionally, co-infections with the strains WA (pT3SS) and WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) resulted in an increased LDH release whereas a co-infection with the strains WA (pT3SS) and WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) led to the decrease of LDH release compared to single infections with WA (pT3SS), again suggesting an antagonism between IpgB₁ and IpgB₂. These results are contrary to published data, which suggest a correlation between RhoA activation dependent actin polymerisation and pore formation.

The cellular Rho GTPases are involved in the maintenance of epithelial integrity of polarized cells. Infections of polarized MDCK cell layers with different *Yersinia*-Toolbox strains resulted in a decrease of the transepithelial electric resistance (TER) indicating a damage of the epithelial integrity after injection of YopE₁₃₈-IpgB₁ or YopE₁₃₈-Map. The TER value was not altered after injection of YopE₁₃₈-IpgB₂ indicating an intact epithelial integrity.

To study bacterial Rho GTPase modulating proteins in more detail and to get a deeper insight to the role of Rho GTPases in the murine infection model with *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella*, mice with gene deletions for RhoA, Rac1 or Cdc42 (“floxed” (fl) Rho GTPase gene) in macrophages were constructed (LysMCre x GTPase^{fl}). It could be shown that bone marrow derived macrophages lack RhoA, Rac1 or Cdc42 in case of homzygous *lysM::cre* showing a functional deletion of the floxed DNA sequences.

Mouse infections of control mice and Cdc42^{fl/fl} *lysM::cre* / *lysM::cre* and RhoA^{fl/fl} *lysM::cre* / *lysM::cre* mice with *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium resulted in a significantly increased bacterial colonization of the spleens of Cdc42^{fl/fl} *lysM::cre* / *lysM::cre* mice and an increased monocyte / macrophage population in the spleens compared to the control. In addition, an increase of the granulocyte population of the spleens was detected after the infection with *Yersinia enterocolitica*. These results show that Cdc42 is important during the infection defence of macrophages and neutrophils. Furthermore, this enables the detailed analysis of the effector functions of bacterial Rho GTPase GEF mimetics in murine macrophages and in the murine infection model.

1.) Einleitung

Zellen nehmen von außen Signale über Rezeptoren wahr und übertragen diese Signale ins Zellinnere (Signaltransduktion), um bestimmte Zellfunktionen einzuschalten. Diese Schalterfunktionen können kleine GTPasen übernehmen. Im Aus-Zustand haben sie GDP, im Ein-Zustand haben sie GTP gebunden, der durch Austausch von GDP zu GTP erreicht wird und durch die GTPase-Aktivität wieder aufgehoben wird. Der GDP/GTP-Austausch wird durch einen Austauschfaktor GEF (*GTP exchange factor*) gesteuert. In diesem Zustand sind die GTPasen aktiv und können so Effektorproteine binden und damit Signaltransduktionskaskaden aktivieren (Wennerberg et al., 2005; Vetter and Wittinghofer, 2001); siehe Kap. 1.1.2). Aufgrund dieser Schalterfunktion nehmen die Rho GTPasen eine zentrale Stellung innerhalb der Zelle ein (Kap. 1.1.2) und sind daher Zielproteine diverser bakterieller Toxine / Moduline. Diese bakteriellen Effektoren lassen sich nach ihrem Transport- und Wirkmechanismus in verschiedene Klassen einteilen. So kann man die autotranslozierten Moduline (AB Toxine / Exotoxine) und die über das Typ 3 Sekretionssystem (T3SS) oder Typ 4 Sekretionssystem (T4SS) sekretierten Effektoren in je eine Gruppe einteilen (Kap.1.1.3).

1.1) Rho GTPasen als Teil der Ras Superfamilie

Die zellulären Rho GTPasen gehören zur Ras Superfamilie und damit einhergehend zu den kleinen (20 kDa) GTPasen. Die Ras Superfamilie umfasst mehr als 150 humane GTPasen. Evolutionär konservierte orthologe Gene finden sich in *Drosophila*, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *Dyctiostelium* und Pflanzen (Colicelli, 2004). Die Ras-Superfamilie wird in fünf GTPase-Familien (Ras, **Rho**, Rab, Ran und Arf) basierend auf Sequenz- und funktionalen Ähnlichkeiten eingeteilt. Die als kleine GTP-bindende Proteine bezeichneten GTPasen haben einen ähnlichen Funktionsmechanismus und wirken in der Zelle als binärer Schalter.

1.1.1) Die Rho Familie

Überblick über die Rho Subfamilien

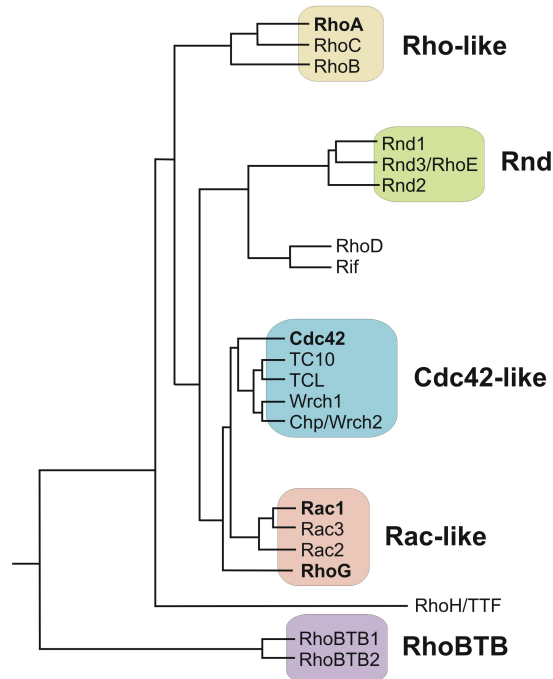


Abb. 1 Einteilung der Subfamilien der Rho Familie. RhoH, RhoD und Rif lassen sich keinen genauen Gruppen zuordnen. Das Schaubild wurde erstellt in Anlehnung an (Burrige and Wennerberg, 2004)

Die Rho Familie (Ras homologous proteins) ist ihrerseits in die fünf Subfamilien Rho-like, Rac-like, Cdc42-like, Rnd und RhoBTB eingeteilt. RhoH, RhoD und Rif lassen sich keiner genaueren Subfamilie zuordnen (Boueux et al., 2007; Burrige and Wennerberg, 2004), (Abb. 1). Die Proteine der Rho-like Subfamilie haben alle eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit und kontrollieren im Wesentlichen kontraktile zytoskelettale Strukturen, Aktin Stressfasern und fokale Adhäsionskomplexe.

Lamellipodien und „Membrane Ruffles“ werden von den Proteinen der Rac-like Subfamilie induziert, wohingegen die Proteine der Cdc42-like Subfamilie Filopodien (Vgl. Kap. 1.1.2.1) induzieren (Burrige and Wennerberg, 2004). Eine Ausnahme bildet die Rnd Subfamilie, da alle Rnd Typen eine Aminosäuresubstitution in der GTPase Domäne besitzen und dadurch GTPase inaktiv sind. Damit werden sie nicht über den herkömmlichen Weg des GTP / GDP Zyklus (Kap 1.1.2.2) kontrolliert und reguliert (Burrige and Wennerberg, 2004; Nobes et al., 1998; Foster et al., 1996).

Funktion und Regulation der RhoBTB Subfamilie ist soweit noch nicht verstanden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der Fokus auf die GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 gelegt, da diese im Wesentlichen an Zytoskelettlagerungsprozessen beteiligt sind (Phagozytose, Makropinozytose, Endozytose, Bildung von reaktivem Sauerstoff = „ROS-burst“, Migration).

1.1.2) Zelluläre und molekulare Funktion der Rho GTPasen

Die Rho GTPasen fungieren als zentrale binäre molekulare Schalter in der Zelle, die dadurch verschiedenste Zellfunktionen regulieren. Um die Schalterfunktion auszuüben, müssen die Rho GTPasen ihrerseits koordiniert und reguliert werden.

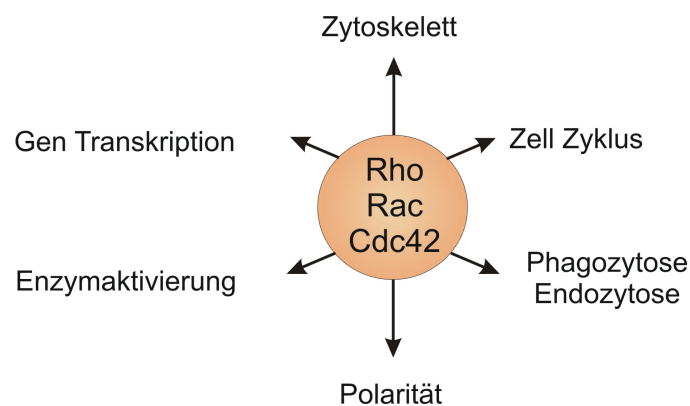


Abb. 2 Schematische Darstellung der zentralen Regulationsfunktion der zellulären Rho GTPasen in Anlehnung an A. Hall

1.1.2.1) Zelluläre Funktion der Rho GTPasen

Die Rho GTPasen kontrollieren elementare Zellvorgänge (Abb. 2). So wird das Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett durch die Rho GTPasen reguliert (Palazzo et al., 2001; Ishizaki et al., 2001; Hall, 1998). Durch Regulation der Zytoskelettdynamik wird die zelluläre Migration (Nobes and Hall, 1999; 1995), der Zellzyklus (Besson et al., 2004), die Phagozytose (z.B. von Erregern) (May et al., 2000; Caron and Hall, 1998) und Endozytose reguliert.

Weiterhin wird die Polarität von Zellen und Chemotaxis sowie die Aufrechterhaltung und Polarisierung von Epithelien durch die Rho GTPasen kontrolliert (Bruewer et al., 2004; Gibson and Perrimon, 2003; Vaezi et al., 2002; Braga et al., 1997; Nusrat et al., 1995). Zusätzlich kann die Aktivität diverser Enzyme durch Rho GTPasen reguliert werden. So wird beispielsweise die NADPH Oxidase durch RhoG und Rac2 gesteuert (Condliffe et al., 2006; Carstanjen et al., 2005; Kim and Dinauer, 2001). Diese Regulation steuert die Produktion von antibakteriell wirkenden reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS = reactive oxxygen species) durch Neutrophile, Makrophagen und Dendritische Zellen.

Ein weiteres Beispiel für Enzymaktivierung ist die PI-3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Phosphat Kinase), die durch Rac1 z.B. bei der Polarisierung im Rahmen der Chemotaxis aktiviert wird (Srinivasan et al., 2003; Weiner et al., 2002; Zheng et al., 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Rho GTPasen die Gentranskription kontrollieren können (Hill et al., 1995; Minden et al., 1995). Die Migration und Chemotaxis, Phagozytose und die Aktivierung der NADPH Oxidase spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort gegen diverser Erreger. Somit sind die Rho GTPasen von fundamentaler Bedeutung für eine effiziente Erregerabwehr.

Bisher ist die Regulation und Auswirkung der Rho GTPasen auf das Aktin Zytoskelett am besten verstanden. Dabei verursachen die verschiedenen Rho GTPasen unterschiedliche morphologische Strukturen. So induziert aktives Rac1 Lamellipodien und „Membrane Ruffles“. RhoA induziert Stressfasern und Cdc42 „Microspikes“ / Filopodien (Abb. 3).

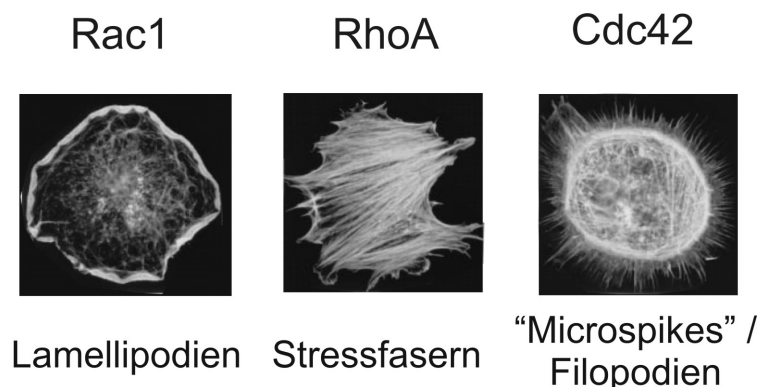


Abb. 3 Mikroskopische Darstellung von Rac1 induzierten Lamellipodien, RhoA induzierten Stressfasern und Cdc42 induzierten „Microspikes“ in Swiss 3T3 (Hall, 1998)

1.1.2.2) Molekulare Funktion der Rho GTPasen

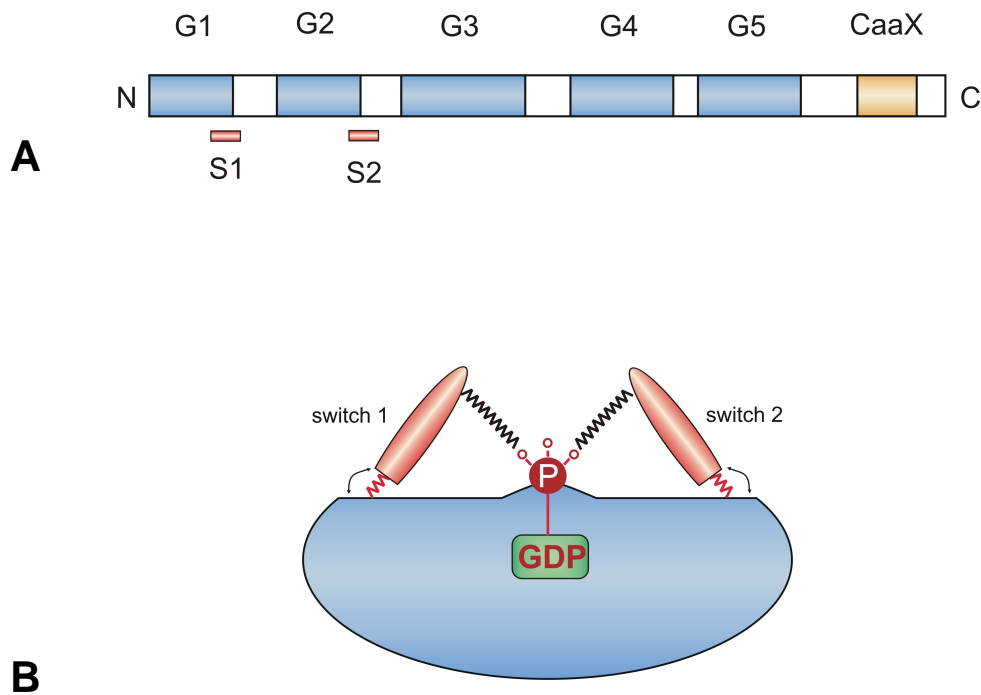


Abb. 4 Schematischer Aufbau der Rho GTPasen. **(A)** Domänen Verteilung. **(B)** gefaltetes Protein mit gebundenem GTP und „switch1/2-on“ Konformation

Wie bereits in Kap. 1.1.2 erwähnt, fungieren die zellulären Rho GTPasen als binäre molekulare Schalter in der Zelle. Generell wird ein Signal von außen über einen Rezeptor auf die Rho GTPasen übertragen, so dass die Zelle auf die Umwelt reagieren kann. Sie weisen einen typischen Aufbau, der in Abb. 4 A dargestellt ist, auf. N-terminal sind die Domänen G1 – G5 sowie S1 und S2 und C-terminal ist die für die Membranlokalisierung notwendige CaaX-Box lokalisiert. Die Regionen S1 und S2 sind die sog. „Switch Regionen“, die mit den Domänen G1 und G2 überlappen (Abb. 4 A und B). Diese „Switch-Regionen“ sind wichtig für die Interaktion mit dem γ -Phosphat des GTPs, was somit auch eine wesentliche Rolle bei der Dephosphorylierung von GTP spielt (Wennerberg et al., 2005; Colicelli, 2004; Vetter and Wittinghofer, 2001). Darüber hinaus sind diese „Switch-Regionen“ von Bedeutung für die Interaktion mit GEFs und damit einhergehend für den Austausch von GDP zu GTP.

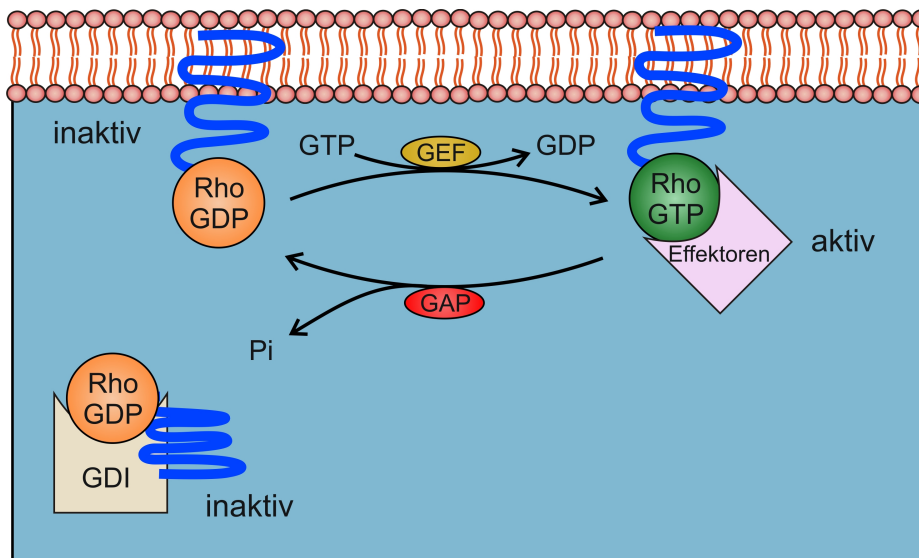


Abb. 5 Schematische Darstellung des Rho GTPasen GTP / GDP Zyklus. Die Konversion von Rho-GDP zu Rho-GTP wird von GEFs und die Konversion von Rho-GTP zu Rho-GDP von GAPs gesteuert. GDIs binden Rho GTPasen an den Prenylresten und verhindern eine Membraninserterung, so dass die Rho GTPasen im Cytosol lokalisiert bleiben und somit inaktiv sind.

Die Aktivität und signalgebende Kapazität der Rho GTPasen hängt ganz entscheidend von GTP ab. Sobald eine Rho GTPase GTP gebunden hat, ist sie aktiv und kann mit Effektor Proteinen interagieren und ein Signal weiter geben. Hat die Rho GTPase GDP gebunden, ist sie inaktiv und kann nicht mehr an weitere Effektor - Proteine binden. Dieser Zyklus der GDP zu GTP- (aktivierend) sowie GTP zu GDP- Konversion (inaktivierend) wird durch GEFs (Guanine Exchange Factor, aktivierend) und GAPs (GTPase Activating Protein, inaktivierend) gesteuert. GEFs tauschen GDP zu GTP aus und sind somit aktivierend, demgegenüber bewirken die GAPs eine Aktivierung der intrinsischen GTPase Funktion der Rho GTPasen, was zur Dephosphorylierung und damit zur Freisetzung von Ortho-Phosphat führt (siehe Abb. 5). Dies hat zur Folge, dass keine weiteren Effektoren mehr an die Rho GTPase binden können und die Rho GTPase bezogen auf die Signalwirkung inaktiv ist. Derzeitig sind 70 humane GEFs und 80 humane GAPs identifiziert. Allerdings ist bisher nur wenig über die Regulation der GEF und GAP Aktivität bekannt. Neben den GEFs und GAPs sind GDIs an der Regulation von Rho GTPasen beteiligt. Derzeit sind drei humane GDIs beschrieben (Heasman and Ridley, 2008).

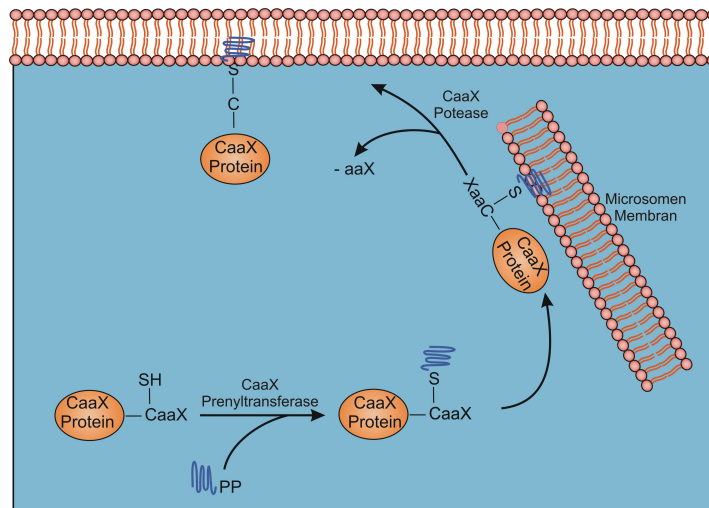


Abb. 6 Schematische Darstellung der posttranslationalen Modifikation der Rho GTPasen. Die CaaX Prenyltransferase sorgt für die Protein Prenylierung, so dass die Rho GTPase in die Membran inseriert werden kann. Die CaaX Protease spaltet den -aaX Rest proteolytisch ab. C-terminales Cystein wird methyliert (Methylester).

Damit die Rho GTPasen ihre Wirkung entfalten können, müssen sie entsprechend in der Zelle lokalisiert sein. Für diesen Vorgang sind posttranslationale Modifikationen notwendig, so dass die Rho GTPasen in die Membran inseriert werden können. Für diese Modifikation sind die Enzyme Protein-Geranylgeranyltransferase (GGTase) sowie CaaX-Protease von besonderer Bedeutung. Die Geranylgeranyltransferase erkennt die CaaX-Box und katalysiert die Addition eines Geranylgeranyl-Rests an die Thiolgruppe des terminalen Cysteins unter Ausbildung eines Thioesters und unter Freisetzung von Pyrophosphat (Abb. 6). Die CaaX Protease hingegen spaltet in der CaaX-Box den terminalen aaX-Teil ab. GDIs binden den Geranylgeranylrest und verhindern so die Verankerung in der Membran und damit den Zugang zu den GEFs (Zhang and Casey, 1996). Dadurch wirken GDIs inaktivierend (Heasman and Ridley, 2008) und sequestrierend.

1.1.3) Rho GTPasen als molekulare Zielstruktur bakterieller Erreger

Wie in Kap. 1.1.2 dargestellt, sind die zellulären Rho GTPasen zentrale Regulatoren von Zellvorgängen. Von besonderer Bedeutung sind die Rho GTPasen für die Immunantwort. Aufgrund dieser zentralen Stellung der Rho GTPasen, haben verschiedene bakterielle Erreger Gene für Proteine mit Rho GTPasen-Modulations-Wirkung erworben, um sich so eine entsprechende Replikationsnische innerhalb eines Wirts zu erschließen.

Diese modulatorischen Proteine lassen sich nach ihrem Transport- und Wirkmechanismus in verschiedene Klassen einteilen. Einen Überblick darüber ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Rho GTPasen Modulatoren können im Wesentlichen je nach ihrem Wirkmechanismus der Zellinternalisierung in die Gruppe der autotranslozierten Moduline (A/B-Toxine / Exotoxine) und der T3SS (Typ 3 Sekretionssystem) injizierten Moduline eingeteilt werden. Die A/B-Toxine C3 Exoenzym und CNF1 gehören zur ersten Gruppe, wohingegen die GEF-Mimetika SopE, E2, IpgB₁, IpgB₂, Map, sowie die GAP-Mimetika SptP, YopE, ExoS und ExoT zur Gruppe der T3SS-injizierten Moduline zusammengefasst werden können. Darüber hinaus lässt sich YopT (*Yersinia* Outer Protein T) ebenfalls in die Gruppe der T3SS translozierten Proteine einordnen. Die T3SS Effektoren YopE und YopT von *Yersinia enterocolitica*, SopE, SopE2, SptP von *Salmonella*, IpgB₁, IpgB₂ von *Shigella* und Map von *Escherichia coli* (Pathotyp EHEC / EPEC) werden von Erregern synthetisiert, die für Gastrointestinalerkrankungen u.a. mit schwerem Verlauf verantwortlich sind (Haraga et al., 2008; Schroeder and Hilbi, 2008; Hayward et al., 2006; Ohl and Miller, 2001). In dieser Doktorarbeit wurde schwerpunktmäßig die Effektorwirkung der Proteine YopE und YopT von *Yersinia enterocolitica*, sowie IpgB₁, IpgB₂ von *Shigella flexneri* und Map von *Escherichia coli* (EHEC) untersucht und in Kap. 1.2 näher dargestellt.

Tab. 1 Überblick über die einzelnen bakteriellen Rho GTPasen Modulatoren

Glucosyl-Transferasen			
Protein	Bakterium	Wirkung	Referenz
Toxin A und B	<i>Clostridium difficile</i>	Inaktivierend (RhoA, Rac1, Cdc42)	(Just et al., 1995)
Rho ADP-Ribosyl-Transferasen			
C3 exoenzym	<i>Clostridium botulinum</i>	Inaktivierend (RhoA, RhoB, RhoC)	(Aktories et al., 2004)
ExoS, ExoT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ADP-Ribosyl-Transferase Aktivität Zusätzlich GAP Mimetikum	(Krall et al., 2002; Krall et al., 2000)
Rho-Deamidasen			
CNF1, 2	<i>Escherichia coli</i>	Glutamin Deamidase Aktivierung von Rho GTPasen	(Fiorentini et al., 1997; Schmidt et al., 1997; Flatau et al., 1997)
Rho-Protease			
YopT	<i>Yersinia enterocolitica</i>	C-terminale proteolytische Spaltung des prenylierten Cys der CaaX-Box von RhoA, Rac1, Cdc42	(Shao et al., 2003; Shao et al., 2002)
Mimikry-Proteine			
SopE, SopE2	<i>Salmonella</i>	GEF Mimetikum für Rac1 und Cdc42 Zellinvasion	(Hardt et al., 1998)
IpgB ₁	<i>Shigella flexneri</i>	RhoG Mimetikum / Rac1 GEF Zellinvasion	(Huang et al., 2009; Alto and Dixon, 2008; Handa et al., 2007; Alto et al., 2006; Ohya et al., 2005)
IpgB ₂		RhoA GEF / Mimetikum ?	
Map	<i>Escherichia coli</i> EHEC / EPEC	Cdc42 GEF Tight Junction Zerstörung	
SptP	<i>Salmonella</i>	Cdc 42 GAP Mimetikum	(Kaniga et al., 1996)
YopE	<i>Yersinia enterocolitica</i>	RhoG / Rac1 GAP Mimetikum	(Roppenser et al., 2009; von Pawel-Rammingen et al., 2000)
ExoS, ExoT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GAP Mimetikum ExoS, ExoT Zusätzlich ADP-Ribosyl-Transferase Aktivität	(Krall et al., 2002; Krall et al., 2000)

1.2) Rho GTPasen- / GEF Mimetika

Die in Tab.1 dargestellten T3SS translozierten Effektorproteine IpgB₁, IpgB₂ von *Shigellen* und Map von *E. coli* wurden kürzlich von Alto et al. (2006) in eine Proteinfamilie zusammengefasst, die alle das Trp-xxx-Glu Motiv (W-xxx-E) besitzen. Die W-xxx-E Proteinfamilie umfasst 24 verschiedene Proteine von verschiedenen bakteriellen Erregern. Dabei wurde ein neuartiges Konzept der Effektor Wirkung für IpgB₁ IpgB₂ und Map postuliert. Demnach handelt es sich bei diesen Proteinen um Rho GTPasen Mimetika, die in der Zelle die Wirkung zellulärer Rho GTPasen unabhängig von GTP übernehmen können. Alto et al. (2006) zeigte in seinen Studien, dass IpgB₁ „Membrane Ruffles“, IpgB₂ Stressfasern (durch Rock- und mDia1-Aktivierung) und Map Filopodien induziert. Somit wurde IpgB₁ als Rac1 Mimetikum, IpgB₂ als RhoA Mimetikum (interagiert mit Rock und mDia1) und Map als Cdc42 Mimetikum beschrieben. Neuere Arbeiten von Handa et al. (2007) zeigen, dass der Shigellen Effektor IpgB₁ mit dem zellulären Elmo / Dock180 Komplex interagiert und dieser Komplex aus IpgB₁-Elmo-Dock180 seinerseits als GEF aktivierend auf Rac1 wirkt. Da Elmo / Dock180 als GEF von RhoG aktiviert wird und der Komplex aus IpgB₁-Elmo-Dock unabhängig von RhoG Rac1-GEF-Aktivität besitzt, wurde IpgB₁ als RhoG Mimetikum definiert. Die neueste Arbeit von Alto et al. (2009) ordnet IpgB₁, IpgB₂ und Map als GEFs für Rac1, RhoA und Cdc42 ein. Trotz fehlender Sequenzähnlichkeiten der Proteine IpgB₁, IpgB₂ und Map bilden diese Proteine ähnliche Strukturen wie das bakterielle GEF SopE aus (Bulgin et al., 2010). Letztendlich wirken diese T3SS Faktoren als Aktivatoren der Rac1-, RhoA-, Cdc42 Signalwege. Die Effektorfunktionen von YopE und YopT werden im Kap. 1.3 im Rahmen der Beschreibung von *Yersinia enterocolitica* näher beschrieben.

1.3) Enteropathogene bakterielle Erreger

Gram-negative enteropathogene Erreger besitzen in der Regel ein Typ III Sekretionssystem (T3SS), mit dem sie diverse Effektoren / Moduline in die Zellen des Wirts injizieren, um die Wirtszellen so umzuprogrammieren, so dass sie sich ihre spezifische Replikationsnische im Wirt erschließen können.

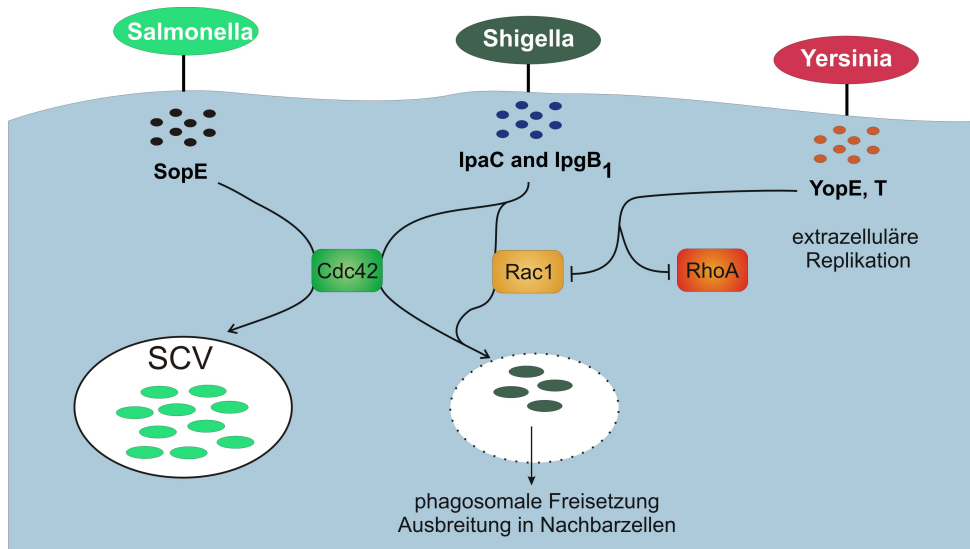


Abb. 7 Vergleichende schematische Darstellung von Gram-negativen enteropathogenen bakteriellen Erregern. Salmonellen injizieren unter anderem SopE (Cdc42 GEF), Shigellen (IpgB₁ und IpgB₂) Yersinien YopE und T als Modulatoren der Rho GTPasen.

So injizieren Salmonellen Effektoren, die eine intrazelluläre Replikation in speziellen Vakuolen induzieren (SCV = *Salmonella* containing vacuole). Ebenso wie die Salmonellen injizieren Shigellen Effektoren, die eine intrazelluläre Replikation erlauben. Im Gegensatz zu den Salmonellen zerstören die Shigellen die Vakuole und replizieren im Cytosol (Abb. 7). Yersinien hingegen injizieren Effektoren, die die Rho GTPasen inhibieren, so dass die Yersinien extrazellulär replizieren können (Abb. 7).

1.3.1) *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium)

Ebenso wie Yersinien gelangen die Salmonellen durch kontaminiertes Wasser und kontaminierte Lebensmittel über den ösogastrointestinalen Weg in den Körper des Wirts. Nach der Magenpassage replizieren sie im Dünndarm und überwinden das Darmepithel über die M Zellen der Peyer's Patches. Von da aus gelangen sie in die Lamina Propria und infizieren Phagozyten. Mittels dieser infizierten Phagozyten disseminieren sie über das Lymphsystem und über das Blut in die Milz und Leber (Monack et al., 2004a; Monack et al., 2004b). *Salmonella* Typhimurium besitzt fünf Pathogenitätsinseln (SPI-1 – SPI-5), wobei SPI-1 und SPI-2 am besten verstanden sind. Auf diesen beiden Inseln sind die Gene für je ein T3SS sowie deren Effektoren lokalisiert. Die Funktionen von SPI-1 und SPI-2 lassen sich in frühe und späte Funktion einteilen.

So ist SPI-1 für die Überwindung des Darmepithels und Invasion essentiell, wohingegen SPI-2 für die intrazelluläre Replikation notwendig ist (Haraga et al., 2008; Jarvelainen et al., 2003). Die Expression der SPI-1 und SPI-2 Gene wird von Umgebungssignalen reguliert. So wird SPI-1 bei 37° C und hohen Salzkonzentrationen und niedrigem O₂-Partialdruck induziert (Vgl. Darmmilieu) (Schechter et al., 1999; Bajaj et al., 1996; Lee and Falkow, 1990). Demgegenüber wird SPI-2 bei hoher Protonen- und niedrigen Mg²⁺- Fe²⁺ und Phosphat-Konzentration induziert (Zaharik et al., 2002; Lee et al., 2000; Deiwick et al., 1999; Garcia-del et al., 1992).

1.3.2) *Yersinia enterocolitica*

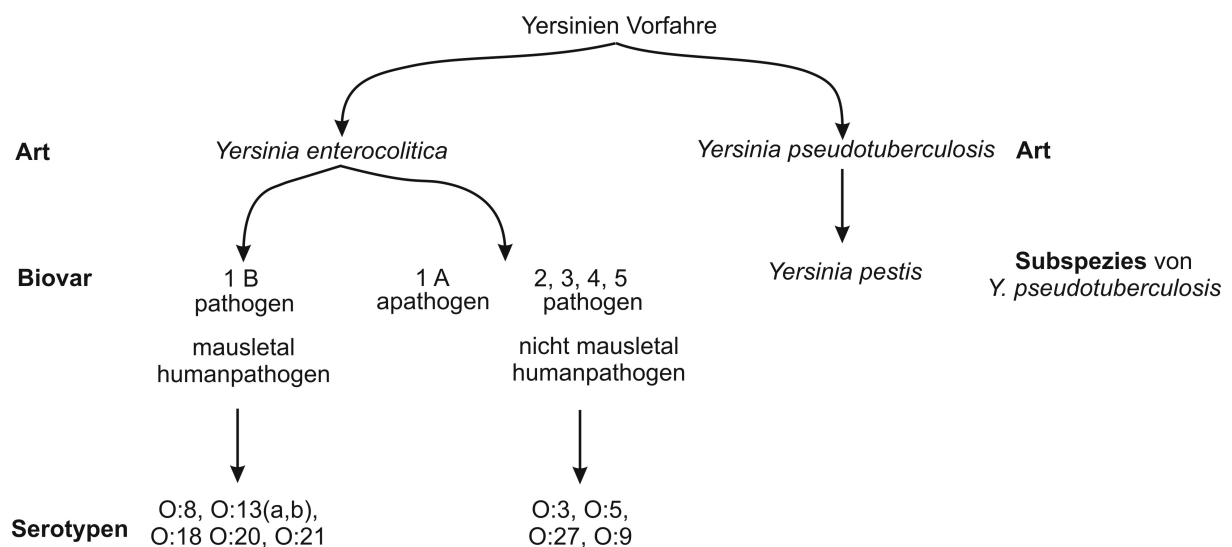


Abb. 8 Überblick über die Einteilung der humanpathogenen *Yersinia*-Arten

Yersinia enterocolitica gehört wie die Salmonellen, Shigellen und *E. coli* zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Art *Yersinia enterocolitica* umfasst fünf Biovare, wobei 1A als apathogen, 1B als tier- und humanpathogen (mausletal) und 2 - 5 nur humanpathogen ist. Für die humanpathogenen Serotypen O:3 (Biovar 4), O:9 (Biovar 2, Biovar 3), O:5 O:27 (Biovar 3) sind vor allem Schweine das Hauptreservoir. Darüber hinaus können enteropathogene Yersinien auch aus dem Boden, Wasser und Lebensmittel isoliert werden (Bockemühl and Wong, 2003).

Menschen infizieren sich zumeist über kontaminierte Lebensmittel und Wasser. Seltener aber findet eine Übertragung durch Schmierinfektionen statt (Bockemühl and Roggentin, 2004).

1.3.3) Pathogenese der *Yersinia enterocolitica* Infektion

Wie bereits in Kap. 1.3 erwähnt, gelangen die Yersinien durch kontaminierte Lebensmittel über den ösogastrointestinalen Weg in den Körper des Wirts. Nach der Magenpassage replizieren sie im Dünndarm und überwinden das Darmepithel über die M Zellen der Peyer Plaques. Von da aus gelangen die Yersinien in die mesenterialen Lymphknoten und wahrscheinlich über Blutgefäße in die Milz und Leber. Die humanpathogenen Serotypen von *Yersinia enterocolitica* besitzen das 70 – 75 kb große Virulenzplasmid (pYV) (Portnoy and Falkow, 1981). Auf dem pYV Plasmid sind die Gene für das Ysc-T3SS sowie deren Effektoren, die Yops (Yersinia Outer Proteins) kodiert (Snellings et al., 2001). Die Yops sind die T3SS Effektorproteine, die mit Hilfe des Ysc-T3SS kontaktabhängig in die Wirtszelle transloziert werden, wodurch sich die Yersinien ihre replikative Nische im Wirt erschließen. Es werden mindestens sechs Effektorproteine vom *Yersinia enterocolitica* pYV Plasmid kodiert, nämlich YopE, YopT, YopH, YopM, YopO/YpkA und YopP/J.

1.3.4) Das Yersinien T3SS und dessen Effektoren

Das Yersinien T3SS ist ein Proteinsekretionssystem, das als „molekulare Spritze“ Effektoren / Modulatoren in die Wirtszelle kontaktabhängig injizieren kann (Cornelis, 2006; Cornelis, 2002a). Abb. 9 zeigt den schematischen Aufbau des Yersinien T3SS, mit dessen Hilfe die T3SS Effektoren in die Wirtszelle transloziert werden. Bisher ist unklar, ob die Yops über eine „Membranpore“ durch die T3SS-Nadel oder über eine Translokationspore in das Zellinnere gelangen. Für die Proteintranslokation sind die Proteine LcrV, YopB und YopD, die an der Nadelspitze lokalisiert sind und vermutlich in die Membran inserieren, notwendig.

Sobald die Effektorproteine in der Wirtszelle sind, können sie ihre modulatorische Wirkung entfalten.

Der wesentlichste Effekt dabei ist die antiphagozytische Wirkung der Yops, wobei YopE, T, O, H, hierbei die Hauptrolle spielen. Im Gegensatz zu den in Kap. 1.2 dargestellten GEF Mimetika von *Shigella* IpgB₁, IpgB₂ und *E. coli* Map (Rho GTPasen Signalaktivatoren) wirkt YopE als GAP Mimetikum und YopO als GDI Mimetikum. Die GAP Aktivität von **YopE** inhibiert die Rho GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 mit unterschiedlicher Effizienz, wobei Rac1 am stärksten betroffen ist (Aepfelbacher et al., 2007).

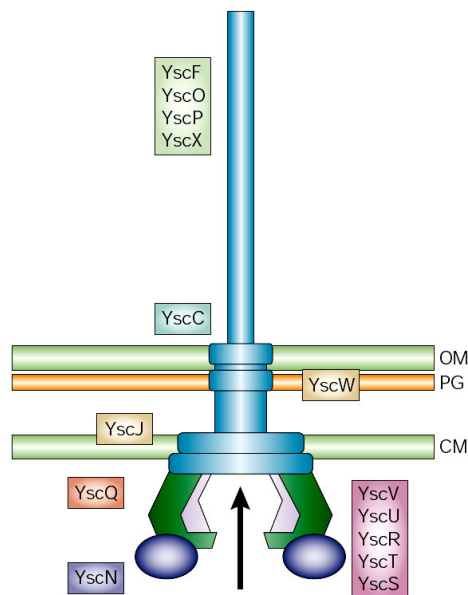


Abb. 9 Schematische Darstellung des Ysc T3SS nach Cornelis (2002)

In einer neuen Arbeit von Roppenser et al. (2009) wurde gezeigt, dass YopE eine größere GAP-Aktivität für RhoG als für Rac1 besitzt.

Somit ist der inhibitorische Rac1 Effekt von YopE indirekt über inaktiviertes RhoG (RhoG-Elmo-Dock180 = Rac1 GEF) und direkt über Rac1 Inhibierung zu erklären. Die Gap Aktivität von YopE für RhoG / Rac1 verhindert die Aktinpolymerisierung, so dass phagozytische Zellen paralytisch werden. Somit wirkt YopE antiphagozytotisch und es kann sich auch kein „phagocytic cup“ ausbilden (von Pawel-Rammingen et al., 2000).

Das Effektorprotein **YopT** wirkt als Cystein-Protease und spaltet den Geranylgeranylrest am C-Terminus der Rho GTPasen ab, so dass die Rho GTPasen (stärkste Aktivität für RhoA) von der Zytoplasmamembran freigesetzt werden, wodurch keine koordinierte Aktinpolymerisation mehr zustande kommt. Diese Inaktivierung verhindert ähnlich wie YopE die Aktinpolymerisierung und wirkt damit ebenfalls antiphagozytotisch (Shao et al., 2003; 2002). Neuere Arbeiten postulieren ebenfalls die Translokationsregulation durch YopE und YopT. Demnach verursacht die Inaktivierung von Rac1/RhoA durch YopE und YopT den Verschluss der Translokationspore und damit das Ende des Translokationsprozess durch das Yersinien T3SS (Mejia et al., 2008; Aili et al., 2008; Aili et al., 2006; 2003; Viboud and Bliska, 2002; 2001).

YopO ist ein multifunktionaler Effektor. So besitzt er GDI-Aktivität (Kap.1.1.2) und bindet Rac1 und Cdc42. Außerdem besitzt YopO eine Ser-Thr-Kinaseaktivität und bindet ebenfalls Aktinfilamente. Die Ser-Thr Kinase wird nach Aktinbindung aktiv und phosphoryliert die α Untereinheit von $G\alpha_q$ Proteinen. YopO bewirkt ebenfalls die Aktindepolymerisierung und wirkt antiphagozytotisch (Aepfelbacher et al., 2007; Grosdent et al., 2002). **YopP** wirkt apoptotisch in Makrophagen und dendritischen Zellen und kann die MAPK- und $NF\kappa B$ Signaltransduktionswege durch Acetylierung inhibieren. Dies führt zu einer Reduktion der Freisetzung der pro-inflammatorischen Cytokine $TNF\alpha$ und IL8 (Shao, 2008; Mittal et al., 2006; Boland and Cornelis, 1998; Ruckdeschel et al., 1997). Somit wirkt YopP antiinflammatorisch. Die genaue Funktion von **YopM** ist noch nicht bekannt, allerdings wird es nach der Translokation in die Zelle in den Zellkern transportiert und reguliert dort vermutlich die Transkription diverser Gene. Weiterhin ist YopM für die Mausvirulenz essentiell (Trulzsch et al., 2004; McDonald et al., 2003). **YopH** wirkt als Protein Tyrosin-Phosphatase und dephosphoryliert $p130^{Cas}$, FAK, Paxilin und Pyk2 (Kinase) (Shao, 2008), was zur Auflösung von Aktinstrukturen und Fokaladhäsionskomplexen führt, was eine Inhibierung der Integrin vermittelten Phagozytose bewirkt. Darüber hinaus wird die NADPH Oxidase abhängige Bildung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) inhibiert (Cornelis, 2002b; Persson et al., 1997; Bliska and Black, 1995; Guan and Dixon, 1990).

1.3.5) Die Oberflächenproteine YadA und Invasin

Zwei weitere wichtige Virulenzfaktoren sind das pYV-kodierte YadA (*Yersinia* adhesin) und das chromosomal kodierte Inv (Invasin). **YadA** bildet trimere „Lollipop-Like“ Strukturen auf der Zelloberfläche von *Yersinia enterocolitica* (Balligand et al., 1985; Bolin and Wolf-Watz, 1984; Bolin et al., 1982). Dabei ist YadA C-terminal in der äußeren Membran verankert.

YadA-Monomere werden sec-abhängig in das Periplasma sezerniert und von dort über einen Autotransportermechanismus als YadA Trimer mit dem C-Terminus in die äußere Membran inseriert. (Cotter et al., 2005). Wahrscheinlich bildet dabei der C-Terminus die Transportpore. Die *yadA* Expression wird durch VirF temperaturabhängig reguliert. So wird *yadA* erst bei 37° C exprimiert und an die Oberfläche transportiert (Lambert de et al., 1992). Für YadA sind verschiedenste Wirkungen beschrieben.

So vermittelt YadA die Adhärenz an Epithelzellen, Neutrophile und an Moleküle der Extrazellulären Matrix (Roggenkamp et al., 1996; Ruckdeschel et al., 1996; Heesemann et al., 1987). Des weiteren vermittelt YadA die Autoagglutination, was wahrscheinlich die Bildung von Mikrokolonien und Abszessen in Leber und Milz bedingt (Balligand et al., 1985). Außerdem zeigen diverse Arbeiten, dass YadA den Komplementfaktor H und das C4b- bindende Protein binden kann, was vermutlich die Serumresistenz von Yersinien bedingt (Kirjavainen et al., 2008; Pilz et al., 1992; Balligand et al., 1985; Skurnik et al., 1984).

Invasin ist im Gegensatz zu YadA chromosomal kodiert und ist ebenfalls auf der Oberfläche lokalisiert. Dabei ist Invasin im Gegensatz zu YadA als Monomer N-terminal in der Membran verankert. Invasin wird für die Bindung und die Überwindung der M Zellen der intestinalen Mukosa benötigt (Marra and Isberg, 1997; Isberg et al., 1987). Studien konnten zeigen, dass Invasin spezifisch $\alpha\beta 1$ -Integrin bindet und durch diese Bindung eine Zellinvasion nach dem „Zipper“ Mechanismus induziert (Isberg and Leong, 1990). Die Interaktion mit $\beta 1$ -Integrin aktiviert RhoG und Rac1, was zur Internalisierung führt (Mohammadi and Isberg, 2009). Die *inv* Expression ist ebenfalls temperaturabhängig. Im Gegensatz zu YadA ist die *inv* Expression bei 37° C reprimiert und bei mittleren Temperaturen (~27° C) aktiviert. Die *inv* Expression wird durch den Transkriptions Regulator RovA reguliert (Heroven et al., 2004; Nagel et al., 2001).

1.3.5) *Yersinia enterocolitica* als „Toolbox-System“

Attenuierte enteropathogene Bakterien wie Yersinien und Salmonellen können als rekombinante Lebendvaccine verwendet werden. Mittels ihrer T3SS können heterologe Antigene in antigenpräsentierende Zellen injiziert werden. Arbeiten von Rüssmann et. al und Trülzsch et al. zeigten, dass sich YopE hervorragend für den Transport heterologer Antigene in das Zytosol von Wirtszellen eignet. Weiterhin kann mit diesem System eine Antigenpräsentation in Makrophagen und dendritischen Zellen über MHC I und MHC II erreicht werden (Trülzsch et al., 2008; 2005; Rüssmann et al., 2003; 2001; 2000). Somit können Yersinien generell als „Werkzeugkasten“ für die Untersuchung diverser heterologer T3SS Effektoren verwendet werden.

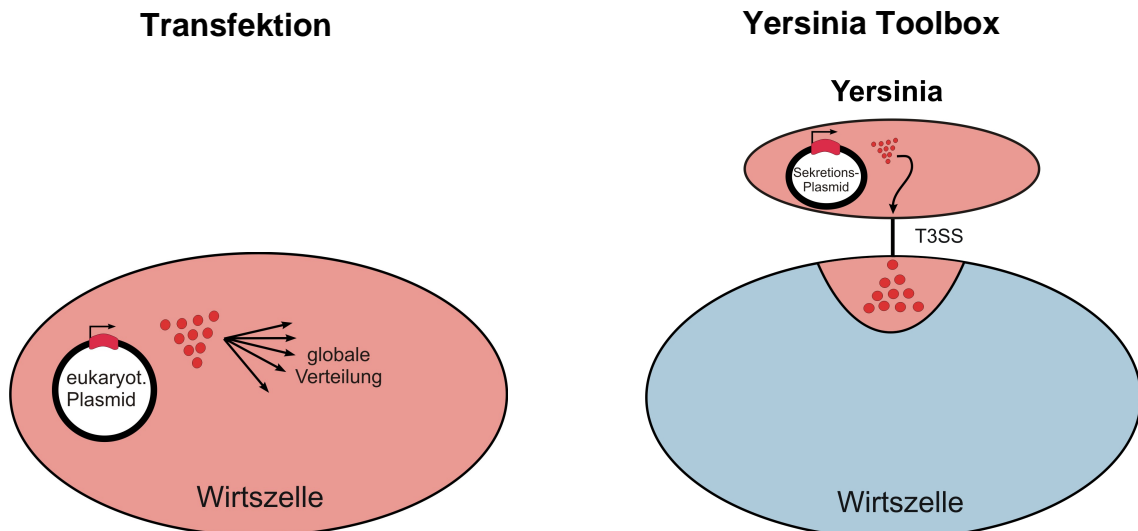


Abb. 10 Gegenüberstellung Transfektion (linkes Bild) vs. Yersinia Toolbox (rechtes Bild). Bei der eukaryotischen Transfektion sind die Gene der zu untersuchenden Proteine auf einem eukaryotischen Expressionsplasmid lokalisiert und werden über das eukaryotische Expressionssystem exprimiert. Die Proteine werden i.d.R. überproduziert und werden eher global über die Zelle verteilt (rosa Farbe). Bei der Yersinia Toolbox sind die Gene der zu untersuchenden Proteine auf einem sogenannten T3SS Sekretionsplasmid lokalisiert. Für die Expression der Gene wird das bakterielle Expressionssystem verwendet. Die erhaltenen Proteine (T3SS Effektoren) werden über das bakterielle T3S-System in die Wirtszelle injiziert. Für die Untersuchung bakterieller T3SS-Effektoren ist dies der natürlichere / physiologischere Weg, da die Proteine den natürlichen bakteriellen Sekretionsmechanismus unterlaufen. Dadurch liegen die Proteine in physiologischen Konzentrationen vor und sind eher lokal in der Wirtszelle verteilt.

Weiterhin zeigen Studien von Trülzsch et al. (2003), dass Yersinien soweit modifiziert werden können, dass sie keine Effektoren mehr exprimieren und nur das T3SS auf einem Plasmid (Mini pYV = pT3SS) exprimieren.

Dieser Stamm WA (pT3SS) kann dann mit Plasmiden, die ihrerseits einzelne Yops exprimieren, kombiniert werden, so dass die singulären Effektorfunktionen der einzelnen Proteine analysiert werden können. Dieses System ist in mehrerer Hinsicht vorteilhaft. So können unterschiedlichste Effektorproteine verschiedenster bakterieller Herkunft singulär ohne Hintergrundeffekte weiterer T3SS Effektoren untersucht werden. Dieses System ist insofern auch vorteilhaft, da die Effektoren in einem physiologischeren Kontext analysiert werden können. Viele Arbeiten an den Rho GTPasen / GEF Mimetika wurden mit eukaryotischen transfizierten Zellen durchgeführt. Dabei kann es aufgrund der Überexpression und der Proteinlokalisierung zu Artefakten kommen, da die Proteine global über die gesamte Zelle verteilt sein können (Abb. 10). Da bisher noch kein T3SS Stamm für Shigellen und *E. coli* existiert, liegt hier der entsprechende Vorteil zur Untersuchung der Rho GTPasen / GEF Mimetika IpgB₁, IpgB₂ und Map.

1.4.) Infektionsmodelle

Um die Pathogenese sowie Interaktion einzelner Erreger mit dem Wirt auf molekularer Ebene besser zu verstehen, sind verschiedenste Modellsysteme notwendig. Die einfachsten Infektionsmodelle sind die Zellkultursysteme. Dabei kann die Interaktion von Bakterien mit verschiedensten Zelltypen analysiert werden. Dies allerdings spiegelt nicht die tatsächliche Situation im Wirt wider. Als Infektionsmodelle wurden daher verschiedenste Tiermodelle etabliert. So wird unter anderem der Wurm *Caenorhabditis elegans* (Nematoden), die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, der Zebrafisch *Danio rerio* und die Maus *Mus musculus* (Mamalia) als Infektionsmodell verwendet. Die Verwendung von *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* als Infektionsmodell ist insofern vorteilhaft, da diese Tiere günstig in der Haltung, einfach zu handhaben, und aus ethischer Hinsicht als Infektionsmodell nicht problematisch sind. Allerdings haben diese Tiere nur ein rudimentäres Immunsystem, so dass Vertebraten ebenfalls als Infektionsmodell verwendet werden. In dieser Hinsicht erscheint der Zebrafisch als Brückenorganismus zwischen niedrigeren Tieren wie *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* und Mamaliern. Zebrafische haben ebenfalls ein angeborenes und adaptives Immunsystem.

Allerdings sind auch dem Zebrafisch als Infektionsmodell Grenzen gesetzt, da humane bakterielle Erreger auf 37° C adaptiert sind. Insbesondere Yersinien benötigen für die Yop-Synthese eine Temperatur von 37° C. Weiterhin sind standardisierte Methoden für die Gen-Deletion in Mäusen etabliert, wohingegen im Zebrafisch noch keine generelle Methode etabliert ist.

Somit sind Mäuse ideale Infektionsmodelle (van der Sar et al., 2004; Labrousse et al., 2000; Kurz and Ewbank, 2000). Allerdings sind Studien mit Mäusen mit hohen Kosten verbunden. Darüber hinaus spielen ethische Aspekte bei der Verwendung von Mäusen als Infektionsmodell eine große Rolle.

1.5) Konditionale knockout-Mäuse

Die Rho GTPasen spielen eine wesentliche Rolle während der Immunantwort einer Infektion. Besonders Makrophagen und Neutrophile spielen im Hinblick auf Migration, Phagozytose und „oxidative burst“ eine wichtige Rolle bei der Abwehr diverser Erreger. So ist die Konstruktion von entsprechenden knockout(ko)-Mäusen von besonderer Bedeutung. Allerdings sind konstitutive/Zelltyp-unspezifische ko- Mäuse für Rac1 und Cdc42 letal aufgrund der zentralen zellulären Bedeutung der Rho GTPasen (Heasman and Ridley, 2008). Um dieses Problem zu umgehen, erscheint die Herstellung von besonderen konditionalen ko-Mäusen attraktiv. Im Gegensatz zu konstitutiven ko-Mäusen, die eine Gendeletion in allen Zelltypen von Geburt an tragen (Keimbahn-knockout), sind konditionale „knockouts“ an bestimmte Bedingungen geknüpft. Dies kann zellspezifisch oder durch bestimmte Agenzien induziert sein. Für eine konditionale Gendeletion müssen diverse Voraussetzungen erfüllt sein. So muss ein entsprechendes Gen mit speziellen rekombinasespezifischen Sequenzen flankiert sein, ohne die Funktion des Gens wesentlich zu stören. Diese speziellen Sequenzen werden von einer sequenzspezifischen Rekombinase erkannt. Bringt man diese spezielle Rekombinase unter die Kontrolle eines zellspezifischen Promotors, so wird die Rekombinase zellspezifisch exprimiert, was eine zellspezifische Rekombination verursacht. Sofern die flankierenden Sequenzen richtig orientiert sind, führt diese Rekombination zur Deletion des flankierten Abschnitts. Anwendung hierbei findet das vom P-Phagen stammende Cre-lox-System und / oder das aus der Hefe stammende Flp-FRT-System.

Cre ist wie Flp eine sequenzspezifische Rekombinase die loxP bzw. FRT Sequenzen erkennt und zwischen diesen Sequenzen eine Rekombination vermittelt. Flankiert man einen bestimmten Genabschnitt mit den entsprechenden Sequenzen, so kann Cre bzw. Flp die Rekombination / Deletion selektiv zwischen diesen Markersequenzen vermitteln (Lewandoski 2001). Die loxP Sequenz ist insgesamt 34 bp lang. Der 8 bp umfassende „core“ wird von zwei 13 bp langen „inverted repeats“ flankiert (Abb. 11). Die Richtung der „loxP sites“ wird von der Orientierung des „cores“ definiert. Dies ist von besonderer Bedeutung, wie Abb. 11 B zeigt.

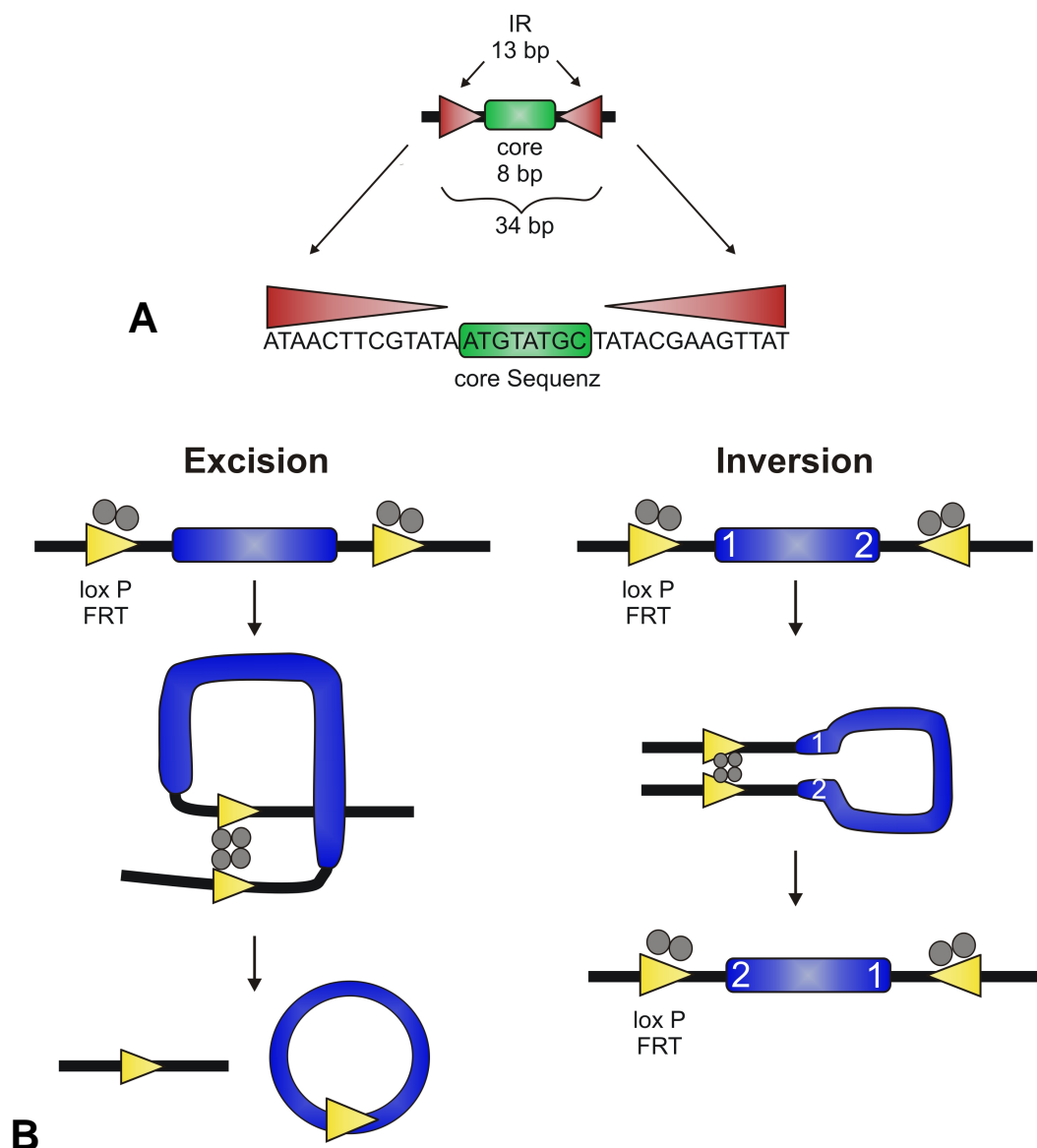


Abb. 11 Schematische Darstellung von „loxP sites“ (A). (B) Die Richtung der „loxP sites“ determiniert das Ergebnis der Rekombination. Bei gleicher Orientierung der „loxP sites“ vermittelt die Cre Rekombinase eine Excision und bei unterschiedlicher Orientierung eine Inversion des entsprechenden Genlocus.

Die Excision findet nur statt, wenn die loxP Sequenzen in gleicher Richtung orientiert sind. Zeigen sie jedoch in die entgegengesetzte Richtung, vermittelt die Cre Rekombinase nur eine Inversion des mit „loxP sites“ flankierten Genabschnitts (Lewandoski, 2001). Wie eingangs bereits erwähnt, sind die Rho GTPasen bei Makrophagen und Neutrophilen von entsprechender Bedeutung bei der Erreger Abwehr (Migration, Phagozytose, ROS). Deswegen ist die Konstruktion von RhoA, Cdc42 und Rac1 konditionalen ko-Mäusen, die die Gendeletion in Makrophagen und Neutrophilen tragen von besonderer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass Cre unter Kontrolle des *lysM* (Lysozym M) Promotors spezifisch den Knockout „gefloxter“ Gene in Makrophagen und Granulozyten induziert (Sinha et al., 2004; Clausen et al., 1999).

Diese Mäuse können somit für die Zucht von konditionalen ko-Mäusen verwendet werden, die die Gendeletion in Makrophagen und Granulozyten tragen. Ein genaues Kreuzungsschema ist in Kap. 2.9 erläutert.

1.6) Zielsetzung dieser Arbeit

Die zellulären Rho GTPasen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der zellulären Funktionen wie z.B. der Erregerabwehr. So werden zum einen zytoskelettabhängige Funktionen wie Erhaltung der Zell- und Epithelintegrität, Zellmigration, Phagozytose und Vesikeltransport und zum anderen enzymabhängige Funktionen wie der „oxidative burst“ von den Rho GTPasen reguliert. Aktivitätsmodulation der Rho GTPasen durch Virulenzfaktoren von Bakterien ist ein essentieller Mechanismus vieler bakterieller Infektionen. Salmonellen und Shigellen aktivieren Rho GTPasen, um Zugang zu ihrer intrazellulären replikativen Nische zu bekommen, wohingegen Yersinien die Rho GTPasen inaktivieren, um so Phagozyten zu paralisieren. Dies führt zur extrazellulären Replikation und Abszessbildung durch Yersinien *in vivo*. Kürzlich wurde eine neue T3SS Effektor Familie identifiziert. Proteine dieser Familie tragen das charakteristische W-xxx-E Motiv. Diese Proteine simulieren die Funktion zellulärer GEFs für Rho GTPasen. Die Proteine IpgB₁, IpgB₂ und Map sind T3SS Effektorproteine aus *Shigella* und *E. coli* (EHEC), die den aktiven Zustand von RhoG/Rac1, RhoA bzw. Cdc42 herbeiführen. Generell produzieren bakterielle Erreger ein bestimmtes Arsenal an Virulenzfaktoren im Zuge ihrer Infektion. „Loss of Function“ Mutationen können oft nur indirekt oder gar nicht die singulären Effektorfunktionen aufgrund der Redundanz verschiedener Effektoren phänotypisch erkennbar machen. Daher wird im ersten Teil dieser Arbeit *Yersinia enterocolitica* in verschiedensten Modifikationen als „Toolbox“ etabliert, um die Effektor Funktionen der singulären G-Protein GEF Mimetika Proteine von *Shigella* und *E. coli* (EHEC) zu studieren. Dazu wurden *Yersinia* spezifische T3SS Substrate konstruiert. *In vitro* Infektionsversuche sollten Aufschluss über die zelluläre Wirkung der Effektoren unter physiologischen T3SS Bedingungen liefern.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss der Rho GTPasen auf die Infektionsempfänglichkeit. Dazu wurden konditionale ko-Mäuse gezüchtet, die eine Gendeletion für RhoA, Rac1 oder Cdc42 in Makrophagen und Granulozyten/Neutrophile tragen. Infektionsversuche mit mauspathogenen Salmonellen und Yersinien sollten Aufschluss über die Bedeutung von Rho GTPasen für die Infektionsabwehr liefern.

2.) Material und Methoden

2.1) Geräte und Verbrauchsmaterial

2.1.1) Tabelle 2: Geräte

Gerät	Modell	Firma
Analysenwaage	Kern 440-33	Sartorius, Göttingen
Brutschrank	Typ B 20	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	Gasprofi 1 micro	WLD -TEC GmbH, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	Cytoperm 2	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	FACSCantoTMII + FACS Diva Software	BD, Heidelberg
Elektroblot- Apparatur	Mini Trans Blot® System	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer für SDS-Gele	MiniPROTEAN 2® Cell System	Bio-Rad, München
Elektroporator	Gene Pulser	Bio-Rad, München
ELISA Messgerät	Sunrise Tecan, Magellan3 Software	Tecan
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX61 + cell P software	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskope	Leica SP5 (konfokal), DM IRB, DM RBE	Leica, Wetzlar
Gel-Dokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammern	verschiedene Größen	Biometra, Göttingen
Homogenisator	MM 2000	Retsch, Wuppertal
Messgerät für Transepitheliale Resistenz (TER)	ERS Millicell	Millipore
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved 0,1 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Tierkäfige	Typ 2 (530 cm ²), Typ 3 (800 cm ²)	Tecniplast
Magnetrührer	IKA RET	Eppendorf, Hamburg
OP-Besteck	verschiedene Sorten	Heiland, Eickemeyer
PCR-Cycler	Eppendorf Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
	Biometra T3	Biometra, Göttingen
pH-Meter	320 pH-Meter	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
Pipetten	Eppendorf, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	Bio-Rad, München
Reaktionsgefäß Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Spannungsquellen	Power Pac 200 und 300	Bio-Rad, München
Spectrophotometer	NanoDrop ND 1000	Spectronic instruments, Rochester, USA
Sterilwerkbank	Herasafe HS 12	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Vakuumzentrifuge	Savant DNA 110 SpeedVac	Memmert, Schwabach
Wasserbad	GFL	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Eppendorf 5417R und 5415R	Eppendorf, Hamburg
	3K30 Kühlzentrifuge	Sigma
	Megafuge 3.0R	Heraeus, Hanau

2.1.2) Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Blotting-Papier	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel
Elektroporationsküvetten	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Einmalspritzen (1ml, 10, 20 ml)	Braun, Melsungen
Einmalpipetten	Falcon, Osnabrück
Einmalskalpell Cut-Fix	Braun, Melsungen
FACS Rundbodenröhrchen	Beckton Dickinson, Heidelberg
Gel-Blotting Papier	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel
Kanülen	Braun, Melsungen
Histoacryl Gewebekleber	Braun, Melsungen
Mikrotiterplatten 24-well	Nunc
Maus Standard Trockenfutter	ssniff
Mikrotiterplatten 96-well	Nunc
Nitrocellulose-Membran (Protran, BA85)	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger Super Frost Plus	Hartenstein, Würzburg
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen (Plastik)	Greiner bio-one Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml (ERG)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml (Falcon)	Beckton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter 0,22 µm und 0,45 µm (Millex)	Millipore, Schwalbach
Sterilfilterflaschen 0,22 µm, 500 ml	Nalgene
Tierstreu, PS14 select, Pappelgranulat	ssniff
Zellkulturflaschen	Nunc
Zellschaber	Nunc

2.2) Chemikalien und Kits

2.2.1) Tabelle 4: Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie	Hersteller	Chemikalie	Hersteller
1 kb DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe	Isopropanol	Merck, Darmstadt
Aceton	Roth, Karlsruhe	Inhibitoren: NSC23766 (Rac1), ROCK (Y-27632), Wortmannin	Merck, Calbiochem
Acrylamid	Serva, Heidelberg	KCl	Roth, Karlsruhe
Agarose (Premium)	Serva, Heidelberg	K-Na-Tartrat	Merck, Darmstadt
Antibiotika	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
APS, Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Methanol	Merck, Darmstadt
Bacto Trypton	Roth, Karlsruhe	Mounting Medium Mowiol für Mikroskopie	Merck, Darmstadt
BCIP (5-Brom,4-Chlor,3- Indolylphosphat	Roth, Karlsruhe	Na-Azid	Merck, Darmstadt
BHI	BD, Heidelberg	NaCl	Roth, Karlsruhe
BSA	Roth, Karlsruhe	NaOH	Merck, Darmstadt
CIN-Agarplatten	Oxoid, Hampshire	NBT (Nitro-Blau-Tetrazolium)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CpG Oligonukleotide ODN 1826	Cayla InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich	Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue	Merck, Darmstadt	Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
CuSO ₄ * 5H ₂ O	Merck, Darmstadt	PFA (Para-Formaldehyd)	Merck, Darmstadt
DAPI	Sigma-Adrich, Taufkirchen	PMSF, Phenyl-methyl-sulfonyl- fluorid	Applichem
Diethanolamin	Merck, Darmstadt	Primer	Metabion, Martinsried
Diethylether	Hedinger	Propidiumjodid	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Digitonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
D-MEM	Invitrogen, Karlsruhe	Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe	Proteinstandard "BenchMark Pre-Stained"	Invitrogen, Karlsruhe
D-PBS	Invitrogen, Karlsruhe	Protran BA Nitrozellulose Transfer Membran	Schleicher und Schüll, Dassel
EGTA	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen	RbCl ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Roth, Karlsruhe	Restriktionsenzyme	Fermentas
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
FKS	Invitrogen, Karlsruhe	SDS	Serva, Heidelberg
Folin	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T4 DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	TEMED (N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe	Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Glycin	MP, Ohio, USA	Tris	MP, Ohio, USA
H ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe	Triton X-100	Roth, Karlsruhe
HAc (Essigsäure)	Merck, Darmstadt	Trypanblau-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	Roth, Karlsruhe	Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Formalin	Merck, Darmstadt	Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
		Yeast-Extrakt (Hefe-Extrakt)	MP, Ohio, USA

2.2.2) Tabelle 5: Kits

Kit	Hersteller
PCR und Gel Aufreinigungskit	Macherey und Nagel, Düren
Plasmid Isolationskit, Midi	
DNA Aufreinigungs Kit	Roche
CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega

2.2.3) Tabelle 6: Antikörper

Epitop	Wirt	Verwendung	Hersteller
α YopE	Kaninchen	1 : 3000, 90 min	Heesemann, Antiserum, (Trulzsch et al., 2003)
α Rac1	Maus	1 : 1000, 2h	Millipore, monoclonal, clone 23A8
α Cdc42	Maus	1 : 200, 2h	BD, monoclonal, clone 44
α RhoA	Maus	1 : 100, 2h	Santa Cruz, monoclonal, clone 26C4
α Kaninchen, alk. Phosphatase	Ziege	1 : 2000, 30 min	Dianova, polyklonal
α Maus, alk. Phosphatase	Ziege	1 : 2000, 30 min	Dianova, polyklonal

2.3) Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1) Tabelle 7: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Kommentar	Quelle
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>E.coli</i> Labor Stamm (<i>recA1</i> , <i>hsdR17</i>)	(Hanahan, 1983)
<i>Shigella flexneri</i>	Patienten Isolat, dysentery	MvPI, Stammsammlung
<i>Escherichia coli</i> EHEC 0157	Patienten Isolat, enterohämorrhagische Colitis, Pathotyp EHEC, Serotyp O157 :H7	
<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium SL1344	Streptomycinresistenter Stamm	(Smith et al., 1984)
<i>Yersinia enterocolitica</i> Stämme		
WA (pYV)	Patienten Isolat WA-314 von Serotyp O:8 mit dem Virulenzplasmid pYV08, mausvirulent	(Heesemann and Laufs, 1983)
WA-C	plasmidloser Abkömmling von Stamm WA (pYV)	
WA-C Δinv	Invasin Mutante, Kanamycinkassette in das <i>invasin</i> Gen inseriert	(Ruckdeschel et al., 1996)
WA (pT3SS)	Abkömmling von Stamm WA-C mit Plasmid pT3SS, früher als pTTSS definiert, kodiert für das Ysc Typ III Sekretionssystem. Keine Yops und kein YopQ vorhanden.	(Trulzsch et al., 2003)
WA (pYV08-515)	Tn5-Insertion in <i>lcrD</i> Gen Sekretionsdefizient	(Ruckdeschel et al., 1996)
WA (pYV, pE _i -X)	Stamm WA-C mit den Plasmiden pYV und pACYC184: SycE-YopE _i -X (YopE-Hybride)	Diese Arbeit
WA (pT3SS, pE _i -X)	Stamm WA-C mit den Plasmiden pT3SS und pACYC184: SycE-YopE _i -X (YopE-Hybride)	
WA Δinv (pT3SS, pE _i -X)	Stamm WA-C Δinv mit den Plasmiden pT3SS und pACYC184: SycE-YopE _i -X (YopE-Hybride)	
WA (pT3SS, pIV-E ₁₃₈ -lpgB ₁)	Stamm WA-C mit den Plasmiden pT3SS und pIV2: SycE-YopE ₁₃₈ -lpgB ₁	
WA (pT3SS, pE ₁₃₈ -lpgB ₂ , pIV-E ₁₃₈ -lpgB ₁)	Stamm WA-C mit den Plasmiden pT3SS und pACYC184: SycE-YopE ₁₃₈ -lpgB ₂ pIV2: SycE-YopE ₁₃₈ -lpgB ₁	
WA (pT3SS, pE ₁₃₈ -P60)	Stamm WA-C mit den Plasmiden pT3SS und pACYC184: SycE-YopE ₁₃₈ -P60	Stammsammlung MvPI
WA (pT3SS, pYopE)	pYopE = pYopESycE	(Trulzsch et al., 2003)
WA (pT3SS, pYopE _{R144A})	Inaktiviertes YopE, As-Substitution 144 aa Arg \rightarrow Ala	Stammsammlung MvPI, (Von Pawel-Rammingen et al., 2000)
WA (pT3SS, pYopT)	pYopT = pYopTSycT	(Trulzsch et al., 2003)

2.3.2) Tabelle 8: verwendete Plasmide

Plasmid	Kommentar	Quelle
pACYC184	Low copy vector Cm ^R , Tet ^R	Chang and Cohen 1978
pIV2	<i>Yersinia</i> Plasmid, kompatibel mit pACYC184, Kan ^R	(Strauch <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Yersinia</i> Plasmid, kompatibel mit pACYC184, Tet ^R	Diese Arbeit
pCJYE18-G3	SycE <i>Sall-Bam</i> HI YopE18- <i>gfp3</i> Fragment in pACYC184	(Jacobi <i>et al.</i> , 1998)
pCJYE53-G3	<i>Sall-Bam</i> HI YopE53- <i>gfp3</i> Fragment in pACYC184	
pCJYE138-G3	<i>Sall-Bam</i> HI YopE138- <i>gfp3</i> Fragment in pACYC184	
pT3SS	Mini pYV, Spec ^R	(Trulzsch <i>et al.</i> , 2003)
pE _i -X	<i>Sall-Bam</i> HI YopE _i -X fragment in pACYC184 i = 18 aa, 53 aa oder 138 aa von YopE, X = IpgB ₁ , IpgB ₂ , Map oder p60	Diese Arbeit
pIV-E ₁₃₈ -X	<i>Xho</i> I- <i>Not</i> I SycE-YopE _i -X fragment in pIV2 plasmid,	Diese Arbeit

2.3.3) Oligonukleotide

Tabelle 9 a: Primer für bakterielle Gene

Name	Sequenz	Schnittstelle
IpgB ₁ for	GTT <u>GGA TCC</u> ATG CAA ATT CTA AAC AAA ATA C	<i>Bam</i> H1
IpgB ₂ for	GTT <u>GGA TCC</u> ATG CTT GGA ACA TCT TTT AAT AAT	
MapEH for	GTT <u>GGA TCC</u> ATG TTT AGT CCA ATG ACA ATGG	
IpgB ₁ rev	ATA <u>GTC GAC</u> TTA ATT TGT ATT GCT TTG ACG GT	<i>Sal</i> I
IpgB ₂ rev	GTT <u>GTC GAC</u> TCA GAA AGG CGA TTC TAA ATT TG	
MapEH rev	AGT <u>GTC GAC</u> CTA CAA TCG GGT ATC CTG T	
SycE for	GCC <u>GAA GCT TGA</u> TAT TGC TGG CAC CAC AAA T	<i>Hind</i> III
SycE for	GCC G <u>CTC GAG</u> GAT ATT GCT GGC ACC ACA AAT	<i>Xho</i> I
IpgB ₁ rev	ATA <u>GCGGCCGC</u> TTA ATT TGT ATT GCT TTG ACG GT	<i>Not</i> I
IpgB ₂ rev	GTT <u>GCGGCCGC</u> TCA GAA AGG CGA TTC TAA ATT TG	
MapEH rev	AGT <u>GCGGCCGC</u> CTA CAA TCG GGT ATC CTG T	
Tet-Bgl II for	TAGT <u>AGATCT</u> TGT TTG ACA GCT TAT CAT CG	<i>Bgl</i> II
Tet-Nco I rev	TAGA <u>CCATGG</u> TTC TTG GAG TGG TGA ATC CG	<i>Nco</i> I

Tabelle 9 b: Primer für Mausgenotypisierungen

Name	Sequenz	Gen
MLys1 for	CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC	Lysozym M
MLys2_2 i rev	CCA TAG TAG CCA GCC ATT CC	
Cre8	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG	Cre Rekombinase
MG1 for	GTC TTG AGT TAC ATC TCT GG	Rac1
MG2 rev	CTG ACG CCA ACA ACT ATG C	
JvH11 for	AGC CAG CCT CTT GAC CGA TTT A	RhoA
JvH15 rev	TGT GGG ATA CCG TTT GAG CAT	
MR6 for	TCT GCC ATC TAC ACA TAC AC	Cdc42
MR7 rev	ATG TAG TGT CTG TCC ATT GG	

2.4.) Nährmedien und Antibiotika

2.4.1) Tabelle 10: Nährmedien (Bakterien)

Die folgenden Nährmedien wurden in H₂O_{dest} angesetzt und anschließend bei 1 bar Druck und 121 °C für 15 min autoklaviert.

Medium	Zusammensetzung	
Luria Bertani Medium (LB Medium)	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
LB-Agar	LB Medium mit 15 g/L Bacto-Agar	
<u>B</u>rain <u>H</u>eart <u>I</u>nfusion Medium (BHI)		37 g/l
Einfriermedium	LB Medium + 20 % Glycerin	
YT Medium	Bacto – Hefeextrakt (0,5%)	5 g/l
	Bacto – Trypton (2 %)	20 g/l
	MgSO ₄ (0,4 %)	20 mM
	KCl	10 mM
	pH 7,6	
SOC Medium	Bacto-Trypton	20 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	KCl	250 mM
	Glucose	20 mM

2.4.2) Tabelle 11: Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Chloramphenicol	70 % Ethanol	10 mg/ml	10 µg/ml
Kanamycin	H ₂ O _{dest}	50 mg/ml	50 µg/ml
Tetrazyklin	70 % Ethanol	20 mg/ml	20 µg/ml
Spectinomycin	H ₂ O _{dest}	50 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycin	H ₂ O _{dest}	100 mg/ml	100 µg/ml

2.5) Tabelle 12: Eukaryotische Zellen und Nährmedien

Zelllinien		
Zellen	Kommentar	Kulturmedien
HeLa	Humane adhärenzte Epithelzellen, Zervix Karzinom	RPMI Medium + 10 % FCS
MDCK	<u>M</u> adin <u>D</u> arby <u>C</u> anine <u>K</u> idney <u>C</u> ells, Nierenepithelzellen aus dem Hund	MEM Medium + 10 % FCS 100 µg/ml Penicilin / Streptomycin
primäre Zellen		
BMDM	„ <u>B</u> one <u>m</u> arrow <u>d</u> erived <u>m</u> acrophages“, aus dem Mausknochenmark ausdifferenzierte Makrophagen	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 10 % FCS 5 % Pferdeserum 1 % Hepes 1 % Na-Pyruvat 1 % L-Glutamin M-CSF (2 ng/ml)

2.6) Molekularbiologische Methoden

2.6.1) Tabelle 13: Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR Rezept	
Komponente	Volumen
PCR Master Mix	45 µl
Primer for + rev	je 0,5 µl
Taq Polymerase	0,5 µl
DNA	Kolonie oder 1µl DNA Lsg.
H ₂ O _{dest}	ad 50 µl

PCR Master Mix	
Komponente	Volumen
10x PCR Puffer	1 ml
2 mM d-NTP	1 ml
H ₂ O _{dest}	ad 9 ml

PCR Programm	
Temp. [° C]	Zeit
94° C	5 min
94° C	1 min
56° C	30 s
72° C	2 min
72° C	10 min
4° C	∞

x 36

2.6.2) Konstruktion von *Yersinia* spezifischen T3SS Substraten (Klonieren)

Die DNA der Gene *ipgB₁*, *ipgB₂* (aus *Shigella flexneri* ST2) und *map* (aus EHEC O157:H7) wurden aus den jeweiligen Stämmen mittels PCR amplifiziert (Tab. 7, 9 a). Dazu wurden die jeweiligen Stämme mit einem Drei-Ösen-Austrich auf LB Agar bei 37° C ÜN kultiviert. Für die PCR wurde von jedem Stamm eine Kolonie gepickt und in ein PCR Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 3 min in der Mikrowelle gekocht. Die PCR wurde nach folgendem Rezept durchgeführt (siehe Tab. 13)

Die Primer für die PCR waren so konstruiert, dass vor dem Startkodon eine *Bam*HI- und nach dem Stoppkodon eine *Sal*I-Schnittstelle eingefügt wurde. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe des PCR Reinigungs Kit von (Machery und Nagel) aufgereinigt und anschließend je 2 h mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I bei 37° C verdaut. Vor dem zweiten Verdaustritt wurden die einzelnen Verdau-Ansätze mittels PCR-Reinigungs Kit gereinigt. Bei Map wurde ein partieller *Bam*HI Verdau durchgeführt, da Map eine interne *Bam*HI Schnittstelle besitzt (Tab. 14). Dazu wurde *Sal*I verdaute Map-DNA für 15 min mit *Bam*HI 1:100 verdünnt verdaut.

Als Vektoren dienten die von C. Jacobi et al. (1998) hergestellten GFP Translokationskonstrukte (pCJYE18-G3, pCJYE53-G3, pCJYE138-G3) auf pACYC184 Basis. Bei diesen Konstrukten wurde GFP an unterschiedlich lange N-Termini von YopE fusioniert. Mittels Restriktionsverdau (siehe Tab. 14) wurde das *gfp*-Fragment entfernt und durch entweder *ipgB*₁ *ipgB*₂ oder *map* ersetzt. Dazu wurden die verdauten Vektoren und PCR Produkte gelelektrophoretisch getrennt, die jeweilige Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Gel-Reinigungs Kit (Machery und Nagel) aufgereinigt und ÜN bei 17° C ligiert (siehe Kap. 2.6.2).

Tabelle 14: Reaktionsansätze

Inserts
52 µl DNA
2 µl RE
6 µl 10x RE Puffer
gesamt 60 µl

Partialverdau Map
30 µl Sal I verdaute DNA
18 µl BamH1 1:100
6 µl 10x BamH1 Puffer
6 µl H ₂ O _{dest}
gesamt 60 µl

Vektoren
12 µl DNA
2 µl RE
6 µl 10x RE Puffer
40 µl H ₂ O _{dest}
gesamt 60 µl

2.6.3) Ligation

Tabelle 15: Ligationsansatz

Die Ligationen wurden so angesetzt, dass die „Insert-DNA“ ungefähr im dreifachen Überschuss bezogen auf die Vektor-DNA vorlag. Die Ansätze wurden ÜN bei 17° C inkubiert. Die erhaltenen Ligationsansätze wurden wie in Kap. 2.7 beschrieben in *E. coli* transformiert.

Ligation	
Insert DNA	5 µl
Vektor	5 µl
Puffer 10x	2 µl
Ligase	1 µl
Tris oder H ₂ O	7 µl

gesamt 20 µl

2.6.4) Protein Präzipitation

Um die Proteine zu präzipitieren, wurden die Lösungen mit TCA versetzt (10 % Endkonzentration) und ÜN bei 4° C präzipitiert. Das Präzipitat wurde 30 min bei 10.000 rpm bei 4° C sedimentiert und das Sediment in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Proteine mit 0,4 Vol. eiskaltem Aceton für 1 h auf Eis gefällt. Das Präzipitat wurde erneut für 30 min bei 10.000 rpm bei 4° für 30 min sedimentiert. Das Präzipitat wurde in 1 ml eiskalten Aceton resuspendiert und bei 4° C und 14.000 rpm für 3 min sedimentiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Sediment im Speedvac für 2 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet mit 30 – 50 µl PBS resuspendiert und bei -20° C gelagert.

2.6.5) Tabelle 16: Versuchsprotokoll für SDS-PAGE und Westernblot

A

Rezept Proteingel			
Substanz	11% iges Gel	15% iges Gel	4% iges Gel
1 M Tris HCl pH 8,8	3,75 ml		1,25 ml, 250 mM Tris HCl pH6,8
30 % iges Acrylamid	3,7 ml	5 ml	0,35 ml
10% SDS	0,2 ml		50 µl
H ₂ O _{dest}	2,35 ml	1,05 ml	0,85 ml
10 ml gesamt			2,5 ml gesamt
10% APS	40 µl		15 µl
TEMED	20 µl		15 µl

B

Rezept 1x Laemmli Puffer	
10 x Laemmli Puffer	100 ml
10 % SDS	10 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

10x Laemmli Puffer	
Tris	30,2 g
Glycin	142,6 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Rezept Blot Puffer	
10x Laemmli Puffer	100 ml
Methanol	200 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

C

Coomassie Färbelösung	
Coomassie Brillant Blue	1,25 g
Eisessig	46 ml
Methanol	227ml
H ₂ O _{dest}	227ml

Coomassie Entfärbelösung	
Essigsäure	140 ml
Methanol	400 ml
H ₂ O _{dest}	1460 ml

Die Proteine wurden nach der von Laemmli beschriebenen Methode im SDS Polyacrylamid Gel aufgetrennt (Laemmli, 1970). Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurde der Polyacrylamidanteil und damit die Auftrennungsbedingungen der Gele variiert.

Für die Untersuchung der YopE Fusionsproteine wurden 11 % ige, für die Analyse der Rho GTPasen 15 % ige Polyacrylamid Gele verwendet (Gel Rezept siehe Tab. 16). Nachdem das Laufgel auspolymerisiert war, wurde das Gel mit einem geringer konzentrierten Sammelgel überschichtet, um scharfe distinkte Banden zu erhalten. Je Spur wurden ca. 30 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Das Gel wurde mit 40 V für ca. 30 min in Laemmli Puffer betrieben bis die Lauffront die Gelgrenze des Probengels erreicht hatte. Danach wurde die Spannung auf 120 V und damit auch die Laufgeschwindigkeit der Proteine erhöht. Sobald die Lauffront den Anoden-Gelrand erreicht hatte, wurde die Auftrennung beendet. Je nach Anwendung wurden die aufgetrennten Proteine entweder mittels Coomassie-Färbung oder mittels Westernblot detektiert. Durch Coomassie-Färbung werden alle aufgetrennten Proteinbanden unspezifisch gefärbt. Dazu wurden die SDS Gele für 10 min in der Coomassie-Färbelösung (siehe Tab. 16 C) bei RT inkubiert und anschließend so lange mittels Entfärbelösung (Tab. 16 C) entfärbt, bis einzelne Proteinbanden sichtbar waren. Um bestimmte Proteine zu identifizieren, wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (BA85, Schleicher & Schuell, Elektrolot/BioRad). Dazu wurde das Gel auf eine Nitrocellulose-Membran gebracht und mit Whattman Papier bedeckt (Abb. 12). Die Proteine wurden für 1 h bei 80 V auf die Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Nitrocellulose-Membranen wurden über Nacht bei 4° C mit 20 % FCS und 0,05 % Tween 20 in PBS inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Je nach zu untersuchendem Protein wurden die Nitrocellulose-Membranen mit unterschiedlichen Antikörpern unterschiedlich lang inkubiert.

Tabelle 16: Reaktionsansätze für Immunoblotting

Substratpuffer		Gebrauchslösung	Reaktionslösung
Diethanolamin	10 % in H ₂ O, pH 9,6	Substratpuffer 1 : 5 verdünnt in physiologischer NaCl Lsg	9 ml Gebrauchslösung
		1 M MgCl ₂ 1 : 5000 verdünnt	1 ml NBT (1mg / ml in H ₂ O)
			0,1 ml BCIP (5mg/ml in Dimethylformamid)

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Membranen 3 x mit PBS 0,05 % Tween 20 gewaschen und je nach Primärantikörper ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Sekundärantikörper für 30 min - 1 h (siehe Tab. 6) auf die Nitrocellulose-Membran gegeben. Danach wurden die Membranen erneut 3 x mit PBS 0,05 % Tween 20 gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit NBT / BCIP Lösung (siehe Tab. 17) bei RT. Die Inkubation erfolgte bei RT für 10 – 30 min. bis Banden auf der Nitrocellulose Membran sichtbar waren. Die Reaktion wurde mittels $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gestoppt.

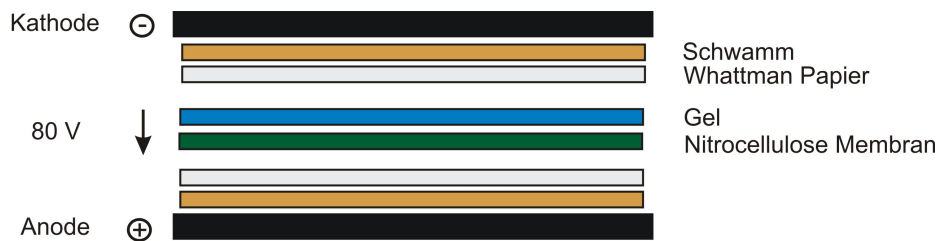


Abb. 12 Schematische Darstellung des elektrophoretischen Proteintransfers, Mini-Transblotkammer/BioRad

2.6.6) Sekretion und zelluläre Translokation der Hybridproteine

Yersinien wurden über Nacht in BHI bei 27° C schüttelnd inkubiert und am Folgetag 1:20 in BHI mit 0,2 mM CaCl_2 verdünnt und, je nachdem ob Sekretion induziert werden sollte, für 2 oder 4 h bei 27° C schüttelnd inkubiert. Für die Sekretionsinduktion wurden die Kulturen mit 5 mM EGTA versetzt und bei 37° C für weitere 2 h bis zu einer $\text{OD}_{600} \sim 0,3 - 0,5$ inkubiert. Die Kulturen wurden bei 5.000 rpm 4° C für 15 min sedimentiert und die Proteine im Überstand mittels TCA und Aceton Behandlung präzipitiert (siehe Kap. 2.6.5).

Das HeLa-Zell-Kulturinfektionsmodell wurde für die Yop-Translokationsanalyse verwendet. Dazu wurden HeLa-Zellen in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm^2) so ausgesät, dass am Infektionstag 80 % konfluente Zellrasen zur Verfügung standen. Eine Yersinien Übernachtskultur wurde 1:20 in BHI verdünnt und bei ~ 5 h bei 37° C inkubiert. Die HeLa-Zellen wurden mit einer „Multiplicity Of Infection“ (MOI) ~ 10 infiziert und für 2 h bei 37° C 5 % CO_2 inkubiert. Die Infektionsüberstände wurden für 60 s mit 1 ml Proteinase K (PK, 500 μg / ml in PBS) bei RT inkubiert.

Anschließend wurden 800 μl der Proteinase K Lösung entfernt, so dass noch ein kleiner Proteinaselösungsfilm auf den Zellen war, der kontaminierende sekretierte Proteine verdaute.

Nach 20 min Inkubation wurden 500 µl frisch zubereitetes PMSF (4 mM in PBS, PMSF = Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid) auf die Zellen gegeben, um die Proteinase PK-Aktivität zu inhibieren. Ein Teil der Ansätze wurde mit 400 µl Digitonin (1 % in PBS) 10 min bei RT lysiert und der andere Teil der Ansätze wurde mit PBS für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen in Eppendorf Gefäße überführt und für 10 min bei 4° und 13.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden mit TCA und Aceton Behandlung für die Westernblot Analyse (Kap. 2.6.5) vorbereitet.

2.6.7) Zelllysat von „bone marrow derived macrophages“ (BMDM)

Die adhärennten ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen (BMBM) wurden für 15 min im Kühlschrank gekühlt, um die Zellen von der Oberfläche zu lösen. Danach wurden die Zellen von der Plastikoberfläche abgeschabt, mit dem Medium gesammelt und die Zellzahl bestimmt (Kap 2.8.3). Die Zellen wurden bei 5 min, 800 rpm 4° C pelletiert und das Medium vollständig abgenommen. Für die Zelllyse wurden pro 10⁷ Zellen 100 µl Lyse Puffer verwendet. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 15.000 rpm, 4° C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand (Lysat) wurde abgenommen und das Sediment verworfen. Die Protein Konzentration des Lysats wurde mittels Proteinbestimmung nach Lowry bestimmt (Kap 2.6.9).

Tabelle 18: Verwendeter Zelllysepuffer

Lysepuffer	
Tris / HCl, pH 7,4	50 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	2mM
Glycerin	10%
NP40	0,1%
Protease Inhibitor Cocktail	01:20

2.6.8) Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Tabelle 19: Verwendete Lösungen für Proteinkonzentrationsbestimmungen

Reagenz A		Reagenz B	
2 % Na ₂ CO ₃	2 g	4 % CuS ₄ * 5H ₂ O	200 mg / 5 ml H ₂ O
1 % SDS	1 g		
0,16 % K-Na-Tartrat	160 mg		
0,4 % NaOH	100 ml 0,1 M		

Reagenz C
100 ml Reagenz A
1 ml Reagenz B

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde eine Proteinbestimmungsreaktion nach Lowry durchgeführt (LOWRY et al., 1951). Dazu wurden 3 ml Reagenz C mit 1 ml Probe oder Standard versetzt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden 300 µl Folin (1 : 2 verdünnt) hinzugefügt. Nach 45 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 750 nm gemessen. Mit Hilfe des Protein Standards wurde die unbekannte Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

2.7) Mikrobiologische Methoden

2.7.1) Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

Alle Bakterienstämme wurden in (LB Medium / 20% Glycerin) bei – 80° C gelagert.

2.7.1.1) *E. coli*

Die *E. coli* Stämme wurden, soweit nicht anders vermerkt, in LB Medium mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum unter Schütteln (190 rpm) bei 37° C inkubiert.

2.7.1.1.1) Herstellung Calcium-kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden Ca-kompetente *E.coli* verwendet. Dazu wurden *E. coli* ÜN in YT Medium bei 37° C kultiviert und am folgenden Tag 1 : 100 in YT Medium verdünnt und ca. 3 h inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ 0,4 – 0,5 hatte. Anschließend wurde die Kultur 10 min auf Eis gekühlt und 10 min bei 4° C und 3.000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 30 ml eiskaltem TFB1 Puffer pro 100 ml Kulturvolumen resuspendiert. Die Suspension wurde erneut 10 min bei 4° C und 3.000 rpm abzentrifugiert und das erhaltene Sediment in 4 ml TFB2 Puffer pro 100 ml Kulturvolumen resuspendiert. Die Bakterien wurden zu 50 µl auf Trockeneis aliquotiert und anschließend bei – 80° C gelagert.

Tabelle 20: Verwendete Pufferlösungen für Transformation von *E. coli*

TFB 1 Puffer		TFB 2 Puffer	
KAc	30 mM	Mops pH 7,0	10 mM
MnCl ₂ (4H ₂ O)	50 mM	CaCl ₂	75 mM
RbCl ₂	100 mM	RbCl ₂	10 mM
CaCl ₂ (2H ₂ O)	10 mM	Glycerin	15%
Glycerin	15%	pH 7,0 (mit HCl titrieren)	
pH 5,8 (mit HAc titrieren)			

2.7.1.1.2) Transformation Calcium-kompetenter *E. coli* Zellen

50 µl Ca²⁺ – kompetente *E. coli* wurden 20 min auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach exakt 90 s bei 42° C wurden die Zellen 5 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 37° C in SOC Medium für 1 h inkubiert und danach auf LB Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

2.7.1.2) *Yersinia enterocolitica*

Yersinien wurden soweit nicht anders vermerkt in BHI Medium bei 27° C mit entsprechenden Selektionsantibiotika schüttelnd (190 rpm) inkubiert.

2.7.1.2.1) Herstellung elektrokompetenter Yersinien

Für die Transformation von Yersinien wurden elektrokompetente Zellen verwendet. Dazu wurden die Zellen ÜN in LB Medium bei 27° C kultiviert und am folgenden Tag 1 : 50 in LB Medium verdünnt und ca. 4 - 5 h inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von ~ 0,5 erreichte. Anschließend wurde die Kultur 30 min auf Eis gekühlt und schließlich für 15 min bei 4° C und 4.000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde volumenäquivalent zum Kulturvolumen in eiskaltem H₂O resuspendiert und erneut 15 min bei 4° C und 4.000 g abzentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 1/2 Kulturvolumen eiskaltem H₂O resuspendiert, anschließend 15 min bei 4° C und 4.000 g zentrifugiert und das erhaltene Sediment in 1/50 Kulturvolumen H₂O (10 % Glycerol) resuspendiert und nochmals 15 min bei 4° C und 4.000 g sedimentiert. Das erhaltene Sediment wurde in 1/333 Kulturvolumen H₂O (10 % Glycerol) resuspendiert und in 40 µl Aliquots bei – 80°C gelagert.

2.7.1.2.2) Elektrotransformation

40 µl elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl DNA Lösung (ca. 200 – 500 ng) in vorgekühlten Elektroporationsküvetten (BioRad) versetzt. Die Zellen wurden bei U = 2,5 kV, R = 200 Ω und C = 25 µF und t ~ 4 ms elektroporiert.

Die elektroporierten Zellen wurden in 800 µl Soc Medium resuspendiert und für 1 h bei 27° C inkubiert und anschließend auf entsprechenden LB Selektionsagarplatten plattiert und für 24 – 48 bei 27° C inkubiert.

2.7.1.2.3) Vorbereitung der *Yersinia* Stämme für Infektionsversuche

Yersinien wurden in BHI bei 27° C ÜN unter Schütteln inkubiert und am Folgetag 1:20 in BHI verdünnt und bei 37° schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 0,5 inkubiert (ca. 3 - 4h).

2.8) Zellbiologische Methoden

2.8.1) Kultivierung und Konservierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Kultivierung wurden die Zellen zunächst für 1 min in einem 37° C Wasserbad aufgetaut und anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. 10 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium wurde den Zellen langsam tröpfchenweise zur Adaptation an das Zellkulturmedium hinzugeführt. Die so erhaltene Zellkultursuspension wurde in weiteren 10 ml vorgewärmten Zellkulturmedium (siehe Tab. 12) aufgenommen und in einer Zellkulturflasche (80 cm² Nunc) ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt. Die so ausgesäten Zellen wurden bei 37° C und 5 % CO₂ gesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden passagiert sobald 80 % Konfluenz erreicht waren. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml PBS (Zellkulturflasche 80 cm² Nunc) gewaschen und 3 min bei 37° C mit 2 ml Trypsin EDTA (Invitrogen) inkubiert. Die sich ablösenden Zellen wurden in 8 ml Zellkulturmedium aufgenommen und je nach gewünschtem Dichtegrad in neuen Zellkulturflaschen (80 cm² Nunc) mit vorgelegtem Zellkulturmedium ausgesät.

2.8.2) Kryokonservierung von Zelllinien

Die Zellen wurden für 5 min bei 1.000 rpm und 4° C sedimentiert und das Sediment in 1,5 ml vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und in vorgekühlten Kryoröhrchen ÜN bei - 80° C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium: 10 % DMSO in FKS

2.8.3) Bestimmung der Lebendzellzahl

Das Aussäen von definierten Zellkonzentrationen erforderte die genaue Bestimmung der Zellanzahl in Suspension. Dazu wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 90 µl Tryphanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verdünnt. Von dieser Lösung wurden 10 µl in eine Neubauer-Zellkammer gegeben. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde die Anzahl der Zellen pro Großquadrat ausgezählt.

Die absolute Zellzahl/ml Suspension wurde unter Berücksichtigung des Kammerfaktors wie folgt bestimmt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = u \times 10 \times 10^4$$

sei u Anzahl ungefärbter Zellen pro Großquadrat
 10 = Verdünnungsfaktor
 10⁴ Kammerfaktor

2.8.4) In vitro Infektionen mit Yersinien

2.8.4.1) Infektionen von HeLa Zellen

Tabelle 21: Übersicht über die Zellzahlen pro Infektionsansatz

Versuch	Anzahl Zellen / Infektionsansatz	Versuchsbedingung
Invasionstest	2,4 x 10 ⁵	24 Well Platten
Visualisierung des Aktinzytoskeletts	2,0 x 10 ⁵	24 Well Platten mit Coverslips
Propidiumiodid (PI) Färbung	2,4 x 10 ⁵	24 Well Platten mit Coverslips
LDH release Assay	1 x 10 ⁵	96 well Platten

HeLa Zellen wurden am Tag vor der Infektion je nach Versuch unterschiedlich ausgesät, so dass die Zellen am Infektionstag konfluent waren (siehe Tab. 21). Es wurde jeweils die Hälfte pro gewünschtem Infektionsansatz ausgesät, da eine Verdopplung der Zellzahl ÜN angenommen wurde, so dass die Zellen am Infektionstag konfluent waren.

2.8.4.1.1) Untersuchung der Yersinien-Invasion von HeLa-Zellen

Im Rahmen der Invasionsstudien wurden diverse Inhibitoren verwendet. Dazu wurden die HeLa Zellen mit 100 µM Rac1 Inhibitor (NSC23766, Calbiochem) oder 20 µM ROCK Inhibitor (Y27632, Calbiochem) für 1 h oder 1 µM PI-3-Kinase Inhibitor (Wortmannin) für 30 min präinkubiert. Die HeLa Zellen wurden mit der MOI ~ 10 infiziert. Dazu wurden die *Yersinien* wie (Tab. 21) angegeben kultiviert und die entsprechende Keimzahl (= 10 x 2,4 * 10⁵ / Ansatz) in 500 µl / Infektionsansatz vorgewärmten RPMI Medium auf die Zellen gegeben.

Anschließend wurden die Bakterien für 10 min bei 1.000 rpm auf die Zellen zentrifugiert, um die Infektion zu synchronisieren. Weiterhin wurde ein Infektionsansatz auf 1 ml aufgefüllt und die CFU Werte bestimmt (Input). Nach 30 min Infektionszeit bei 37°C / 5 % CO₂ wurden die Zellen 3 x mit RPMI1640 gewaschen und anschließend weitere 1,5 h mit RPMI Medium + 50 µg / ml Gentamicin bei 37 ° 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut 3 x mit RPMI1640-Medium gewaschen und anschließend mit 200 µl / Well 1 % Triton-X 100 in PBS 5 min lysiert. Das Lysat wurde in 800 µl LB Medium aufgenommen und in den Verdünnungsstufen 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² und 10⁻³ auf entsprechendem Selektiv LB Agar ausplattiert und bei 27° C für 48 h inkubiert. Die erhaltenen CFU Werte (Output) wurden mit den erhaltenen Anfangswerten (Input) ins Verhältnis gesetzt, um die Invasionsrate eines Infektionsansatzes zu bestimmen.

$$\text{Relative Invasion} = \frac{\text{Output}}{\text{Input}} \times 100\%$$

2.8.4.1.2) Visualisierung des zellulären Aktinzytoskeletts

Konfluente HeLa Zellen wurden für 2 h in serumfreien Medium inkubiert (Tab. 21), da Serum als RhoA Aktivator Aktin-Stressfasern induziert. Die Infektion wurde analog zum Invasions Assay durchgeführt ohne jedoch die Zellen zu lysieren. Nach 2 h Infektionszeit wurden die Zellen mit 3,7 % PFA für 10 min in RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Aceton permeabilisiert und die Aktinfilamente mit TRITC-Phalloidin 1:100 (Stock 6,6 µM, Invitrogen) verdünnt in PBS für 20 min gefärbt. Zusätzlich wurden die Zellkerne und Bakterien mit DAPI 1:100 in PBS verdünnt (Stock 200 µg/ml) 15 min gefärbt. Die Präparate wurden in 8 µl Mowiol eingedeckelt und die Ränder mit durchsichtigem Nagellack versiegelt.

2.8.4.1.3) Zytotoxizitätsbestimmung / Lactatdehydrogenase (LDH) Freisetzung

HeLa Zell-Monolayer wurden mit verschiedenen Yersinien Stämmen unterschiedlich lang infiziert. Zellkulturüberstände wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten gesammelt.

Die LDH Menge wurde entsprechend der Herstellerangaben bestimmt (CytoTox 96 non radioactive Assay, Promega). Nach 30 min Inkubationszeit mit dem Substrat wurde die Reaktion gestoppt, die Absorption bei 490 nm mittels ELISA Messgerät gemessen. Die LDH Freisetzung wurde wie folgt bestimmt: für die Positivkontrolle wurden die Zellen mittels 10 % Triton für 5 min lysiert. Dieser erhaltene Wert entspricht der LDH Gesamtfreisetzung (100 %)

$$\text{LDH} = \frac{(\text{LDH}_{\text{infizierte Probe}}) - (\text{LDH}_{\text{uninfizierte Probe}})}{(\text{LDH}_{\text{lysierte Probe}}) - (\text{LDH}_{\text{uninfizierte Probe}})} \times 100\%$$

2.8.4.1.4) Propidiumiodid Färbung

Nach 3 h Infektionszeit wurden HeLa Monolayer 3 x mit vorgewärmten PBS gewaschen und unfixiert für 15 min mit Propidiumiodid (PI, 1:100 verdünnt, Miltenyi Biotec) in PBS gefärbt. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen, für 10 min in 3,7 % Formalin fixiert und 15 min mit DAPI gefärbt, erneut 3 x mit PBS gewaschen und in 8 µl Mowiol eingedeckelt. Bei der positiv Kontrolle wurde die Zelle vor der Propidiumiodid Färbung mit Formalin fixiert, was die Membranintegrität stört, so dass das Propidiumiodid in die Zelle gelangen kann. Die Proben wurden unmittelbar nach der Färbung mikroskopisch analysiert.

2.8.4.2) Infektion von MDCK Zellen mit Yersinien

Die Hundenierenzelllinie MDCK kann unter bestimmten Kulturbedingungen polarisierte Monolayer ausbilden. Dazu wurden 5×10^4 Zellen in je einem Transwell (12 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße) in 500 µl MEM Medium ausgesät. In die untere Kammer (siehe Fig. 13) wurden 1,5 ml Medium vorgelegt. Das Medium wurde täglich gewechselt und am dritten Tag waren die Zellen polarisiert (TER ~ 250 – 300 Ωcm²) und bereit für Infektionsversuche. Für die TER Analyse wurden die MDCK Zellen im Transwell mit einer MOI ~ 10 infiziert.

2.8.4.2.1) Transepitheliale Resistenz (TER) Messung

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) wurde mit dem Gerät Millicell-ERS (Millipore) bestimmt. Dazu wurden die Elektroden zunächst für 15 min in 70 % Ethanol sterilisiert und anschließend unter einer sterilen Werkbank luftgetrocknet und in PBS bis zur Anwendung gelagert. Während der Messung wurde die kürzere Elektrode in die obere Kammer („Transwell“) und die längere in die untere Kammer getaucht. Der gemessene Wert gab den elektrischen Widerstand zwischen der Zellschicht / „Transwell Membran“ und der unteren Kammer an. Um den tatsächlichen elektrischen Widerstand (R) der Zellschicht zu ermitteln wurde der Leerwert (Transwell ohne Zellen) von den jeweiligen gemessenen R-Werten (Transwell mit Zellen) subtrahiert. Die TER-Werte ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) wurden wie in Abb. 13 beschrieben bestimmt und berechnet.

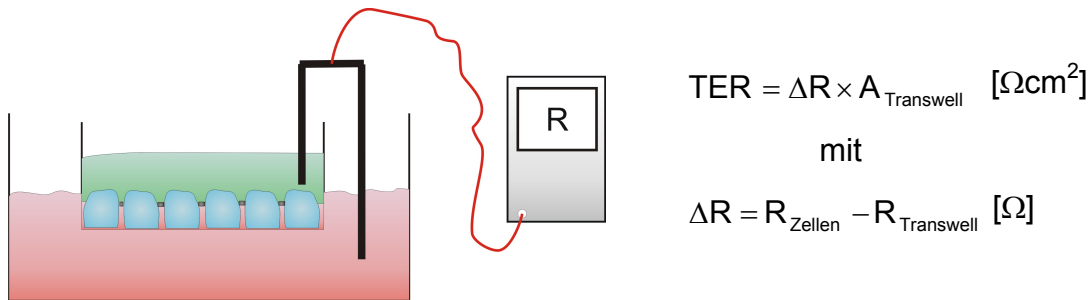


Abb. 13 Schematischer Aufbau zur TER Messanordnung: R = elektrischer Widerstand Ω
A: Transwellfilterfläche, cm^2

2.8.5) „Fluoreszenz activated cell sorting“ (FACS)

Die Zellen von den Milzen infizierter Mäuse wurden mittels Zellsieb vereinzelt und in 5 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen. Nach 7 min bei RT wurde die Lyse mit 5 ml RPMI Medium gestoppt. Die Zellen wurden bei 1500 rpm für 7 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 5 ml RPMI Medium resuspendiert und die Zellen mit einfachem Filtergewebe (80 μm) gefiltert. Für die Färbung wurden 10^6 Zellen verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst 10 min in Fc Block (10 μl auf 100 μl FACS Puffer) im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden 100 μl FACS Puffer hinzugefügt und die Zellen bei 1.500 rpm sedimentiert und erneut mit 200 μl FACS Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 100 μl Antikörpermischungen für 45 min gefärbt (siehe Tabelle 22 A, B).

Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 150 – 200 µl FACS Puffer gewaschen und anschließend in 150 µl FACS Puffer mit Propidiumiodid aufgenommen und dann am FACS-Gerät analysiert.

Tabelle 22 a: Puffer und Antikörper für FACS-Analyse

Erythrozyten Lyse Puffer		FACS Puffer	
Ammoniumchlorid	15 M	PBS	1.000 ml
Tris HCl	0,017 M	BSA	5 g
gesamt pH Wert	7,4	Na-Azid (30 % ig in H ₂ O)	660 µl

Tabelle 22 b: FACS-Antikörper / Reagenzien

	Epitop	Wirt	Konzentration	Hersteller
A	CD3e.FITC clone 145-2C11	Armenian Hamster IgG1	je 1µg pro 10 ⁶ Zellen	BD
	CD19-APC-Cy7 clone 1D3	Rat IgG2a		
	CD49b-APC clone HMα2	Armenian Hamster IgG1		
B	F4 / 80 Pacific Blue, clone BM8	Rat IgG2a		Caltag (Invitrogen)
	Cd11c-PE-Cy7, clone HL3	Hamster IgG1		BD
	Ly6G-FITC clone 1A8	Rat IgG2a		Miltenyi Biotec
	Ly6C-APC clone 1G7.G10	Rat IgG2a		
	Cd11b-APC-Cy7 clone M1/70	Rat IgG2b		
C	FC Block, Rat-α-mouse, CD16/CD32FC _γ III / II	Rat	10 µl auf 100 µl Puffer pro 10 ⁷ Zellen	Miltenyi Biotec
	Propidium Iodid	---	1:100	

2.9) Mauszucht, Mausinfektionsversuche und Isolierung primärer Zellen

2.9.1) Mauslinien und Zuchtbedingung

Zuchtziel war die Erstellung konditionaler Rho GTPasen „knockout“ Mäuse, die die konditionale Gendeletion in Makrophagen und Granulozyten haben. Dazu wurden 129Sv / C57/Bl6 Hybrid-Mäuse mit folgenden Genotypen hergestellt: Rac1^{fl/fl} *lysM::cre* / *lysM::cre*, RhoA1^{fl/fl} *lysM::cre* / *lysM::cre*, Cdc42^{fl/fl} *lysM::cre* / *lysM::cre*, sowie Rac1, RhoA, Cdc42^{+/+} *lysM::cre* / *lysM::cre*.

Die homozygoten Mäuse der F3 Generation exprimieren die Cre-Rekombinase in den Makrophagen und Granulozyten wodurch eine Excision der jeweiligen Rho GTPasen in Makrophagen und Granulozyten stattfinden sollte. Zunächst wurden die $Rac1^{fl/fl}$, $RhoA^{fl/fl}$ und $Cdc42^{fl/fl}$ Mäuse jeweils mit homozygoten $lysM::cre$ Mäusen verpaart. Die doppelt heterozygoten Nachkommen der F1 Generation wurden untereinander verpaart, und die homozygoten Nachkommen $Rac1^{fl/fl} lysM::cre / lysM::cre$, $RhoA^{fl/fl} lysM::cre / lysM::cre$, $RhoA^{fl/fl} lysM::cre / lysM::cre$, sowie $Rac1$, $RhoA$, $Cdc42^{+/+} lysM::cre / lysM::cre$ der F2 Generation wurden ebenfalls verpaart (Abb. 14). Diese Nachkommen bilden die F3 Generation und wurden für die in Kap. 2.9.3 beschriebenen Versuche verwendet.

Tabelle 23: Überblick Mauslinien

Überblick Mauslinien		
Generation	Mauslinie	Mausstamm
F0 Generation	Rac1 fl/fl	129Sv
	RhoA fl/fl	
	Cdc42 fl/fl	
	$LysM::cre$	C57/Bl6
F1 Generation	$Rac1 fl/fl \times lysM::cre$	129Sv / C57/Bl6 Bastarde
	$RhoA fl/fl \times lysM::cre$	
	$Cdc42 fl/fl \times lysM::cre$	
F2 Generation	$Rac1 fl/+ lysM / lysM::cre$	
	$RhoA fl/+ lysM / lysM::cre$	
	$Cdc42 fl/+ lysM / lysM::cre$	
F3 Generation	$Rac1 fl/fl lysM::cre / lysM::cre$	
	$RhoA fl/fl lysM::cre / lysM::cre$	
	$Cdc42 fl/fl lysM::cre / lysM::cre$	
	$Rac1 +/+ , RhoA +/+ , Cdc42 +/+ , lysM::cre / lysM::cre$	

Die Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen bei 20° - 24°C und 50 % ± 5 % Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Dazu wurden die Mäuse in Typ2 (530 cm²) oder Typ3 (800 cm²) Käfigen mit Einzelfrischlufzufuhr gehalten und einmal wöchentlich in frische Käfige mit frischer steriler Wasserzufuhr umgesetzt. Für die F3 Generation wurden jeweils zwei Weibchen mit einem Männchen verpaart, um die Wurfgröße zu erhöhen. Die Nachkommen wurden nach 3 Wochen abgesetzt und biopsiert (Schwanzspitze).

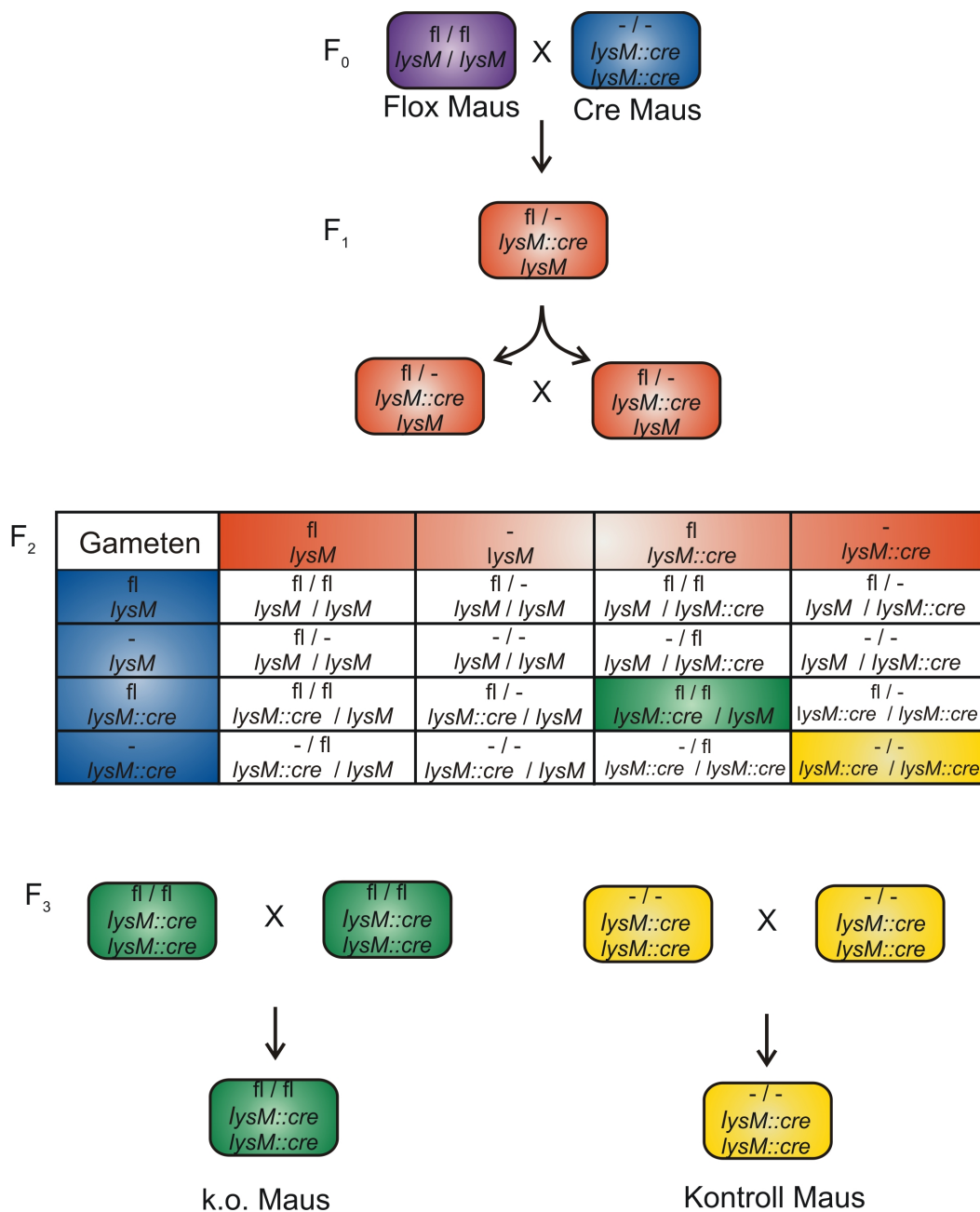


Abb. 14 Kreuzungsschema der konditionalen Knockout Mäuse. Die Rho GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 sollen zellspezifisch deletiert werden.

In der F₀ Generation wurde eine homozygote im GTPase-Gen „gefloxt“ (fl/fl) Maus mit einer homozygoten LysM Cre Maus (Cre Gen unter *lysM*-Promotorkontrolle, *lysM*: Lysozymgen) verpaart. Der *lysM* Promotor ist zellspezifisch in Makrophagen und Neutrophilen aktiv. In der F₃ Generation werden zwei Maustypen erhalten; die homozygot „gefloxt“ und homozygoten *lysM::cre* Mäuse, die die konditionalen Gendeletion je einer RhoGTPase haben (grüne Markierung). Weiterhin wurden „ungefloxt“ homozygote *lysM::cre* Mäuse als wildtypähnliche Mäuse / Kontrollmäuse verwendet (gelbe Markierung)“.

2.9.2) Genotypisierung und Biopsieentnahme

Die zu biopsierenden Mäuse wurden für ca. 20 – 30 s (je nach Stamm, Alter und Gewicht) mit Diethylether narkotisiert. Anschließend wurden ca. 2 - 4 mm der Schwanzspitze mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Die Wunde wurde zunächst abgedrückt und anschließend mittels Histoacryl Gewebekleber versiegelt.

Die DNA der Biopsien wurde mit Hilfe des Kits Roche high pure PCR Template Preparation Kit isoliert. Dazu wurden die erhaltenen Biopsien mit einem Lysepuffer ÜN bei 55°C inkubiert und das Lysat über die Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die erhaltene DNA wurde je nach zu untersuchendem Merkmal (Tab. 24) mit den in Kap. 2.3.3 in Tab. 9 angegebenen Primern und den in Kap. 2.6.1 angegebenen PCR Rezept eingesetzt.

Tabelle 24: Genotypisierungsergebnisse (PCR) der gezüchteten Mauslinien

PCR Überblick über die Mauslinien		
Generation	Mauslinie	PCR
F0 Generation	Rac1 fl/fl	Rac1, LysM Cre
	RhoA fl/fl	RhoA, LysM Cre
	Cdc42 fl/fl	Cdc42, LysM Cre
	LysM::cre	Rac1, RhoA, Cdc42, LysM Cre
F1 Generation	Rac1 fl/fl X LysM::cre	Rac1, LysM Cre
	RhoA fl/fl X LysM::cre	RhoA, LysM Cre
	Cdc42 fl/fl X LysM::cre	Cdc42, LysM Cre
F2 Generation	Rac1 fl/+ LysM/LysM::cre	Rac1, LysM Cre
	RhoA fl/+ LysM/LysM::cre	RhoA, LysM Cre
	Cdc42 fl/+ LysM/LysM::cre	Cdc42, LysM Cre
F3 Generation	Rac1 fl/fl LysM::cre/LysM::cre	Rac1, LysM Cre
	RhoA fl/fl LysM::cre/LysM::cre	RhoA, LysM Cre
	Cdc42 fl/fl LysM::cre/LysM::cre	Cdc42, LysM Cre
	Rac1 +/+, RhoA +/+, Cdc42 +/+, LysM::cre/LysM::cre, Kontrollmaus	Rac1, RhoA, Cdc42, LysM Cre

2.9.3) Mausinfektionsversuche

Die Mäuse wurden intraperitoneal (i.p.) mit den Stämmen *Salmonella* Typhimurium Stamm SL1344 oder mit *Yersinia enterocolitica* Stamm WA (pYV) infiziert. Dazu wurden die Salmonellen zunächst ÜN bei 37° C in LB Medium schüttelnd (190 rpm) kultiviert und am Folgetag 1:25 verdünnt und stehend für ~4 h in LB Medium (0,2 M NaCl, SPI-1 Induktion) bis zu einer OD₆₀₀ 0,5 bei 37° C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend so verdünnt, so dass ca. 10⁵ CFU / ml Infektionsansatz vorlagen. Von diesem Infektionsansatz wurden 100 µl i.p. appliziert so, dass jede Maus mit 10⁴ Salmonellen infiziert wurde. Für die Yersinien-Infektion wurde der Stamm WA (pYV) zunächst mausspassagiert, um eine homogene virulente Population zu selektionieren. Dazu wurden die Yersinien ÜN bei 27° C schüttelnd in LB Medium inkubiert. 1 ml der ÜN Kultur wurde bei 10.000 rpm zentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden einer Maus 25 µl i.p. appliziert. Am Folgetag wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Dazu wurde die Maus in CO₂ euthanisiert und das Bauchfell geöffnet. Dabei wurde das Coelom (Peritoneum) nicht beschädigt. Der Peritonealraum wurde mit 5 ml PBS gespült. Die so gewonnene Suspension wurde auf CIN Agar (*Yersinia*-selektiv-Agar) ausplattiert und bei 27° C inkubiert. Am Folgetag wurden 120 ml LB Medium durch eine Kolonie der zuvor aus der Maus isolierten *Yersinien* angeimpft und ÜN bei 27° C schüttelnd inkubiert.

Die Bakterien wurden am Folgetag bei 5.000 rpm für 15 min sedimentiert und anschließend in 10 ml glycerinhaltigem LB Medium vollständig resuspendiert, auf Eppendorfgefäße verteilt und bei -80° C gelagert. Am Folgetag wurde eine Keimzahlbestimmung durchgeführt. Dazu wurden die Verdünnungsstufen 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ ausplattiert. Für den Mausinfektionsversuch mit Yersinien wurden die eingefrorenen Bakterien für 10 min auf Eis aufgetaut und entsprechend der zuvor bestimmten Keimzahl so verdünnt, dass im Infektionsansatz 10⁵ Bakterien / ml vorlagen. Von diesem Ansatz wurden analog zur Salmonelleninfektion 100 µl i.p. appliziert, so dass jede Maus mit 10⁴ Bakterien infiziert wurde (Tierversuchsnummer der Regierung von Oberbayern: 211-2531-82/07). Pro Stamm wurden fünf Mäuse infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Mäuse in CO₂ euthanisiert, die Milzen entnommen und homogenisiert, anschließend auf streptomycinhaltigem LB Agar oder CIN Agar ausplattiert und bei 37° C (*Salmonella*) oder 27° C (*Yersinia*) ÜN inkubiert.

2.9.4) Gewinnung von Knochenmarkszellen und Differenzierung in Knochenmarksmakrophagen (BMDM)

Um primäre Zellen zu isolieren wurden die Mäuse zunächst in CO₂ euthanisiert und anschließend die Oberschenkelknochen isoliert. Die Knochen wurden in 70 % Ethanol desinfiziert und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Knochenenden wurden mittels sterilem Skalpel abgeschnitten und das Knochenmark mit 5 ml eiskaltem PBS aus dem Knochen gespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde bei 4° C 5 min bei 800 rpm pelletiert und in M-CSF haltigem DMEM Medium (siehe Kap. 2.5) zur Differenzierung in BMDM resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe Kap. 2.8.3) wurden 5 x 10⁶ Zellen / Bakterien-Petrischale in 8 ml ausgesät und bei 37° C 5 % CO₂ inkubiert. Nach drei und sieben Tagen wurden je 4 ml frisches Medium / Petrischale hinzugefügt. Nach 10 Tagen wurde das Medium komplett gewechselt und am 12. Tag wurden erneut 4 ml Medium hinzugefügt. Am Tag 15 waren die Zellen zu BMD-Makrophagen ausdifferenziert und bereit für die Versuche.

2.10) Statistik

Zur statistischen Untersuchung wurde der Student's t-Test der Software Graph Pad 5.0 verwendet. Ergebnisse waren signifikant sobald $P < 0,05$ war. Folgende Abkürzungen wurden verwendet. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$

3.) Ergebnisse I

3.1) Herstellung von Ysc-T3SS-Hybridsubstraten auf YopE-Basis

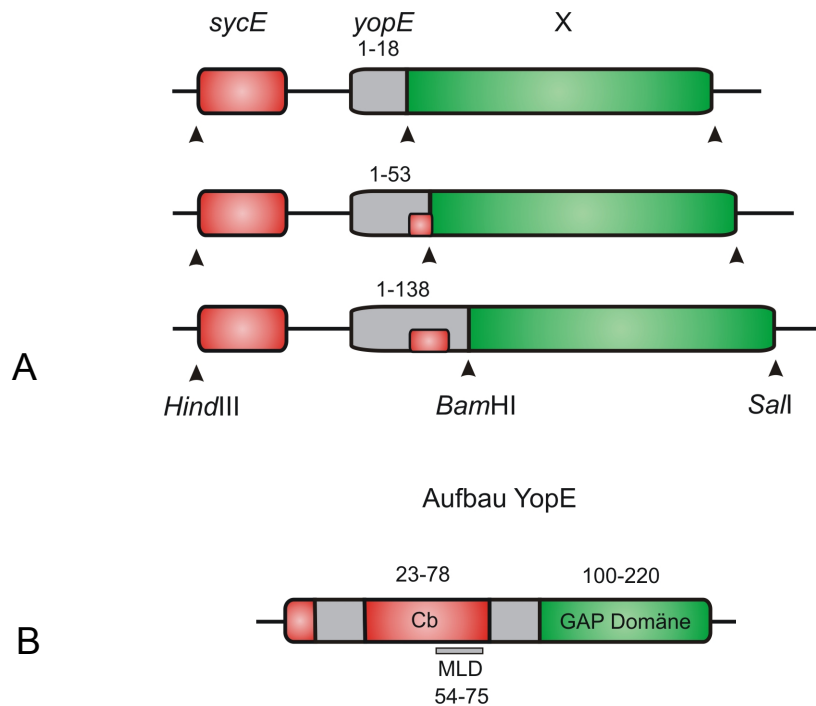


Abb. 15 (A) Schematische Darstellung der kodierenden DNA-Sequenz für YopE-Hybridproteine mit unterschiedlicher Anzahl von YopE Kodons ausgehend vom Startkodon. Die Pfeile markieren die jeweiligen Schnittstellen der Restriktionsenzyme HindIII, BamHI und Sal I. **(B)** Schematische Darstellung von YopE. Die SycE Bindestelle im Protein (= Cb) ist im Bereich der Aminosäurereste 23-78 aa lokalisiert, die Membranlokalisierungsdomäne (MLD) ist in dem Bereich 54-78 aa lokalisiert. Im Bereich 100-220 aa ist die GAP-Domäne lokalisiert.

Die zur W-xxx-E Familie gehörenden T3SS Effektoren werden von verschiedenen pathogenen Erregern synthetisiert, die ihrerseits eine Vielzahl von Virulenzfaktoren mit oftmals redundanter Funktion produzieren. Bei der Analyse der Erregerpathogenität können Deletionen von identifizierten Pathogenitätsgenen mit redundantem Phänotyp deshalb phänotypisch nicht immer erkennbar sein. Um dieses Problem zu umgehen, sollten die Effektorfunktionen isoliert untersucht werden. Die verschiedenen W-xxx-E-Effektorproteine-kodierenden Gene sollten deshalb in einen konstanten bakteriellen Hintergrund eines gut definierten Trägerbakteriums eingebracht werden.

Für solch eine „Toolbox“ sind Yersinien mit ihrem Ysc-T3SS und ihren bekannten chromosomalen Pathogenitätsgenen besonders geeignet.

Für die Etablierung einer *Yersinia*-Toolbox wurden *Yersinia* spezifische T3SS Substrate auf YopE-Basis konstruiert, indem die zu untersuchenden Proteine an drei unterschiedlich lange YopE N-Termini fusioniert wurden (18 aa, 53 aa und 138 aa). Das 138 aa Konstrukt enthält die gesamte SycE Bindestelle sowie die Membranlokalisierungsdomäne (MLD) wohingegen das 53 aa Konstrukt nur eine verkürzte SycE Bindestelle und keine MLD besitzt. Das 18 aa Konstrukt hingegen besitzt weder eine SycE Bindestelle noch eine MLD Sequenz. Da für die Wirkung von T3SS Effektoren die Sekretion essentiell ist, wurde zunächst überprüft, ob die konstruierten heterologen T3SS Substrate tatsächlich sekretiert wurden. Dazu wurden die Yersinien unter T3SS induzierenden Bedingungen (Ca^{2+} -Depletion) kultiviert und die Proteine aus den Überständen präzipitiert. Sekretion der heterologen T3SS Konstrukte, YopE_i-IpgB₁, YopE_i-IpgB₂, YopE_i-Map (i = 53, 138) konnte bei den Stämmen WA (pYV, pE_i-X) durch Verwendung von YopE Antiserum mittels Immunblotanalyse detektiert werden (Abb.16 A, B, C). Keine Sekretion allerdings konnte für die jeweiligen YopE₁₈-X (X = IpgB₁, IpgB₂, Map) Konstrukte mittels Immunblot detektiert werden. Das YopE Antiserum erkennt jeweils den YopE N-Terminus der jeweiligen YopE_i-X Konstrukte, vermutlich sind die ersten 18 Aminosäuren nicht ausreichend für ein starkes Signal in der Immunoblotanalyse. Die übrigen von dem pYV Plasmid exprimierten Yops scheinen die Sekretion der heterologen T3SS Substrate nicht zu stören.

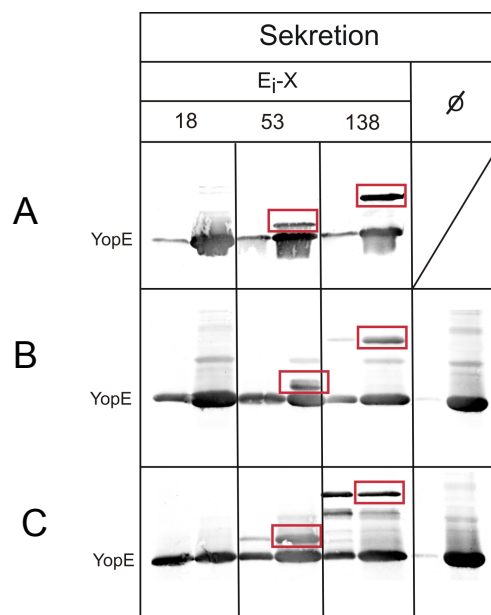


Abb. 16 Immunblotanalyse von sekretierten YopE_i-X Proteinen der Stämme WA (pYV, pE_i-X); i=18, 53, 138 aa, **(A)** X=IpgB₁, **(B)** X=IpgB₂ und **(C)** X=Map
Die Bakterien wurden je bei 27° C (Repression der Yop Sekretion, jeweils linke Spur) und bei 37° C + EGTA (5 mM) (Ca^{2+} Depletion, Sekretionsinduktion, jeweils rechte Spur) kultiviert. Die Proteine der Kulturüberstände wurden anschließend präzipitiert und mittels YopE Kaninchen Antiserum detektiert. Die rot markierten Banden geben das YopE_i-X Konstrukt an.

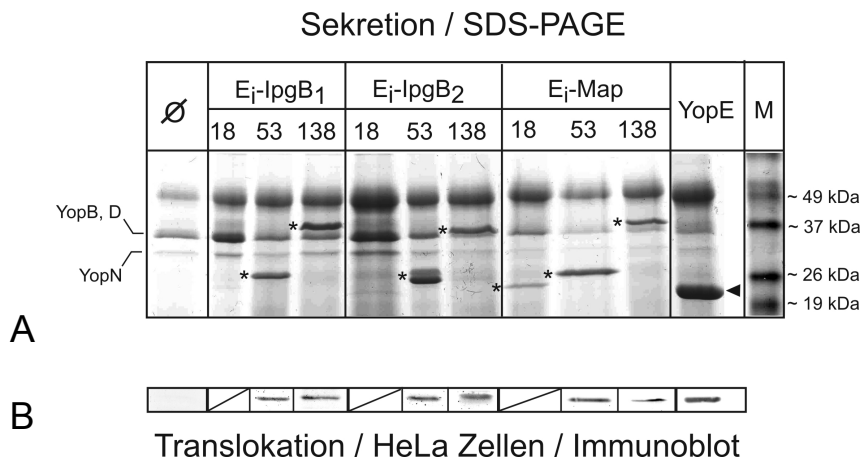


Abb. 17 Sekretions- und Translokationsanalyse von *Yersinia*-Toolbox-Stämmen

A Proteinpräzipitate von 5 ml Kulturüberstand nach SDS-PAGE

B: Proteinpräzipitate von *Yersinia*-infizierten HeLa-Zellen, YopE-Antiserum-Immunoblot.

Translokationsanalyse, Infektion von HeLa-Zellen MOI = 10 für 3 h, schonende Zellyse (Digitonin) und anschließende Präzipitation des Zelllysats.

Stammzuordnung der Spuren: ∅ : WA (pT3SS); E_i-X : WA (pT3SS, pE_i-X), i = 18, 53, 138 aa, X = IpgB₁, IpgB₂, Map; YopE : WA (pT3SS, pYopE).

Umgekehrt scheinen die heterologen T3SS Substrate die Sekretion der Yops nicht zu beeinflussen, da YopE weiterhin sekretiert wird (Abb. 16 B, C). Sekretion wurde ebenfalls bei den Stämmen WA (pT3SS, pE₅₃-X) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-X) mittels SDS-PAGE / Coomassie-Färbungen detektiert (Abb. 17 A) werden. Zusätzlich konnte Sekretion für YopE₁₈-Map detektiert werden, nicht aber für YopE₁₈-IpgB₁ und YopE₁₈-IpgB₂ (Abb. 17 A). Da die Konstrukte YopE₁₈-IpgB₁ und YopE₁₈-IpgB₂ nicht / kaum im Coomassie Gel detektierbar sind, zeigt sich hier, dass das Sekretionsverhalten der YopE_i-X Konstrukte nicht nur durch die Länge des N-Terminus, sondern auch durch das fusionierte Partnerprotein beeinflusst wird. Aufbauend zu den Sekretionsanalysen wurde überprüft, ob die sekretierten Proteine auch in Wirtszellen (HeLa) transloziert werden. Dazu wurden HeLa Zellen mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₅₃-X) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-X) für 2 h infiziert. Mittels Westernblot Analyse wurde überprüft, ob die Hybridproteine injiziert waren. Translokation wurde sowohl von den N-terminalen 53 aa als auch den ersten 138 aa vom YopE N-Terminus vermittelt. IpgB₁, IpgB₂ und Map konnten intrazellulär nachgewiesen werden (Abb. 17 B). Die Sekretions- und Translokationsanalysen zeigen, dass die YopE-Hybridproteine IpgB₁, IpgB₂ und Map über den *Yersinia*-T3SS-Apparat in den Überstand und in Wirtszellen sekretiert / injiziert werden können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nicht nur der N-Terminus, sondern auch das fusionierte Partnerprotein das Sekretionsverhalten beeinflusst.

3.2) Biologische Aktivität in Zellen, Effekt auf das Aktin-Zytoskelett

Um zu überprüfen, ob die translozierten Proteine ihre Wirkung intrazellulär entfalten, wurden die Auswirkung auf das Aktin-Zytoskelettveränderungen genauer untersucht. Dazu wurden HeLa Zellen mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-X) infiziert. Sofern die Hybridproteine tatsächlich biologisch aktiv sind, sollte IpgB₁ (Aktivator von Rac1) „Membrane Ruffles“ induzieren und IpgB₂ (Aktivator des RhoA Signalwegs) Stressfasern induzieren. Map fungiert als Cdc42 Aktivator und sollte somit bei biologischer Aktivität „Microspikes“ induzieren.

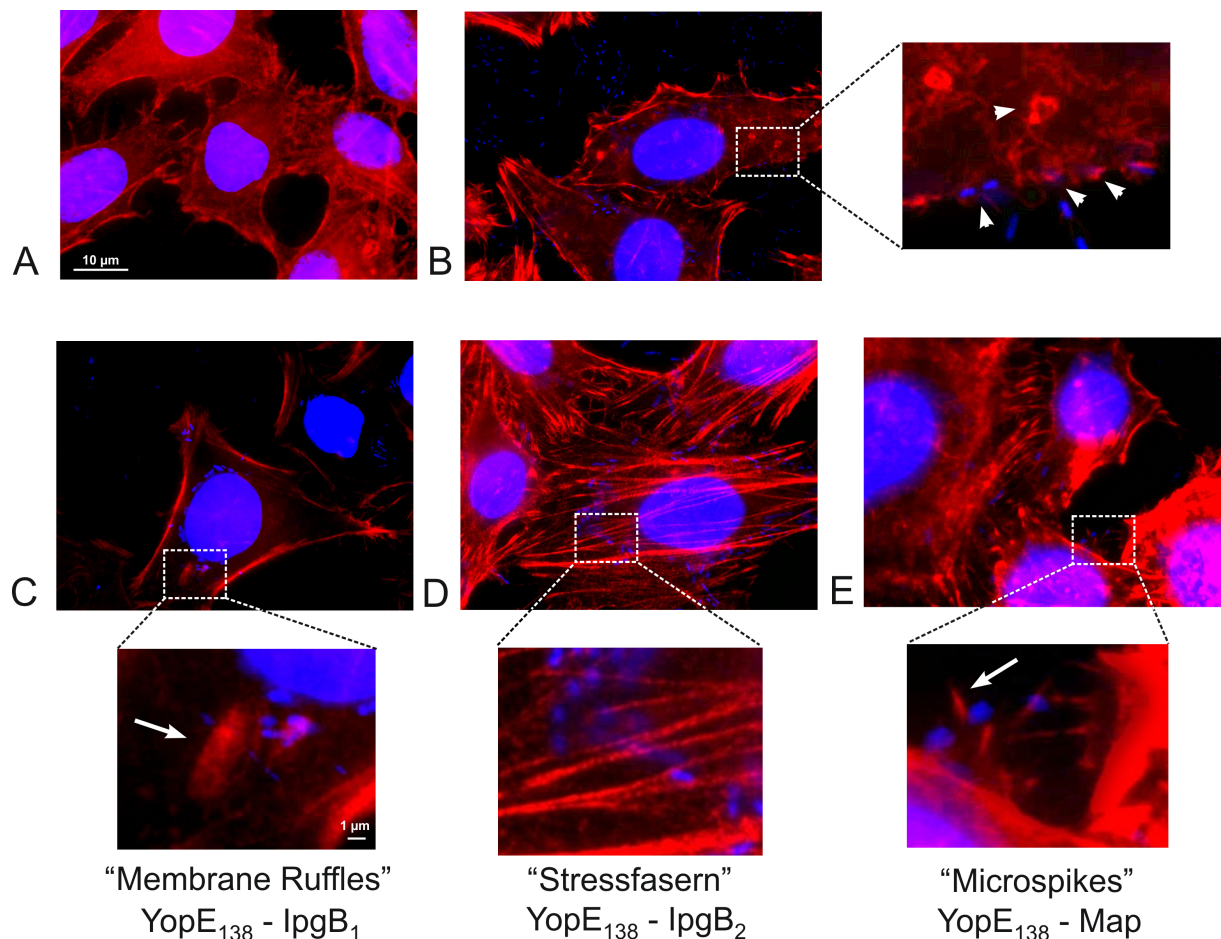


Abb. 18 Einfluss der YopE₁₃₈-X-Hybridproteine auf das Aktin-Zytoskelett. Infektion von HeLa Zellen (MOI ~ 10) mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-X, X = IpgB₁, IpgB₂, Map) für 30 min. Anschließend Gentamicin-Behandlung (50 µg/ml) für 90 min. Die Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts erfolgte mit Rhodamin Phalloidin (rot) zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Die Aufnahmen erfolgten bei 100-facher Vergrößerung. Die Ausschnitte sind 400-fach vergrößert (100x Objektiv eines Olympus Mikroskops und anschließende 4-Fach Vergrößerung mittels Grafik Software) (A) MOCK, (B) WA (pT3SS), (C) WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁), (D) WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂), (E) WA (pT3SS, pE₁₃₈-Map)

Die Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts mit Rhodamin-Phalloidin ergab (Abb. 18), dass YopE₁₃₈-IpgB₁ „Membrane Ruffles“ und YopE₁₃₈-IpgB₂ Stressfasern induzierte. Nach YopE₁₃₈-Map Injektion konnten lokale „Microspikes“ detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die translozierten heterologen Proteine ihre erwartete biologische Aktivität in der Zelle entfalten. Da die Hybridproteine über das T3SS in die Zelle injiziert werden und ihre modulatorische Funktionen auf das Aktin-Zytoskelett behalten, kann *Yersinia enterocolitica* als „Toolbox“ verwendet werden, um die Funktionen von T3SS-Effektorproteinen anderer Bakterien isoliert zu untersuchen.

3.3) Einfluss der Rho GTPasen GEF-Mimetika auf die Zellinvasion in nicht-phagozytierende Zellen

3.3.1) Invasionsstudien

Kap. 3.2 zeigt deutlich, dass die Hybridproteine YopE_i-IpgB₁, YopE_i-IpgB₂ und YopE_i-Map das zelluläre Aktinzytoskelett beeinflussen. Daher wurde untersucht, welche Rolle diese Hybridproteine für die zelluläre Invasionsrate der Yersinien spielen (Abb. 19 A, B, C). Dazu wurden HeLa Zellen mit den Invasin-positiven Stämmen WA (pT3SS, pE_i-X) und den Invasin-negativen Stämmen WA Δinv (pT3SS, pE_i-X) infiziert und die Invasionsrate bestimmt. Das Plasmid pT3SS kodiert für das Ysc-T3SS. Zusätzlich ist auf diesem Plasmid das *yadA* Gen lokalisiert, so dass die Stämme WA (pT3SS) und WA (pT3SS, pE_i-X) jeweils das Adhäsion Yada an der Bakterienoberfläche tragen. Zusätzlich wird bei diesen Stämmen das chromosomal kodierte *Invasin* produziert. Die Stämme WA Δinv (pT3SS) WA Δinv (pT3SS, pE_i-X) exprimieren nur *yadA*, aber kein *inv*-Gen. Invasin interagiert mit den zellulären Integrinen (β 1-Integrin), was zur Rac1 Aktivierung und Internalisierung führt (Isberg and Barnes, 2001; Dersch and Isberg, 1999). Die basale Invasionsrate des Stammes WA (pT3SS) liegt bei ca. 10 % (= Referenzwert). Demgegenüber liegt die Invasionsrate des Stammes WA Δinv (pT3SS) praktisch bei Null (Abb. 19 A, C).

Die Stämme WA (pT3SS pE₅₃-IpgB₁) und WA (pT3SS pE₁₃₈-IpgB₁) induzierten beide eine ca. 6-fach erhöhte Invasion (~ 50-60 %) verglichen mit dem Referenzstamm WA (pT3SS) (Abb. 19 A). Ein ähnliches Ergebnis wurde mit analogen Versuchen der Inv-negativen Stämme WA Δinv (pT3SS, pE₅₃-IpgB₁) und WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) erhalten (Abb. 19 C). Dies zeigt deutlich die Invasionsinduktorfunktion von IpgB₁ (Rac1-Aktivator), das als sekretiertes Protein über den T3S Apparat als Invasionsinduktor wirkt.

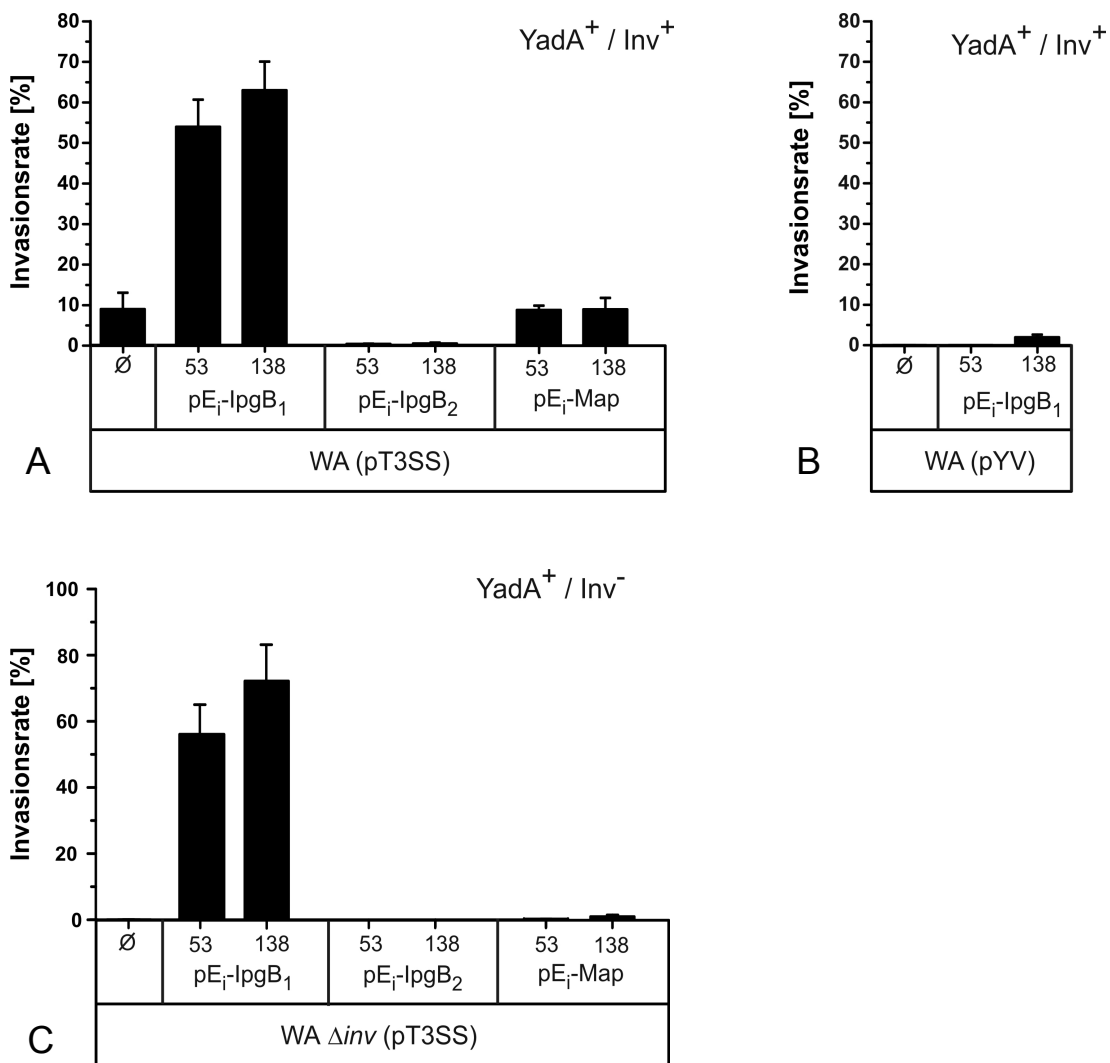


Abb. 19 Einfluss der YopE_i-X Hybridproteine auf das Invasionsverhalten verschiedener *Yersinia* Stämme. Infektionen von HeLa Zellen (MOI = 10) für 30 min. Anschließend Gentamicin-Behandlung (50 µg/ml) für 90 min zur Abtötung extrazellulärer Bakterien. Bestimmung der intrazellulären CFUs durch 5 minütige Zellyse (PBS/Triton-X-100, 1 %) und anschließender Ausplattierung des Lysats in unterschiedlichen Verdünnungsstufen. **(A)** WA (pT3SS, pE_i-X) mit i=53 aa, 138 aa und X=IpgB₁, IpgB₂ oder Map, **(B)** WA Δinv (pYV, pE_i-IpgB₁) mit i=53 aa, 138 aa und X=IpgB₁, IpgB₂ oder Map und **(C)** WA (pYV, pE_i-IpgB₁) mit i=53 aa, 138 aa

Die Stämme WA (pT3SS, pE₅₃, -IpgB₂) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) hingegen inhibieren die Invasin-vermittelte Invasion (Abb. 19 A). IpgB₂ hat somit einen gegensätzlichen Effekt zu IpgB₁. Nach Translokation von YopE_i-Map (Cdc42-GEF) wurde keine Aktivität hinsichtlich der Invasivität festgestellt. Die *Yersinia*-Toolbox ermöglicht es ebenfalls, das Zusammenspiel verschiedener Effektoren, z.B. das von IpgB₁, mit den pYV-kodierten Yop-Effektoren zu untersuchen. So wurde das Invasionsverhalten der Stämme WA (pYV, pE₅₃-IpgB₁) und WA (pYV, pE₁₃₈-IpgB₁) untersucht (Abb. 19 B).

Im Gegensatz zu den Stämmen WA (pT3SS) und WA Δinv (pT3SS) produzieren die Stämme WA (pYV), WA (pYV, pE₅₃-IpgB₁) und (pYV, pE₁₃₈-IpgB₁) die antiphagozytischen Effektoren YopH, YopT, und YopE.

Die Invasionsrate der Stämme WA (pYV, pE₅₃-IpgB₁) und WA (pYV, pE₁₃₈-IpgB₁) ist deutlich reduziert im Vergleich zu den Stämmen WA (pT3SS, pE₅₃-IpgB₁) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) sowie WA Δinv (pT3SS, pE₅₃-IpgB₁) und WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁). Dies zeigt, dass die Yops mit den von IpgB₁ aktivierten Rac1-Signalkaskaden interferieren und diese auch inhibieren.

Dafür kommen im speziellen die *Yersinia*-Effektoren YopE und YopT in Frage. Mit Hilfe von Co-Infektionsversuchen wurde dieses Ergebnis genauer analysiert. Weiterhin wurde mittels Co-Infektionsversuchen die Bedeutung und Funktion von IpgB₂ detaillierter untersucht. Da IpgB₂ die Invasin abhängige Invasion inhibiert, ist dies ein Hinweis darauf, dass IpgB₂ Rac1 inhibiert. Auch diese Hypothese wurde mittels Co-Infektionen näher betrachtet. Da IpgB₁ Rac1 aktiviert, sollte IpgB₂ bei Rac1-Inhibierung die IpgB₁ vermittelte Invasion deutlich reduzieren.

3.3.2) Co-Infektions-Invasionsstudien

In Kap. 3.3.1 wurde der Einfluss der YopE_i-X Hybridproteine auf das Invasionsverhalten in Rahmen von Mono-Infektionsversuchen untersucht. Darüber hinausgehend ist das Zusammenspiel diverser T3SS Effektoren von besonderem Interesse. Mit Hilfe der „*Yersinia*-Toolbox“ kann nun das Zusammenspiel verschiedenster Effektoren in Co-Infektionen auf das Invasionsverhalten untersucht werden. So können zum einen Effektoren eines Erregerstammes (IpgB₁ vs IpgB₂, aus *Shigella flexneri*) und zum anderem Effektoren von unterschiedlichen Erregern untersucht werden (IpgB₁ vs YopT bzw. YopE).

Dazu wurden HeLa Zellen in unterschiedlichen Co-Infektionsverhältnissen (1:0, 0:1, 1:1, 5:1 und 1:5) mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁), WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂), WA (pT3SS, pYopT) und WA (pT3SS, pYopE) infiziert. Zunächst wurde der Einfluss der *Shigella*-Effektoren YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-IpgB₂ auf das Invasionsverhalten in einer Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) untersucht. Kap.3.3.1, Abb 19 A zeigt, dass der Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) in Mono-Infektionen sehr invasiv ist im Vergleich zum Referenzstamm, wohingegen der Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) die Invasin-abhängige Invasion inhibiert. Da die Invasin-vermittelte Invasion Rac1-abhängig ist, ergibt sich aus den genannten Resultaten die Fragestellung inwiefern YopE₁₃₈-IpgB₂ die Invasion bei gleichzeitiger Gegenwart von YopE₁₃₈-IpgB₁ beeinflusst. Bekannt ist, dass IpgB₁ als Aktivator des Rac1-Signalwegs und IpgB₂ als Aktivator des RhoA-Signalwegs fungiert. Insofern lässt sich die Fragestellung erweitern, inwiefern die Interferenz von aktiviertem Rac1 und aktiviertem RhoA die Invasion beeinflusst (Abb. 20 A).

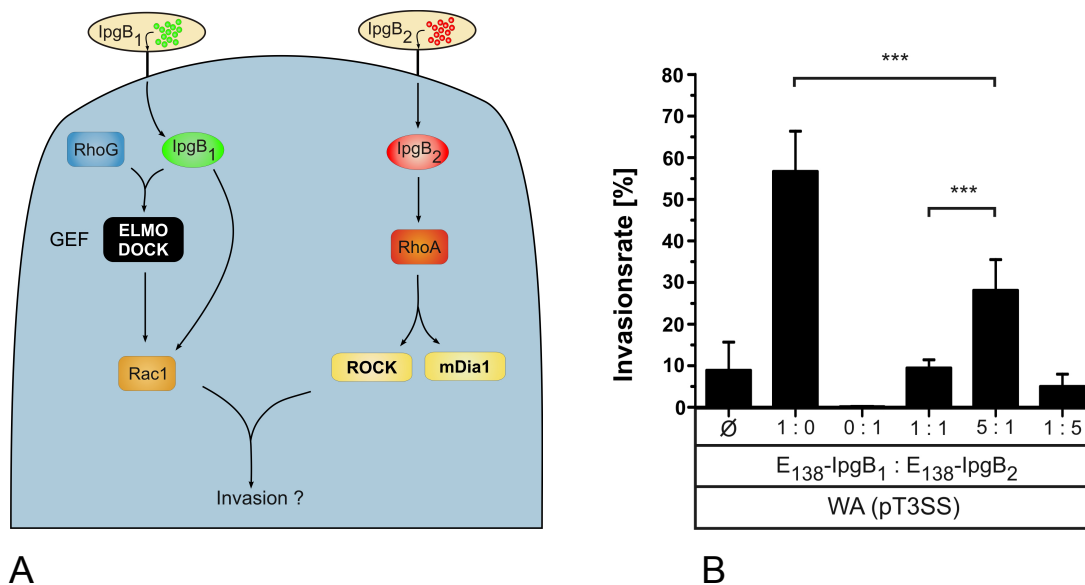


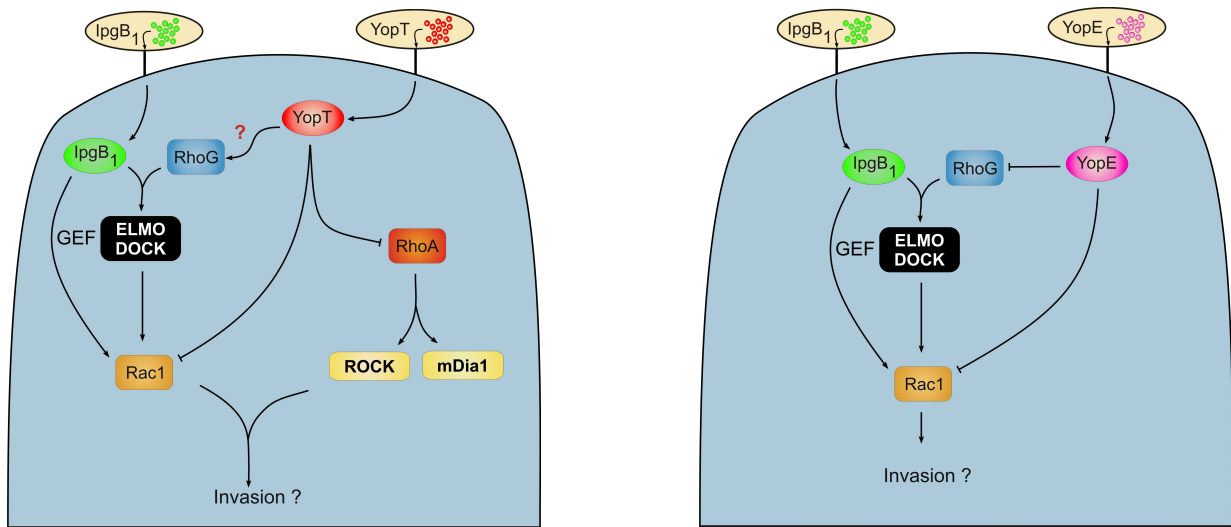
Abb. 20 Zusammenspiel der YopE₁₃₈-X-Hybridproteine (X=IpgB₁, IpgB₂) und dessen Einfluss auf das Invasionsverhalten der Stämme WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) in Co-Infektionen. **(A)** Veranschaulichung der aktivierten Signalwege einer Co-Infektion von HeLa Zellen mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂). YopE₁₃₈-IpgB₁ aktiviert den Rac1-Signalweg und YopE₁₃₈-IpgB₂ den RhoA-Signalweg. Welchen Einfluss hat die gleichzeitige Aktivierung beider Signalwege auf die Invasion der Stämme WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂)? **(B)** Co-Infektionen von HeLa Zellen (MOI = 10) für 30 min mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) mit unterschiedlichen Co-Infektions-Verhältnissen (1:0, 0:1, 1:1, 5:1, 1:5). Anschließend Gentamicin-Behandlung (50 µg/ml) für 90 min zur Abtötung extrazellulärer Bakterien. Bestimmung der intrazellulären CFUs nach 5-minütiger Zellyse (PBS/Triton-X-100, 1%) und anschließender Ausplattierung des Lysats in unterschiedlichen Verdünnungsstufen.

In einer 1:1 Infektion der beiden Stämme WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) war die Invasionsrate verglichen mit einer Mono-Infektion mit dem Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) um das 5-fache auf ca. 10 % reduziert (Abb. 20 B). Eine Reduktion (2-fach, 30 %) der Invasionsrate wurde ebenfalls bei einer 5:1 Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) : WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) detektiert. Der YopE₁₃₈-IpgB₁-aktivierte Signalweg (RhoG, Rac1) wird also in Gegenwart von YopE₁₃₈-IpgB₂ (RhoA-Aktivator) inhibiert, was auf einen Antagonismus zwischen YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-IpgB₂ schließen lässt. Kap. 3.3.1

Abb. 19 B zeigt, dass die Invasionsrate des Stammes WA (pYV, pE₁₃₈-IpgB₁) deutlich gegenüber dem Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) vermindert ist. Durch dieses Resultat ergibt sich die Fragestellung, inwiefern die antiphagozytischen *Yersinia enterocolitica*-Effektoren YopT und YopE die YopE₁₃₈-IpgB₁-induzierte Invasion beeinflussen (Abb. 21 A, C). YopT wirkt als Cysteinprotease und inaktiviert die Rho GTPasen (Rac1, RhoA, und Cdc42, siehe Einleitung Kap. 1.3.3). Dabei wirkt YopT hauptsächlich auf RhoA. Eine YopT-Wirkung auf RhoG ist bisher noch nicht beschrieben (Abb. 21 A). Demgegenüber wirkt YopE hauptsächlich auf den Rac1 Signalweg durch direkte Rac1-Inhibition und indirekte Rac1-Inhibition über RhoG-Inhibition (Abb. 21 B). Analog zum in Abb. 20 B dargestellten Experiment wurden Co-Infektionen mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pYopT) sowie WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pYopE) durchgeführt.

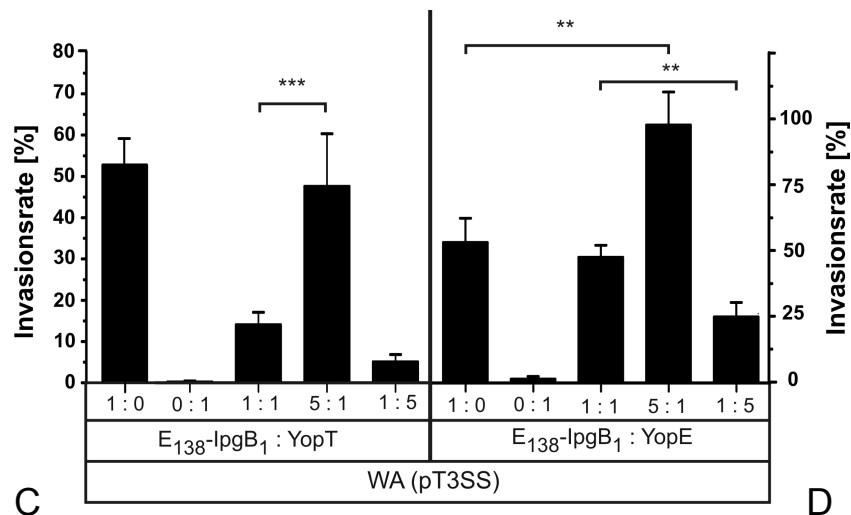
Die Invasionsrate war erneut signifikant um das 5-fache in einer 1:1 Co-Infektion mit WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pYopT)-Co-Infektion reduziert (Abb. 21 C). YopT kann also den YopE₁₃₈-IpgB₁ aktivierten Signalweg (Rac1-Signal-Kaskade) inhibieren.

Im Gegensatz zur WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) / WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) = 5:1 Co-Infektion konnte keine signifikante Invasionsreduktion in einer Co-Infektion mit WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) / WA (pT3SS, pYopT) = 5:1 detektiert werden. Somit ist YopE₁₃₈-IpgB₂ ein deutlich stärkerer Inhibitor für den YopE₁₃₈-IpgB₁-aktivierten Weg als YopT.



A

B



C

D

Abb. 21 Zusammenspiel der T3SS Effektoren YopE₁₃₈-IpgB₁, YopT und YopE und dessen Einfluss auf das Invasionsverhalten in Co-Infektionen.

(A) und (B) Veranschaulichung der Signalwege bei Co-Infektion von HeLa Zellen mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pYopT) bzw. WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pYopE). YopE₁₃₈-IpgB₁ aktiviert den Rac1-Signalweg wohingegen YopT die Rho GTPasen mittels Protease-Aktivität und YopE die Rho GTPasen mittels GAP-Aktivität inaktiviert. Welchen Einfluss hat die gleichzeitige Aktivierung der Rac1 Signalkaskade und Inaktivierung der Rho GTPasen auf die Invasion während einer jeweiligen Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) / WA (pT3SS, pYopT) sowie WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) / WA (pT3SS, pYopE)?

(C) und (D) Co-Infektionen von HeLa Zellen (MOI = 10) für 30 min mit den Stämmen **(C)** WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pYopT) sowie **(D)** WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pYopE) mit unterschiedlichen Co-Infektions-Verhältnissen (1:0, 0:1, 1:1, 5:1, 1:5). Anschließend Gentamicin-Behandlung (50 µg/ml) für 90 min zur Abtötung extrazellulärer Bakterien. Bestimmung der intrazellulären CFUs nach 5-minütiger Zellyse (PBS/Triton-X-100, 1%) und anschließender Ausplattierung des Lysats in unterschiedlichen Verdünnungsstufen.

Ein völlig überraschendes Bild allerdings stellte sich im Rahmen einer Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pYopE) ein.

Bei einer 1:1 Co-Infektion ergab sich keine Änderung der Invasionsrate verglichen mit einer Mono-Infektion des Stammes WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) (Abb. 21 D). Somit kann YopE nicht den YopE₁₃₈-IpgB₁-aktivierten Signalweg effizient inhibieren. In einer Co-Infektion mit WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) / WA (pT3SS, pYopE) = 5:1 war die Invasionsrate sogar 2-fach erhöht. Erst bei einer Co-Infektion mit WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) / WA (pT3SS, pYopE) = 1:5 (YopE-Überschuss) konnte eine 2-fache Reduktion der Invasionsrate detektiert werden. YopE kann also nur „im Überschuss“ den YopE₁₃₈-IpgB₁-aktivierten Signalweg inhibieren, wohingegen ein Co-Infektionsverhältnis von 1:1 zu keiner signifikanten Invasionsreduktion führt. Dieses YopE-Ergebnis unterstützt auch die Hypothese, dass YopE mit höherer GAP-Aktivität auf RhoG als auf Rac1 wirkt und somit Rac1 eher indirekt inhibiert (Roppenser et al., 2009).

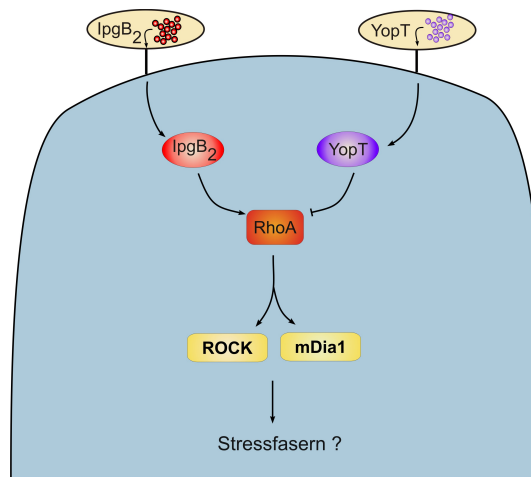


Abb. 22 Zusammenspiel der T3SS Effektoren E_{138} -IpgB₂ und YopT in Co-Infektionen. Veranschaulichung einer Co-Infektion von HeLa Zellen mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) und WA (pT3SS, pYopT) YopE₁₃₈-IpgB₂ aktiviert den RhoA-Signalweg wohingegen YopT die Rho GTPasen (hauptsächlich RhoA) mittels Protease-Aktivität inaktiviert. Welchen Einfluss hat die gleichzeitige Aktivierung der RhoA Signalkaskade und Inaktivierung von RhoA auf die Stressfaserbildung?

Kap. 3.2 zeigt, dass die YopE₁₃₈-X Hybridproteine das Aktin-Zytoskelett beeinflussen. So induziert YopE₁₃₈-IpgB₂ Stressfasern in HeLa Zellen (Abb. 18 D). Da die Stämme WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) und WA (pT3SS, pYopT) nicht invasiv sind (Abb. 20 B und 21 C) wurde das Zusammenspiel der Effektoren YopE₁₃₈-IpgB₂ und YopT in Rahmen von Co-Infektionen bei anschließender visueller Analyse der Aktin-Zytoskelett-Strukturen untersucht.

Dabei wurde überprüft, ob der Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) bei gleichzeitiger Gegenwart von WA (pT3SS, pYopT) noch Stressfasern induziert (Abb. 22). Zusätzlich wurde überprüft, ob der Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) bei 30 minütiger Präinkubation mit dem Stamm WA (pT3SS, pYopT) noch Stressfasern induzieren kann.

Bei der simultanen Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) / WA (pT3SS, pYopT) = 1:1 konnten Stressfasern detektiert werden (Abb. 23 C). Demgegenüber konnten keine Stressfasern bei einer sukzessiven Co-Infektion (1:1) der Stämme WA (pT3SS, pYopT) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) (30 minütige Präinkubation) detektiert werden (Abb. 23 D). Dieses Ergebnis zeigt, dass die YopE₁₃₈-IpgB₂-Stressfaserinduktion schneller als die YopT-RhoA Inhibition ist oder dass gebildete Stressfasern durch YopT-bedingte RhoA-Inhibition nicht wieder dissoziieren.

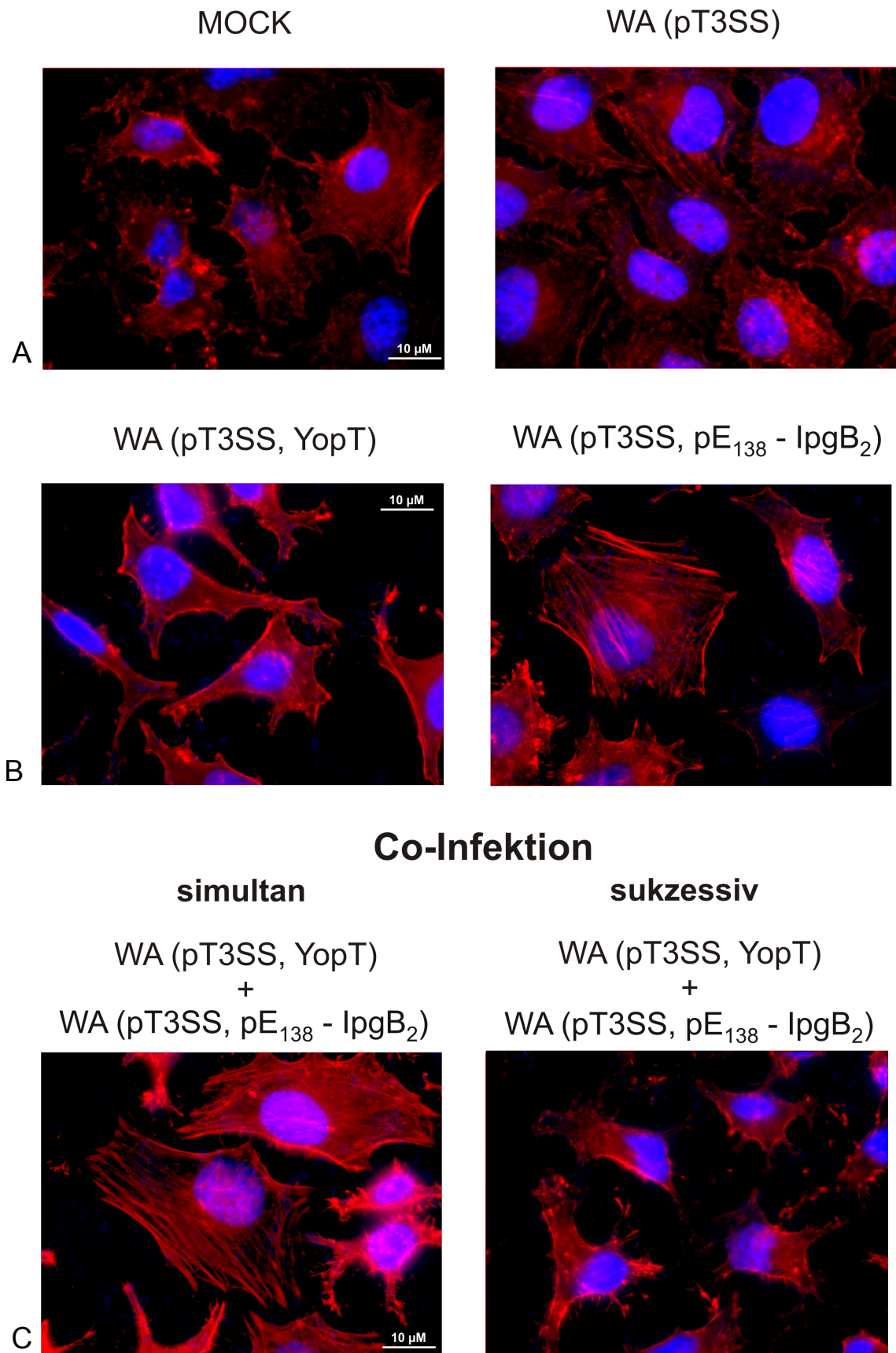


Abb. 23 Einfluss von YopE₁₃₈-IpgB₂ und YopT auf das Aktin-Zytoskelett. Infektion von HeLa Zellen (MOI = 10) für 30 min. Anschließend Gentamicin-Behandlung (50 µg/ml) für 90 min. Die Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts erfolgte mit Rhodamin-Phalloidin (rot) zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Die Aufnahmen erfolgten mit einem 63x-Objektiv. **(A)** MOCK und WA (pT3SS), **(B)** WA (pT3SS, pYopT) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) **(C)** Simultane Co-Infektion mit WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) / WA (pT3SS, pYopT) = 1 : 1, sukzessive Co-Infektion WA (pT3SS, pYopT) / WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂)= 1 : 1 bei 30 min Präinkubation mit dem Stamm WA (pT3SS, pYopT).

Sowohl IpgB₁ als auch IpgB₂ werden als Bestandteil eines ganzen Arsenal von T3SS Effektoren über das Mxi-Spa15-T3SS im Shigellen System sekretiert. Mit Hilfe der *Yersinia*-Toolbox können nun die Effektoren entweder isoliert oder auch gemeinsam untersucht werden. Mit Hilfe des Drei-Plasmid-Co-Expressions-Stammes WA (pT3SS, pIV-E₁₃₈-IpgB₁, pE-IpgB₂) wurde der Einfluss auf das Invasionsverhalten in Gegenwart der beiden T3SS Effektoren YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-IpgB₂ überprüft. Analog zu den Co-Infektionsstudien zeigte eine simultane Expression und Translokation der Effektoren YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-IpgB₂ eine deutliche Reduktion der Invasionskapazität von YopE₁₃₈-IpgB₁, da die Invasionsrate des Stammes WA (pT3SS, pIV-E₁₃₈-IpgB₁, pE-IpgB₂) auf ein Sechstel des Kontrollwertes reduziert war (Kontrollstamm WA pT3SS, pIV-E₁₃₈-IpgB₁) (Abb. 24 A). Somit ergibt sich ein weiterer Hinweis auf einen Antagonismus zwischen YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-IpgB₂. Die Sekretionsanalysen zeigen, dass YopE₁₃₈-IpgB₂ stärker als YopE₁₃₈-IpgB₁ sekretiert wird (Abb. 24 B). Falls dies auch für die Translokation zutreffen sollte, wäre die auffällig starke antagonistische Wirkung von IpgB₂ auf die von IpgB₁ in diesem Experiment gut erklärbar.

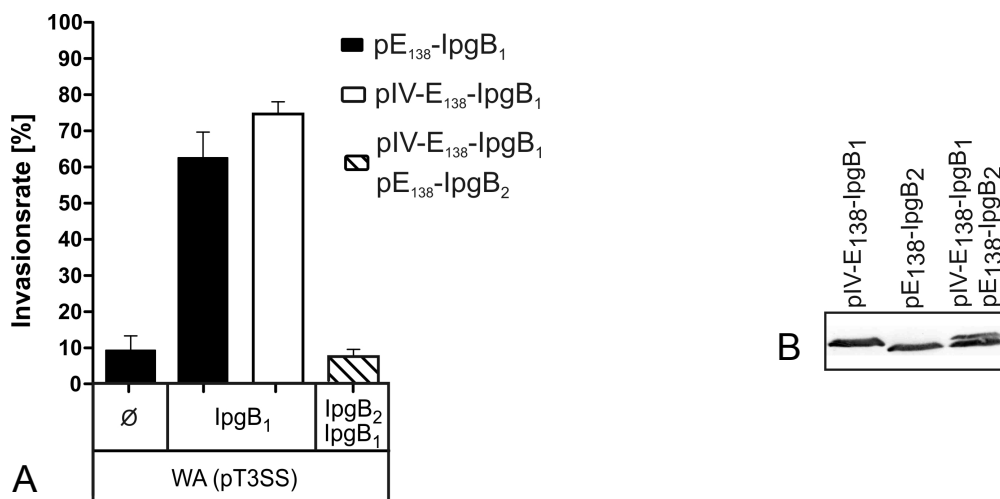


Abb. 24 (A) Einfluss auf die Invasion durch Co-Translokation von YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-IpgB₂. Infektionen von HeLa Zellen (MOI = 10) für 30 min. Anschließend Gentamicin-Behandlung (50 µg/ml) für 90 min zur Abtötung extrazellulärer Bakterien. Bestimmung der intrazellulären CFUs nach 5-minütiger Zellyse (PBS-Triton-X-100, 1 %) und anschließender Ausplattierung des Lysats in unterschiedlichen Verdünnungsstufen.

(B) Immunblot von Präzipitaten aus 17 ml Kulturüberständen der Stämme WA (pT3SS, pIV-E₁₃₈-IpgB₁), WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂), WA (pT3SS, pIV-E₁₃₈-IpgB₁, pE₁₃₈-IpgB₂) Detektion der Hybridproteine mit YopE Antiserum. Die Stämme wurden bei 37° C + EGTA (Ca²⁺ Depletion, Sekretionsinduktion) kultiviert.

3.3.3) Einfluss chemischer Inhibitoren auf die Invasionsrate

Wie bereits in der Einleitung diskutiert, fungiert IpgB₁ als Rac1-Aktivator und IpgB₂ als RhoA-Aktivator. Mittels chemischer Inhibitoren für Rac1 (NSC23766, inhibiert die Rac1-Interaktion mit den GEFs Trio und Tiam), ROCK (Y27632 inhibiert die Kinaseaktivität) und PI-3-K (Wortmannin) sollten zusätzliche Hinweise über die durch YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-IpgB₂ aktivierten Signalwege erhalten werden.

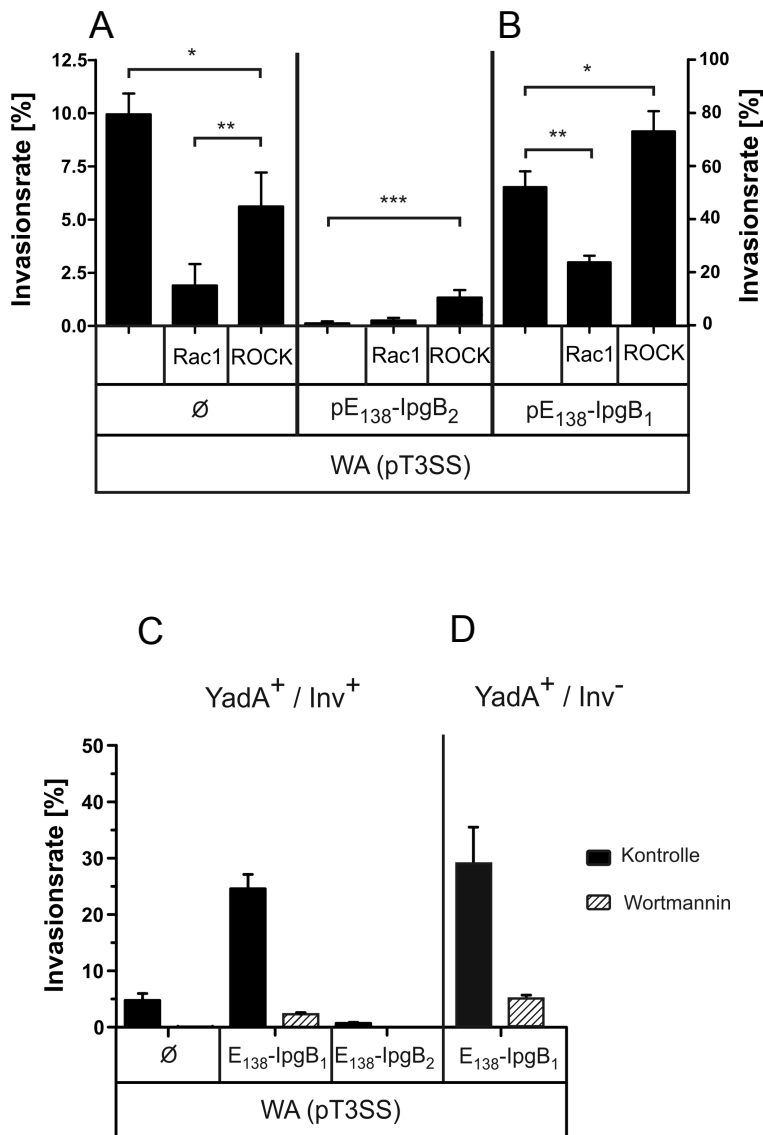


Abb. 25 Wirkung von Rho GTPase-Signaling-Inhibitoren auf die *Yersinia*-Invasion. HeLa Zellen wurden **(A)** mit dem Rac1-Inhibitor NSC23766 (100 µM, 1 h Präinkubation) oder **(B)** mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 (20 µM, 1 h Präinkubation) oder **(C,D)** mit dem PI-3-K Inhibitor Wortmannin (1 µM, 30 min Präinkubation) präinkubiert. Anschließende Infektion der präinkubierten HeLa Zellen (MOI = 10) für 30 min und nachfolgender Gentamicin-Behandlung (50 µg/ml) für 90 min zur Abtötung extrazellulärer Bakterien. Bestimmung der intrazellulären CFUs nach 5-minütiger Zellyse (PBS-Triton-X-100, 1%) und anschließender Ausplattierung des Lysats in unterschiedlichen Verdünnungsstufen und Bestimmung der CFUs.

Inhibition von Rac1 führte zu einer signifikanten Invasionsreduktion der Stämme WA (pT3SS) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) bzw. WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) (Abb. 25 A, B). Diese Invasionsreduktion zeigt deutlich, dass die Invasin-abhängige Invasion Rac1-abhängig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass YopE₁₃₈-IpgB₁ Rac1 für die Invasion benötigt. Inhibition von ROCK im Rahmen einer Infektion mit WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) führte zu einer signifikanten Invasionserhöhung (10-fach gegenüber dem Kontrollwert). Dies zeigt, dass der Inhibitionseffekt von YopE₁₃₈-IpgB₂ auf die Rac1-Wirkung über ROCK kontrolliert wird. In einem weiteren Inhibitionsversuch wurde die Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3-K) mittels Wortmannin gehemmt, die für die Konversion von Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat zu Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₂ zu PIP₃) notwendig ist. PIP₃ ist ein Co-Faktor für Rac1-GTP. Anschließend wurde die Invasionsrate (Abb. 25 C, D) bestimmt und parallel dazu der Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett bestimmt (Abb. 26).

Die Inhibition der PI-3-K führte zur Reduktion der Invasion von WA (pT3SS) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) bzw. WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁). Dies zeigt, dass die YopE₁₃₈-IpgB₁-vermittelte Invasion PI-3-K abhängig ist. Die TRITC-Phalloidin Färbung des Aktinzytoskeletts zeigte, dass in Gegenwart von Wortmannin eine lokalisierte Aktinakkumulation bei den zellassoziierten Bakterien des Stammes WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) darstellbar war (Abb. 26, linke Spalte). Allerdings wirkte der Internalisierungs Vorgang wie eingefroren, da die Bakterien nur partiell internalisiert wurden (Abb. 25 C). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Rac1 als auch die PI-3-K für die YopE₁₃₈-IpgB₁ vermittelte Internalisierung notwendig sind. Weiterhin wird hierbei eine Aktivierungshierarchie, bei der Rac1 vor der PI-3-K aktiviert wird, deutlich.

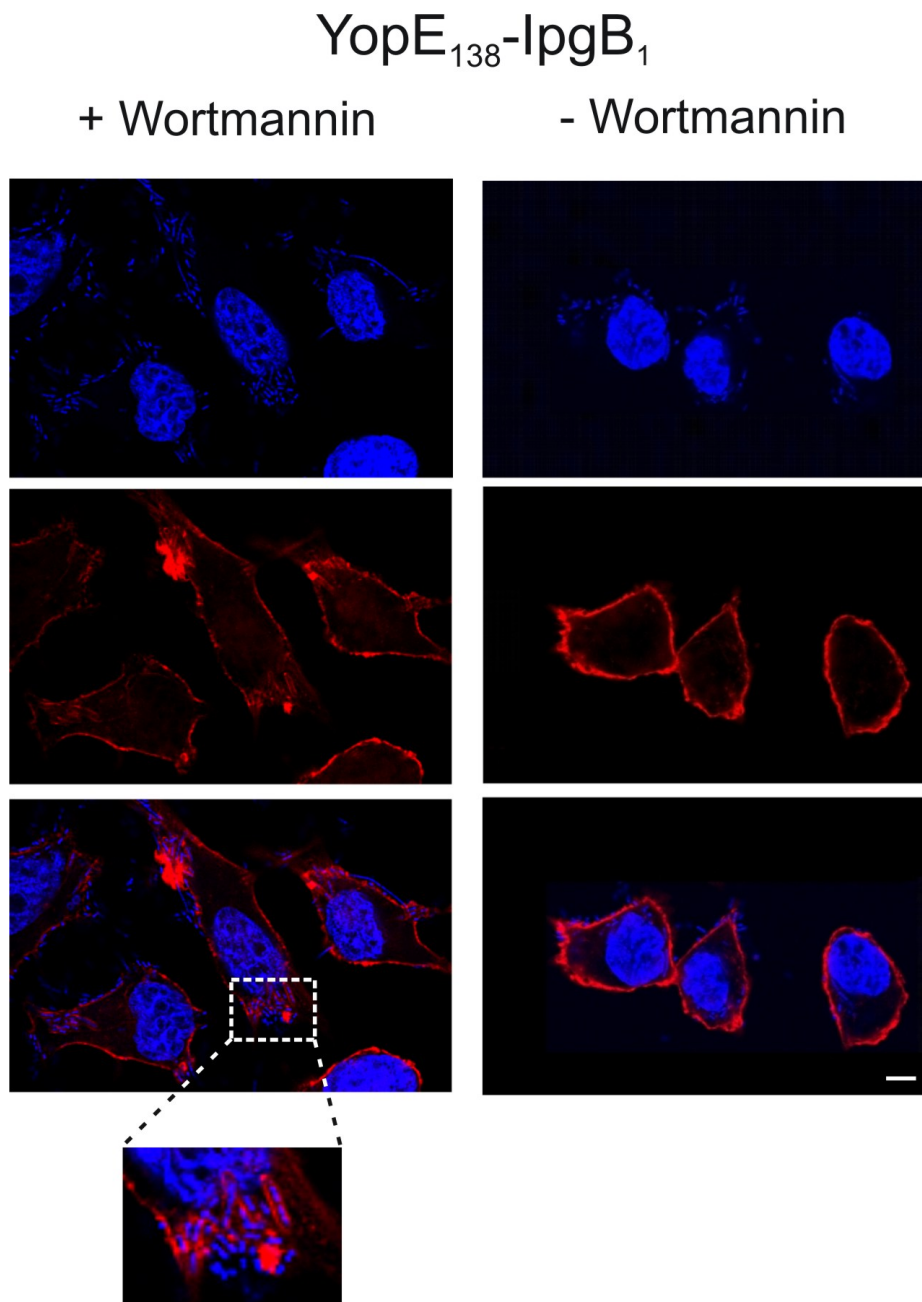


Abb. 26 Einfluss von YopE₁₃₈-IpgB₁ auf das Aktin-Zytoskelett nach Vorbehandlung mit dem PI-3-K Inhibitor Wortmannin für 30 min (1 μ M). Infektion von Wortmannin-vorbehandelten und unbehandelten HeLa Zellen (MOI = 10) für 30 min mit dem Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁). Anschließend Gentamicin-Behandlung (50 μ g/ml) für 90 min. Die Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts erfolgte mit Rhodamin Phalloidin (rot) zusätzlich wurden die Zellkerne und Bakterien mit DAPI gefärbt (blau). Die Aufnahmen erfolgten mit einem 63x Objektiv eines konfokalen Mikroskops. Die Ausschnittvergrößerung zeigt zellassoziierte Bakterien mit co-lokalisiertem Aktin.

3.4.) Beeinflussung der Zytoplasmamembranintegrität durch den T3SS Apparat von *Yersinia enterocolitica*

Das T3SS der Yersinien ist essentiell für deren Pathogenese. Mit Hilfe des T3SS werden verschiedene Proteine in die Wirtszelle injiziert die so die zelluläre Wirkung modulieren. Durch den Translokationsprozess ist eine Interaktion der Bakterien mit der Wirtszellmembran notwendig. Eine Hypothese besagt, dass für die Translokation von Effektorproteinen die Insertion einer Translokationspore in der Wirtszellmembran notwendig ist. Nach diesem Modell ist die Translokationspore nicht stabil mit der Injektionsnadel des T3SS verbunden, so dass die Poren lateral in der Wirtszellmembran diffundieren können, was einen K^+ -Efflux und einen Ca^{2+} -Influx bewirken würde. Diese Schädigung der Zytoplasmamembranintegrität (Zytotoxizität) lässt sich durch Färbung mit Propidiumiodid (interkaliert mit DNA, nicht membrangängig) oder LDH-Aktivität (Laktatdehydrogenasefreisetzung) im Überstand quantitativ darstellen.

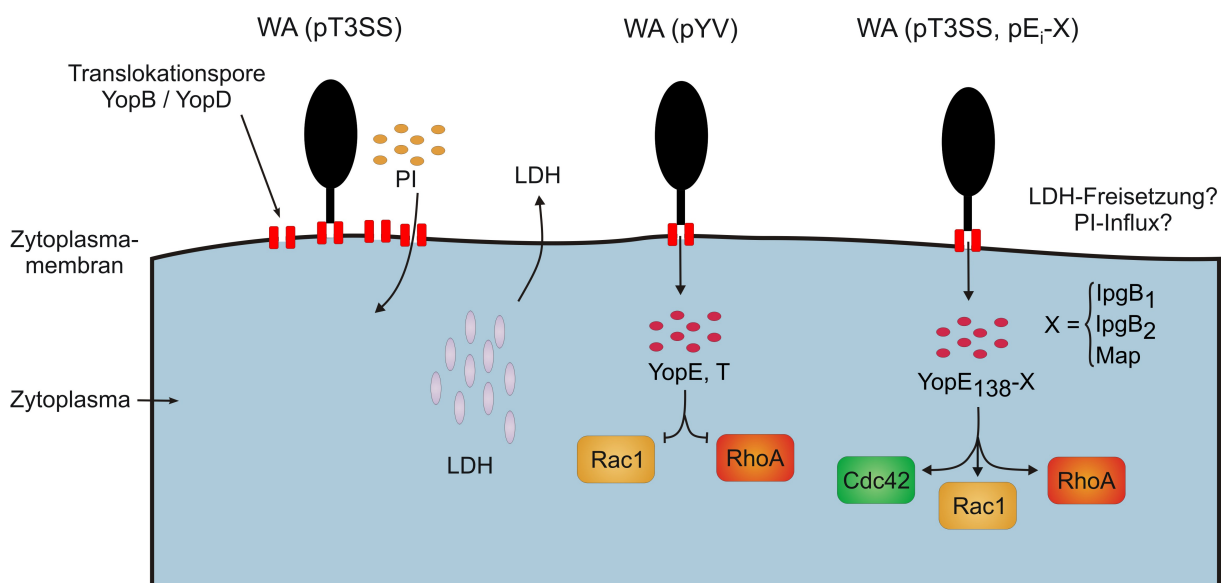


Abb. 27 Veranschaulichung der T3SS induzierten Beeinflussung der Membranintegrität. Linker Bildabschnitt: Die Interaktion des T3SS und der Translokationspore YopB/YopD mit der Zytoplasmamembran führt zur LDH-Freisetzung und zur PI-Aufnahme. Rechter Bildabschnitt: Durch Injektion der Rho GTPasen-Modulatoren YopE und YopT wird die LDH-Freisetzung und die PI-Aufnahme verhindert (Stabilisierung der YopB/YopD-Pore). Welchen Einfluss hat die Injektion der YopE₁₃₈-X Hybridproteine (X=IpgB₁, IpgB₂ und Map) auf die Membranintegrität?

Verschiedene Arbeiten zu diesem Gebiet zeigen, dass die Rho GTPasen (hauptsächlich RhoA) am Translokationsprozess des T3S Apparats beteiligt sind. Die *Yersinia* Effektoren YopE und YopT inhibieren Rac1 und RhoA, was eine Porenbildung verhindern sollte. Somit wird die Membranintegrität nach dem Translokationsprozess wieder hergestellt (Mejia et al., 2008; Viboud and Bliska, 2002; Viboud and Bliska, 2001). Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, dass YopK von *Y. pseudotuberculosis* (YopQ in *Y. enterocolitica*) mit dem YopB / YopD Translocon interagiert und dadurch die Inflammation- / Pyroptose-Aktivierung durch Unterdrückung der Porenbildung verhindert (Brodsky et al., 2010).

Da IpgB₁ (Rac1-Aktivator) und IpgB₂ (RhoA-Aktivator) die Aktivität der zellulären Rho GTPasen beeinflussen, wurde untersucht, ob diese Proteine einen Effekt auf die Membranintegrität haben. Abb. 27 zeigt schematisch, dass mittels LDH-Freisetzung und PI-Influx (DNA-Färbung) die Schädigung der Zytoplasmamembranintegrität erfasst werden kann. Die Stärke der Membranintegritätsstörung ist dabei direkt abhängig von der LDH-Freisetzung bzw. der Anzahl der PI-positiven Zellen. Ein hohes Maß an LDH-Freisetzung bzw. viele PI-positive Zellen bedeuten eine starke Schädigung der Membranintegrität (Krysko et al., 2008). Untersucht wurde die zelluläre Membranintegrität von HeLa Zellen nach Infektion mit verschiedenen *Yersinia* Toolbox Stämmen.

Eine starke Beeinträchtigung der Membranintegrität von HeLa Zellen konnte nach einer Infektion mit dem Stamm WA (pT3SS) detektiert werden. So wurde nach 2 h und 3 h Infektionszeit ein hoher Wert für die LDH-Freisetzung (Abb. 30 A, 2 h ~ 30 % und 3 h ~ 60 %) detektiert. Zusätzlich konnte mikroskopisch mittels PI-Färbung ein hoher Anteil (Abb. 28, ~ 50 %) an PI-positiven Zellen nach 3 h Infektionszeit detektiert werden. Demgegenüber führten Infektionen mit den Stämmen WA (pT3SS, YopE) und WA (pT3SS, YopT) kaum zu einer Beeinträchtigung der Membranintegrität, da praktisch keine LDH-Freisetzung nach 2 h und 3 h Infektionszeit (Abb. 30 A) und keine PI-positiven Zellen (Abb. 28) nachweisbar waren.

Diese Ergebnisse bestätigen die Arbeiten von Bliska et al. (Mejia et al., 2008; Viboud and Bliska, 2002; Viboud and Bliska, 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Infektionen mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁), WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-Map) erhalten.

Besonders das negative Ergebnis für den Rac1-aktivierenden Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und RhoA-aktivierenden Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) war überraschend, da nach den Berichten von Bliskas Gruppe Aktivierung von Rac1/RhoA nach Infektion mit Yersinien membranschädigend, und Rac1/RhoA-Inaktivierung durch YopE oder YopT membranstabilisierend wirken sollte (Mejia et al. 2008). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Translokation der YopE₁₃₈-Hybridproteine grundsätzlich ausreicht, um die Schädigung der Zytoplasmamembran durch das Ysc-T3SS zu verhindern. Um dies zu überprüfen, wurde die Infektion mit dem Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-P60) und dem Stamm WA (pT3SS, pE_{R144A}) durchgeführt. p60 sollte als Mureinlyase von *Listeria monocytogenes* keine zellbiologische Wirkung haben. YopE_{R144A} weist einen Aminosäureaustausch im Argininfinger (Arginin zu Alanin) auf und ist somit GAP-inaktiv (Von Pawel-Rammingen et al., 2000). Infektionen mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-P60) WA (pT3SS, pE_{R144A}) wiesen ebenfalls praktisch keine Beeinträchtigung der Membranintegrität auf, da kein LDH nach 2 h und 3 h Infektionszeit (Abb. 30 A) sowie nur vereinzelt PI-positive Zellen

(Abb. 28, ~ 3 % nach Infektion mit WA (pT3SS, pE_{R144A})) nachweisbar waren. Somit führte nur die Infektion mit dem Stamm WA (pT3SS) zur Membranschädigung. Falls die Translokationspore des Ysc-T3SS für die Zytoplasmamembranschädigung verantwortlich ist und die GTPasen Rac1/RhoA an der „Porenbildung“ beteiligt sind, sollte sich dies durch Co-Infektionen mit den Stämmen WA (pT3SS) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-X) (mit X = IpgB₁, IpgB₂) widerspiegeln. Die Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS) / WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) = 1:1 führte zu einer starken Membranschädigung, da eine starke LDH-Freisetzung (Abb. 30 B: 2 h / 35 % und 3 h ~ 65 %, Abb. 30 B) und ein hoher Anteil an PI-positiven Zellen nach 3 h Infektionszeit (Abb. 29, ~ 45 %) detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde deutlich weniger LDH nach 2 h bzw. 3 h Infektionszeit (Abb. 30 B: 2 h / 5 % und 3 h / 20 %, Abb. 30 B) bei einer Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS) / WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) = 1:1 freigesetzt. Zusätzlich wurden kaum PI-positive Zellen nach 3 h Infektionszeit detektiert (Abb. 29, 3 h / 3 %). Dies deutet darauf hin, dass das Ysc-T3SS ohne Translokationssubstrat oder ausschließlich mit Rac1-aktivierendem Hybridprotein YopE₁₃₈-IpgB₁ in Co-Infektion eine Membranschädigung der infizierten Zelle verursacht. In Gegenwart des RhoA-aktivierenden Proteins YopE₁₃₈-IpgB₂ hingegen ist die Membranschädigung durch das Ysc-T3SS deutlich reduziert.

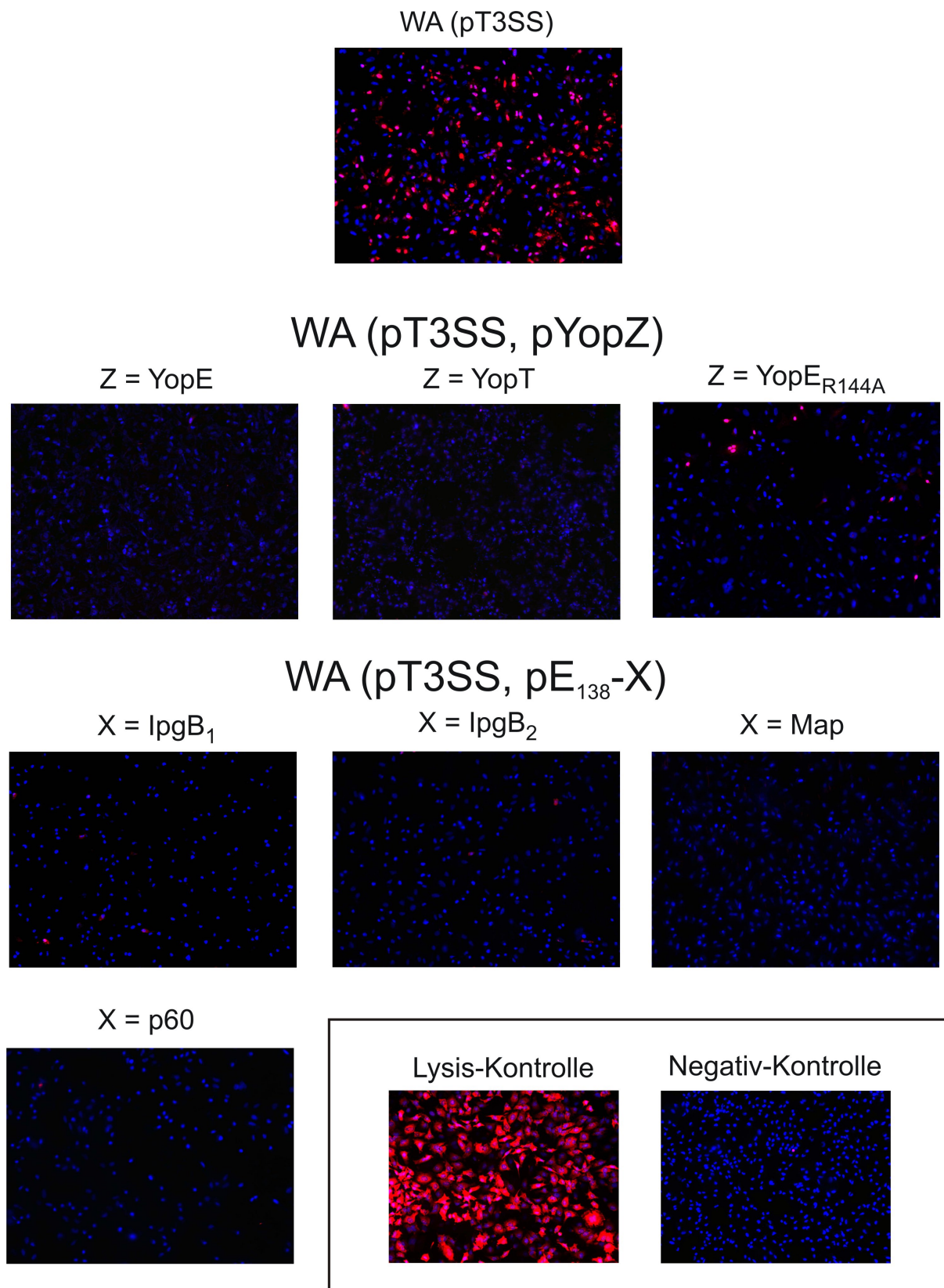


Abb. 28 Einfluss des Ysc-T3SS auf die Membranintegrität von HeLa-Zellen in Abhängigkeit der Effektorproteine YopZ (Z = YopE, YopT, YopE_{R144A}) sowie YopE₁₃₈-X (X = IpgB₁, IpgB₂, Map, p60) auf die Membranintegrität von HeLa Zellen.

Infektion von HeLa Zellen (MOI = 10) mit den Stämmen WA (pT3SS), WA (pT3SS, pYopZ) und WA (pT3SS, E₁₃₈-X) für 3 h. Anschließend Färbung der Zellkerne mit Propidiumiodid PI (rot) und DAPI (blau). PI-positive Zellen zeigen eine Membranschädigung der jeweiligen Zelle an.

3.5) Beeinflussung der MDCK-Epithelschichtintegrität durch die Hybridproteine YopE₁₃₈-IpgB₁, YopE₁₃₈-IpgB₂ und YopE₁₃₈-Map

Sowohl Darmepithelzellen als auch Nierentubulizellen sind lateral durch „Tight Junctions“ (TJ) und „Adherence Junctions“ (AJ) verbunden und bilden so polarisierte Zellschichten aus. Die Integrität der Epithelschicht wird durch Rho GTPasen gesteuert. Da IpgB₁, IpgB₂ und Map die Feinregulation der Rho GTPasen beeinflussen, sollten sie die Epithelschichtintegrität modulieren. Von Shigellen ist bekannt, dass sie die Epithelschichtintegrität empfindlich stören und es zur Öffnung von TJ / AJ im Darmepithel kommt, so dass zum einen Immunzellen ins Darmlumen gelangen und zum anderen die Shigellen über die zellulären Spalten zwischen den Enterozyten in diese basolateral invadieren können. Für diesen Vorgang allerdings sind bisher noch keine Effektoren beschrieben. Die Integrität des Epitheliums wurde *in vitro* durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands/Resistenz (TER) bestimmt, wobei ein hoher TER-Wert auf ein intaktes Epithel schließen lässt. Demgegenüber bedeutet ein niedriger Wert, dass die Zellverbindungen und damit die Epithelschichtintegrität abnehmen. Keine Abnahme der Epithelschichtintegrität konnte für den Stamm WA Δinv (pT3SS) detektiert werden. Somit kann dieser Stamm als Negativ-Kontrolle dienen. Ebenfalls konnte keine Abnahme der Epithelschichtintegrität durch eine Infektion von WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) detektiert werden (Abb. 31). Demgegenüber wurde eine Abnahme der Epithelschichtintegrität während einer Infektion mit den Stämmen WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-Map) detektiert. Bereits nach 2 h war der TER-Wert 25 % niedriger als der Ausgangswert. Diese Abnahme des TER-Werts setzte sich in den beobachteten Zeitraum von 6 h bis auf 60 % für den Stamm WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und bis auf 40 % für die mit dem Stamm WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-Map) infizierten Zellen fort. YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-Map sind somit in der Lage die Epithelschichtintegrität polarisierter Zellen deutlich zu schädigen.

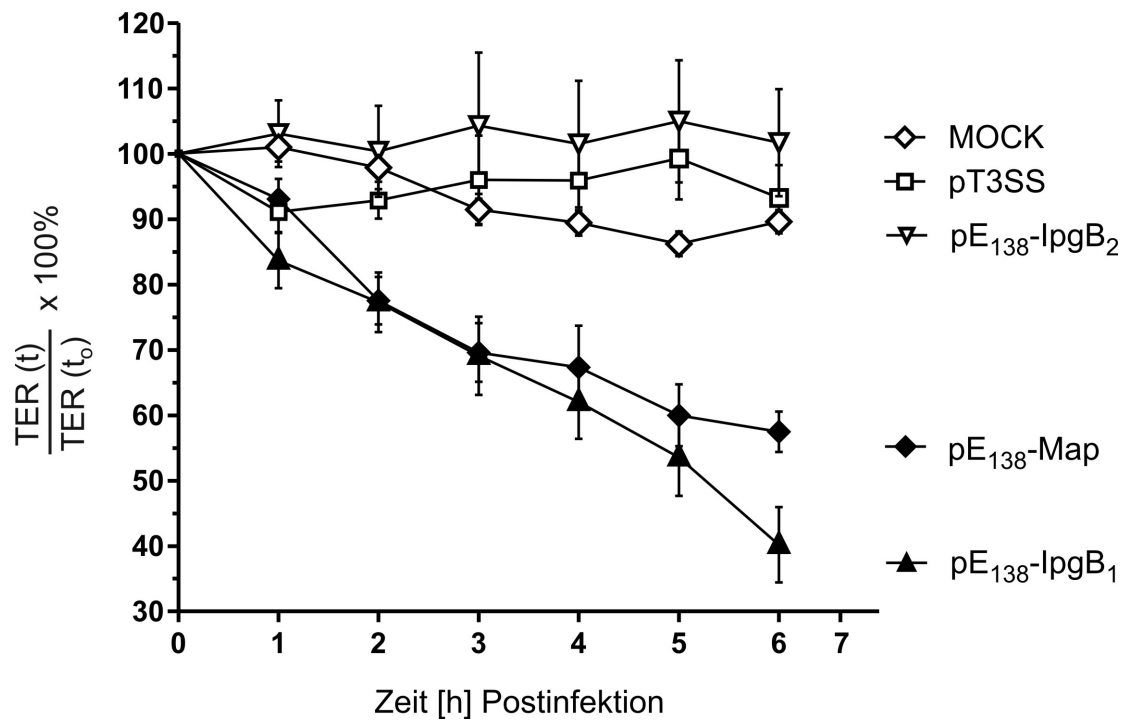


Abb. 31 Einfluss der YopE₁₃₈-X Hybridproteine auf die Epithelschichtintegrität polarisierter MDCK Zellen. Infektion polarisierter MDCK Zellen (MOI = 10) mit den Stämmen WA Δinv (pT3SS) und WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-X) mit X = IpgB₁, IpgB₂ und Map. Stündliche Messung der TER – Werte über den Zeitraum von 6 h. Darstellung normierter Werte % [(TER(t) / TER(o)) x 100 %]

3.6) Fazit I

Die Rho GTPasen GEF-Mimetika können mittels der *Yersinia*-Toolbox isoliert oder in definierten Kombinationen untersucht werden. In dieser Arbeit wurde das Sekretions- und Translokationsverhalten, der Einfluss auf das Aktinzytoskelett und damit einhergehend auf Invasion sowie der Einfluss auf die Epithelschichtintegrität polarisierter Zellen untersucht. Dabei konnte Sekretion und Translokation der YopE Hybridproteine mit den Fusionspartnern für IpgB₁, IpgB₂ und Map gezeigt werden. Weiterhin konnte durch Aktinfärbungen die biologische Aktivität der translozierten Proteine nachgewiesen werden.

Invasionsstudien zeigten, dass YopE_i-IpgB₁ die Invasion induziert, wohingegen YopE_i-IpgB₂ die Invasin-abhängige und IpgB₁-induzierte Invasion reduziert, was auf einen Antagonismus zwischen den aktivierten Rho GTPasen Rac1 und RhoA hinweist.

Untersuchungen zur Membranintegrität ergaben entgegen der Erwartung, dass die Rac1 und RhoA Aktivierung durch IpgB₁ bzw. IpgB₂ nicht zu einem Anstieg der Zerstörung der Membranintegrität führt.

Eine Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) führte aber nicht zur „Porenheilung“ durch YopE₁₃₈-IpgB₁ im Gegensatz zu YopE₁₃₈-IpgB₂ (Co-Infektion WA (pT3SS / WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂)). Untersuchungen zur Epithelschichtintegrität zeigten, dass YopE₁₃₈-Map und YopE₁₃₈-IpgB₁ in der Lage sind, die Epithelschichtintegrität empfindlich zu stören, wohingegen YopE₁₃₈-IpgB₂ wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Epithelschichtintegrität hat. Somit ist die *Yersinia*-Toolbox ein multifunktionelles „Werkzeug“, um verschiedenste zellbiologische Aspekte zu untersuchen.

4.) Ergebnisse II

4.1) Konstruktion von konditionalen Rho GTPasen knockout Mäusen

Konditionale Rho GTPasen ko-Mäuse wurden gezüchtet, um diese Mäuse zum einen als Spendertiere für die Gewinnung von Phagozyten (Neutrophile, Makrophagen), und zum anderen als Infektionsmodell zu verwenden. Wie bereits in der Einleitung (Kap. 1.5) geschildert wurde die sequenzspezifische Rekombinase Cre unter Kontrolle des *lysM* Promotors gebracht. Dieser Promotor ist in Makrophagen und Neutrophilen aktiv, so dass es zur zellspezifischen Deletion von „geflochten“ (fl) Genabschnitten kommt (hier: RhoA^{fl}, Rac1^{fl} und Cdc42^{fl}). Da *Yersinia enterocolitica* die Rho GTPasen in professionellen Phagozyten (z.B. Makrophagen und Neutrophile) durch YopE und YopT inhibiert, könnte die Fragestellung nach der Mausvirulenz der Stämme WA (pYV), WA (pYV $\Delta yopT$), WA (pYV $\Delta yopE$) und WA (pYV $\Delta yopT$, $\Delta yopE$) und die Bedeutung der Rho GTPasen für den *Yersinia*-Infektionsprozess durch diese Mäuse bearbeitet werden. Weiterhin könnten RhoA, Rac1, und Cdc42-negative Makrophagen für *in vitro* Untersuchungen zur Wirkungsweise der YopE_i-X-Hybridproteine verwendet werden.

Die Mäuse wurden über drei Generationen gezüchtet. Dabei wurde der Genotyp mittels PCR aus Schwanzspitzengewebe bestimmt. Abb. 14 (Kap. 2.9.1) zeigt den Zuchtplan. Dabei wurde bis zur Generation F₃ gezüchtet, um homozygote Mäuse zu generieren: RhoGTPase^{fl/fl}, *lysM::cre* / *lysM::cre*. Die Genotypisierungs-PCR war so konzipiert, dass für den jeweiligen Genotyp eine bestimmte Kombination an PCR-Produkten detektiert wurde.

So bedeutete eine Bande bei 393 bp (Flox PCR) und eine Bande bei 700 bp (*lysM::cre* PCR) für den RhoA Stamm (Abb. 32), dass die Maus folgenden Genotyp besaß $RhoA^{fl/fl}$, *lysM::cre* / *lysM::cre*. In Tab. 25 sind alle weiteren Kombinationen aufgelistet.

erwartete Größe der PCR Produkte	WT	heterozygot	homozygot
	+/+	+/-	-/-
RhoA	297 bp	297 bp / 393 bp	393 bp
Rac1	236 bp	236 bp / 318 bp	318 bp
Cdc42	160 bp	160 bp / 310 bp	310 bp
LysM Cre	350 bp	350 bp / 700 bp	700 bp

Tab. 25

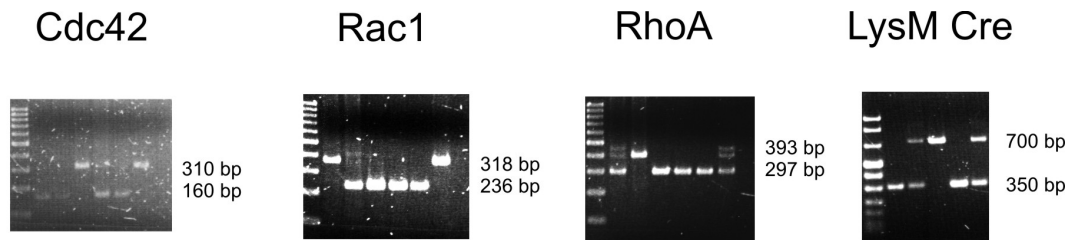


Abb. 32 Mausgenotypisierung mittels PCR. Ein „gefloxtes“ Allel bzw. das *lysM::cre* Allel wurde durch die Anzahl der PCR-Produktbanden deutlich (Homozygote Individuen zeigen nur eine Bande, heterozygote zwei Banden). Die zu erwartenden Bandengrößen sind in Tab. 25 dargestellt.

4.2) Nachweis der Deletion von RhoA, Cdc42 und Rac1 in Makrophagen

Um das Expressionsverhalten von *lysM* und damit einhergehend von Cre zu untersuchen, wurde zunächst die GFP-Fluoreszenz von *lysM::gfp* BMD-Makrophagen für 15 Tage untersucht. Die GFP-Fluoreszenz dient dabei als Maß für die Aktivität des *lysM* Promotors. Unter den Zellkulturbedingungen (Kap. 2.9.4) war die GFP Expression nach 15 Tagen maximal (Abb. 33). Diese Kultivierungsbedingungen dienten als Referenz für die Kultivierung der *lysM::cre* Makrophagen. Unter diesen Bedingungen sollte die Expression der Cre Rekombinase optimal sein, so dass eine Excision des „gefloxten“ Genabschnitts von Cdc42, RhoA bzw. Rac1 zu erwarten war.

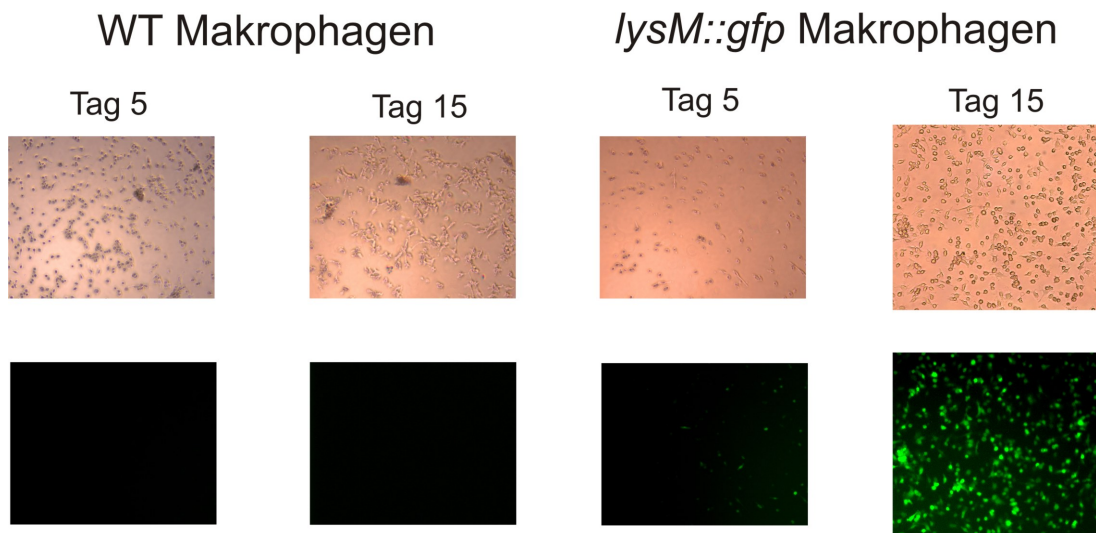


Abb. 33 Überprüfung der *lysM* Promotoraktivität. Gewinnung von Femur-Knochenmark, Kultivierung und Ausdifferenzierung in M-CSF-haltigem Medium (2ng/ml). Aufnahme der Zellen bei 10-facher Vergrößerung.

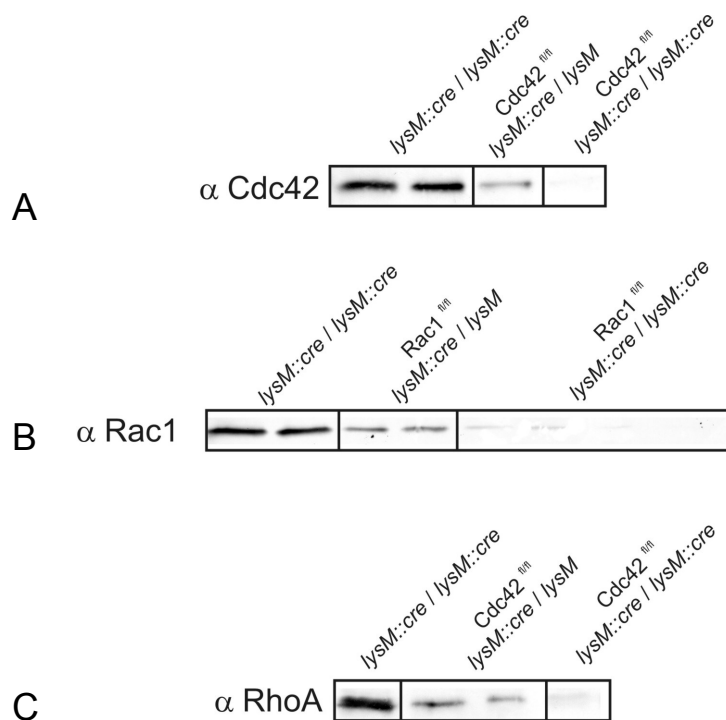


Abb. 34 Immunoblot Nachweis von (A) Cdc42, (B) Rac1 (C) RhoA in BMD-Makrophagen. Die Knochenmarkszellen wurden 15 Tage mit M-CSF haltigem Medium ausdifferenziert, lysiert anschließend im SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Elektrolot auf NZ-Filter übertragen.

Um zu überprüfen, ob die BMD-Makrophagen tatsächlich eine RhoA-, Rac1-, bzw. Cdc42-Deletion haben, wurden die Zelllysate von ausdifferenzierten BMD-Makrophagen mittels Immunblot analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von RhoA, Cdc42 und Rac1 bei homozygoten *lysM::cre* Makrophagen vorlag. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bei heterozygoten *lysM::cre* Makrophagen nicht zur vollständige Deletion kommt, so dass eine Mischkultur von RhoA-, Rac1- bzw. Cdc42-positiven und -negativen Zellen vorlag (Abb. 34 A, B, C).

Daraufhin wurde die Zuchtstrategie derart angepasst, dass nur noch homozygote Mäuse (fl/fl, *lysM::cre / lysM::cre*) gezüchtet wurden. Weiterhin wurden die *lysM::cre / lysM::cre* Mäuse der F₃ Generation als Kontrollmäuse (ohne Deletion der GTPasen) verwendet. Damit wurde die Möglichkeit geschaffen, sowohl *in vitro* als auch in *in vivo* Versuche zur Rolle der Rho GTPasen in der Infektionsabwehr durchzuführen.

4.3) Mausinfektionsversuche

Um den Einfluss zur Rolle der Rho GTPasen auf die Infektionsabwehr zu untersuchen, wurden Infektionsversuche mit den GTPase-gendeletierten Mäusen durchgeführt. Dazu wurden je fünf Tiere pro Versuchsgruppe mit 1×10^4 Bakterien intraperitoneal (i.p.) infiziert. Für die Infektion wurde zum einen der Erreger *Yersinia enterocolitica* und zum anderen *Salmonella Typhimurium* verwendet.

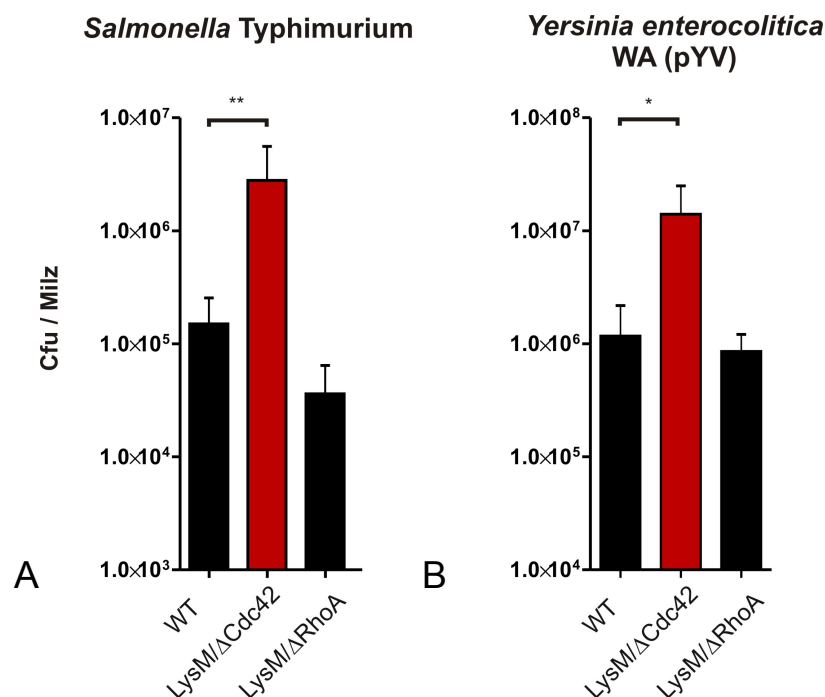


Abb.35 Ergebnisse von intraperitoneal infizierten Mäusen mit Cdc42- bzw. RhoA-deletierten Makrophagen. WT: 129Sv / C57/Bl6-Hybrid, LysMCre, Wildtyp-Kontrolle. Infektionsdosis: 10^4 *Salmonella Typhimurium* SL 1344 bzw. *Y. enterocolitica* WA (pYV). Nach 2 Tagen wurde die Milzenkolonisierung überprüft.

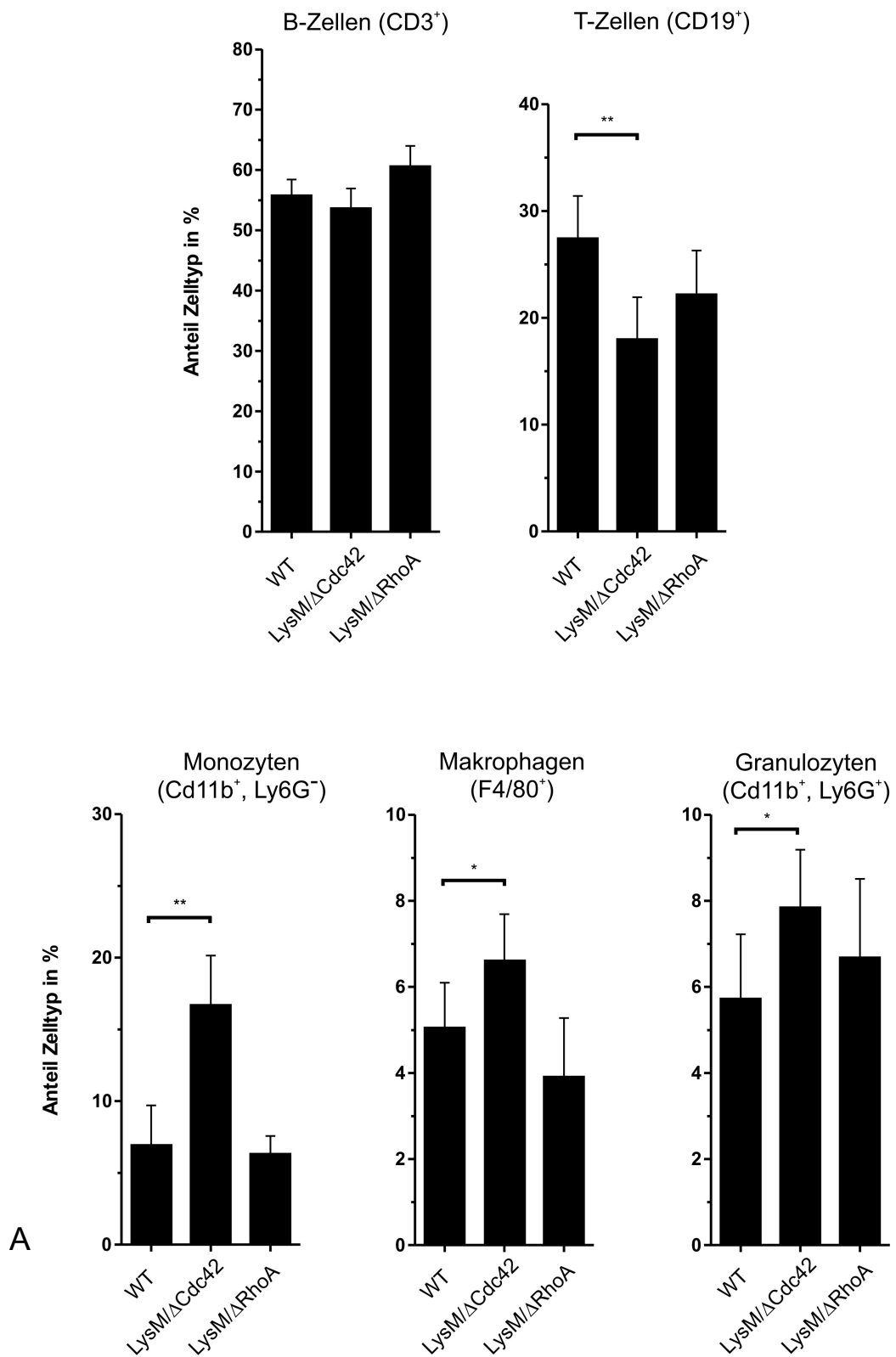
Nach zwei Tagen wurde die Kolonisierung der Milzen untersucht. Eine signifikante Erhöhung der Milzkolonisierung (1-1,5 Log-Stufen) wurde für den Mausstamm LysM/ΔCdc42 im Rahmen einer Salmonellen und Yersinien Infektion nachgewiesen.

Dies zeigt, dass die LysM/ Δ Cdc42 Mäuse insgesamt anfälliger für Infektionen sind (Abb. 35 A, B). Demgegenüber wurde kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollmäusen für die die LysM/ Δ RhoA Mäuse festgestellt.

In einem weiteren Experiment wurde die Zusammensetzung der Splenozyten (B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten) mittels FACS Analyse von infizierten Mäusen differentiell quantifiziert. Dazu wurden nach 2 Tagen die Milzen aus den mit *Yersinia enterocolitica* bzw. *Salmonella Typhimurium* infizierten Mäusen entnommen und für die FACS Analyse verwendet. Bei einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* ergab sich kein Unterschied bei dem Anteil an B Zellen (CD19⁺) zwischen LysM/ Δ Cdc42-, LysM/ Δ RhoA- und Kontroll-Mäusen. Demgegenüber wurde aber ein signifikanter Unterschied des T Zell-Anteils (CD3⁺) zwischen infizierten Kontrollmäusen (28 %) und LysM/ Δ Cdc42 Mäusen (17 %) detektiert. Gleichzeitig war der Monozyten- (CD11b⁺, Ly6G⁻), Makrophagen (F4/80⁺) und Granulozyten (Cd11b⁺, Ly6G⁺) Anteil bei LysM/ Δ Cdc42 Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant erhöht. Bei den Monozyten der LysM/ Δ Cdc42 Mäuse betrug der Anteil 18 % gegenüber 8 % bei Kontrollmäusen. Ähnlich erhöhte Werte wurden für Granulozyten bei LysM/ Δ Cdc42 Mäusen gefunden im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abb. 36 A). Dieses Ergebnis des erhöhten Anteils der Monozyten, Makrophagen und Granulozyten korreliert mit den stärker kolonisierten Milzen der LysM/ Δ Cdc42 Mäuse. Cdc42 ist somit ein wichtiger Faktor für die Infektionsabwehr. Für den LysM/ Δ RhoA Mausstamm wurden keine signifikanten Unterschiede für die T und B Zellpopulation sowie für die Monozyten, Makrophagen und Granulozyten im Vergleich mit den Werten der Kontrollmaus festgestellt. Auch dieses Ergebnis korreliert mit der ermittelten Erregerlast der Milz. RhoA scheint also nicht essentiell für die Infektionsabwehr der Mäuse zu sein. Im Rahmen einer *Salmonella Typhimurium* Infektion konnte kein Unterschied der B- und T-Zellen für die Mausstämme LysM/ Δ Cdc42 und LysM/ Δ RhoA sowie für den WT-Kontrollstamm detektiert werden. Ähnlich wie bei der Infektion mit *Yersinia enterocolitica* ist der Anteil an Makrophagen und Monozyten bei dem LysM/ Δ Cdc42 Stamm signifikant erhöht verglichen mit dem Kontrollstamm.

Auffällig dabei ist, dass der Makrophagen- und Monozyten- Anteil deutlich geringer bei einer Salmonellen- als bei einer Yersinien-Infektion war (Faktor 3 - 4-fach).

Der LysM/ Δ RhoA Stamm verhielt sich wie schon bei der Yersinien Infektion ähnlich wie der WT und zeigte keine Unterschiede.



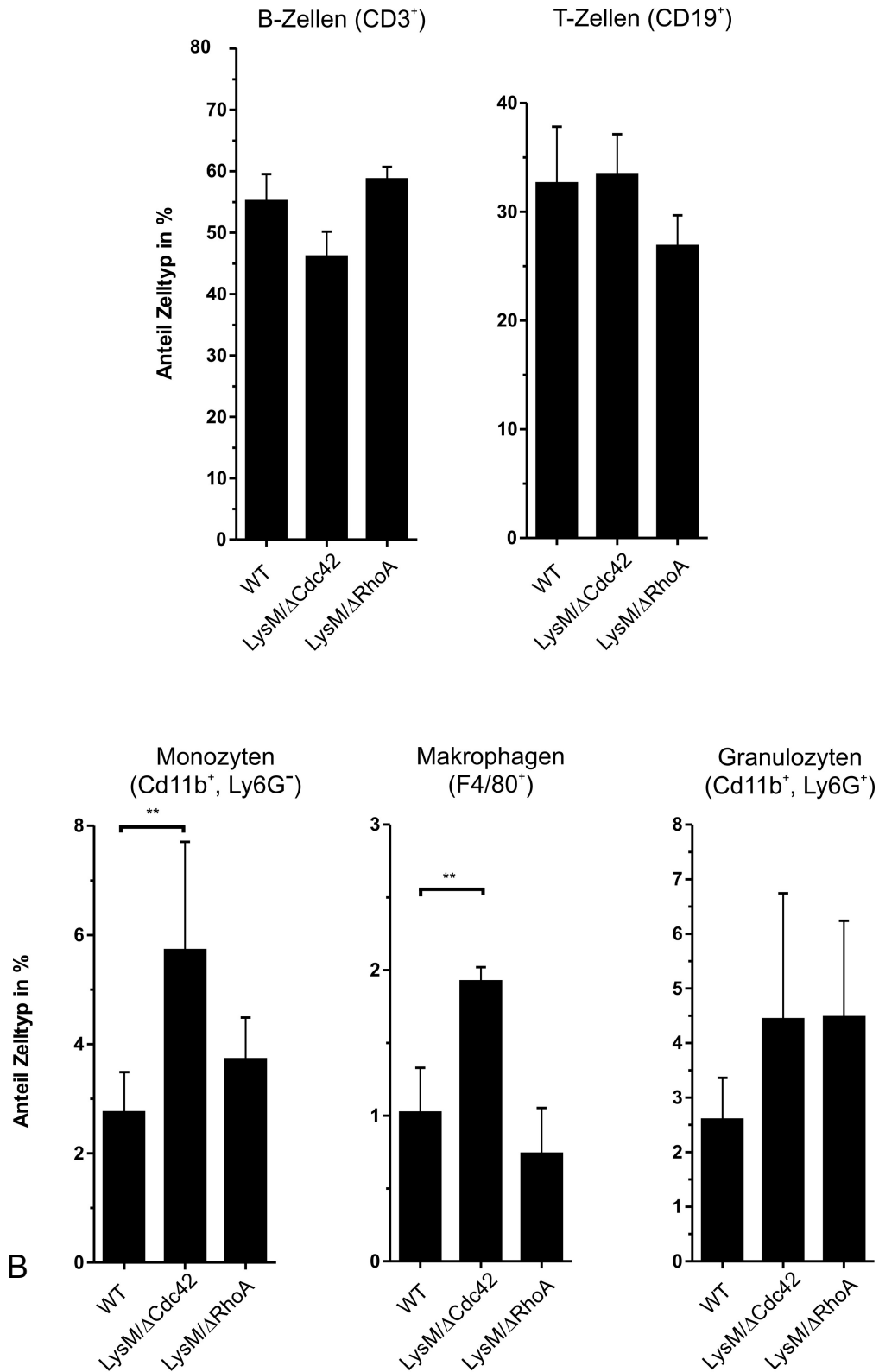


Abb. 36 Einfluss der Rho GTPasen auf die Anteile der Milz-Zellpopulationen (B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten) nach einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* WA (pYV) **(A)** bzw. mit *Salmonella* Typhimurium SL 1344 **(B)**. Bestimmung der Milz-Zellpopulationsanteile von infizierten GTPase Deletionsmäusen mittels FACS-Analyse. B-Zellen (CD3⁺), T-Zellen (CD19⁺), Monozyten (CD11b⁺, Ly6G⁻), Makrophagen (F4/80⁺) und Granulozyten (CD11b⁺, Ly6G⁺). Intraperitoneal-Infektion von jeweils fünf Mäusen der Mausstämmen LysM Δ Cdc42, LysM Δ RhoA und LysM (WT-Kontrolle) mit jeweils 10⁴ Bakterien. Bestimmung der Zellpopulationen in der Milz nach 2 Tagen Inkubationszeit.

4.5) Fazit II

Die zellspezifische Deletion der Gene für RhoA, Rac1 bzw. Cdc42 war in den BMD-Makrophagen bei den gezüchteten Mäusen nachweisbar. Die Mausinfektionsversuche zeigen, dass der LysM/ Δ Cdc42 Mausstamm anfälliger ist für Infektionen mit *Yersinia enterocolitica* und *Salmonella* Typhimurium. Weiterhin konnte eine deutliche Erhöhung der Monozyten-, Makrophagen- und Granulozyten-Population in der Milz der mit *Yersinia enterocolitica*- sowie eine Erhöhung der Monozyten-, Makrophagen- der mit *Salmonella* Typhimurium-infizierten LysM/ Δ Cdc42 Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen detektiert werden. Damit wird deutlich, dass Cdc42 wichtig für die Infektionsantwort auf Yersinien (extrazellulär) und Salmonellen (intrazellulär) ist.

5.) Diskussion

5.1) *Yersinia* Toolbox

5.1.1) Sekretion und Translokation der YopE_i-X Hybridproteine

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *Yersinia enterocolitica* mit seinem plasmidkodierten Ysc-T3SS heterologe YopE-Hybridproteine sekretieren und in Zellen translozieren kann (Abb. 16, 17). Bereits frühere Arbeiten zur Entwicklung von Lebendvakzinen zeigten, dass heterologe Fusionsproteine bestehend aus dem YopE N-Terminus und dem zu untersuchenden Proteinantigen, akzeptierte Ysc-T3SS Substrate von *Yersinia enterocolitica* sind (Trulzsch et al., 2008; 2005; Russmann et al., 2003; 2001; 2000). Je nach Länge des N-Terminus von YopE ergeben sich unterschiedliche Sekretions- / Translokationsraten für das T3SS Substrat. So vermitteln die ersten 18 Aminosäuren (aa) eine schwache Sekretion, aber keine Translokation in Wirtszellen. Im Unterschied dazu vermitteln die ersten 53 aa eine starke Sekretion des heterologen Fusionsproteins und eine schwache Translokation in Wirtszellen. Die ersten 138 aa hingegen vermitteln eine Sekretion in den Überstand und eine effiziente Translokation in Wirtszellen (Jacobi et al., 1998). Da die ersten 138 aa die SycE Bindestelle (Cb = „Chaperone binding site“) enthalten, deutet dies darauf hin, dass SycE für eine erfolgreiche Translokation und Sekretion benötigt wird.

Entgegen der Erwartung durch frühere Arbeiten von Jacobi et al. mit E₁₈-Hybridproteinen konnte keine Sekretion von YopE₁₈-IpgB₁ und YopE₁₈-IpgB₂ detektiert werden (Abb 17 A, B). Lediglich YopE₁₈-Map konnte im Überstand nachgewiesen werden. Die genaue Betrachtung der jeweiligen YopE N-Termini zeigt (Rodgers et al., 2010; Rodgers et al., 2008), dass nur das 138 aa Konstrukt die gesamte Bindestelle für das SycE-Dimer beinhaltet, wohingegen das 53 aa Konstrukt noch die Domäne für ein SycE-Monomer trägt und das 18 aa Konstrukt keine SycE Bindestelle aufweist. SycE ist das Chaperon für YopE und ist bei dem T3SS-abhängigen Proteinexport von YopE notwendig. Dabei bindet SycE als Dimer an die SycE Bindestelle von YopE (Abb. 37).

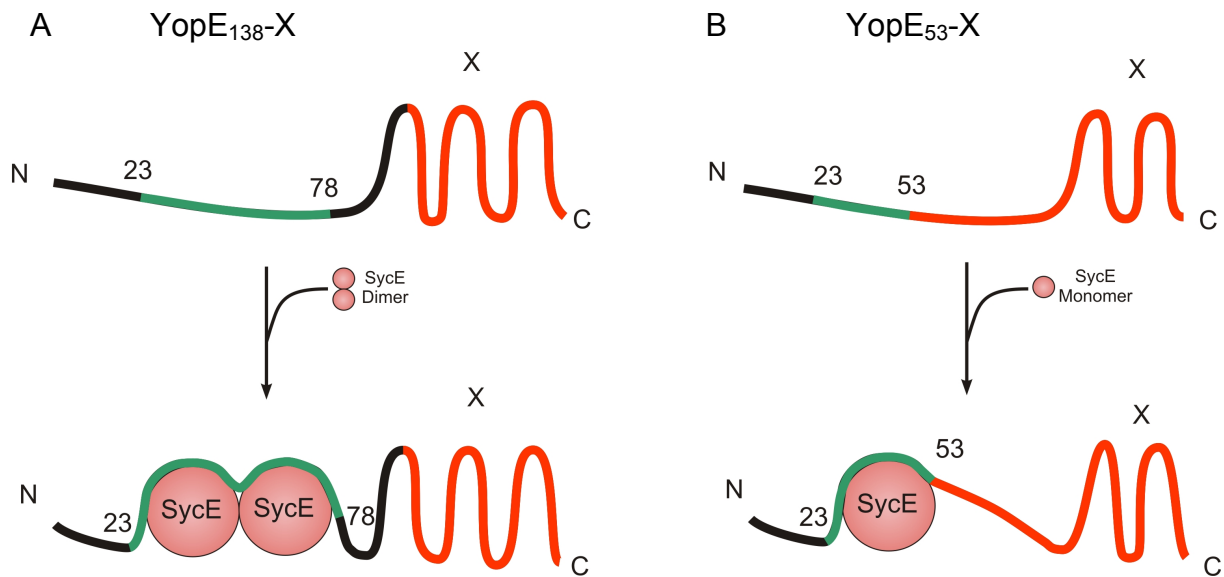


Abb. 37 Schematische Darstellung der SycE-vermittelten Faltung der YopE_i-X Hybridproteine (i=53, 138). **(A)** Die SycE Bindestelle ist N-terminal im Bereich 23-78 aa lokalisiert (grün). Nach Bindung des SycE-Dimers wird das Ysc-T3SS Substrat in eine Konformation gebracht, die Sekretion und Translokation in Zielzellen erlaubt (Rodgers et al., 2008). **(B)** Modell zur Sekretionsvermittlung von YopE₅₃-X-Hybridproteinen. Der 53 aa umfassende YopE-N-Terminus enthält ungefähr die Hälfte der SycE-Bindestelle (23-53 aa), so dass vermutlich SycE-Monomere binden und die Sekretion vermitteln.

Die Konstrukte YopE₁₈-IpgB₁ und YopE₁₈-IpgB₂ weisen keine bzw. nur eine kaum detektierbare Sekretion auf, wohingegen das YopE₁₈-Map Konstrukt deutlich effizienter sekretiert wird. Dies zeigt, dass nicht nur die Länge des YopE-N-Terminus sondern auch das fusionierte heterologe Protein das Sekretionsverhalten bestimmt. Da die fusionierten Proteine ihrerseits T3SS Effektoren sind und die Fusionsproteine ihre eigene Signalsequenz und Chaperonbindestelle des *Shigella*- bzw. *E. coli* EHEC-T3SS tragen, könnte dies die Ursache für das unterschiedliche Sekretionsverhalten sein. Die Proteine IpgB₁ und IpgB₂ benötigen für ihre Sekretion über das Shigellen-Mxi-Spa15 T3SS das Chaperon Spa15 (Parsot et al., 2003; Page et al., 2002; 2001), wohingegen Map das Chaperon CesT für das EHEC/EPEC T3SS benötigt (Thomas et al., 2005). CesT und SycE gehören beide zu den Klasse IA Chaperonen und sind sich somit strukturell sehr ähnlich. Spa15 hingegen gehört zu den Klasse IB Chaperonen, die hinsichtlich der Effektor Interaktionsdomäne einen strukturellen Unterschied im Vergleich zu Klasse IA Chaperonen aufweisen. Da CesT hinsichtlich der Effektor - Bindedomänen dem SycE sehr ähnlich ist, könnte SycE die Sekretion von E₁₈-Map vermitteln, indem es ähnlich wie das CesT an die CesT Bindestelle im Effektor Map bindet. Dagegen ließe sich die ineffiziente Sekretion von YopE₁₈-IpgB₁ sowie YopE₁₈-IpgB₂ so erklären, dass SycE nicht in der Lage ist, an die Spa15 Bindestellen von IpgB₁ und IpgB₂ zu binden.

Vorstellbar wäre damit, dass das Klasse IA Chaperon SycE die Sekretion von Klasse IB Substraten induzieren kann, wenn das Klasse IB Substrat mit einer Klasse IA Bindestelle (hier YopE_{53 / 138}) markiert ist.

5.1.2) Biologische Aktivität der YopE_i-X Hybridproteine

Nach erfolgreicher Translokation in die Wirtszelle sollten die YopE_i-Hybrid-Effektoren ihre zellbiologische Aktivität entfalten. In der vorliegenden Arbeit wurde die zellbiologische Aktivität mittels Fluoreszenz-Phalloidin-Färbung von Aktinfasern nach Infektionen von HeLa Zellen analysiert, da bereits frühere Arbeiten zeigten, dass IpgB₁, IpgB₂ und Map Modulatoren des Aktinzytoskeletts sind, die selektiv je Rac1 / RhoG, RhoA bzw. Cdc42 aktivieren (Huang et al., 2009; Alto and Dixon, 2008; Handa et al., 2007; Alto et al., 2006; Ohya et al., 2005). Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus der W-xxx-E Effektoren derzeit noch nicht vollständig geklärt.

So wurden die W-xxx-E Effektoren IpgB₁, IpgB₂ und Map zunächst als Rho GTPasen Mimetika eingeordnet (Alto et al., 2006). Neuere Arbeiten von Handa et al. ordnen IpgB₁ als RhoG Mimetikum, das mit ELMO-Dock180 interagiert und für Rac1 als GEF wirkt (Handa et al., 2007). Die aktuellste Arbeit von Huang et al. jedoch zeigt, dass IpgB₁ als Rac1 GEF durch direkte Interaktion mit Rac1, IpgB₂ als RhoA GEF und Map als Cdc42 GEF wirkt (Huang et al., 2009). Darüber hinausgehend wurde kürzlich die IpgB₂-GEF-Interaktion mit RhoA strukturell dargestellt (Klink et al., 2010). Letztendlich führen die Effektoren über die Aktivierung der jeweiligen Rho GTPasen zur Aktinzytoskelett-Modulation. In der vorliegenden Arbeit konnte die biologische Aktivität der T3SS Konstrukte durch Induktion spezifischer Aktinstrukturen nachgewiesen werden. So wurden „Membrane Ruffles“ durch YopE₁₃₈-IpgB₁, Stressfasern durch YopE₁₃₈-IpgB₂ und lokale „Microspikes“ durch YopE₁₃₈-Map induziert, was die biologische Aktivität der translozierten Konstrukte zeigt. Diese Ergebnisse ermöglichen weitere zellbiologische Funktionsanalysen von IpgB₁, IpgB₂ und Map mit Hilfe der hier entwickelten *Yersinia*-Toolbox.

5.1.3) Einfluss der YopE_i-X-Hybridproteine auf die zelluläre Invasion

Die Verwendung der *Yersinia* Toolbox zur Untersuchung der zellbiologischen T3SS-Effektorwirkung bietet verschiedene Vorteile. 1) Zellbiologische Untersuchungen verschiedener T3SS-Substrate können mit der *Yersinia* Toolbox in einem physiologischeren Kontext verglichen mit eukaryotischen Transfektionssystemen analysiert werden. So wirken die T3SS-injizierten Effektoren initial eher lokal, was durch die Translokation bedingt ist. Demgegenüber liefert die eukaryotische Transfektionsmethode eher eine globale Effektorwirkung im Zytoplasma.

2) Kann die Effektor-induzierte Wirkung der Zelle auf das produzierende Bakterium untersucht werden, was bei Transfektionsversuchen nicht möglich ist.

3) Mit der *Yersinia*-Toolbox können die Effektoren getrennt von anderen Co-translozierten Effektoren (insbesondere noch unbekannter Effektoren) untersucht werden. Der umgekehrte Weg, also die Generierung von Deletionsmutanten bei noch unbekanntem Erregern könnte die Detektion von Phänotypen wegen überlappender Effekte schwierig machen. So sind Shigellen mit einem Arsenal an T3SS Effektoren ausgerüstet, die mitunter auch redundant wirken können.

a) *Yersinia*-Toolbox-Mono-Infektionen

Die Untersuchungen zur *Yersinia*-induzierten Invasion von HeLa Zellen zeigten, dass der Stamm WA (pT3SS) Invasin-abhängig in HeLa Zellen invadiert. Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass Invasin mit zellulärem β 1-Integrin interagiert und, dass die Interaktion zur Rac1-abhängigen Internalisierung der Yersinien führt (Isberg and Barnes, 2001; Dersch and Isberg, 1999). Die Rac1-Abhängigkeit der Invasin-vermittelten Invasion konnte bei dem Stamm WA (pT3SS) in Gegenwart des Rac1-Inhibitors NSC23766 ebenfalls gezeigt werden. Die Invasionsversuche wurden daher mit Invasin-positiven und negativen Stämmen durchgeführt.

Die Untersuchungen zur *Yersinia*-induzierten Invasion von HeLa Zellen zeigten, dass YopE_i-IpgB₁ die Invasion der Stämme WA (pT3SS, pE_i-IpgB₁) und WA *inv* (pT3SS, pE_i-IpgB₁) (i = 53, 138 aa, Abb. 19 A, C) induzierte. Die Rate war deutlich erhöht gegenüber der Inv-abhängigen Invasion.

Diese Daten gehen einher mit den Ergebnissen von Ohya et al., die besagen, dass IpgB₁ Überexpression bzw. ektopische Expression in HeLa Zellen zu „Membrane Ruffles“ und zu erhöhter Invasion führen (Ohya et al., 2005). Gleichzeitig konnte diese Gruppe zeigen, dass IpgB₁ mit dem ELMO-Dock180 Signalweg interagiert und ein aktives GEF für Rac1 bildet und somit Rac1 aktiviert (Handa et al., 2007). Die aktuellste Arbeit von Huang et al. jedoch weist die GEF-Aktivität von IpgB₁ für Rac1 biochemisch und strukturell nach (Huang et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Rac1-Abhängigkeit der YopE₁₃₈-IpgB₁-induzierten Invasion unter Verwendung des Rac1 Inhibitors NSC23766 nachgewiesen werden.

Dieser Inhibitor verhindert die Interaktion der Rac1-GEFs Tiam und Trio mit Rac1 und damit die Aktivierung von Rac1 (Gao et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die YopE₁₃₈-IpgB₁-induzierte Invasion abhängig von Rac1-Aktivierung ist, da der Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) eine signifikante Invasionsreduktion in Gegenwart des Inhibitors NSC23766 aufweist. Vermutlich verhindert der Inhibitor NSC23766 ähnlich wie für die Rac1-GEFs Tiam und Trio die Interaktion von YopE₁₃₈-IpgB₁ mit Rac1, so dass YopE₁₃₈-IpgB₁ nicht seine GEF-Aktivität ausüben kann. Da der Inhibitor NSC23766 signifikant die YopE₁₃₈-IpgB₁ vermittelte Invasion blockiert, wirkt NSC23766 als „Virulenz-Blocker“.

YopE₁₃₈-IpgB₁ führt nicht nur zur Ausbildung von „Membrane Ruffles“, sondern auch zur Internalisierung der translozierenden Bakterien. Diese Internalisierung jedoch ist neben Rac1 auch abhängig von der PI-3-K und damit PIP₃ (Abb. 25 C, D). Da sich der „Phagocytic Cup“ (Abb. 26) allerdings noch in Gegenwart des PI-3-K Inhibitors Wortmannin ausbildet, wird hier eine Aktivierungshierarchie deutlich. So wird zunächst Rac1 aktiviert, was im weiteren Verlauf zur Aktivierung der PI-3K führt.

Der Effektor YopE_i-IpgB₂ in den Stämmen WA (pT3SS, pE_i-IpgB₂) (i = 53, 138 aa) inhibierte die Inv-abhängige Invasion (Abb. 19 A). Da die Inv abhängige Invasion über Rac1 gesteuert wird (Isberg and Barnes, 2001; Dersch and Isberg, 1999), ergeben sich hier Hinweise darauf, dass IpgB₂ die Rac1-Aktivierung inhibiert. Invasionsstudien in Gegenwart des ROCK Inhibitors Y-27632 ergaben, dass die Invasionsrate des Stammes WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) erhöht war im Vergleich zur WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) Invasionsrate ohne Inhibitor. Allerdings erreichte diese erhöhte Invasionsrate nicht den Vergleichswert des Stammes WA (pT3SS).

Da durch ROCK-Inhibition die Invasionsrate von WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) erhöht wurde, Inv Rac1-abhängig die Invasion vermittelt und IpgB₂ die Inv-abhängige Invasion unterdrückt, ergeben sich hier Hinweise, dass die Rac1-Inhibition von IpgB₂ über RhoA und ROCK gesteuert wird.

b) Co-Infektionen

Co-Infektionen von HeLa-Zellen mit Yersinien, die unterschiedliche Effektoren injizieren, ermöglichen die Analyse der interaktiven Wirkung von T3SS-Effektoren.

So ergab sich eine Internalisierungsinhibition während einer Co-Infektion von HeLa Zellen mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂). Selbst bei einem YopE₁₃₈-IpgB₁-Überschuss (Mischungsverhältnis 5:1) war die Invasionsrate signifikant durch YopE₁₃₈-IpgB₂ reduziert (Abb. 20 B). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass YopE₁₃₈-IpgB₂ antagonistisch auf YopE₁₃₈-IpgB₁ wirkt. Dieser Effekt stellte sich ebenfalls bei dem Co-Translokationsstamm WA (pT3SS, pIV-E₁₃₈-IpgB₁, pE₁₃₈-IpgB₂) ein (Abb. 24 A). Hier war die Invasionsrate um das 7-Fache reduziert. Allerdings zeigen Sekretionsstudien des Co-Expressions Stammes, dass bei gleichzeitiger *yopE₁₃₈-ipgB₁* und *yopE₁₃₈-ipgB₂*-Expression die E₁₃₈-IpgB₁-Sekretion um das 2-Fache reduziert ist.

Von Hachani et al. wurde die Invasivität von *ipgB₁*- und *ipgB₂*-Deletionsmutanten von *Shigella flexneri* untersucht (Hachani et al., 2008). Eine *ipgB₁*-Deletionsmutante war erwartungsgemäß weniger invasiv in HeLa Zellen verglichen mit dem WT-Stamm. Dagegen führte die Deletion von *ipgB₂* zu keiner wesentlichen Veränderung der Invasivität der Shigellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass wahrscheinlich die Injektion verschiedenster Effektorproteine von Shigellen (z.B. IpgB₁, IpgB₂, IpaA, IcsB usw.) überlappende Funktionen haben und die Deletion eines einzelnen Effektorgens nicht immer mit einem deutlichen Phänotyp assoziiert ist.

Dies zeigt einen Vorteil der Yersinia Toolbox, mit der die Effektorwirkung einzelner Effektoren gezielt untersucht werden können.

Offensichtlich reicht die Injektion von IpgB₁ aus, um die Invasion der Yersinien zum Abschluss zu bringen (Gentamicin geschützt). Da YopE₁₃₈-IpgB₂ mit der YopE₁₃₈-IpgB₁-induzierten Bakterienaufnahme interferiert, muss eine Sekretionshierarchie bei Shigellen angenommen werden. Die Invasivität von IpgB₁/IpgB₂-positiven Shigellen (WT) sollte voraussetzen, dass IpgB₂ zeitlich versetzt nach IpgB₁ injiziert wird.

Vermutlich wird der Effektor IpgB₁ als einer der ersten Effektoren in die Zielzelle injiziert, um so Membranhüllungs (Makropinozytose) zu initiieren. IpgB₂ hingegen könnte erst später in der Reihenfolge injiziert werden, so dass die Invasionsinhibition später bzw. erst nach einem bestimmten Invasionsniveau beginnt. Eine Sekretionshierarchie von T3SS Effektoren konnte in der Tat bei enteroinvasiven Bakterien nachgewiesen werden. Salmonellen translozieren ebenfalls Effektoren in die Wirtszelle und induzieren ihre eigene Zellaufnahme durch den sogenannten „Trigger“ Mechanismus. Verschiedenste Proteine sind an dieser Invasion beteiligt. So sind die Effektoren SopE (Rac1-GEF) und SipA (bindet Aktin und senkt die kritische Aktinkonzentration zur Polymerisierung, somit wird die Aktinpolymerisation erleichtert) initial an der Invasion beteiligt. Der Effektor SptP (Proteintyrosinphosphatase, GAP) hingegen bringt die Invasion zum Abschluss. Es konnte gezeigt werden, dass der Effektor SipA zu Beginn des Invasionsprozesses und SptP erst zeitlich verzögert injiziert wird (Winnen et al., 2008; Schlumberger et al., 2005).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die gleiche Invasivität einer *Shigella-ipgB₂* Mutante wäre, dass vermutlich der Sättigungswert der zellulären Invasionskapazität eine erhöhte Invasionsrate einer *Shigella-ipgB₂* Mutante verhindert. Durch das definierte T3SS Effektor Repertoire ist die Yersinia Toolbox besonders geeignet, das Zusammenwirken einzelner Effektoren nach deren Injektion in die Zielzellen zu untersuchen. Die Co-Infektions-Untersuchungen lassen erwarten, dass die Effektoren YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-IpgB₂ simultan in die Zelle injiziert werden, so dass Rac1 und RhoA gleichzeitig aktiviert werden. Die beobachtete Reduktion der Invasionsrate ist wahrscheinlich auf den Antagonismus von YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE₁₃₈-IpgB₂ und damit auf Rac1 und RhoA zurückzuführen.

Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass RhoA über ROCK-Aktivierung Rac1 inhibieren kann. Die Rac1-Inhibition könnte über verschiedene Signalwege stattfinden. So fungiert ein Komplex aus Par-3 / Par-6 / aPKC als Rac1 GEF.

Dieser Komplex spielt zum Beispiel eine Rolle bei der Rac1-Aktivierung an der Frontseite migrierender Zellen oder in Epithelzellen zur Regulation von Adhärenzverbindungen. Bei RhoA-Aktivität wird ROCK aktiviert, das seinerseits Par-3 phosphorylieren kann. Diese Par-3 Phosphorylierung führt zur Inaktivierung des Par-3 / Par-6 / aPKC Komplex und somit zur Inaktivierung von Rac1 (Nakayama et al., 2008; Hurd and Margolis, 2005; Chen and Macara, 2005). Ein weiterer Mechanismus der Rac1-Inaktivierung durch RhoA könnte die Regulation über die PTEN (Phosphoinositol-Phosphatase) sein. Die PTEN ist der Antagonist der PI-3-K, die die Konversion von PIP₂ zu PIP₃ katalysiert. Die PTEN hingegen dephosphoryliert PIP₃ zu PIP₂. Somit führt eine entsprechende PTEN Aktivität ähnlich wie Wortmannin - Behandlung zu einem erhöhten PIP₂- und einen niedrigen PIP₃-Spiegel. PIP₃ wirkt aktivierend auf Rac1. Durch Erhöhung der PIP₂ Konzentration kommt es zur Rac1-GDP (inaktiv) Anreicherung.

Die PTEN wird durch aktiviertes ROCK phosphoryliert, das seinerseits über RhoA aktiviert wird. Somit führt aktiviertes RhoA zur Rac1-Inaktivierung (Meili et al., 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass der RhoA Effektor ROCK die Rac1-GAPs ARHGAP22 oder FilGAP aktivieren kann und somit zur Rac1 Inaktivierung führt (Sanz-Moreno et al., 2008; Ohta et al., 2006). Danach führt beispielsweise aktiviertes RhoA zur ROCK-Aktivierung, das seinerseits FilGAP phosphoryliert. Im phosphorylierten Zustand wirkt FilGAP als Rac1-GAP und führt so zur Rac1-Inaktivierung. FilGAP bildet einen Komplex mit Filamin A, das seinerseits Aktinfilamente vernetzt und sowohl Rho GTPasen als auch deren Regulatoren (GEFs und GAPs) wie z.B. Trio oder deren Effektoren wie z.B. Pak1 bindet (Ohta et al., 2006). Welcher Mechanismus genau bei der durch IpgB₂ induzierten Rac1 Inhibition stattfindet, müssen weitere Arbeiten zeigen (Abb. 39).

Inhibition der YopE₁₃₈-IpgB₁ vermittelten Invasion konnte auch für die Stämme WA (pYV, pE₅₃-IpgB₁) und WA (pYV, pE₁₃₈-IpgB₁) detektiert werden. Da diese Stämme simultan Yops produzieren sollten, sind insbesondere die GTPasen Inhibitoren YopE und YopT entsprechende Kandidaten für die YopE_i-IpgB₁-Invasions-Inhibition (i=53, 138). Hier könnte es zur Interferenz zwischen aktivierenden Signalwegen und inaktivierenden Signalwegen kommen. Bei simultaner Injektion ist die inhibierende Wirkung der Yops dominant gegenüber der Rac1-aktivierenden Wirkung von IpgB₁.

Die Wirkung von YopE (Rac1-GAP, RhoG-GAP) und YopT (Cysteinprotease, inhibiert RhoA und Rac1) auf die IpgB₁-Rac1 Aktivierung wurde mittels Co-Infektionen genauer untersucht. Dazu wurden HeLa Zellen mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pYopT) in verschiedensten Mischungsverhältnissen (5:1, 1:1, 1:5) infiziert und die Invasionsrate bestimmt. Bei einem 1:1-Infektionsverhältnis wurde eine deutliche Invasionsreduktion detektiert, wohingegen bei einer 5:1 Infektion kaum eine Reduktion der Invasionsrate festgestellt wurde (Abb. 21 C).

Im Vergleich zu YopE₁₃₈-IpgB₂ wirkt YopT also schwächer auf die Inhibition der YopE₁₃₈-IpgB₁-vermittelten Invasion. Trotzdem ist die inaktivierende Wirkung von YopT dominant gegenüber der aktivierenden Rac1-Wirkung von YopE₁₃₈-IpgB₁. Dies zeigt genauso wie der Rac1 Inhibitionsversuch (Abb. 25 B), dass YopE₁₃₈-IpgB₁ die zellulären Rho GTPasen benötigt, um Aktinumlagerungen zu induzieren. Da IpgB₁ Rac1 aktiviert, ist die Inhibition der Invasion durch YopT ein starker Hinweis darauf, dass YopT Rac1 inaktiviert. Dies ist insofern von Bedeutung, da YopT von *Y. enterocolitica* laut Literaturlage hauptsächlich RhoA inaktivieren soll (Aepfelbacher et al., 2007; 2005; 2003). Die Rac1 Inaktivierung von YopT scheint dennoch so stark zu sein, dass YopE₁₃₈-IpgB₁ die Invasion kaum induzieren kann (Abb. 39).

Im Rahmen einer Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, pYopE) (Mischungsverhältnis 5:1, 1:1, 1:5) ergab sich ein völlig überraschendes Ergebnis. YopE war nicht in der Lage die YopE₁₃₈-IpgB₁-abhängige Invasion bei einem 1:1 Mischungsverhältnis zu reduzieren, wohingegen bei einem YopE₁₃₈-IpgB₁-Überschuss von 5:1 die Invasionsrate deutlich erhöht war im Vergleich zu der einer WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁ Mono - Infektion (Abb. 21 D). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten von Roppenser et al., die zeigen, dass YopE präferentiell RhoG inhibiert (RhoG-GAP) und damit die Rac1-Aktivierung nur indirekt hemmt. Erst bei einer erhöhten Konzentration von YopE kann Rac1-GTP wahrscheinlich durch die GAP-Wirkung direkt inaktiviert werden (Roppenser et al., 2009). Vermutlich ist die erhöhte Invasionsrate bei einer geringen YopE Konzentration so zu erklären, dass YopE RhoG bevorzugt inaktiviert. Dies führt zu mehr RhoG-GDP, das GDI bindet.

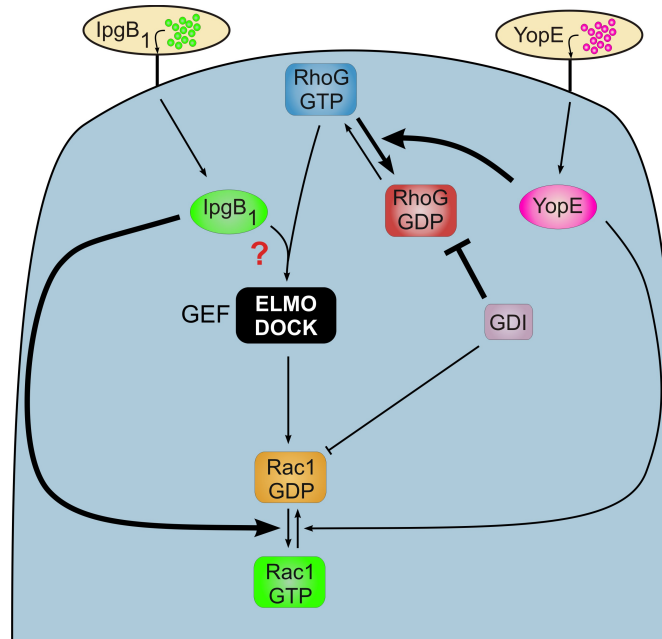


Abb. 38 Schematische Darstellung über die interaktive Wechselwirkung von YopE₁₃₈-IpgB₁ und YopE nach einer Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₁) und WA (pT3SS, YopE). YopE₁₃₈-IpgB₁ aktiviert vermutlich direkt Rac1. Bei einer geringen YopE Konzentration ist die Invasionsrate erhöht, da YopE überwiegend RhoG durch seine GAP-Wirkung inaktiviert. Dadurch wird RhoG-GTP in das inaktive RhoG-GDP überführt, das vermehrt GDI binden kann. Durch diese RhoG-GDP-GDI-Bindung steht weniger GDI für die Rac1-GDP-Bindung zur Verfügung. Somit steht mehr aktivierbares Rac1-GDP als E₁₃₈-IpgB₁-Substrat zur Verfügung, so dass durch die E₁₃₈-IpgB₁-GEF Wirkung vermehrt Rac1-GTP vorliegt.

Damit steht weniger GDI für Rac1-GDP zur Verfügung, so dass mehr Rac1-GDP-Substrat vom GEF YopE₁₃₈-IpgB₁ in Rac1-GTP umgewandelt werden kann, wodurch sich die erhöhte Invasionsrate erklären lässt. Wahrscheinlich ist eine relativ hohe YopE Konzentration erforderlich, um die YopE₁₃₈-IpgB₁-induzierte Invasion über Rac1-GTP zu inhibieren (Abb. 38).

In einer weiteren Co-Infektion wurde das Zusammenspiel zwischen YopE₁₃₈-IpgB₂ (RhoA-GAP) und YopT (RhoA-Inhibitor) untersucht. Dazu wurde der Einfluss auf das Aktinzytoskelett fluoreszenzmikroskopisch untersucht, indem Aktinfilamente mit TRITC-Phalloidin angefärbt wurden.

Da YopE₁₃₈-IpgB₂ und YopT mit RhoA interagiert, sollte die Fragestellung beantwortet werden, inwiefern YopT die durch YopE₁₃₈-IpgB₂ induzierten Stressfasern beeinflusst. Nach der ersten „Mimetika“ - Arbeit von Alto et al. soll IpgB₂ direkt mit ROCK und mDia1 interagieren und so Stressfasern induzieren (Alto et al., 2006).

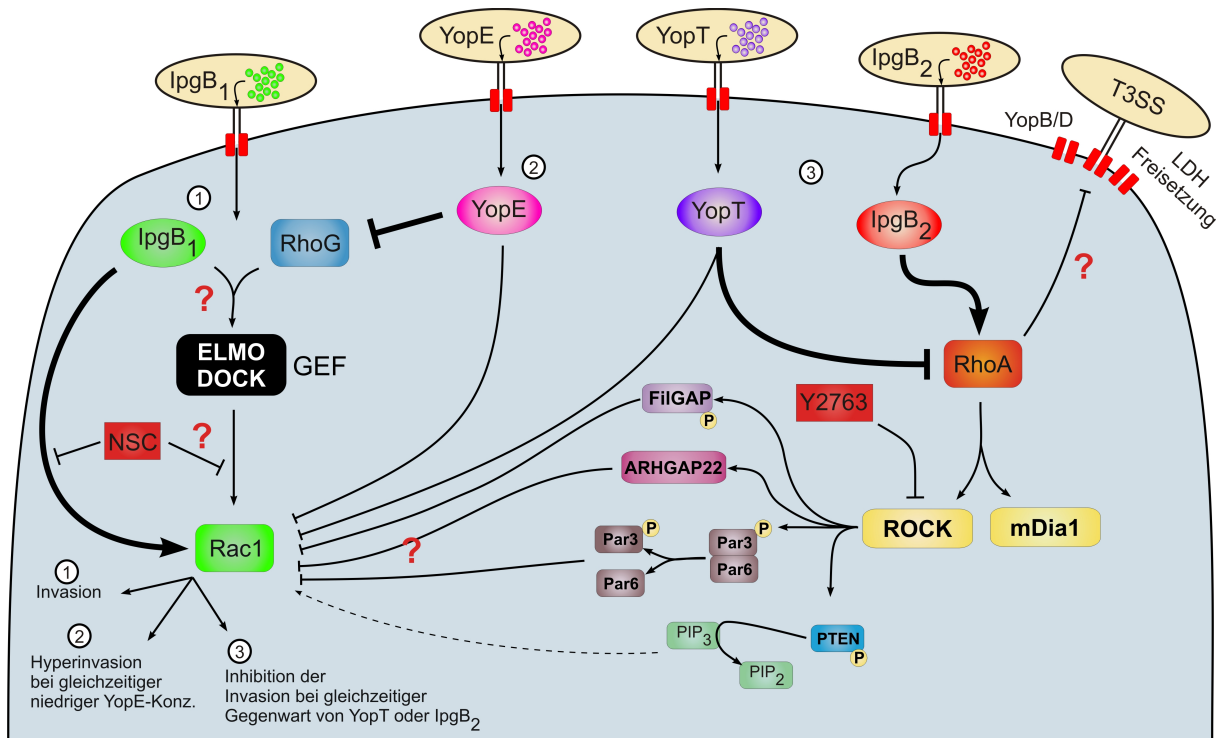


Abb. 39 Schematische Darstellung der durch die jeweiligen T3SS Effektoren aktivierten / inaktivierten zellulären Signalwege. **1)** IpgB₁ aktiviert Rac1 entweder direkt oder indirekt durch Elmo-Dock-Interaktion (GEF-Aktivierung, bisher nicht wiederlegt, aber unwahrscheinlich). Diese Rac1-Aktivierung führt zur Yersinia-Invasion. **2)** YopE inhibiert Rac1 direkt (GAP-Wirkung) und indirekt durch Inhibition von RhoG (GAP-Wirkung auf RhoG). In Mono-Infektionen führt dies zur Inhibition der durch Invasin-induzierten Invasion. Bei simultaner Injektion von IpgB₁ und YopE in Co-Infektionen kann YopE bei einem äquivalenten IpgB₁-YopE Verhältnis die Invasion nicht inhibieren. Bei einem IpgB₁-Überschuss und einer geringen YopE-Konzentration ergibt sich eine Hyperinvasion. **3)** YopT inhibiert RhoA und Rac1 (Cysteinprotease). In Mono-Infektionen führt dies zur Inhibition der durch Invasin-induzierten Invasion, in Co-Infektionen führt dies zur Inhibition der durch IpgB₁-induzierten Invasion. IpgB₂ aktiviert RhoA, was in Mono-Infektionen zur Inhibition der durch Invasin-induzierten Invasion führt. In Co-Infektionen inhibiert die Aktivierung von RhoA die IpgB₁-induzierte Invasion. Somit wirkt RhoA-Aktivierung inhibierend auf Rac1. Die Inhibition der Rac1-Aktivierung könnte über ROCK-Aktivierung von FilGAP, ARHGAP22, Par3/6-PKC oder PTEN gesteuert sein.

Wenn IpgB₂ direkt ROCK aktiviert, wie von Alto et al. beschrieben, dann sollte YopT durch RhoA-Inaktivierung keinen Effekt bezüglich der Stressfasern zeigen. Bei *gleichzeitiger* Infektion von WA (pT3SS, pE₁₃₈-IpgB₂) und WA (pT3SS, pYopT) (Mischungsverhältnis 1:1) konnten Stressfasern detektiert werden, wohingegen die Stressfasern nach 30 minütiger Präinkubation von HeLa-Zellen mit WA (pT3SS, pYopT) aufgelöst waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei vorheriger RhoA-Inaktivierung durch YopT eine Aktivierung von RhoA/ROCK durch IpgB₂ nicht mehr möglich ist. Weiterhin zeigt dies auch, dass IpgB₂ sehr schnell die Stressfasern induzieren kann (schnelle Aktivierung von RhoA und ROCK). Umgekehrt zeigt dies auch, dass, wenn RhoA inaktiviert ist, IpgB₂ über RhoA-Aktivierung keine Stressfasern mehr induzieren kann.

Da YopT als Cysteinprotease den Geranylgeranyl-Cystein-Membrananker von RhoA abspaltet, kann RhoA nicht mehr membranständig wirken. Insofern könnte eine YopT-bedingte Membrandelokalisation von RhoA für das Ausbleiben der Stressfaserbildung verantwortlich sein.

5.1.4) T3SS-vermittelte Beeinflussung der zellulären Membranintegrität

Bei Shigellen wird der Translokationskomplex durch die Proteine IpaB und IpaD gebildet, die eine Homologie zum Yersinien Translokationskomplex YopB/YopD aufweisen (Veenendaal et al., 2007; Marenne et al., 2003; Hakansson et al., 1993). Es herrscht Konsens darüber, dass YopB/YopD für die Yop Translokation in Zielzellen benötigt wird. Ein Modell besagt, dass sowohl YopK (*Y. pseudotuberculosis*) als auch das homologe YopQ (*Y. enterocolitica*) mit YopD interagiert und so vermutlich die Translokationsrate sowie den Durchmesser des Translokons regulieren (Brodsky et al., 2010; Holmstrom et al., 1997). Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass das auf einem Mini-Virulenzplasmid (Yop-defizient) lokalisierte Ysc-T3SS von *Y. pestis* in *Y. pseudotuberculosis* die Aktivierung des Inflammasoms und damit Zellnekrose induziert, sofern YopK und alle weiteren Yops nicht exprimiert werden. Nach einem weiteren Model ist die Porenbildung und die damit einhergehende Cytotoxizität unabhängig von YopK/Q und wird vielmehr durch Rho GTPase inaktivierende Effektoren reguliert (Mejia et al., 2008; Viboud and Bliska, 2002; 2001).

Insbesondere die Inaktivierung der Rho GTPasen Rac1 und vor allem RhoA durch YopE und YopT soll demnach die Porenbildung unterbinden. Darüber hinaus wurde mit transfizierten Zellen gezeigt, dass konstitutiv aktives Rac1 oder RhoA in Gegenwart von YopE und YopT je zu einer erhöhten LDH-Freisetzung führt (Viboud and Bliska, 2001). Nach diesen Ergebnissen sollte sowohl ein Rac1-Aktivator als auch ein RhoA-Aktivator die Porenbildung / Zerstörung der Membranintegrität fördern. Dazu wurde der Einfluss der YopE₁₃₈-X-Hybridproteine (X=IpgB₁, IpgB₂, Map und P60) auf die Membranintegrität überprüft. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Stamm WA (pT3SS) analog zu publizierten Ergebnissen zu einem hohen Anteil an Propidiumiodid-positiven Zellen nach 3 h Infektionszeit führte (Viboud et al. 2001 und Mejija et al. 2008). Gleichzeitig konnte eine LDH-Freisetzung nach 2 h und 3 h Inkubation detektiert werden.

Demgegenüber blieb die Membranschädigung wie erwartet nach einer Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS, pYopE) und WA (pT3SS, pYopT) aus.

Die Stämme WA (pT3SS, pE₁₃₈-lpgB₁) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-lpgB₂) sollten eine starke Membranschädigung verursachen, da lpgB₁ als Rac1-Aktivator und lpgB₂ als Rho-Aktivator wirkt. Entgegen der Erwartung wurde keine LDH-Freisetzung bzw. wurden keine PI-positive Zellen detektiert, was auf eine fehlende Membranschädigung hindeutet.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für die T3SS-Injektion von YopE₁₃₈-Map und YopE₁₃₈-P60 durch die Stämme WA (pT3SS, pE₁₃₈-Map) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-Map). Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Yersinia-induzierte Aktivierung der Rho GTPasen nicht zur Schädigung der Zytoplasmamembran der Wirtszelle führt. Vielmehr scheint die Membranintegrität immer dann erhalten zu bleiben, wenn ein YopE₁₃₈-X Hybridprotein transloziert wird.

Da alle diese Konstrukte den identischen YopE N-Terminus besitzen, sollte der Sekretionsprozess / Translokationsprozess als solcher schon dazu führen, dass die Transportpore wahrscheinlich „abgedichtet“ ist und es somit nicht zur Membranschädigung kommt. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von Co-Infektionen gestärkt. Bei einer Co-Infektion mit dem membranschädigenden Stamm WA (pT3SS) und dem nicht-membranschädigenden Stamm WA (pT3SS, pE₁₃₈-lpgB₁) war die Membranschädigung (LDH ↑, Anteil-PI-positiver Zellen ↑) vergleichbar mit der einer Mono-Infektion mit dem Stamm WA (pT3SS). Dies ist ein Indiz dafür, dass während einer Mono-Infektion bei dem Sekretionsprozess von YopE₁₃₈-lpgB₁ keine Membranporen wirksam werden. Weiterhin zeigt dies, dass Rac1-Aktivierung nicht zur „Porenheilung“ in trans bei einer Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-lpgB₁) führt.

Ein umgekehrtes Ergebnis stellte sich in einer Co-Infektion mit den Stämmen WA (pT3SS) und WA (pT3SS, pE₁₃₈-lpgB₂) ein. Hier war die Membranschädigung 4-fach reduziert (LDH ↓, Anteil-PI-positiver Zellen ↓). Dies zeigt, dass der RhoA-Aktivator lpgB₂ in der Lage ist, T3SS bedingte Membranschädigungen in trans zu unterdrücken. Die Invasionsversuche zeigten bereits, dass YopE₁₃₈-lpgB₂ Rac1 inhibieren kann. Insofern deutet sich hier an, dass die Rac1 Inhibition durch YopE₁₃₈-lpgB₂ ebenso die Membranschädigung unterbinden kann.

Da YopE bzw. YopT die durch YopB/YopD induzierte Porenbildung verhindert, werfen die Ergebnisse die Frage auf, ob IpgB₂ ebenfalls die Transportpore in Shigellen nach Translokation der Effektoren schließt / inaktiviert.

5.1.5) Epithelschichtintegrität

Bei polarisierten Epithelzellschichten spielen Rho GTPasen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellverbindungen wie „Tight Junctions“ (TJ) und „Adherence Junctions“ (AJ), die zusammen den apikalen junctionalen Komplex bilden (AJK). Weiterhin ist bekannt, dass eine Dysregulation der zellulären Rho GTPasen die Epithelschichtintegrität empfindlich stören kann (Samarin and Nusrat, 2009; Miyoshi and Takai, 2008; Shin et al., 2006). Einerseits ist beschrieben, dass eine konstitutive Rac1- bzw. RhoA-Aktivität (Transfektionsexperimente) zum Abbau des AJK führt. Andererseits aber konnte gezeigt werden, dass aktives Rac1 einen protektiven Effekt auf AJ und aktives RhoA einen protektiven Effekt auf TJ ausübt (Samarin and Nusrat, 2009). Im Zellkulturmodell (Transwellssystem) werden unter anderem MDCK Zellen (Hunde-Nierentubulizellen) für Studien an polarisierten Zellschichten verwendet. Die lateralen Zellverbindungen werden dabei ebenfalls von AJ und TJ gebildet (Cohen and Musch, 2003; Cereijido et al., 1978). Somit kann der Einfluss diverser Kulturbedingungen und Infektionen auf die Epithelschichtintegrität im Zellkultursystem getestet werden.

Für enteroptahogene Bakterien stellt das ebenfalls aus polarisierten Zellen bestehende Darmepithel eine wichtige Barriere dar. Shigellen, Salmonellen und Yersinien können das Darmepithel überwinden und in die Submukosa invadieren. Für Shigellen und Salmonellen konnte gezeigt werden, dass diese Erreger in der Lage sind, die AJKs zu modulieren, um so zwischen den Darmepithelspalten basolateral die Mukosa zu invadieren (Kohler et al., 2007; Sakaguchi et al., 2002). Vor diesem Hintergrund wurde überprüft, ob die Stämme WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-X) (X=IpgB₁, IpgB₂ und Map) einen Einfluss auf die Integrität von MDCK Zellen ausüben. Von Map ist bekannt, dass die Epithelienschichtintegrität zerstört wird, indem die TJ aufgelöst werden (Dean and Kenny, 2004; Kenny et al., 2002). Somit kann der Stamm WA Δinv (pT3SS, pE₁₃₈-Map) als Positiv-Kontrolle verwendet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass YopE₁₃₈-IpgB₁ die MDCK-Zellschichtintegrität zerstört, wohingegen YopE₁₃₈-IpgB₂ die Schichtintegrität nicht beeinflusst.

Somit konnte gezeigt werden, dass YopE₁₃₈-IpgB₁ neben der bakteriellen Invasion in HeLa-Zellen auch die Integrität von polarisierten MDCK Zellen beeinträchtigt. Da IpgB₁ als Rac1 GEF wirkt, hat es das Potential die Funktion der AJK-Proteine zu stören. IpgB₂ (RhoA-GEF) hingegen hat keinen störenden Effekt auf die AJK Funktion.

5.1.6) Fazit der *Yersinia*-Toolbox

1. YopE-Hybride, die durch Fusion mit vollständigen Shigellen und *E. coli* T3SS Substrat hergestellt wurden, werden vom Ysc-T3SS sezerniert und transloziert.
2. Die Rho GTPase modulierende Funktion der heterologen Fusionspartner bleibt erhalten.
3. Durch den *Yersinia*-Stamm WA (pT3SS) können die Funktionen der heterologen Substrate zellbiologisch im Kontext der bakteriellen Substratinjektion einzeln/isoliert oder in Kombination mit verschiedenen Effektoren untersucht werden.
4. Hinsichtlich der *Yersinia*-Internalisierung konnte ein Antagonismus zwischen IpgB₂/RhoA-Aktivierung und IpgB₁/Rac-Aktivierung festgestellt werden.
5. Im polarisierten MDCK-Zellschichtmodell konnte gezeigt werden, dass IpgB₁ und Map (Aktivierung von Rac1 bzw. Cdc42) die Integrität der Zellschicht stören, während IpgB₂ (Aktivierung von RhoA) keinen Einfluss auf die Zellschichtintegrität hat.

5.2) Konditionale knockout Mäuse

Wie im vorangehenden Abschnitt diskutiert, wirken die Effektoren YopE, YopT, IpgB₁, IpgB₂ und Map im wesentlichen auf die entsprechenden Rho GTPasen RhoG, RhoA, Rac1 und Cdc42. Um überprüfen zu können, ob die o.g. bakteriellen Effektoren noch weitere Rho GTPasen modulieren, wurden experimentelle Voraussetzungen durch die Generierung von Maus Makrophagen mit deletierten RhoA-, Rac1- bzw. Cdc42-Genen geschaffen. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit entsprechenden „gefloxten“ Rho GTPase-Genen (R. Fässler, MPI Biochemie Martinsried) mit lysM::*cre* Mäusen (I. Förster, Düsseldorf) gekreuzt.

Die erste Zuchtstrategie sah zunächst vor, dass folgender Genotyp erzielt werden sollte: $Rac1^{fl/fl}, lysM / lysM::cre$, $RhoA^{fl/fl}, lysM / lysM::cre$, $Cdc42^{fl/fl}, lysM / lysM::cre$. Dies bedeutet, dass die Mäuse heterozygot bezüglich des *cre* Allels sein sollten, so dass noch eine intakte Genkopie von Lysozym M (*lysM*) vorhanden war. Die Zucht war zunächst derartig konzipiert, um einen negativen Einfluss durch die *lysM*-Inaktivierung auf die Zellen zu vermeiden.

Um zu überprüfen, ob die Knochenmarksmakrophagen eine Deletion der Rho GTPasen RhoA, Rac1 bzw. Cdc42 aufwiesen, wurden die Knochenmarkszellen 15 Tage in M-CSF haltigem Medium ausdifferenziert und anschließend die Zelllysate auf RhoA, Rac1 und Cdc42 mittels Immunblot überprüft. In Zellen mit heterozygotem *cre*-Genotyp konnte lediglich eine Reduktion der RhoA-, Rac1- und Cdc42-Proteinmenge detektiert werden, was auf eine unvollständige Deletion schließen lässt. Vermutlich ergibt sich bei einem heterozygoten *cre*-Genotyp eine Mischzellpopulation bei der sowohl GTPase-exprimierende Zellen und Zellen mit verminderter GTPase- bzw. keiner GTPase-Expression vorliegen.

Daraufhin wurde die Zuchtstrategie in der Weise angepasst, dass *cre* jeweils homozygot vorlag ($lysM::cre / lysM::cre$). Die Expressionsanalyse mit Knochenmarksmakrophagen einer $lysM::gfp / lysM::gfp$ Maus zeigte, dass der *lysM* Promotor unter den *in vitro* Bedingungen sehr aktiv ist, so dass unter den gleichen Bedingungen die Deletion von *rhoA*, *rac1* bzw. *cdc42* bei homozygotem *lysM::cre* Genotyp stattfinden sollte. Erst bei einem homozygoten *cre*-Genotyp konnte eine fast vollständige Reduktion der RhoA-, Rac1- und Cdc42-Proteinmenge detektiert werden. Als Kontrolle wildtyp-ähnlicher Mäuse bzw. Zellen dienten fortan die Mäuse/Zellen mit dem Genotyp $lysM::cre / lysM::cre$.

Die Rho GTPasen spielen eine essentielle Rolle während der Migration, Phagozytose und oxidativen „Burst“ in Zellen des angeborenen Immunsystems (siehe Einleitung, Kap. 1.1.2.1).

Migration von Monozyten und Neutrophilen beispielsweise ist ein essentieller Prozess während einer Peritonitis. Dabei wandern Monozyten (differenzieren zu Makrophagen im Peritonealraum) und Neutrophile in den Peritonealraum und bilden die erste Instanz während der Infektionsabwehr (Hau, 2003; Heemken et al., 1997). Bei den zuvor beschriebenen Mäusen sind die Rho GTPasen RhoA, Rac1 bzw. Cdc42 in Makrophagen und Neutrophilen deletiert.

Die Auswirkung dieser Deletion auf die Infektionsabwehr wurde durch intraperitoneale Infektionsversuche mit wildtypischen Salmonellen und Yersinien untersucht, indem die bakterielle Milzkolonisierung sowie die Zellpopulationen der Milz qualitativ und quantitativ nach zwei Tagen Infektionszeit bestimmt wurde.

Diese Versuche zeigten, dass Cdc42 eine wichtige Rolle während der Infektionsabwehr spielt, da die Milzen nach einer Salmonelleninfektion bzw. Yersinieninfektion 10-fach höher mit Bakterien kolonisiert waren als die jeweilige Kontrollgruppe. Gleichzeitig konnte bei einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* gezeigt werden, dass die Monozyten-, Makrophagen- und Granulozytenpopulation der Cdc42^{fl/fl} *lysM::cre / lysM::cre* Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant höheren Anteil an der Gesamtzellpopulation der Milz einnahmen.

Eine Infektionen mit *Salmonella* führte ebenfalls zu einer signifikanten Anteilserhöhung der Monozyten-, Makrophagenpopulation im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch waren die Unterschiede in der Granulozytenpopulation nicht signifikant. Dieses Ergebnisse korrelieren also mit dem Infektionsstatus der Mäuse. Da der Makrophagen- und Granulozytenanteil bezogen auf die Gesamtzellpopulation der Milz signifikant erhöht bei den Cdc42^{fl/fl} *lysM::cre / lysM::cre* Mäusen im Zuge einer Salmonellen und Yersinien war, zeigt sich hier, dass Cdc42 generell für eine effiziente Infektionsabwehr benötigt wird. Weiterhin stellt sich hierbei die Frage, ob die Cdc42 defizienten Zellen zwar mit dem Erreger in Kontakt kommen, diese aber nicht mehr antibakteriell wirken. Um dies zu beantworten sind weitere FACS- und Funktionsuntersuchungen notwendig.

Die Deletion der jeweiligen Rho GTPasen konnte in den Knochenmarksmakrophagen nachgewiesen werden. Insofern dienen die Mäuse als Quelle für primäre Zellen, die zu Knochenmarksmakrophagen ausdifferenziert werden können. Weiterhin haben die Infektionsversuche gezeigt, dass die Cdc42^{fl/fl} *lysM::cre / lysM::cre* Mäuse anfälliger für Infektionen sind. Somit können sowohl weitere *in vitro* und *in vivo* Experimente mit den entsprechenden Mäusen weitere Aufschlüsse zum Einfluss der Rho GTPasen während der Infektionsabwehr liefern.

Von besonderem Interesse dabei ist, ob YopE/YopT - Deletionsmutanten von *Yersinia enterocolitica* (z.B. WA (pYV), WA (pYV $\Delta yopT$), WA (pYV $\Delta yopE$) und WA (pYV $\Delta yopT$, $\Delta yopE$)) mausvirulent in den GTPase Deletions-Mäusen sind.

Dies kann in Folgeuntersuchungen während Infektionen von z.B. dem Mausstamm LysM/ Δ RhoA und WA (pYV $\Delta yopT$) sowie LysM/ Δ Rac1 und WA (pYV $\Delta yopE$) näher analysiert werden. Weiterhin könnten RhoA, Rac1, und Cdc42-negative Makrophagen für *in vitro* Untersuchungen zur Wirkungsweise der E_i-X-Hybridproteine verwendet werden.

6.) Publikationen

Diese Dr. Arbeit führte zu folgenden Veröffentlichungen:

Fachjournal:

„The *Yersinia enterocolitica* type 3 secretion system as toolbox for studying the cell biological effects of bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins“

Stefan Wölke, Nikolaus Ackermann and Jürgen Heesemann

Eingereicht / submitted am 13. Dezember 2010, Cellular Microbiology

Fachtagungen:

- 22.9.2009, DGHM Göttingen, Vortrag

“*Yersinia enterocolitica*: a multifunctional tool to analyze T3SS effectors of different bacterial pathogens”

Stefan Wölke, Nikolaus Ackermann, Konrad Trütsch und Jürgen Heesemann

- 28.1. - 30.1.2009, Mini-Symposium Biochemistry of Host-Pathogen Interactions
Kloster Banz, Vortrag

“Analysis of Bacterial Rho GTPase Modulating Proteins by Use of the *Yersinia* Toolbox System”

- 25.7. – 26.7.2008, 1st National Conference on *Yersinia*, Posterpräsentation

“Construction of mice deficient for RhoA, Rac1 and Cdc42 in macrophages and granulocytes

Stefan Wölke, Jürgen Heesemann and Nikolaus Ackermann

7.) Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die interessante Aufgabenstellung, die Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und für jede Menge Ideen und Anregungen.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Roy Gross für die Ratschläge und Anregungen bezüglich meiner Dr. Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Nikolaus Ackermann für fachliche Anregungen und Diskussionen.

Ich bedanke mich bei Kristin Adler sowie Susanna Roeder für die Unterstützung hinsichtlich der Mausgenotypisierung. Darüber hinaus bedanke ich mich beim tierpflegerischen Personal für die Betreuung meiner Zuchtmäuse.

Ein großes Dankeschön gilt dem „Büro 327“ sowie „Büro 227“ für die fachliche und moralische Unterstützung: Beate Czech, Christoph Guggenberger, Virginie Nägele, Julia Niefnecker, Anette Schulz und Katja Vlasova.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, vor allem bei meinen Eltern bei meinen Freunden und natürlich bei Sabine Dittmann für jegliche Unterstützung.

8.) Referenzen

1. Aepfelbacher,M., Trasak,C., and Ruckdeschel,K. (2007). Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb. Haemost.* 98, 521-529.
2. Aepfelbacher,M., Trasak,C., Wilharm,G., Wiedemann,A., Trulzsch,K., Krauss,K., Gierschik,P., and Heesemann,J. (2003). Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J Biol. Chem.* 278, 33217-33223.
3. Aepfelbacher,M., Zumbihl,R., and Heesemann,J. (2005). Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by YopT of *Yersinia*. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* 291, 167-175.
4. Aili,M., Isaksson,E.L., Carlsson,S.E., Wolf-Watz,H., Rosqvist,R., and Francis,M.S. (2008). Regulation of *Yersinia* Yop-effector delivery by translocated YopE. *Int J Med Microbiol* 298, 183-192.
5. Aili,M., Isaksson,E.L., Hallberg,B., Wolf-Watz,H., and Rosqvist,R. (2006). Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Cell Microbiol* 8, 1020-1033.
6. Aili,M., Telepnev,M., Hallberg,B., Wolf-Watz,H., and Rosqvist,R. (2003). In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity. *Microb. Pathog.* 34, 297-308.
7. Aktories,K., Wilde,C., and Vogelsgesang,M. (2004). Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 152, 1-22.
8. Alto,N.M. and Dixon,J.E. (2008). Analysis of Rho-GTPase mimicry by a family of bacterial type III effector proteins. *Methods Enzymol.* 439, 131-143.
9. Alto,N.M., Shao,F., Lazar,C.S., Brost,R.L., Chua,G., Mattoo,S., McMahon,S.A., Ghosh,P., Hughes,T.R., Boone,C., and Dixon,J.E. (2006). Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* 124, 133-145.
10. Bajaj,V., Lucas,R.L., Hwang,C., and Lee,C.A. (1996). Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol. Microbiol* 22, 703-714.
11. Balligand,G., Laroche,Y., and Cornelis,G. (1985). Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect. Immun.* 48, 782-786.
12. Besson,A., Assoian,R.K., and Roberts,J.M. (2004). Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat. Rev. Cancer* 4, 948-955.
13. Bliska,J.B. and Black,D.S. (1995). Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect. Immun.* 63, 681-685.
14. Bockemühl,J. and Roggentin,P. (2004). Enterale Yersiniosen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 47, 685-691.
15. Bockemühl,J. and Wong,J. (2003). *Yersinia*. *Manual of Clinical Microbiology* 672-683.
16. Boland,A. and Cornelis,G.R. (1998). Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect. Immun.* 66, 1878-1884.

17. Bolin,I., Norlander,L., and 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.
18. Bolin,I. and Wolf-Watz,H. (1984). Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 43, 72-78.
19. Boureux,A., Vignal,E., Faure,S., and Fort,P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 24, 203-216.
20. Braga,V.M., Machesky,L.M., Hall,A., and Hotchin,N.A. (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol.* 137, 1421-1431.
21. Brodsky,I.E., Palm,N.W., Sadanand,S., Ryndak,M.B., Sutterwala,F.S., Flavell,R.A., Bliska,J.B., and Medzhitov,R. (2010). A *Yersinia* effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host. Microbe* 7, 376-387.
22. Bruewer,M., Hopkins,A.M., Hobert,M.E., Nusrat,A., and Madara,J.L. (2004). RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am. J Physiol Cell Physiol* 287, C327-C335.
23. Bulgin,R., Raymond,B., Garnett,J.A., Frankel,G., Crepin,V.F., Berger,C.N., and Arbeloa,A. (2010). Bacterial guanine nucleotide exchange factors SopE-like and WxxxE effectors. *Infect. Immun.* 78, 1417-1425.
24. Burrige,K. and Wennerberg,K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.
25. Caron,E. and Hall,A. (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721.
26. Carstanjen,D., Yamauchi,A., Koornneef,A., Zang,H., Filippi,M.D., Harris,C., Towe,J., Atkinson,S., Zheng,Y., Dinauer,M.C., and Williams,D.A. (2005). Rac2 regulates neutrophil chemotaxis, superoxide production, and myeloid colony formation through multiple distinct effector pathways. *J Immunol.* 174, 4613-4620.
27. Cerejido,M., Robbins,E.S., Dolan,W.J., Rotunno,C.A., and Sabatini,D.D. (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol.* 77, 853-880.
28. Chen,X. and Macara,I.G. (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat. Cell Biol.* 7, 262-269.
29. Clausen,B.E., Burkhardt,C., Reith,W., Renkawitz,R., and Forster,I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 8, 265-277.
30. Cohen,D. and Musch,A. (2003). Apical surface formation in MDCK cells: regulation by the serine/threonine kinase EMK1. *Methods* 30, 269-276.
31. Colicelli,J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci. STKE.* 2004, RE13.
32. Condliffe,A.M., Webb,L.M., Ferguson,G.J., Davidson,K., Turner,M., Vigorito,E., Manifava,M., Chilvers,E.R., Stephens,L.R., and Hawkins,P.T. (2006). RhoG regulates the neutrophil NADPH oxidase. *J Immunol.* 176, 5314-5320.
33. Cornelis,G.R. (2002a). The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 742-752.

34. Cornelis,G.R. (2002b). The Yersinia Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol* 291, 455-462.
35. Cornelis,G.R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol* 4, 811-825.
36. Cotter,S.E., Surana,N.K., and St,G.J., III (2005). Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 13, 199-205.
37. Dean,P. and Kenny,B. (2004). Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic Escherichia coli is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. *Mol. Microbiol* 54, 665-675.
38. Deiwick,J., Nikolaus,T., Erdogan,S., and Hensel,M. (1999). Environmental regulation of Salmonella pathogenicity island 2 gene expression. *Mol. Microbiol* 31, 1759-1773.
39. Dersch,P. and Isberg,R.R. (1999). A region of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *EMBO J* 18, 1199-1213.
40. Fiorentini,C., Fabbri,A., Flatau,G., Donelli,G., Matarrese,P., Lemichez,E., Falzano,L., and Boquet,P. (1997). Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase. *J Biol. Chem.* 272, 19532-19537.
41. Flatau,G., Lemichez,E., Gauthier,M., Chardin,P., Paris,S., Fiorentini,C., and Boquet,P. (1997). Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 387, 729-733.
42. Foster,R., Hu,K.Q., Lu,Y., Nolan,K.M., Thissen,J., and Settleman,J. (1996). Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol. Cell Biol.* 16, 2689-2699.
43. Gao,Y., Dickerson,J.B., Guo,F., Zheng,J., and Zheng,Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 7618-7623.
44. Garcia-del,P.F., Foster,J.W., Maguire,M.E., and Finlay,B.B. (1992). Characterization of the micro-environment of Salmonella typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol. Microbiol* 6, 3289-3297.
45. Gibson,M.C. and Perrimon,N. (2003). Apicobasal polarization: epithelial form and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 747-752.
46. Grosdent,N., Maridonneau-Parini,I., Sory,M.P., and Cornelis,G.R. (2002). Role of Yops and adhesins in resistance of Yersinia enterocolitica to phagocytosis. *Infect. Immun.* 70, 4165-4176.
47. Guan,K.L. and Dixon,J.E. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in Yersinia. *Science* 249, 553-556.
48. Hachani,A., Biskri,L., Rossi,G., Marty,A., Menard,R., Sansonetti,P., Parsot,C., Van Nhieu,G.T., Bernardini,M.L., and Allaoui,A. (2008). IpgB1 and IpgB2, two homologous effectors secreted via the Mxi-Spa type III secretion apparatus, cooperate to mediate polarized cell invasion and inflammatory potential of Shigella flexneri. *Microbes. Infect.* 10, 260-268.
49. Hakansson,S., Bergman,T., Vanooteghem,J.C., Cornelis,G., and Wolf-Watz,H. (1993). YopB and YopD constitute a novel class of Yersinia Yop proteins. *Infect. Immun.* 61, 71-80.
50. Hall,A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
51. Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol. Biol.* 166, 557-580.

-
52. Handa,Y., Suzuki,M., Ohya,K., Iwai,H., Ishijima,N., Koleske,A.J., Fukui,Y., and Sasakawa,C. (2007). Shigella IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO-Dock180 machinery. *Nat. Cell Biol.* 9, 121-128.
 53. Haraga,A., Ohlson,M.B., and Miller,S.I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol* 6, 53-66.
 54. Hardt,W.D., Chen,L.M., Schuebel,K.E., Bustelo,X.R., and Galan,J.E. (1998). *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93, 815-826.
 55. Hau,T. (2003). Peritoneal Defense Mechanisms. *Turk J Med Sci* 33, 131-134.
 56. Hayward,R.D., Leong,J.M., Koronakis,V., and Campellone,K.G. (2006). Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. *Nat. Rev. Microbiol* 4, 358-370.
 57. Heasman,S.J. and Ridley,A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690-701.
 58. Heemken,R., Gandawidjaja,L., and Hau,T. (1997). Peritonitis: pathophysiology and local defense mechanisms. *Hepatogastroenterology* 44, 927-936.
 59. Heesemann,J., Gross,U., and Gruter,L. (1987). Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol Immunol.* 9, 312-316.
 60. Heesemann,J. and Laufs,R. (1983). Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J Bacteriol.* 155, 761-767.
 61. Heroven,A.K., Nagel,G., Tran,H.J., Parr,S., and Dersch,P. (2004). RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and rovA expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol* 53, 871-888.
 62. Hill,C.S., Wynne,J., and Treisman,R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81, 1159-1170.
 63. Holmstrom,A., Petterson,J., Rosqvist,R., Hakansson,S., Tafazoli,F., Fallman,M., Magnusson,K.E., Wolf-Watz,H., and Forsberg,A. (1997). YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol. Microbiol* 24, 73-91.
 64. Huang,Z., Sutton,S.E., Wallenfang,A.J., Orchard,R.C., Wu,X., Feng,Y., Chai,J., and Alto,N.M. (2009). Structural insights into host GTPase isoform selection by a family of bacterial GEF mimics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 853-860.
 65. Hurd,T.W. and Margolis,B. (2005). Pars and polarity: taking control of Rac. *Nat. Cell Biol.* 7, 205-207.
 66. Isberg,R.R. and Barnes,P. (2001). Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J Cell Sci.* 114, 21-28.
 67. Isberg,R.R. and Leong,J.M. (1990). Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60, 861-871.
 68. Isberg,R.R., Voorhis,D.L., and Falkow,S. (1987). Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* 50, 769-778.
 69. Ishizaki,T., Morishima,Y., Okamoto,M., Furuyashiki,T., Kato,T., and Narumiya,S. (2001). Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat. Cell Biol.* 3, 8-14.

70. Jacobi,C.A., Roggenkamp,A., Rakin,A., Zumbihl,R., Leitritz,L., and 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.
71. Jarvelainen,H.A., Galmiche,A., and Zychlinsky,A. (2003). Caspase-1 activation by *Salmonella*. *Trends Cell Biol.* 13, 204-209.
72. Just,I., Selzer,J., Wilm,M., von Eichel-Streiber,C., Mann,M., and Aktories,K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375, 500-503.
73. Kaniga,K., Uralil,J., Bliska,J.B., and Galan,J.E. (1996). A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol* 21, 633-641.
74. Kenny,B., Ellis,S., Leard,A.D., Warawa,J., Mellor,H., and Jepson,M.A. (2002). Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol. Microbiol* 44, 1095-1107.
75. Kim,C. and Dinauer,M.C. (2001). Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J Immunol.* 166, 1223-1232.
76. Kirjavainen,V., Jarva,H., Biedzka-Sarek,M., Blom,A.M., Skurnik,M., and Meri,S. (2008). *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS. Pathog.* 4, e1000140.
77. Klink,B.U., Barden,S., Heidler,T.V., Borchers,C., Ladwein,M., Stradal,T.E., Rottner,K., and Heinz,D.W. (2010). Structure of *Shigella* IpgB2 in complex with human RhoA: implications for the mechanism of bacterial guanine nucleotide exchange factor mimicry. *J Biol. Chem.* 285, 17197-17208.
78. Kohler,H., Sakaguchi,T., Hurley,B.P., Kase,B.A., Reinecker,H.C., and McCormick,B.A. (2007). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates intercellular junction proteins and facilitates transepithelial neutrophil and bacterial passage. *Am. J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 293, G178-G187.
79. Krall,R., Schmidt,G., Aktories,K., and Barbieri,J.T. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect. Immun.* 68, 6066-6068.
80. Krall,R., Sun,J., Pederson,K.J., and Barbieri,J.T. (2002). In vivo rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect. Immun.* 70, 360-367.
81. Krysko,D.V., Vanden,B.T., D'Herde,K., and Vandenabeele,P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 44, 205-221.
82. Kurz,C.L. and Ewbank,J.J. (2000). *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 8, 142-144.
83. Labrousse,A., Chauvet,S., Couillault,C., Kurz,C.L., and Ewbank,J.J. (2000). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr. Biol.* 10, 1543-1545.
84. Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
85. Lambert de,R.C., Sluiter,C., and Cornelis,G.R. (1992). Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol* 6, 395-409.
86. Lee,A.K., Detweiler,C.S., and Falkow,S. (2000). OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol.* 182, 771-781.

87. Lee,C.A. and Falkow,S. (1990). The ability of Salmonella to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 4304-4308.
88. Lewandoski,M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 2, 743-755.
89. LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L., and RANDALL,R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193, 265-275.
90. Marenne,M.N., Journet,L., Mota,L.J., and Cornelis,G.R. (2003). Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb. Pathog.* 35, 243-258.
91. Marra,A. and Isberg,R.R. (1997). Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect. Immun.* 65, 3412-3421.
92. May,R.C., Caron,E., Hall,A., and Machesky,L.M. (2000). Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat. Cell Biol.* 2, 246-248.
93. McDonald,C., Vacratsis,P.O., Bliska,J.B., and Dixon,J.E. (2003). The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol. Chem.* 278, 18514-18523.
94. Meili,R., Sasaki,A.T., and Firtel,R.A. (2005). Rho Rocks PTEN. *Nat. Cell Biol.* 7, 334-335.
95. Mejia,E., Bliska,J.B., and Viboud,G.I. (2008). *Yersinia* controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity. *PLoS. Pathog.* 4, e3.
96. Minden,A., Lin,A., Claret,F.X., Abo,A., and Karin,M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81, 1147-1157.
97. Mittal,R., Peak-Chew,S.Y., and McMahon,H.T. (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.
98. Miyoshi,J. and Takai,Y. (2008). Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 670-691.
99. Mohammadi,S. and Isberg,R.R. (2009). *Yersinia pseudotuberculosis* virulence determinants invasin, YopE, and YopT modulate RhoG activity and localization. *Infect. Immun.* 77, 4771-4782.
100. Monack,D.M., Bouley,D.M., and Falkow,S. (2004a). *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1*^{+/+} mice and can be reactivated by IFNγ neutralization. *J Exp. Med* 199, 231-241.
101. Monack,D.M., Mueller,A., and Falkow,S. (2004b). Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat. Rev. Microbiol* 2, 747-765.
102. Nagel,G., Lahrz,A., and Dersch,P. (2001). Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol. Microbiol* 41, 1249-1269.
103. Nakayama,M., Goto,T.M., Sugimoto,M., Nishimura,T., Shinagawa,T., Ohno,S., Amano,M., and Kaibuchi,K. (2008). Rho-kinase phosphorylates PAR-3 and disrupts PAR complex formation. *Dev. Cell* 14, 205-215.

104. Nobes,C.D. and Hall,A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
105. Nobes,C.D. and Hall,A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 144, 1235-1244.
106. Nobes,C.D., Lauritzen,I., Mattei,M.G., Paris,S., Hall,A., and Chardin,P. (1998). A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol.* 141, 187-197.
107. Nusrat,A., Giry,M., Turner,J.R., Colgan,S.P., Parkos,C.A., Carnes,D., Lemichez,E., Boquet,P., and Madara,J.L. (1995). Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10629-10633.
108. Ohi,M.E. and Miller,S.I. (2001). Salmonella: a model for bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Med* 52, 259-274.
109. Ohta,Y., Hartwig,J.H., and Stossel,T.P. (2006). FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat. Cell Biol.* 8, 803-814.
110. Ohya,K., Handa,Y., Ogawa,M., Suzuki,M., and Sasakawa,C. (2005). IpgB1 is a novel Shigella effector protein involved in bacterial invasion of host cells. Its activity to promote membrane ruffling via Rac1 and Cdc42 activation. *J Biol. Chem.* 280, 24022-24034.
111. Page,A.L., Fromont-Racine,M., Sansonetti,P., Legrain,P., and Parsot,C. (2001). Characterization of the interaction partners of secreted proteins and chaperones of Shigella flexneri. *Mol. Microbiol* 42, 1133-1145.
112. Page,A.L., Sansonetti,P., and Parsot,C. (2002). Spa15 of Shigella flexneri, a third type of chaperone in the type III secretion pathway. *Mol. Microbiol* 43, 1533-1542.
113. Palazzo,A.F., Cook,T.A., Alberts,A.S., and Gundersen,G.G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* 3, 723-729.
114. Parsot,C., Hamiaux,C., and Page,A.L. (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol* 6, 7-14.
115. Persson,C., Carballeira,N., Wolf-Watz,H., and 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.
116. Pilz,D., Vocke,T., Heesemann,J., and Brade,V. (1992). Mechanism of YadA-mediated serum resistance of Yersinia enterocolitica serotype O3. *Infect. Immun.* 60, 189-195.
117. Portnoy,D.A. and Falkow,S. (1981). Virulence-associated plasmids from Yersinia enterocolitica and Yersinia pestis. *J Bacteriol.* 148, 877-883.
118. Rodgers,L., Gamez,A., Riek,R., and Ghosh,P. (2008). The type III secretion chaperone SycE promotes a localized disorder-to-order transition in the natively unfolded effector YopE. *J Biol. Chem.* 283, 20857-20863.
119. Rodgers,L., Mukerjee,R., Birtalan,S., Friedberg,D., and Ghosh,P. (2010). A solvent-exposed patch in chaperone-bound YopE is required for translocation by the type III secretion system. *J Bacteriol.* 192, 3114-3122.
120. Roggenkamp,A., Ruckdeschel,K., Leitritz,L., Schmitt,R., and 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.

121. Roppenser,B., Roder,A., Hentschke,M., Ruckdeschel,K., and Aepfelbacher,M. (2009). *Yersinia enterocolitica* differentially modulates RhoG activity in host cells. *J Cell Sci.* 122, 696-705.
122. Ruckdeschel,K., Roggenkamp,A., Lafont,V., Mangeat,P., Heesemann,J., and Rouot,B. (1997). Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect. Immun.* 65, 4813-4821.
123. Ruckdeschel,K., Roggenkamp,A., Schubert,S., and Heesemann,J. (1996). Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.* 64, 724-733.
124. Russmann,H., Gerdemann,U., Igwe,E.I., Panthel,K., Heesemann,J., Garbom,S., Wolf-Watz,H., and Geginat,G. (2003). Attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. *Infect. Immun.* 71, 3463-3472.
125. Russmann,H., Igwe,E.I., Sauer,J., Hardt,W.D., Bubert,A., and Geginat,G. (2001). Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing hybrid *Yersinia* type III proteins. *J Immunol.* 167, 357-365.
126. Russmann,H., Weissmuller,A., Geginat,G., Igwe,E.I., Roggenkamp,A., Bubert,A., Goebel,W., Hof,H., and Heesemann,J. (2000). *Yersinia enterocolitica*-mediated translocation of defined fusion proteins to the cytosol of mammalian cells results in peptide-specific MHC class I-restricted antigen presentation. *Eur. J Immunol.* 30, 1375-1384.
127. Sakaguchi,T., Kohler,H., Gu,X., McCormick,B.A., and Reinecker,H.C. (2002). *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 4, 367-381.
128. Samarin,S. and Nusrat,A. (2009). Regulation of epithelial apical junctional complex by Rho family GTPases. *Front Biosci.* 14, 1129-1142.
129. Sanz-Moreno,V., Gadea,G., Ahn,J., Paterson,H., Marra,P., Pinner,S., Sahai,E., and Marshall,C.J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135, 510-523.
130. Schechter,L.M., Damrauer,S.M., and Lee,C.A. (1999). Two AraC/XyIS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Mol. Microbiol* 32, 629-642.
131. Schlumberger,M.C., Muller,A.J., Ehrbar,K., Winnen,B., Duss,I., Stecher,B., and Hardt,W.D. (2005). Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 12548-12553.
132. Schmidt,G., Sehr,P., Wilm,M., Selzer,J., Mann,M., and Aktories,K. (1997). Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* 387, 725-729.
133. Schroeder,G.N. and Hilbi,H. (2008). Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol Rev.* 21, 134-156.
134. Shao,F. (2008). Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Curr. Opin. Microbiol* 11, 21-29.
135. Shao,F., Merritt,P.M., Bao,Z., Innes,R.W., and Dixon,J.E. (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109, 575-588.
136. Shao,F., Vacratsis,P.O., Bao,Z., Bowers,K.E., Fierke,C.A., and Dixon,J.E. (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.

137. Shin,K., Fogg,V.C., and Margolis,B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 207-235.
138. Sinha,P., Chi,H.H., Kim,H.R., Clausen,B.E., Pederson,B., Sercarz,E.E., Forster,I., and Moudgil,K.D. (2004). Mouse lysozyme-M knockout mice reveal how the self-determinant hierarchy shapes the T cell repertoire against this circulating self antigen in wild-type mice. *J Immunol.* 173, 1763-1771.
139. Skurnik,M., Bolin,I., Heikkinen,H., Piha,S., and Wolf-Watz,H. (1984). Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol.* 158, 1033-1036.
140. Smith,B.P., Reina-Guerra,M., Hoiseth,S.K., Stocker,B.A., Habasha,F., Johnson,E., and Merritt,F. (1984). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* as modified live vaccines for calves. *Am. J Vet. Res.* 45, 59-66.
141. Snellings,N.J., Popek,M., and Lindler,L.E. (2001). Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon. *Infect. Immun.* 69, 4627-4638.
142. Srinivasan,S., Wang,F., Glavas,S., Ott,A., Hofmann,F., Aktories,K., Kalman,D., and Bourne,H.R. (2003). Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol.* 160, 375-385.
143. Strauch,E., Voigt,I., Broll,H., and Appel,B. (2000). Use of a plasmid of a *Yersinia enterocolitica* biogroup 1A strain for the construction of cloning vectors. *J Biotechnol.* 79, 63-72.
144. Thomas,N.A., Deng,W., Puente,J.L., Frey,E.A., Yip,C.K., Strynadka,N.C., and Finlay,B.B. (2005). CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 57, 1762-1779.
145. Trulzsch,K., Geginat,G., Sporleder,T., Ruckdeschel,K., Hoffmann,R., Heesemann,J., and Russmann,H. (2005). *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J Immunol.* 174, 4244-4251.
146. Trulzsch,K., Roggenkamp,A., Aepfelbacher,M., Wilharm,G., Ruckdeschel,K., and 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.
147. Trulzsch,K., Sporleder,T., Igwe,E.I., Russmann,H., and Heesemann,J. (2004). Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect. Immun.* 72, 5227-5234.
148. Trulzsch,K., Sporleder,T., Leibiger,R., Russmann,H., and Heesemann,J. (2008). *Yersinia* as oral live carrier vaccine: influence of *Yersinia* outer proteins (Yops) on the T-cell response. *Int J Med Microbiol* 298, 59-67.
149. Vaezi,A., Bauer,C., Vasioukhin,V., and Fuchs,E. (2002). Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev. Cell* 3, 367-381.
150. van der Sar,A.M., Appelmek,B.J., Vandenbroucke-Grauls,C.M., and Bitter,W. (2004). A star with stripes: zebrafish as an infection model. *Trends Microbiol* 12, 451-457.
151. Veenendaal,A.K., Hodgkinson,J.L., Schwarzer,L., Stabat,D., Zenk,S.F., and Blocker,A.J. (2007). The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Mol. Microbiol* 63, 1719-1730.
152. Vetter,I.R. and Wittinghofer,A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.

153. Viboud,G.I. and Bliska,J.B. (2001). A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *EMBO J* 20, 5373-5382.
154. Viboud,G.I. and Bliska,J.B. (2002). Measurement of pore formation by contact-dependent type III protein secretion systems. *Methods Enzymol.* 358, 345-350.
155. Von Pawel-Rammingen,U., Telepnev,M.V., Schmidt,G., Aktories,K., Wolf-Watz,H., and Rosqvist,R. (2000). GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol. Microbiol* 36, 737-748.
156. von Pawel-Rammingen,U., Telepnev,M.V., Schmidt,G., Aktories,K., Wolf-Watz,H., and Rosqvist,R. (2000). GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol. Microbiol* 36, 737-748.
157. Weiner,O.D., Neilsen,P.O., Prestwich,G.D., Kirschner,M.W., Cantley,L.C., and Bourne,H.R. (2002). A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat. Cell Biol.* 4, 509-513.
158. Wennerberg,K., Rossman,K.L., and Der,C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 118, 843-846.
159. Winnen,B., Schlumberger,M.C., Sturm,A., Schupbach,K., Siebenmann,S., Jenny,P., and Hardt,W.D. (2008). Hierarchical effector protein transport by the Salmonella Typhimurium SPI-1 type III secretion system. *PLoS. One.* 3, e2178.
160. Zaharik,M.L., Vallance,B.A., Puente,J.L., Gros,P., and Finlay,B.B. (2002). Host-pathogen interactions: Host resistance factor Nramp1 up-regulates the expression of Salmonella pathogenicity island-2 virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15705-15710.
161. Zhang,F.L. and Casey,P.J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 241-269.
162. Zheng,Y., Bagrodia,S., and Cerione,R.A. (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J Biol. Chem.* 269, 18727-18730.

