



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Charakterisierung der Kollagenbindung von  
*Yersinia enterocolitica*  
und ihre Bedeutung in der Wirtszellinteraktion

Kristina Gramlich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl  
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Heesemann  
(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 08.09.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.10.2014 angenommen.

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>v</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>ix</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>xi</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>4</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i> .....	7
1.1.1 <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	7
1.2 Pathogenese und Virulenz von <i>Y. enterocolitica</i> .....	8
1.2.1 Enterotoxin Yst.....	9
1.2.2 Das <i>Yersinia</i> Typ III Sekretionssystem (Ysc-T3SS).....	9
1.2.3 Die „ <i>Yersinia</i> outer proteins“ (Yops).....	10
1.2.4 Adhäsine .....	12
1.3 Das Wachstumsverhalten von <i>Y. enterocolitica</i> im 3D-Kollagengel.....	19
1.4 Kollagen – Struktur und Funktion .....	21
1.5 Die Erkennung und Eliminierung von bakteriellen Erregern durch Phagozyten	25
1.6 Ziel der Arbeit .....	27
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	28
2.1.1 <i>Yersinia enterocolitica</i> Stämme.....	28
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> Stämme .....	30
2.1.3 Plasmide.....	30
2.2 Primer .....	31
2.3 Bakterielle Nährmedien und Zusätze .....	33
2.4 Antibiotika .....	33
2.5 Zellkultur .....	34
2.5.1 Eukaryotische Zellen .....	34
2.5.2 Nährmedien und Zusätze .....	34
2.6 Antikörper.....	35
2.7 Proteine und Peptide .....	37
2.8 Chemikalien, Biochemikalien, Enzyme und Kits.....	37
2.9 Puffer und Lösungen .....	40
2.10 Geräte.....	41
2.11 Verbrauchsmaterialien.....	42
2.12 Mikrobiologische Methoden.....	43
2.12.1 Kultivierungsverfahren .....	43
2.12.2 Stammhaltung von Bakterien .....	44
2.12.3 Herstellung elektrokompenter Zellen und Elektroporation .....	45
2.13 Molekularbiologische und genetische Methoden.....	45
2.13.1 DNS-Isolierung.....	45

2.13.2	Manipulation von DNS.....	46
2.13.3	Agarosegelelektrophorese .....	46
2.13.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki <i>et al.</i> , 1988).....	46
2.13.5	Aufreinigung von DNS-Fragmenten .....	48
2.13.6	DNS-Sequenzierung (Sanger <i>et al.</i> , 1977) .....	48
2.13.7	Herstellung von Deletionsmutanten in <i>Y. enterocolitica</i> durch homologe Rekombination nach Datsenko und Wanner, 2000 .....	48
2.13.8	Herstellung der Plasmide pYadA, pΔYadA, pYadA <sub>HY</sub> und pYadA <sub>ΔN</sub> .....	50
2.14	Biochemische Methoden .....	50
2.14.1	Herstellung von bakteriellen Ganzzelllysaten .....	50
2.14.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
2.14.3	Coomassie-Färbung (Weber & Osborn, 1969).....	52
2.14.4	Western Blot (Towbin <i>et al.</i> , 1992).....	52
2.14.5	Markierung von Proteinen mit Biotin- oder Alexa Fluor 488- Succinimidylestern 53	
2.14.6	MALDI-TOF .....	53
2.15	Zellbiologische Methoden .....	54
2.15.1	Kultivierung von Zelllinien .....	54
2.15.2	Kryokonservierung .....	54
2.15.3	Auftauen von Zellen .....	54
2.15.4	Zellzahlbestimmung .....	54
2.15.5	Isolierung von polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) aus humanem Blut ..	55
2.16	Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Yersinien mit Säugerzellen ...	55
2.16.1	Kultivierung von <i>Y. enterocolitica</i> für Infektionsversuche .....	55
2.16.2	Infektionen von HeLa-Zellen .....	56
2.16.3	Transfektion von CHO-Zellen.....	56
2.16.4	Infektionen von humanen PMNs.....	57
2.16.5	Infektionen von murinen Makrophagen .....	57
2.17	Immunologische Methoden .....	58
2.17.1	Immunfluoreszenzfärbung im 3D-KoG.....	58
2.17.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	58
2.17.3	Nachweis von Proteinen auf der Zelloberfläche.....	60
2.17.4	Nachweis von YadA-gebundenem Kollagen .....	61
2.18	Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	62
2.19	Auswertung durchflusszytometrischer Analysen .....	63
2.20	Statistische Auswertung .....	63
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>64</b>
3.1	Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Yersinien im 3D-KoG.....	64
3.1.1	Konstruktion einer <i>yadA</i> -Deletionsmutante in WA(pT3SS) durch homologe Rekombination.....	64
3.1.2	Herstellung von <i>yadA</i> - und $\Delta yadA$ -exprimierenden Yersinien in WA-c <sup>RS</sup> .....	65
3.1.3	Einfluss der Yops auf die LPM-Morphologie im 3D-KoG .....	65
3.2	Charakterisierung der fibrillären Kapsel auf der Bakterienoberfläche.....	66
3.2.1	Der Einfluss von Yersinia-Genen bezüglich der fibrillären Kapsel im 3D-KoG	68

3.2.2	Die Bildung der fibrillären Kapsel ist abhängig von Kollagen .....	71
3.2.3	Die Bildung der fibrillären Kapsel ist abhängig von der Kollagenbindungsfähigkeit von YadA.....	73
3.3	Detektion von Kollagen auf der bakteriellen Zelloberfläche mittels Immunfluoreszenz- und Immunelektronenmikroskopie .....	75
3.4	Analyse der Interaktion von Yersinien mit Kollagen Typ I.....	77
3.4.1	Charakterisierung der YadA-Kollagenbindung.....	77
3.4.2	Inhibierung der Kollagenbindung durch ein kollagenähnliches Peptid (POG) <sub>10</sub> .....	82
3.5	Die Interaktion von Yersinien und Kollagen mit Wirtszellen.....	90
3.5.1	<i>inv</i> -negative und -positive, <i>yadA</i> -exprimierende Yersinien .....	90
3.5.2	Die Rolle der YadA-Kollagenbindungseigenschaft bei Infektionen von HeLa-Zellen .....	94
3.5.3	Die Interaktion von Kollagen-bindenden Yersinien mit Neutrophilen (PMNs) .....	96
3.5.4	Die Interaktion von Kollagenbindenden Yersinien mit Makrophagen .....	102
3.6	MARCO als potentieller Wirtszellrezeptor für YadA.....	104
3.6.1	Transfektion und Synthesenachweis von MARCO.....	104
3.6.2	Bindung von <i>yadA</i> -exprimierenden Yersinien an MARCO-transfizierte CHO-Zellen .....	106
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>108</b>
4.1	Das Wachstumsverhalten von Yersinien im 3D-KoG.....	108
4.1.1	Der Einfluss der Yop-Effektorproteine auf das Wachstumsverhalten im 3D-KoG .....	109
4.2	Charakterisierung der YadA-Kollagenbindung.....	110
4.2.1	Die Bindung von Kollagenfibrillen an YadA.....	111
4.2.2	Bindungsstellen von YadA an Kollagen .....	116
4.3	Die Bedeutung der YadA-Kollagenbindung in der Wirtszellinteraktion .....	119
4.3.1	Einfluss der YadA-Kollagenbindung auf die Interaktion mit Epithelzellen .....	120
4.3.2	Die YadA-Kollagenbindung führt zu verminderter PMN-Interaktion aufgrund von sterischer Hinderung.....	121
4.3.3	Die Rolle der YadA-Kollagenbindung in der Makrophagen-Interaktion.....	123
4.3.4	Mögliche Bedeutung der YadA-Kollagenbindung für die Pathogenität der Yersinien.....	127
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>147</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3D-KoG	3D-Kollagengel
3D-Ko488G	3D-Kollagengel mit 488-Koll I
488-Koll I	Alexa Fluor 488-markiertes Kollagen Typ I
A	Adenin, Ampere
Å	Angström
Ail	Attachment invasion locus
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AT	Autotransporter
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
BHI	Brain-Heart-Infusion
Biotin Koll I	Biotin-markiertes Kollagen Typ I
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium Ionen
Cb	Carbenicillin
CFU	Colony forming unit
CHO	Chinese hamster ovary
Cm	Chloramphenicol
Cm	Zentimeter
Δ	Delta
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DDR	Discoidin-Domänen Rezeptor
dest.	destilliert
d.h.	Das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPM	Dicht gepackte Mikrokolonien
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
Eib	<i>Escherichia coli</i> immunoglobulin-binding protein
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	Et alteri: und andere
FACIT	fiber-associated collagens with interrupted triple-helices
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales bovines Serum
FSC	Forward scatter
FITC	Fluorescein Thiocyanat
FK	Fibrilläre Kapsel
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine

g	Gramm
G	Guanin, Glycin, Gauge
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	Guanidine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GP	Glycoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
H	Histidin
Hia	<i>Haemophilus influenzae</i> Adhäsion
HPI	High pathogenicity island
Ig	Immunglobulin
IκB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
IKK	IκBα-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
Inv	Invasin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kn	Kanamycin
Konz.	Konzentriert
l	Liter
LAIR	Leukocyte-associated IG-like receptor
LB	Luria-Bertani
LPM	Locker gepackte Mikrokolonien
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli, Meter
M	Molar
μ	Mikro
MACIT	membrane-associated collagens with interrupted triple-helices
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time-Of-Flight
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
MFI	Mean fluorescence intensity
min	Minute
MIR	Makrophagen-Interaktionsrate
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOI	Multiplicity of infection
MPO	Myeloperoxidase
MPR	Makrophagen-Phagozytoserate
MULTIPLEXIN	multiple triple-helix domains and interruptions
Myf	Mucoid <i>Yersinia</i> factor
n	Nano
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NET	Neutrophil extracellular trap
NFκB	nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	Nod-like Rezeptor
N-terminal	Amino-terminal
O	Hydroxyprolin
OD	Optische Dichte
p	Pico

P	Prolin
PAG	Poly-N-Acetylglucosamin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration in einer wässrigen Lösung
P <sub>paraB</sub>	Arabinose-induzierbarer Promotor aus <i>E. coli</i>
PLT	planktonisch
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PP	Polyprolin
Psa	pH 6 Antigen
PTP	Protein-Tyrosinphosphatase
pYV	<i>Yersinia</i> virulence plasmid
R	resistent
RFP	Red fluorescent protein
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RS	Restriktionssystem
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp	Spectinomycin
sp.	spezies
SR-A	Scavenger Rezeptor A
SSC	Side Scatter
T	Thymin
T3SS	Typ III-Sekretionssystem
T5SS	Typ V-Sekretionssystem
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TLR	Toll-like Rezeptor
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
ün	über Nacht
Usp	Ubiquitous surface protein
usw.	Und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	Vor allem
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsın A



Y	Tyrosin
YFP	Yellow fluorescent protein
Yop	Yersinia outer protein
YpkA	Yersinia protein kinase
Ysc	Yop secretion
Yst	Yersinia stable toxin
wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Struktur und Funktion des Yersinia Adhäsins A (YadA).....	16
Abb. 1.2 Wachstumsverhalten von <i>Y. enterocolitica</i> im 3D-KoG. ....	19
Abb. 1.3 T3SS-abhängiger Schutzmechanismus von <i>Y. enterocolitica</i> Mikrokolonien vor Phagozytose durch Neutrophile im 3D-KoG.....	20
Abb. 1.4 Ausbildung einer 100 nm-dicken fibrillären Kapsel von WA(pYV) (A). ....	21
Abb. 1.5 Biosynthese von fibrillärem Kollagen. ....	24
Abb. 2.1 Strategie der Herstellung von Deletionsmutanten nach Datsenko & Wanner, 2000. ....	49
Abb. 3.1 Strategie zur Herstellung von <i>yadA</i> - und $\Delta$ <i>yadA</i> -exprimierenden Yersinien. .	65
Abb. 3.2 Hellfeldmikroskopie von WA(pT3SS), WA(pT3SS $\Delta$ YadA), WA(pYadA) und WA(p $\Delta$ YadA) im 3D-KoG.....	66
Abb. 3.3 Immunoblot zur Kontrolle der YadA-Produktion.....	68
Abb. 3.4 Hellfeldmikroskopie (HF) und Elektronenmikroskopie (TEM) von WA(pYV) $\Delta$ <i>hmsH</i> und WA(pYV) $\Delta$ <i>bcsA</i> im 3D-KoG.....	69
Abb. 3.5 Immunoblot zur Kontrolle der YadA-Produktion.....	70
Abb. 3.6 Hellfeldmikroskopie (HF) und Elektronenmikroskopie (TEM) von DH5 $\alpha$ (pUC YadA) und DH5 $\alpha$ (pUC13) im 3D-KoG. ....	70
Abb. 3.7 Hellfeldmikroskopie (HF) und Elektronenmikroskopie (TEM) von WA(pYV) und WA(pYV $\Delta$ YadA) im 3D-Fibrin-Gel.....	72
Abb. 3.8 Elektronenmikroskopische Darstellung von Yersinien im 3D-KoG und Immunoblot mit Kaninchen anti-YadA Serum. ....	73
Abb. 3.9 Elektronenmikroskopische Darstellung (TEM) von WA(pYV) und WA(pYV::YadA <sub>HY</sub> ) im 3D-KoG. ....	74
Abb. 3.10 Immunfluoreszenzmikroskopie von WA(pYV, pRFP) und WA(pYV $\Delta$ YadA, pRFP) im 3D-KoG.....	75
Abb. 3.11 Immunelektronenmikroskopie von WA(pYV) und WA(pYV $\Delta$ YadA) im 3D- KoG. ....	76
Abb. 3.12 Konfokale fluoreszenzmikroskopische Darstellung von WA(pYV, pRFP), WA(pYV $\Delta$ YadA, pRFP) und WA(pYV::YadA <sub>HY</sub> , pRFP) im 3D-Ko488G.....	78
Abb. 3.13 SDS-PAGE und Immunoblot von Yersinien-gebundenem und löslichem Biotin-Koll I. ....	79
Abb. 3.14 Nachweis von Biotin-Koll I und durch Kollagenasebehandlung gespaltene Biotin-Kollagenfragmente mittels SDS-PAGE und Immunoblot. ....	80
Abb. 3.15 Interaktion von Yersinien mit Kollagenase verdauten 488-Koll I-Fragmenten. .....	81
Abb. 3.16 Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der Kollagen Typ I-Bindung von Yersinien mit und ohne Kollagenasebehandlung. ....	82
Abb. 3.17 Hellfeldmikroskopie (HF) und Elektronenmikroskopie (TEM) von WA(pYV) im 3D-KoG ohne oder mit (POG) <sub>10</sub> . ....	83
Abb. 3.18 Konfokale fluoreszenzmikroskopische Darstellung der kompetitiven Bindung von 488-Koll I und 647-(POG) <sub>10</sub> an WA(pYV, pRFP) im 3D-Ko488G.....	84

---

Abb. 3.19 Durchflusszytometrischer Nachweis von Yersinien exponiertem YadA. ....	86
Abb. 3.20 Durchflusszytometrische Bestimmung der YadA-Kollagenbindung von Yersinia-Einzelzellen.....	87
Abb. 3.21 Durchflusszytometrische Quantifizierung der YadA-Kollagenbindung.....	89
Abb. 3.22 Immunoblot mit Kaninchen anti-YadA Serum zur Überprüfung der YadA- Produktion. ....	91
Abb. 3.23 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von 488-Koll I und Yersinien. ...	93
Abb. 3.24 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von 647-(POG) <sub>10</sub> und Yersinien.	93
Abb. 3.25 Doppel-Immunfluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen zum Nachweis von Fibronektin und Kollagen auf der Zelloberfläche. ....	94
Abb. 3.26 Adhäsion von WA $\Delta$ inv(pYadA) und WA $\Delta$ inv(pYadA <sub>HY</sub> ) mit und ohne Kollagenbehandlung an HeLa-Zellen.....	96
Abb. 3.27 Reinheitsüberprüfung und Test auf Kollagenproduktion der aus humanem Blut gewonnenen PMN-Fraktionen.....	97
Abb. 3.28 Adhäsion von WA $\Delta$ inv(pYFP)-Stämmen an PMNs.....	99
Abb. 3.29 Adhäsion von WA(pYFP)- und WA $\Delta$ inv(pYFP)-Stämmen an PMNs.....	100
Abb. 3.30 Mögliche Kombination an PMN-Rezeptor-Interaktion mit den verschiedenen Yersinien-Konstrukten.....	101
Abb. 3.31 Adhäsion von WA $\Delta$ inv(pYFP)-Stämmen mit und ohne Kollagen- bzw. (POG) <sub>10</sub> -Präinkubation an PMNs. ....	102
Abb. 3.32 Bestimmung der MIR und MPR von Yersinien mit bzw. ohne Kollagenbehandlung von J774-Makrophagen.....	103
Abb. 3.33 Nachweis von MARCO auf J774-Makrophagen.....	105
Abb. 3.34 Synthesenachweis von MARCO transfizierter CHO-Zellen mittels Immunoblot. ....	105
Abb. 3.35 Adhäsion von WA $\Delta$ inv(pYFP)-Stämmen an CHO(pMARCO) und CHO(pH420)-Zellen.....	107
Abb. 4.1 Darstellung der YadA-Kollagenbindung von WA(pYV) im 3D-KoG.....	113
Abb. 4.2 Schematische Darstellung der verschiedenen Bindungsstellen von YadA....	118
Abb. 4.3 Möglicher Adhäsionsmechanismus von <i>Y. enterocolitica</i> (Ye) an HeLa-Zellen. .....	120
Abb. 4.4 Möglicher Adhäsionsmechanismus von <i>Y. enterocolitica</i> (Ye) an PMNs.....	122

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Verschiedene Kollagentypen, deren Klassifizierung und Vorkommen. ....	22
Tab. 2.1 Verwendete <i>Y. enterocolitica</i> Stämme .....	29
Tab. 2.2 Verwendete <i>E. coli</i> Stämme .....	30
Tab. 2.3 Verwendete Plasmide. ....	31
Tab. 2.4 Liste der verwendeten Primer. ....	33
Tab. 2.5 Verwendete Antibiotika. ....	34
Tab. 2.6 Verwendete eukaryotische Zelllinien und primär Zellen. ....	34
Tab. 2.7 Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze. ....	35
Tab. 2.8 Liste der verwendeten Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen bzw. Konzentrationen. ....	36
Tab. 2.9 Liste der verwendeten Proteine und Peptide. ....	37
Tab. 2.10 Liste der verwendeten Chemikalien, Biochemikalien, Enzyme und Kits. ....	40
Tab. 2.11 Liste der verwendeten Geräte .....	42
Tab. 2.12 Liste der Verbrauchsmaterialien. ....	43
Tab. 2.13 Ansätze für 3D-Kollagengele entsprechend der nachfolgenden Experimente. ....	44
Tab. 2.14 Standardreaktionsansatz bei Verwendung des Expand High Fidelity Mix. ....	47
Tab. 2.15 Standardreaktionsansatz bei Verwendung des BioMix Red. ....	47
Tab. 2.16 Verwendetes Standard PCR-Reaktionsprogramm. ....	47
Tab. 2.17 PCR-Reaktionsprogramm bei Verwendung von ~70-Nukleotid langen Primern. ....	49
Tab. 2.18 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE. ....	52
Tab. 2.19 Ethanolreihe für die Entwässerung der Proben. ....	59
Tab. 2.20 Aufführung der verwendeten mikroskopischen Methoden. ....	62

## Zusammenfassung

Das dreidimensionale TypI-Kollagengel (3D-KoG) ermöglicht aufgrund seiner fibrillären Netzwerkstruktur die mikroskopische Analyse der Interaktionen von Mikroorganismen mit Matrixproteinen (ECM) oder migrierenden Phagozyten. Im Vergleich zu Zellsuspensionen oder Zellmonolayern simuliert das 3D-KoG besser die Bedingungen, die in infiziertem Gewebe erwartet werden. Humanpathogene *Yersinia enterocolitica*, wie WA(pYV) des Serotyps O:8, zeigen im 3D-KoG einen besonderen Wachstumsphänotyp: Sie wachsen in dicht gepackten Mikrokolonien (DPM), die den Mikrokolonien in infiziertem lymphatischen Organen der Maus ähneln (Lymphknoten, Milz u.a.). Für diesen DPM-Phänotyp ist das *Yersinia* Adhäsins A (YadA) verantwortlich, das die Autoaggregation der Bakterien sowie die Interaktion mit ECM-Proteinen vermittelt. Entsprechend zeigt eine  $\Delta yadA$ -Mutante im 3D-KoG locker gepackte Mikrokolonien (LPM).

In dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss der Yops und des T3SSs auf die LPM-Morphologie im 3D-KoG untersucht. Hierzu wurde dem plasmidlosen Stamm WAc das Plasmid pT3SS eingeführt, das neben YadA alle Gene für das T3SS, jedoch keine Gene für die T3SS-Substrate, sogenannte Yops („*Yersinia* outer proteins“) besitzt. Für diesen Stamm WA(pT3SS) konnte ein DPM-Wachstum im 3D-KoG bestimmt werden, wohingegen die zugehörige YadA-Deletionsmutante WA(pT3SS $\Delta$ YadA) planktonisch wuchs. Damit konnte das T3SS als zusätzlicher Faktor für die LPM-Bildung ausgeschlossen werden. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch den Wachstumsvergleich des YadA-positiven Stamms WA(pYadA) und dem Kontrollstamm WA(p $\Delta$ YadA), welche DPM – bzw. planktonisches Wachstum im 3D-KoG zeigten. YadA-negative/T3SS-positive Stämme, die keine Yops sezernieren können (WA(pT3SS $\Delta$ YadA)), zeigen planktonisches Wachstum, wohingegen der Yop-produzierende aber YadA-negative Stamm WA(pYV $\Delta$ YadA) im 3D-KoG den LPM-Phänotyp zeigt. Somit konnte ein weiterer Faktor, der für die LPM-Morphologie verantwortlich ist, in dieser Arbeit identifiziert werden: sezernierte Yop-Effektorproteine, die an der Bakterienoberfläche haften.

Vorangegangene elektronenmikroskopische Untersuchungen hatten gezeigt, dass der DPM-Phänotyp mit der Ausbildung einer fibrillären Kapsel der Einzelbakterien (Kapseldicke ~ 100 nm) assoziiert ist. Dabei blieb unklar, ob die Kapsel aus Polysacchariden und/oder Proteinfibrillen besteht. Es wurden deshalb *Yersinia*-Mutanten mit deletierten Genen für Polysaccharidkapselbiosynthese (*hmsH*, *bcsA*) oder fibrilläres Adhäsins (*myfA*) mikroskopisch

untersucht. Die genannten Deletionsmutanten bilden alle die fibrilläre Kapsel und den DPM-Phänotyp aus. Da die Kollagen-nichtbindende YadA<sub>HY</sub>-Mutante (Austausch der Histidinreste 156 und 159 gegen Tyrosin) keine nachweisbare Kapselbildung zeigte, wurden Methoden zum Kollagennachweis entwickelt. Durch Transmissionselektronen- (TEM) und Fluoreszenzmikroskopie wurde der Nachweis erbracht, dass es sich bei der fibrillären Kapsel um Kollagen handelt. Jedoch zeigten weitere Analysen u.a. mit Fluoreszenzfarbstoff markiertem Kollagen die Bindung von Kollagenuntereinheiten an YadA, sogenannten Fibrillen (( $\alpha_1$ )<sub>2</sub>( $\alpha_2$ )-Trimer). Dies konnte auch durch die Analysen mittels TEM bestätigt werden. Eine TypI-Kollagenfibrille besteht aus einer Tripel-Helix mit zwei  $\alpha_1$ - und einer  $\alpha_2$ -Kette, die eine polymere native Kollagenfaser bilden. Einige frühere Studien befassten sich bereits mit der Bindung von YadA-positiven Yersinien an immobilisiertes Kollagen, wobei der Anteil von Kollagenfasern, -fibrillen oder -monomeren nicht berücksichtigt wurde. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Kollagen, konnte ein neuer Assay entwickelt werden, um die YadA-Bindung an lösliches Kollagen zu untersuchen. Biochemische Analysen bestätigten die Anwesenheit von fibrillärem Kollagen in Lösung. Die YadA-Kollagenbindung konnte mittels FACS-Analysen quantifiziert und durch Verwendung eines tripel-helikalen kollagenähnlichen Oligopeptids (POG)<sub>10</sub> partiell blockiert werden. Nach Erreichen der Bindungssättigung mit (POG)<sub>10</sub> sank die Kollagenbindungskapazität YadA-positiver Yersinien auf 50 %. Das Ergebnis spricht für zwei Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität für Kollagen, wobei die weniger affine Bindungsstelle von (POG)<sub>10</sub> besetzt wird. Desweiteren wurde festgestellt, dass die Bindung von (POG)<sub>10</sub> an YadA die Fähigkeit zur Yersinia-Autoagglutination aufhebt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der YadA-Kollagenbindung für die Interaktion mit Wirtszellen untersucht. Stämme, die kollagenbindungsmutiertes YadA<sub>HY</sub> produzieren, zeigen eingeschränkte Adhäsion an HeLa-Zellen. Mittels Immunfluoreszenz wurde nachgewiesen, dass HeLa-Zellen Fibronectin und Kollagen an der Zelloberfläche aufweisen. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Yersinien an ECM-Proteine und damit zum größten Teil indirekt über zell-assoziierte ECM an HeLa-Zellen binden. Primäre hämatopoetische Zellen wie Neutrophile oder Makrophagen haben keine ECM-Proteine an der Zelloberfläche. Bei der Interaktion mit Immunzellen wurden PMNs und Makrophagen verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Rezeptoren als auch der Zytokinsekretion unterscheiden. Die Adhärenzraten von Yersinien, welche ein verkürztes YadA<sub>ΔN</sub> (Deletion der N-terminalen AS 29 – 81) oder kein YadA produzieren sind vergleichbar und zudem um 50 % niedriger als von YadA-

positiven Yersinien. Kollagen-präinkubierte Yersinien zeigten deutlich reduzierte Adhärenz an PMNs im Vergleich zu Kollagen-freien oder (POG)<sub>10</sub>-präinkubierten Yersinien. Die Kollagenkapsel weist eine Dicke von 100 nm auf (TEM-Bestimmung), wohingegen eine (POG)<sub>10</sub>-Schicht höchstens 30 - 40 nm dick sein sollte. Im Vergleich zu gebundenem (POG)<sub>10</sub> verhindert wahrscheinlich die YadA-Kollagenbindung die Interaktion mit Rezeptoren der Neutrophilen durch Maskierung oder sterische Hinderung.

Die mittels Gentamicin-Killing-Assay ermittelte Anzahl von Kollagen-präinkubierten Yersinien nach Phagozytose war niedriger als von Kollagen-freien Yersinien, was auf einen Schutzmechanismus der Kollagenschicht hinweist. YadA<sub>ΔN</sub>-Mutanten zeigten keinen Unterschied in der Adhärenzrate für Makrophagen im Vergleich zu YadA-positiven Yersinien. Deshalb ist die N-terminale Region für die PMN-Interaktion essentiell, jedoch spielt sie für die Makrophagen-Adhäsion keine Rolle. Es wurde deshalb geprüft, ob der Makrophagen-Rezeptor MARCO („macrophage receptor with collagenous structure“) mit seiner kollagenähnlichen „Stil“-Domäne für YadA in Frage kommt. MARCO-transfizierte CHO-Zellen zeigten aber keine signifikanten Unterschiede in der Yersinien-Adhärenz im Vergleich zu untransfizierten CHO-Zellen. Deshalb kann MARCO als direkter Rezeptor für YadA ausgeschlossen werden.

## Summary

Because of its fibril-forming meshwork the three-dimensional type I collagen gel (3D-CoG) allows microscopic analysis of the interaction of pathogens with extracellular matrix proteins (ECM) or migrating phagocytes. Compared to bacterial suspensions or 2D-cell monolayers it simulates a tissue-like environment. WA(pYV), the human pathogenic serotype O:8 of *Yersinia enterocolitica*, shows unusual growth behavior in the 3D-CoG: they grow in densely packed microcolonies (dpm) similar to microcolonies in infected lymphatic mouse organs (lymph nodes, spleen and more). The Yersinia adhesion A (YadA) is not only responsible for forming the dpm phenotype but also for bacterial autoaggregation as well as for interaction with ECM-proteins. According to this  $\Delta yadA$  mutants are forming loosely packed microcolonies (lpm) in the 3D-CoG.

In this work the influence of the T3SS and its effector Yops on lpm phenotype in the 3D-CoG was investigated. Plasmid-cured WAc strains were transformed with the plasmid pT3SS harboring YadA and all genes for the Ysc-T3SS but no genes for T3SS substrates, the Yops (*Yersinia* outer proteins). In the 3D-CoG this WA(pT3SS) strain shows dpm phenotype whereas the corresponding *yadA*-deletion mutant WA(pT3SS $\Delta$ YadA) grows planktonic excluding the T3SS-needle as an additional factor for lpm formation. These results were confirmed comparing 3D-CoG growth of YadA-positive WA(pYadA) and control strain WA(p $\Delta$ YadA) showing dpm and planktonic growth, respectively. YadA-negative/T3SS-positive but Yop- non-producing strains (WA(pT3SS $\Delta$ YadA)) are growing dispersed, whereas Yop-producing and YadA-negative WA(pYV $\Delta$ YadA) are growing in lpm. In this work an additional factor that is responsible for the lpm morphology could be identified: secreted Yop effector proteins that cover the bacterial surface.

Previous electron microscopic analysis showed that dpm morphology is associated with the formation of a fibrillar layer of single Yersinia cells (100 nm thick capsule), whereas it was still unclear if this capsule is of a polysaccharide or a fibrillar protein origin. To resolve this question Yersinia mutants depleted of genes encoding for either polysaccharide synthesis (*hmsH*, *bcsA*) and/or fibrillar adhesin (*myfA*) were microscopically examined. These mutants form the fibrillar layer as well as the dpm phenotype. Because the collagen non-binding YadA<sub>HY</sub>-mutant (exchange of histidine residues 156 and 159 to tyrosin) did not show the fibrillar layer, diverse assays for the detection of collagen were developed. Using transmission electron (TEM) – and fluorescence microscopy it could be shown that the



fibrillar capsule consists of collagen. Further analysis with fluorescence-labeled collagen indicated the binding of collagen subunits to YadA, named fibrils ( $(\alpha_1)_2(\alpha_2)$ -trimer), which could also be demonstrated by TEM analysis. Type I collagen fibrils consist of a triple-helix with two  $\alpha_1$ - and one  $\alpha_2$ -chain that form a polymer native collagen fiber. Previous studies dealing with binding of YadA-positive *Yersinia* to immobilized collagen did not consider the content of collagen fibers, - fibrils or – monomers. In this work a new assay has been established using fluorescence-labeled collagen to study YadA-binding to soluble collagen. The presence of fibrillar collagen was demonstrated by biochemical analysis. YadA collagen-binding has been quantified by FACS analysis and partially blocked by a triple-helical collagen-like oligopeptide (POG)<sub>10</sub>. When (POG)<sub>10</sub>-binding was saturated the collagen binding capacity of YadA-positive *Yersinia* decreased to 50 %. This result indicates, that two binding sites with different affinity for collagen exist on YadA, whereas the less affine one is used by (POG)<sub>10</sub>. Additionally it could be shown that binding of (POG)<sub>10</sub> to YadA abrogates *Yersinia* autoagglutination.

The second part of this work deals with the role of YadA collagen-binding in the interaction with host cells. Strains producing collagen-binding mutated YadA<sub>HY</sub> show restricted adhesion to HeLa-cells. Using immunofluorescence it could be proven that HeLa cells exhibit fibronectin and collagen on the cell surface. The results argue for the binding of *Yersinia* to these ECM proteins and so mostly for indirect binding via cell-associated ECM proteins to HeLa cells. Primary hematopoietic cells like neutrophils and macrophages do not harbor ECM proteins on their cell surface. To study the interaction with immune cells, PMNs and macrophages differing in their receptor expression and cytokine secretion were used. The adhesion rate of *Yersinia* mutants producing truncated YadA<sub>ΔN</sub> (deletion of the N-terminal aa 29 – 81) and  $\Delta yadA$  deletion mutants is comparable and 50 % less than of YadA-positive *Yersinia*. Collagen preincubated *Yersinia* showed clearly reduced adherence to PMNs compared to untreated or (POG)<sub>10</sub>-treated bacteria. The 100 nm (determined by TEM) thick collagen layer is thicker than the (POG)<sub>10</sub>-layer which is about 30 - 40 nm in length. Comparing bound (POG)<sub>10</sub> the YadA-collagen binding inhibits the interaction with neutrophil receptors by masking or steric hindrance.

Gentamicin protection assays showed that the number of collagen preincubated *Yersinia* after phagocytosis has been clearly reduced compared to untreated *Yersinia* pointing out a protection mechanism caused by the collagen layer. YadA<sub>ΔN</sub> mutants did not show differences in adhesion to macrophages compared to YadA-positive *Yersinia* concluding that

the N-terminal region of YadA is only required for PMN-interaction, but not for macrophage binding. Hence it has been tested, if the macrophage receptor MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) harboring a collagen-like stalk domain could function as a binding partner for YadA. However MARCO-transfected CHO cells did not show significant differences in *Yersinia* adherence compared to untransfected CHO cells. Therefore MARCO can be excluded as a direct receptor for YadA.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Gattung *Yersinia*

Der Erreger der Pest, *Yersinia pestis* wurde 1894 von dem Schweizer Arzt und Bakteriologen Alexandre Yersin in Hongkong identifiziert (Bibel & Chen, 1976, Perry & Fetherston, 1997). Ursprünglich wurde das Bakterium nach Louis Pasteur *Pasteurella pestis* benannt, später jedoch zu Ehren Yersins, welcher erstmals den Zusammenhang des von ihm identifizierten Pesterregers und dem zeitgleichen Auftreten des Rattensterbens in Hongkong herstellte, in *Yersinia pestis* umbenannt (Perry & Fetherston, 1997). Die Gattung *Yersinia* umfasst derzeit 17 Arten, wobei nur *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* humanpathogen sind (Skurnik & Toivonen, 2011).

Die gram-negativen, stäbchenförmigen Yersinien gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und besitzen ein Wachstumsoptimum bei 27 °C, können sich jedoch auch noch bei Temperaturen von 4 °C vermehren (Hahn *et al.*, 2009). Die enteropathogenen Arten *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind peritrich begeißelt, wobei die Beweglichkeit nur bei 27 °C erfolgt und Yersinien bei 37 °C unbeweglich sind (Straley & Perry, 1995).

### 1.1.1 *Yersinia enterocolitica*

Die Aufnahme von *Y. enterocolitica* geschieht meist über den oralen Weg und verursacht beim Menschen eine Yersiniose, welche sich meist durch eine milde Gastroenteritis unter Begleitung von Fieber manifestiert. In selteneren Fällen kommt es jedoch zu Folgeerkrankungen im muskuloskeletalen Bewegungsapparat, der reaktiven Arthritis (Cover & Aber, 1989). *Y. enterocolitica* ist nach *Campylobacter jejunii* und *Salmonella enterica* der dritthäufigste Erreger von Darmerkrankungen in Deutschland (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, 2012). Die Übertragung erfolgt meist indirekt über kontaminierte Lebensmittel und Wasser (Hahn *et al.*, 2009). Die Hauptinfektionsquelle von *Y. enterocolitica* ist das Schwein: Durch die Aufnahme von nicht ausreichend erhitztem Schweinefleisch (z.B. Hackfleisch) werden die Erreger vom Menschen aufgenommen (Wauters *et al.*, 1987).

Biochemische Eigenschaften erlauben die Einteilung von *Y. enterocolitica* Stämmen in 6 Biotypen (1A, 1B, 2, 3, 4 und 5) (Bottone, 1999). Für Mäuse hochvirulente Stämme gehören

dem Biotyp 1B (vorherrschend in Amerika) an, wohingegen der Biotyp 1A die apathogenen Stämme und die Biotypen 2 – 5 (vorherrschend in Europa, Asien und Australien) die mäßig virulenten Stämme umfasst (Wauters *et al.*, 1987). Basierend auf der unterschiedlichen Struktur der Lipopolysaccharide (O-Antigene) können die verschiedenen Biotypen weiter in über 70 Serotypen unterteilt werden (Garzetti *et al.*, 2013). Die Biotypen 2 und 4 mit den Serotypen O:3, O:9 und O:5, 27 sind in Europa verbreitet, wohingegen das Biovar 1B mit den medizinisch relevanten Serotypen O:4, 32 O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 vor allem in Nordamerika auftritt (Bottone, 1997). In Deutschland werden die meisten Infektionen (> 90 %) durch den Serotyp O:3 hervorgerufen. Eine geringere Rolle spielen die Serotypen O:5, 27 (0,8 %), O:8 (0,2 %) und O:9 (6 %) (Robert Koch-Institut 2012).

## **1.2 Pathogenese und Virulenz von *Y. enterocolitica***

Nach der oralen Aufnahme von *Y. enterocolitica* durch kontaminierte Nahrung gelangen die Bakterien in den Dünndarm und passieren die intestinale Barriere durch Invasion von M-Zellen, die zwischen den follikel-assoziierten Epithelzellen der Peyer'schen Plaques lokalisiert sind (Autenrieth & Firsching, 1996). Von dort aus gelangen die Yersinien in die mesenterialen Lymphknoten (Bottone, 1997) und können sich wahrscheinlich über die Blutbahn in Leber und Milz ausbreiten (Cornelis *et al.*, 1998, Carter, 1975). In diesen Organen replizieren die Bakterien vorwiegend extrazellulär und bilden Mikroabzesse (Öllerich *et al.*, 2007).

Die Pathogenität von *Y. enterocolitica* hängt von zahlreichen Virulenzfaktoren ab, welche entweder chromosomal kodiert sind oder sich auf dem 70 kb großen Virulenzplasmid pYV („*Yersinia* virulence plasmid“) befinden (Portnoy & Martinez, 1985). Zu den chromosomalkodierten Virulenzfaktoren gehören das Siderophor Yersiniabactin Ybt, das hitzestabile Enterotoxin Yst, das fibrilläre Myf-Antigen und die Adhäsine Inv (Invasin) und Ail („attachment and invasion locus“) (Perry *et al.*, 1999, Iriarte *et al.*, 1993, Isberg *et al.*, 1987, Miller & Falkow, 1988). Auf dem Plasmid pYV befinden sich die Gene, die für die Komponenten des *Yersinia* Typ III Sekretionssystems (Ysc-T3SS) sowie die Effektorproteine Yops („*Yersinia* outer proteins“) und das YadA („*Yersinia* adhesin A“) kodieren (Heesemann *et al.*, 1986, Heesemann & Grüter, 1987).

### 1.2.1 Enterotoxin Yst

Das hitzestabile Enterotoxin Yst („Yersinia stable toxin“) von *Y. enterocolitica* wird sowohl von pathogenen als auch von apathogenen Stämmen des Biotyps 1A produziert (Delor *et al.*, 1990, Singh & Viridi, 2004). Das 30 Aminosäure lange Peptid wird *in vitro* nur bei Temperaturen unter 30 °C synthetisiert (Takao *et al.*, 1984, Feeley *et al.*, 1979). Eine Erhöhung der Osmolarität und des pH-Wertes jedoch führen zu einer Induktion der *yst* Transkription bei 37 °C (Mikulskis *et al.*, 1994). Das Enterotoxin aktiviert die Guanylatcyclase im Darmepithel, das letztendlich die für eine Yersiniose typische wässrige Diarrhöe auslöst (Delor & Cornelis, 1992).

### 1.2.2 Das Yersinia Typ III Sekretionssystem (Ysc-T3SS)

Zahlreiche gram-negative Bakterien besitzen ein komplex aufgebautes Sekretionssystem, um bakterielle Effektorproteine in die Wirtszelle einzuschleusen, welche dort in zelluläre Signalkaskaden der Wirtszelle eingreifen und somit zur Manipulation der Zelle führen (Galan & Collmer, 1999). Die Pathogenität von Yersinien, Salmonellen und Shigellen wird durch das Typ III Sekretionssystem (T3SS) verwirklicht (Iriarte & Cornelis, 1996, Kaniga *et al.*, 1995, Sansonetti *et al.*, 1982). Es besteht aus einem Basalkörper, der die innere und äußere bakterielle Membran durchspannt und einer äußeren „Injektionsnadel“, welche zur Injektion der Effektorproteine in die Wirtszelle benutzt wird (Cornelis *et al.*, 1998, Hoiczyk & Blobel, 2001). Das Ysc-T3SS besteht aus 29 Ysc-Proteinen (Hueck, 1998, Galan & Wolf-Watz, 2006): Der untere Basalkörper wird aus den Proteinen YscD, I, J, R, S, T, U, und V in der inneren Membran gebildet (Plano & Straley, 1993, Plano & Straley, 1995). YscQ bildet vermutlich einen multimeren Ring am unteren Teil des Basalkörpers und interagiert zusammen mit der ATPase YscN, die als Proteinentfaltungsenzym („unfoldase“) die Translokation der Yops bewirkt. YscN wird von YscL reguliert (Morita-Ishihara *et al.*, 2006, Sorg *et al.*, 2006, Jackson & Plano, 2000). Das Sekretin YscC bildet den oberen Teil des Basalkörpers, indem es einen Doppelring in der äußeren Membran bildet (Burghout *et al.*, 2004). Die Sekretionsnadel besteht aus 200 – 300 YscF Proteinen und weist eine Länge von 60 – 80 nm auf (Hoiczyk & Blobel, 2001). Den Abschluss bildet LcrV, das vermutlich die Proteine YopB und YopD bei der Bildung der Translokationspore in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle unterstützt (Mueller *et al.*, 2005, Cornelis & Wolf-Watz, 1997).

### 1.2.3 Die „Yersinia outer proteins“ (Yops)

Die Injektion von Effektorproteinen über das T3SS in die Wirtszelle ist eine weit verbreitete Strategie von pathogenen Bakterien, um kontaktierte Wirtszellen zu Zwecken des Erregers zu kontrollieren (Hueck, 1998). *Y. enterocolitica* transloziert mindestens sechs Yop Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle, wo diese in verschiedene Signalkaskaden eingreifen, die Phagozytose unterdrücken bzw. Zytoskelettlagerung kontrollieren, um ein extrazelluläres Replizieren der Yersinien zu gewährleisten (Erfurth *et al.*, 2004, Ruckdeschel *et al.*, 2001, Koberle *et al.*, 2009). Die Expression der Yops erfolgt *in vitro* bei 37 °C und wird unter Calciummangel induziert (Wattiau & Cornelis, 1994, Joseph & Plano, 2013).

**YopH** ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP), die eine Reihe von Signalkaskaden beeinflusst, welche bedeutend für die angeborene und erworbene Immunantwort sind (Aepfelbacher, 2004, Cornelis, 2002). Die Injektion von YopH in Neutrophile und Makrophagen führt zur Dephospholierung der Proteine der fokalen Adhäsionskomplexe (FAK) (Hamid *et al.*, 1999). Dadurch kommt es letztendlich zu einer Zerstörung der Aktinstrukturen und somit zur Inhibierung der Phagozytose (Andersson *et al.*, 1996, Persson *et al.*, 1997). YopH verhindert nicht nur die bakterielle Internalisierung selbst, sondern wirkt auch Prozessen entgegen, die mit der Phagozytose assoziiert sind, wie dem „oxidative burst“ von Phagozyten (Viboud & Bliska, 2005). Zudem wird durch YopH die Calcium-Signalisierung blockiert, das bei der Ausschüttung der Granula von Neutrophilen eine wichtige Rolle spielt (Andersson *et al.*, 1999). Weiterhin übt das YopH einen inhibitorischen Effekt auf die Synthese des MCP-1 („macrophage chemoattractant protein 1“) aus, ein Chemokin, welches an der Rekrutierung von Makrophagen zum Infektionsherd beteiligt ist (Sauvonnet *et al.*, 2002). Die Effektorproteine YopE, YopT und YopO interagieren mit Rho GTPasen. Rho GTPasen sind GTP-bindende Proteine, die eine Vielzahl an zellulären Funktionen regulieren (Barbieri *et al.*, 2002). Zu den am besten charakterisierten gehören RhoA, Rac-1 und Cdc42. In der GTP-gebundenen Form kommt es zu einer Konformationsänderung, die letztendlich zur Aktivierung des Proteins führt. Umgekehrt wird die GTPase in GDP-gebundener Form inaktiv. **YopE** fungiert als GTPase aktivierendes Protein (GAP), indem es die Rho GTPase durch Hydrolyse von GTP in die inaktive GDP-gebundene Form überführt (Aepfelbacher, 2004, Black & Bliska, 2000). Die Inaktivierung der GTPasen führt zur Depolymerisierung der Aktinfilamente und somit zur Zerstörung des Zytoskeletts (Grosdent *et al.*, 2002, Rosqvist *et al.*, 1991, Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000). Dieser Effekt wird allgemein als Zytotoxizität bezeichnet. **YopT** fungiert als

Cysteinprotease, das einen Prenylrest am C-terminalen Cystein der Rho GTPasen abspaltet (Shao *et al.*, 2003, Shao *et al.*, 2002). Mit diesem Prenylrest sind die GTPasen an der Plasmamembran verankert (Sorg *et al.*, 2001). Durch die Spaltung kommt es zur Freisetzung der GTPasen von der Zellmembran, somit zum Funktionsverlust und letztendlich wie YopE zur Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts (Zhang & Casey, 1996, Iriarte & Cornelis, 1998). **YopO** (YpkA in *Y. pseudotuberculosis*) ist eine Serin-/Threoninkinase, die Homologien zum N-terminalen Bereich von eukaryotischen Serin-/Threoninkinasen aufweist und durch Aktin aktiviert wird (Navarro *et al.*, 2007, Galyov *et al.*, 1993, Juris *et al.*, 2002). Dadurch kommt es zur Modulierung des Aktin-Zytoskeletts, das im Fall von YopO durch die Zerstörung von Stressfibern charakterisiert ist (Groves *et al.*, 2010). Die C-terminale Region von YopO weist eine GDI („Guanidine nucleotide dissociation inhibitors“-ähnliche Domäne auf, welche eine Bindung an Rac und Rho ermöglicht (Prehna *et al.*, 2006, Barz *et al.*, 2000). Zudem blockiert YopO die Phagozytose, indem es das heterotrimer Protein  $G\alpha_q$ , ein wichtiger Faktor in der Signaltransduktionskaskade der Phagozytose, phosphoryliert und somit die Bindung von GTP inhibiert (Navarro *et al.*, 2007, Groves *et al.*, 2010). **YopP** (YopJ in *Y. pseudotuberculosis*) stellt einen wirksamen Inhibitor von MAPK- und NF- $\kappa$ B- Signaltransduktionswegen dar, indem es als Acetyltransferase Serin- und Threoninreste von MEK1/2- und IKK $\alpha/\beta$ -Kinasen acetyliert, wodurch deren Phosphorylierung blockiert und die anschließende Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , ein Regulator des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, unterbrochen wird (Mittal *et al.*, 2010, Mukherjee *et al.*, 2006, Orth *et al.*, 1999). Somit wird die Translokation von NF $\kappa$ B zum Nukleus verhindert und folglich die Transkription von proinflammatorischen Genen, wie IL-8 und TNF $\alpha$ , unterdrückt (Mittal *et al.*, 2006, Orth, 2002). Durch die Inhibierung der MAPK- und NF- $\kappa$ B- Signaltransduktionswege wird auch die Apoptose in Makrophagen nach LPS-Stimulierung induziert (Monack *et al.*, 1997, Ruckdeschel *et al.*, 1997). Das Effektorprotein **YopM** ist das einzig bekannte Yop ohne enzymatische Aktivität und wird nach T3SS-abhängiger Translokation in die Wirtszelle zum Nukleus transportiert (Skrzypek *et al.*, 1998, Cornelis & Wolf-Watz, 1997). Des Weiteren konnte eine Interaktion mit den zwei Kinasen PRK2 und RSK-1 gezeigt werden, welche u.a. eine Rolle in der Regulation der Translation, Proliferation und Überleben der Zelle spielen (McDonald *et al.*, 2003, Vincent & Settleman, 1997, Frodin & Gammeltoft, 1999). YopM scheint ebenfalls wie YopP die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zu unterdrücken, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Ruter *et al.*, 2010). Ein weiteres Substrat des T3SS ist **YopQ** (YopK in *Y. pseudotuberculosis*), das

die Translokationsrate der Yops kontrolliert (Dewoody *et al.*, 2011). YopK-Deletionsmutanten zeigen eine erhöhte Injektionsrate der Effektor-Yops in Wirtszellen, sind aber im Mausmodell stark attenuiert (Holmstrom *et al.*, 1995). Die Regulation der Yop-Translokation durch YopQ/K findet jedoch nicht im bakteriellen Cytosol statt, sondern entfaltet seine regulatorische Aktivität am Translokon (YopB, YopD) nach seiner eigenen Sekretion in Wirtszellen (Dewoody *et al.*, 2013).

#### 1.2.4 Adhäsine

##### 1.2.4.1 Das Myf-Antigen

Das Myf-Antigen („mucoid *Yersinia* factor A“) wird als Proteinpolymer aus 21 kDa-Untereinheiten produziert und weist Homologien zu PsaA („pH 6 antigen“) von *Y. pestis* auf (Iriarte *et al.*, 1993, Huang & Lindler, 2004). Das *myf* operon besteht aus den Genen *myfA*, *myfB* und *myfC*: Während MyfA die Fimbrienuntereinheit ist, kodiert *myfB* für ein vermeintliches Chaperon („usher“) und *myfC* wahrscheinlich für ein Außenmembranprotein (Iriarte & Cornelis, 1995). Die Transkription von *myfA* ist nicht nur temperatur- (Optimum 37 °C) und pH-Wert-abhängig (Optimum pH 6), sondern auch von der Expression von *myfE* und *myfF*, die in einem ORF stromaufwärts von *myfA* liegen (Iriarte & Cornelis, 1995). In Seren, die aus Yersiniose-diagnostizierten Patienten bezogen wurden, konnten Antikörper gegen MyfA nachgewiesen werden, womit gezeigt werden konnte, dass Myf-Fibrillen *in vivo* gebildet werden und eine Antikörperantwort induzieren (Rastawicki & Gierczynski, 2009). Die *in vivo*-Funktion des Myf-Antigens ist noch nicht gänzlich geklärt, jedoch wird eine Interaktion von Myf mit dem Darmepithelium des Wirts angenommen (Bialas *et al.*, 2012). Desweiteren könnte das Protein einen Schutzmechanismus vor den bakteriziden Eigenschaften von Phagozyten bieten (Diaz *et al.*, 1985).

##### 1.2.4.2 “Attachment and Invasion locus“ (Ail)

Das chromosomal kodierte Ail von *Y. enterocolitica* ist ein Protein von 17 kDa, das 8 membrandurchspannende  $\beta$ -Faltblätter und 4 extrazelluläre Schleifen in der äußeren Membran bildet (Miller *et al.*, 1990, Beer & Miller, 1992). Es ist verantwortlich für eine Invasin-unabhängige und Spezies-spezifische Invasion in verschiedene Zelllinien (Bliska & Falkow, 1992). Weiterhin vermittelt es Serumresistenz, indem es ebenso wie YadA das C4b-



bindende Protein (C4bp), ein Regulator des humanen Komplement-Systems, bindet (Barnum, 1991, Miller & Falkow, 1988, Ho *et al.*, 2012). Dadurch ist *Y. enterocolitica* vor dem Angriff des Komplement-Systems geschützt (Kirjavainen *et al.*, 2008). Die genaue Beteiligung von Ail an der Pathogenität von *Y. enterocolitica* konnte bisher noch nicht völlig geklärt werden, da die Virulenz einer *ail*-Deletionsmutante im Vergleich zu einem *Yersinia*-Wildtyp-Stamm im Mausmodell nicht herabgesetzt war (Wachtel & Miller, 1995).

#### 1.2.4.3 Invasin (Inv)

Ein weiteres chromosomal kodiertes Adhäsion ist das Invasin, welches mit der N-terminalen Region in der äußeren Membran von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* verankert ist (Hamburger *et al.*, 1999). Mit seiner C-terminalen extrazellulären Domäne bindet es an  $\beta_1$ -Integrine ( $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_1$ ) von Wirtszellen und vermittelt die Invasion durch einen „Zipper“-Mechanismus in die Zelle (Leong *et al.*, 1995, Sansonetti, 2002). Die extrazelluläre Region des Invasins von *Y. pseudotuberculosis* ist 18 nm lang und besteht aus 5 globulären Domänen D1 – D5. Die Domäne D2 fehlt dagegen bei *Y. enterocolitica* (Grassl *et al.*, 2003). Die Domänen D1, D2 und D3 assoziieren miteinander, bewirken die Oligomerisierung von Invasin auf der Zelloberfläche und führen zu verstärkter Invasivität von *Y. pseudotuberculosis* (Dersch & Isberg, 1999). Das Fehlen der Domäne D2 bei *Y. enterocolitica* wird als Grund für die geringere Invasivität im Mausmodell im Vergleich zu *Y. pseudotuberculosis* angenommen (Dersch & Isberg, 2000). *Y. pestis* besitzt kein funktionelles *inv* Gen, da es durch Insertion eines IS-Elements inaktiviert ist (Simonet *et al.*, 1996). Die maximale *in vitro*-Produktion von Inv wird bei Temperaturen von 26 °C erreicht, wohingegen *inv* bei 37 °C schwach exprimiert wird (Revell & Miller, 2000). Die Transkription von *inv* wird durch den Transkriptionsaktivator RovA reguliert. Das *rovA* Gen wird durch RovA autoreguliert und durch RovM inhibiert (Heroven *et al.*, 2004, Nagel *et al.*, 2001). Bei 37 °C wird die Expression von *inv* durch das DNS-bindende Protein H-NS unterdrückt, wobei dieses bei moderaten Temperaturen durch den Transkriptionsaktivator RovA verdrängt wird und somit die *inv* Transkription ermöglicht wird (Tran *et al.*, 2005).

Invasin vermittelt die Invasion und die Translokation über die M-Zellen im Bereich der follikel-assoziierten Epithelzellen der Peyer'schen Plaques (PP) (Marra & Isberg, 1997). Dies wird durch die direkte Interaktion von Inv mit  $\beta_1$ -Integrinen, die auf M-Zellen exponiert sind, gewährleistet und führt zur Kolonisierung der PP durch Yersinien (Schulte *et al.*, 2000b). Neben der Internalisierung durch Inv löst das Adhäsion auch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und

somit die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8 aus, das u.a. zur Rekrutierung von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) führt (Kampik *et al.*, 2000, Schulte & Autenrieth, 1998). Für die Induktion der Zytokinantwort ist die Adhäsion der Yersinien durch Inv bzw. von Invasin-gekoppelten Latex-Kügelchen an Wirtszellen ausreichend (Schulte *et al.*, 2000a). Des Weiteren ist Invasin verantwortlich für die Bindung an NK-Zellen und beteiligt an der Aufnahme der Bakterien durch Makrophagen (Wiedemann *et al.*, 2001, Koch *et al.*, 2013).

#### 1.2.4.4 Yersinia Adhäsine A (YadA)

Das *yadA* (frühere Bezeichnung *yopA/1*) Gen ist auf dem 70 kb großen Virulenzplasmid pYV kodiert und wird als funktionelles YadA Protein von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* produziert (Heesemann & Grüter, 1987, Bolin *et al.*, 1982). *Y. pestis* besitzt ein *yadA*-Pseudogen, das aufgrund einer Basendeletion inaktiv ist (Skurnik & Wolf-Watz, 1989). Jedoch konnten zwei in Struktur und Eigenschaften ähnliche Adhäsine (YadB und YadC) auf dem Chromosom von *Y. pestis* identifiziert und charakterisiert werden (Forman *et al.*, 2008). Die *yadA* Expression wird bei einer Temperatur von 37 °C induziert und durch den Transkriptionsfaktor VirF aktiviert (Skurnik & Toivanen, 1992, Zaleska *et al.*, 1985). Im Gegensatz zur Expression des *yop* Regulons ist die *yadA* Expression jedoch unabhängig von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Bolin *et al.*, 1982, Skurnik, 1985). Das YadA Protein hat ein Molekulargewicht von 41 – 45 kDa und bildet hitzestabile Aggregate mit einem Molekulargewicht von 160 – 240 kDa in SDS-Gelen aus, welche die Trimerisierung von YadA darstellen (Skurnik & Wolf-Watz, 1989, Mack *et al.*, 1991, Skurnik *et al.*, 1984, Roggenkamp *et al.*, 2003). Je höher die Polyacrylamidkonzentration des SDS-Gels, desto langsamer wandert das YadA-Trimer durch das Gel. Das detektierbare Molekulargewicht des YadA-Trimers ist somit abhängig von der Polyacrylamidkonzentration (Mack *et al.*, 1994).

Als trimerer Autotransporter (AT) wird YadA dem TypV<sub>c</sub>-Sekretionssystem (T5<sub>c</sub>SS) zugeordnet (Henderson *et al.*, 2004). Da es zu den ersten klonierten und charakterisierten trimeren ATs gehört, gilt es als Prototyp der AT-Gruppe. Durch ein N-terminales Signalpeptid wird die Sec-abhängige Translokation durch die innere Membran ermöglicht (Leo *et al.*, 2012). Trimere AT bestehen aus einer N-terminalen „passenger“ Domäne und einer C-terminalen Translokationsdomäne, welche durch 12 β-Faltblätter („β-barrel“) in der äußeren Membran verankert ist und die Translokationspore bildet (Linke *et al.*, 2006, Wollmann *et al.*, 2006, Oomen *et al.*, 2004, Grijpstra *et al.*, 2013). Während letztere unter

den Homologen Hia von *Haemophilus influenzae*, EibA von *Escherichia coli* und UspA1 von *Moraxella catarrhalis* AT sehr konserviert ist, stellt die „passenger“-Domäne mit ihren unterschiedlichen repetitiven Sequenzen eine sehr variable Region dar (Ackermann *et al.*, 2008, Roggenkamp *et al.*, 2003, Hoiczky *et al.*, 2000).

#### 1.2.4.4.1 Struktur

Abhängig von Spezies und Serotyp stellt das monomere YadA ein Protein von 41-44 kDa dar, dessen trimere Oligomerisierung auch in SDS-Polyacrylamidgelen aufgrund der Bildung von hitzestabilen Aggregaten mit einem Molekulargewicht von 140 – 250 kDa nachgewiesen werden kann (Skurnik & Wolf-Watz, 1989, Mack *et al.*, 1994, Zaleska *et al.*, 1985).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten erstmals die Bildung einer „lollipop“-ähnlichen Struktur mit einer Länge von 23 nm auf der Bakterienoberfläche (Hoiczky *et al.*, 2000) (Abb. 1.1, B). Diese besteht aus einer ~ 18 nm langen Stiel- und der ~ 5 nm langen Kopfreion, welche durch die Halsregion, auch Konnektor genannt, verbunden sind (Hoiczky *et al.*, 2000). Letztere ist aus drei haarnadelähnlichen Strukturen aufgebaut (Koretke *et al.*, 2006).

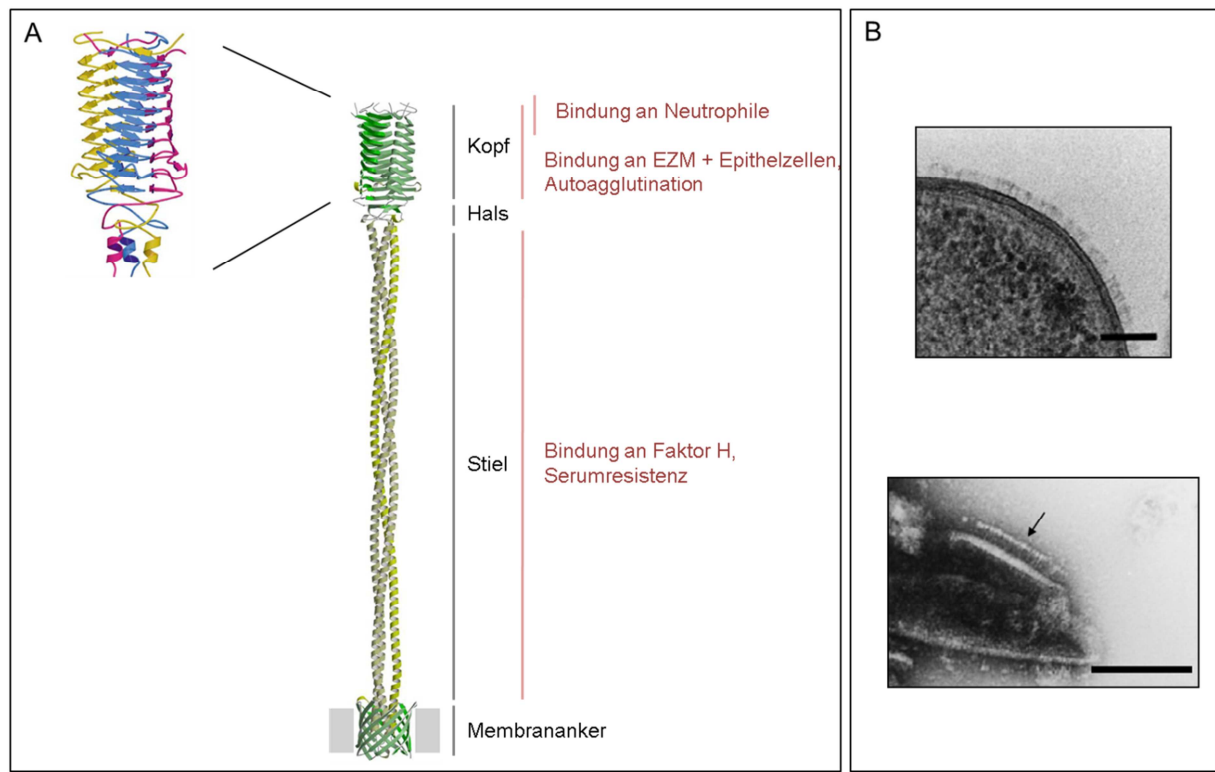
Die stark hydrophobe Kopfreion von *Y. enterocolitica* YadA unterteilt sich in 9 linkshändige parallele  $\beta$ -Faltblättern, wobei die Stielregion aus rechtshändigen „coiled-coils“ aufgebaut ist und sich aus zehn 15-fachen Wiederholungen zusammensetzt (Nummelin *et al.*, 2004, Hoiczky *et al.*, 2000). Der anschließende C-terminale hochkonservierte Membrananker umfasst vier transmembrane  $\beta$ -Stränge pro Monomer und bildet die Pore in der äußeren Membran, wodurch das YadA in der äußeren Membran verankert wird (Koretke *et al.*, 2006) (Abb. 1.1, A).

#### 1.2.4.4.2 Funktion

Verschiedene Domänen des YadA Proteins werden bestimmten Funktionen zugeordnet: Es besitzt die Fähigkeit zur Autoagglutination, vermittelt Serumresistenz und Adhärenz an eine Reihe von extrazellulären Matrixproteinen (ECM), sowie verschiedenste Zelltypen (Emödy *et al.*, 1989, Terti *et al.*, 1992, Balligand *et al.*, 1985, Schulze-Koops *et al.*, 1992, Mantle & Husar, 1994).

*YadA*-Deletionsmutanten sind im Ratteninfektionsmodell avirulent, weshalb YadA einen essentiellen Virulenzfaktor für *Y. enterocolitica* darstellt (Gaede & Heesemann, 1995). Der

genaue Bereich, der für die Autoagglutination verantwortlich ist, konnte noch nicht eindeutig identifiziert werden, wird aber der hydrophoben Region der Kopfdomäne von YadA zugeschrieben (Roggenkamp *et al.*, 2003).



**Abb. 1.1 Struktur und Funktion des Yersinia Adhäsin A (YadA).**

(A) Topologie-Modell von YadA mit der Kopf-, Hals-, Stielregion und dem Membrananker. Die Binderegionen für verschiedene Liganden sind zusätzlich dargestellt. Die Vergrößerung zeigt die trimere Kopfdomäne in Seitenansicht (Modifiziert nach Koretke *et al.*, 2006 und Nummelin *et al.*, 2004). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Y. enterocolitica* zeigen YadA als „lollipop“-ähnliche Struktur auf der Oberfläche. (Hoiczky *et al.*, 2000).

Einzelne YadA-Kopfdomänen interagieren in einem anti-parallelen Zipper-ähnlichen Mechanismus miteinander, das zur Flockenbildung der Bakterien führt (Hoiczky *et al.*, 2000). Als extrazelluläres Bakterium besitzt *Y. enterocolitica* eine besondere Fähigkeit, die bakteriziden Effekte des Komplementsystems zu tolerieren: Zum einen bindet YadA den Serumfaktor H, welcher den alternativen Signalweg des Komplementsystems reguliert und zur Spaltung von C3b in die inaktive Form iC3b führt (Biedzka-Sarek *et al.*, 2008a). Für die Interaktion mit Faktor H ist die Stielregion von YadA essentiell, wobei diese sequenzunabhängig und eher von Konformation und strukturellen Motiven abhängig ist (Biedzka-Sarek *et al.*, 2008b). Zusätzlich bindet YadA das C4-bindende (C4b) Protein, das einen negativen Regulator des klassischen Signalwegs des Komplementsystems darstellt

(Kirjavainen *et al.*, 2008). Durch die Interaktion mit diesen Serumkomponenten und fehlender Komplement-vermittelten Opsonierung der Phagozytose ist *Y. enterocolitica* weniger zugänglich (Mikula *et al.*, 2012). Des Weiteren vermittelt YadA Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden von Granulozyten (Visser *et al.*, 1996).

Die pathogenetische Bedeutung der YadA-Bindung von ECM-Proteinen, wie Kollagen, Fibronectin und Laminin ist bisher unklar (Tahir *et al.*, 2000, Flügel *et al.*, 1994, Schulze-Koops *et al.*, 1993). YadA von *Y. enterocolitica* bindet diverse fibrilläre Kollagene (Typ I, II, III, V, XI) sowie quervernetztes Kollagen Typ IV (Emödy *et al.*, 1989, Schulze-Koops *et al.*, 1992, Flügel *et al.*, 1994). Verantwortlich für diese Interaktion ist die Kopfdomäne von YadA: Sowohl eine Deletion von 22 Aminosäuren der hydrophoben Kopfregion (YadA $_{\Delta 80-101}$ ) als auch ein Aminosäureaustausch von Histidin 156 und 159 durch Tyrosin (YadA $_{HY}$ ), führt zu einem Verlust der Kollagenbindungseigenschaft (Tamm *et al.*, 1993, Schulze-Koops *et al.*, 1995, Roggenkamp *et al.*, 1995). Des Weiteren scheint auch das Motiv NSVAIG-S, welches achtmal innerhalb der N-terminalen Region vorhanden ist, essentiell für die Bindung an Kollagen Typ I und IV zu sein (Tahir *et al.*, 2000). Die YadA-Kollagen Interaktion ist hochaffin und besonders stabil, da es extreme pH-Werte (5 – 10) und Temperaturen von 80 °C standhält. Zudem ist es gegenüber proteolytischen Enzymen wie Proteinase K, Papain und Trypsin resistent (Emödy *et al.*, 1989). Die Identifizierung der für die Bindung essentiellen Struktur bzw. Sequenzbereichs des Kollagens wird kontrovers diskutiert: Schulze-Koops *et al.* konnten eine hoch homologe Binderegion von 134 AS der  $\alpha_1$ -Kette (AS 642 – 775) des Kollagens Typ I für die Bindung an YadA identifizieren, das erstmals eine Bindestelle für bakterielle Proteine an Kollagen ohne repetitives Sequenzmotiv GXY darstellt (Schulze-Koops *et al.*, 1995). Neuere Studien zeigen jedoch, dass die YadA-Kollagen Interaktion unabhängig von einer spezifischen Sequenz des Kollagens ist und die Bindung eher von der tripel-helikalen Struktur des Kollagens abhängig ist (Leo *et al.*, 2008). Durch Einsatz von kollagen-ähnlichen tripel-helikalen Peptiden, welche repetitive Aminosäuremotive aus Glycin (G), Prolin (P) und 4-Hydroxyprolin (O) tragen, konnte eine Bindung von YadA an diese Peptide nur in Anwesenheit der in Kollagen reichlich präsenten Aminosäure 4-Hydroxyprolin nachgewiesen werden (Leo *et al.*, 2008, Koide, 2005). Ein einziges GPO-Triplet innerhalb einer repetitiven GPP-Sequenz ist ausreichend, um die Bindung an YadA zu gewährleisten, wobei mehr als sechs Triplets (GPO) $_6$  und die Ausbildung einer tripel-helikalen Struktur notwendig sind, um eine starke Bindung zu garantieren (Leo *et al.*, 2010). Die Affinität von YadA für das zehnfach repetitive Triplet (POG) $_{10}$  ist ähnlich hoch wie für Kollagen Typ I

(Leo *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde die Bindung von rekombinantem YadA an immobilisiertes Kollagen Typ I und IV durch (POG)<sub>10</sub> blockiert, weshalb derselbe Mechanismus für Bindung an fibrilläres - und quervernetztes Kollagen angenommen wird (Leo *et al.*, 2010). Auch die Interaktion von ausgewählten tripel-helikalen Peptiden mit Blutplättchen konnte durch rekombinantes YadA inhibiert werden (Leo *et al.*, 2010). Die Kollagenbindungseigenschaft von YadA ist überdies ein wesentlicher Virulenzfaktor von *Y. enterocolitica*, da eine Kollagenbindungsmutante YadA<sub>HY</sub> in ihrer Kolonisierung von mesenterialen Lymphknoten und Milz im Mausmodell stark beeinträchtigt ist (Roggenkamp *et al.*, 1995).

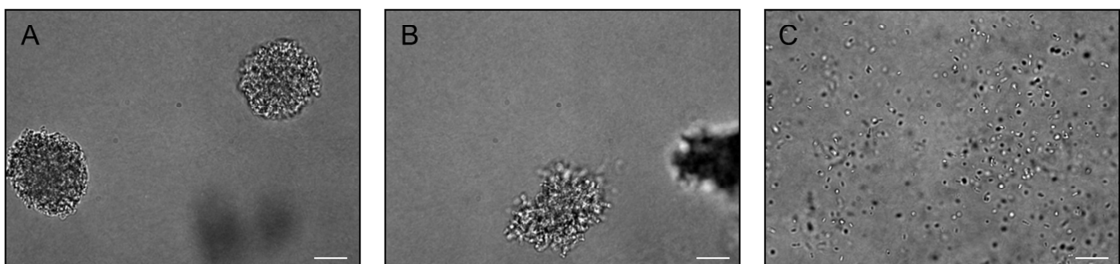
Das Elastase verdaute Laminin-Fragment E1 konnte als Interaktionspartner für YadA identifiziert werden (Flügel *et al.*, 1994). Unabhängig des RGDS-Motivs, welche als klassische Integrin-Bindestelle für Fibronectin gilt, bindet hingegen nur zelluläres und nicht Plasma-Fibronectin spezifisch an YadA von *Y. enterocolitica* (Schulze-Koops *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu YadA von *Y. enterocolitica* interagiert das YadA von *Y. pseudotuberculosis* aufgrund von 31 zusätzlichen Aminosäuren innerhalb der Kopfregion bevorzugter mit Fibronectin als mit Kollagen oder Laminin (Heise & Dersch, 2006). Die YadA-Fibronectin Bindung von *Y. pseudotuberculosis* ist ebenfalls essentiell für die  $\beta_1$ -Integrin vermittelte Assoziation mit Epithelzellen, wobei die Bindung an  $\beta_1$ -Integrin von HeLa-Zellen indirekt durch YadA über Fibronectin als Brückenprotein gewährleistet wird (Heise & Dersch, 2006). Neben der Fähigkeit mit ECM-Proteinen zu assoziieren, ist die Kopfdomäne ebenfalls für die Anheftung an verschiedene Epithelzelllinien, wie HeLa und Hep-2, notwendig (Heesemann & Grüter, 1987). Für die Bindung an polymorphkernige Leukozyten (PMNs) und die daraus resultierende Induktion des oxidativen „Burst“ ist die Region AS 29 – 81 der Kopfdomäne von YadA verantwortlich. Weiterhin scheint dieser Bereich für die effiziente Infektion der Maus essentiell zu sein (Roggenkamp *et al.*, 1996, Ruckdeschel *et al.*, 1996). YadA-Deletionsmutanten zeigen auch verminderte Adhärenz an Makrophagen und sind weniger vor deren Phagozytosemechanismus geschützt (Grosdent *et al.*, 2002).

YadA wird auch als „docking“-Protein diskutiert: Durch die YadA-vermittelte Bindung an Neutrophile, kommt das Injektisom des T3SS in Kontakt mit der Wirtszelle und ermöglicht es dem Bakterium die Yop-Effektoren in die Zelle zu übertragen (Visser *et al.*, 1995, Mota *et al.*, 2005).

### 1.3 Das Wachstumsverhalten von *Y. enterocolitica* im 3D-Kollagengel

Um die Interaktion von Infektionserregern mit Wirtszellen *in vitro* zu untersuchen, werden üblicherweise zweidimensionale Zellkultur-, „Monolayer“ verwendet. Dieses Infektionsmodell jedoch berücksichtigt keine dynamischen Vorgänge wie Zellmigration und chemotaktische Prozesse, wie sie in infiziertem Gewebe passieren (Gunzer *et al.*, 2000). Das dreidimensionale Kollagengel (3D-KoG) stellt ein *in vitro*-Modell dar, um Zellmigration, Zell-Zell-Interaktion oder Zellmatrixinteraktion zu untersuchen und somit *in vivo*-Vorgänge zu simulieren (Sixt & Lämmermann, 2011). Erste Studien mit *Y. enterocolitica* als Prototyp eines extrazellulären Erregers, in einem 3D-KoG zeigten ein ungewöhnliches Wachstumsverhalten: Yersinien wachsen in dicht gepackten Mikrokolonien (DPM), wobei dieses Verhalten sowohl abhängig von dem Virulenzplasmid pYV als auch von YadA ist (Abb. 1.2, A). Der plasmidlose Stamm WAc<sup>RS</sup> hingegen wächst im 3D-KoG planktonisch (PLT), eine *yadA*-Deletionsmutante in locker gepackten Mikrokolonien (LPM) (Abb. 1.2, B und C) (Freund *et al.*, 2008). Die Dichte der Mikrokoloniebildung im KoG ist dabei unabhängig von der Eigenschaft der Yersinien, Kollagen zu binden, da eine Kollagenbindungsmutante (YadA<sub>HY</sub>) ebenfalls DPM Mikrokolonien bildet (Freund *et al.*, 2008).

Stamm	WA(pYV)	WA(pΔYadA)	WAc <sup>RS</sup>
Phänotyp	T3SS + YadA + Yop +	T3SS + Yop +	



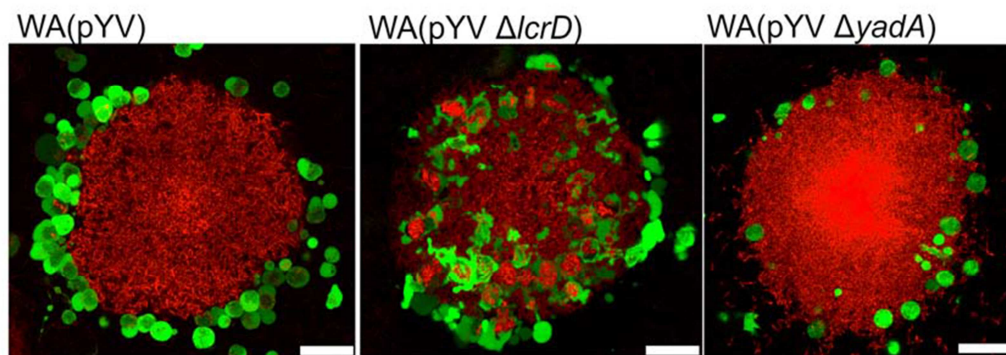
**Abb. 1.2 Wachstumsverhalten von *Y. enterocolitica* im 3D-KoG.**

WA(pYV) (A) wächst in DPM und WA(pYVΔYadA) (B) in LPM. WAc<sup>RS</sup> (C) zeigt planktonisches (PLT) Wachstumsverhalten. Der Größenbalken entspricht 20 μm.

Zudem ähnelt das im 3D-KoG beobachtete Wachstumsverhalten der Yersinien dem in infiziertem Gewebe der Maus. Nach oraler Infektion der Maus mit Yersinien können diese in

den Peyer'schen Plaques, Milz und Leber als Mikrokolonien nachgewiesen werden (Öllerich *et al.*, 2007).

Erste Untersuchungen der Interaktion von Yersinien mit Phagozyten im 3D-KoG zeigten einen T3SS-abhängigen Schutzmechanismus gegen Phagozytose und der Invasion durch polymorphkernige Neutrophile (PMN) in die Mikrokolonie (Abb. 1.3). Die Mikrokolonien eines YadA-positiven T3SS-defizienten Stamms WA(pYV $\Delta$ lcrD) waren dagegen durch PMNs nicht geschützt. Durch die LPM von WA(pYV $\Delta$ YadA) können einige Phagozyten in die Mikrokolonie einwandern, die Yersinien sind jedoch ebenfalls wie der Wildtyp WA(pYV) durch Injektion der Effektor-Yops in die PMNs gegenüber Phagozytose resistent (Guggenberger, 2011).



**Abb. 1.3 T3SS-abhängiger Schutzmechanismus von *Y. enterocolitica* Mikrokolonien vor Phagozytose durch Neutrophile im 3D-KoG.**

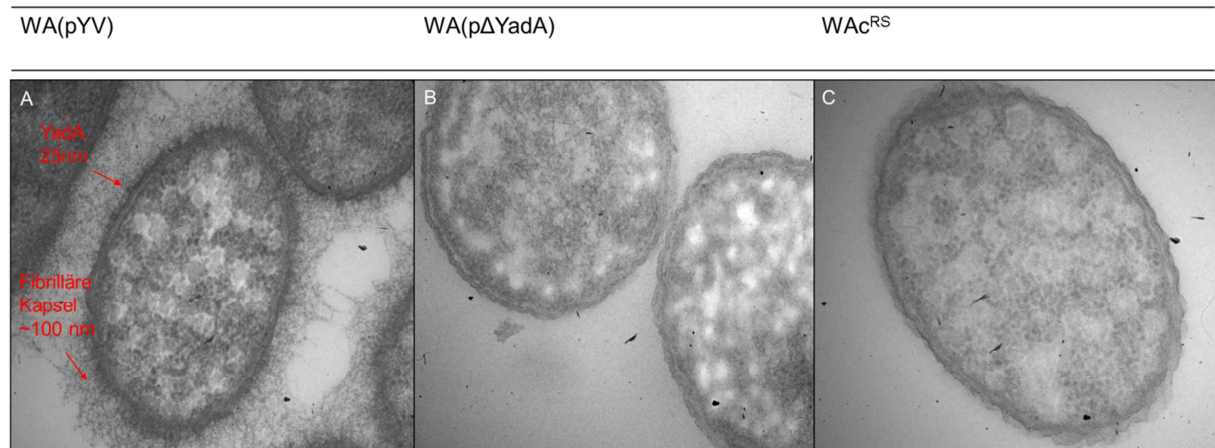
Neutrophile (grün) werden am Eindringen in die WA(pYV)-Mikrokolonie (rot) gehindert. Die DPM des T3SS-negativen Stamms WA(pYV $\Delta$ lcrD) hingegen wird durch einwandernde Neutrophile invadiert und die Yersinien werden phagozytiert. Die LPM der YadA-Deletionsmutante ist ebenfalls vor Phagozytose und Invasion durch einwandernde Neutrophilen geschützt. Der Größenbalken entspricht 20  $\mu$ m. (Guggenberger, 2011).

Eine Analyse der Ultrastruktur mittels Elektronenmikroskopie der DPM von WA(pYV) im 3D-KoG zeigte eine fibrilläre Kapsel (FK) auf der Bakterienoberfläche (Freund *et al.*, 2008) (Abb. 1.4, A). Die Bildung dieser ca. 100 nm-langen Fibrillen konnte bei plasmidlosen WAc<sup>RS</sup>- und YadA-negativen Stämmen dagegen nicht nachgewiesen werden (Abb. 1.4, B und C). Die Struktur und die Rolle dieser fibrillären Kapsel in der Pathogenität von Yersinien konnte bisher nicht geklärt werden.

Die Beteiligung von fimbriellen Proteinen, wie das MyfA-Protein, an der Kapselbildung konnte bereits durch elektronenmikroskopische Analysen einer *myfA*-Deletionsmutante ausgeschlossen werden (Freund *et al.*, 2008). Nicht nur Fibrillen, sondern auch Polysaccharide können an der bakteriellen Kapselbildung beteiligt sein. Das Operon



*hmsHFRS* („hemin storage system“) von *Y. pestis* kodiert für die Synthese von poly- $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosamin (PNAG) und stellt eine Komponente für die Biofilmbildung dar (Perry *et al.*, 1990, Bobrov *et al.*, 2008). Dieses Exopolysaccharid wird auch von *Staphylococcus epidermidis* (PIA) und *E. coli* (PGA) produziert (Itoh *et al.*, 2008).



**Abb. 1.4 Ausbildung einer 100 nm-dicken fibrillären Kapsel von WA(pYV).**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Y. enterocolitica* im 3D-KoG: WA(pYV) ist mit einer fibrillären Kapsel umhüllt (A), welche bei pYV-negativen WAc<sup>RS</sup>- (C) und YadA-negativen Stämmen (B) fehlt. Deutlich ist auch die Struktur des YadA auf der Oberfläche von WA(pYV) zu erkennen (modifiziert nach Freund *et al.*, 2008).

Das Außenmembranprotein HmsH hat hierbei die Funktion als Porin, durch welches PNAG auf die Bakterienoberfläche transportiert wird (Pendrak & Perry, 1993, Lillard *et al.*, 1997). Das Operon *bcsABCD* („bacterial cellulose synthesis“) von *E. coli* kodiert für die Biosynthese von  $\beta$ -1,4-Cellulose und ist ebenso an der Biofilmbildung beteiligt (Ross *et al.*, 1991, Zogaj *et al.*, 2001). Das Protein BcsA stellt hierbei die Cellulose-Synthase dar und ist essentiell für die Produktion von Cellulose (Zogaj *et al.*, 2001). Desweiteren ist die Cellulose-Produktion von *E. coli* Nissle essentiell für die Adhäsion an gastrointestinale Epithelzellen und an das Epithelium der Maus (Monteiro *et al.*, 2009).

## 1.4 Kollagen – Struktur und Funktion

Kollagen umfasst ein Drittel der gesamten Proteine des Menschen und ist der häufigste Bestandteil der extrazellulären Matrix (Shoulders & Raines, 2009). Aufgrund seiner Struktur und Organisation werden diese in folgende Gruppen eingeteilt: Fibrilläre (Faser-bildende) und Netzwerk-bildende Kollagene, sowie auch FACIT („fiber-associated collagens with

interrupted triple-helices“), MACIT („membrane-associated collagens with interrupted triple-helices“) und MULTIPLEXIN („multiple triple-helix domains and interruptions“) (Kadler *et al.*, 2007) (Tab. 1.1). Zur Gruppe der MACIT gehören ebenfalls kollagenähnliche Membranproteine wie die „scavenger“ Rezeptoren (Myllyharju & Kivirikko, 2001, Ricard-Blum & Ruggiero, 2005). Es wurden bereits 28 verschiedene Kollagentypen identifiziert, welche aus verschiedenen Kombinationen von mindestens 46 individuellen Polypeptid-Ketten, den  $\alpha$ -Ketten, aufgebaut sind (Brinckmann, 2005).

Kollagentyp	Klassifizierung	Vorkommen
<b>I</b>	Fibrillär	Haut, Knochen, Sehne, Cornea
<b>II</b>	Fibrillär	Knorpel, Glaskörper
<b>III</b>	Fibrillär	Haut, Blutgefäße, Darm
<b>IV</b>	Netzwerk	Basalmembran
<b>V</b>	Fibrillär	Knochen, Dermis, Cornea, Placenta
<b>VI</b>	Netzwerk/ Microfibrilläre Filamente	Knochen, Knorpel, Cornea, Dermis
<b>VII</b>	verankert fibrillär	Dermis, Blase
<b>VIII</b>	Netzwerk	Dermis, Gehirn, Herz, Niere
<b>IX</b>	FACIT	Knorpel, Cornea, Glaskörper
<b>X</b>	Netzwerk	Knorpel
<b>XI</b>	Fibrillär	Knorpel
<b>XII</b>	FACIT	Dermis, Sehne
<b>XIII</b>	MACIT	Endothelzelle, Dermis, Auge, Herz
<b>XIV</b>	FACIT	Knochen, Dermis, Knorpel
<b>XV</b>	MULTIPLEXIN	Kapillaren, Hoden, Niere, Herz
<b>XVI</b>	FACIT	Dermis, Niere
<b>XVII</b>	MACIT	Epithelium
<b>XVIII</b>	MULTIPLEXIN	Basalmembran, Leber
<b>XIX</b>	FACIT	Basalmembran
<b>XX</b>	FACIT	Cornea
<b>XXI</b>	FACIT	Magen, Niere
<b>XXII</b>	FACIT	Verbindungen (junction) von Gewebe
<b>XXIII</b>	MACIT	Herz, Retina
<b>XXIV</b>	Fibrillär	Knochen, Cornea
<b>XXV</b>	MACIT	Gehirn, Herz, Hoden
<b>XXVI</b>	FACIT	Hoden, Ovar
<b>XXVII</b>	Fibrillär	Knorpel
<b>XXVIII</b>	Microfibrilläre Filamente	Dermis, Ischiasnerv
<b>„Scavenger“ Rezeptor</b>	Protein mit kollagen-ähnlicher Struktur	Makrophagen

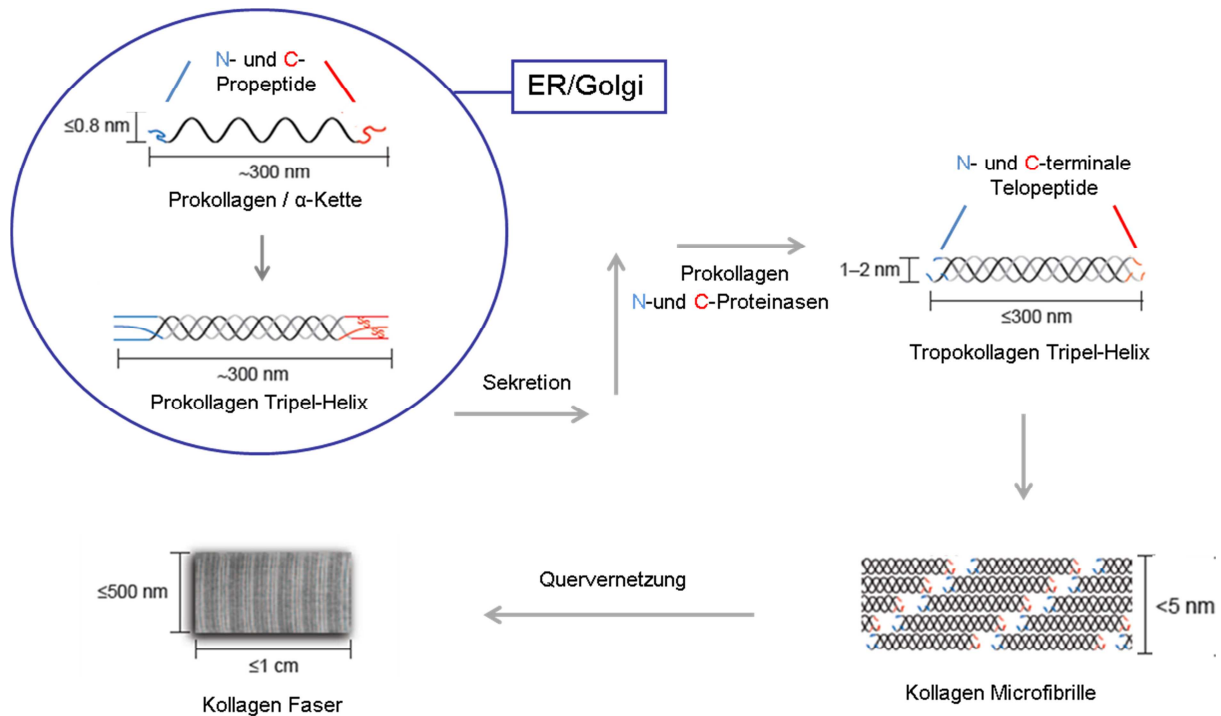
**Tab. 1.1 Verschiedene Kollagentypen, deren Klassifizierung und Vorkommen.**

Modifiziert nach Shoulders & Raines, 2009 und Kadler *et al.*, 2007.

Kollagene können entweder hetero- oder homotrimer sein: Heterotrimere Kollagene, wie Typ I, bestehen aus zwei identischen  $\alpha_1$ - und einer  $\alpha_2$ -Kette [ $\alpha_1(\text{I})_2\alpha_2(\text{I})$ ]. Kollagen Typ II dagegen ist aus drei identischen  $\alpha_1$ -Ketten [ $\alpha_1(\text{II})_3$ ] aufgebaut und stellt ein Beispiel für ein Homotrimer dar (Ricard-Blum & Ruggiero, 2005). Die Struktur ist durch drei parallele Polypeptidstränge charakterisiert, welche sich in einer linkshändigen PPII (polyprolin II-Typ)-helikalen Konformation umeinander winden und eine rechtshändige Tripel-Helix bilden (Bella *et al.*, 1994). Ein wichtiges Merkmal aller Kollagentypen ist die sich an jeder dritten Stelle wiederholende Aminosäure Glycin (G), mit dem repetitiven Sequenztriplet XYG, wobei die Position X meistens die Aminosäure Prolin (P) und die Position Y Hydroxyprolin (O) darstellt (Ramshaw *et al.*, 1998). Fibrilläre Kollagene werden als N- und C-Propeptid flankierende Prokollagene synthetisiert, welche eine Tripel-Helix ausbilden (Myllyharju & Kivirikko, 2004, Kadler, 1995) (Abb. 1.5). Nach der Sekretion werden die N- und C-terminalen Propeptide durch spezifische Proteinasen abgespalten, das zur Freilegung der nicht-tripel-helikalen Telopeptide führt, welche wichtig für die Ausbildung der sogenannten Microfibrille sind (Prockop & Fertala, 1998). Durch weitere Quervernetzung kommt es letztendlich zur Formierung der funktionellen Kollagenfaser (Myllyharju & Kivirikko, 2001). Diese intermolekulare Vernetzung ist dabei Voraussetzung für die mechanischen Eigenschaften von Kollagen (Gelse *et al.*, 2003).

Kollagen trägt aber nicht nur zur mechanischen Festigkeit von Gewebe bei, es ist zudem als Matrix an Zelladhäsion und -migration während des Wachstums und Differenzierung des Gewebes sowie der Wundheilung, beteiligt (Leitinger & Hohenester, 2007). Dabei vermitteln spezifische Zellrezeptoren, wie  $\beta_1$ -Integrine, Discoidin-Domänen-Rezeptoren (DDR) oder Glycoprotein VI (GPVI), die Interaktion mit Kollagen (Hynes, 2002, Vogel *et al.*, 2000, Kahn, 2004). Die Integrine  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$  und  $\alpha_{11}\beta_1$  spielen hierbei eine zentrale Rolle in der Zelladhäsion an extrazelluläre Matrix (Tulla *et al.*, 2001, Tiger *et al.*, 2001). Als spezifische Integrinbindungsstelle wurde bereits das Aminosäuresequenzmotiv GFOGER innerhalb der tripelhelikalen Region des Typ I Kollagens identifiziert (Knight *et al.*, 1998, Knight *et al.*, 2000, Takagi *et al.*, 2002).

Die DDRs fungieren unabhängig von Integrinen als Kollagenrezeptoren, welche meist auf Epithelzellen und Leukozyten (DDR1) sowie Mesenchymzellen (DDR2) vorhanden sind. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass DDR2 und nicht wie primär angenommen Integrine, essentiell für Adhäsion und Migration von Neutrophilen im 3D-KoG ist (Afonso *et al.*, 2013).



**Abb. 1.5 Biosynthese von fibrillärem Kollagen.**

Nach Synthese der Prokollagen/ $\alpha$ -Ketten und Ausbildung einer Tripel-Helix von drei  $\alpha$ -Ketten werden diese sezerniert. Durch N- und C-Proteinasen werden die N- und C-Propeptide des Prokollagen abgespalten und die N- und C-terminalen Telo-peptide freigesetzt als Bausteine für die Ausbildung der Kollagen Microfibrille. Die Kollagenfaser entsteht durch weitere Quervernetzung einzelner Microfibrillen. Modifiziert nach Shoulders & Raines, 2009.

Des Weiteren regulieren DDRs von Neutrophilen die Remodellierung der extrazellulären Matrix durch Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), welche die Kollagenmatrix auflösen. Dabei entstehen Kollagenbruchstücke mit chemotaktischer Wirkung auf Neutrophile (Vogel *et al.*, 2006, Yoshimura *et al.*, 2005). GP(VI) ist ein Kollagenrezeptor auf Thrombozyten, welcher bedeutend für den Wundverschluss von verletzten Gefäßen ist (Farndale *et al.*, 2004, Kahn, 2004). Der Kontakt zwischen Thrombozyten und Kollagen wird dabei durch den von Endothelzellen freigesetzten von Willebrand Faktor initiiert (Leitinger & Hohenester, 2007). Eine stabile Bindung der Thrombozyten an Kollagen jedoch wird nur durch GP(VI) und zusätzlich  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin ermöglicht (Siljander *et al.*, 2004, Sarratt *et al.*, 2005). LAIR-1 („leukocyte-associated IG-like receptor-1“) ist ein Kollagenrezeptor, welcher größtenteils von peripheren mononukleären Zellen produziert wird (Meyaard *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass die LAIR-1 vermittelte Kollagenbindung von aktivierten Immunzellen zur Inaktivierung der

Zellen führt (Meygaard, 2010). Wie GP(VI) erkennt auch LAIR-1 die repetitive und konservierte GPO-Sequenz des Kollagens (Lebbink *et al.*, 2006).

## 1.5 Die Erkennung und Eliminierung von bakteriellen Erregern durch Phagozyten

Infektionen durch bakterielle Erreger werden durch das Immunsystem erkannt, das mittels des angeborenen Immunsystems durch Phagozyten (PMNs, Makrophagen, dendritische Zellen) mit einer schnellen Erregerabwehr reagiert. Phagozytische Zellen spielen eine zentrale Rolle in der ersten akuten Phase der Infektion, indem diese eindringende Erreger phagozytieren und zerstören können (Langereis, 2013). Zu diesen spezialisierten Zellen gehören die Granulozyten (neutrophile, eosinophile und basophile). Granulozyten gehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen hervor. Diese zirkulieren im Blut bis sie an den Infektionsherd rekrutiert werden, wobei PMNs im Vergleich zu Makrophagen kurzlebig sind (Boxer *et al.*, 1985, Murphy, 2012).

Die Erkennung von bakteriellen Erregern geschieht u.a. durch Toll-like Rezeptoren (TLR), welche auch von PMNs exprimiert werden, und Strukturen wie LPS oder Peptidoglycan von Bakterien erkennen (Janeway & Medzhitov, 2002, Takeda *et al.*, 2003).

Für die Internalisierung von Mikroorganismen durch Phagozytose können  $F_c\gamma$ -Rezeptoren oder Komplement-Rezeptoren (CR1, CR3 und CR4) verantwortlich sein (Greenberg, 1999). Erstere initiieren die Bindung an durch Antikörper opsonisierte Erreger, wohingegen Komplementrezeptoren die durch Komplementproteine opsonierten Mikroorganismen erkennen (Ghiran *et al.*, 2000, Daeron, 1997). Die Komplementrezeptoren CR3 und CR4 gehören auch zu den  $\beta_2$ -Integrinen ( $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_X\beta_2$ ) (Ross *et al.*, 1992). Zudem sind „scavenger“ Rezeptoren A (SR-A) wie MARCO („macrophage receptor with collagenous structure“) an der Bindung von LPS sowie Lipoteichonsäure und anschließende Phagozytose der Bakterien beteiligt (Hughes *et al.*, 1995, Dunne *et al.*, 1994). SR-A besitzen ein transmembranes Homotrimer und eine extrazelluläre Domäne, welche aus einer kollagen-ähnlichen Tripel-Helix besteht (Elomaa *et al.*, 1998). Als bakterielle Bindedomäne konnte die C-terminale Cystein-reiche Domäne identifiziert werden (van der Laan *et al.*, 1999, Brannstrom *et al.*, 2002). Heterotrimere G-Protein gekoppelte Rezeptoren erkennen chemotaktisch wirkende Wirtspeptide wie C5a und mikrobielle Peptide wie fMLP, deren Stimulierung zur Anlockung weiterer Phagozyten führt (Kolaczowska & Kubes, 2013). Eine Bindung an den Rezeptor

vermittelt eine Konformationsänderung und Dissoziation in die Untereinheiten G $\alpha$ i und G $\beta$  $\gamma$ , das wiederum indirekt Rac und Rho-GTPasen bzw. Cdc42 aktiviert und letztendlich Chemotaxis und respiratorischen Burst stimuliert (Bar-Sagi & Hall, 2000, Murphy, 2012).

Die Erreger werden von der Plasmamembran der Phagozyten umschlossen und in ein Phagosom internalisiert, welches mittels Fusion mit Lysosomen (Phagolysosom) zum Abtöten der meisten Erreger führt (Klebanoff *et al.*, 2013). Des Weiteren beinhalten Neutrophile eine Reihe von Granula, welche mit dem Phagosom fusionieren: Tertiäre Granula enthalten einen hohen Anteil an Gelatinase, sekundäre (spezifische) Granula, welche die Matrix-Metalloproteasen MMP8, MMP9 und MMP25 produzieren, und primäre (Myeloperoxidase) oder azurophile Granula (Jog *et al.*, 2007, Borregaard, 2010). Die aufgenommenen Bakterien können anschließend durch antimikrobielle Proteine, u.a. Defensin, Cathepsin G, Laktoferrin, Elastase oder Myeloperoxidase (MPO), die Produktion von Stickstoff (NOS) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zerstört werden (Nathan, 2006, Janeway & Medzhitov, 2002). Letzteres wird durch die NADPH-Oxidase gewährleistet, welche Sauerstoff zu dem hochreaktiven Superoxidanion (O $_2^-$ ) reduziert (Chiba *et al.*, 1990). Weitere ROS sind u.a. H $_2$ O $_2$ , das durch Dismutation von Superoxid entsteht, und HOCl, das aus Oxidation von Chlorid durch die MPO der tertiären Granula gebildet wird (Gardiner *et al.*, 2013, Dupre-Crochet *et al.*, 2013).

Durch Erregerkontakt kommt es zur Aktivierung der Neutrophilen und Degranulierung, wobei die MMP8 (Kollagenase), MMP9 (Gelatinase) und MMP25 (Leukolysin) Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen (Kang *et al.*, 2001, Greenlee *et al.*, 2007). Durch den Verdau von Kollagen entstehen PGP Peptid-Fragmente, deren Bedeutung als Chemokin für Neutrophile *in vivo* und *in vitro* belegt werden konnte (Gaggar *et al.*, 2010, O'Reilly *et al.*, 2009). Durch LPS wird die Produktion von PGP induziert, das durch die Interaktion mit CXC Rezeptoren zur Rekrutierung von weiteren Neutrophilen zum Infektionsherd führt und somit die Entzündungsreaktion verstärkt (Weathington *et al.*, 2006, Gaggar *et al.*, 2008). Ein neu-entdeckter Mechanismus, wie Mikroorganismen von Neutrophilen bekämpft werden können, ist die Ausbildung von NETs („neutrophil extracellular traps“) (Underhill & Ozinsky, 2002, Remijnsen *et al.*, 2011). Hierbei werden Mikroorganismen durch die Bildung von Netz-ähnlichen Strukturen umschlossen und abgetötet. Diese bestehen aus Histonen, DNS-Fäden und Granula-Proteine, die von Neutrophilen freigesetzt werden (Brinkmann & Zychlinsky, 2007, Yipp & Kubes, 2013).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Das 3D-Kollagengel (KoG) eignet sich besonders, um Zell-Zell-Interaktionen, Zellmigration und -interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen (ECM) und Infektionserregern zu untersuchen, womit auch dynamische Vorgänge, wie sie in infiziertem Gewebe vorliegen, berücksichtigt werden können (Gunzer *et al.*, 2000, Sixt & Lämmermann, 2011). Erste Studien mit *Y. enterocolitica* im 3D-KoG zeigten ein ungewöhnliches Wachstumsverhalten: Stämme, welche das Virulenzplasmid pYV besitzen, bilden dicht gepackte Mikrokolonien (DPM), die den Yersinien in Abzessen von infizierten Mausorganen wie Milz und Leber stark ähneln (Freund *et al.*, 2008, Öllerich *et al.*, 2007). pYV-negative WAc-Stämme hingegen wachsen weitgehend planktonisch bzw. dispers im 3D-KoG. Ein weiterer Phänotyp konnte von YadA-Deletionsmutanten bestimmt werden, welche im 3D-KoG in locker gepackten Mikrokolonien (LPM) wachsen. Zudem ist das DPM-Wachstum unabhängig von der Kollagenbindungseigenschaft des YadA-Proteins, da kollagenbindungsmutierte WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>) im 3D-KoG ebenfalls DPM bilden (Freund *et al.*, 2008). Zunächst sollte ein weiterer Faktor identifiziert werden, welcher für das LPM-Wachstum verantwortlich ist. Desweiteren sollte herausgefunden werden, ob die fibrilläre Kapsel (FK) von Yersinien gebildet wird: Hierzu sollten Gene, welche für die Synthese von Polysacchariden oder fimbriellen Proteine kodieren, deletiert werden. Ebenso sollte untersucht werden, ob Kollagenbausteine an der Bildung der fibrillären Kapsel beteiligt sind.

Um die YadA-Kollagenbindung näher zu charakterisieren, wurden fluoreszenz-mikroskopische und biochemische Analysen angewandt. Zudem sollte eine neue Methode entwickelt werden, um Bindungsanalysen mit löslichem Kollagen zu untersuchen.

Die funktionelle Bedeutung der Kollagenbindung für die Interaktion mit Immunzellen ist noch nicht bekannt und sollte daher näher geprüft werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

#### 2.1.1 *Yersinia enterocolitica* Stämme

Stamm	Eigenschaft	Referenz
<i>Yersinia enterocolitica</i>		
WA(pYV)	Klinisches Isolat WA-314, Serotyp O:8, mit Virulenzplasmid pYV	(Heesemann <i>et al.</i> , 1983)
WA-c <sup>RS</sup>	Plasmidloses und restriktions/modifikationsnegatives Derivat von WA(pYV)	(Heesemann & Laufs, 1983, Antonenko <i>et al.</i> , 2003)
WA $\Delta$ inv	<i>inv</i> -negative Mutante von WA-c <sup>RS</sup> , Kn <sup>R</sup> (alleler Austausch)	Diese Arbeit
WA(pYV $\Delta$ YadA)	<i>yadA</i> -negative Mutante von WA(pYV); Kn-Kassette inseriert in die <i>PstI</i> Schnittstelle des <i>yadA</i> ; WA(pYVO8-A0), Kn <sup>R</sup> , (alleler Austausch)	(Roggenkamp <i>et al.</i> , 1995)
WA(pYV::YadA <sub>HY</sub> )	Kollagenbindungsmutante von WA(pYV); Austausch der Histidinreste (H) 156 und 159 durch Tyrosin (Y) von <i>YadA</i> ; WA(pYVO8-A-2), Kn <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	(Roggenkamp <i>et al.</i> , 1995)
WA(pYV::YadA <sub>ΔN</sub> )	WA(pYV) mit Deletion der Aminosäuren 29-81 von <i>YadA</i> ; N-Terminus des reifen sezernierten <i>YadA</i> ; WA(pYVO8-A <sub>Δ29-81</sub> ), Kn <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	(Roggenkamp <i>et al.</i> , 1996)
WA $\Delta$ <i>hmsH</i> (pYV)	<i>hmsH</i> -negative Mutante von WA(pYV), Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WA $\Delta$ <i>bcsA</i> (pYV)	<i>bcsA</i> -negative Mutante von WA(pYV), Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WA(pYV, pRFP)	WA(pYV) mit pLACRFP, Cm <sup>R</sup> ; RFP: red fluorescent protein	(Öllerich <i>et al.</i> , 2007)
WA(pYV $\Delta$ YadA, pRFP)	WA(pYV $\Delta$ YadA) mit pLACRFP, Cm <sup>R</sup> , Kn <sup>R</sup> ; RFP: red fluorescent protein	(Öllerich <i>et al.</i> , 2007)
WA(pYV::YadA <sub>HY</sub> , pRFP)	WA(pYV::YadA <sub>HY</sub> ) mit pLACRFP, Cm <sup>R</sup> , Kn <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> , RFP: red fluorescent protein	Diese Arbeit
WA(pT3SS)	WA-c <sup>RS</sup> mit pT3SS (alle Gene des <i>Ysc</i> -T3SS, <i>yadA</i> und Translokon <i>lcrV</i> , <i>yopB</i> , <i>yopD</i> ); Sp <sup>R</sup>	(Trülsch <i>et al.</i> , 2003)
WA(pT3SS $\Delta$ YadA)	<i>yadA</i> -negative Mutante von WA(pT3SS), Sp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit



<b>Stamm</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Referenz</b>
WA(pYadA)	WA-c <sup>RS</sup> mit pACYC184 <i>yadA</i> , Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WA(pΔYadA)	WA-c <sup>RS</sup> mit pACYC184 <i>yadA::kn</i> , Cm <sup>R</sup> , Kn <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WA(pYadA <sub>HY</sub> )	WA-c <sup>RS</sup> mit pACYC184 <i>YadA<sub>HY</sub></i> , Cm <sup>R</sup> , Kn <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WA(pYadA <sub>ΔN</sub> )	WA-c <sup>RS</sup> mit pACYC184 <i>YadA<sub>ΔN</sub></i> , Cm <sup>R</sup> , Kn <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WAΔ <i>inv</i> (pT3SS)	<i>inv</i> -negative Mutante von WA(pT3SS), Sp <sup>R</sup> , Kn <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WAΔ <i>inv</i> (pYadA)	<i>inv</i> -negative Mutante von WA(pYadA), Kn <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WAΔ <i>inv</i> (pΔYadA)	<i>inv</i> -negative Mutante von WA(pΔYadA), Kn <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WAΔ <i>inv</i> (pYadA <sub>HY</sub> )	<i>inv</i> -negative Mutante von WA(pYadA <sub>HY</sub> ), Kn <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WAΔ <i>inv</i> (pYadA <sub>ΔN</sub> )	<i>inv</i> -negative Mutante von WA(pYadA <sub>ΔN</sub> ), Kn <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
WA(pYadA, pYFP)	WA(pYadA) mit pRPSM-YFP, Cm <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup> ; YFP: yellow fluorescent protein	Diese Arbeit
WA(pΔYadA, pYFP)	WA(pΔYadA) mit pRPSM-YFP, Cm <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup> ; YFP: yellow fluorescent protein	Diese Arbeit
WA(pYadA <sub>HY</sub> , pYFP)	WA(pYadA <sub>HY</sub> ) mit pRPSM-YFP, Cm <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; YFP: yellow fluorescent protein	Diese Arbeit
WA(pYadA <sub>ΔN</sub> , pYFP)	WA(pYadA <sub>ΔN</sub> ) mit pRPSM-YFP, Cm <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; YFP: yellow fluorescent protein	Diese Arbeit
WAΔ <i>inv</i> (pYadA, pYFP)	WAΔ <i>inv</i> (pYadA) mit pRPSM-YFP, Kn <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup> ; YFP: yellow fluorescent protein	Diese Arbeit
WAΔ <i>inv</i> (pΔYadA, pYFP)	WAΔ <i>inv</i> (pΔYadA) mit pRPSM-YFP, Kn <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup> ; YFP: yellow fluorescent protein	Diese Arbeit
WAΔ <i>inv</i> (pYadA <sub>HY</sub> , pYFP)	WAΔ <i>inv</i> (pYadA <sub>HY</sub> ) mit pRPSM-YFP, Kn <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; YFP: yellow fluorescent protein	Diese Arbeit
WAΔ <i>inv</i> (pYadA <sub>ΔN</sub> , pYFP)	WAΔ <i>inv</i> (pYadA <sub>ΔN</sub> ) mit pRPSM-YFP, Kn <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; YFP: yellow fluorescent protein	Diese Arbeit

**Tab. 2.1** Verwendete *Y. enterocolitica* Stämme

### 2.1.2 *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Eigenschaft	Referenz
DH5 $\alpha$	<i>E. coli endA1 supE44 hsdR17 (r-k m+ k) thi-1 recA1gyrA96 relA1 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF) U169 (<math>\phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15)</i>	(Hanahan, 1983)
DH5 $\alpha$ (pUC::YadA)	DH5 $\alpha$ mit pUC13; YadA als 5kb <i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment	(Roggenkamp <i>et al.</i> , 1995)

Tab. 2.2 Verwendete *E. coli* Stämme

### 2.1.3 Plasmide

Stamm	Eigenschaft	Referenz
pRFP	pACYC184 mit <i>rfp</i> aus pDSredexpress, <i>rfp</i> (red fluorescent protein) unter dem <i>lac</i> Promotor, Cm <sup>R</sup>	(Trülzsch <i>et al.</i> , 2003)
pYFP	pUC13 mit <i>yfp</i> aus pTurboYFP, <i>yfp</i> (yellow fluorescent protein) unter dem <i>rpsM</i> Promotor, Amp <sup>R</sup>	A. Wieser
pKD46	Rekombinase-Expressionsplasmid unter Arabinose-induzierbarem Promotor <i>araB</i> , Amp <sup>R</sup>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pACYC184	Klonierungsvektor mit geringer Kopienanzahl pro Zelle, Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	New England Biolabs
pACYC177	Klonierungsvektor mit geringer Kopienanzahl pro Zelle, Kn <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	New England Biolabs
pYadA	pACYC184 mit <i>yadA</i> aus WA(pYV) über <i>BamHI</i> und <i>XbaI</i> , Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
p $\Delta$ YadA	pACYC184 mit <i>yadA::kn</i> aus WA(pYV $\Delta$ YadA) über <i>BamHI</i> und <i>XbaI</i> , Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pYadA <sub>HY</sub>	pACYC184 mit <i>yadA<sub>HY</sub></i> aus WA(pYV::YadA <sub>HY</sub> ) über <i>BamHI</i> und <i>XbaI</i> , Cm <sup>R</sup> (s. 2.1.1)	Diese Arbeit
pYadA <sub>AN</sub>	pACYC184 mit <i>yadA<sub>AN</sub></i> aus WA(pYV::YadA <sub>AN</sub> ) über <i>BamHI</i> und <i>XbaI</i> , Cm <sup>R</sup> (s.2.1.1)	Diese Arbeit
pTTSS	pLAFRII mit <i>yadA</i> und dem TypIII-Sekretionssystem (T3SS) aus pYV, Sp <sup>R</sup>	(Trülzsch <i>et al.</i> , 2003)
pMARCO	pcDNA3.3-TOPO mit humanem Volllängen- <i>marco</i> (1-518)	(Elomaa <i>et al.</i> , 1998)

Stamm	Eigenschaft	Referenz
pH420	pcDNA3.3-TOPO mit humanem verkürztem- <i>marco</i> (1-420)	(Elomaa <i>et al.</i> , 1998)

Tab. 2.3 Verwendete Plasmide.

## 2.2 Primer

Alle in Tab. 2.4 aufgelisteten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) und Eurofins (Ebersberg) in lyophilisiertem und entsalztem Zustand bestellt, in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst, und in Konzentrationen von 100 pmol/μl bei -20°C gelagert.

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	T <sub>m</sub> in °C	Verwendung
s_Cm_r	CCGTCTTTCATTGCCATAC	54.5	Überprüfung der Deletionsmutanten bei Insertion einer Cm-Kassette
s_hmsH_f	ATGCTGTAATACATTCCAAG	54.2	Überprüfung der Deletion von WΔ <i>hmsH</i> (pYV)
neu_s_hmsH_r	GCTCGGCAGGTGGAACAAAT	62.4	Überprüfung der Deletion von WΔ <i>hmsH</i> (pYV)
hmsH_ET_Cm_f	<u>AGATGAGTAAATTGATTAGTTGA</u> <u>TCGACATCATGATGACAGGCTGA</u> <u>AACATGATGACGGAAGATCACTT</u> <u>CGCAG</u>	68.0	Amplifizierung der Cm-Kassette aus pACYC184 mit <i>hmsH</i> -Homologiearmen
hmsH_ET_Cm_r	<u>TCAGGGTGAAGATTCAATCTTTG</u> <u>ATAATTTATCTTCGGCAAACGCA</u> <u>ACTTTTGAGAAGCACACGGTCAC</u> <u>AC</u>	69.9	Amplifizierung der Cm-Kassette aus pACYC184 mit <i>hmsH</i> -Homologiearmen
s_bcsA_f	CAGCAGCCGTTTACAACAG	57.0	Überprüfung der Deletion von WΔ <i>bcsA</i> (pYV)
s_bcsA_r	TCAATCACCCCTTCTGGAT	55.0	Überprüfung der Deletion von WΔ <i>bcsA</i> (pYV)
bcsA_ET_Cm_f	<u>GATTAATGCTGTGGAAAGCGATC</u> <u>TATGAATCGCCTGATGCGGATGT</u> <u>TATTTCGAAGTTCCTATACTTTCTA</u> <u>GAGAATAGGAACTTCTGACGGA</u> <u>AGATCACTTCGCAG</u>	>75	Amplifizierung der Cm-Kassette aus pACYC184 mit <i>bcsA</i> -Homologiearmen
bcsA_ET_Cm_r	<u>CCCAAAGCCAGTGC GGTTAAACC</u> <u>AGGTTATTTTCTCGTCATCATAT</u> <u>CATCAGAAGTTCCTATCTCTAG</u> <u>AAAGTATAGGAACTTCTTGAGAA</u> <u>GCACACGGTCACAC</u>	>75	Amplifizierung der Cm-Kassette aus pACYC184 mit <i>bcsA</i> -Homologiearmen

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	T <sub>m</sub> in °C	Verwendung
bla_f	GATCAGTTGGGTGCACGA	56.0	Überprüfung der Transformation und Deletion von pKD46
bla_r	TTGCCGGGAAGCTAGAGT	56.0	Überprüfung der Transformation und Deletion von pKD46
yadA_BamHI_r2	ATTGGATCCGCAAATATCGGAGG GATTG	69.0	Amplifizierung von <i>yadA</i> -Fragmenten aus pYV, pYVΔ <i>YadA</i> , pYV:: <i>YadA</i> <sub>HY</sub> , pYV:: <i>YadA</i> <sub>ΔN</sub> , Einführung einer <i>BamHI</i> -Schnittstelle
yadA_XbaI_f2	ATCTCTAGACACAAAACATCCGG TTTGA	66.0	Amplifizierung von <i>yadA</i> -Fragmenten aus pYV, pYVΔ <i>YadA</i> , pYV:: <i>YadA</i> <sub>HY</sub> , pYV:: <i>YadA</i> <sub>ΔN</sub> , Einführung einer <i>XbaI</i> -Schnittstelle
inv_ET_Kan_f	TCTGCTATTCTATTGTTAGTGTTT GCGAGAGAGAAGAAGAAGTTAT TTCTTCACTGACACCCTCATCAG TG	80.0	Amplifizierung der Kn-Kassette aus pACYC177 mit <i>inv</i> -Homologiearmen
inv_ET_Kan_r	GCAACAGCATATTGAGCATAACA CTCAGGCGCTGGCGGTTTTGAAT ACCGTCAAGTCAGCGTAATGCTC	87.0	Amplifizierung der Kn-Kassette aus pACYC177 mit <i>inv</i> -Homologiearmen
yadA_ET_Cm_f	ATAACTGAGCTTTTATTCACGGG AAACTAAAGAAATATAAAAGGT GCTTACATATGAATATCCTCCTT A	74.0	Amplifizierung der Cm-Kassette aus pACYC184 mit <i>yadA</i> -Homologiearmen
yadA_ET_Cm_r	AAATTATGTAATCGGTGTTTTCC TATAGACTTGTTAACTTCTAAAT GATATGTGTAGGCTGGAGCTGCT TC	77.0	Amplifizierung der Cm-Kassette aus pACYC184 mit <i>yadA</i> -Homologiearmen
s_k2_f	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	61.4	Überprüfung der <i>inv</i> -Deletionsmutante bei Insertion einer Kn-Kassette
s_k1_r	GCCGATTGTCTGTTGTGCCC	61.4	Überprüfung der <i>inv</i> -Deletionsmutante bei Insertion einer Kn-Kassette
yadA_up104_f	CGCAGCCAACATAAATCG	54.0	Überprüfung der Lokalisation der <i>yadA</i> -Fragmente
yadA_down1853_r	ATCCGCATAACACTTTTCGT	54.0	Überprüfung der Lokalisation der <i>yadA</i> -Fragmente
yadA_screen_f	CTAAAGAAATATAAAAGGTGCTT	53.0	Überprüfung der <i>yadA</i> -Deletion von pTSSΔ <i>yadA</i>

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	T <sub>m</sub> in °C	Verwendung
yadA_screen_r	GACTTGTTAACTTCTAAATGATA	53.0	Überprüfung der <i>yadA</i> - Deletion von pTTSSΔ <i>yadA</i>

**Tab. 2.4 Liste der verwendeten Primer.**

T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur, f = Vorwärtsprimer, r = Rückwärtsprimer, eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, eingeführte Homologiearme für die Rekombination sind gestrichelt unterstrichen dargestellt.

## 2.3 Bakterielle Nährmedien und Zusätze

Die aufgeführten Nährmedien wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst und bei 121°C für 20 min bei 1 bar autoklaviert.

<b>Luria-Bertani-Medium</b>	10 g/l Trypton, pH 7,4 – 7,5 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl
<b>LB-Agar</b>	15g Bacto-Agar/ 1000 ml LB-Medium
<b>LB-Einfriermedium</b>	LB-Medium mit 50% Glycerin
<b>Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium</b>	37g/l
<b>SOC-Medium</b>	20 g/l Trypton, pH 7,4 – 7,5 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 250 mM KCl

Nach dem Autoklavieren wurden dem SOC-Medium noch 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 20 mM Glucose, die zuvor sterilfiltriert wurden, hinzugegeben.

## 2.4 Antibiotika

Die aufgeführten Antibiotika wurden vor Einsatz mit einem 0,2 µm-Filter sterilfiltriert.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Lösungsmittel
<b><u>Einsatz zur Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>Y. enterocolitica</i></u></b>			
<b>Ampicillin (Amp)</b>	100 mg/ml	100 µg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
<b>Chloramphenicol (Cm)</b>	20 mg/ml	20 µg/ml	70% Ethanol
<b>Kanamycin (Kn)</b>	50 mg/ml	50 µg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Lösungsmittel
Spectinomycin (Sp)	100 mg/ml	100 µg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Carbenicillin (Cb)	300 mg/ml	300 µg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Tetracyclin (Tet)	2 mg/ml	20 µg/ml	70% Ethanol
<b><u>Einsatz bei Infektionsversuchen</u></b>			
Gentamicin	10 mg/ml	50 µg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
<b><u>Einsatz für Selektion von transfizierten Zellen</u></b>			
Genecitin (G418)	50 mg/ml	0,5 – 1 mg/ml	-

Tab. 2.5 Verwendete Antibiotika.

## 2.5 Zellkultur

### 2.5.1 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HeLa	Humane Epithelzelllinie	ATCC® CCL-2™
J774A.1	murine Monozyten- Makrophagen-Zelllinie	ATCC® TIB-67™
CHO	„Chinese hamster ovary“: Ovarienzelllinie	ATCC® CCL-61™

Tab. 2.6 Verwendete eukaryotische Zelllinien.

### 2.5.2 Nährmedien und Zusätze

Die in Tab. 2.6 aufgelisteten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter Zugabe der entsprechenden Zellkulturmedien kultiviert.

Zelllinie	Medium	Einfriermedium
HeLa	RPMI 1640	70 % RPMI 1640
	10 % FBS	20 % FBS
	10 mM HEPES	10 % DMSO
J774A.1	RPMI 1640	70 % RPMI 1640
	10 % FBS	20 % FBS
	10 mM HEPES	10 % DMSO
	2 mM Glutamin	

Zelllinie	Medium	Einfriermedium
CHO	MEM alpha 10 % FBS 10 mM HEPES 2 mM Glutamin	MEM alpha 20 % FBS 10 % DMSO

Tab. 2.7 Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze.

## 2.6 Antikörper

Antikörper	Eingesetzte Verdünnung/Konzentration	Quelle/Firma
<b><u>Unkonjugierte Primärantikörper</u></b>		
Spezifisches Yada Antiserum (Kaninchen)	1:5000 (WB)	(Dziwisch <i>et al.</i> , 1988)
Spezifisches Kollagen Typ I Antiserum (Ziege)	1:100 (IF), 1:10 (IG), 1:250 (WB)	Merck-Millipore (Darmstadt)
Spezifisches Kollagen Typ I Antiserum (Kaninchen)	1:40 (IF)	Merck-Millipore (Darmstadt)
Fibronektin spezifischer monoklonaler Antikörper (Maus)	1:200 (IF)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Maus-MARCO spezifischer monoklonaler Antikörper (Ratte)	1:100 (IF, FC)	AbD Serotec (München)
Spezifisches human-MARCO <sub>ct</sub> Antiserum (Kaninchen)	1:100 (IF), 1:500 (WB)	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
CD16/32 spezifische monoklonale Antikörper (blockierende Funktion)	0,5 µg (FC)	eBioscience (Frankfurt)
<b><u>Enzymkonjugierte Sekundärantikörper</u></b>		
Esel anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat	1:10000 (WB)	GE Healthcare (München)
Esel anti-Maus IgG Peroxidase- Konjugat	1:10000 (WB)	GE Healthcare (München)
Kaninchen anti-Ziege IgG Peroxidase-Konjugat	1:10000 (WB)	Merck-Millipore (Darmstadt)

<b>Antikörper</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung/Konzentration</b>	<b>Quelle/Firma</b>
<b><u>Goldkonjugierter Antikörper</u></b>		
<b>Anti-Ziege IgG Gold-Konjugat</b>	1:20 (IG)	Aurion (Wageningen, Niederlande)
<b><u>Fluorochromkonjugierte Antikörper</u></b>		
<b>Kaninchen anti-Ziege IgG FITC- Konjugat</b>	1:400 (IF)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Ziege anti-Kaninchen IgG FITC- Konjugat</b>	1:400 (IF)	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa555-Konjugat</b>	1:400, 1:1000 (IF)	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa488-Konjugat</b>	1:400 (IF)	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Ziege anti-Maus IgG Alexa488- Konjugat</b>	1:400 (IF)	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Ziege anti-Ratte IgG Alexa647- Konjugat</b>	1:10000 (FC)	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Ziege anti-Kaninchen Atto647- Konjugat</b>	1: (FC)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Maus anti-human CD66abce APC- Konjugat</b>	1µl/10 <sup>6</sup> Zellen (FC)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<b>Maus IgG2b APC-Konjugat</b>	1µl/10 <sup>6</sup> Zellen (FC)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

**Tab. 2.8** Liste der verwendeten Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen bzw. Konzentrationen.

WB: Westernblot-Anwendung, FC: Durchflusszytometrische Anwendung, IF: Immunfluoreszenz-Anwendung, IG: Immunoелеktron-Anwendung



## 2.7 Proteine und Peptide

Protein/Peptid	Konzentration	Firma
<b>Bovines Kollagen Typ I (Purecol)</b>	3 mg/ml	Advanced Biomatrix (San Diego, USA)
<b>(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>, (POG)<sub>10</sub></b>	1 mg/ml	Genaxxon bioscience (Ulm)
<b>Dy647M-Mpr-(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>-OH, 647-(POG)<sub>10</sub></b> (mit Fluoreszenzfarbstoff DyLight Dy647 markiert)	1 mg/ml	Peptides&elephants (Potsdam)

Tab. 2.9 Liste der verwendeten Proteine und Peptide.

Pro: Prolin, Hyp: Hydroxyprolin, Gly: Glycin, Mpr: Mercaptoethanol

## 2.8 Chemikalien, Biochemikalien, Enzyme und Kits

Name	Firma
<b>Aceton</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>Acrylamid/Bis Lösung (29:1)</b>	Serva (Heidelberg)
<b>Agarose</b>	Serva (Heidelberg)
<b>Ammoniumpersulfat (APS)</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Ampicillin</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Alexa488 Succinimidyl Ester</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Arabinose</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Araldit</b>	Serva (Heidelberg)
<b>Bacto-Trypton</b>	BD Bioscience (Heidelberg)
<b>Bacto Hefe-Extrakt</b>	BD Bioscience (Heidelberg)
<b>BD FACS Clean</b>	BD Bioscience (Heidelberg)
<b>BD FACS Flow</b>	BD Bioscience (Heidelberg)
<b>BD FACS Shutdown solution</b>	BD Bioscience (Heidelberg)
<b>Beschleuniger 2,4,6-</b>	Serva (Heidelberg)
<b>Tris(dimethylaminomethyl)phenol</b>	
<b>BHI</b>	Oxoid (Hampshire, UK)
<b>Biotin Succinimidyl Ester</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Bromphenolblau</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>BSA</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Carbenicillin</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)

<b>Name</b>	<b>Firma</b>
<b>CIN-Agarplatten</b>	Oxoid (Hampshire, UK)
<b>Chloramphenicol</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Coomassie Brilliant Blau</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>DABCO</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>DAPI</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>DAPI-Mounting Medium Vectashield</b>	Vector laboratories (Burlingame, USA)
<b>DMEM high glucose</b>	Life Technologies
<b>DMSO</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>DNS 1kb Längenstandard</b>	Thermo Scientific (St. Leon-Rot)
<b>DNS Probenpuffer, 6x</b>	Thermo Scientific (St. Leon-Rot)
<b>dNTP Mix</b>	Thermo Scientific (St. Leon-Rot)
<b>D-PBS</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Dithiothreitol (DTT)</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>ECL Western Blotting Reagenz</b>	GE Healthcare (München)
<b>EDTA</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>EGTA</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Essigsäure</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Ethanol p.a.</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Ethidiumbromid</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>FBS</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>F<sub>c</sub>R Blocking Reagenz</b>	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<b>Fibrinogen</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>Folin-Ciocalteu's Reagenz</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Genicitin (G418)</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Gentamicin</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Giemsa</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>Glycerol</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Glutaraldehyd</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Glycin</b>	MP (Ohio, USA)
<b>HCl</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Harnstoff</b>	MP (Ohio, USA)
<b>High fidelity PCR enzyme mix</b>	Thermo Scientific (St. Leon-Rot)
<b>Histopaque<sup>®</sup>-1119 und -1077</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Isopropanol</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>Kanamycin</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)

<b>Name</b>	<b>Firma</b>
<b>KCl</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>KHCO<sub>3</sub></b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Kollagenase (<i>Clostridium histolyticum</i>)</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>L-Glutamin</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Lipofectamine™ 2000</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>LPS (<i>E. coli</i> K12)</b>	Invivogen (San Diego, USA)
<b>Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Methanol</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>Mowiol 4-88</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Natrium Acetat</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Natrium-Cacodylat</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>NaCl</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Roth (Karlsruhe)
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>NaOH</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>Osmiumtetroxid</b>	Paesel+Lorei (Duisburg)
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>PCR clean up Kit</b>	Macherey & Nagel (Düren)
<b>PCR BioMix Red</b>	Bioline (Luckenwalde)
<b>Plasmid Purification Kit</b>	Macherey & Nagel (Düren)
<b>ProLong® Gold Antifade mit DAPI</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Propylenoxid</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>Protein Molekulargewichtsmarker (PageRuler)</b>	Thermo Scientific (St. Leon-Rot)
<b>Restriktionsenzyme</b>	Thermo Scientific (St. Leon-Rot)
<b>RPMI 1640 (phenolrot und farblos)</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Rutheniumrot</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>SDS</b>	Serva (Heidelberg)
<b>Spectinomycin</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Sterilfilter 0,22 µm</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>T4 DNA-Ligase</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>TEMED</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Tetracyclin</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Thrombin</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Tris</b>	MP (Ohio, USA)

Name	Firma
<b>Triton X-100</b>	Roth (Karlsruhe)
<b>Trypan Blau</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Trypsin-EDTA</b>	Life Technologies (Darmstadt)
<b>Tween 20</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Uranyl Acetat</b>	Serva (Heidelberg)
<b>Vectashield Mounting Medium</b>	Linaris (Wertheim)

Tab. 2.10 Liste der verwendeten Chemikalien, Biochemikalien, Enzyme und Kits.

## 2.9 Puffer und Lösungen

### Gelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM Tris 40 mM Essigsäure 1 mM EDTA
Ethidiumbromid-Färbebad	1 µg Ethidiumbromid pro ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

### SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8 2 % SDS 10 % Glycerin 5 % β-Mercaptoethanol 0,005 % Bromphenolblau
10 x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 250mM Glycin 0,1% SDS
Coomassie-Färbelösung	0,275 % Coomassie Brilliant Blau 50 % Methanol 10 % Essigsäure
Entfärbelösung	10 % Methanol 10 % Ethanol 7.5 % Essigsäure

## Western Blot

10 x Blotting-Puffer	60,6 g Tris 138,2 g Glycin H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> ad 2 l
10 x TBS pH 7,5	121 g Tris 175 g NaCl H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> ad 2 l
TBS-T	200 ml 10x TBS 2 ml Tween 20 H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> ad 2 l
Blockierungslösung	5 g Milchpulver TBS-T ad 100 ml

## Einbettmedium für Immunfluoreszenz

Mowiol	6 g Glycerol 2,4 g Mowiol 4-88 6 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5
--------	--

Die Mischung wurde für 2 h bei 50 °C gerührt und anschließend 25 mg DABCO dazugegeben.

## 2.10 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Analysenwaage	1203 MP, Typ 1801	Sartorius (Göttingen)
Blot-Apparatur	Mini-Trans-Blot	Bio-Rad (München)
Blotdokumentation	ChemiDoc XRS System	Bio-Rad (München)
Brutschrank	Typ B 20	Hereaus (Hanau)
CLSM	TCS-SP5	Leica (Wetzlar)
CLSM	TCS	Leica (Wetzlar)
Elektronenmikroskop	Philips CM-10	Philips (Hamburg)
Elektronenmikroskop	Zeiss EM 10	Zeiss (Jena)
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (München)
Elektroporationsgerät	GenePulser II	Bio-Rad (München)

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
<b>Epifluoreszenzmikroskop</b>	BX61	Olympus (Hamburg)
<b>FACS</b>	BD Facs Canto II	BD Bioscience (Heidelberg)
<b>Filmentwickler</b>	Fujifilm FPM-100A	Fuji (Düsseldorf)
<b>Gelelektrophoresekammer für DNS</b>	miniRapide	OLS (Bremen)
<b>Geldokumentation</b>	GelDoc EQ	Bio-Rad (München)
<b>Kühlzentrifuge</b>	Sigma 3K30	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>Kühlzentrifuge (Schwingrotor)</b>	Varifuge (Zellkultur)	Heraeus (Hanau)
<b>Lichtmikroskop</b>	Axivert 25	Zeiss (Jena)
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Neubauer improved 0,1	PEQLAB (Erlangen)
<b>PCR-Cycler</b>	Uno Cycler	VWR (Darmstadt)
<b>pH-Meter</b>	320 pH-Meter	Mettler Toledo (Giessen)
<b>Pipetten</b>	10, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson (Middleton, USA)
<b>Schüttelinkubator</b>	Excella E24	New Brunswick (Nürtingen)
<b>Spektrophotometer</b>	Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
<b>Spektrophotometer</b>	NanoDrop ND 1000	PEQLAB (Erlangen)
<b>Spinning Disk CLSM</b>	Nikon Eclipse TE300	Nikon (Düsseldorf)
<b>Standardzentrifuge</b>	5417R	Eppendorf (Hamburg)
<b>Sterilwerkbank</b>	Herasafe HS 12	Thermo Electron Corporation (Langenselbold)
<b>Thermoschüttler</b>	Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
<b>UV-Transilluminator</b>	UVT-20M/W	Herolab (Wiesloch)
<b>Wasserbad</b>	WB 7	Memmert GmbH + CoKG (Schwalbach)

Tab. 2.11 Liste der verwendeten Geräte.

Zusätzlich zu den in Tab. 2.11 aufgelisteten Geräten wurden Standardlaborgeräte verwendet.

## 2.11 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Firma</b>
<b>15-Napf µ-slide</b>	Ibidi (Martinsried)
<b>24-/96-Napfkulturplatten</b>	TPP (Trasadingen, Schweiz)

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Firma</b>
<b>6-Napfkulturschalen</b>	Sigma-Aldrich (Hamburg)
<b>96-Napfkulturplatten (gewölbter Boden)</b>	BD Bioscience (Heidelberg)
<b>Elektroporationsküvetten</b>	Thermo Scientific (St. Leon-Rot)
<b>FACS Röhrchen</b>	BD Bioscience (Heidelberg)
<b>Filterpapier</b>	Whatman (Dassel)
<b>Membranadapter</b>	Sarstedt (Nümbrecht)
<b>Multifly® -Set</b>	Sarstedt (Nümbrecht)
<b>Nadeln 18G</b>	Braun (Melsungen)
<b>PCR Reaktionsgefäße</b>	Eppendorf (Hamburg)
<b>Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)</b>	Eppendorf (Hamburg)
<b>Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)</b>	Corning (Corning, USA)
<b>Skalpell</b>	Braun (Melsungen)
<b>Sterilfilter</b>	Merck-Millipore (Darmstadt)
<b>Sterilfilter-Flaschen</b>	TPP (Trasadingen, Schweiz)
<b>Spritzen (10 und 20 ml)</b>	Braun (Melsungen)
<b>Zellkulturflaschen</b>	TPP (Trasadingen, Schweiz)

Tab. 2.12 Liste der Verbrauchsmaterialien.

## 2.12 Mikrobiologische Methoden

### 2.12.1 Kultivierungsverfahren

#### 2.12.1.1 Kultivierungsverfahren in Flüssigmedium

Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte die Kultivierung der *Y. enterocolitica* Stämme (Tab. 2.1) bei 27°C in BHI-Medium bzw. der *E. coli* Stämme (Tab. 2.2) in LB-Medium bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 180 U/min unter aeroben Bedingungen unter Zugabe entsprechender Antibiotika.

#### 2.12.1.2 Kultivierungsverfahren im 3D-KoG

Die Kultivierung der Bakterien im 3D-KoG erfolgte nach Freund *et al.*, 2008 unter modifizierten Bedingungen: Yersinien und *E. coli*-Stämme wurden über Nacht bei 27 °C

bzw. 37 °C angezüchtet und am darauf folgenden Tag 1:20 in BHI- bzw. LB-Medium unter Zugabe entsprechender Antibiotika verdünnt. Diese Kulturen wurden für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 1800 rpm für 10 min zentrifugiert, 1x mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Die Bakterienzellzahl wurde photometrisch bestimmt. Dabei entspricht eine OD<sub>600nm</sub> von 0,3 einer Zellzahl von 5x10<sup>7</sup>/ml Yersinien. Das jeweilige Volumen an Bakteriensuspension wurde errechnet, mit der Kollagenlösung, deren saurer pH mit Natriumbicarbonat auf 7,4 neutralisiert wurde, gemischt und in das für die nachfolgende Anwendung entsprechende Kulturgefäß (Tab. 2.13) gegossen. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> (Zellkulturinkubator) für 30-45 Minuten waren die Gele auspolymerisiert und wurden mit vorgewärmten RPMI überschichtet. Die weitere Bebrütung erfolgte über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Anwendung	Bakterienzellzahl	Kollagen- konzentration im Gel	Kulturgefäß (Volumen)
<b>Licht- und Elektronenmikroskopie</b>	10 <sup>5</sup>	0,15 %	Selbstgebaute Kammer aus Objektträger und Deckglas (100 µl)
<b>Immunfluoreszenzmikroskopie</b>	10 <sup>3</sup>	0,08 %	15-Napf-µ-slide (10 µl)
<b>Immunogoldfärbung</b>	10 <sup>3</sup>	0,08 %	96-Napfkulturschale (10 µl)

**Tab. 2.13 Ansätze für 3D-Kollagengele entsprechend der nachfolgenden Experimente.**

### 2.12.1.3 Kultivierungsverfahren im 3D-Fibrin-Gel (Lämmermann *et al.*, 2008)

Die Yersinien wurden wie unter 2.12.1.2 beschrieben angezüchtet und in einer 0,2 % Fibrinogenlösung aufgenommen. Vor dem Einfüllen in ein 15-Napf-µ-slide, wurde 0,125 U/ml Thrombin hinzupipettiert, um das Fibrinogen in Fibrin zu spalten. Die Fibringelbildung war nach 30 Minuten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> abgeschlossen.

### 2.12.2 Stammhaltung von Bakterien

Die Bakterien wurden wie unter 2.12.1.1 angezüchtet, bei 3000 rpm 10 min abzentrifugiert und in LB-Einfriermedium resuspendiert. Die Lagerung erfolgte in Kryoröhrchen bei -80°C.



## 2.12.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Elektroporation

### 2.12.3.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien (Schriefer *et al.*, 2013)

Übernachtskulturen wurden in 100 – 200 ml LB 1:50 unter Zugabe entsprechender Antibiotika verdünnt und bei 27 °C (*Y. enterocolitica*) bzw. 37 °C (*E. coli*) geschüttelt bis die logarithmische Wachstumsphase bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 - 0,5 erreicht wurde. Falls nötig wurde die Genexpression der Rekombinasen mit 1 % Arabinose induziert (2.13.7). Anschließend wurde die Bakteriensuspension in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 10 min auf Eis gelagert. Nach Zentrifugieren bei 6000 rpm bei 4°C für 10 min wurden die Bakterien dreimal mit sterilen eiskalten 10 % Glycerin in Ampuwa gewaschen und in 100 – 200 µl 10 % Glycerin in Ampuwa aufgenommen. Die Lagerung der 100 µl-Aliquots erfolgte bei -80°C.

### 2.12.3.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien (Nägele *et al.*, 2011)

Eingefrorene elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit DNS (1 µl Ligationsansatz, 5 ng Plasmid-DNS oder 9 µl PCR-Produkt) in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF (time constant > 4 ms). Vorgekühltes SOC-Medium wurde nach Elektroporation hinzupipettiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Bakterien wurden anschließend in einem Thermoblock bei 27°C (*Y. enterocolitica*) oder 37°C (*E. coli*) 1 h bei 800 rpm geschüttelt. 100 µl und der abzentrifugierte in 100 µl aufgenommene Rest der Bakteriensuspension wurden auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und bei 27 °C oder 37 °C 1 – 3 Tage bebrütet.

## 2.13 Molekularbiologische und genetische Methoden

### 2.13.1 DNS-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNS bzw. genomischer DNS wurde mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Machery Nagel, Düren) bzw. PrestoSpin D Kit (Molzym, Bremen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.13.2 Manipulation von DNS**

*In vitro*-Modifikationen von DNS-Fragmenten, wie Restriktionen und Ligationen, wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt.

### **2.13.3 Agarosegelelektrophorese**

Für die Auftrennung von DNS-Fragmenten wurden 1% Agarosegele in TAE-Puffer gegossen und die DNS in Probenpuffer in Geltaschen aufgetragen. Die Nukleinsäuren wandern dabei aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode und werden in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse und Konformation (linear, offen zirkular, oder verdrillt) aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von 85 V. Anschließend wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad angefärbt und DNS-Fragmente durch UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurde ein UV-Transilluminator benutzt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße diente ein 1 kb DNS Längenstandard.

Bei der präparativen Auftrennung erfolgte die Elektrophorese bei ca. 70 V. Nach der Inkubation im Ethidiumbromidbad wurde die gewünschte gefärbte DNS-Bande auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und aufgereinigt (2.13.5).

### **2.13.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)**

Bei der Polymerasekettenreaktion handelt es sich um eine enzymatische Methode zur Amplifizierung spezifischer DNS-Fragmente. Für Klonierungen wurde als Matrize entweder Plasmid- oder genomische DNS verwendet. Als Polymerase diente der Expand High Fidelity enzyme Mix (Fermentas), welcher aus einer Mischung aus Taq- und „proof-reading“-Polymerase besteht. Zur schnellen und einfachen Identifizierung von positiven Klonen wurde die sogenannte „colony PCR“ angewandt. Hierzu wird mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Material einer Bakterienkolonie abgenommen und direkt im PCR-Master Mix (BioMix Red, Bionline) gelöst. Die PCR-Reaktionsansätze und PCR-Reaktionsprogramme sind in Tab. 2.14, Tab. 2.15 und Tab. 2.16 dargestellt.

Komponenten	Expand High Fidelity Mix (µl)
H <sub>2</sub> O	32,6
10x Puffer	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6
dNTPs (je 2mM)	5
Primer je vorwärts/rückwärts (100 pmol/µl)	0,2
Polymerase-Mix	0,5
Matrizen-DNS (1 ng)	0,5

Tab. 2.14 Standardreaktionsansatz bei Verwendung des Expand High Fidelity Mix.

Komponenten	BioMix Red (µl)
H <sub>2</sub> O	13,5
2x BioMix Red (mit 5 mM MgCl <sub>2</sub> )	9,5
Primer je vorwärts/rückwärts (10 pmol/µl)	1

Tab. 2.15 Standardreaktionsansatz bei Verwendung des BioMix Red.

PCR-Schritte	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale	95	5 min	1
Denaturierung			
Denaturierung	95	45 s	30 - 35
Hybridisierung	T <sub>m</sub> ± 2	45 s	
Elongation	72*	45 s	
Finale Elongation	72*	10 min	1

Tab. 2.16 Verwendetes Standard PCR-Reaktionsprogramm.

T<sub>M</sub>: Schmelztemperatur. \* Für den Expand High Fidelity Polymerase-Mix wurde eine Elongationstemperatur von 68 °C verwendet.

Die Hybridisierungstemperatur wurde unter Berücksichtigung der Schmelztemperatur T<sub>M</sub> des Primers gewählt, die sowohl von der Länge als auch von der Sequenz der verwendeten Oligonukleotidprimer abhängig ist. Die Schmelztemperatur T<sub>M</sub> wird nach folgender Formel (Suggs *et al.*, 1981) berechnet:

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

### **2.13.5 Aufreinigung von DNS-Fragmenten**

Die Aufreinigung von PCR-Produkten sowie ausgeschnittene Agarosegelstücke erfolgte mit dem PCR clean up Kit von Macherey & Nagel nach Anleitung des Herstellers. Aufgereinigte DNS wurde in Ampuwa gelöst und bei -20 °C gelagert.

### **2.13.6 DNS-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)**

Für Sequenzierungen wurden aufgereinigte Plasmid-DNS bzw. PCR-Produkte mit ausgewählten Primern in den jeweiligen Konzentrationen nach Angaben der Firma GATC (Konstanz) vermischt und verschickt. Die Sequenzierung der doppelsträngigen DNS erfolgte dabei nach dem Prinzip des "Cycle Sequencing", welches auf dem nach Sanger beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden basiert (Sanger *et al.*, 1977). Die erhaltenen DNS-Sequenzen wurden mittels BioEdit Software auf Qualität überprüft und anschließend durch die Clustal W2 Software (<http://expasy.org>) mit der bekannten Gensequenz verglichen und analysiert.

### **2.13.7 Herstellung von Deletionsmutanten in *Y. enterocolitica* durch homologe Rekombination nach Datsenko und Wanner, 2000**

Die Methode zur Herstellung von Gendeletionen nach Datsenko und Wanner beruht auf homologer Rekombination durch Einsatz der Lambda Red Rekombinase (Datsenko & Wanner, 2000) (Abb. 2.1). Hierzu werden Primer mit ca. 50 Nukleotiden (Nt) entworfen, die homolog zu den flankierenden Bereichen der gewünschten Deletion sind und weiteren ca. 20 Nt, die eine Amplifikation des gewünschten Genfragments ermöglichen. Dies ergibt somit Primer mit einer ungefähren Länge von 70 Nukleotiden. Als Matrize für die PCR dienten die Plasmide pACYC184 bzw. pACYC177, wodurch eine Chloramphenicol- bzw. Kanamycin-Resistenz Kasette mittels Expand High Fidelity Polymerase-Mix amplifiziert wurde. Das PCR-Reaktionsprogramm ist in Tab. 2.17 dargestellt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden sechsmal 50 µl-PCR-Reaktionsansätze pro Probe aufgereinigt.

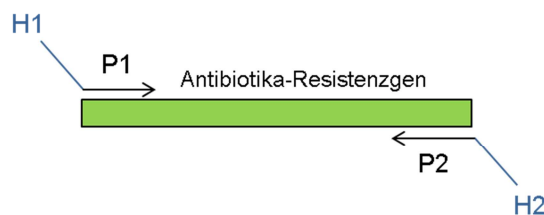
Anschließend wurde der Ansatz mit *DpnI* über Nacht inkubiert, um restliche methylierte Matrizen-Plasmid-DNS zu verdauen. Der Verdau wurde mit 3 M Natriumacetat, pH 5,2, und 100 % reinen eiskalten Ethanol bei -20 °C über Nacht oder bei -80 °C für 20 min gefällt. Nach der Zentrifugation bei 13000 rpm für 20 min bei 4°C, wurde die DNS einmal mit 70%

Ethanol gewaschen, in der SpeedVac getrocknet und in 10 µl Ampuwa gelöst. 1 µl der DNS wurde anhand Gelelektrophorese kontrolliert und die Ausbeute abgeschätzt.

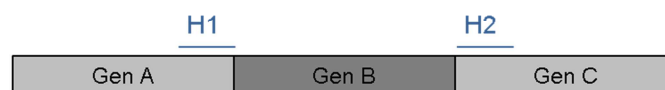
PCR-Schritte	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
<b>Initiale Denaturierung</b>	95	5 min	1
<b>Denaturierung</b>	95	30 s	35
<b>Hybridisierung</b>	$T_m \pm 2$	2 min	35
<b>Elongation</b>	72*	2 min	
<b>Finale Elongation</b>	72*	7 min	1

Tab. 2.17 PCR-Reaktionsprogramm bei Verwendung von ~70-Nukleotid langen Primern.

Schritt 1: Amplifizierung des Antibiotika-Resistenzgens



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



Schritt 3: Selektion Antibiotika-resistenter Klone



Abb. 2.1 Strategie der Herstellung von Deletionsmutanten nach Datsenko & Wanner, 2000.

H1 und H2 entsprechen den Homologiebereichen, P1 und P2 sind die Primer-Bindestellen zur Antibiotika-Resistenzkassette.

Die verbleibende DNS wurde anschließend mittels Elektroporation in elektrokompente Yersinien transformiert, die das temperatursensitive Plasmid pKD46 mit λ Red Rekombinasen besitzen. Vor der Gensequenz der Rekombinasegene ist ein mit Arabinose

induzierbarer Promotor *P<sub>araB</sub>* lokalisiert, sodass die Genexpression der Rekombinasen mit 1 % Arabinose induziert werden kann. Die Replikation des Plasmids ist temperaturabhängig, was bei Temperaturen von über 30 °C zum Verlust des Plasmids führt. Somit wurden die Deletionsmutanten nach erfolgreicher Mutagenese über Nacht bei 37 °C geschüttelt, um das temperatursensitive Plasmid pKD46 aus den Bakterienzellen zu eliminieren.

Da bakterielle Restriktionssysteme aufgenommene DNS verdauen und somit die genetische Manipulation erschweren, wurde der Stamm WAc<sup>RS</sup> für die homologe Rekombination verwendet, welcher ein Derivat von *Y. enterocolitica* WAc ist, in dem das funktionelle PstI-ähnliche YenI Restriktions-Modifikationssystem deletiert wurde (Antonenko *et al.*, 2003). Antibiotika-resistente Klone wurden mittels PCR getestet und die Deletion durch Sequenzierung überprüft. Folgende Deletionsmutanten wurden nach dieser Methode hergestellt: WA $\Delta$ *hmsH*(pYV), WA $\Delta$ *bcsA*(pYV), WA(pT3SS $\Delta$ YadA), WA $\Delta$ *inv* (s. Tab. 2.1).

### 2.13.8 Herstellung der Plasmide pYadA, p $\Delta$ YadA, pYadA<sub>HY</sub> und pYadA<sub>AN</sub>

Für die Herstellung der Plasmide pYadA, p $\Delta$ YadA, pYadA<sub>HY</sub> und pYadA<sub>AN</sub> wurde zunächst eine PCR mit den Primern *yadA\_XbaI\_f2* und *yadA\_BamHI\_r2* durchgeführt (Tab. 2.4). Als Matrize diente jeweils genomische DNS der Stämme WA(pYV), WA(pYV $\Delta$ YadA), WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>) und WA(pYV::YadA<sub>AN</sub>). Alle Amplifikate beinhalteten sowohl Promotor- als auch Terminatorsequenz des *yadA*-Gens. Die PCR-Produkte wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *BamHI* verdaut und in den mit *XbaI* und *BamHI* eröffneten Vektor pACYC184 ligiert. pYadA enthält somit das Wildtyp-Gen *yadA*, p $\Delta$ YadA das durch eine Kanamycinresistenzkassette unterbrochene *yadA*-Gen, pYadA<sub>HY</sub> das modifizierte YadA, in dem die Histidine an Stelle 156 und 159 jeweils durch Tyrosine ausgetauscht wurden und pYadA<sub>AN</sub> das YadA mit der Deletion der Aminosäuren 29 – 81. Diese Plasmide wurde jeweils in den pYV-negativen WA-c<sup>RS</sup>- und WA $\Delta$ *inv*-Stamm transformiert.

## 2.14 Biochemische Methoden

### 2.14.1 Herstellung von bakteriellen Ganzzelllysaten

Für die Untersuchung der YadA-Produktion wurden Übernachtskulturen am folgenden Tag 1:40 unter Zugabe von entsprechenden Antibiotika in RPMI überimpft und 5 h bei 37 °C

geschüttelt. Es wurde eine  $OD_{600nm}$  von 1,0 in 100  $\mu$ l eingestellt, mit 2x SDS-Probenpuffer gemischt und für 10 min bei 100 °C aufgeköcht. Anschließend wurde für 5 – 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Lysate bei -20 °C gelagert.

### **2.14.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Hierzu wurden 0,75 mm dicke Polyacrylamidgele der Größe 8 x 7 cm, bestehend aus einem 4 % Sammelgel und je nach Molekulargewicht einem 6 -12 % Trenngel, gegossen und die aufgetragenen Proteinproben elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine werden zunächst durch das Sammelgel an der Grenzfläche zum Trenngel konzentriert und dann im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch die Zugabe von SDS im Probenpuffer sowie im Gel, wird den Proteinen eine negative Ladung verliehen, womit diesen eine Wanderung im elektrischen Feld zur Anode ermöglicht wird. Zur Denaturierung der Proteine wurde dem SDS-Probenpuffer  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben, welches zur Auflösung der Disulfidbrücken der Proteine führt. Die Proteinproben wurden 10 min bei 100°C aufgeköcht, das die Wasserstoffbrückenbindungen unterbricht und somit die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst wird. Zusätzlich wurde ein vorgefärbter Proteinstandard aufgetragen, um das Molekulargewicht der aufgetragenen Proteine abzuschätzen. Der Gellauf erfolgte in Mini-PROTEAN 3 Gelkammern bei konstant 80 V für 20 min und anschließenden 140 - 180 V in 1 x SDS-Laufpuffer (2.9). Nach dem Gellauf wurden die SDS-Gele in Coomassie-Lösung (2.9) gefärbt oder für Western Blot-Analysen (2.14.4) weiterverwendet.

	<b>6 % Trenngel (5 ml)</b>	<b>10 % Trenngel (5 ml)</b>	<b>12 % Trenngel (5 ml)</b>	<b>4 % Sammelgel (1 ml)</b>
<b>1,5 M Tris/HCl, pH 8,8</b>	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
<b>1 M Tris/HCl, pH 6,8</b>	-	-	-	130 µl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> 30 %</b>	2,6 ml	1,9 ml	1,6 ml	0,68 ml
<b>Acrylamidlösung</b>	1,0	1,7 ml	2,0 ml	170 µl
<b>10 % SDS</b>	50 µl	50 µl	50 µl	10 µl
<b>10 % APS</b>	50 µl	50 µl	50 µl	10 µl
<b>TEMED</b>	4 µl	2 µl	2 µl	1 µl

Tab. 2.18 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE.

### 2.14.3 Coomassie-Färbung (Weber & Osborn, 1969)

Die Detektion der mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine erfolgte durch Färbung mit Coomassie-Lösung (2.9). Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Die SDS-Gele wurden unter Schwenken für 10 min gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung (2.9) für 30 – 60 min entfärbt.

### 2.14.4 Western Blot (Towbin *et al.*, 1992)

Bei einem Western Blot werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und mittels spezifischer Antikörper (Tab. 2.8) detektiert. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei konstanten 170 mA für 45 min in einer Mini Trans-Blot Kammer. Anschließend wurde die Membran unter Schwenken 1 h in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Nach dreimaligen Waschen für 5 min in TBS-T (2.9), folgte die Inkubation mit einem spezifischen Primäntikörper in TBS-T für 1 h. Die Waschschritte wurden wiederholt, um ungebundene Antikörper zu entfernen und der mit Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundäntikörper wurde hinzugegeben. Nach 1 h wurde dreimal mit TBS-T gewaschen und die Proteine mit dem ECL Western Blotting Reagenz nach Angaben des Herstellers nachgewiesen. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde Peroxidasesubstrat und Luminol



zum Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper gegeben. Durch freigesetztes Peroxid wird Luminol oxidiert und das Reaktionsprodukt emittiert Licht, welches auf Röntgenfilm bzw. mittels des Chemi-Doc XRS-Systems (Bio-Rad) sichtbar gemacht werden kann.

#### **2.14.5 Markierung von Proteinen mit Biotin- oder Alexa Fluor 488-Succinimidylestern**

Die Markierung von Kollagen erfolgte mit Biotin- und Alexa Fluor 488-Succinimidylestern wie kürzlich beschrieben unter modifizierten Bedingungen (Han *et al.*, 2008). Die kovalente Bindung erfolgt hierbei über freie primäre Amine. Für die Markierung wurden 800 µl Kollagenlösung (3 mg/ml) in 2,5 M NaCl + 0,5 M NaCO<sub>3</sub>, pH 9,3 mit 10 µg/ml Biotin- bzw. Alexa Fluor 488-Succinimidylester vermischt und für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Kollagen über Nacht mit 0,5 M Essigsäure in 0,9 M NaCl gefällt. Die Kollagenlösung wurde bei 14000 rpm und 4 °C 15 min zentrifugiert und in 1 ml 2 mM HCl resuspendiert. Die Dialyse erfolgte für 4 h gegen 4 l H<sub>2</sub>O/2mM HCl sowie eine weitere Dialyse über Nacht. Die Konzentration an markiertem und unmarkiertem Kollagen wurde mittels 6 % SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Markiertes Kollagen wird nachfolgend 488-Koll I bzw. Biotin-Koll I genannt.

#### **2.14.6 MALDI-TOF**

Durch SDS-PAGE aufgetrenntes Kollagen wurde durch MALDI-TOF („Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time-Of-Flight“) Analyse identifiziert. Hierfür wurden die Proteinbanden manuell mit einem Skalpell aus den Gelen ausgestochen. Die anschließende Probenbearbeitung erfolgte wie kürzlich beschrieben, die massenspektrometrische Analyse wurde im Zentrallabor für Proteinanalytik (ZfP) (Prof. Imhof) im Adolf-Butenandt-Institut (Schillerstr. 44, 80336 München) der LMU-München in einem Voyager DE STR (Applied Biosystems, Foster City, USA) im reversen Modus durchgeführt (Schlee *et al.*, 2004, Schmid *et al.*, 2009). Die Kalibrierung der Peptidmassen erfolgte intern auf die bekannten Massen der Autolysepeptide von Trypsin. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch Herrn Tilman Schlunk und Herrn Pierre Schilcher mit Hilfe der Suchmaschine Mascot.

## **2.15 Zellbiologische Methoden**

### **2.15.1 Kultivierung von Zelllinien**

Die Kultivierung von HeLa- und CHO-Zellen (2.5.1) erfolgte in Zellkulturflaschen mit 10 ml Zellkulturmedium (2.5.2) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Für das Ablösen des konfluenten Zellrasens wurde zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,25 % Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C inkubiert, wodurch sich die adhärenenten Zellen vom Flaschenboden lösen. Die Kultivierung von J774-Makrophagen (2.5.1) erfolgte in 10 mm Zellkulturschalen mit 10 ml Zellkulturmedium (2.5.2). Wenn ein konfluenter Zellrasen erreicht war, wurden die Zellen nach Waschen mit PBS mit frischem Medium überschichtet und mit einem Zellschaber vorsichtig abgeschabt. Zur Subkultivierung wurden die Zellen in einem Verhältnis 1:3, 1:5 oder 1:10 in frischem Medium verdünnt.

### **2.15.2 Kryokonservierung**

Eukaryotische Zellen können über mehrere Jahre in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Hierzu wurden  $5 \times 10^5$  HeLa- sowie CHO-Zellen bzw.  $2,5 \times 10^6$  J774-Zellen in 1,5 ml Einfriermedium (2.3) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Zunächst wurden die Zellen bei -80 °C über Nacht eingefroren, bevor diese in einen Stickstofftank überführt wurden.

### **2.15.3 Auftauen von Zellen**

Die kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und sofort mit vorgewärmtem Zellkulturmedium versetzt, um den zellschädigenden DMSO-Gehalt zu verringern. Die Zellen wurden anschließend einmal bei 1000 rpm 5 min mit PBS gewaschen und in geeignete Kulturgefäße überführt.

### **2.15.4 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension in 90 µl Trypanblau-Lösung verdünnt. Zellen, die keine intakte Zellmembran aufweisen, nehmen den blauen Farbstoff auf, womit tote von

lebenden Zellen unterschieden werden können. Unter dem Lichtmikroskop wurden 4 Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times 10 \times 10^4$$

$$10^4 = (\text{Volumen des Großquadrates entspricht } 10^{-4} \text{ ml})$$

$$10 = \text{Verdünnungsfaktor}$$

### **2.15.5 Isolierung von polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) aus humanem Blut**

Zur Gewinnung von humanem Blut (Eigenspende) wurde ein Multifly-Set mit einem Membranadapter und eine Spritze, die zuvor mit 10 U Heparin befüllt worden war, verwendet. 10 ml heparinisiertes Blut wurde mit der gleichen Menge PBS vermischt und vorsichtig auf einen Dichtegradienten aus Polysucrose und Natrium-Diatrizoat (Histopaque<sup>®</sup>, Sigma) pipettiert. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers unter modifizierten Bedingungen. Der Dichtegradient besteht aus zwei Schichten: Die untere Schicht aus 12 ml Histopaque<sup>®</sup> 1119, mit einer Dichte von 1,119 g/ml, die obere Schicht aus 10 ml Histopaque<sup>®</sup> 1077 mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Nach der Zentrifugation (22 °C, 380 g, 20 min, ohne Bremse) befanden sich Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen in der oberen opaken Schicht. Die untere opaque Schicht, in der sich die PMNs befinden, wurde abgenommen und erneut bei 4 °C und 230 g für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde einer Erythrozytenlyse durch Lysepuffer (4,15 g NH<sub>4</sub>Cl, 500 mg KHCO<sub>3</sub>, 18 mg EDTA ad 500 ml H<sub>2</sub>O; pH 7.4) unterzogen und für exakt 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde einmal mit RPMI-Medium gewaschen (4 °C, 230 g, 10 min) und in RPMI-Medium oder FACS-Puffer dem nachfolgenden Versuch entsprechend resuspendiert.

## **2.16 Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Yersinien mit Säugerzellen**

### **2.16.1 Kultivierung von *Y. enterocolitica* für Infektionsversuche**

Yersinien wurden für Infektionsversuche mit HeLa-, CHO-Zellen, sowie J774-Makrophagen mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 10 eingesetzt. PMNs wurden mit einer MOI von 5 infiziert. Die MOI berechnet sich dabei aus dem Verhältnis der eingesetzten Bakterienanzahl und der Zellzahl pro Infektionsansatz. Yersinien wurden wie unter 2.12.1.1

beschrieben angezüchtet, 1:40 in RPMI-Medium verdünnt und bis zu einer  $OD_{600nm} \sim 0,3 - 0,4$  bei 37 °C kultiviert. Die Bakterien wurden 10 min bei 3000 rpm sedimentiert und in entsprechendem Medium ohne Zusätze aufgenommen. Die Bakterienzellzahl wurde wie unter 2.12.1.2 beschrieben photometrisch bestimmt, das Infektionsvolumen pro Ansatz berechnet und in Reaktionsgefäße überführt. Um bakterielle Aggregate zu dispergieren, wurde die Bakteriensuspension vor der Infektion durch eine Spritze mit einer 27G-Kanüle gedrückt. Die Bakterien wurden anschließend mit oder ohne 10 µg/ml Kollagen bzw. 50 µg/ml (POG)<sub>10</sub> 15 min bei 37 °C in einem Thermoschüttler inkubiert und wurden anschließend direkt für Infektionsversuche verwendet werden.

### **2.16.2 Infektionen von HeLa-Zellen**

Infektionen von HeLa-Zellen wurden unter modifizierten Bedingungen nach Nägele *et al.*, 2011, durchgeführt. Hierzu erfolgte die Kultivierung der HeLa-Zellen wie unter 2.15.1 beschrieben. Einen Tag vor Infektion wurde mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  pro Napf in 24-Napfkulturschalen ausgesät. Die Zellen verdoppelten sich über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> zu  $\sim 2 \times 10^5$  Zellen pro Napf und wurden mit einer MOI von 10 mit Yersinien inkubiert. Zur Synchronisierung des Bakterienkontaktes wurden die Bakterien 10 min bei 1000 rpm auf die Zellen zentrifugiert und für 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nicht adhärente Yersinien wurde durch dreimaliges Waschen mit RPMI entfernt. Zell-assoziierte Yersinien wurden mit 1 % Triton-X/PBS bei Raumtemperatur in Suspension gebracht. Die Bakterien wurden in geeignete Reaktionsgefäße überführt und mit 0,1 U Kollagenase für 5 min bei 37 °C inkubiert, um Kollagengebundene Bakterien voneinander zu trennen. Anschließend wurden Verdünnungsreihen hergestellt und auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Um die Zellzahl der eingesetzten Yersinien zu überprüfen, wurden von dem errechneten Infektionsvolumen ebenfalls Verdünnungsreihen angelegt und ausplattiert.

### **2.16.3 Transfektion von CHO-Zellen**

CHO-Zellen wurden wie unter 2.15.1 beschrieben kultiviert und für die Transfektion mit einer Zellzahl von  $8 \times 10^4$  in 24-Napfkulturschalen in 500 µl Medium auf Deckgläschen ausgesät. Für die Transfektion sollte ein 50 % - 80 % konfluenter Zellrasen verwendet werden (i.d.R. nach Übernachtskultur). Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers mit 2 µl Lipofectamin<sup>TM</sup>-Lösung, welche zuvor mit 50 µl Zellkulturmedium ohne

FBS für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde 1 µg Plasmid-DNS mit 50 µl Zellkulturmedium ohne FBS vermischt und zur Lipofectamin-Lösung pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur. Danach wurde der Ansatz tropfenweise auf die CHO-Zellen pipettiert und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 4 – 6 h erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Medium. Nach 24 h konnten die Zellen für weitere Analysen verwendet werden. Für den Nachweis der Produktion mittels Western Blot Analysen (2.14.4) wurden 5x10<sup>5</sup> CHO-Zellen in 6-Napfkulturschalen in 2 ml Medium ausgesät und die verwendeten Transfektionsreagenzien entsprechend angeglichen.

#### **2.16.4 Infektionen von humanen PMNs**

Für Infektionen von humanen PMNs wurde folgende Methode etabliert: PMNs wurden wie unter 2.15.5 beschrieben isoliert und mit einer Zellzahl von in Mikrotiterplatten (2x10<sup>5</sup> Zellen/96 Napf) ausgesät. Diese wurden für Adhärenzversuche mit Yersinien mit einer MOI von 5 infiziert und bei 500 rpm für 3 min (Freilauf) sedimentiert wurde. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden nicht-adhärenente Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen auf Eis gestellt. Die Nöpfe wurden zweimal mit 200 µl PBS gespült und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer (300 g, 4 °C, 10 min) wurde das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen.

#### **2.16.5 Infektionen von murinen Makrophagen**

Die murine Makrophagenzelllinie J774 wurde wie unter 2.15.1 beschrieben kultiviert und einen Tag vor Infektion mit einer Zellzahl von 5x10<sup>4</sup> in 96-Napfkulturschalen ausgesät. Die J774-Makrophagen verdoppelten sich über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> zu 1x10<sup>5</sup> Zellen pro Napf. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 mit Yersinien infiziert, wobei bei 500 rpm 3 min (Freilauf) sedimentiert wurde. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Adhäsions- und Invasionsversuche wurden wie für HeLa-Zellen (2.16.2) beschrieben durchgeführt.

## 2.17 Immunologische Methoden

### 2.17.1 Immunfluoreszenzfärbung im 3D-KoG

Immunfluoreszenzfärbungen von Yersinien im 3D-KoG erfolgten wie kürzlich beschrieben (Guggenberger *et al.*, 2012). Bakterien wurden in 0,08 % Kollagengelen wie unter 2.12.1.2 beschrieben in 15-Napf  $\mu$ -slides kultiviert und mit 0,1 % Glutaraldehyd 10 min bei 4 °C fixiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurde 3 % BSA mit 5 % Ziegen Serum in PBS verwendet und 1 h inkubiert. Anschließend wurden die KoG mit polyklonalem Ziege Kollagen Typ I- (1:100 in 5 % Kaninchenserum) oder Kaninchen Kollagen Typ I-Antiserum (1:40 in 5 % Ziegen Serum) für 1 h behandelt (Tab. 2.8). Die Detektion von Kollagen erfolgte mittels anti-Ziege-FITC (1:400) bzw. anti-Kaninchen-Alexa Fluor 488 (1:400) in 0,2 % BSA für 1 h. Zuletzt wurden die 3D-KoG-Proben mit PBS überschichtet oder in Vectashield eingebettet. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Laser scanning Fluoreszenzmikroskop (Leica TCS).

### 2.17.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

#### 2.17.2.1 Rutheniumrotfärbung und Einbettung für Elektronenmikroskopie (Hammerschmidt *et al.*, 2005)

Für die Analyse der im 3D-KoG gewachsenen Yersinien durch TEM wurden Kollagen- und Fibringele wie unter 2.12.1.2 bzw. 2.12.1.3 beschrieben hergestellt, mit einer sterilen Kanüle in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und an der Anatomischen Anstalt, Lehrstuhl II, der LMU weiterverarbeitet (Freund *et al.*, 2008) Die Fixierung erfolgte mit 100  $\mu$ l Puffer I (3,5 % Glutaraldehyd, 0,2 M Cacodylatpuffer, pH 7,3, 0,1 % Rutheniumrot). Nach 1 h Inkubation wurden die Gele dreimal mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend mit Puffer II (5 % Osmiumtetroxid, 0,2 M Cacodylatpuffer, 0,15 % Rutheniumrot) 3 h bei Raumtemperatur nachfixiert und kontrastiert. Die Proben wurden dreimal mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (Tab. 2.19) entwässert. Danach wurde zweimal mit Propylenoxid gewaschen und in einem Aralditgemisch (5,2 g Araldit, 2-3 % Beschleuniger) eingebettet. Die Polymerisierung erfolgte für 48 h bei 60 °C.

Ethanolkonzentration	Dauer
30 %	15 min
50 %	15 min
70 %	über Nacht
90 %	30 min
100 %	90 min

**Tab. 2.19 Ethanolreihe für die Entwässerung der Proben.**

Anschließend wurden die auspolymerisierten Blöcke in 0,5 µm-Semidünnschnitte am Ultracut E (Reichert-Jung/Leica, Wetzlar) und in 65 nm-Ultradünnschnitte mit einem Ultra-Cut-Mikrotom (Leica, Wetzlar), sogenannte Grids, geschnitten. Für die TEM wurden die Grids mit 100 µl Uranyl Acetat für 20 min kontrastiert und jeweils einmal mit 70 % bzw. 35 % Methanol gespült. Zuletzt folgten zwei Waschstschritte mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und nach dem Trocknen konnten die Schnitte mit einem Philips CM-10 bzw. Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop analysiert werden.

#### 2.17.2.2 Immunogoldfärbung im 3D-KoG

Für den Nachweis von YadA-gebundenem Kollagen mittels TEM wurde die Methode der Immunoelektronenmikroskopie wie kürzlich dargestellt angewandt (Kapperud *et al.*, 1987). Hierzu wurden die Yersinien im KoG wie unter 2.12.1.2 beschrieben kultiviert und 1 h bei 4 °C mit Puffer I (3,5 % Glutaraldehyd, 0,2 M Cacodylatpuffer, pH 7,3, 0,1 % Rutheniumrot) fixiert. Die Gele wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen, mit 0,2 % BSA 1 h blockiert und mit Ziege Kollagen Typ I Antiserum (1:10) 3 h inkubiert. Ungebundenes Antiserum wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die KoG über Nacht mit Kaninchen anti-Ziege 6nm-Gold Konjugat (1:20) in PBS überschichtet. Am folgenden Tag wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit Puffer I nachfixiert. Die Kontrastierung und Einbettung erfolgte wie unter 2.17.2.1 beschrieben.

### **2.17.3 Nachweis von Proteinen auf der Zelloberfläche**

#### 2.17.3.1 Nachweis von extrazellulären Matrix(ECM)-proteinen

HeLa-Zellen wurden wie unter 2.15.1 beschrieben kultiviert und mit 5 % Ziegen Serum für 1 h blockiert. Die Antikörperkonzentration wurde zuvor austitriert. Da die Zellen unfixiert gefärbt wurden, wurden alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Nach Blockierung folgte die Behandlung mit spezifischen Kollagen- bzw. Fibronectin-Antikörpern (Tab. 2.8) in 5 % Ziegen Serum für eine weitere Stunde. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Detektion der ECM-Proteine erfolgte mit Alexa Fluor 488- bzw. -555-konjugierten Sekundäntikörpern (Tab. 2.8). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 3,7 % PFA für 20 min bei Raumtemperatur fixiert, die Deckgläschen aus dem 24-Napf entnommen und auf einem Objektträger mit Antifade DAPI eingebettet.

Isolierte humane PMNs wurden mit 3,7 % PFA fixiert und anschließend dreimal gewaschen. Die Immunfluoreszenzfärbung von PMNs mit spezifischen Kollagen Typ I Antiserum erfolgte wie für HeLa-Zellen beschrieben.

#### 2.17.3.2 Bestimmung der Reinheit humaner PMNs

PMNs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation wie unter 2.15.5 beschrieben isoliert und die Zellzahl bestimmt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in FACS-Puffer aufgenommen, mit F<sub>c</sub>-Blocking Reagenz für 10 min inkubiert und dreimal gewaschen. Anschließend wurde mit Maus anti-human-CD66abce-APC Konjugat (1:100) 10 min im Kühlschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer (300 g, 4 °C, 5 min) wurde der prozentuale Anteil an PMNs (CD66abce-positive Zellen) anhand durchflusszytometrischer Analysen bestimmt.

#### 2.17.3.3 Nachweis von zellulären Oberflächenrezeptoren

Für den Nachweis von MARCO („macrophage receptor with collagenous structure“) wurden J774-Zellen wie unter 2.16.5 beschrieben ausgesät und gegebenenfalls nach 4 h mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS überschichtet. Der F<sub>c</sub>-Rezeptor wurde mit 5 % Maus Serum in 3 % BSA blockiert. Als Blockierungskontrolle wurde Maus IgG-APC-Konjugat verwendet. Anschließend wurden



die J774-Makrophagen für 1 h im Kühlschrank mit monoklonalem MARCO-Antikörper (Ratte) (1:100) in 3 % BSA behandelt und dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Ziege anti-Ratte Alexa Fluor 647-Konjugat (1:10000) in 3 % BSA für 45 min bei 4 °C. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt und anschließend wurden die Zellen mit 4 % PFA für 20 min bei 4 °C fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Makrophagen mit 100 µl FACS-Puffer überschichtet und mit einer blauen Pipettenspitze (1 ml) vorsichtig aus dem 96-Napf abgeschabt.

Für den Nachweis der MARCO-/H420-Produktion von transient transfizierten CHO-Zellen (2.16.3) erfolgte der Nachweis mit human-MARCO<sub>ct</sub> spezifischen Kaninchenserum, welches die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors erkennt. Deshalb wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und anschließend mit 0,1 % Triton-X 100 für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Es wurde anschließend sorgfältig 3mal mit PBS gewaschen und mit 3 % BSA 1h bei RT blockiert. Nach der einstündigen Inkubation mit human-MARCO<sub>ct</sub> spezifischen Kaninchenserum (1:100), folgte die Zugabe des Sekundäntikörpers Ziege anti-Kaninchen Alexa555-Konjugat (1:1000) für 1 h. Die Deckgläschen aus dem 24-Napf wurden vorsichtig entnommen und auf einem Objektträger mit Antifade DAPI eingebettet.

## **2.17.4 Nachweis von YadA-gebundenem Kollagen**

### 2.17.4.1 Nachweis im 3D-Ko488G

Yersinien wurden in 0,08 % Kollagengelen mit 488-Koll I wie unter 2.12.1.2 beschrieben in 15-Napf „µ-slides“ (Tab. 2.12) über Nacht kultiviert und unfixiert mikroskopiert (3D-Ko488G). Die Analyse von Yersinien und Kollagen erfolgte am PerkinElmer „spinning disc“-Fluoreszenzmikroskopsystem (Nikon Eclipse TE300) (Tab. 2.20).

### 2.17.4.2 Nachweis in Flüssigkulturen

Für die Detektion von YadA-gebundenem Kollagen in Flüssigkulturen wurde folgende Methode etabliert: Hierzu wurden Yersinien wie unter 2.12.1.1 beschrieben über Nacht angezüchtet und 1:20 in RPMI bis zu Erreichen von einer OD<sub>600nm</sub> von ~ 0,3 - 0,4 bei 37 °C geschüttelt. Die Kulturen wurden bei 4500 g 10 min sedimentiert und ca.  $8 \times 10^7$  Yersinien in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Für Blockierung der Kollagenbindung wurden die

Bakterien zuerst mit dem trimeren Peptid (POG)<sub>10</sub> für 15 min bei 37°C behandelt, überschüssiges Peptid durch Zentrifugation (4500 g, 5 min) entfernt und anschließend mit 10 µg/ml 488-, Biotin-Koll I bzw. unmarkiertem Kollagen Typ I ebenfalls für 15 min bei 37°C inkubiert. Um ungebundenes Kollagen zu entfernen, wurden die Bakteriensuspensionen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und entweder in 100 µl FACS-Puffer oder 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Bei Verwendung von 488-Koll I erfolgte die Analyse durchflusszytometrisch am FACS CantoII im FITC-Kanal oder im Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61). Bei Verwendung von Biotin-Koll I wurden die Proben zum Western Blotting weiterverarbeitet und das gebundene Biotin-Koll I mit Streptavidin Peroxidase-Konjugat (1:10000) detektiert.

Gegebenenfalls wurde das Kollagen bzw. die mit Kollagen bereits inkubierten Yersinien mit Kollagenase bei 37 °C ohne Schütteln behandelt. Konzentrationen von 0,01 U/µl bis 0,5 U/µl wurden für den Verdau verwendet. Die Dauer ist im jeweiligen Versuch angegeben und betrug wenigstens 2 min. Anschließend wurde die Behandlung mit 1,25 mM EGTA gestoppt.

## 2.18 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Die Mikroskope, die bei der jeweiligen Methode in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tab. 2.20 aufgelistet.

<b>Methode</b>	<b>Mikroskop</b>
<b>Mikrokoloniebildung im 3D-KoG</b>	Olympus BX61
<b>Immunfluoreszenzfärbung im 3D-KoG</b>	Leica TCS
<b>3D-Ko488G</b>	PerkinElmer „spinning disc“-Mikroskopsystem mit Nikon Eclipse TE300
<b>Immunfluoreszenzfärbung von eukaryotischen Zellen</b>	Leica TCS-SP5, Olympus BX61
<b>Elektronenmikroskopie</b>	Philips CM-10/Zeiss EM 10

**Tab. 2.20** Aufführung der verwendeten mikroskopischen Methoden.

Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ 1.44p Software (National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>).

## **2.19 Auswertung durchflusszytometrischer Analysen**

Für durchflusszytometrische Analysen wurden 50.000 (Bakterien) bzw. 10.000 – 20.000 Ereignisse jeder Probe im FACS Canto II gemessen und ausgewertet. Hierzu wurde zunächst eine Population im Punktwolkendiagramm mittels des Größen- (FSC) und Granularitätsparameters (SSC) festgelegt. Die Fluoreszenzsignale wurden so eingestellt, dass die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der ungefärbten Zell- oder Bakterienpopulation ungefähr bei einem Wert von 100 lag. Für die Untersuchung der Expression von Oberflächenrezeptoren wurde die geometrische MFI der Probe gemessen und in Relation zur ungefärbten Probe gesetzt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels FlowJo-8.4.6 Software (Tree Star Inc, San Carlos).

## **2.20 Statistische Auswertung**

Kollagenbindungs- und Infektionsversuche mit Säugerzellen wurden mindestens dreimal in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Von den Ergebnissen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt, sowie die Signifikanz der Ergebnisse durch den Student T-Test berechnet. Der T-Test wurde ungepaart und zweiseitig durchgeführt mittels Graph Pad Prism 5.0 Software (Graph Pad Software Inc, La Jolla, USA). Signifikanz-Werte von  $(p) \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angenommen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Yersinien im 3D-KoG

Untersuchungen zum Wachstum von *Y. enterocolitica* im 3D-Kollagengel (KoG) haben gezeigt, dass die pathogenen Stämme in dicht gepackten Mikrokolonien (DPM) wachsen (Freund *et al.*, 2008, Czech, 2011). Dieses Wachstumsverhalten ist abhängig vom Virulenzplasmid pYV und dem *Yersinia* Adhäsion A (YadA), da plasmidlose WA-c Stämme planktonisch (PLT) und die *yadA*-Deletionsmutante WA(pYV $\Delta$ YadA) in locker gepackten Mikrokolonien (LPM) wachsen (siehe S.19, Abb. 1.2).

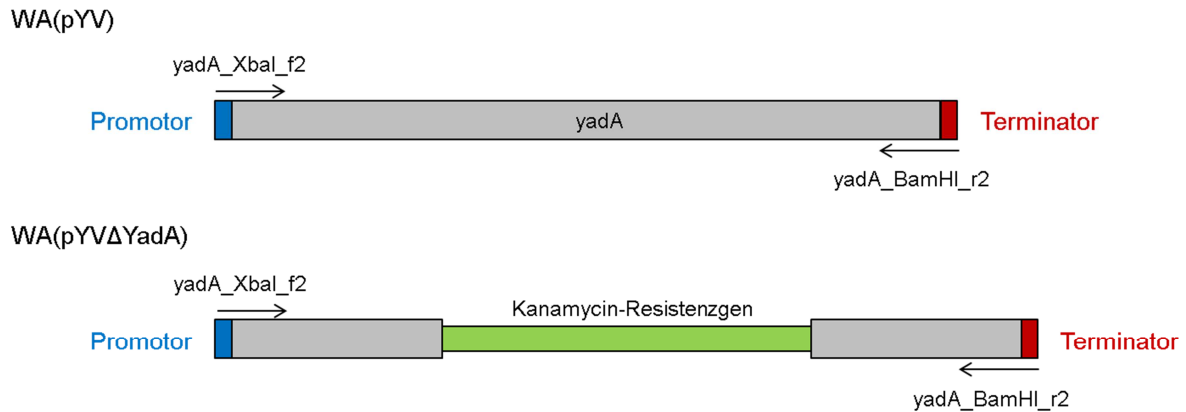
Zudem bewirkt YadA auch die Autoagglutination der Yersinien, falls diese in Zellkulturmedium, wie RPMI, bei 37 °C statisch kultiviert werden (Balligand *et al.*, 1985), wobei eine *yadA*-Deletionsmutante zur Aggregation neigt und instabile Mikroaggregate bildet. Die Ergebnisse unterstützen das beobachtete Wachstumsverhalten von LPM- und DPM-Phänotyp der Yersinien im 3D-KoG. Um einen zweiten Faktor, der für das LPM Wachstum des WA(pYV $\Delta$ YadA) Stammes verantwortlich ist, zu identifizieren, wurden in den plasmidlosen WAc Stamm das Plasmid pT3SS (2.1.3) sowie das Plasmid pYadA eingeführt. Die erhaltenen rekombinanten Stämme wurden im 3D-KoG auf ihr Wachstumsverhalten überprüft.

#### 3.1.1 Konstruktion einer *yadA*-Deletionsmutante in WA(pT3SS) durch homologe Rekombination

*yadA* wurde durch homologe Rekombination nach der Methode von Datsenko und Wanner (2.13.7) in dem Plasmid pT3SS (2.1.3) durch allelen Austausch einer Chloramphenicol-Resistenz-Kassette deletiert (Datsenko & Wanner, 2000). Das Plasmid pT3SS besitzt neben YadA und den Translokonproteinen YopB und YopD alle Gene für das Ysc-T3SS, jedoch keine Gene für T3SS-Substrate, die Effektorproteine Yops („*Yersinia* outer proteins“) (Trülzsch *et al.*, 2003). Nachfolgend wird der Stamm WA(pT3SS $\Delta$ YadA) genannt (Tab. 2.1).

### 3.1.2 Herstellung von *yadA*- und $\Delta yadA$ -exprimierenden Yersinien in $WAc^{RS}$

Für die Herstellung von *yadA*-positiver sowie -negativer Yersinien wurde ein PCR-Produkt mit den Primern *yadA\_XbaI\_f2* und *yadA\_BamHI\_r2* (2.2) amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNS der Stämme  $WA(pYV)$  und  $WA(pYV\Delta YadA)$  (2.13.8) (Abb. 3.1).



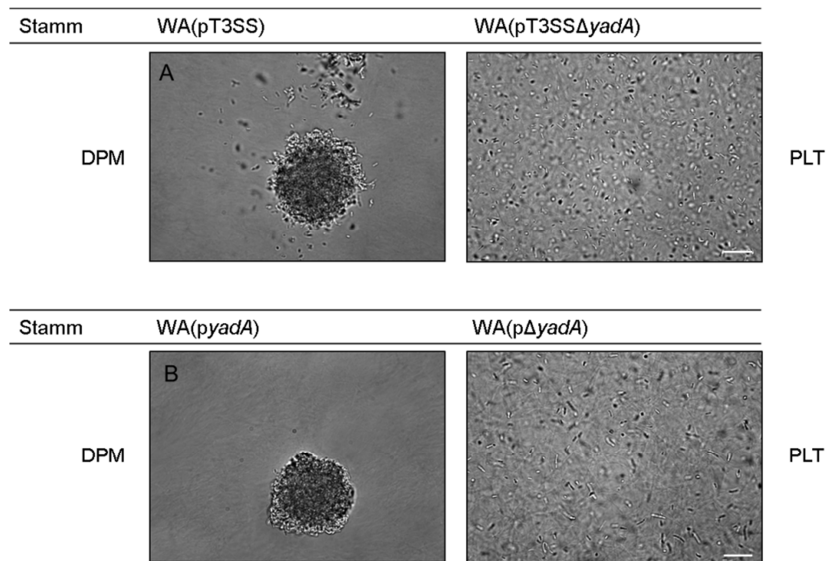
**Abb. 3.1 Strategie zur Herstellung von *yadA*- und  $\Delta yadA$ -exprimierenden Yersinien.**

Mit den Primern *yadA\_XbaI\_f2* und *yadA\_BamHI\_r2* wurde ein PCR-Produkt mit genomischer DNS der Stämme  $WA(pYV)$  bzw.  $WA(pYV\Delta YadA)$  amplifiziert.

Das entstandene PCR-Fragment sowie der Zielvektor pACYC184 wurden mit *Bam*HI und *Xba*I verdaut und ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide pYadA und p $\Delta$ YadA wurden in elektrokompente  $WAc^{RS}$  Empfängerzellen transformiert und chloramphenicolresistente ( $Cm^R$ ) Kolonien mittels PCR getestet. Zusätzlich wurden die Plasmide reisoliert und die eingebrachte Gensequenz durch Sequenzierung überprüft. Diese rekombinanten Yersinien werden nachfolgend  $WA(pYadA)$  bzw.  $WA(p\Delta YadA)$  genannt (Tab. 2.3).

### 3.1.3 Einfluss der Yops auf die LPM-Morphologie im 3D-KoG

Die Stämme  $WA(pT3SS)$  und  $WA(pT3SS\Delta YadA)$  wurden im 3D-KoG angezüchtet und auf Mikrokoloniebildung durch Hellfeldmikroskopie charakterisiert. Der *YadA*-positive Stamm  $WA(pT3SS)$  bildete DPM, wohingegen der *YadA*-negative Stamm  $WA(pT3SS\Delta YadA)$  überraschenderweise planktonisches Wachstumsverhalten (PLT) zeigte (Abb. 3.2, A). Somit kann das Injektisom als zusätzlicher Faktor für die Mikrokoloniebildung im 3D-KoG ausgeschlossen werden. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch das Wachstumsverhalten der Stämme  $WA(pYadA)$  und  $WA(p\Delta YadA)$ : im 3D-KoG bildet  $WA(pYadA)$  DPM, wobei der *YadA*-negative  $WA(p\Delta YadA)$  PLT wuchs (Abb. 3.2, B).



**Abb. 3.2 Hellfeldmikroskopie von WA(pT3SS), WA(pT3SSΔYadA), WA(pYadA) und WA(pΔYadA) im 3D-KoG.**

WA(pT3SS) (A, links) und WA(pYadA) (B, links) wachsen in DPM, WA(pT3SSΔYadA) (A, rechts) und WA(pΔYadA) (B, rechts) planktonisch (PLT). 0,15 % KoG, 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Der Größenbalken entspricht 20 μm.

Zusammenfassend zeigen YadA-positive Yersinien DPM-Wachstum im 3D-KoG, wobei ein funktionelles T3SS dabei keine Rolle spielt. YadA-negative Stämme, die keine Yop Effektorproteine sekretieren, zeigen planktonisches Wachstumsverhalten, wohingegen der Yop-sekretierende Stamm WA(pYVΔYadA) als LPM wächst (S. 19, Abb. 1.2, B). Weiterhin ist der DPM-Phänotyp assoziiert mit der Bildung der fibrillären Kapsel im 3D-KoG, wohingegen diese bei LPM- bzw. PLT-wachsenden Yersinien abwesend ist. Deshalb sollte der Ursprung der fibrillären Kapsel von Yersinien aufgeklärt werden.

### 3.2 Charakterisierung der fibrillären Kapsel auf der Bakterienoberfläche

Kürzlich konnte durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gezeigt werden, dass *Y. enterocolitica* WA(pYV) eine 100 nm dicke fibrilläre Kapsel (FK) auf der Bakterienoberfläche aufweist, wenn dieser in DPM in einem 3D-KoG gewachsen ist (Freund *et al.*, 2008) (S. 21, Abb. 1.4). Die Bildung der FK ist abhängig von YadA, denn WA(pYVΔYadA) bilden keine FK. Die FK könnte aber auch YadA-assoziiert sein: Zum Einen spricht die Sichtbarmachung durch Rutheniumrot in der TEM für Polysaccharide,

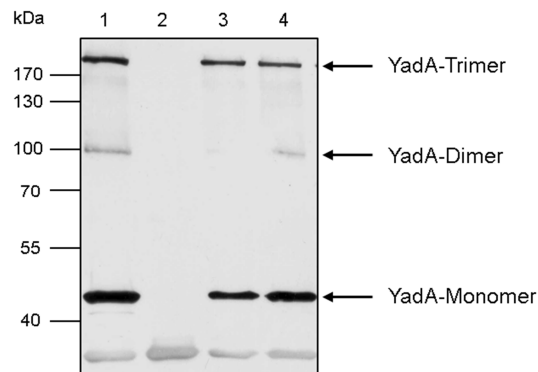
welche sich an YadA anlagern können und somit zur bakteriellen Kapselbildung beitragen (Hammerschmidt *et al.*, 2005, Moe *et al.*, 2010). Zahlreiche Mitglieder der *Enterobacteriaceae* produzieren polysacchridhaltige Kapseln, welche an der Biofilmbildung beteiligt sind (Whitfield, 2006). Desweiteren könnte die FK auch aus glycosiliertem YadA bestehen. Oberflächenproteine von *Campylobacter jejunii* können durch das O- oder N-Glycosylierungssystem modifiziert werden (Logan *et al.*, 1989, Szymanski *et al.*, 1999). Die O-Glycosylierung des Flagellins von *C. jejunii* resultiert in antigener Variation, wobei die N-Glycosylierung *in vitro* eine Rolle in Adhäsion und Invasion von Säugerzellen spielt (Szymanski *et al.*, 2002, Harris *et al.*, 1987). Die FK könnte aber auch einen proteinhaltigen Ursprung haben, wie z.B: Fibrillen oder Pili. MyfA-Fibrillen werden im sauren pH (pH 6,5 - 5,0) produziert und stellen ein polymeres Protein dar (Iriarte *et al.*, 1993). Auch elektronenmikroskopisch konnte das in *Y. pestis* homologe Psa („pH 6 antigen“) als fibrilläre Struktur nachgewiesen werden (Lindler & Tall, 1993). Um die Struktur und die Natur der fibrillären Kapsel zu charakterisieren, wurden Yersinia-Deletionsmutanten von Genen hergestellt, die verantwortlich sein könnten für die Produktion der FK.

Eine *myfA*-Mutante, die keine Myf-Fibrillen mehr produziert, wurde bereits von Freund *et al.* analysiert, wobei keine Unterschiede in der Bildung von FK im Vergleich zu WA(pYV) in der TEM bestimmt werden konnten (Freund *et al.*, 2008). Mögliche Polysaccharide, die zur bakteriellen Kapselbildung beitragen könnten, sind Poly-N-Acetylglucosamin (PNAG,  $\beta(1,6)$ ) sowie  $\beta$ -1,4-Cellulose. Das Operon *hmsHFRS* von *Y. pestis* kodiert für die Biosynthese und den Transport von PNAG (Perry *et al.*, 2004) und konnte auch in der Genomsequenz von *Y. enterocolitica* 8081 gefunden werden. Dieses Exopolysaccharid wird ebenfalls von *E. coli* gebildet und ist essentiell für die Biofilmbildung (Itoh *et al.*, 2008). Der Transport von PNAG über die bakterielle Membran ist abhängig von HmsH, welches die Funktion als Porin besitzt (Lillard *et al.*, 1997). Das Operon *bcsABCD* kodiert für die Biosynthese von  $\beta$ -1,4-Cellulose, wobei BcsA als Cellulose Synthase fungiert und essentiell für die Produktion dieses Polysaccharids ist (Zogaj *et al.*, 2001). Der Einfluss von *hmsH* und *bcsA* auf die FK-Bildung wurde im Folgenden weiter untersucht. Um Yersinien-spezifische Gene an der Beteiligung der FK-Bildung auszuschließen, wurden zusätzlich YadA-produzierende *E. coli* Stämme hergestellt und analysiert.

### 3.2.1 Der Einfluss von *Yersinia*-Genen bezüglich der fibrillären Kapsel im 3D-KoG

Die Gene *hmsH* und *bcsA* wurden nach der Methode von Datsenko und Wanner (2.13.7), wie schon für die Deletion von *yadA* (3.1.1) beschrieben, durch homologe Rekombination im Stamm WA(pYV) durch allelen Austausch einer Chloramphenicol-Resistenz-Kassette deletiert. Die Vorwärtsprimer wurden dabei so gewählt, dass auch die vorhergesagte Promotorsequenz deletiert wird.

Um die FK-Bildung der Polysaccharidmutanten WA(pYV) $\Delta$ *hmsH* und WA(pYV) $\Delta$ *bcsA* mit dem Stamm WA(pYV) vergleichen zu können, wurden diese zunächst auf YadA-Produktion und Mikrokoloniebildung im KoG untersucht. Hierzu wurden Ganzzelllysate der  $\Delta$ *hmsH*- und  $\Delta$ *bcsA*-Deletionsmutanten, sowie WA(pYV) als Positivkontrolle und WAc als Negativkontrolle mittels Immunoblot analysiert. Das YadA-Trimer (~ 190 kDa), -Dimer (~ 100 kDa) und -Monomer (45 kDa) konnte für WA(pYV) und die beiden Deletionsmutanten WA(pYV) $\Delta$ *hmsH* und WA(pYV) $\Delta$ *bcsA* in vergleichbaren Mengen und Größen nachgewiesen werden (Abb. 3.3, Spur 1, 3 und 4; Negativkontrolle Spur 2). Die YadA-Modifizierung durch HmsH oder BcsA konnte durch den Immunoblot nicht nachgewiesen werden.

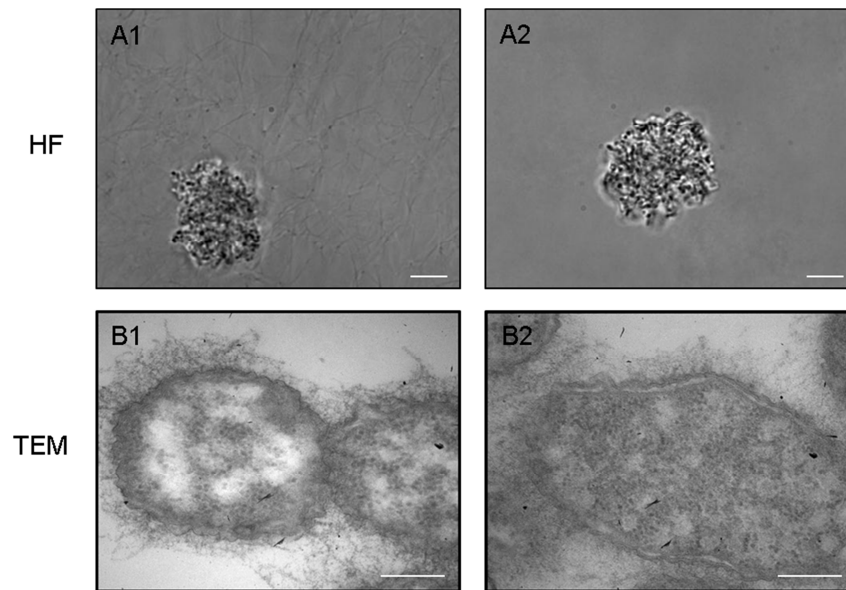


**Abb. 3.3 Immunoblot zur Kontrolle der YadA-Produktion.**

10  $\mu$ l der Ganzzelllysate ( $\sim 2,5 \times 10^7$  Zellen) WA(pYV) (1), WAc (2), WA(pYV) $\Delta$ *hmsH* (3) und WA(pYV) $\Delta$ *bcsA* (4) wurden auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und nach Western Blot mit spezifischen YadA Antiserum detektiert. Das YadA von WA(pYV) (1), WA(pYV) $\Delta$ *hmsH* (3) und WA(pYV) $\Delta$ *bcsA* (4) kann als Trimer (~ 190 kDa), Dimer (~ 100 kDa) und Monomer (~ 45 kDa) nachgewiesen werden.

Da die FK-Bildung im Zusammenhang mit der DPM-Bildung im 3D-KoG steht, wurden die Polysaccharidmutanten WA(pYV) $\Delta$ *hmsH* und WA(pYV) $\Delta$ *bcsA* in einem 3D-KoG lichtmikroskopisch auf Koloniebildung analysiert.





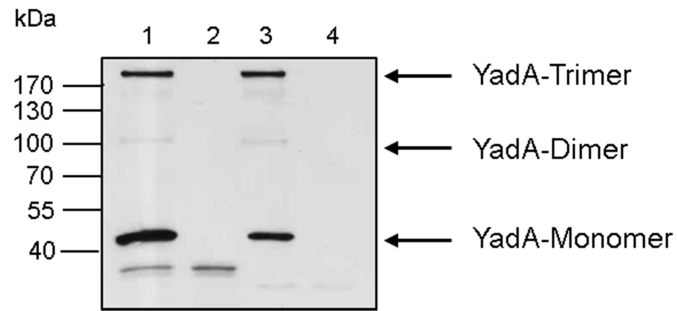
**Abb. 3.4 Hellfeldmikroskopie (HF) und Elektronenmikroskopie (TEM) von *WA(pYV)ΔhmsH* und *WA(pYV)ΔbcsA* im 3D-KoG.**

*WA(pYV)ΔhmsH* (A1, B1) und *WA(pYV)ΔbcsA* (A2, B2) bilden DPM (Hellfeld) bzw. eine fibrilläre Kapsel (FK) (3D-KoG). 0,15 % KoG, 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Kontrastierung im TEM erfolgte mit Rutheniumrot. Der Größenbalken entspricht 20 μm (A1, A2) bzw. 2000 Å (B1, B2).

Die Stämme *WA(pYV)ΔhmsH* und *WA(pYV)ΔbcsA* zeigten die typische DPM-Bildung (Abb. 3.4, A1 und A2). Des Weiteren konnte elektronenmikroskopisch (TEM) eine zu *WA(pYV)* vergleichbare fibrilläre Kapselbildung sichtbar gemacht werden (Abb. 3.4, B1 und B2). Somit tragen wahrscheinlich weder Poly-N-Acetylglucosamin noch Cellulose zur Yersinien-Kapselbildung im 3D-KoG bei.

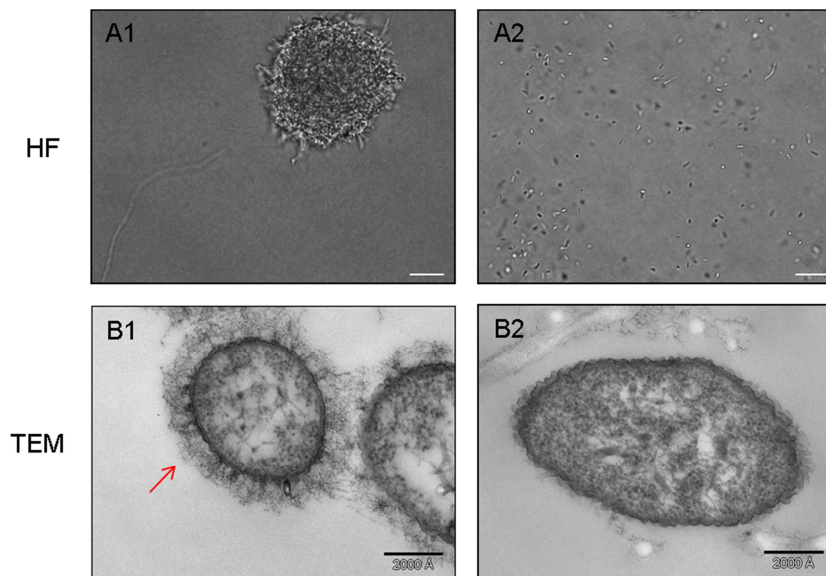
Um neben *hmsH* und *bcsA* auch andere *Yersinia*-spezifische chromosomale Gene an der Beteiligung der FK auszuschließen, wurde das Plasmid pUC::YadA in *E. coli* DH5α transformiert. DH5α(pUC::YadA) und die Negativkontrolle DH5α(pUC13) wurden zunächst auf YadA-Produktion getestet und anschließend auf Mikrokoloniewachstum und FK-Bildung im 3D-KoG untersucht. Im Immunoblot zum Nachweis der YadA-Produktion konnten vergleichbare Mengen des YadA-Trimers (~ 190 kDa), -Dimers (~ 100 kDa) und -Monomers (~ 45 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 3.5, Spur 1 und 3). DH5α(pUC13), *WA(pYV)ΔYadA* dienten als Negativkontrollen (Abb. 3.5, Spur 2 und 4).

Für die Charakterisierung der Mikrokoloniebildung der Stämme DH5α(pUC::YadA) und DH5α(pUC13), wurden diese in einem 3D-KoG angezchtet und mikroskopiert. DH5α(pUC::YadA) zeigte wie auch *WA(pYV)* DPM-Bildung, wobei DH5α(pUC13), ähnlich wie der plasmidlose *WAc*, planktonisch wuchs (Abb. 3.6, A1 und A2).



**Abb. 3.5 Immunoblot zur Kontrolle der YadA-Produktion.**

10  $\mu$ l der Ganzzelllysate ( $\sim 2,5 \times 10^7$  Zellen) WA(pYV) (1), WA(pYV $\Delta$ YadA) (2), DH5 $\alpha$ (pUC::YadA) (3) und DH5 $\alpha$ (pUC13) (4) wurden durch eine 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot mit spezifischen YadA Antiserum detektiert. Das YadA von WA(pYV) und DH5 $\alpha$ (pUC::YadA) kann als Trimer, Dimer und Monomer in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden. WA(pYV $\Delta$ YadA), DH5 $\alpha$ (pUC13): Negativkontrollen.



**Abb. 3.6 Hellfeldmikroskopie (HF) und Elektronenmikroskopie (TEM) von DH5 $\alpha$ (pUC::YadA) und DH5 $\alpha$ (pUC13) im 3D-KoG.**

DH5 $\alpha$ (pUC::YadA) (A1, B1) bildet DPM und FK (Pfeil). DH5 $\alpha$ (pUC13) (A2, B2) mit planktonischem Wachstum ohne FK. 0,15 % KoG, 16 h bei 37  $^{\circ}$ C und 5 % CO $_2$ . Der Größenbalken entspricht 20  $\mu$ m (A1, A2) bzw. 2000  $\text{Å}$  (B1, B2).

Elektronenmikroskopisch konnte auch bei dem YadA-produzierenden *E. coli*-Stamm eine FK-Bildung auf der Bakterienoberfläche sichtbar gemacht werden, die von Struktur und Größe der FK von WA(pYV) ähnelt (Abb. 3.6, B1). Der YadA-negative DH5 $\alpha$ (pUC13)

zeigte hingegen keine fibrillären Oberflächenstrukturen (Abb. 3.6, B2). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass sehr wahrscheinlich nur YadA für die Bildung der fibrillären Kapsel im 3D-KoG von bakterieller Seite erforderlich ist.

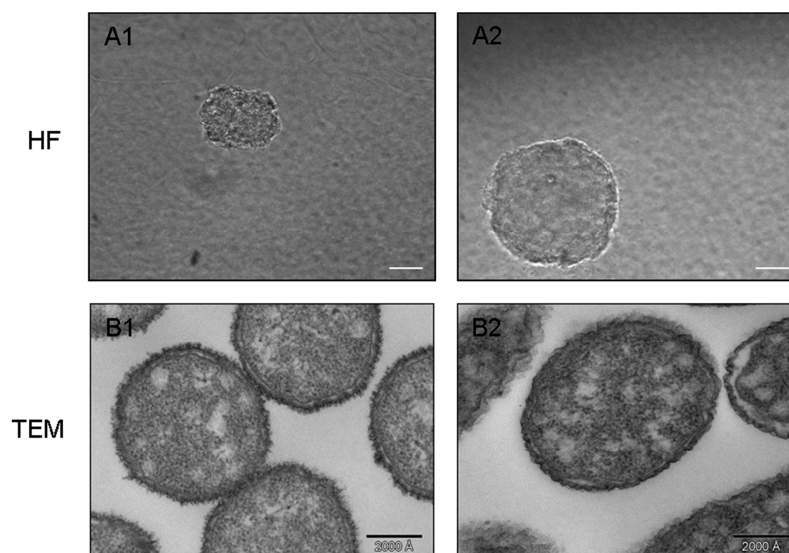
### **3.2.2 Die Bildung der fibrillären Kapsel ist abhängig von Kollagen**

Bei der Kollagenfaserbildung werden aus den trimeren Kollagenfibrillen ( $\alpha_1$ )<sub>2</sub>( $\alpha_2$ ) die typisch multimeren Fasern während der Gelierung gebildet. Bisher war es üblich, die Bindung der YadA-positiven Yersinien an immobilisiertes Kollagen in Mikrotiterplatten zu testen. Diese Methode differenziert nicht zwischen Bindung an Kollagenfibrillen oder makroskopischen Fasern. Es wurden deshalb verschiedene Tests entwickelt, um nachzuweisen, dass die FK aus Kollagenfibrillen besteht.

#### **3.2.2.1 Im Fibringel bilden YadA-positive Yersinien keine fibrilläre Kapsel aus**

Es ist bekannt, dass YadA an verschiedene Kollagentypen, Fibronectin und Laminin bindet, nicht aber an Fibrinogen oder Fibrin. Es wurde deshalb geprüft, ob Yersinien auch in einem inerten Gel aus Fibrin die FK ausbildet.

Hierfür wurden die Stämme WA(pYV) und WA(pYV $\Delta$ YadA) in einem 3D-Fibringel angezüchtet (2.12.1.3). Beide Stämme zeigten auch im Fibringel Mikrokoloniebildung (Abb. 3.7, A1 und A2), wobei jene von WA(pYV $\Delta$ YadA) im Gegensatz zum LPM-Phänotyp im 3D-KoG, auch durch DPM-Bildung charakterisiert war. Eine fibrilläre Kapsel konnte weder auf der Oberfläche von WA(pYV) noch von WA(pYV $\Delta$ YadA) in der TEM sichtbar gemacht werden (Abb. 3.7, B1, B2). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Mikrokoloniewachstum selbst nicht entscheidend ist für die Kapselbildung, sondern das Kollagen in der Matrix des 3D-Gels.



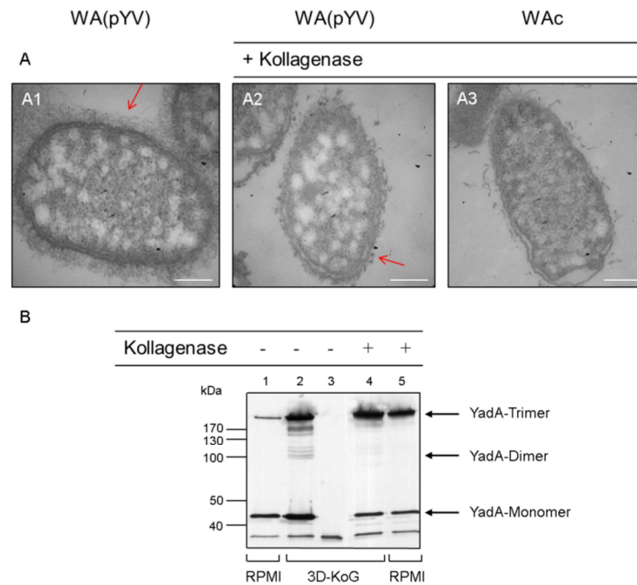
**Abb. 3.7 Hellfeldmikroskopie (HF) und Elektronenmikroskopie (TEM) von WA(pYV) und WA(pYVΔYadA) im 3D-Fibrin-Gel.**

WA(pYV) (A1, B1) und WA(pYVΔYadA) (A2, B2) bilden DPM, zeigen jedoch keine fibrilläre Kapsel. 0,15 % KoG, 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Der Größenbalken entspricht 20 μm (A1, A2) bzw. 2000 Å (B1, B2).

### 3.2.2.2 Charakterisierung der fibrillären Kapsel nach Kollagenaseverdau

Um zu prüfen, ob die FK aus Kollagenfibrillen besteht, wurde das Yersinia-3D-KoG mit Kollagenase behandelt. Nach Wachstum von WA(pYV) im 3D-KoG über Nacht und anschließender Kollagenasebehandlung zeigten die Bakterienzellen in der TEM im Vergleich ohne Kollagenasebehandlung keine FK mehr auf der Bakterienoberfläche (Abb. 3.8, A1 und A2). Sichtbar war die YadA-lollipop-Struktur, wobei diese sich von WA(pYV) Stämmen, welche in Zellkulturmedium kultiviert wurden, unterschied (vgl. Abb. 1.1, B). Ebenfalls wies die Außenmembran von YadA-negativen Kollagenase-behandelten WAc Stämmen eine unterschiedliche Struktur im Vergleich zu unbehandelten WAc auf. (vgl. Abb. 1.4, C und Abb. 3.8, A3). Um auszuschließen, dass die Kollagenase das YadA angreift, wurde ein Western Blot mit YadA Antiserum zum Nachweis von YadA nach Kollagenasebehandlung des 3D-KoGs durchgeführt. Der Immunoblot zeigt, dass ein stabiles YadA-Trimer auch nach Kollagenasebehandlung der Yersinien im 3D-KoG oder in RPMI-Medium nachzuweisen ist (Abb. 3.8, B, Spur 4 und 5). Die Größe von ca. 190 kDa stimmt mit den Positivkontrollen WA(pYV) in RPMI bzw. im 3D-KoG überein (Abb. 3.8, B, Spur 1 und 2). Der plasmidlose Stamm WA-c diente als Negativkontrolle. Durch die Kollagenase wurde allein die

Kollagenmatrix verdaut, das Außenmembranprotein YadA scheint resistent gegenüber Kollagenase zu sein.



**Abb. 3.8 Elektronenmikroskopische Darstellung von Yersinien im 3D-KoG und Immunoblot mit Kaninchen anti-YadA Serum.**

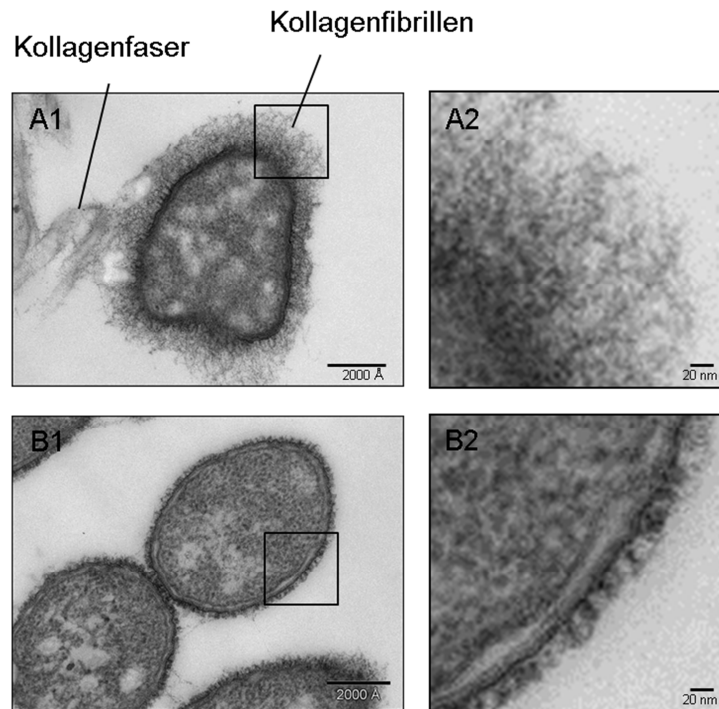
A: WA(pYV) im 3D-KoG (A1). WA(pYV) (A2) und WAc (A3) im 3D-KoG gewachsen nach anschließender Kollagenasebehandlung. WA(pYV) zeigt FK-Bildung im unbehandelten 3D-KoG (Pfeil). Die Kollagenasebehandlung führt zur Auflösung der FK bei WA(pYV) und macht die YadA-lollipop-Struktur zugleich sichtbar (Pfeil). WA-c (Negativkontrolle) (A3). 0,15 % KoG, 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Der Größenbalken entspricht 2000 Å.

B: 10 µl der Ganzzelllysate ( $\sim 2,5 \times 10^7$  Zellen) von WA(pYV) in RPMI (1), WA(pYV) (2) und WA-c im 3D-KoG (3), WA(pYV) im 3D-KoG (4) und in RPMI (5) nach Kollagenasebehandlung wurden durch eine 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot mit YadA Antiserum detektiert. Das YadA-Protein von WA(pYV) ist auch nach Kollagenasebehandlung als Trimer nachweisbar (4 und 5). WA(pYV) in RPMI (1) und im KoG (2) (Positivkontrolle), WA-c (Negativkontrolle) (3).

### 3.2.3 Die Bildung der fibrillären Kapsel ist abhängig von der Kollagenbindungsfähigkeit von YadA

Um einen weiteren Hinweis zu erhalten, dass die FK aus Kollagenfibrillen besteht, wurde das Wachstum und die Mikrokoloniestruktur der kollagenbindungsdefizienten Mutante WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>) im 3D-KoG untersucht. Bei dieser Mutante wurden zwei Histidin-Kodons des YadA<sub>H156Y/H159Y</sub> zu Tyrosin-Kodons konvertiert (Roggenkamp *et al.*, 1995).

Lichtmikroskopische Untersuchungen zum Wachstumsverhalten dieser Mutante im 3D-KoG zeigten einen WA(pYV)-vergleichbaren DPM-Phänotyp (Freund *et al.*, 2008).



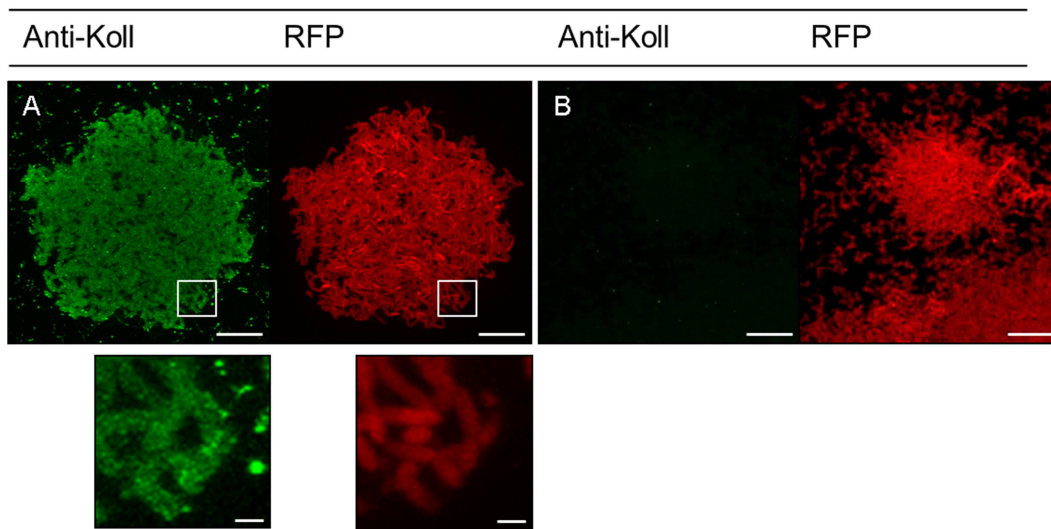
**Abb. 3.9 Elektronenmikroskopische Darstellung (TEM) von WA(pYV) und WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>) im 3D-KoG.**

WA(pYV) zeigt die fibrilläre Kollagenkapsel auf der Bakterienoberfläche (A1, Ausschnitt A2). WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>) besitzt kein FK, die Oberflächenstruktur entspricht dem YadA-Protein (B1, Ausschnitt B2). 0,15 % KoG, 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Der Größenbalken entspricht 2000 Å bzw. 20 nm.

Wie in Abb. 3.9 gezeigt, bildet die kollagenbindungsdefiziente Mutante (B1, B2) keine FK aus. Bei starker Vergrößerung (B2) ist die 23 nm-dicke YadA-lollipop Struktur auf der Außenmembran zu erkennen. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die 100 nm-dicke fibrilläre Kapsel von WA(pYV) (A1, A2) wahrscheinlich aus Kollagenfibrillen besteht. Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse, dass der Mikrokolonie Phänotyp DPM durch YadA vermittelt wird, aber nicht von der Kollagenbindung des YadA Proteins abhängig ist.

### 3.3 Detektion von Kollagen auf der bakteriellen Zelloberfläche mittels Immunfluoreszenz- und Immunelektronenmikroskopie

Zum direkten Nachweis von Kollagen auf der Bakterienoberfläche von Yersinien im 3D-KoG wurde die Methode der Immunfluoreszenz- bzw. Immunogoldfärbung angewandt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden rot-fluoreszierende (RFP) Yersinien im 3D-KoG angezüchtet. Nach Fixierung erfolgte die Detektion des gebundenen Kollagens mit Kaninchen anti-Kollagen Typ I Serum und Ziege anti-Kaninchen IgG FITC-Konjugat.

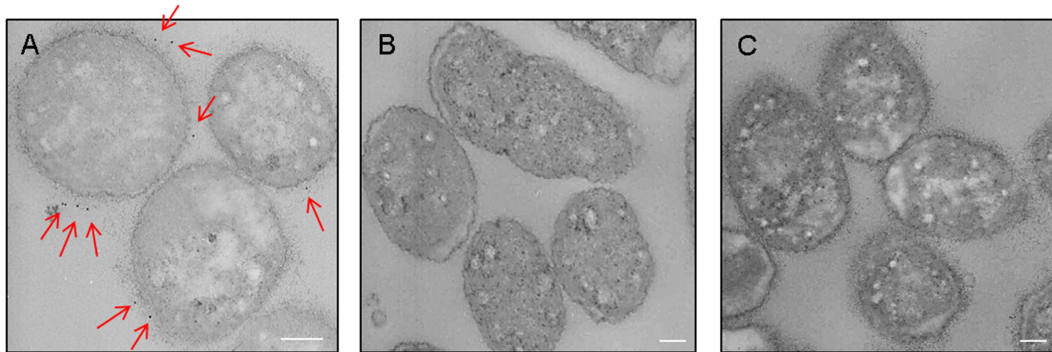


**Abb. 3.10 Immunfluoreszenzmikroskopie von WA(pYV, pRFP) und WA(pYVΔYadA, pRFP) im 3D-KoG.**

Das 3D-KoG wurden nach Fixierung mit Glutaraldehyd mit Kaninchen anti-Kollagen Typ I Serum und Ziege anti-Kaninchen IgG FITC-Konjugat inkubiert. Die Darstellung der Bakterien erfolgte mit einem konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop (CLSM). A: Eine WA(pYV, pRFP) Mikrokolonie (DPM) zeigt eine deutlich grüne Immunfluoreszenzfärbung. In der Ausschnittsvergrößerung sind die RFP-fluoreszierenden Einzelbakterien (rot) und die Kollagen-umhüllten Yersinien (grün) deutlich zu erkennen. B: WA(pYVΔYadA, pRFP) zeigt keine Kollagen-Immundefärbung. Durch die RFP-Fluoreszenz sind die Bakterienzellen zu erkennen, wie auch der unterschiedliche Mikrokolonie-Phänotyp (LPM). 0,08 % KoG, 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Größenbalken entsprechen 10 μm bzw. 1 μm.

Interessanterweise zeigten die polymerisierten Kollagenfasern nur schwache Fluoreszenz (wenig gebundener Antikörper), wogegen WA(pYV, pRFP) deutlich als grün fluoreszierende Bakterienzellen dargestellt werden konnten (Abb. 3.10, A). Die Glutaraldehyd-Fixierung führte nicht zu einer Permeabilisierung der Zellen, da das zytosolische RFP in den Bakterienzellen verblieb. Als Negativkontrolle diente WA(pYVΔYadA, pRFP), welcher wie erwartet keine grün fluoreszierende Kapsel zeigte (Abb. 3.10, B). Auch mittels

Immunogoldfärbung konnte die Kollagenkapsel auf der Oberfläche von WA(pYV) im 3D-KoG nachgewiesen werden. Zur Detektion wurde hierfür ein polyklonales Ziege anti-Kollagen Typ I Serum und ein anti-Ziege IgG Gold Konjugat verwendet. In der TEM konnten die Goldpartikel eindeutig um die fibrilläre Kapsel von WA(pYV) sichtbar gemacht werden (Abb. 3.11, A Pfeile). Eine Kontrollprobe, bei der ein 3D-KoG mit WA(pYV) nur mit dem Zweitantikörper inkubiert wurde, zeigte keine gebundenen Goldpartikel (Abb. 3.11, C). Zusammenfassend konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Kollagenbindung von WA(pYV), die im 3D-KoG zur FK-Bildung führt, durch Einsatz spezifischer anti-Kollagen Seren sichtbar gemacht werden kann. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass YadA-produzierende Yersinien im 3D-KoG Kollagenfibrillen und nicht Kollagenfasern binden.



**Abb. 3.11 Immunelektronenmikroskopie von WA(pYV) und WA(pYV $\Delta$ YadA) im 3D-KoG.**

3D-KoG mit Yersinien wurden nach Fixierung mit Glutaraldehyd mit Ziege anti-Kollagen Typ I und anti-Ziege IgG Gold-Konjugat inkubiert. A: Rote Pfeile weisen auf gebundene Goldpartikel von WA(pYV). B: Negativkontrolle: WA(pYV $\Delta$ YadA). C: Antiserumkontrolle: WA(pYV) ohne Erstantikörper und nur mit anti-Ziege IgG Gold-Konjugat inkubiert. 0,08 % KoG, 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Der Größenbalken entspricht 250 nm.

Die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass YadA-produzierende Yersinien bevorzugt Kollagenfibrillen binden. Hinsichtlich der Größendimension der fibrillären Kapsel (ca. 100 nm-Dicke) könnte es sich um die Bindung von heterotrimeren ( $\alpha_1$ )<sub>2</sub>( $\alpha_2$ ) Untereinheiten des sezernierten Kollagens Typ I handeln (Gesamtlänge 300 nm).



## 3.4 Analyse der Interaktion von Yersinien mit Kollagen Typ I

### 3.4.1 Charakterisierung der YadA-Kollagenbindung

#### 3.4.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

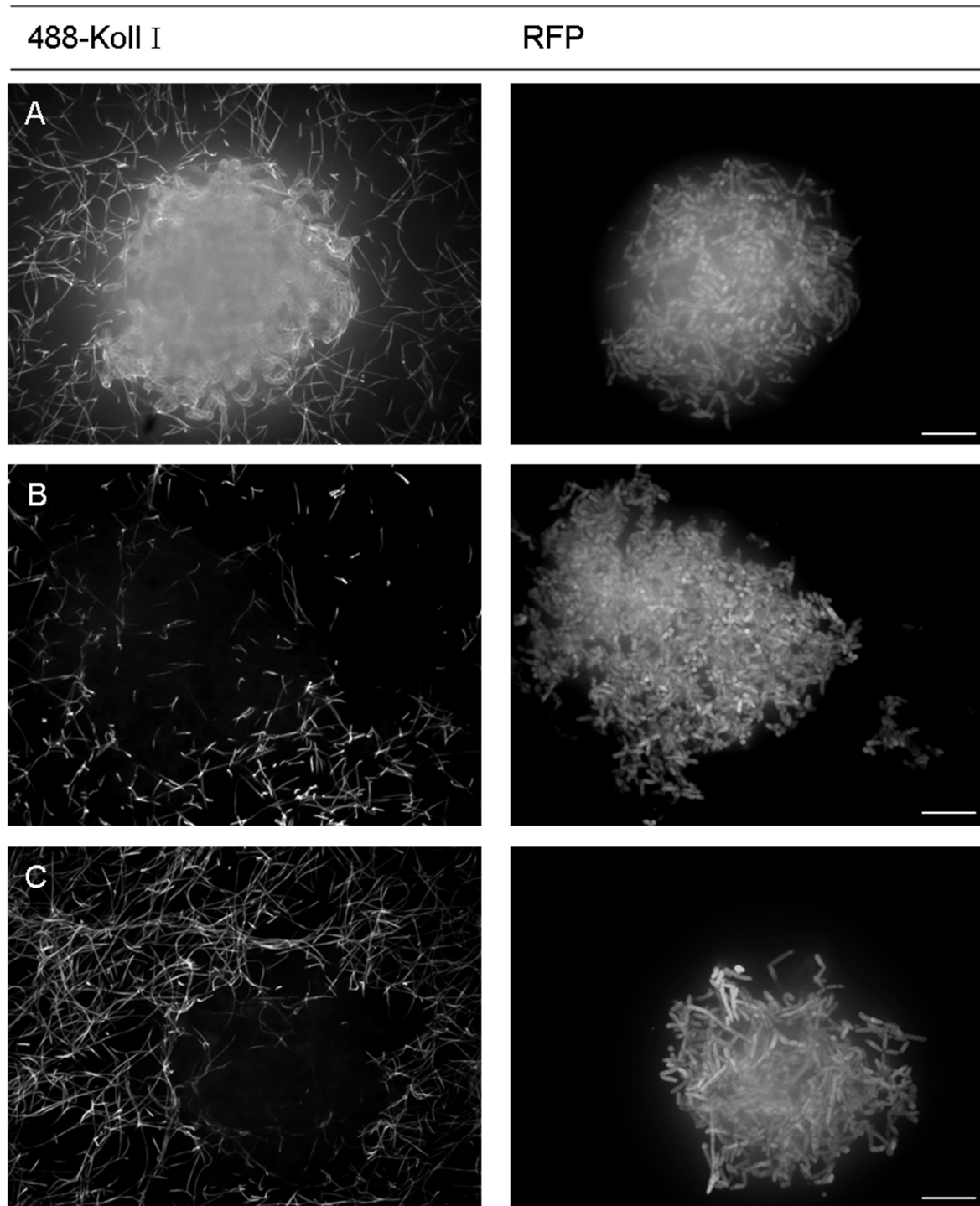
Um die Kollagenbindung an YadA näher zu charakterisieren, wurde lösliches (nicht-geliertes) Kollagen Typ I mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 markiert. *rfp*-exprimierende Yersinien wurden wie unter 2.17.4.1 beschrieben im 3D-Ko488G inkubiert, gewaschen und unfixiert mikroskopiert. Die Kollagenfasern sowie die einzelnen Bakterien der DPM von WA(pYV, pRFP) konnten deutlich durch ihre grüne bzw. rote Fluoreszenz abgebildet werden (Abb. 3.12, A). Der YadA-negative Kontrollstamm WA(pYV $\Delta$ YadA, pRFP) und der kollagenbindungsdefiziente WA(pYV::*YadA*<sub>HY</sub>, pRFP) zeigten keine Grünfluoreszenz (Abb. 3.12, B, C).

Die Kollagenfasern sind deutlich an ihrer Grünfluoreszenz zu erkennen. Auffallend ist jedoch, dass die WA(pYV, pRFP)-Mikrokolonien in Kollagenfasern eingebettet sind und wahrscheinlich kleinere Kollagenfibrillen an der Bakterienoberfläche binden. Dieses Ergebnis unterstützt die elektronenmikroskopischen Ergebnisse (Abb. 3.9, A1).

#### 3.4.1.2 Western Blot-Analysen

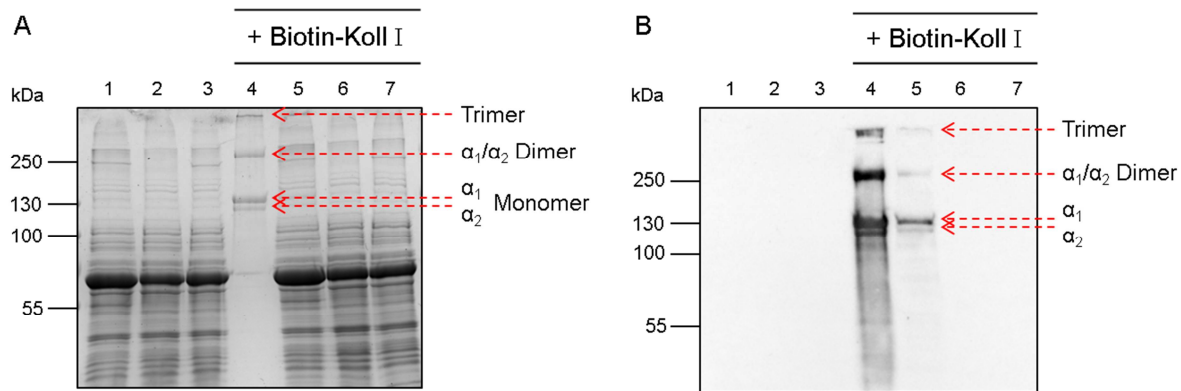
Für Western Blot Analysen wurden Yersinien mit einer Biotin markierten Kollagenlösung bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation sedimentiert, gewaschen und als Ganzzelllysate für SDS-PAGE im Immunoblot präpariert.

Zuvor wurde das Kollagen auf Degradationsprodukte mittels SDS-Gel untersucht und die Proteinbanden durch MALDI-TOF analysiert. Die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen Typ I konnten auch in der verwendeten Kollagenlösung identifiziert werden: Die „kleinste“ unterste Bande im Gel entspricht der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagens (~ 125 kDa), die  $\alpha_1$ -Kette hat ein Molekulargewicht von ca. 135 kDa, wobei ein höherer Anteil an  $\alpha_1$ -Ketten im Vergleich zu  $\alpha_2$ -Ketten in der Lösung vorhanden war. Zudem konnte ein Dimer (~ 260 kDa) und ein Trimer (~ 390 kDa) identifiziert werden (Abb. 3.13, A und B, Spur 4). Kleinere Kollagenfragmente im Bereich von 10 bis 40 kDa waren in der 10 % SDS-PAGE nicht detektierbar.



**Abb. 3.12** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Darstellung von **WA(pYV, pRFP)**, **WA(pYVΔYadA, pRFP)** und **WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>, pRFP)** im 3D-Ko488G.

A: WA(pYV, pRFP) zeigt gebundenes grünfluoreszierendes Kollagen auf der Zelloberfläche. B: Negativkontrolle WA(pYVΔYadA, pRFP) und (C) WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>, pRFP) binden kein Kollagen. Die makroskopisch großen Kollagenfasern sind in allen Abbildungen (A, B und C) deutlich erkennbar. 0,08 % KoG, 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Der Größenbalken entspricht 10 μm.



**Abb. 3.13 SDS-PAGE und Immunoblot von Yersinien-gebundenem und löslichem Biotin-Koll I.**

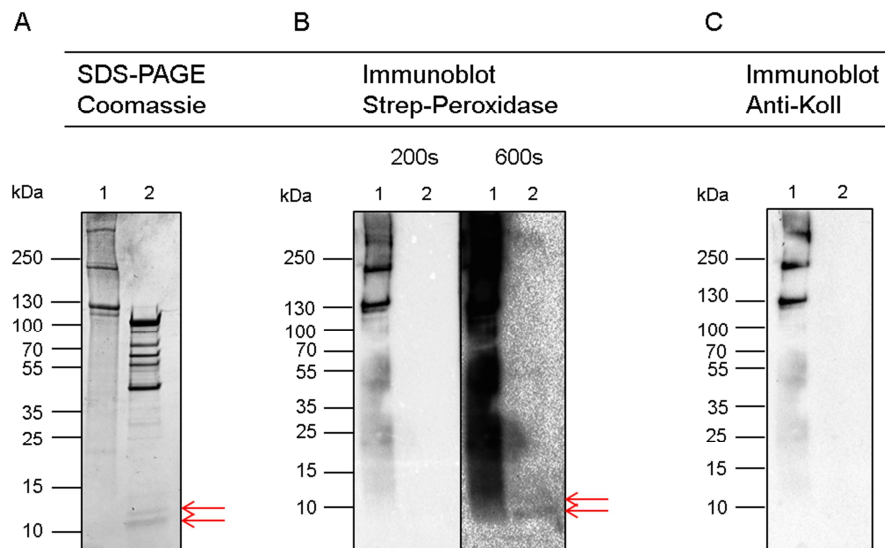
A: 10  $\mu$ l Ganzzelllysate ( $\sim 4 \times 10^7$  Zellen) von WA(pYV) (1, 5), WA(pYV $\Delta$ YadA) (2, 6), WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>) (3, 7) in PBS bzw. nach Biotin-Koll I-Inkubation, sowie als Positivkontrolle 5  $\mu$ g Biotin-Koll I wurden auf eine 10 % SDS-PAGE aufgetragen und mit Coomassieblau gefärbt bzw. (B) nach Western Blot mit Streptavidin Peroxidase-Konjugat sichtbar gemacht. Die  $\alpha_1$ - bzw.  $\alpha_2$ -Ketten von Kollagen haben ein Molekulargewicht von  $\sim 135$  bzw. 125 kDa, das Dimer 260 kDa, das Trimer  $> 390$  kDa. Nur WA(pYV) (5) bindet Kollagen, WA(pYV $\Delta$ YadA) (Negativkontrolle) und WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>) binden keine Kollagenfragmente.

Die Konzentration der mittels 10 % SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde mittels Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 3.13, A). Der Enzym-basierte Nachweis von Biotin-Koll I erfolgte mit Streptavidin Peroxidase Konjugat (Abb. 3.13, B). Die Western Blot Analyse der mit Biotin-Koll I inkubierten Yersinien zeigt, dass WA(pYV) wahrscheinlich das  $(\alpha_1)_2\alpha_2$ -Trimer bindet (Abb. 3.13, B, Spur 5). Kleinere gebundene Kollagenfragmente konnten nicht detektiert werden. Die Spezifität des Konjugats gegenüber Biotin konnte ebenfalls bestätigt werden, da Yersinien, die ohne Biotin-Koll I in PBS inkubiert wurden, nicht vom Streptavidin Peroxidase Konjugat erkannt wurden (Abb. 3.13, B, Spur 1-3). Somit konnte gezeigt werden, dass YadA-produzierende Yersinien in Suspension mit löslichem Kollagen auch  $(\alpha_1)_2(\alpha_2)$ -Trimere oder  $\alpha_1$ - oder  $\alpha_2$ -Ketten binden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten des 3D-Ko488G in der Fluoreszenzmikroskopie.

#### 3.4.1.3 Die Interaktion mit verdauten Kollagenfragmenten

Es wurde bereits gezeigt, dass YadA die Fähigkeit besitzt, durch Kollagenase (*Clostridium histolyticum*) gespaltene Kollagenfragmente zu binden (Schulze-Koops *et al.*, 1995). Um dies durch Fluoreszenzmikroskopie zu bestätigen, wurde Biotin- bzw. 488-Koll I mit einer *Clostridium histolyticum*-Kollagenase (CHC) in Fragmente gespalten und mit *rfp*-

exprimierenden Yersinien inkubiert. Die Spaltprodukte wurde mittels 4-20% Gradienten-SDS-PAGE analysiert und die Interaktion der 488-Koll I-Fragmente mit Yersinien mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Jeweils 30  $\mu\text{g}$  Koll I wurden mit 0,5 U/ $\mu\text{l}$  Kollagenase inkubiert und die Reaktion mit dem Chelator EGTA gestoppt. Abbildung 3.14 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Kollagenasebehandlung von Biotin-Koll I.



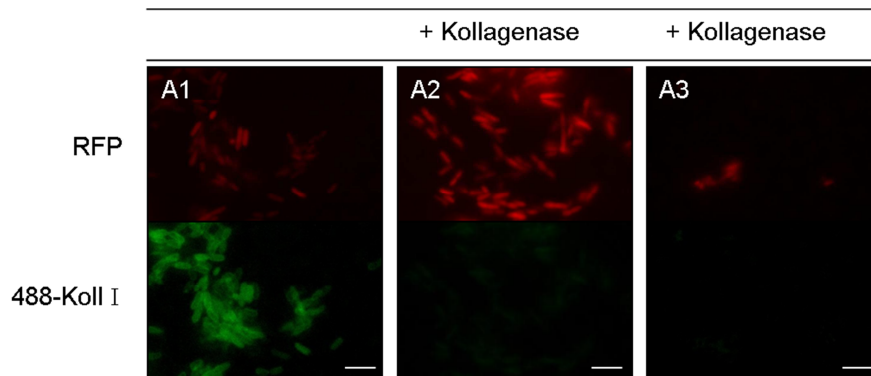
**Abb. 3.14 Nachweis von Biotin-Koll I und durch Kollagenasebehandlung gespaltene Biotin-Kollagenfragmente mittels SDS-PAGE und Immunoblot.**

5  $\mu\text{g}$  unverdautes (1) und Kollagenase verdautes Biotin-Koll I (2) wurden durch eine 4-20 % Gradienten-SDS-PAGE aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung (A) bzw. Immunoblot mit Streptavidin-Peroxidase Konjugat (B) oder mit Ziege anti-Kollagen Typ I Serum detektiert (C). Unverdautes Biotin-Koll I kann mit Streptavidin-Peroxidase Konjugat und dem anti-Kollagen Typ I Serum nachgewiesen werden (B und C, 1). Durch Kollagenase verdaute Kollagenfragmente (30 – 120 kDa) werden weder mit Streptavidin-Peroxidase Konjugat noch mit Ziege anti-Kollagen Typ I Serum detektiert (B und C, 2) Für die Detektion der 10- und 12 kDa-Biotin-Koll I-Fragmente wurde eine höhere Belichtungsdauer (600s) angewandt (B2, rote Pfeile). Die *Clostridium histolyticum*-Kollagenase spaltet Biotin-Koll I in 8 große nicht biotinylierte Koll I-Fragmente und 2 kleine Biotin-Koll I-Fragmente (rote Pfeile).

Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung ist ersichtlich, dass bereits eine 5-minütige Inkubation mit Kollagenase ausreichend ist, das Kollagen trimer in 10 kleinere Fragmente vollständig zu spalten (Abb. 3.14, A, Spur 2). Unverdautes Kollagen zeigt wie erwartet die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Monomere, -Dimere und Trimere in der SDS-PAGE, sowie im Immunoblot mit Streptavidin-Peroxidase Konjugat und Ziege anti-Kollagen Typ I Serum (Abb. 3.14, A, B, C Spur 1). Nach Kollagenaseverdau können Kollagenfragmente von ~ 120 kDa, ~ 100 kDa, ~

90 kDa, ~ 70 kDa, ~ 65 kDa, ~ 60 kDa, ~ 50 kDa, ~ 30 kDa, ~12 kDa und ~10 kDa mittels Coomassie-Färbung detektiert werden. Die Fragmente von 30 kDa – 120 kDa können jedoch im Immunoblot weder mit Streptavidin-Peroxidase Konjugat (B, Spur 2) noch mit Ziege anti-Kollagen Typ I Serum (C, Spur 2) nachgewiesen werden. Nur die Fragmente mit einem Molekulargewicht von 10 und 12 kDa tragen eine Biotin- Markierung (B, Spur 2, rote Pfeile, nach 600s Belichtung), was darauf schließen lässt, dass wahrscheinlich nur der unstrukturierte N- oder C-Terminus des Kollagens markiert wird.

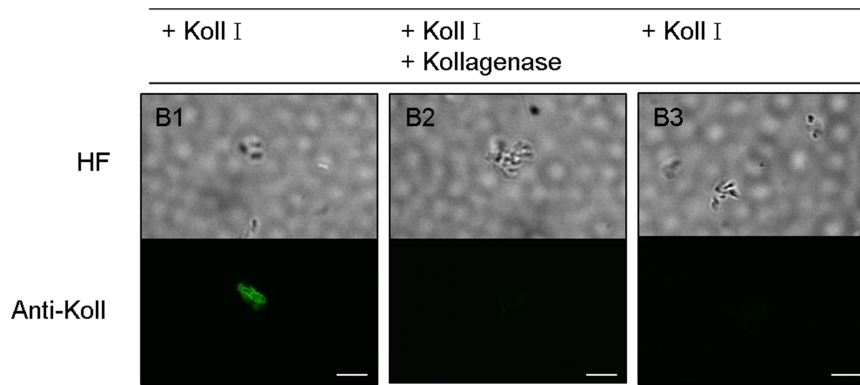
Nach Inkubation von Kollagenase verdauten 488-Koll I-Fragmenten mit WA(pYV, pRFP) konnten keine grün fluoreszierenden Bakterienzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.15, A2). Die aus dem Kollagenaseverdau entstandenen 10- und 12 kDa-Kollagenfragmente können entweder nicht an Yersinien binden oder die Interaktion kann mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht detektiert werden.



**Abb. 3.15 Interaktion von Yersinien mit Kollagenase verdauten 488-Koll I-Fragmenten.**

A1: WA(pYV, pRFP) mit gebundenem 488-Koll I (Positivkontrolle). WA(pYV, pRFP) (A2) und WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>, pRFP) (Negativkontrolle) (A3) wurden mit 5 µg/ml Kollagenase verdautem 488-Koll I für 15 min inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Eine Interaktion mit Kollagenase-behandeltem 488-Koll I und WA(pYV) kann nicht nachgewiesen werden. (A1). Der Größenbalken entspricht 5 µm.

Zudem wurden Yersinien mit unmarkiertem Koll I inkubiert und anschließend in der Immunfluoreszenzmikroskopie mittels anti-Kollagen Typ I Serum detektiert (Abb. 3.16, B1). Wurden WA(pYV) Yersinien nach Kollagen-Inkubation mit Kollagenase verdaut, konnte gebundenes Kollagen nicht mehr sichtbar gemacht werden (Abb. 3.16, B2). Die Kollagenase spaltet somit auch an YadA gebundenes Kollagen, das YadA-Protein selbst wird von der Kollagenase nicht gespalten (s. S. 73, Abb. 3.8). Als Negativkontrolle diente WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>), welcher ebenso kein Fluoreszenzsignal zeigte (Abb. 3.16, B3).



**Abb. 3.16 Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der Kollagen Typ I-Bindung von Yersinien mit und ohne Kollagenasebehandlung.**

WA(pYV) (B1, B2) und WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>) (B3) wurden mit unmarkiertem Koll I für 15 min inkubiert, mit 0,5 U/μl Kollagenase (B2, B3) oder ohne (B1) behandelt und mit Ziege anti-Kollagen Typ I Serum und Kaninchen anti-Ziege FITC-Konjugat inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Anti-Koll). Nach Kollagenaseverdau kann an WA(pYV) gebundenes Kollagen in der Immunfluoreszenz nicht mehr nachgewiesen werden. WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>) (Negativkontrolle) bindet kein Kollagen. HF: Hellfeld. Anti-Koll: Immunfluoreszenzmikroskopie. Der Größenbalken entspricht 5 μm

Eine Interaktion von verdauten Kollagenfragmenten mit Yersinien kann mit der angewendeten Methode nicht nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Inhibierung der Kollagenbindung durch ein kollagenähnliches Peptid (POG)<sub>10</sub>

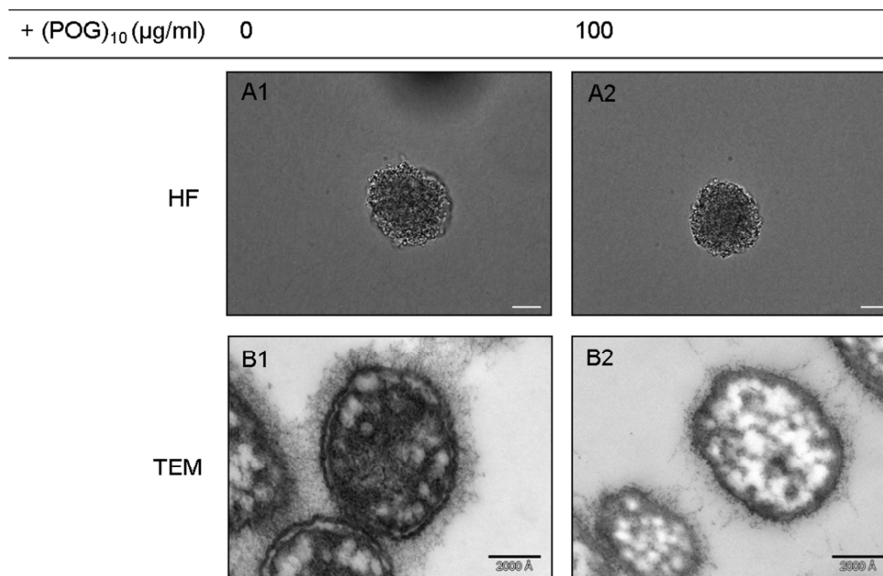
Es ist bekannt, dass YadA im Kopfbereich des Trimers verschiedene ECM-Proteine wie Kollagen, Fibronectin und Laminin binden kann (Emödy *et al.*, 1989, Schulze-Koops *et al.*, 1992). Zusätzlich ist die Kopffregion auch für die YadA-YadA-Interaktion bzw. die Yersinia Autoagglutination verantwortlich (Roggenkamp *et al.*, 2003). Kürzlich wurde mittels einer Kollagen Toolbox (synthetische Oligopeptide, die Kollagen-Aminosäuresequenzmotive enthalten) gezeigt, dass das Oligopeptid (POG)<sub>10</sub> (Prolin-Hydroxyprolin-Glycin Tripel-Helix in 10-facher Wiederholung) an YadA bindet (Leo *et al.*, 2008). Das (POG)<sub>10</sub> und ein DyLight647-(POG)<sub>10</sub> wurden für Bindungs- und kompetitive Bindungsstudien (mit Kollagen) verwendet, um Bindungsdomänen zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde geprüft, ob (POG)<sub>10</sub> die Yersinia Autoagglutination inhibiert.

Die Ausbildung einer stabilen Kollagen Tripel-Helix benötigt Wiederholungen des Aminosäuresemotivs G-X-X' (Shoulders & Raines, 2009). X steht dabei für Prolin (P), X' für Hydroxyprolin (O). Diese drei Aminosäuren kommen am häufigsten in humanem Kollagen

vor (Myllyharju & Kivirikko, 2004). Synthetische Oligopeptide, die dieses Motiv (z.B. POG) in Wiederholungen tragen, können eine homotrimere Tripel-Helix ausbilden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das tripel-helikale Peptid (POG)<sub>10</sub> die Bindung von YadA an immobilisiertes Kollagen (Mikrotiterplattenboden) um 50 % blockiert (Leo *et al.*, 2010).

### 3.4.2.1 Inhibierung der Kollagenbindung im 3D-KoG

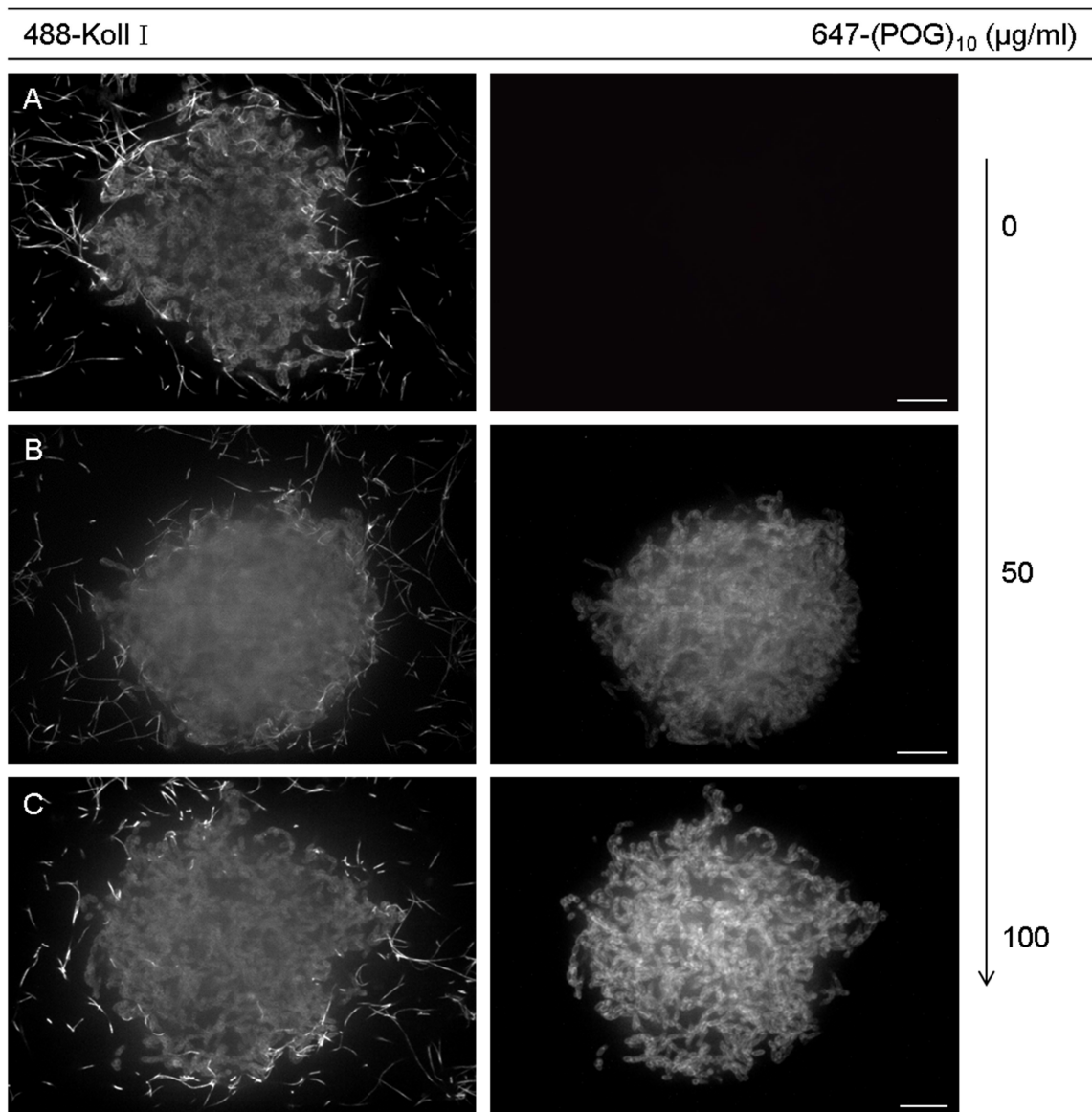
Hier sollte geprüft werden, ob das tripel-helikale Oligopeptid (POG)<sub>10</sub> das Wachstum der Yersinien im 3D-KoG sowie die Ausbildung der Kollagenkapsel beeinflusst. Hierfür wurden die Yersinien in einem 0,15 % 3D-KoG mit 100 µg/ml (POG)<sub>10</sub> angezchtet und nach Inkubation über Nacht zunächst lichtmikroskopisch auf Mikrokoloniewachstum und anschließend mittels TEM auf Kollagenkapselbildung untersucht.



**Abb. 3.17 Hellfeldmikroskopie (HF) und Elektronenmikroskopie (TEM) von WA(pYV) im 3D-KoG ohne oder mit (POG)<sub>10</sub>.**

0,15 % KoG ohne (A1, B1) bzw. mit 100 µg/ml (POG)<sub>10</sub> (A2, B2). WA(pYV) bildet unter Zugabe von (POG)<sub>10</sub> im 3D-KoG DPM, die Ausbildung von FK ist reduziert. 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Größenbalken entsprechen 20 µm (A1, A2) und 2000 Å (B1, B2).

Folgende Ergebnisse wurden erhalten: WA(pYV) bildete mit oder ohne (POG)<sub>10</sub> DPM im 3D-KoG (Abb. 3.17, A1 und A2). Mittels TEM zeigten die Ultradünnschnitte mit (POG)<sub>10</sub>-Supplementierung ca. 50 % weniger fibrilläres Kapselmateriale im Vergleich zu den TEM Schnitten ohne (POG)<sub>10</sub> (Abb. 3.17, B1 und B2). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine kompetitive Bindung von Kollagenfibrillen und (POG)<sub>10</sub> an YadA stattfindet.



**Abb. 3.18** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Darstellung der kompetitiven Bindung von 488-Koll I und 647-(POG)<sub>10</sub> an WA(pYV, pRFP) im 3D-Ko488G.

0,08 % KoG ohne (A), 50 µg/ml (B) oder 100 µg/ml (C) (POG)<sub>10</sub>. Kollagenfasern zeigen keine 647-(POG)<sub>10</sub>-Fluoreszenz. 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Der Größenbalken entspricht 10 µm.

Zusätzlich konnte durch den Einsatz von fluoreszenzmarkiertem 647-(POG)<sub>10</sub> im 3D-Ko488G mittels Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass (POG)<sub>10</sub> die Ausbildung der multimeren Kollagenfasern nicht beeinflusst. WA(pYV) Bakterien scheinen ausschließlich 647-(POG)<sub>10</sub> und 488-Koll I-Trimere auf der Oberfläche zu binden. Die multimeren Kollagenfasern zeigen keine 647-(POG)<sub>10</sub>-Fluoreszenz (Abb. 3.18).

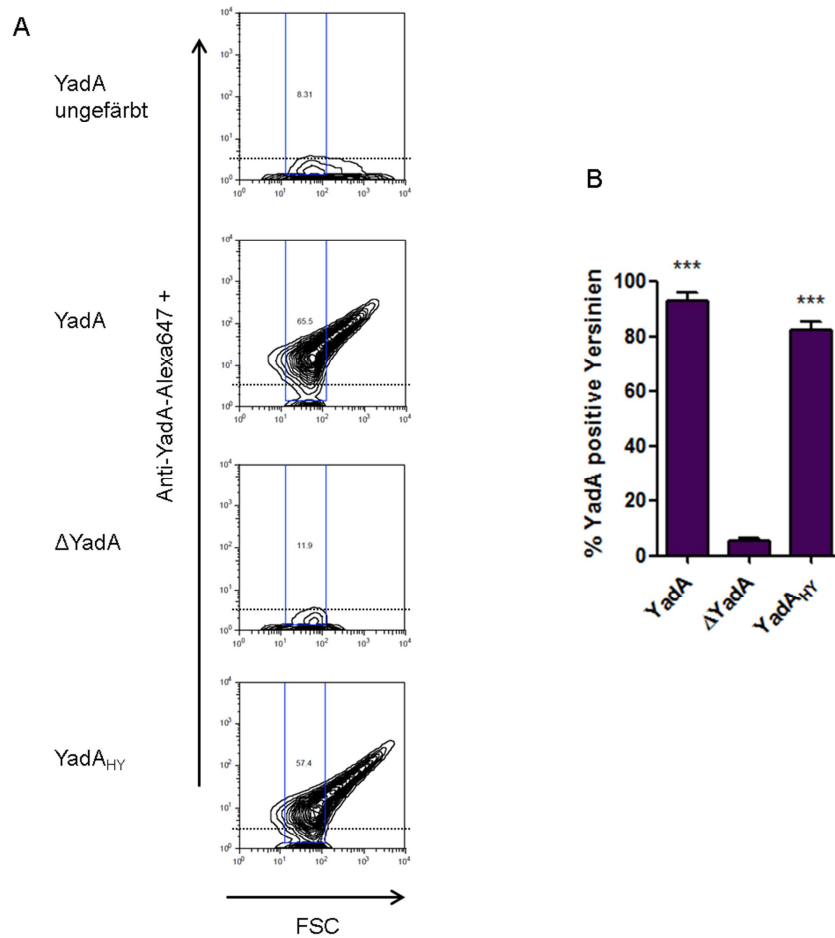


### 3.4.2.2 Quantifizierung der Blockierung der Kollagenbindung

Um die kompetitive (POG)<sub>10</sub>-Kollagenbindung mit löslichem Kollagen zu analysieren, wurden die Yersinien wie unter 2.12.1.1 beschrieben kultiviert und ca.  $1,5 \times 10^8$  Yersinien mit 10 µg/ml 488-Koll I bei 37 °C inkubiert. Um unspezifisch assoziiertes 488-Koll I zu entfernen, wurden die Yersinien dreimal mit PBS gewaschen. Für die Inhibierung der Kollagenbindung wurden Yersinien zuvor mit (POG)<sub>10</sub> in Konzentrationen von 0,05 – 100 µg/ml inkubiert. Zunächst wurde die YadA-Exposition der Yersinien unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen mittels Immunfärbung mit einem monoklonalem anti-YadA-Antikörper, welcher mit Alexa647 markiert war, quantifiziert.

In der Darstellung als Contour Plot ist erkennbar, dass YadA-positive Yersinien als Einzelzellen und Zellaggregate unterschiedlicher Größe vorhanden sind. YadA-negative Yersinien zeigen eine homogene Population (Abb. 3.19, A). Da die Anzahl der Bakterien pro Aggregat nicht bestimmt werden kann, müssen die Aggregate für die Auswertung ausgeschlossen werden. Deshalb wurde eine definierte Region („Gate“) für Einzelzellen ausgewählt. Da die homogene WA(pYVΔYadA)-Population kaum Aggregate ausbildet, wurde das Gate für Einzelzellen dieser Population als Referenzwert für die anderen Stämme genommen. Von dieser Subpopulation zeigten 93 % der WA(pYV)- und 83 % der WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>)-Yersinien YadA-Exposition. Etwa 7 % der WA(pYV)-Bakterien produzieren somit unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen kein nachweisbares YadA (Abb. 3.19, B).

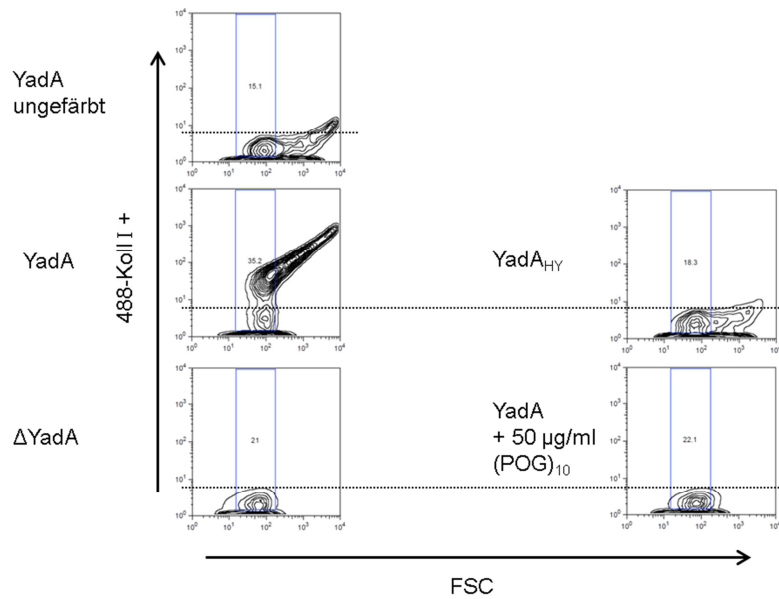
Der prozentuale Anteil der 488-Koll I-assoziierten Yersinien wurde ebenfalls durchflusszytometrisch quantifiziert sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 488-Koll I-positiven Yersinia-Einzelzellen ermittelt. Auch hierfür ist in der Darstellung als Contour Plot erkennbar, dass 488-Koll I-positiv Yersinien sowohl als Einzelzellen als auch in Zellaggregaten (höhere FSC-Werte) vorhanden sind. 488-Koll I-nicht bindende Yersinien und (POG)<sub>10</sub>-präinkubierte WA(pYV)-Stämme zeigen eine homogene Population (Abb. 3.20). Höhere FSC-Werte sind wahrscheinlich auf 488-Koll I-Yersinien-Aggregate zurückzuführen.



**Abb. 3.19 Durchflusszytometrischer Nachweis von Yersinien exponiertem YadA.**

Yersinien wurden mit monoklonalem Maus anti-YadA-Alexa647 1h inkubiert. (A) Contour Plot: Verteilung der Population bezogen auf Partikelgrößenparameter (FSC) und anti-YadA-Alexa647. Für das Gate (blau) von Yersinia-Einzellzellen wurde die homogene WA(pYV $\Delta$ YadA)-Population als Referenzwert bestimmt und für die anderen Stämme übernommen. Die horizontale Linie zeigt die Trennung in YadA-positive und YadA-negative Yersinien. (B) Prozentualer Anteil an Yersinien mit exponiertem YadA: 93 % der WA(pYV)- und 83,0 % der WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>)-Yersinien zeigten exponiertes YadA. YadA: WA(pYV);  $\Delta$ YadA: WA(pYV $\Delta$ YadA) (Negativkontrolle); YadA<sub>HY</sub>: WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>), (kollagenbindungsdefizient). Die Ergebnisse sind als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente dargestellt. \*\*\*,  $p < 0,001$  versus WA(pYV $\Delta$ YadA).

Zudem führt die Bindung von (POG)<sub>10</sub> an WA(pYV) auch zur Inhibierung der Autoagglutination der Yersinien, wie aus dem Contour Plot zu erkennen ist: Die Population zeigt ähnlich wenig Aggregate wie WA(pYV $\Delta$ YadA)-Yersinien und wird ebenfalls als homogene Population dargestellt.



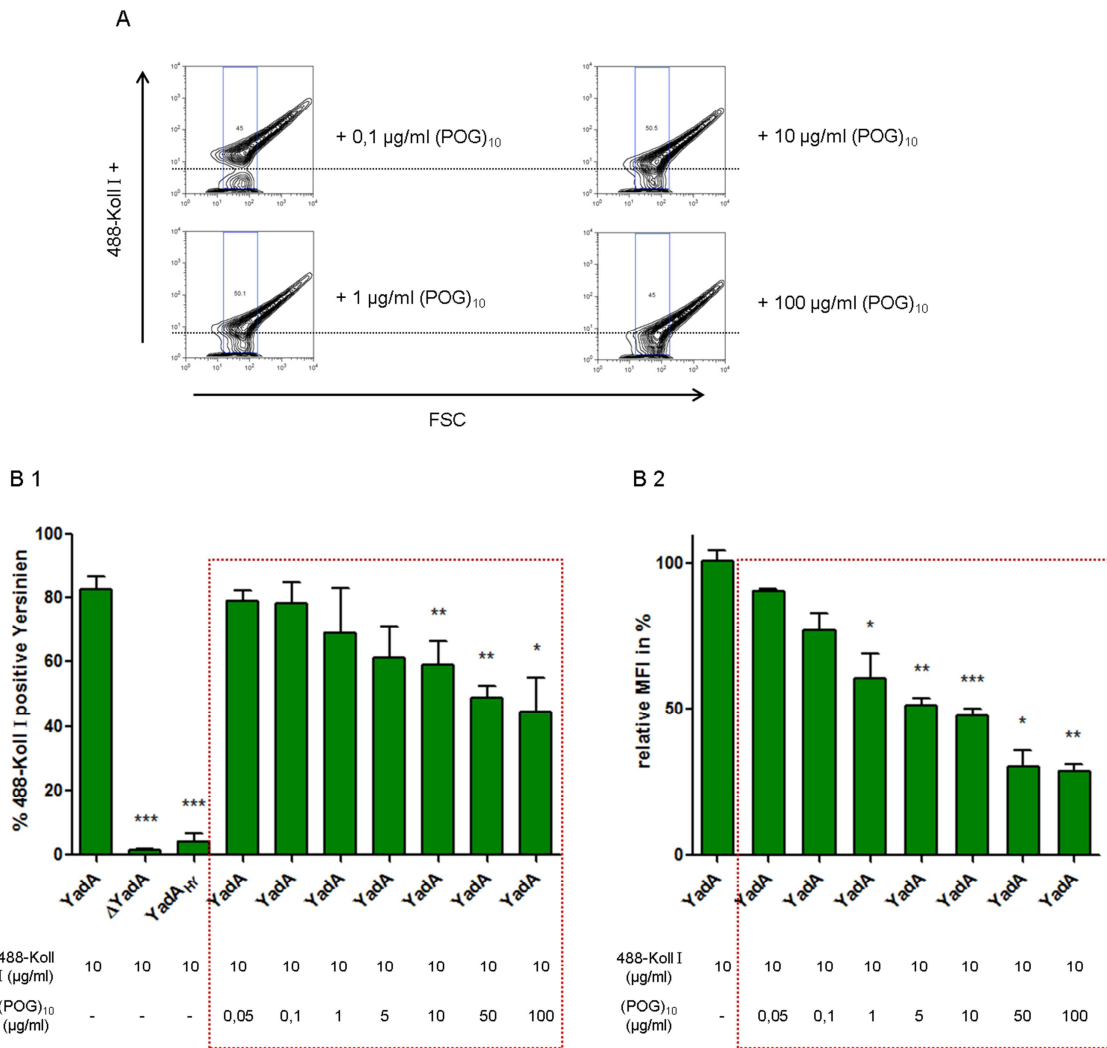
**Abb. 3.20 Durchflusszytometrische Bestimmung der YadA-Kollagenbindung von Yersinia-Einzelzellen.**

WA(pYV) und die pYV-YadA-Varianten für 15 min bei 37 °C mit 10 µg/ml 488-Koll I bzw. 50 µg/ml (POG)<sub>10</sub> inkubiert. Contour Plot: Verteilung der Population bezogen auf Partikelgrößenparameter (FSC) und 488-Koll I. Für das Gate (blau) von Yersinia-Einzelzellen wurde die homogene WA(pYVΔYadA)-Population als Referenzwert bestimmt und für die anderen Stämme übernommen. Die horizontale Linie zeigt die Trennung in 488-Koll I-positive und 488-Koll I-negative Yersinien. YadA: WA(pYV); ΔYadA: WA(pYVΔYadA) (Negativkontrolle); YadA<sub>HY</sub>: WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>).

Um die Kollagenbindung von Einzelzellen miteinander zu vergleichen, wurde die definierte Region („Gate“) für Einzelzellen wie auch für die Untersuchung der YadA-Exposition gewählt (Abb. 3.19, A), um die Aggregate für die Auswertung auszuschließen (Abb. 3.20, blau). Von dieser Subpopulation zeigten ~ 83 % der WA(pYV)-Yersinien 488-Koll I-Bindung, die Kollagenbindungsmutante WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>) zeigte noch einen Bindungsanteil von ca. 4 %. Für WA(pYVΔYadA) konnte wie erwartet keine 488-Koll I-Bindung nachgewiesen werden (Negativkontrolle) (Abb. 3.20). Nach einer Vorinkubation mit 10 µg/ml (POG)<sub>10</sub> zeigten noch ~ 59 % der WA(pYV) Einzelbakterien 488-Koll I-Bindung. Ab einer Konzentration von 50 µg/ml (POG)<sub>10</sub>, reduzierte sich die Anzahl an 488-Koll I-positiven WA(pYV) um fast ~ 50% (Abb. 3.21, A). Mit dieser Konzentration wurde auch der Sättigungspunkt erreicht, da eine Erhöhung auf 100 µg/ml (POG)<sub>10</sub> die 488-Koll I-Bindung von WA(pYV) nicht weiter herabsetzte. Somit sind bei (POG)<sub>10</sub>-Sättigung zwei Yersinien- Populationen vorhanden: 50 % haben 488-Koll I und (POG)<sub>10</sub> gebunden, 50 % der Yersinien haben nur (POG)<sub>10</sub> gebunden und sind 488-Koll I negativ. Berücksichtigt man nur 488-Koll

I-positive Einzelbakterien, werden die Bindungsergebnisse durch die Darstellung der MFI der 488-Koll I-positiven Einzelzellen quantifizierbarer:

Die MFI von 50  $\mu\text{g/ml}$  (POG)<sub>10</sub>- präinkubierten Yersinien reduzierte sich um zwei Drittel im Vergleich ohne Kollagenbindungsinhibition mit (POG)<sub>10</sub>, wobei eine Erhöhung auf 100  $\mu\text{g/ml}$  (POG)<sub>10</sub> ebenfalls keinen niedrigeren MFI ergab (Abb. 3.21, B2). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass YadA zwei Bindungsstellen besitzt: eine hochaffine für Kollagen und eine schwächere Bindungsstelle, die kompetitiv von (POG)<sub>10</sub> besetzt werden kann.



**Abb. 3.21 Durchflusszytometrische Quantifizierung der YadA-Kollagenbindung.**

WA(pYV) und die pYV-YadA-Varianten wurden mit bzw. ohne (POG)<sub>10</sub> für 15 min bei 37 °C präinkubiert und anschließend mit 10 µg/ml 488-Koll I für 15 min bei 37 °C koinkubiert. (A) Contour Plot: Verteilung der Population bezogen auf Partikelgrößenparameter (FSC) und 488-Koll I. Exemplarisch sind die Plots für vier (POG)<sub>10</sub>-Konzentrationen dargestellt. Für das Gate (blau) von Yersinia-Einzelnzellen wurde die homogene WA(pYVΔYadA)-Population als Referenzwert bestimmt und für die anderen Stämme übernommen. Die horizontale Linie zeigt die Trennung in 488-Koll I-positive und 488-Koll I-negative Yersinien. (B1) Prozentualer Anteil an 488-Koll I-bindenden Yersinien. (B2) Prozentuale mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der 488-Koll I-positiven Yersinien in Bezug auf WA(pYV)/488-Koll I. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mindestens dreier unabhängiger Experimente dargestellt. \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001 versus 488-Koll I-positiver WA(pYV)-Werte. YadA: WA(pYV); ΔYadA: WA(pYVΔYadA) (Negativkontrolle); YadA<sub>HY</sub>: WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>). Mit steigender Konzentration von (POG)<sub>10</sub>-präinkubierten Bakterien nimmt die Anzahl 488-Koll I-positiver WA(pYV) ab. Die MFI von (POG)<sub>10</sub> präinkubierten Yersinien sinkt ebenfalls.

### 3.5 Die Interaktion von Yersinien und Kollagen mit Wirtszellen

Für die Translokation über die M-Zellen im Bereich der follikel-assoziierten Epithelzellen der Peyer'schen Plaques (PP) ist die Interaktion des Yersinia Invasin (Inv) mit  $\beta_1$ -Integrinen der M-Zellen erforderlich. (Schulte *et al.*, 2000b). Das Adhäsion Yada ist dagegen für das Überleben der Yersinien im Gewebe von Bedeutung. Es wird angenommen, dass die Yada-Bindung mit  $\beta_1$ -Integrinen von Wirtszellen über einen Brückenmechanismus mit extrazellulären Matrixproteinen (ECM), wie Kollagen oder Fibronektin, zustande kommt (Reis & Horn, 2010). Zudem konnte die verantwortliche Binderegion von Yada gegenüber polymorphonukleären Neutrophilen (PMN) auf die N-terminalen Aminosäuren 29-81 des Yada lokalisiert werden (Roggenkamp *et al.*, 1996).

Yersinien haben wahrscheinlich eine Doppelstrategie für die Evasion der angeborenen Immunabwehr entwickelt. Einerseits können sie durch Kontakt mit einwandernden PMNs die „paralysierenden“ Effektor-Yops mittels T3SS injizieren und andererseits sich durch Mikrokoloniebildung vor weiteren Kontakt mit Phagozyten schützen. Durch Bindung von ECM-Proteinen könnten sie den Kontakt mit Phagozyten reduzieren und durch Kollagenquervernetzung die Mikrokolonien stabilisieren.

Um die Rolle von Yada-gebundenem Kollagen in Bezug auf die Interaktion mit Wirtszellen zu untersuchen, wurden verschiedene Yada-Derivate in Inv-positiven, wie auch Inv-negativen Yersinien hergestellt. Da die Yop-Effektorproteine über das T3SS in Wirtszellen injiziert werden und diese paralysieren, um die Yersinien u.a. vor Phagozytose zu schützen, wurden pYV-Plasmid-negative WAc-Stämme ohne T3SS und Yop-Effektorproteine verwendet.

#### 3.5.1 *inv*-negative und -positive, *yadA*-exprimierende Yersinien

##### 3.5.1.1 Konstruktion einer *inv*-Deletion in *Y. enterocolitica* WAc<sup>RS</sup>

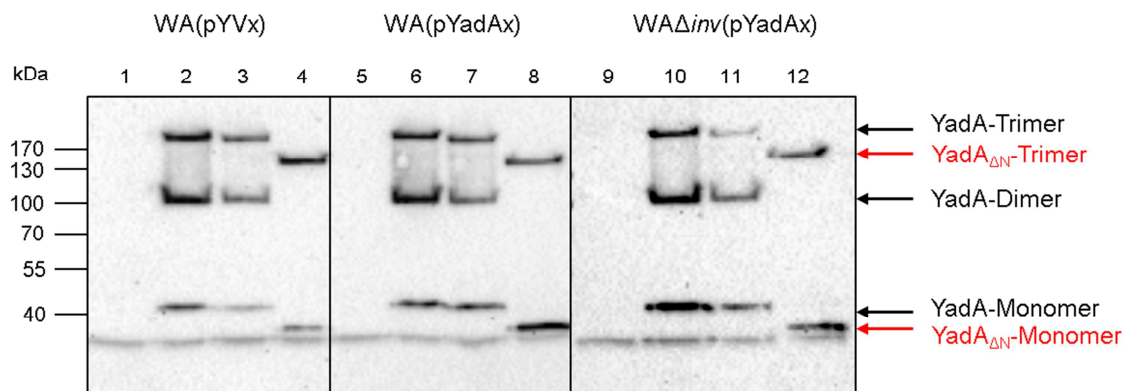
*Inv* wurde durch die Methode nach Datsenko und Wanner mittels homologer Rekombination, wie schon für die Deletion von *yadA* beschrieben (3.1.1), im Stamm WAc<sup>RS</sup> durch Ersatz einer Kanamycin-Kassette deletiert (Datsenko & Wanner, 2000). Die Vorwärtsprimer wurden dabei so gewählt, dass auch die vorhergesagte Promotorsequenz deletiert wird. Nachfolgend wird der *inv*-deletierte Stamm WA $\Delta$ *inv* bezeichnet.

### 3.5.1.2 Herstellung von *yadA<sub>HY</sub>*- und *yadA<sub>ΔN</sub>*-exprimierenden Yersinien

Ähnlich wie unter 3.1.2 beschrieben, wurde für die Herstellung des kollagenbindungsmutierten *YadA<sub>HY</sub>* (*YadA<sub>H156Y/H159Y</sub>*) und des PMN-bindungsdefizienten *YadA<sub>ΔN</sub>* (*YadA<sub>Δ29-81</sub>*) ein PCR-Produkt mit den Primern *yadA\_XbaI\_f2* und *yadA\_BamHI\_r2* (2.2) amplifiziert, wobei als Matrize genomische DNS von *WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>)* bzw. *WA(pYV::YadA<sub>ΔN</sub>)* diente (2.13.8). Das PCR-Fragment sowie der Klonierungsvektor *pACYC184* wurden mit *XbaI* und *BamHI* verdaut und ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide *pYadA<sub>HY</sub>* und *pYadA<sub>ΔN</sub>* wurden in elektrokompente *WAc<sup>RS</sup>* bzw. *WAΔinv*-Stämme transformiert. Die Selektion erfolgte mit Chloramphenicol bzw. zusätzlich mit Kanamycin für die *Δinv*-Mutante. Resistente Klone wurden mittels PCR geprüft und die Gensequenz der reisolierten Plasmide durch Sequenzierung überprüft.

### 3.5.1.3 Nachweis von *YadA<sub>HY</sub>* und *YadA<sub>ΔN</sub>* in *WAΔinv* und *WAc<sup>RS</sup>*

Für den Nachweis der *YadA<sub>HY</sub>*- und *YadA<sub>ΔN</sub>*-Proteine wurden Ganzzelllysate der entsprechenden Yersinien-Stämme im Western Blot vergleichend untersucht.



**Abb. 3.22 Immunoblot mit Kaninchen anti-YadA Serum zur Überprüfung der YadA-Produktion.**

10  $\mu$ l der Ganzzelllysate ( $\sim 2,5 \times 10^7$  Zellen) *WA(pYVΔYadA)* (1), *WA(pYV)* (2), *WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>)* (3), *WA(pYV::YadA<sub>ΔN</sub>)* (4), *WA(pΔYadA)* (5), *WA(pYadA)* (6), *WA(pYadA<sub>HY</sub>)* (7), *WA(pYadA<sub>ΔN</sub>)* (8), *WAΔinv(pΔYadA)* (9), *WAΔinv(pYadA)* (10), *WAΔinv(pYadA<sub>HY</sub>)* (11) und *WAΔinv(pYadA<sub>ΔN</sub>)* (12) wurden durch eine 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot mit spezifischen *YadA* Antiserum detektiert. *YadA<sub>HY</sub>*- ( $\sim 190$  kDa) und *YadA<sub>ΔN</sub>*-Trimere ( $\sim 130$  kDa) sowie –Monomere ( $\sim 45$  kDa bzw.  $\sim 40$  kDa) werden in *WA*- und *WAΔinv*-Konstrukten produziert.

Abb. 3.22 zeigt, dass *YadA*, *YadA<sub>HY</sub>* und *YadA<sub>ΔN</sub>* sowohl in *WA*- als auch *WAΔinv*-Stämmen als Monomer und Trimer produziert werden (Spur 7, 8 und 11, 12).

YadA- und YadA<sub>HY</sub>-Proteine zeigen zusätzlich ein Dimer, wohingegen für das verkürzte YadA<sub>ΔN</sub> das Trimer (~130 kDa) bzw. Monomer (~ 40 kDa) jedoch kein YadA-Dimer detektiert werden konnte auf (Spur 4, 8 und 12). Die produzierte Menge an YadA bzw. YadA-Derivaten ist bei allen Stämmen vergleichbar (Spur 10-12). Die ΔYadA-Konstrukte zeigten weder in WA- (Spur 5) noch in WAΔ*inv*-Stämmen (Spur 9) YadA-Produktion, wie auch die Negativkontrolle WA(pYVΔYadA) (Spur 2).

#### 3.5.1.4 Interaktion der WAΔ*inv*-Stämme mit Kollagen Typ I und dem kollagen-ähnlichen Peptid (POG)<sub>10</sub>

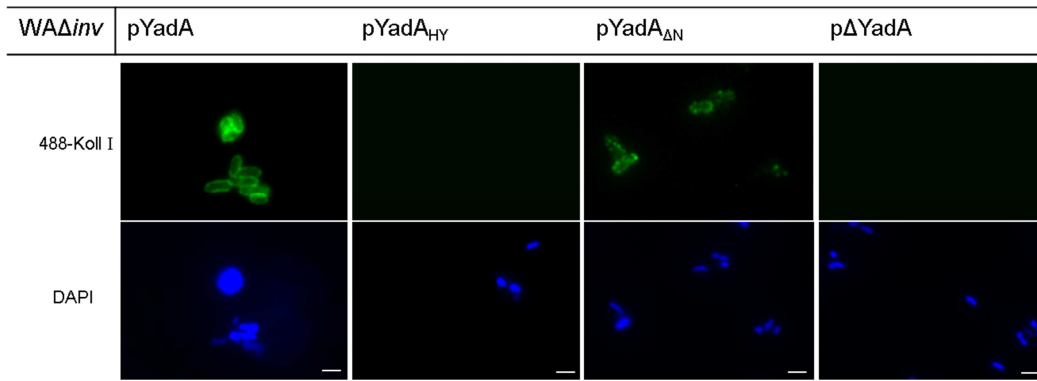
Um die Kollagen Typ I-Bindung der Yersinien mit den jeweiligen YadA-Konstrukten zu untersuchen, wurden diese mit Alexa488-konjugiertem Kollagen Typ I (488-Koll I) inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Für die Detektion der Bakterien wurde zusätzlich mit DAPI gefärbt.

WAΔ*inv*(pYadA) und WAΔ*inv*(pYadA<sub>ΔN</sub>) zeigen durch ihre Oberflächenfluoreszenz die Bindung von 488-Koll I. WAΔ*inv*(pYadA<sub>HY</sub>) und WAΔ*inv*(pΔYadA) zeigen keine Grünfluoreszenz, was auf eine definierbare Kollagenbindung hinweist (Abb. 3.23).

Des Weiteren wurden die Stämme bezüglich ihrer Bindungsfähigkeit gegenüber dem kollagenähnlichen Peptid (POG)<sub>10</sub> getestet. Hierzu wurden YFP-produzierende (grün/gelb-fluoreszierende) Yersinien mit dem fluoreszenzmarkierten 647-(POG)<sub>10</sub> (pink) inkubiert und ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 3.24). Die YFP-produzierenden Yersinien konnten als grün fluoreszierende Bakterien sichtbar gemacht werden. WAΔ*inv*(pYadA, pYFP) und WAΔ*inv*(pYadA<sub>ΔN</sub>, pYFP) wiesen zusätzlich eine pink-farbene Oberflächenumrandung auf und besitzen somit die Eigenschaft, 647-(POG)<sub>10</sub> zu binden. Der Kollagen-nichtbindende Stamm WAΔ*inv*(pYadA<sub>HY</sub>, pYFP) zeigte keine (POG)<sub>10</sub>-Bindung. Wie erwartet, bindet der YadA-negative Stamm WAΔ*inv*(pΔYadA, pYFP) auch kein 647-(POG)<sub>10</sub>.

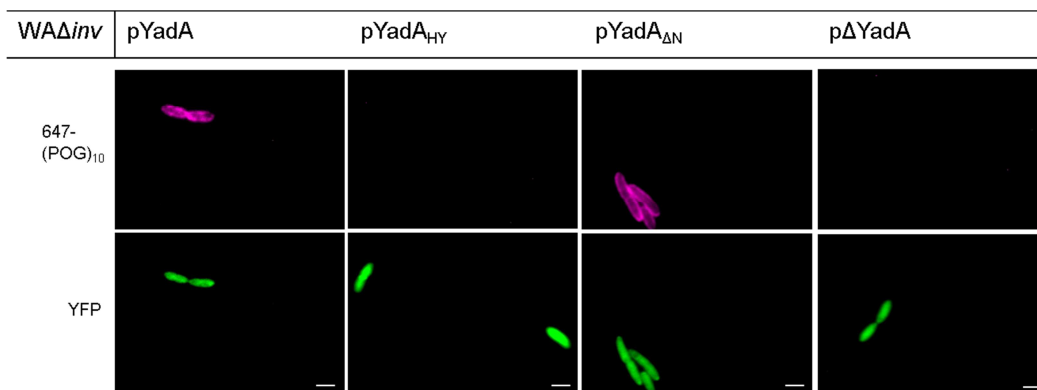
Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Yersinien mit YadA<sub>ΔN</sub> (Deletion der PMN-Bindungsdomäne) weiterhin die Fähigkeit besitzen, Kollagen wie auch (POG)<sub>10</sub> zu binden. Zudem wurde gezeigt, dass Kollagen-nichtbindendes YadA<sub>HY</sub> auch kein (POG)<sub>10</sub> bindet.





**Abb. 3.23** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von 488-Koll I und Yersinien.

Nach 2h-Inkubation der Bakterien bei 37 °C folgte eine Inkubation mit 10 µg/ml 488-Koll I für 15 min bei 37 °C. Für die Einbettung der Proben wurde Anti-fade DAPI verwendet. Mittels Fluoreszenzmikroskopie können 488-Koll I-bindende *WAΔinv*(pYadA) und *WAΔinv*(pYadA<sub>ΔN</sub>) Bakterien als grün fluoreszierende Zellen dargestellt werden. *WAΔinv*(pYadA<sub>HY</sub>) und *WAΔinv*(pΔYadA) zeigen keine grüne Fluoreszenz, was auf fehlende Bindung von 488-Koll I hinweist. Der Größenbalken entspricht 2 µm.



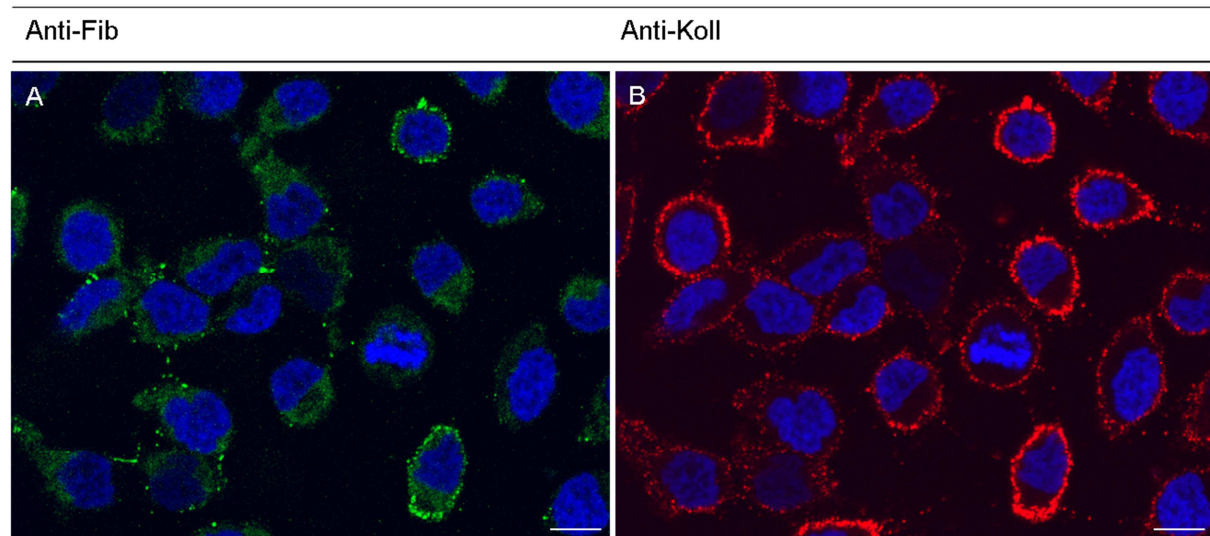
**Abb. 3.24** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von 647-(POG)<sub>10</sub> und Yersinien.

Nach 2h-Inkubation der Bakterien bei 37 °C folgte eine Inkubation von 10 µg/ml 647-(POG)<sub>10</sub> für 15 min bei 37 °C. YFP-Yersinien sind in grün dargestellt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie können 647-(POG)<sub>10</sub>-bindende *WAΔinv*(pYadA, pYFP) und *WAΔinv*(pYadA<sub>ΔN</sub>, pYFP) Bakterien als pink fluoreszierende Zellen dargestellt werden. *WAΔinv*(pYadA<sub>HY</sub>, pYFP) und *WAΔinv*(pΔYadA, pYFP) zeigen keine Fluoreszenz, was auf fehlende Bindung von 647-(POG)<sub>10</sub> hinweist. Der Größenbalken entspricht 2 µm.

### 3.5.2 Die Rolle der YadA-Kollagenbindungseigenschaft bei Infektionen von HeLa-Zellen

#### 3.5.2.1 Nachweis von Kollagen- und Fibronectin-Produktion in HeLa-Zellen

Es wird vermutet, dass YadA über einen Brückenmechanismus mit extrazellulären Matrix-(ECM)-Proteinen an  $\beta_1$ -Integrine von Wirtszellen bindet. ECM-Proteine werden von Epithelzelllinien (z.B. Hep2) produziert und sekretiert (Morita *et al.*, 1993, Hayashi *et al.*, 1988).



**Abb. 3.25 Doppel-Immunfluoreszenzmikroskopie von HeLa-Zellen zum Nachweis von Fibronectin und Kollagen auf der Zelloberfläche.**

$1 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden unfixiert mit Maus anti-Fibronectin Antikörper und Ziege anti-Maus IgG Alexa488-Konjugat (grün) bzw. Kaninchen anti-Kollagen Typ I Antiserum und Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa555-Konjugat (rot) inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurde mit 3,7 % PFA fixiert und mit Anti-fade DAPI eingebettet. HeLa-Zellen sekretieren offensichtlich ECM-Proteine. (A) Fibronectin, (B) Kollagen. Der mikroskopische Nachweis erfolgte sequentiell an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (CLSM). Der Größenbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Um dies für HeLa-Zellen zu bestätigen, wurden Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen der Zytoplasmamembran mit Maus anti-Fibronectin Antikörper und Kaninchen anti-Kollagen Typ I Antiserum und den entsprechenden Fluorophor-konjugierten Zweitantikörpern durchgeführt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (2.17.3.1). Es konnte sowohl Fibronectin (grün) als auch Kollagen (rot) auf der Oberfläche der nativen unfixierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.25, A, B). Offensichtlich sekretieren HeLa-Zellen die

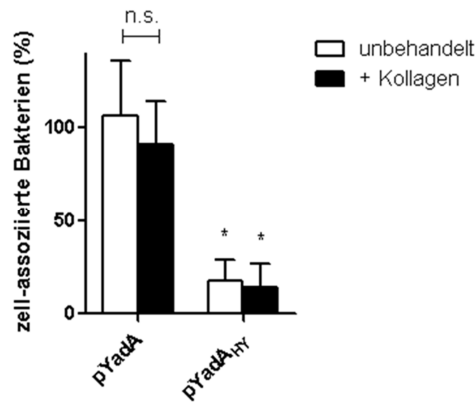
ECM-Proteine Fibronectin und Kollagen, wobei die Menge an ECM-Protein nicht von allen Zellen gleich stark produziert wird. Da mittels CLSM nur ein Ausschnitt der z-Ebene mikroskopiert wurde, konnte Fibronectin und Kollagen nur an den Zellrändern dargestellt werden.

### 3.5.2.2 Infektionen von HeLa-Zellen

Die YadA-vermittelte Bindung der Yersinien an ECM-Proteine ermöglicht die Interaktion mit  $\beta_1$ -Integrinen, welche von Epithelzellen produziert werden.  $\beta_1$ -Integrine binden Kollagen wie auch Fibronectin und könnten somit die Anheftung von Yersinien durch YadA gewährleisten (Gilcrease, 2007). Fibronectin besitzt neben einer Bindungsstelle für Integrin auch eine für Kollagen (To & Midwood, 2011). Kollagengebundene Yersinien könnten daher auch über Fibronectin eine Bindung mit  $\beta_1$ -Integrinen eingehen. Die Bindung von Kollagenfibrillen an YadA könnte aber auch zu einer schwächeren Bindung an Epithelzellen führen, da die Bindungsstelle für Kollagen des YadA Proteins bereits besetzt ist und somit die Bindung an Kollagenfasern der ECM inhibiert wird.

Daher sollte der Einfluss des an YadA gebundenen Kollagens von Yersinien auf Adhäsion von Epithelzellen geprüft werden. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit Kollagen-freien und Kollagen-präinkubierten Yersinien inkubiert (2.16.2). Ungebundene Yersinien wurden durch Waschen entfernt, zell-assoziierte Bakterien mittels Triton in Suspension gebracht und die CFU durch Ausplattieren auf selektiven Agarplatten bestimmt. Für diese Versuche wurden  $WA\Delta inv$ -Stämme verwendet, um die alleinige Rolle von YadA mit und ohne Kollagen für die Interaktion mit HeLa-Zellen zu überprüfen. Etwa 100 % der eingesetzten  $WA\Delta inv(pYadA)$ -Stämmen zeigten Adhärenz gegenüber HeLa-Zellen, wohingegen die Bindungseffizienz von  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$  um 75 % geringer war (Abb. 3.26, weiße Säulen). Dies bestätigt die Ergebnisse von Roggenkamp *et al.*, 1995, dass die Bindung von Yersinien an HeLa-Zellen mit der Kollagenbindungseigenschaft von YadA korreliert.

Yersinien mit gebundenem Kollagen hingegen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsion an HeLa-Zellen. Der kollagenbindungsmutierte Stamm  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$ , der als Negativkontrolle mit Kollagen inkubiert wurde, zeigte ähnliche Bindungseffizienz wie unbehandelte  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$  (Abb. 3.26). Der Verlust der Kollagenbindungseigenschaft führt zu verminderter Zelladhäsion.



**Abb. 3.26 Adhäsion von  $W\Delta inv(pYadA)$  und  $W\Delta inv(pYadA_{HY})$  mit und ohne Kollagenbehandlung an HeLa-Zellen.**

$2 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 10 für 30 min inkubiert. Prozentualer Anteil zell-assoziiierter Bakterien in Bezug auf die Anzahl eingesetzter Bakterien. Die Adhäsion von  $W\Delta inv(pYadA_{HY})$  im Vergleich zu  $W\Delta inv(pYadA)$  ist um 75 % reduziert. Die Kollagenbehandlung spielt dabei keine Rolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente, in drei Ansätzen durchgeführt, dargestellt. ns = nicht signifikant; \*,  $p < 0,05$  versus  $W\Delta inv(pYadA)$ . pYadA:  $W\Delta inv(pYadA)$ , pYadA<sub>HY</sub>:  $W\Delta inv(pYadA_{HY})$ .

YadA-positive Yersinien binden wahrscheinlich an sekretierte ECM-Proteine der HeLa-Zellen unabhängig von einer Kollagenvorinkubation. Da Fibronectin auch eine Bindungsstelle für Kollagen aufweist, könnten Kollagen-präinkubierte Yersinien über eine Fibronectin-Kollagen-Interaktion die Bindung an HeLa-Zellen ermöglichen, wohingegen Kollagen-freie Yersinien direkt an sekretiertes Fibronectin, Kollagen oder andere ECM-Proteine wie Laminin binden.

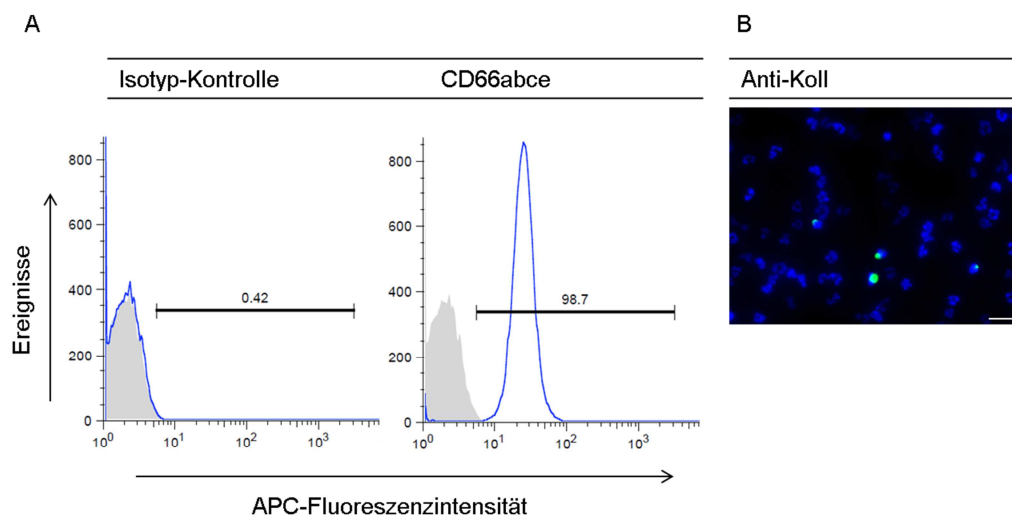
### 3.5.3 Die Interaktion von Kollagen-bindenden Yersinien mit Neutrophilen (PMNs)

Im Gegensatz zu Epithelzellen produzieren primäre hämatopoetische Zellen wie PMNs keine ECM-Proteine an der Zelloberfläche. Diese exprimieren aber eine Reihe an Rezeptoren, wie  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine, fMLP-Rezeptoren, TLR 2 und TLR 4 oder  $F_c$ -Rezeptoren, die eine Yersinien-Bindung ermöglichen können (Sabroe *et al.*, 2002, Balazovich *et al.*, 1996, Frieser *et al.*, 1996). Kollagengebundene Yersinien könnten zum Einen indirekt über Integrine eine PMN-Bindung eingehen, zum Anderen könnte die Kollagenschicht aber auch zur Maskierung von YadA-Domänen führen, welche für die PMN-Rezeptorbindung notwendig sind, womit eine PMN-Interaktion eingeschränkt ist. Um den Einfluss der YadA-Kollagenbindung auf die

PMN-Interaktion zu untersuchen, wurden humane PMNs isoliert, mit Kollagen-freien sowie Kollagen-präinkubierten Yersinien infiziert und die Adhärenzrate miteinander verglichen.

### 3.5.3.1 Isolierung von humanen PMNs

PMNs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus humanem Blut isoliert (2.15.5) und die Reinheit der Zellfraktionen mittels PMN-spezifischer Antikörper überprüft. Hierfür wurden die Zellen mit anti-CD66abce-APC Konjugat inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. 98,7 % der isolierten Zellen waren CD66abce-positiv und wurden damit als Neutrophile identifiziert (Abb. 3.27, A). Um die Spezifität der CD66abce-Antikörperbindung zu überprüfen, wurden die PMNs mit IgG2b-APC als Isotypkontrolle inkubiert. Hierbei zeigten nur wenige Zellen ein Fluoreszenzsignal (0,42 %).



**Abb. 3.27 Reinheitsüberprüfung und Test auf Kollagenproduktion der aus humanem Blut gewonnenen PMN-Fractionen.**

(A) Histogramm:  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit  $1 \mu\text{l}$  CD66abce- bzw. der Isotypenkontrolle IgG2b-APC Konjugat für 10 min inkubiert und der Anteil an fluoreszierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. 98,7 % der isolierten Zellen sind CD66abce-positiv (rechtes Diagramm). Die Isotypenkontrolle zeigte vergleichbare Fluoreszenzintensitäten wie ungefärbte Zellen (linkes Diagramm). Ungefärbte Zellen sind in grau unterlegt. (B) Immunfluoreszenzmikroskopie von PMNs für die Untersuchung der Kollagenproduktion. PFA fixierte PMNs wurden mit Kaninchen anti-Kollagen Typ I Antiserum und Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa488-Konjugat inkubiert und mit Anti-fade DAPI eingebettet. Der Zellkern der Zellen erscheint in blau, Kollagen in grün. Die Kollagenproduktion der isolierten Zellen ist gering. Der Größenbalken entspricht  $20 \mu\text{m}$ .

Um die Anwesenheit von Kollagen von PMNs auszuschließen, wurden die isolierten Zellen zunächst mittels polyklonalem Kaninchen anti-Kollagen Typ I-Serum auf

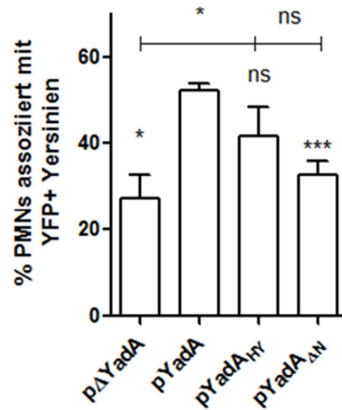
Kollagenproduktion mittels Immunfluoreszenz getestet (2.17.3.1). Dieses Antiserum wurde auch für den positiven Nachweis der Kollagensekretion der HeLa-Zellen verwendet (Abb. 3.25). In der PMN-Fraktion zeigten  $\sim 0,05$  % eine Grünfluoreszenz auf der Zelloberfläche (Abb. 3.27, B). Da 98,7 % als PMNs identifiziert wurden, ist es möglich, dass die übrigen 1,3 % der Zellen keine PMNs sind und z.B. Fibroblasten-ähnliche Zellen wie Fibrozyten enthalten, die Kollagen-positiv sind (Pilling *et al.*, 2009).

### 3.5.3.2 Interaktion von Yersinien mit humanen PMNs

Um den Einfluss der Kollagenbeschichtung der Yersinien auf Adhäsion von PMNs zu untersuchen, wurden diese mit unbehandelten bzw. Kollagen behandelten *yfp*-exprimierenden Yersinien mit unterschiedlichen YadA-Konstrukten inkubiert (2.16.4).

Der prozentuale Anteil von PMNs, der mit YFP-positiven Bakterien assoziiert ist (Bindungsanteil %) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zunächst wurden die Rolle der Kollagenbindungseigenschaft und der Einfluss des Adhäsins Inv von Kollagen-freien Yersinien an der PMN-Interaktion bestimmt. Hierzu wurden die verschiedenen YadA-Mutanten in einem Inv-negativen und Inv-positiven Hintergrund ohne Kollagen-Vorinkubation für die Infektion von PMNs verwendet und die Bindungsanteil miteinander verglichen.

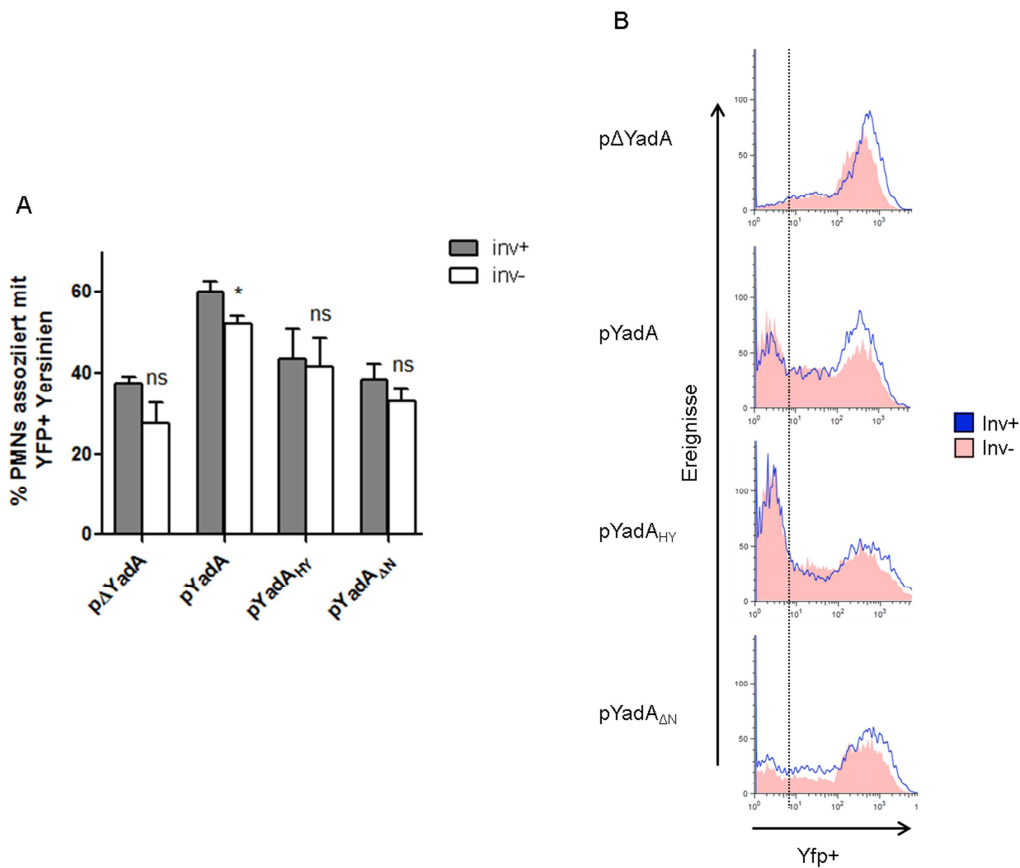
Bei einer MOI von 5 Yersinien pro PMN waren 52 % der PMNs mit  $WA\Delta inv(pYadA, pYFP)$  assoziiert, wohingegen nur 28 % bzw. 31 % der PMNs mit  $WA\Delta inv(p\Delta YadA, pYFP)$  bzw.  $WA\Delta inv(pYadA_{\Delta N}, pYFP)$  assoziiert waren (Abb. 3.28). Dies bestätigt, dass für die Bindung an PMNs die N-terminale Region (Aminosäuren 29-81) des YadA-Proteins eine wichtige Rolle spielt (Roggenkamp *et al.*, 1996). Die Kollagenbindungsmutante  $WA\Delta inv(pYadA_{HY}, pYFP)$  zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Bindungseffizienz im Vergleich zu  $WA\Delta inv(pYadA, pYFP)$ . Somit spielt die Kollagenbindungseigenschaft von YadA, wie erwartet, in der Tendenz eine schwache Rolle. Da nur etwa die Hälfte (52 %) der PMNs fähig sind, Yersinien zu binden, wird angenommen, dass nur diese PMNs Rezeptoren für die Yersinien-Bindung produzieren.



**Abb. 3.28 Adhäsion von WAΔinv(pYFP)-Stämmen an PMNs.**

$2 \times 10^5$  PMNs wurden mit einer MOI von 5 für 30 min inkubiert und der prozentuale Anteil an PMNs mit assoziierten YFP-positiven Yersinien durchflusszytometrisch bestimmt. Die Adhäsion von WAΔinv(pΔYadA) und WAΔinv(pYadA<sub>ΔN</sub>) an PMNs ist reduziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mindestens dreier unabhängiger Experimente dargestellt. ns = nicht signifikant; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  versus WAΔinv(pYadA). pΔYadA: WAΔinv(pΔYadA, pYFP), pYadA: WAΔinv(pYadA, pYFP), pYadA<sub>HY</sub>: WAΔinv(pYadA<sub>HY</sub>, pYFP), pYadA<sub>ΔN</sub>: WAΔinv(pYadA<sub>ΔN</sub>, pYFP).

Inv-positive Yersinien zeigten nur teilweise höhere Bindung an PMNs im Vergleich zu den WAΔinv-Stämmen, wobei nur WA(pYadA, pYFP) signifikant höhere Bindungseffizienz zeigte (60 %) (Abb. 3.29, A). PMN-assoziierte Inv-positive WA(pΔYadA, pYFP) (37 %), WA(pYadA<sub>HY</sub>, pYFP) (43 %) und WA(pYadA<sub>ΔN</sub>, pYFP) (38 %) zeigten höhere Bindungseffizienz als die zugehörigen Inv-negativen Yersinien (28 %, 39 % bzw. 31 %), jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Aus der Populationsverteilung im Histogramm geht jedoch hervor, dass bei allen Stämmen der größte Anteil an PMNs eine hohe MFI zeigen, wobei dieser Anteil bei Inv-positiven im Vergleich zu Inv-negativen Yersinien erhöht ist (Abb. 3.29, B). Somit binden die meisten PMNs mehrere Yersinien pro PMN. Der Anteil an niedrigeren MFI-Werten ist bei allen infizierten PMNs gering. Insgesamt zeigen somit WA(pYadA, pYFP)- bzw. WA(pYadA<sub>HY</sub>, pYFP)-inkubierte PMNs eine höhere MFI als WA(pΔYadA, pYFP)- bzw. WA(pYadA<sub>ΔN</sub>, pYFP)-inkubierte PMNs.







**Abb. 3.29 Adhäsion von WA(pYFP)- und WA $\Delta$ inv(pYFP)-Stämmen an PMNs.**

2 x 10<sup>5</sup> PMNs wurden mit einer MOI von 5 für 30 min inkubiert und der prozentuale Anteil an PMNs mit assoziierten YFP-positiven Yersinien durchflusszytometrisch bestimmt (A). (B) Histogramme der durchflusszytometrischen Bestimmung: Inv-negative Yersinien sind in hellrot unterlegt, Inv-positive in blau. Der Bindungsanteil von Inv- und YadA-positiven Yersinien ist erhöht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mindestens dreier unabhängiger Experimente dargestellt. ns = nicht signifikant, \*, p < 0,05 versus WA(pYadA). pΔYadA: WA bzw. WA $\Delta$ inv(pΔYadA, pYFP), pYadA: WA bzw. WA $\Delta$ inv(pYadA, pYFP), pYadA<sub>HY</sub>: WA bzw. WA $\Delta$ inv(pYadA<sub>HY</sub>, pYFP), pYadA<sub>ΔN</sub>: WA bzw.  $\Delta$ inv(pYadA<sub>ΔN</sub>, pYFP).

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich drei postulierte PMN-Rezeptoren (A, B, C) (Abb. 3.30):

1. Eine YadA-vermittelte Bindung kann über den N-terminalen Bereich von YadA geschehen (Rezeptor A),
2. Die PMN-Bindung wird durch ein anderes Yersinia Adhäsins vermittelt (Rezeptor B), da Inv- und YadA-negative Yersinien auch PMN-Interaktion zeigen,
3. Eine Inv-vermittelte Bindung an z.B.  $\beta_1$ -Integrine wird ermöglicht (Rezeptor C).

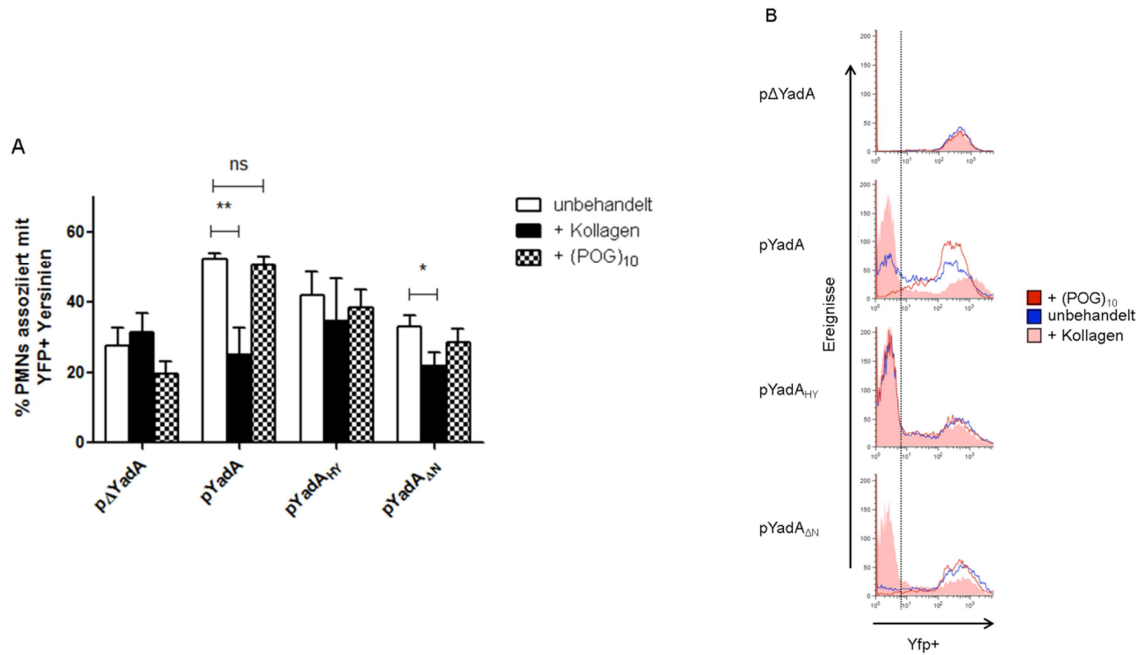


Stamm	Rezeptor	Bindungsanteil %	Stamm	Rezeptor	Bindungsanteil %
YadA <sub>HY</sub> /YadA	A B 	~ 50 %	Inv, YadA <sub>HY</sub> /YadA	C A B 	~ 60 %
YadA <sub>ΔN</sub> /ΔYadA	B 	~ 30%	Inv, YadA <sub>ΔN</sub> /ΔYadA	C B 	~ 38%

**Abb. 3.30 Mögliche Kombination an PMN-Rezeptor-Interaktion mit den verschiedenen Yersinien-Konstrukten.**

Um den Beitrag des YadA-Kollagenkomplexes der Yersinien an der PMN-Interaktion zu untersuchen, wurden Inv-negative-Stämme mit Kollagen bzw. mit dem kollagenähnlichen Peptid (POG)<sub>10</sub> präinkubiert und mit PMNs inkubiert. Der prozentuale Bindungsanteil an PMNs, die mit WAΔ*inv*(pYadA, pYFP)/Kollagen assoziiert waren, lag bei nur mehr 20 %, und lag damit im Vergleich zu Yersinien ohne Kollagenbeschichtung 2,6fach niedriger (Abb. 3.31, A). PMNs mit WAΔ*inv*(pYadA<sub>ΔN</sub>, pYFP)/Kollagen zeigten noch einen Bindungsanteil von 24 %, der im Vergleich mit Kollagen-freien Yersinien (31 %) niedriger war. WAΔ*inv*(pYadA<sub>HY</sub>, pYFP)/Kollagen zeigte keine signifikante Änderung im Bindungsverhalten an PMNs im Vergleich zu Kollagen-freien Yersinien. Ebenso wie WAΔ*inv*(pΔYadA, pYFP), welcher als Kontrolle diente. Dies spricht dafür, dass nicht das Kollagen in der Yersinien-Suspension, sondern das Yersinien-gebundene Kollagen die Bindung an PMNs reduziert.

WAΔ*inv*(pYadA)/(POG)<sub>10</sub> assoziierte PMNs zeigten eine Bindungseffizienz von 50 %, wobei dies keinen signifikanten Unterschied zu (POG)<sub>10</sub>-freien WAΔ*inv*(pYadA)-inifzierten Zellen darstellte (52 %) (Abb. 3.31, A). Auch die Stämme WAΔ*inv*(pΔYadA, pYFP)/(POG)<sub>10</sub>, WAΔ*inv*(pYadA<sub>HY</sub>, pYFP)/(POG)<sub>10</sub> und WAΔ*inv*(pYadA<sub>ΔN</sub>, pYFP)/(POG)<sub>10</sub> zeigten kein verändertes Bindungsverhalten gegenüber PMNs, welche mit den entsprechenden (POG)<sub>10</sub>-freien Yersinien inkubiert wurden (Abb. 3.31, B). Zusammenfassend führt YadA-gebundenes Kollagen der Yersinien zu einer Verringerung in der Adhärenz an PMNs, wohingegen die Bindung des kollagenähnlichen Peptids (POG)<sub>10</sub> an YadA die Bindung an Neutrophile nicht beeinflusst.



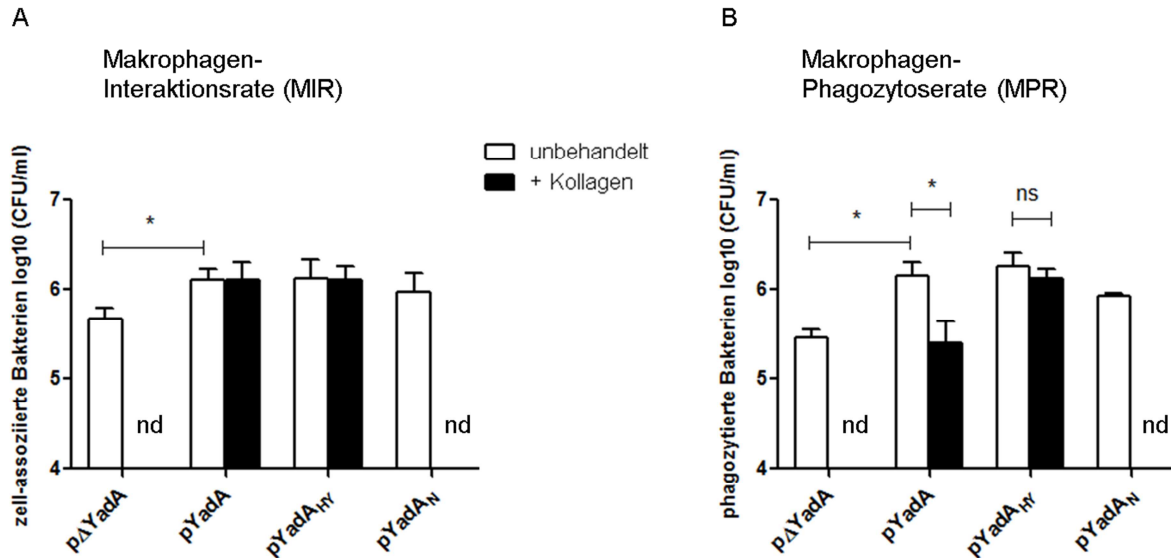
**Abb. 3.31 Adhäsion von WA $\Delta$ inv(pYFP)-Stämmen mit und ohne Kollagen- bzw. (POG)<sub>10</sub>-Präinkubation an PMNs.**

Yersinien wurden mit 10  $\mu$ g/ml Kollagen bzw. 50  $\mu$ g/ml (POG)<sub>10</sub> für 15 min bei 37 °C inkubiert und für die Infektion (MOI = 5) von  $2 \times 10^5$  PMNs eingesetzt. Der prozentuale Anteil an PMNs mit assoziierten YFP-positiven Yersinien wurde durchflusszytometrisch bestimmt (A). (B) Histogramme der durchflusszytometrischen Bestimmung: Yersinien mit Kollagen sind in hellrot unterlegt, Kollagen-freie in blau, (POG)<sub>10</sub>-Yersinien in rot. Nur 20 % der PMNs binden WA $\Delta$ inv(pYadA)/Kollagen. (POG)<sub>10</sub>-präinkubierte Yersinien zeigen keine Änderung im Bindungsverhalten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mindestens dreier unabhängiger Experimente dargestellt. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ . p $\Delta$ YadA: WA $\Delta$ inv(p $\Delta$ YadA, pYFP), pYadA: WA $\Delta$ inv(pYadA, pYFP), pYadA<sub>HY</sub>: WA $\Delta$ inv(pYadA<sub>HY</sub>, pYFP), pYadA<sub>ΔN</sub>: WA $\Delta$ inv(pYadA<sub>ΔN</sub>, pYFP).

### 3.5.4 Die Interaktion von Kollagenbindenden Yersinien mit Makrophagen

Neben PMNs spielen auch Makrophagen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr. Diese Phagozytentypen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression, sondern auch in der Chemokin- und Zytokinsekretion. Um den Einfluss der Kollagenbindung von Yersinien auf die Makrophagen-Interaktions- und -Phagozytoserate (MIR und MPR) zu untersuchen, wurden konfluente J774-Makrophagen mit unbehandelten sowie kollagenbehandelten Yersinien infiziert. Für Adhäsionsversuche wurden die Zellen mit Inv-negativen Yersinien, mit bzw. ohne Kollagenvorbehandlung, mit einer MOI von 10 für 30 min inkubiert und die Anzahl an zellassoziierten Bakterien (intra- und extrazellulär) mittels CFU („colony forming units“) bestimmt. Für die Quantifizierung der phagozytierten

Yersinien wurde Gentamicin eingesetzt, das zur Abtötung der extrazellulären Bakterien führt (2.16.5). Bevor infizierte Makrophagenproben auf Agarplatten ausplattiert wurden, wurden diese mit Kollagenase inkubiert, um eine Vereinzlung der Kollagenbehandelten Yersinien zu gewährleisten.



**Abb. 3.32 Bestimmung der MIR und MPR von Yersinien mit bzw. ohne Kollagenbehandlung von J774-Makrophagen.**

Yersinien wurden mit bzw. ohne 10 µg/ml Kollagen für 15 min bei 37 °C inkubiert und für die Infektion (MOI = 10) von  $1 \times 10^5$  Makrophagen eingesetzt. Nach 30 min Inkubation wurde die MIR (A), nach einer 90-minütigen Gentamicinbehandlung die MPR quantifiziert (B). Vor Bestimmung der MIR und MPR erfolgte eine Behandlung mit 0,1 U Kollagenase. Die Ergebnisse sind als log<sub>10</sub> CFU/ml angegeben und als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente, welche in drei Ansätzen durchgeführt wurden, dargestellt. nd = nicht durchgeführt, ns = nicht signifikant; \*,  $p < 0,05$ . pΔYadA: WAΔinv(pΔYadA), pYadA: WAΔinv(pYadA), pYadA<sub>HY</sub>: WAΔinv(pYadA<sub>HY</sub>), pYadA<sub>ΔN</sub>: WAΔinv(pYadA<sub>ΔN</sub>).

Die Bestimmung der MIR zeigte vergleichbare CFU-Werte für unbehandelte WAΔinv(pYadA), WAΔinv(pYadA<sub>HY</sub>) und WAΔinv(pYadA<sub>ΔN</sub>) (Abb. 3.32, A). Die MIR kollagenvorbehandelter WAΔinv(pYadA) und WAΔinv(pYadA<sub>HY</sub>) war vergleichbar mit der von Kollagen-freien Yersinien, sowie der MIR von WAΔinv(pYadA<sub>ΔN</sub>)-assoziierten Makrophagen und war damit fast dreimal so hoch wie die MIR von WA(pΔYadA). Auch die Phagozytoserate (MPR) war bei allen Kollagen-freien Stämmen vergleichbar (Abb. 3.32, B). WAΔinv(pYadA)/Kollagen zeigte hingegen eine 5fach niedrigere MPR als der entsprechende Kollagen-freie Stamm (Abb. 3.32, B). Die Kollagenbindungsmutante WAΔinv(pYadA<sub>HY</sub>) zeigte mit und ohne Kollagenbehandlung eine vergleichbare MPR. Dies spricht dafür, dass nicht das Kollagen in der Yersiniensuspension, sondern nur an YadA gebundenes Kollagen

die Phagozytoserate reduziert. Die Kollagenbindung von Yersinien könnte somit einen Schutzmechanismus vor Phagozytose von Makrophagen darstellen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Deletion der N-terminalen Region von YadA (pYadA<sub>ΔN</sub>) keinen Einfluss auf die Makrophagen-Interaktion hat.

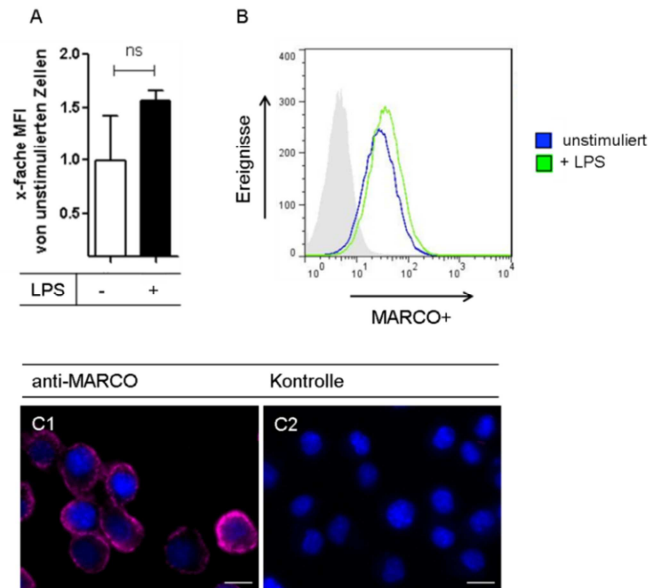
### **3.6 MARCO als potentieller Wirtszellrezeptor für YadA**

Bisher ist für YadA kein direkter Wirtszellrezeptor bekannt. Da in dieser Arbeit die Interaktion von YadA mit Kollagenfibrillen charakterisiert wurde, wurde die Beteiligung des trimeren MARCO („macrophage receptor with collagenous structure“) als direkter Rezeptor für YadA untersucht. Dieser Rezeptor, welcher vor allem von Makrophagen in der Marginalzone der Milz exprimiert wird, weist eine tripel-helikale kollagenähnliche Rezeptorstil-Domäne auf (Elomaa *et al.*, 1998).

Auch die verwendeten J774-Makrophagen produzieren MARCO (0): Mittels Ratte anti-Maus-MARCO (ED31) Antikörper konnte in der Durchflusszytometrie eine Fluoreszenzintensitätsverschiebung von gefärbten Zellen gezeigt werden (Abb. 3.33, B). Eine Stimulation der Makrophagen mit LPS führte zu keiner signifikanten Erhöhung der MFI im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abb. 3.33, A). Dadurch konnten die Aussagen von van der Laan nicht bestätigt werden, da auch unstimulierte Zellen eine ähnliche MFI wie LPS-stimulierte J774-Makrophagen zeigten (Abb. 3.33, A und B, grün und blau) (van der Laan *et al.*, 1999). Zudem konnte die Oberflächendichte von MARCO unstimulierter Zellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Abb. 3.33, C1). Kontroll-Makrophagen, die nur mit dem Sekundäantikörper inkubiert wurden, zeigten keine Fluoreszenz (Abb. 3.33, C2, Kontrolle). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass MARCO auch ohne vorherige Stimulation schon auf der Oberfläche der J774-Makrophagen mittels spezifischer Antikörper nachweisbar ist.

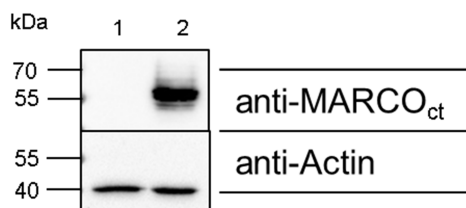
#### **3.6.1 Transfektion und Synthesenachweis von MARCO**

Um die Rolle von MARCO als potentiellen Wirtszellrezeptor von YadA genauer zu untersuchen, wurden humane CHO-Zellen mit pMARCO (Tab. 2.3) transfiziert (2.16.3) und zunächst die Produktion von MARCO mittels Immunoblot nachgewiesen.



**Abb. 3.33 Nachweis von MARCO auf J774-Makrophagen.**

$2 \times 10^5$  Zellen wurden mit Ratte anti-Maus-MARCO Antikörper und anschließend Ziege anti-Ratte Alexa647-Konjugat inkubiert. Zur Erhöhung der MARCO-Oberflächendichte wurden Zellen zuvor mit 100 ng/ml LPS über Nacht stimuliert. Der Nachweis von MARCO auf J774-Makrophagen erfolgte über die durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) (A, B) und Immunfluoreszenzmikroskopie (C). Unstimulierte (B, blau) zeigen eine leicht geringere Oberflächendichte an MARCO als mit LPS behandelte J774-Makrophagen (B, grün) (A, B). Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert (B, grau, C2). Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt die Oberflächenexpression von MARCO (C1, pink). Die Ergebnisse sind als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente dargestellt. ns = nicht signifikant. Der Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m.



**Abb. 3.34 Synthesenachweis von MARCO transfizierter CHO-Zellen mittels Immunoblot.**

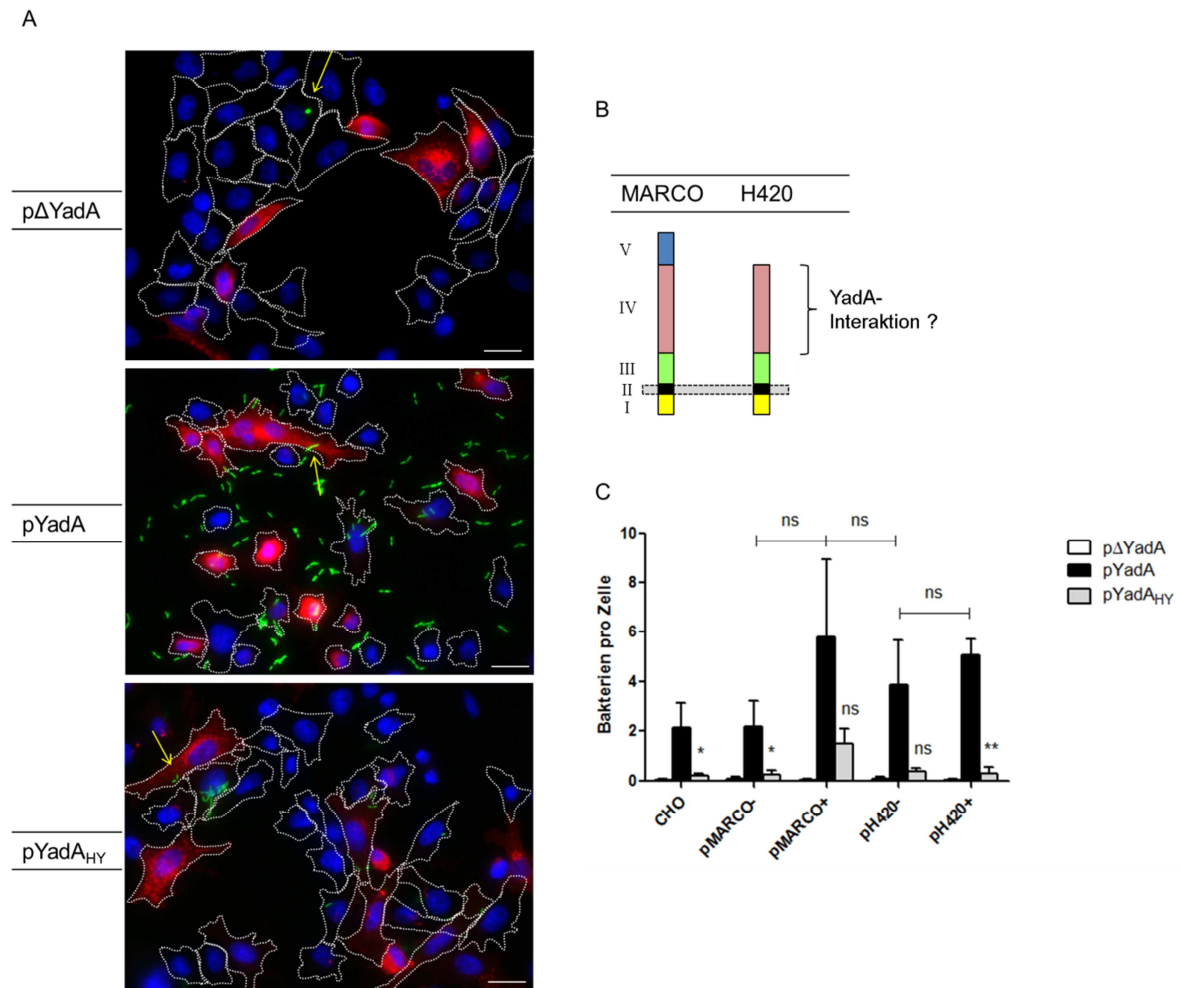
$3 \times 10^5$  Zellen in SDS-Probenpuffer wurden auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und nach Western Blot mit Kaninchen anti-human MARCO<sub>ct</sub> Antiserum detektiert. CHO(pMARCO) produzieren das MARCO-Protein (2). Negativkontrolle: untransfizierte CHO-Zellen (1). Als Ladekontrolle wurde Maus anti-Aktin verwendet.

Der Immunoblot zeigte für CHO(pMARCO) eine Proteinbande bei  $\sim 60$  kDa (Abb. 3.34, Spur 2), welche bei untransfizierten CHO-Zellen nicht vorhanden war (Abb. 3.34, Spur 1). Als

Gel-Ladekontrolle wurde die Aktinproduktion mittels Maus anti-Aktin-Antikörper bei beiden Zellen in vergleichbaren Mengen nachgewiesen (Abb. 3.34, Spur 1 und 2).

### 3.6.2 Bindung von *yadA*-exprimierenden Yersinien an MARCO-transfizierte CHO-Zellen

Die unter 3.6.1 beschriebenen transfizierten CHO-Zellen wurden mit den  $WA\Delta inv(pYFP)$ -Stämmen inkubiert und zell-assoziierte YFP-positive Yersinien mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. CHO-Zellen wurden sowohl mit Vollängen-MARCO (pMARCO) als auch mit einer verkürzten Variante (pH420), dem die Cystein-reiche Region am C-Terminus (Domäne V) deletiert wurde, transfiziert (Brannström *et al.*, 2002) (Abb. 3.35, B). Hierzu wurden die Proben mit anti-human MARCO<sub>ct</sub> Kaninchenserum gefärbt und zunächst fluoreszenzmikroskopisch die Transfektionseffizienz ermittelt. Da diese bei ca. 30 % lag, wurden pro Infektionsprobe die Anzahl adhärenter Yersinien von untransfizierten CHO- mit der von CHO(pMARCO)- und CHO(pH420)-Zellen, welche durch Rotfluoreszenz detektiert wurden, verglichen (Abb. 3.35, A). Die gemittelte Anzahl an  $WA\Delta inv(pYadA, YFP)$ -assoziierten CHO(pMARCO)-Zellen war 3mal höher als die von MARCO-negativen und untransfizierten CHO-Zellen, allerdings waren die Werte wegen der hohen Streuung nicht signifikant (Abb. 3.35, C). Etwa gleich viele  $WA\Delta inv(pYadA, YFP)$  Yersinien wurden an MARCO- und H420-positiven CHO-Zellen bestimmt. Dies lässt den Schluß zu, dass die Domäne V nicht entscheidend für die YadA-Interaktion ist. Die Bindungseffizienz von  $WA\Delta inv(pYadA_{HY}, YFP)$  an CHO-Zellen und CHO(pH420) war geringer als die von  $WA\Delta inv(pYadA, YFP)$  infizierten Zellen. Die Anzahl von  $WA\Delta inv(p\Delta YadA, YFP)$ -assoziierten MARCO-, H420-positiven sowie -negativen CHO-Zellen betrug weniger als ein Bakterium pro Zelle. Somit ist der Rezeptor MARCO wahrscheinlich nicht wesentlich an der Yersinien-YadA-Zellinteraktion beteiligt.



**Abb. 3.35 Adhäsion von *WAΔinv*(pYFP)-Stämmen an CHO(pMARCO) und CHO(pH420)-Zellen.**

1,6 x 10<sup>4</sup> transfizierte CHO-Zellen wurden mit einer MOI von 10 für 30 min inkubiert und die Anzahl an adhärenen Yersinien nach Inkubation mit anti-human MARCO<sub>ct</sub> Kaninchenserum und anschließend anti-Kaninchen Alexa555-Konjugat fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (A, C). (A) Exemplarisch sind die mit *WAΔinv*(pΔYadA,YFP), *WAΔinv*(pYadA,YFP) und *WAΔinv*(pYadA<sub>HY</sub>,YFP) infizierten CHO(pMARCO) Zellen (rot) dargestellt. Zell-assoziierte Yersinien (grün) wurden pro Zelle gezählt (gelber Pfeil). Der Größenbalken entspricht 20 μm. (B) Schematische Darstellung des MARCO-Rezeptors (Domäne I-V) und des verkürzten Konstrukts H420 (Domäne I-IV). Domäne II entspricht der Verankerung in der Zellmembran, Domäne IV der kollagenähnlichen Region. (C) Von mindestens 5 Gesichtsfeldern (N = ~ 25 Zellen/Gesichtsfeld) wurden zell-assoziierte Yersinien jeweils von pMARCO+ und pMARCO-, pH420+ und pH420-, sowie untransfizierten CHO-Zellen (Kontrolle) pro Zelle gezählt. Die Anzahl von adhärenen YadA-positiven Yersinien an CHO(pMARCO)- und CHO(pH420)-transfizierten Zellen ist nicht signifikant höher als die Anzahl von YadA-negativen und YadA<sub>HY</sub>-produzierenden Yersinien. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (N = ~ 125) mindestens dreier unabhängiger Experimente dargestellt. \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01 versus *WAΔinv*(pYadA), ns = nicht signifikant. pΔYadA: *WAΔinv*(pΔYadA, pYFP), pYadA: *WAΔinv*(pYadA, pYFP), pYadA<sub>HY</sub>: *WAΔinv*(pYadA<sub>HY</sub>, pYFP). p(MARCO): CHO(pMARCO), p(H420): CHO(pH420).

## 4 Diskussion

### 4.1 Das Wachstumsverhalten von Yersinien im 3D-KoG

Ein mit *Y. enterocolitica* kultiviertes 3D-KoG stellt ein *in vitro*-Modell dar, welches *in vivo*-Bedingungen simuliert. Mit diesem kann eine dreidimensionale gewebsähnliche Umgebung erzeugt werden, welche realere Untersuchungen als ein 2D-System bezüglich Zellinteraktion, -migration, sowie Zellmatrixinteraktion ermöglicht. Das Wachstumsverhalten von humanpathogenen *Y. enterocolitica* im 3D-KoG spiegelt zudem die Kolonisierung in infiziertem Mausegewebe wider: Stämme, welche das Virulenzplasmid pYV besitzen (WA(pYV)), bilden dicht gepackte Mikrokolonien (DPM-Phänotyp), das der Yersinien-Kolonisierung einer infizierten Milz, Leber und den Peyer'schen Plaques stark ähnelt (Freund *et al.*, 2008). In diesen Organen kommt es zu monoklonaler Mikrokolonie- und Abzessbildung (Öllerich *et al.*, 2007). Yersinien ohne pYV (WAc) hingegen wachsen weitgehend planktonisch im 3D-KoG. Desweiteren ist bekannt, dass das Adhäsion YadA, welches auf dem pYV-Plasmid kodiert wird, entscheidend für die Packungsdichte der Mikrokolonien ist (Freund *et al.*, 2008). YadA besteht aus einer Stiel-, Hals- und Kopfreion, wobei letztere verantwortlich ist für Autoagglutination und Bindung an extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen (Emödy *et al.*, 1989, Koretke *et al.*, 2006). YadA-deletierte Stämme (WA(pYV $\Delta$ YadA)) zeigen einen weiteren Phänotyp: diese wachsen in locker gepackten Mikrokolonien (LPM) im 3D-KoG. Yersinien mit deletierter Kopfreion des YadA-Proteins zeigen ebenfalls einen LPM-Phänotyp (Freund *et al.*, 2008). Die Fähigkeit des YadA-Proteins Kollagen zu binden, hat jedoch keinen Einfluss auf die Packungsdichte, da ein kollagenbindungsdefizienter Stamm WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>), bei welchem zwei Histidin-Kodons des YadA gegen zwei Tyrosin-Kodons ausgetauscht wurden, im 3D-KoG in DPM wächst. YadA vermittelt ECM-Bindung und Autoaggregation im 3D-KoG, wobei die Autoaggregation unabhängig von der ECM-Bindung im 3D-KoG ist. Weitere Adhäsine wie Inv oder Myf haben ebenfalls keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten im 3D-KoG (Freund *et al.*, 2008). Sekretierte Yop-Effektorproteine, die an der bakteriellen Oberfläche anhaften, könnten zur LPM-Morphologie beitragen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit genauer geprüft.



#### 4.1.1 Der Einfluss der Yop-Effektorproteine auf das Wachstumsverhalten im 3D-KoG

Die Vermutung, die Injektionsnadel des T3SS ist an der Aggregation der Yersinien im 3D-KoG beteiligt, konnte widerlegt werden. Hierzu wurde zum Einen der pYV-negative Stamm WAc(pT3SS) verwendet, welcher neben *YadA* auch alle Gene für das T3SS besitzt, jedoch keine Gene für die T3SS-Effektorproteine, aber die Translokon-Proteine YopB, D sowie LcrV. Zudem wurde in diesem Stamm das *yadA*-Gen deletiert (WA(pT3SS $\Delta$ YadA)). Es konnte gezeigt werden, dass *YadA*-negative und T3SS-positive Stämme im 3D-KoG planktonisch wachsen im Gegensatz zum *YadA*-positiven WAc(pT3SS)-Stamm, welcher in DPM wuchs (Abb. 3.2, S.66). Somit kann das T3SS als zusätzlicher Faktor für die Mikrokoloniebildung im 3D-KoG ausgeschlossen werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden zusätzlich WAc-Stämme ohne T3SS verwendet. Hierzu wurden Plasmide konstruiert, welche das funktionelle *yadA*-Gen (WA(pYadA)) sowie ein durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette unterbrochenes *yadA*-Gen (WA(p $\Delta$ YadA)) besitzen. Das Wachstumsverhalten im 3D-KoG von WA(p $\Delta$ YadA) ähnelte dem von WA(pT3SS $\Delta$ YadA), welche beide planktonisch wuchsen, wobei der *YadA*-positive WA(pYadA) wie der WAc(pT3SS)-Stamm DPM bildete. *YadA*-negative Stämme, die keine Yops sekretieren, wachsen somit planktonisch, wohingegen WA(pYV $\Delta$ YadA) mit funktioneller Yop-Sekretion LPM bildet. Somit könnten sezernierte Yop-Effektorproteine an der Aggregation der Yersinien beteiligt sein, wenn das *YadA* Protein als Agglutinationsfaktor nicht vorhanden ist. Eine *YadA*- und *Inv*-Deletionsmutante im WA(pYV)-Stamm wiederum zeigt, ähnlich dem WAc-Stamm, planktonisches Wachstum im 3D-KoG (Guggenberger, 2011). Es wird vermutet, dass die bakterielle Autoagglutination bei Verlust des Invasins durch *YadA* kompensiert wird, da eine *inv*-Deletion allein keine Veränderung des DPM-Phänotyps herbeiführt (Freund *et al.*, 2008, Guggenberger, 2011). Möglicherweise besitzt *Inv* eine inhibitorische Funktion in Bezug auf die Zell-Zellteilung. Desweiteren zeigen *Inv*-negative WAc-Yersinien keine Autoagglutination in Zellkulturmedium, wohingegen *YadA*-negative WA(pYV)-Stämme instabile Aggregate aufweisen (Schütz *et al.*, 2010). Im 3D-KoG zeigen diese Stämme einen stabilen LPM-Phänotyp, welcher durch die Yop-Sekretion herbeigeführt wird. Die Vermutung, dass die Vernetzung zum LPM-Wachstum von WA(pYV $\Delta$ YadA)-Yersinien allein auf Invasin beruht, kann nicht bestätigt werden, da ebenfalls die Yop-Effektorproteine daran beteiligt sein könnten.

## 4.2 Charakterisierung der YadA-Kollagenbindung

Die Invasion der intestinalen Mucosa mittels Invasin gilt als erster Schritt, um eine Yersinien-Infektion im Wirt zu verursachen (Isberg & Van Nhieu, 1995). Nach der Invasion spielt YadA wahrscheinlich eine bedeutende Rolle während der Infektion in der Adhäsion an Wirtszellen Neben Serumresistenz vermittelt YadA auch Resistenz gegenüber einer Reihe antimikrobieller Peptide wie Lysozym und Defensin (Visser et al., 1996, Kirjavainen et al., 2008). Es wird angenommen, dass die Bindung an Epithelzellen, welche extrazelluläre Matrixproteine (ECM) wie Kollagen und Fibronectin sezernieren, durch *Y. enterocolitica* entweder direkt durch Invasin oder indirekt durch YadA, das die Bindung an ECM-Proteine vermittelt soll, geschieht. Frühere Untersuchungen wiesen die Bindung von YadA an Kollagen Typ I, II, III, IV, V und XI nach (Emödy et al., 1989, Schulze-Koops et al., 1992). Kollagen Typ I wird als Tripel-Helix, bestehend aus zwei  $\alpha_1$ - und einer  $\alpha_2$ -Kette, aus der eukaryotischen Zelle sezerniert und nach Ausbildung einer Mikrofibrille zur fertigen Kollagenfaser quervernetzt (Shoulders & Raines, 2009). In der Vergangenheit wurde die YadA-Kollagenbindung überwiegend mittels ELISA nachgewiesen: Kollagen-beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit Yersinien inkubiert und diese mittels Antikörper detektiert (Roggenkamp et al., 1995). Diese Methode eignet sich, um eine hohe Anzahl an Proben zu testen, hat aber den Nachteil, dass über den Trimerisierungszustand der Kollagen- $\alpha$ -Ketten bzw. Ausbildung einer Kollagenfaser und somit über die Bindung an Kollagenuntereinheiten keine Aussage mehr getroffen werden kann. Um die YadA-Kollagenbindung in Zellkulturmedium nachzuweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine geeignetere Methode mit fluoreszenzmarkiertem Kollagen entwickelt. In dieser Lösung ist das Vorhandensein von trimeren  $\alpha_1$ -/ $\alpha_2$ -Kollagen-Untereinheiten (Kollagenfibrillen) gewährleistet und die Interaktion mit YadA kann zudem durch Detektion des fluoreszenzmarkierten Kollagens durchflusszytometrisch quantifiziert werden.

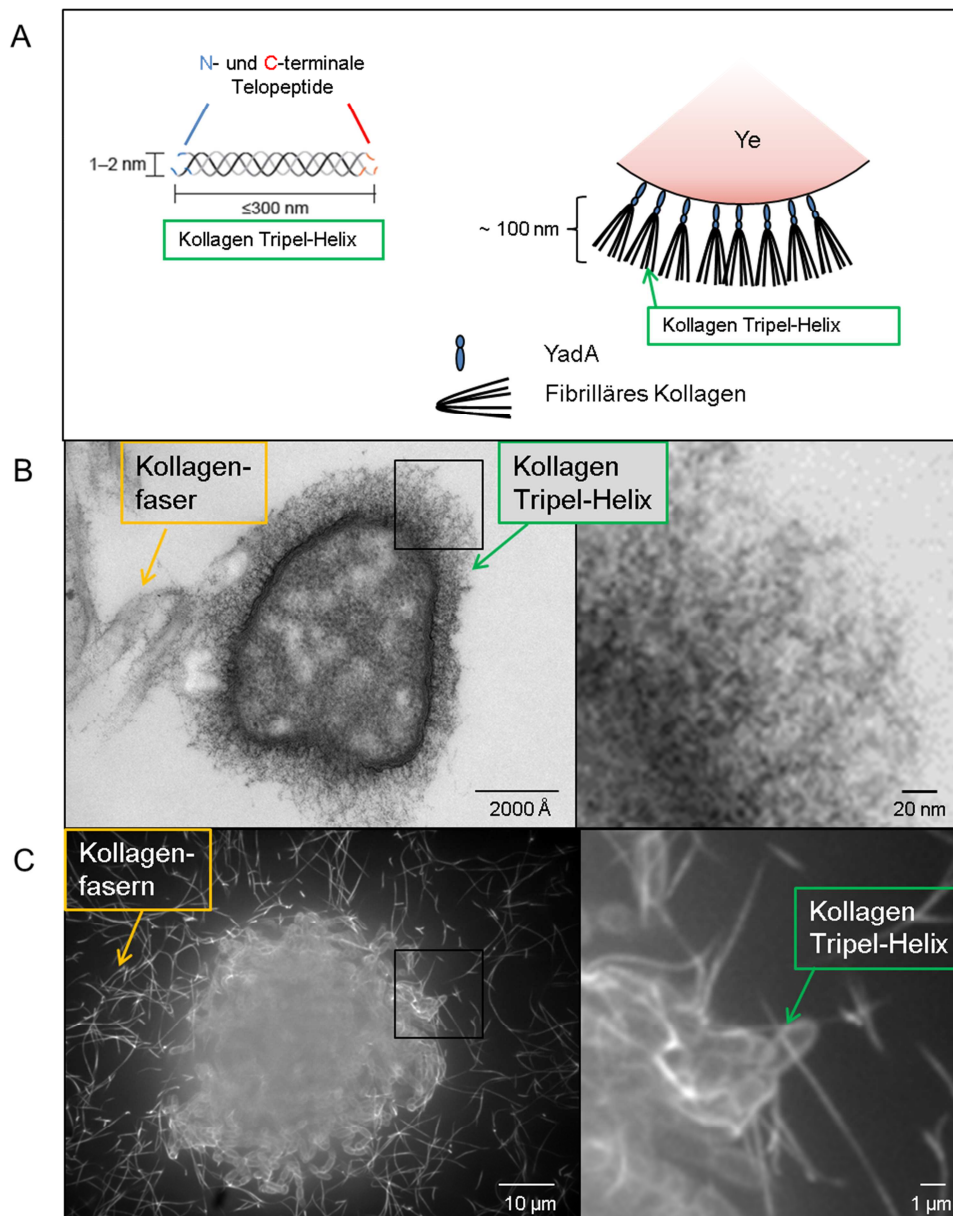
Desweiteren wurde im 3D-KoG die Kollagenbindung der Yersinien mittels Transmissionselektronen- (TEM) und Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. In der Elektronenmikroskopie zeigten die Bakterien mit der Ausbildung einer fibrillär erscheinenden Umhüllung einen neuartigen Kapsel-ähnlichen Phänotyp. Da das Wachstumsverhalten von Yersinien im 3D-KoG eher *in vivo*-Bedingungen entspricht als die Kultivierung in Zellkulturmedium, wurde die Ausbildung dieser fibrillären Kapsel und die YadA-Kollagenbindung in diesem Modell ebenfalls näher charakterisiert.

#### 4.2.1 Die Bindung von Kollagenfibrillen an YadA

Kürzlich konnte durch TEM die Ausbildung einer 100 nm dicken fibrillären Kapsel (FK) von humanpathogenen Yersinien nachgewiesen werden, wenn diese im 3D-KoG kultiviert wurden (Freund *et al.*, 2008, Abb. 1.4, S.21). Eine Reihe von Mikroorganismen sezernieren extrazelluläre Polymere, die an der Biofilmbildung beteiligt sind und ebenso durch TEM sichtbar gemacht werden können. Sezerniertes bakterielles Material konnte an der bakteriellen Oberfläche von *Campylobacter jejuni*, welcher ebenfalls zur Mikrokoloniebildung fähig ist, durch Färbung mit Rutheniumrot mittels TEM nachgewiesen werden (Moe *et al.*, 2010). Die Färbung mit Rutheniumrot stellt für den Nachweis von Polysacchariden auf der Zelloberfläche bei elektronenmikroskopischen Analysen eine gängige Methode dar (Waller *et al.*, 2004). Da die FK der Yersinien im 3D-KoG ebenfalls mit Rutheniumrot in der TEM sichtbar gemacht wurde, wurde zunächst getestet, ob es sich um sezernierte Polysaccharide handeln könnte. *E. coli* und andere *Enterobacteriaceae* produzieren Poly-N-Acetylglucosamin (PNAG), welches essentiell für die Biofilmbildung ist (Wang *et al.*, 2004). In *Y. pestis* wird dieses Exopolysaccharid von dem Operon *hmsHFRS* kodiert (Perry *et al.*, 2004). Durch vergleichende Genomsequenzanalyse konnte auch für *Y. enterocolitica* 8081 ein Homolog identifiziert werden. Ebenso konnte ein intaktes *bcs* Operon in der Genomsequenz von *Y. enterocolitica* 8081 aufgefunden werden. Dieses Operon kodiert für Proteine der Cellulose-Biosynthese, welches neben *E. coli* auch in Biofilmbildnern wie Salmonellen und Pseudomonaden vorhanden ist (Le Quere & Ghigo, 2009, Zogaj *et al.*, 2001, Ude *et al.*, 2006). Eine Beteiligung von HmsH (PNAG-Transporter) sowie BcsA (Cellulose-Synthase) an der FK-Bildung von *Y. enterocolitica* WA(pYV) konnte durch elektronenmikroskopische Analysen der hergestellten *hmsH*- bzw. *bcsA*-Deletionsmutanten, welche im 3D-KoG kultiviert wurden, ausgeschlossen werden. Beide Deletionsmutanten zeigten im 3D-KoG DPM und eine dem WA(pYV)-Stamm vergleichbare fibrilläre Kapsel auf der bakteriellen Oberfläche (Abb. 3.4, S.69). Weitere Yersinia Proteine, welche an der FK-Bildung beteiligt sein könnten, wurden durch Analyse eines YadA-produzierenden *E. coli* Stammes ausgeschlossen. Dieser Stamm DH5 $\alpha$ (pUC::YadA) zeigte den Yersinien vergleichbare DPM- sowie FK-Bildung, welche bei YadA-negativen DH5 $\alpha$  abwesend war. Dies belegt, dass im wesentlichen YadA für die FK-Bildung im 3D-KoG verantwortlich ist. Desweiteren war die FK bei Yersinien, welche in einem kollagenfreien 3D-Fibringel kultiviert wurden, nicht vorhanden und eine Kollagenasebehandlung führte zum Verlust der fibrillären Kapsel der Yersinien im 3D-KoG. Frühere Untersuchungen zur Kollagenbindung

von Yersinien zeigten, dass der Austausch zweier Histidin-Kodons in Position 156 und 159 des YadA-Proteins durch Tyrosin-Kodons zum Verlust der Kollagenbindung führt (Roggenkamp *et al.*, 1995). Da bei diesem kollagenbindungsdefizienten WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>)-Stamm durch TEM-Analysen keine FK nachzuweisen war, besteht die fibrilläre Kapsel folglich aus Kollagenfibrillen (Abb. 3.9, S.74). Weiterhin ist die FK-Bildung nicht direkt mit der DPM-Bildung im 3D-KoG assoziiert, da auch der kollagenbindungsdefiziente Stamm in DPM wächst, aber im Gegensatz zu kollagenbindungsfähigen Yersinien keine FK aufweist. Um Kollagen als Bestandteil der FK auf der bakteriellen Zelloberfläche direkt nachzuweisen, wurden die Yersinien im 3D-KoG mittels Immunfluoreszenz- und Immunelektronenmikroskopie analysiert. Die Detektion von Kollagen erfolgte mit spezifischen anti-Kollagen Seren, wobei diese mit den polymerisierten Kollagenfasern kaum reagierten. In der Immunfluoreszenz jedoch konnten die in DPM gewachsenen WA(pYV)-Yersinien deutlich als fluoreszierende Bakterien dargestellt werden (Abb. 3.10, S.75). In der Immunogoldfärbung konnten die Goldpartikel zudem eindeutig um die fibrilläre Kapsel von WA(pYV) sichtbar gemacht werden (Abb. 3.11, S.76). Die eingesetzten anti-Kollagen Typ I-Seren erkennen somit YadA-gebundenes Kollagen, binden jedoch kaum an Kollagenfasern im 3D-KoG. Dies weist darauf hin, dass Yersinien weniger Kollagenfasern, sondern verstärkt Kollagenfibrillen binden. Ähnlich wurde dies bereits auch für das Streptokokken-Protein Slr gezeigt: Durch Elektronenmikroskopie wurde die Bindung von Kollagen Typ I-Untereinheiten an die Bakterien sichtbar gemacht. Zudem konnte die Bindung von goldmarkiertem rekombinantem Slr-Protein an fibrilläres und natives Kollagen mittels TEM nachgewiesen werden (Bober *et al.*, 2011). Somit binden auch Streptokokken nicht nur native Kollagenfasern, sondern auch fibrilläre Kollagenuntereinheiten.

Eine nähere Charakterisierung der YadA-Kollagenbindung im 3D-KoG erlaubte der Einsatz von grün-fluoreszenzmarkiertem Kollagen Typ I (488-Koll I). Hier konnten die makroskopisch großen Kollagenfasern anhand ihrer grünen Fluoreszenz in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Weiterhin zeigten die in DPM gewachsenen WA(pYV)-Yersinien deutliche Grünfluoreszenz auf der Bakterienoberfläche, welche bei WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>)- und YadA-negativen Yersinien nicht vorhanden war (Abb. 3.12, S.78). Offensichtlich besteht YadA-gebundenes 488-Koll I aus Kollagenfibrillen, den kleinsten Untereinheiten der Kollagenfaser, welches sich deutlich von einer nativen Kollagenfaser unterscheidet.



**Abb. 4.1 Darstellung der YadA-Kollagenbindung von WA(pYV) im 3D-KoG.**

(A) Darstellung einer bis zu 300 nm langen Kollagen Tripel-Helix und U-förmig an YadA gebundene Kollagen Tripel-Helices, welche eine Dicke von  $\sim 100$  nm ergeben könnten. Ye: *Y. enterocolitica*. Elektronen- (B) bzw. fluoreszenzmikroskopische Darstellung (C) von WA(pYV) im 3D-Ko488G. Yersinien zeigen gebundene Kollagen Tripel-Helices (grün) und -Fasern (gelb).

Dies stimmt auch mit der Charakterisierung mittels TEM überein: Die 100 nm dicke fibrilläre Kollagenkapsel auf der bakteriellen Oberfläche von WA(pYV) zeigt fibrilläre Kollagenuntereinheiten, dessen Struktur sich von der quervernetzten Kollagenfaser abhebt (Abb. 4.1, B, C). Von der Größendimension könnte es sich bei gebundenen Kollagenfibrillen

um die 300 nm langen heterotrimeren Tripel-Helices handeln, welche sich eventuell U-förmig an YadA anlagern (Abb. 4.1, A).

Diese Vermutung konnte durch Western Blot Analysen mit Biotin-markiertem Kollagen Typ I (Biotin-Koll I) unterstützt werden. Hierfür wurden die Yersinien mit löslichem Biotin-Koll I in PBS kultiviert und mittels Streptavidin-Konjugat im Immunoblot detektiert. WA(pYV) zeigte u.a. eine Bande bei ~ 390 kDa, die dem  $(\alpha_1)_2\alpha_2$ -Trimer des Kollagens entspricht (Abb. 3.13, S.79). Zudem wurden das Dimer (~ 260 kDa) und die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Monomere (~ 135 kDa bzw. ~ 125 kDa) im Immunoblot nachgewiesen. Kleinere gebundene Kollagenfragmente wurden nicht detektiert. Es konnte bereits eine definierte Binderegion innerhalb der  $\alpha_1$ -Kette des Kollagen Typ I bestimmt werden, doch wird dies kontrovers diskutiert (Schulze-Koops *et al.*, 1995, Leo *et al.*, 2008). Das tripel-helikale Peptid (POG)<sub>10</sub>, welches mit den Aminosäuren Prolin (P), Hydroxyprolin (O) und Glycin (G) das in Kollagen am häufigsten vorkommende Aminosäuremotiv beinhaltet, bindet ähnlich stark an YadA wie natives Kollagen, wobei das Peptid Gly<sup>-</sup> (POG)<sub>4</sub>-PO-(POG)<sub>5</sub>, welches aufgrund der Abwesenheit des zentralen Glycins kaum nachweisbare Tripel-Helices ausbilden kann, nicht mehr zur YadA-Bindung fähig ist (Long *et al.*, 1993, Leo *et al.*, 2008). Desweiteren wurde in dieser Studie die Bindung von Cyanobromid gespaltenen Kollagenfragmenten an YadA untersucht: CB10 (~ 30 kDa) beinhaltet die vorhergesagte Binderegion, welche bei dem Kollagenfragment CB11 (~ 26 kDa) nicht vorhanden ist (Schulze-Koops *et al.*, 1995, (Miller & Lunde, 1973). Die Bindung an rekombinantes YadA konnte jedoch für beide Kollagenfragmente nachgewiesen werden, wobei diese weniger affin war als für intaktes Kollagen und (POG)<sub>10</sub>. Die Bindung der CNBr-Kollagenfragmente wird durch eine mögliche Zerstörung der tripel-helikalen Struktur während der Präparation der Fragmente und anschließende unvollständige Renaturierung zu einer Tripel-Helix erklärt, das folglich zu einer verminderten Bindung an YadA führen könnte. Dies spricht dafür, dass YadA an Kollagenfragmente unabhängig von einer spezifischen Sequenz, aber dafür abhängig von der Ausbildung einer tripel-helikalen Struktur bindet. Dies konnte bereits für das kollagenbindende Protein CNA von Staphylokokken belegt werden, wobei CNA zu den kollagenbindenden Adhäsinen der Familie der MSCRAMM („microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules“) und nicht wie YadA zu den trimeren Autotransportern gehört (Patti *et al.*, 1993). Der bevorzugte Ligand von CNA besteht ebenfalls aus Wiederholungen der Aminosäuresequenz POG, wobei die verantwortliche Binderegion im CNA-Protein auch bei dem Kollagenbindenden Protein ACE von *E. faecalis* hoch konserviert ist und ebenfalls für die Kollagenbindung essentiell ist

(Zong *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2007). Die Bindung von  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Monomeren, wie sie im Immunoblot detektiert wurde, ist deshalb für YadA unwahrscheinlich. Bei der Präparation der mit Biotin Koll I-inkubierten Yersinien für das SDS-Gel wird wahrscheinlich durch die Hitzebehandlung (5 min, 100 °C) und SDS-Zugabe die trimere Struktur des Kollagens aufgelöst und können somit anschließend als Monomere detektiert werden. Um eine mögliche Interaktion von YadA mit verdauten Kollagenfragmenten nachzuweisen, wurde Biotin- bzw. 488-Koll I mit Kollagenase in 10 Fragmente gespalten. Im Immunoblot mit Streptavidin-Konjugat konnten jedoch nur die zwei Kollagenfragmente mit einem Molekulargewicht von 10 und 12 kDa detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass nur der N- und C-Terminus des Kollagens markiert wird. Auch mittels anti-Kollagen Serum wurden nur die trimere-, dimere Form sowie die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Ketten des Biotin-Koll I erkannt, jedoch die 10 Biotin-Koll I-Fragmente nicht. In der Immunfluoreszenz konnte eine Interaktion mit WA(pYV) und durch Kollagenasebehandlung erhaltene 488-Koll I-Fragmente nicht gezeigt werden. Die 10 und 12 kDa-Kollagenfragmente können entweder nicht an YadA binden oder die Methode der Fluoreszenzmikroskopie ist hierfür nicht sensitiv genug. Wurden Yersinien mit unmarkiertem löslichen Kollagen inkubiert, konnten WA(pYV)-Stämme mit anti-Kollagen Typ I-Serum in der Fluoreszenzmikroskopie, wie schon für das 3D-KoG gezeigt, als grünfluoreszierende Zellen sichtbar gemacht werden. Die Behandlung der Kollagen-gebundenen Yersinien mit Kollagenase allerdings führte zum Verlust der Detektion von WA(pYV)-Yersinien mittels des anti-Kollagen Typ I-Serum in der Fluoreszenzmikroskopie. Die Kollagenase spaltet somit auch an YadA gebundenes Kollagen. Die in dieser Arbeit verwendete bakterielle *Clostridium histolyticum* Kollagenase (CHC) unterscheidet sich von eukaryotischen Matrixmetalloproteinasen (MMP) hinsichtlich der Erkennungssequenz. Die CHC erkennt die Sequenz -Pro-X#Gly-Pro- und erzeugt bis zu 5 Spaltprodukte der  $\alpha_1$ (I)-Kette (French *et al.*, 1992). Berücksichtigt man eine Dimer-Bildung einzelner Fragmente, können bis zu 8 Fragmente detektiert werden (French *et al.*, 1992). Möglicherweise sind einige CHC-Kollagenfragmente, welche im SDS-Gel detektiert werden konnten, ebenfalls das Resultat einer Dimerisierung. Da die kommerziell erworbene CHC aus verschiedenen CHCs besteht, kann dies ebenfalls zu mehr als 8 Spaltprodukten führen. Eukaryotische MMPs spalten die  $\alpha$ -Ketten an der definierten Sequenz (Gln/Leu)-Gly#(Ile/Leu)-(Ala/Leu), das zu zwei Kollagenfragmenten führt ( $\frac{3}{4}$  und  $\frac{1}{4}$  der  $\alpha$ -Kette) (Chung *et al.*, 2004, Mallya *et al.*, 1992). Ein MMP-Verdau von mit Fluorophor-markiertem humanen Kollagen zeigte keinen Unterschied in der Markierungsrate der erhaltenen Kollagenfragmente (Han *et al.*,

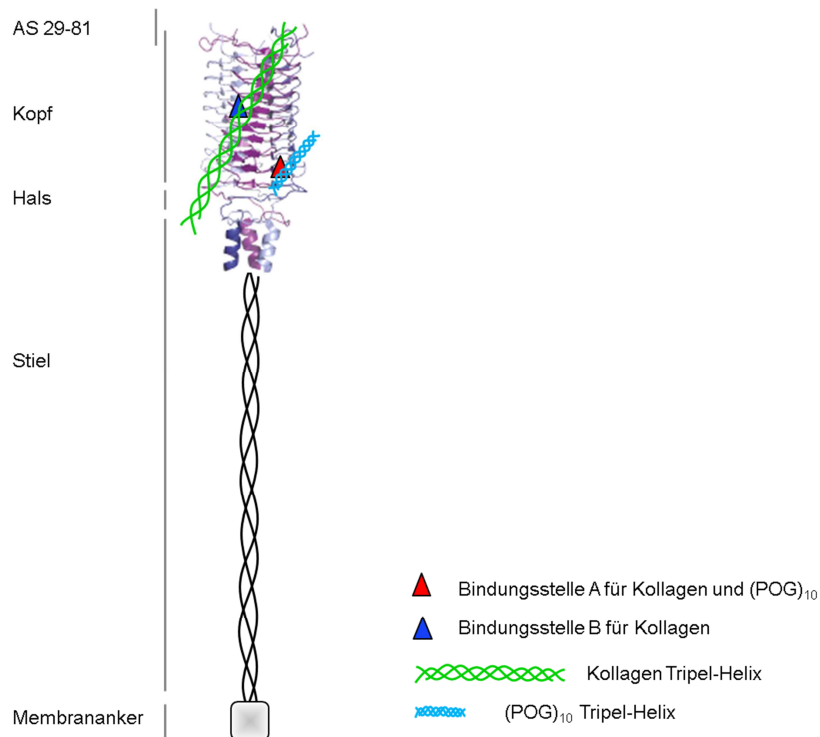
2010). In dieser Untersuchung wurden bei der Markierung somit alle freien Aminogruppen mit dem Fluorophor markiert und nicht nur die Termini. Möglicherweise ist das in dieser Arbeit verwendete bovine Kollagen stark hydroxyliert, so dass die Markierung nur an den Termini möglich war.

#### 4.2.2 Bindungsstellen von YadA an Kollagen

Synthetische kollagen-ähnliche Oligopeptide wie (POG)<sub>10</sub> können eine homotrimere Tripel-Helix ausbilden und stellen damit ein wertvolles Hilfsmittel in biochemischen und biophysikalischen Experimenten dar (Koide 2005). Für das tripel-helikale Peptid (POG)<sub>10</sub> konnte bereits gezeigt werden, dass es die Bindung von Kollagen an YadA blockiert (Leo *et al.*, 2010). Bei diesen Untersuchungen wurden jedoch mit Kollagen beschichtete Kulturplatten verwendet, womit wiederum keine Aussage über den Trimerisierungszustand des Kollagens getroffen werden kann (s. 4.2.). Desweiteren wurde rekombinantes YadA eingesetzt, welches für die Inhibierung der Kollagenbindung mit (POG)<sub>10</sub> inkubiert wurde. Um die Blockierung der YadA-Kollagenbindung mit löslichem Kollagen zu untersuchen, wurde zunächst das 3D-KoG-Modell verwendet. Es zeigte sich, dass Yersinien, welche in einem mit (POG)<sub>10</sub>-supplimentierten 3D-KoG gewachsen waren, eine dünnere fibrilläre Kapsel auf der Bakterienoberfläche aufwiesen, als WA(pYV)-Stämme ohne (POG)<sub>10</sub>, wobei beide DPM bilden (Abb. 3.17, S.83). Es konnte kein Unterschied in der Polymerisation des Kollagengels mit und ohne (POG)<sub>10</sub>-Supplementierung festgestellt werden. Fluoreszenzmarkiertes 647-(POG)<sub>10</sub> bindet an oberflächenexponiertes YadA der DPM, jedoch nicht an die multimeren Kollagenfasern, wie durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden konnte (Abb. 3.18, S.84). Offenbar konkurrieren die Kollagenfibrillen mit (POG)<sub>10</sub> um Bindungsstellen des YadA-Proteins. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurden (POG)<sub>10</sub>-präinkubierte Yersinien auf 488-Koll I-Bindung durchflusszytometrisch analysiert. Diese Methode eignet sich besser, um die Bindung an Kollagen zu untersuchen, da keine polymerisierten Kollagenfasern, sondern nur tripel-helikale Kollagenfibrillen in der Lösung vorhanden sind und stellt somit eine definierte Kollagenmenge dar. Unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen produzierten fast alle WA(pYV)- und WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>)-Yersinien YadA auf der Oberfläche (93 % bzw. 83 %) (S. 86, Abb. 3.19). Somit ist der Anteil an Zellen, welche aufgrund fehlender YadA-Produktion kein Kollagen binden können, in dieser Population gering. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der verschiedenen Yersinien-Stämme zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Darstellung der Populationen



von WA(pYVΔYadA), WA(pYV) sowie 488-Koll I-gebundene WA(pYV): YadA-positive Yersinien neigen zu Autoagglutination, womit eine heterogene Mischung aus Einzelzellen und Aggregaten entsteht (Erhöhung des FSC). Dies wird durch eine Verschiebung der FSC-Intensitätswerte verdeutlicht. Eine definierte Region („Gate“) für Einzelzellen wurde anhand der WA(pYVΔYadA)-Population bestimmt, welche kaum Aggregate bildet (S. 87, Abb. 3.20, A). Somit wird die Analyse einer definierten homogenen Population aus Einzelzellen gewährleistet. Aus dieser Subpopulation konnten 83 % der WA(pYV)-Yersinien lösliches 488-Koll I binden, eine Vorinkubation mit (POG)<sub>10</sub> führte mit dieser Methode ebenfalls zur Blockierung der Kollagenbindung. 4 % der WA(pYV::YadA<sub>HY</sub>)-Yersinien zeigten eine Bindung an 488-Koll I (S. 87, Abb. 3.20, B1). Geringe Konzentrationen von bis zu 0,1 µg/ml (POG)<sub>10</sub> zeigten kaum Veränderung in der Anzahl an 488-Koll I-assoziierten Yersinien, nach einer Vorinkubation von 50 µg/ml (POG)<sub>10</sub> konnten etwa nur 50 % der WA(pYV)-Stämme 488-Koll I binden. Eine Verdopplung der Konzentration an (POG)<sub>10</sub> (100 µg/ml) führte interessanterweise zu keiner Veränderung in der Anzahl an 488-Koll I-assoziierten WA(pYV)-Stämmen, womit der Sättigungspunkt für (POG)<sub>10</sub>-Bindung erreicht war. Somit sind nach Zugabe von 50 µg/ml (POG)<sub>10</sub> zwei Yersinien-Populationen vorhanden: Eine 488-Koll I-positive und eine –negative Yersinien-Population. Um die 488-Koll I-Bindung pro Bakterienzelle zu analysieren, wurden die MFI-Werte der 488-Koll I-positiven Yersinien bestimmt. Bei der Analyse der MFI-Werte wird die Fluoreszenzintensität pro Zelle betrachtet, d.h. die Menge an gebundenen 488-Koll I pro Zelle. Bei einer Vorbehandlung mit 0,05 µg/ml (POG)<sub>10</sub> reduzierte sich die Kollagenbindung der WA(pYV)-Bakterien kaum, eine 20fache Erhöhung an (POG)<sub>10</sub> (1 µg/ml) führte schon zu 40 %, eine Erhöhung auf das 200fache (10 µg/ml) zu ca. 50 % weniger 488-Koll I-Bindung. Yersinien, welche mit 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml (POG)<sub>10</sub> präinkubiert wurden, zeigten bis zu 70 % weniger 488-Koll I-Bindung. Bei einer Vorinkubation mit 50 µg/ml (POG)<sub>10</sub> sind folglich alle Bindungsstellen des YadA-Proteins für (POG)<sub>10</sub> gesättigt (S. 89, Abb. 3.21, B2). Da dennoch 488-Koll I an YadA gebunden werden kann, gibt es möglicherweise eine zweite Bindungsstelle an YadA, welche nur für Kollagen zugänglich ist. Somit weist YadA eventuell zwei unterschiedliche Bindungsstellen für tripel-helikale Peptide auf: Bindet Bindungsstelle A sowohl (POG)<sub>10</sub> als auch fibrilläres Kollagen, kann eine zweite Bindungsstelle B nur Kollagen binden. (Abb. 4.2)



**Abb. 4.2 Schematische Darstellung der verschiedenen Bindungsstellen von YadA.**

Innerhalb der Kopfregion gibt es möglicherweise eine Bindungsstelle A für Kollagen und (POG)<sub>10</sub> (rot) sowie eine Bindungsstelle B nur für Kollagen (blau). Die N-terminale Region mit den Aminosäuren 29-81 ist für die Kollagen- sowie (POG)<sub>10</sub>-Bindung nicht notwendig. Modifiziert nach Nummelin *et al.*, 2004, Mikula *et al.*, 2012.

Wie schon erwähnt, können YadA-produzierende Yersinien Aggregate bilden, welche bei FACS-Analysen mittels Contour Plot als heterogene Population dargestellt werden können. Diese Population beinhaltet somit eine Mischung aus Einzelzellen und Aggregaten. WA(pYVΔYadA) wird als homogene Population dargestellt, bildet somit kaum Aggregate und wurde als Referenzwert für alle anderen Stämme verwendet. Interessanterweise führt die Bindung von (POG)<sub>10</sub> an YadA zur Inhibierung der Autoagglutination von WA(pYV) und stellt ebenfalls wie WA(pYVΔYadA) eine homogene Population aus Einzelzellen dar. Die Autoagglutination geschieht durch einen Zipper-ähnlichen Mechanismus über die Kopfdomäne des YadA-Proteins (Hoiczky *et al.*, 2000). Durch die Bindung von (POG)<sub>10</sub> ist die verantwortliche Domäne möglicherweise abgeschirmt, womit folglich eine Interaktion der Yersinien miteinander durch oberflächenexponiertes YadA ausbleibt.

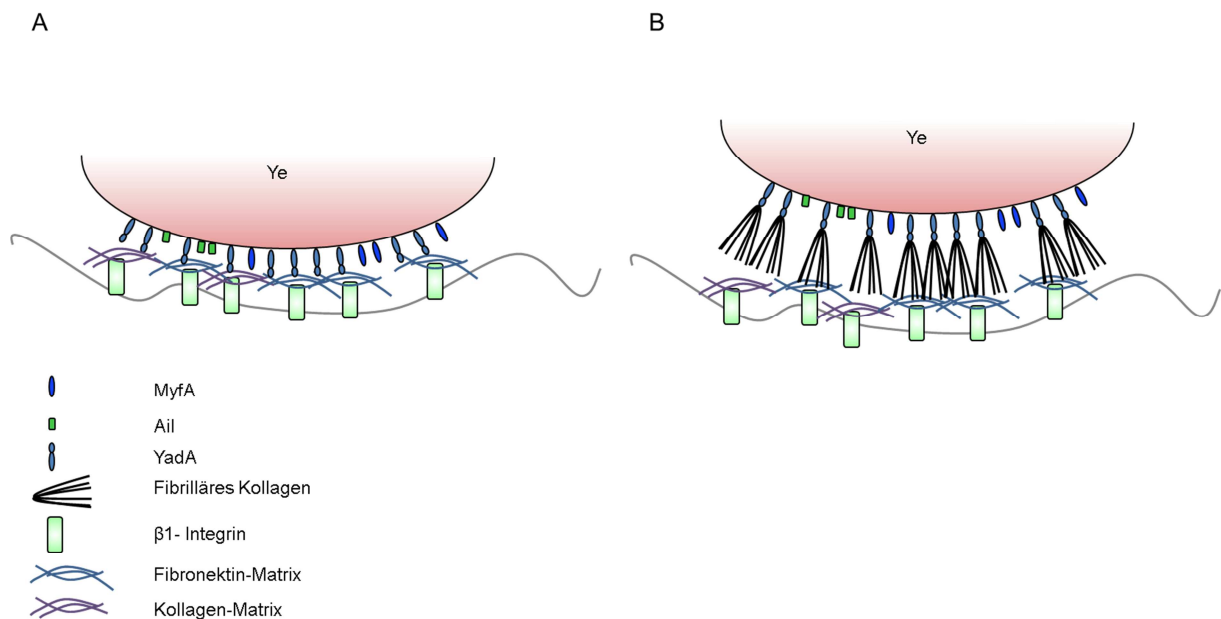
### 4.3 Die Bedeutung der YadA-Kollagenbindung in der Wirtszellinteraktion

Für die Passierung der intestinalen Darmmukosa interagiert *Y. enterocolitica* mittels Invasin (Inv) direkt mit den  $\beta_1$ -Integrinen von Wirtszellen, um eine Adhäsion zu gewährleisten (Öllerich *et al.*, 2007). Die YadA-vermittelte Bindung an  $\beta_1$ -Integrine wird indirekt über die Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine, welche von Epithelzellen sezerniert werden, vermutet (Reis & Horn, 2010). Hämatopoetische Zellen, wie PMNs und Makrophagen, produzieren keine ECM-Proteine, sondern Matrix-Metalloproteinasen (MMP), welche die ECM zerstören, um die Migration zum Entzündungsherd zu erleichtern (Snelgrove, 2011). Der Abbau von Kollagen kann aber auch durch die Internalisierung, also durch Phagozytose, durch Makrophagen geschehen, wobei der Regulationsmechanismus noch nicht völlig geklärt ist (Lucattelli *et al.*, 2003). Um ECM-Proteine phagozytieren zu können, müssen diese zunächst über Makrophagen-Rezeptoren gebunden werden. Die Adhäsion von nativen Kollagenfasern an Makrophagen ist jedoch gering, vielmehr bindet denaturiertes fibrilläres Kollagen spezifisch über MSR („macrophage scavenger receptor“-)Rezeptoren an die Zellen. Desweiteren ist dieser Mechanismus auch unabhängig von Integrinen (Gowen *et al.*, 2000). Obwohl die Hauptaufgabe von Makrophagen bezüglich ECM der Abbau dieser ist, wird auch über die ECM-Produktion selbst von Makrophagen diskutiert. Makrophagen beteiligen sich mit der Produktion von Fibronectin und Kollagen (VI, VIII) direkt an der Homöostase der ECM, wobei dieser Mechanismus vom Aktivierungszustand der Zellen abhängig ist (Schnoor *et al.*, 2008). Makrophagen, welche im Gewebe ausharren, unterscheiden sich hinsichtlich Funktion und der Expression von Oberflächenmarkern von frisch rekrutierten Makrophagen (Gordon & Taylor, 2005, Gordon, 2003). Auch von PMNs wird berichtet, dass diese während der Ausbildung von NETs eine Matrix aus DNA und Kollagen ausbilden (Casutt-Meyer *et al.*, 2010). In dieser Studie wurden die PMNs jedoch in Zellkulturmedium mit humanem Serum kultiviert, welches folglich ECM-Proteine enthalten hat. Dies könnte zur Verfälschung der Kollagen-Detektion von PMNs mittels polyklonalem Antiserum geführt haben.

Um eine Inv-vermittelte Wirtszellinteraktion auszuschließen, wurden  $WA\Delta inv$ -Stämme verwendet, welche zudem pYV-negativ waren, um die Wirtszellen vor Paralyse durch Yop-Effektorproteine zu schützen und Phagozytose zu gewährleisten (Persson *et al.*, 1997).

### 4.3.1 Einfluss der YadA-Kollagenbindung auf die Interaktion mit Epithelzellen

Um den Einfluss von kollagengebundenen Yersinien auf die Adhäsion von Epithelzellen zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit Kollagen-präinkubierten sowie Kollagen-freien  $W\Delta inv$ -Yersinien infiziert. Von der eingesetzten Bakterienanzahl zeigte  $W\Delta inv(pYadA)$  eine Bindungseffizienz von  $\sim 100\%$  gegenüber HeLa-Zellen, wobei nur noch bis zu  $25\%$  von kollagenbindungsmutierten  $W\Delta inv(pYadA_{HY})$ -Yersinien binden konnten. Die Bindungseffizienz sank somit um ca.  $75\%$  (Abb. 3.26, S.96). Dieses Ergebnis bestätigt frühere Studien zur Kollagenbindung (Roggenkamp *et al.*, 1995). Desweiteren konnte die Kollagenbindungsfähigkeit von  $W\Delta inv(pYadA)$  durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine deutliche grüne Oberflächenfluoreszenz, die auf die Bindung von 488-Koll I an YadA zurückzuführen ist. Mit dieser Methode konnte ebenfalls bestätigt werden, dass  $W\Delta inv(pYadA_{HY})$ -Yersinien wie auch  $WA(pYV::YadA_{HY})$  praktisch kein Kollagen binden (Abb. 3.23, S.93). Die Produktion der ECM-Proteine Kollagen und Fibronectin von HeLa-Zellen konnte fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 3.25, S.94).



**Abb. 4.3 Möglicher Adhäsionsmechanismus von *Y. enterocolitica* (Ye) an HeLa-Zellen.**

(A) YadA-vermittelte Adhäsion an  $\beta_1$ -Integrin von HeLa-Zellen durch indirekte Bindung an sekretierte ECM-Proteine Fibronectin und Kollagen. (B) Adhäsion von Kollagen-präinkubierten Yersinien an  $\beta_1$ -Integrin-assoziiertes Fibronectin von HeLa-Zellen.

Wahrscheinlich wird die Bindung von  $WA\Delta inv(pYadA)$  an HeLa-Zellen über die YadA-ECM-Bindung vermittelt. Bei der Infektion von HeLa-Zellen mit Kollagen-präinkubierten  $WA\Delta inv(pYadA)$ -Stämmen würde man eine Blockierung der Adhäsion erwarten. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Bindungseffizienz von Kollagenfreien und Kollagengebundenen Yersinien. Möglicherweise binden die Kollagen-präinkubierten Yersinien über eine Kollagen-Fibronektin-Interaktion an HeLa-Zellen (Abb. 4.3): Die  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen Typ I besitzt eine Binderegion für Fibronektin (AS 757-791) über die eine Bindung an Fibronektin ermöglicht wird (To & Midwood, 2011, Kleinman *et al.*, 1978).

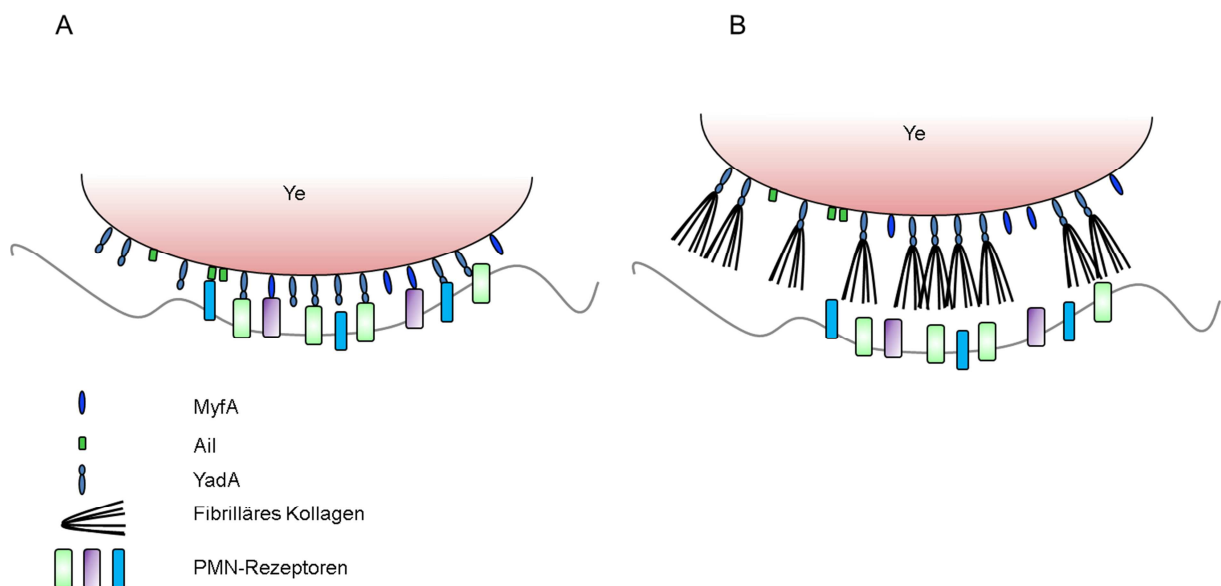
#### **4.3.2 Die YadA-Kollagenbindung führt zu verminderter PMN-Interaktion aufgrund von sterischer Hinderung**

Im Gegensatz zu einer früheren Veröffentlichung konnte in dieser Arbeit kein von PMNs sezerniertes Kollagen detektiert werden (Casutt-Meyer *et al.*, 2010). PMNs wurden aus humanem Blut isoliert und im Serum-freien Zellkulturmedium kultiviert. Eine PMN-Interaktion, welche auf die Bindung von YadA mit sezerniertem Kollagen zurückzuführen ist, wurde ausgeschlossen. Die Reinheit der isolierten PMNs von 98 % wurde mittels PMN-spezifischer Antikörper bestätigt. Um den Einfluss der YadA-Kollagenbindung auf die Interaktion mit PMNs zu untersuchen, wurde die PMN-Adhärenzrate von Kollagen-freien und Kollagen-präinkubierten  $WA\Delta inv(pYadA)$ - und  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$ - sowie  $WA\Delta inv(pYadA_{\Delta N})$ -Yersinien verglichen. Letzterer produziert ein verkürztes  $YadA_{\Delta N}$  (N-terminale Deletion der AS 29-81 von YadA) und zeigt kaum Adhärenz an PMNs. Es hat jedoch keinen Einfluss auf Kollagenbindung und Adhärenz an Epithelzellen (Roggenkamp *et al.*, 1996). Die Kollagen- bzw.  $(POG)_{10}$ -Bindung von  $WA\Delta inv(pYadA_{\Delta N})$  konnte ebenfalls durch den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von gebundenem 488-Koll I bzw. 647- $(POG)_{10}$  bestätigt werden (Abb. 3.23, S.93 und Abb. 3.24, S.93). Inv-produzierende  $WA(pYadA)$ -Yersinien zeigten eine sehr hohe PMN-Interaktionsrate ( $> 60 \%$ ), weshalb vermutet wird, dass nur dieser Anteil an PMNs Rezeptoren für die Yersinien-Bindung auf der Zelloberfläche produzieren (Abb. 3.29, S.100). Im Vergleich dazu konnten 8 % weniger  $WA\Delta inv(pYadA)$ -assoziierte PMNs quantifiziert werden und 23 % weniger  $WA(p\Delta YadA)$ -assoziierte PMNs. Die Beteiligung von Inv an der PMN-Interaktion von Yersinien ist daher untergeordnet, vielmehr spielt YadA eine tragendere Rolle. Möglicherweise wird Inv aber auch durch das oberflächenexponierte YadA maskiert. Die Assoziationsrate von  $WA\Delta inv(YadA_{\Delta N})$ -Yersinien mit PMNs war wie zu erwarten geringer (22 %) als

WA $\Delta$ inv(pYadA), ähnlich wie auch die YadA-Deletionsmutanten (23 %). Dieser Effekt ist nicht auf eine schwächere YadA $\Delta$ N-Produktion zurückzuführen, da vergleichbare YadA bzw. YadA $\Delta$ N-Mengen im Immunoblot nachgewiesen wurden (Abb. 3.22, S.91). Folglich trägt die N-terminale Region mit den AS 29-81 des YadA-Proteins signifikant zur YadA-vermittelten PMN-Interaktion bei.

Da  $\Delta$ inv $\Delta$ yadA-Stämme immer noch eine Bindungseffizienz von 20 % aufwiesen, könnte auch die Beteiligung von anderen Adhäsinen wie z. B. MyfA oder Ail eine Rolle spielen. Möglicherweise könnte bei der PMN-Bindung auch eine LPS-Interaktion mit CD14/TLR beteiligt sein (Janeway & Medzhitov, 2002).

30 % weniger PMNs waren mit Kollagen-präinkubierten WA $\Delta$ inv(pYadA)-Stämmen assoziiert im Vergleich zu PMNs mit assoziierten Kollagen-freien WA $\Delta$ inv(pYadA)-Stämmen. Auch wurden signifikant weniger Kollagen-präinkubierte WA $\Delta$ inv(pYadA $\Delta$ N)-assoziierte PMNs gezählt als Kollagen-freie WA $\Delta$ inv(pYadA $\Delta$ N)-assoziierte PMNs.



**Abb. 4.4 Möglicher Adhäsionsmechanismus von *Y. enterocolitica* (Ye) an PMNs.**

(A) Die Bindung an PMNs kann durch verschiedene Adhäsine (MyfA, Ail, YadA) vermittelt werden. (B) Die 100 nm-dicke Kollagenschicht von Yersinien führt zur Abschirmung der Yersinien und zum Verlust der Erkennung durch PMN-Rezeptoren.

Kollagen-präinkubierte kollagenbindungsmutierte bzw. YadA-Deletionsmutanten wiesen keinen Unterschied in der PMN-Interaktion mit Yersinien ohne vorherige Kollageninkubation auf (Abb. 3.31, S.102). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass nicht

das Kollagen in der Yersinien-Suspension, sondern nur YadA-gebundenes Kollagen die Interaktion mit PMNs beeinflusst.

(POG)<sub>10</sub>-präinkubierte WA $\Delta$ inv(pYadA)-Stämme zeigten keinen Unterschied in der PMN-Interaktion im Vergleich zu Kollagen-freien Yersinien. Da die 100 nm dicke Kollagenkapsel im Vergleich zu 40 nm-(POG)<sub>10</sub> dicker ist, könnte gebundenes Kollagen die Zell-Interaktion sterisch einschränken. Damit könnten YadA-Domänen, welche für die Interaktion mit PMN-Rezeptoren essentiell sind, durch die Kollagenbindung nicht in Kontakt treten, wohingegen diese Domänen bei (POG)<sub>10</sub>-Bindung noch zugänglich sind (Abb. 4.4).

Es wäre aber ebenso möglich, dass die Kollagenbindung an YadA eine Konformationsänderung des YadA-Proteins bewirkt, so dass die vermutliche YadA-Domäne für die PMN-Rezeptor-Bindung nicht mehr zugänglich ist. Ähnliches konnte für EPS-produzierende *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden, welche bei hoher Expressionsrate von Alginat, was zu einer Vergrößerung der gebundenen Alginatschicht führte, verminderte Adhärenz zeigten. Auch hier wird durch das gebundene Alginat der Wirtszellkontakt von Pseudomonaden gestört, weil Oberflächenadhäsine maskiert werden (Orgad *et al.*, 2011). Einige Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) produzieren ein 230 kDa-Oberflächenprotein Pls (Plasmin sensitiv), welches ebenfalls aufgrund von sterischer Hinderung die Adhärenz von *S. aureus* an Wirtszellen reduziert im Vergleich zu Pls-negativen *S. aureus*-Stämmen (Hussain *et al.*, 2009).

### 4.3.3 Die Rolle der YadA-Kollagenbindung in der Makrophagen-Interaktion

Neben PMNs sind auch Makrophagen an der angeborenen Immunabwehr beteiligt. Diese Makrophagen unterscheiden sich u.a. hinsichtlich ihrer Rezeptoren von Neutrophilen: z. B. produzieren Makrophagen Klasse A „scavenger“ Rezeptoren, wie SR-A („scavenger receptor A“) und MARCO („macrophage receptor with collagenous structure“), welche bestimmte Mikroorganismen direkt erkennen (Brannström *et al.*, 2002). Eine wichtige Rolle dieser Rezeptoren in diesem Kontext konnte durch das SR-A knock out Mausmodell belegt werden. SR-A defiziente Mäuse zeigen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Infektionen mit *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* (Thomas *et al.*, 2000, Suzuki *et al.*, 1997). Desweiteren können SR-A defiziente Makrophagen diese Bakterien weniger phagozytieren (Thomas *et al.*, 2000). Aufgrund unterschiedlicher Oberflächenmarker können Makrophagen (z.B. F4/80, Ly6C) von Neutrophilen (z.B. Ly6G) abgegrenzt werden (Murray & Wynn, 2011).

Für die Bestimmung der Yersinien-Makrophagen-Interaktion wurde die murine J774-Makrophagenzelllinie verwendet. Es zeigte sich, dass fast 100 % der eingesetzten YadA-produzierenden Yersinien an die Zellen adhärten (Abb. 3.32, S.103). Eine Interaktion über Inv wurde durch die Verwendung von Inv-negativen Stämmen ausgeschlossen. Interessanterweise konnten keine Unterschiede in der Makrophagen-Interaktionsrate (MIR: zellassozierte Yersinien = intra- und extrazellulär) zwischen  $WA\Delta inv(pYadA)$ ,  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$  und  $WA\Delta inv(pYadA_{\Delta N})$  nachgewiesen werden, lediglich  $WA\Delta inv(p\Delta YadA)$  wies eine dreimal niedrigere MIR auf. Für die Interaktion mit Makrophagen ist die YadA-Region mit den AS 29-81 folglich nicht essentiell, sondern spezifisch für die Bindung an PMNs. Auch Kollagen-präinkubierte  $WA\Delta inv(pYadA)$ - und  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$ -Yersinien zeigten ähnliche MIR wie die zugehörigen Stämme ohne Kollagenbehandlung. Auffallend ist zudem, dass die Inv-YadA-Doppelmutante immer noch Adhärenz an Makrophagen aufweist. Dies deutet daraufhin, dass eventuell noch andere Yersinia-Adhäsine eine Rolle in der Makrophagen-Interaktion spielen könnten. Neben YadA vermittelt auch das Adhäsins Ail die Adhäsion an verschiedene Zelllinien (Miller & Falkow, 1988). Desweiteren zeigte eine *Y. pseudotuberculosis* Tripel-Deletionsmutante ( $\Delta yadA\Delta inv\Delta ail$ ) eine geringere Adhärenzrate an Makrophagen als eine  $\Delta yadA\Delta inv$ -Mutante, wobei sich die Bindungseffizienz der  $\Delta yadA\Delta inv$ -Mutante nicht vom Wildtyp unterschied (Maldonado-Arocho *et al.*, 2013). Ail könnte den Verlust der Adhäsine YadA und Inv in der  $\Delta yadA\Delta inv$ -Mutante kompensieren, spielt jedoch bei Anwesenheit der beiden Adhäsine keine wesentliche Rolle. Jedoch wird das eher kleine 17 kDa-Protein Ail meistens durch LPS maskiert und spielt deshalb auch *in vivo* eine eher untergeordnete Rolle (Wachtel & Miller, 1995). Um den Effekt von Ail auf die *Y. enterocolitica*-MIR zu untersuchen, müsste ebenfalls eine Tripel-Deletionsmutante hergestellt werden.

Bei der Bestimmung der Makrophagen-Phagozytose (MPR) fiel auf, dass nahezu 100 % der zellassozierten Yersinien phagozytiert wurden. Eine Ausnahme stellte der Kollagen-präinkubierte  $WA\Delta inv(pYadA)$ -Stamm dar, welcher bis zu 5mal weniger phagozytiert wurde als unbehandelte Stämme. Jedoch zeigte sich kein Unterschied in der MPR zwischen kollagenfreien  $WA\Delta inv(pYadA)$ ,  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$  und  $WA\Delta inv(pYadA_{\Delta N})$ . Kollagen-präinkubierte  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$ -Stämme wiesen eine vergleichbare MPR wie unbehandelte  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$ -Yersinien auf. Folglich ist nicht das Kollagen in der Yersinien-Suspension verantwortlich für die niedrigere MPR, sondern nur das an YadA gebundene Kollagen. Da für die Analyse der MIR und MPR die CFU („colony forming units“) bestimmt



wurden, werden nur lebende Yersinien quantifiziert, d.h. Yersinien, welche möglicherweise durch die Phagozytose abgetötet wurden, können mit dieser Methode nicht detektiert werden. Somit könnten Kollagen-präinkubierte  $WA\Delta inv(pYadA)$  entweder weniger phagozytiert werden, womit die Kollagenschicht einen Schutzmechanismus gegenüber Phagozytose darstellt, oder diese werden durch spezifische Kollagenrezeptoren der Makrophagen gebunden, das die Phagozytose und anschließende Abtötung der meisten Yersinien induziert. Eine weit verbreitete Funktion von bakteriellen Kapseln ist der Schutz gegenüber Phagozytose durch Makrophagen, wahrscheinlich durch weniger effiziente Bindung der Komplement Komponente C3b, das zu reduzierter Opsonisierung der bekapselten Bakterien führt. Bakterien ohne Kapsel werden durch C3b-Bindung opsonisiert, von Phagozyten mit Rezeptoren für C3b (CR3) gebunden und anschließend phagozytiert (Cortes *et al.*, 2002). Für einige bekapselte *Staphylococcus aureus*-Isolate konnte gezeigt werden, dass diese C3b auf der bakteriellen Zelloberfläche unterhalb der Kapsel binden, wodurch die Bindung an Phagozyten-Rezeptoren und damit die Phagozytose verhindert wird (O'Riordan & Lee, 2004). Da die Infektionen der J774-Makrophagen in Serum-freien Medium durchgeführt wurden, sind zu diesem Zeitpunkt keine Komplement-Komponenten vorhanden, das folglich gegen die Kollagenschicht als Schutzbarriere spricht. Allerdings wurden die Makrophagen zur Anzucht in FBS-haltigen Kulturmedium kultiviert, wodurch auch nach mehrmaligem Waschen noch Reste von Serum oder ECM-Proteine wie Kollagen und Fibronectin bei der Infektion vorhanden sein könnten. Möglicherweise führt die YadA-Kollagenbindung aber auch zu einer verstärkten Bindung an Integrine, wodurch eine Umlagerung des Zytoskeletts und damit die Aufnahme der Kollagen-beschichteten Yersinien herbeigeführt wird (Lopez-Gomez *et al.*, 2012). Als bedeutendes Beispiel gilt *Staphylococcus aureus*, welcher mit Fibronectin-Bindungsproteinen (FnBPs) die Bindung an Integrine über das ECM-Protein Fibronectin vermittelt (Hoffmann *et al.*, 2011). Dagegen spricht jedoch, dass Kollagen-freie Yersinien eine ähnliche MIR zeigen wie Kollagen-beschichtete Bakterien. Möglicherweise werden die Integrine erst durch Kollagen aktiviert und können somit eine Bindung mit Yersinien gewährleisten. Ohne Kollagen werden die Yersinien über andere Makrophagen-Rezeptoren gebunden, wie CD14/TLR 2/4. Andere Studien hingegen belegen, dass die Bindung von Makrophagen an Kollagen Integrin-unabhängig erfolgt: Vielmehr sind MSR („macrophage scavenger receptor“) für die Interaktion verantwortlich, wobei diese eher denaturiertes Kollagen als native Kollagenfasern als Liganden bevorzugen (Gowen *et al.*,

2000). Somit könnte die Bindung von Yersinien, welche fibrilläres Kollagen an YadA gebunden haben, an Makrophagen über MSR erfolgen.

Der Kontakt von Makrophagen mit Yersinien könnte aber auch zur Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) der Makrophagen führen. Diese MMPs spalten ECM-Proteine (Huang *et al.*, 2012) und können somit auch YadA-gebundenes Kollagen spalten. Möglicherweise können Kollagen-freie Yersinien besser phagozytiert werden als Kollagen-präinkubierte Yersinien. Dies spricht für die Kollagenkapsel als Schutzmechanismus vor Phagozytose.

Desweiteren ist unklar, weshalb Kollagenbeschichtete Yersinien nach Phagozytose mehr abgetötet werden sollten als Kollagen-freie Yersinien. Um eine vermehrte Abtötung der Kollagen-beschichteten Yersinien auszuschließen, müssten intra- und extrazelluläre Yersinien mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie ermittelt werden.

Ein interessanter MSR im Zusammenhang mit YadA ist MARCO, welcher eine tripel-helikale kollagenähnliche Rezeptorstil-Domäne (Domäne IV) aufweist (Abb. 3.35) (Elomaa *et al.*, 1998). Die für die Interaktion mit Bakterien verantwortliche Domäne von MARCO wurde jedoch auf die Domäne V eingegrenzt (Brannström *et al.*, 2002). Eine direkte Interaktion von Kollagenbindenden Oberflächenproteinen wie YadA mit der kollagenähnlichen Domäne IV von MARCO wurde bisher noch nicht untersucht. Die Oberflächenproduktion dieses Rezeptors konnte auch bei den verwendeten J774-Makrophagen nachgewiesen werden. Um die direkte Interaktion der kollagenähnlichen Domäne IV von MARCO mit YadA zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit MARCO bzw. dem verkürztem Konstrukt H420, dem die Domäne V deletiert wurde, transfiziert. Die Produktion von MARCO bzw. H420 wurde im Immunoblot und durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die Anzahl an adhärenenten  $WA\Delta inv(pYadA)$ -Stämmen an MARCO-positiven CHO-Zellen war jedoch nicht signifikant höher als die an MARCO-negativen Zellen. Folglich ist MARCO wahrscheinlich nicht an einer direkten Interaktion mit YadA beteiligt. Weiterhin zeigten sich keine Unterschiede in der Bindung an H420- und MARCO-produzierenden CHO-Zellen. Demnach ist die Domäne V von MARCO voraussichtlich nicht entscheidend für eine YadA-Bindung. Die Bindungseffizienz des kollagenbindungsmutierten  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$ -Stammes an untransfizierte sowie H420-produzierende CHO-Zellen war niedriger als die von  $WA\Delta inv(pYadA)$  infizierten Zellen. Die Infektion fand zwar unter Serum-freien Bedingungen statt, jedoch wurden die CHO-Zellen in FBS-haltigen Medium kultiviert. Möglicherweise sind auch nach mehrmaligem Waschen vor

Bakterienzugabe noch Reste an ECM-Proteinen an die Zellen gebunden, wodurch eine YadA-abhängige Zell-Interaktion vermittelt wird. Dies könnte die verminderte Adhärenz des kollagenbindungsmutierten  $WA\Delta inv(pYadA_{HY})$ -Stammes erklären. Weitere Yersinia-Adhäsine spielen wahrscheinlich bei der Interaktion mit CHO-Zellen keine große Rolle, da eine Inv-YadA-Doppelmutante ( $WA\Delta inv(p\Delta YadA)$ ) eine kaum nachweisbare Bindungseffizienz aufwies (0-1 Bakterium pro Zelle).

#### **4.3.4 Mögliche Bedeutung der YadA-Kollagenbindung für die Pathogenität der Yersinien**

Die Kollagenbindungseigenschaft von trimeren Autotransportern wie YadA wurde schon weitgehend beschrieben, die Bedeutung für die Pathogenität der Yersinien hingegen ist noch nicht völlig geklärt (Schulze-Koops *et al.*, 1992, Nummelin *et al.*, 2004, Roggenkamp *et al.*, 1995, Schulze-Koops *et al.*, 1995). Vermutlich ist die Kollagenbindungsfähigkeit von YadA notwendig, um sich über einen Brückenmechanismus an ECM-produzierende Epithelzellen anzuheften (Heise *et al.*, 2006): Die Adhärenz von Kollagenbindungsdefizienten Yersinien an Epithelzellen ist weitgehend aufgehoben (Roggenkamp *et al.*, 1995, diese Arbeit). Weiterhin ist die Kollagenbindungseigenschaft für die Translokation von den Peyer'schen Plaques zur Milz notwendig, wie auch im Mausmodell bestätigt werden konnte, wohingegen die Verbreitung der Yersinien vom Dünndarm zu den Peyer'schen Plaques nicht eingeschränkt ist (Roggenkamp *et al.*, 1995). Die YadA-Kollagenbindung stellt somit einen essentiellen Virulenzfaktor für die Verbreitung und das Überleben der Yersinien außerhalb des Dünndarms dar.

PMNs und Makrophagen spielen eine zentrale Rolle während der Infektion, indem diese bakterielle Erreger phagozytieren und zerstören. Durch den Erregerkontakt der Zellen kommt es aber auch zur Aktivierung der Neutrophilen und Makrophagen, wodurch u.a. Matrixmetalloproteinasen (MMP) sezerniert werden, welche am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Weiss, 1989, Birkedal-Hansen, 1993). Dieser enzymatische Abbau von Kollagen führt zur Freisetzung von Kollagen-Oligopeptiden, welche chemotaktisch auf Neutrophile wirken (Haddox *et al.*, 1999, Laskin *et al.*, 1986). Desweiteren werden Prolyl-Endopeptidasen (PE) von Neutrophilen durch LPS aktiviert, welche diese Kollagen-Oligopeptide am C-Terminus schneiden und somit u.a. zur Freisetzung der Tripeptide PGP (Prolin-Glycin-Prolin) führen (O'Reilly *et al.*, 2009). Durch die Interaktion mit CXC-Rezeptoren von Neutrophilen, bewirken diese ebenfalls chemotaktische Aktivität auf weitere

Neutrophile sowie die Freisetzung von Superoxiden (Gaggar *et al.*, 2008). Somit könnte die Rekrutierung von Neutrophilen im Gewebe durch die Freisetzung der Kollagen-Oligopeptide von der ECM des Bindegewebes vermittelt werden (Laskin *et al.*, 1986). Da YadA ebenfalls kollagenähnliche Peptide wie (POG)<sub>10</sub> bindet, könnte dies ein Hinweis darauf sein, weshalb Yersinien die Fähigkeit besitzen, nicht nur native Kollagenfasern, sondern auch Kollagenfibrillen binden (Leo *et al.*, 2008, diese Arbeit). Werden bei einer Infektion Kollagen-Oligopeptide freigesetzt, die von Yersinien gebunden werden, stehen diese als Chemoattraktant für weitere PMNs nicht mehr zur Verfügung. Dadurch könnten weniger PMNs an den Infektionsherd rekrutiert werden, womit weniger Yersinien unschädlich gemacht werden und sich diese weiterhin vermehren können.

## 5 Literaturverzeichnis

- Ackermann, N., M. Tiller, G. Anding, A. Roggenkamp & J. Heesemann, (2008) Contribution of trimeric autotransporter C-terminal domains of oligomeric coiled-coil adhesin (Oca) family members YadA, UspA1, EibA, and Hia to translocation of the YadA passenger domain and virulence of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **190**: 5031-5043.
- Aepfelbacher, M., (2004) Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of *Yersinia*. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **152**: 65-77.
- Afonso, P. V., C. P. McCann, S. M. Kapnick & C. A. Parent, (2013) Discoidin domain receptor 2 regulates neutrophil chemotaxis in 3D collagen matrices. *Blood* **121**: 1644-1650.
- Andersson, K., N. Carballeira, K. E. Magnusson, C. Persson, O. Stendahl, H. Wolf-Watz & M. Fallman, (1996) YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol Microbiol* **20**: 1057-1069.
- Andersson, K., K. E. Magnusson, M. Majeed, O. Stendahl & M. Fallman, (1999) *Yersinia pseudotuberculosis*-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. *Infect Immun* **67**: 2567-2574.
- Antonenko, V., V. Pawlow, J. Heesemann & A. Rakin, (2003) Characterization of a novel unique restriction-modification system from *Yersinia enterocolitica* O:8 1B. *FEMS Microbiol Lett* **219**: 249-252.
- Autenrieth, I. B. & R. Firsching, (1996) Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol* **44**: 285-294.
- Balazovich, K. J., S. J. Suchard, D. G. Remick & L. A. Boxer, (1996) Tumor necrosis factor- $\alpha$  and FMLP receptors are functionally linked during FMLP-stimulated activation of adherent human neutrophils. *Blood* **88**: 690-696.
- Balligand, G., Y. Laroche & G. Cornelis, (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.
- Bar-Sagi, D. & A. Hall, (2000) Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**: 227-238.
- Barbieri, J. T., M. J. Riese & K. Aktories, (2002) Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 315-344.
- Barnum, S. R., (1991) C4b-binding protein, a regulatory protein of complement. *Immunologic research* **10**: 28-42.
- Barz, C., T. N. Abahji, K. Trulzsch & J. Heesemann, (2000) The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase Ypka/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett* **482**: 139-143.
- Beer, K. B. & V. L. Miller, (1992) Amino acid substitutions in naturally occurring variants of ail result in altered invasion activity. *J Bacteriol* **174**: 1360-1369.
- Bella, J., M. Eaton, B. Brodsky & H. M. Berman, (1994) Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* **266**: 75-81.
- Bialas, N., K. Kasperkiewicz, J. Radziejewska-Lebrecht & M. Skurnik, (2012) Bacterial cell surface structures in *Yersinia enterocolitica*. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **60**: 199-209.
- Bibel, D. J. & T. H. Chen, (1976) Diagnosis of plaque: an analysis of the Yersin-Kitasato controversy. *Bacteriological reviews* **40**: 633-651.

- Biedzka-Sarek, M., H. Jarva, H. Hyytiäinen, S. Meri & M. Skurnik, (2008a) Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun* **76**: 4100-4109.
- Biedzka-Sarek, M., S. Salmenlinna, M. Gruber, A. N. Lupas, S. Meri & M. Skurnik, (2008b) Functional mapping of YadA- and Ail-mediated binding of human factor H to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun* **76**: 5016-5027.
- Birkedal-Hansen, H., (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of periodontology* **64**: 474-484.
- Black, D. S. & J. B. Bliska, (2000) The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* **37**: 515-527.
- Bliska, J. B. & S. Falkow, (1992) Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3561-3565.
- Bober, M., M. Morgelin, A. I. Olin, U. von Pawel-Rammingen & M. Collin, (2011) The membrane bound LRR lipoprotein Slr, and the cell wall-anchored M1 protein from *Streptococcus pyogenes* both interact with type I collagen. *PLoS One* **6**: e20345.
- Bobrov, A. G., O. Kirillina, S. Forman, D. Mack & R. D. Perry, (2008) Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ Microbiol* **10**: 1419-1432.
- Bolin, I., L. Norlander & H. Wolf-Watz, (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* **37**: 506-512.
- Borregaard, N., (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**: 657-670.
- Bottone, E. J., (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* **10**: 257-276.
- Bottone, E. J., (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect* **1**: 323-333.
- Boxer, G. J., J. T. Curnutte & L. A. Boxer, (1985) Polymorphonuclear leukocyte function. *Hospital practice* **20**: 69-73, 77, 80 passim.
- Brannstrom, A., M. Sankala, K. Tryggvason & T. Pikkarainen, (2002) Arginine residues in domain V have a central role for bacteria-binding activity of macrophage scavenger receptor MARCO. *Biochemical and biophysical research communications* **290**: 1462-1469.
- Brinckmann, J., (2005) Collagen at a glance. *Topics in current chemistry* **247**: 1-6.
- Brinkmann, V. & A. Zychlinsky, (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* **5**: 577-582.
- Burghout, P., R. van Boxtel, P. Van Gelder, P. Ringler, S. A. Muller, J. Tommassen & M. Koster, (2004) Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **186**: 4645-4654.
- Carter, P. B., (1975) Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect Immun* **11**: 164-170.
- Casutt-Meyer, S., F. Renzi, M. Schmalzer, N. J. Jann, M. Amstutz & G. R. Cornelis, (2010) Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword. *PLoS One* **5**: e15159.
- Chiba, T., M. Kaneda, H. Fujii, R. A. Clark, W. M. Nauseef & K. Kakinuma, (1990) Two cytosolic components of the neutrophil NADPH oxidase, P47-phox and P67-phox, are not flavoproteins. *Biochemical and biophysical research communications* **173**: 376-381.

- Chung, L., D. Dinakarpanid, N. Yoshida, J. L. Lauer-Fields, G. B. Fields, R. Visse & H. Nagase, (2004) Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO J* **23**: 3020-3030.
- Cornelis, G. R., (2002) Yersinia type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* **158**: 401-408.
- Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory & I. Stainier, (1998) The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1315-1352.
- Cornelis, G. R. & H. Wolf-Watz, (1997) The Yersinia Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**: 861-867.
- Cortes, G., N. Borrell, B. de Astorza, C. Gomez, J. Sauleda & S. Alberti, (2002) Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of Klebsiella pneumoniae in a murine model of pneumonia. *Infect Immun* **70**: 2583-2590.
- Cover, T. L. & R. C. Aber, (1989) Yersinia enterocolitica. *N Engl J Med* **321**: 16-24.
- Czech, B., (2011) Untersuchungen zur Interaktion und Modulation von Yersinia enterocolitica mit neutrophilen Granulozyten in Suspension und im dreidimensionalen Kollagengel.
- Daeron, M., (1997) Structural bases of Fc gamma R functions. *International reviews of immunology* **16**: 1-27.
- Datsenko, K. A. & B. L. Wanner, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- Delor, I. & G. R. Cornelis, (1992) Role of Yersinia enterocolitica Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* **60**: 4269-4277.
- Delor, I., A. Kaeckenbeeck, G. Wauters & G. R. Cornelis, (1990) Nucleotide sequence of yst, the Yersinia enterocolitica gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. *Infect Immun* **58**: 2983-2988.
- Dersch, P. & R. R. Isberg, (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.
- Dersch, P. & R. R. Isberg, (2000) An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors. *Infect Immun* **68**: 2930-2938.
- Dewoody, R., P. M. Merritt, A. S. Houppert & M. M. Marketon, (2011) YopK regulates the Yersinia pestis type III secretion system from within host cells. *Mol Microbiol* **79**: 1445-1461.
- Dewoody, R., P. M. Merritt & M. M. Marketon, (2013) YopK controls both rate and fidelity of Yop translocation. *Mol Microbiol* **87**: 301-317.
- Diaz, R., E. Urrea, J. Toyos & I. Moriyon, (1985) Characterization of a Yersinia enterocolitica antigen common to enterocolitis-associated serotypes. *J Clin Microbiol* **22**: 1035-1039.
- Dunne, D. W., D. Resnick, J. Greenberg, M. Krieger & K. A. Joiner, (1994) The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 1863-1867.
- Dupre-Crochet, S., M. Erard & O. Nubetae, (2013) ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol* **94**: 657-670.
- Dziwisch, L., J. Heesemann & B. Kremer, (1988) The microscopic double immunofluorescence technique, a method for quantitative differentiation between

- extra- and intracellularly located bacteria in isolated polymorphonuclear granulocytes. *Med Microbiol Immunol* **177**: 101-107.
- Elomaa, O., M. Sankala, T. Pikkarainen, U. Bergmann, A. Tuuttila, A. Raatikainen-Ahokas, H. Sariola & K. Tryggvason, (1998) Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. *J Biol Chem* **273**: 4530-4538.
- Emödy, L., J. Heesemann, H. Wolf-Watz, M. Skurnik, G. Kapperud, P. O'Toole & T. Wadstrom, (1989) Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. In: *J Bacteriol.* pp. 6674-6679.
- Erfurth, S. E., S. Grobner, U. Kramer, D. S. Gunst, I. Soldanova, M. Schaller, I. B. Autenrieth & S. Borgmann, (2004) *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun* **72**: 7045-7054.
- Farndale, R. W., J. J. Sixma, M. J. Barnes & P. G. de Groot, (2004) The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* **2**: 561-573.
- Feeley, J. C., J. G. Wells, T. F. Tsai & N. D. Puhr, (1979) Detection of enterotoxigenic and invasive strains of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **5**: 329-334.
- Flügel, A., H. Schulze-Koops, J. Heesemann, K. Kuhn, L. Sorokin, H. Burkhardt, K. von der Mark & F. Emmrich, (1994) Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J Biol Chem* **269**: 29732-29738.
- Forman, S., C. R. Wulff, T. Myers-Morales, C. Cowan, R. D. Perry & S. C. Straley, (2008) yadBC of *Yersinia pestis*, a new virulence determinant for bubonic plague. *Infect Immun* **76**: 578-587.
- French, M. F., A. Bhowan & H. E. Van Wart, (1992) Identification of *Clostridium histolyticum* collagenase hyperreactive sites in type I, II, and III collagens: lack of correlation with local triple helical stability. *Journal of protein chemistry* **11**: 83-97.
- Freund, S., B. Czech, K. Trulzsch, N. Ackermann & J. Heesemann, (2008) Unusual, virulence plasmid-dependent growth behavior of *Yersinia enterocolitica* in three-dimensional collagen gels. *J Bacteriol* **190**: 4111-4120.
- Frieser, M., R. Hallmann, S. Johansson, D. Vestweber, S. L. Goodman & L. Sorokin, (1996) Mouse polymorphonuclear granulocyte binding to extracellular matrix molecules involves beta 1 integrins. *European journal of immunology* **26**: 3127-3136.
- Frodin, M. & S. Gammeltoft, (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Molecular and cellular endocrinology* **151**: 65-77.
- Gaede, K. I. & J. Heesemann, (1995) Arthritogenicity of genetically manipulated *Yersinia enterocolitica* serotype O8 for Lewis rats. *Infect Immun* **63**: 714-719.
- Gaggar, A., P. L. Jackson, B. D. Noerager, P. J. O'Reilly, D. B. McQuaid, S. M. Rowe, J. P. Clancy & J. E. Blalock, (2008) A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J Immunol* **180**: 5662-5669.
- Gaggar, A., S. M. Rowe, H. Matthew & J. E. Blalock, (2010) Proline-Glycine-Proline (PGP) and High Mobility Group Box Protein-1 (HMGB1): Potential Mediators of Cystic Fibrosis Airway Inflammation. *Open Respir Med J* **4**: 32-38.
- Galan, J. E. & A. Collmer, (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322-1328.
- Galan, J. E. & H. Wolf-Watz, (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.



- Galyov, E. E., S. Hakansson, A. Forsberg & H. Wolf-Watz, (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730-732.
- Gardiner, G. J., S. N. Deffit, S. McLetchie, L. Perez, C. C. Walline & J. S. Blum, (2013) A Role for NADPH Oxidase in Antigen Presentation. *Frontiers in immunology* **4**: 295.
- Garzetti, D., R. Susen, A. Fruth, E. Tietze, J. Heesemann & A. Rakin, (2013) A molecular scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide analysis. *Int J Med Microbiol*.
- Gelse, K., E. Poschl & T. Aigner, (2003) Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews* **55**: 1531-1546.
- Ghiran, I., S. F. Barbashov, L. B. Klickstein, S. W. Tas, J. C. Jensenius & A. Nicholson-Weller, (2000) Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *The Journal of experimental medicine* **192**: 1797-1808.
- Gilcrease, M. Z., (2007) Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett* **247**: 1-25.
- Gordon, S., (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**: 23-35.
- Gordon, S. & P. R. Taylor, (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**: 953-964.
- Gowen, B. B., T. K. Borg, A. Ghaffar & E. P. Mayer, (2000) Selective adhesion of macrophages to denatured forms of type I collagen is mediated by scavenger receptors. *Matrix Biol* **19**: 61-71.
- Grassl, G. A., E. Bohn, Y. Muller, O. T. Buhler & I. B. Autenrieth, (2003) Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol* **293**: 41-54.
- Greenberg, S., (1999) Modular components of phagocytosis. *J Leukoc Biol* **66**: 712-717.
- Greenlee, K. J., Z. Werb & F. Kheradmand, (2007) Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiological reviews* **87**: 69-98.
- Grijpstra, J., J. Arenas, L. Rutten & J. Tommassen, (2013) Autotransporter secretion: varying on a theme. *Res Microbiol* **164**: 562-582.
- Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M. P. Sory & G. R. Cornelis, (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* **70**: 4165-4176.
- Groves, E., K. Rittinger, M. Amstutz, S. Berry, D. W. Holden, G. R. Cornelis & E. Caron, (2010) Sequestering of Rac by the *Yersinia* effector YopO blocks Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *J Biol Chem* **285**: 4087-4098.
- Guggenberger, C., (2011) Analysis of host-pathogen interactions in novel three dimensional surrogate infection models.
- Gunzer, M., P. Friedl, B. Niggemann, E. B. Brocker, E. Kampgen & K. S. Zanker, (2000) Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol* **67**: 622-629.
- Haddox, J. L., R. R. Pfister, D. D. Muccio, M. Villain, C. I. Sommers, M. Chaddha, G. M. Anantharamaiah, W. J. Brouillette & L. J. DeLucas, (1999) Bioactivity of peptide analogs of the neutrophil chemoattractant, N-acetyl-proline-glycine-proline. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 2427-2429.
- Hahn, H., S. H. E. Kaufmann, T. F. Schulz & S. Suerbaum, (2009) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Springer Medizin Verlag & Auflage*: p262-264.
- Hamburger, Z. A., M. S. Brown, R. R. Isberg & P. J. Bjorkman, (1999) Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**: 291-295.

- Hamid, N., A. Gustavsson, K. Andersson, K. McGee, C. Persson, C. E. Rudd & M. Fallman, (1999) YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb Pathog* **27**: 231-242.
- Hammerschmidt, S., S. Wolff, A. Hocke, S. Rosseau, E. Muller & M. Rohde, (2005) Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **73**: 4653-4667.
- Han, S., D. J. McBride, W. Losert & S. Leikin, (2008) Segregation of type I collagen homo- and heterotrimers in fibrils. *J Mol Biol* **383**: 122-132.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Harris, L. A., S. M. Logan, P. Guerry & T. J. Trust, (1987) Antigenic variation of Campylobacter flagella. *J Bacteriol* **169**: 5066-5071.
- Hayashi, M., Y. Ninomiya, K. Hayashi, T. F. Linsenmayer, B. R. Olsen & R. L. Trelstad, (1988) Secretion of collagen types I and II by epithelial and endothelial cells in the developing chick cornea demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Development* **103**: 27-36.
- Heesemann, J., U. Gross, N. Schmidt & R. Laufs, (1986) Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic Yersinia sp. grown in calcium-deficient media. *Infect Immun* **54**: 561-567.
- Heesemann, J. & L. Grüter, (1987) Genetic evidence that outer membrane protein YOP1 of Yersinia enterocolitica mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters* **40**: 37-41.
- Heesemann, J., C. Keller, R. Morawa, N. Schmidt, H. J. Siemens & R. Laufs, (1983) Plasmids of human strains of Yersinia enterocolitica: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* **147**: 107-115.
- Heesemann, J. & R. Laufs, (1983) Construction of a mobilizable Yersinia enterocolitica virulence plasmid. *J Bacteriol* **155**: 761-767.
- Heise, T. & P. Dersch, (2006) Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3375-3380.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez & D. Ala'Aldeen, (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744.
- Heroven, A. K., G. Nagel, H. J. Tran, S. Parr & P. Dersch, (2004) RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and rovA expression in Yersinia pseudotuberculosis. *Mol Microbiol* **53**: 871-888.
- Ho, D. K., R. Riva, V. Kirjavainen, H. Jarva, E. Ginstrom, A. M. Blom, M. Skurnik & S. Meri, (2012) Functional recruitment of the human complement inhibitor C4BP to Yersinia pseudotuberculosis outer membrane protein Ail. *J Immunol* **188**: 4450-4459.
- Hoffmann, C., K. Ohlsen & C. R. Hauck, (2011) Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. *European journal of cell biology* **90**: 891-896.
- Hoiczky, E. & G. Blobel, (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen Yersinia enterocolitica into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4669-4674.
- Hoiczky, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas & J. Heesemann, (2000) Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**: 5989-5999.
- Holmstrom, A., R. Rosqvist, H. Wolf-Watz & A. Forsberg, (1995) Virulence plasmid-encoded YopK is essential for Yersinia pseudotuberculosis to cause systemic infection in mice. *Infect Immun* **63**: 2269-2276.

- Huang, W. C., G. B. Sala-Newby, A. Susana, J. L. Johnson & A. C. Newby, (2012) Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor-kappaB. *PLoS One* **7**: e42507.
- Huang, X. Z. & L. E. Lindler, (2004) The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen. *Infect Immun* **72**: 7212-7219.
- Hueck, C. J., (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Hughes, D. A., I. P. Fraser & S. Gordon, (1995) Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *European journal of immunology* **25**: 466-473.
- Hussain, M., D. Schafer, K. M. Juuti, G. Peters, B. Haslinger-Löffler, P. I. Kuusela & B. Sinha, (2009) Expression of Pls (plasmin sensitive) in *Staphylococcus aureus* negative for pls reduces adherence and cellular invasion and acts by steric hindrance. *J Infect Dis* **200**: 107-117.
- Hynes, R. O., (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687.
- Iriarte, M. & G. R. Cornelis, (1995) MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **177**: 738-744.
- Iriarte, M. & G. R. Cornelis, (1996) Molecular determinants of *Yersinia* pathogenesis. *Microbiologia* **12**: 267-280.
- Iriarte, M. & G. R. Cornelis, (1998) YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* **29**: 915-929.
- Iriarte, M., J. C. Vanooteghem, I. Delor, R. Diaz, S. Knutton & G. R. Cornelis, (1993) The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **9**: 507-520.
- Isberg, R. R. & G. T. Van Nhieu, (1995) The mechanism of phagocytic uptake promoted by invasin-integrin interaction. *Trends in cell biology* **5**: 120-124.
- Isberg, R. R., D. L. Voorhis & S. Falkow, (1987) Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**: 769-778.
- Itoh, Y., J. D. Rice, C. Goller, A. Pannuri, J. Taylor, J. Meisner, T. J. Beveridge, J. F. Preston, 3rd & T. Romeo, (2008) Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol* **190**: 3670-3680.
- Jackson, M. W. & G. V. Plano, (2000) Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 85-90.
- Janeway, C. A., Jr. & R. Medzhitov, (2002) Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**: 197-216.
- Jog, N. R., M. J. Rane, G. Lominadze, G. C. Luerman, R. A. Ward & K. R. McLeish, (2007) The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets. *American journal of physiology. Cell physiology* **292**: C1690-1700.
- Joseph, S. S. & G. V. Plano, (2013) The SycN/YscB chaperone-binding domain of YopN is required for the calcium-dependent regulation of Yop secretion by *Yersinia pestis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **3**: 1.
- Juris, S. J., F. Shao & J. E. Dixon, (2002) *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol* **4**: 201-211.
- Kadler, K., (1995) Extracellular matrix 1: Fibril-forming collagens. *Protein profile* **2**: 491-619.
- Kadler, K. E., C. Baldock, J. Bella & R. P. Boot-Handford, (2007) Collagens at a glance. *J Cell Sci* **120**: 1955-1958.

- Kahn, M. L., (2004) Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **30**: 419-425.
- Kampik, D., R. Schulte & I. B. Autenrieth, (2000) Yersinia enterocolitica invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in Yersinia infections. *Infect Immun* **68**: 2484-2492.
- Kang, T., J. Yi, A. Guo, X. Wang, C. M. Overall, W. Jiang, R. Elde, N. Borregaard & D. Pei, (2001) Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem* **276**: 21960-21968.
- Kaniga, K., D. Trollinger & J. E. Galan, (1995) Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. *J Bacteriol* **177**: 7078-7085.
- Kapperud, G., E. Namork, M. Skurnik & T. Nesbakken, (1987) Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. *Infect Immun* **55**: 2247-2254.
- Kirjavainen, V., H. Jarva, M. Biedzka-Sarek, A. M. Blom, M. Skurnik & S. Meri, (2008) *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog* **4**: e1000140.
- Klebanoff, S. J., A. J. Kettle, H. Rosen, C. C. Winterbourn & W. M. Nauseef, (2013) Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* **93**: 185-198.
- Kleinman, H. K., J. C. Murray, E. B. McGoodwin & G. R. Martin, (1978) Connective tissue structure: cell binding to collagen. *J Invest Dermatol* **71**: 9-11.
- Knight, C. G., L. F. Morton, D. J. Onley, A. R. Peachey, A. J. Messent, P. A. Smethurst, D. S. Tuckwell, R. W. Farndale & M. J. Barnes, (1998) Identification in collagen type I of an integrin alpha2 beta1-binding site containing an essential GER sequence. *J Biol Chem* **273**: 33287-33294.
- Knight, C. G., L. F. Morton, A. R. Peachey, D. S. Tuckwell, R. W. Farndale & M. J. Barnes, (2000) The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J Biol Chem* **275**: 35-40.
- Koberle, M., A. Klein-Gunther, M. Schutz, M. Fritz, S. Berchtold, E. Tolosa, I. B. Autenrieth & E. Bohn, (2009) *Yersinia enterocolitica* targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model. *PLoS Pathog* **5**: e1000551.
- Koch, I., K. Dach, J. Heesemann & R. Hoffmann, (2013) *Yersinia enterocolitica* inactivates NK cells. *Int J Med Microbiol* **303**: 433-442.
- Koide, T., (2005) Triple helical collagen-like peptides: engineering and applications in matrix biology. *Connective tissue research* **46**: 131-141.
- Kolaczowska, E. & P. Kubes, (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**: 159-175.
- Koretke, K. K., P. Szczesny, M. Gruber & A. N. Lupas, (2006) Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *J Struct Biol* **155**: 154-161.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lämmermann, T., B. L. Bader, S. J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Soldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Forster, D. R. Critchley, R. Fassler & M. Sixt, (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* **453**: 51-55.
- Langereis, J. D., (2013) Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. *Cell adhesion & migration* **7**.
- Laskin, D. L., T. Kimura, S. Sakakibara, D. J. Riley & R. A. Berg, (1986) Chemotactic activity of collagen-like polypeptides for human peripheral blood neutrophils. *J Leukoc Biol* **39**: 255-266.
- Le Quere, B. & J. M. Ghigo, (2009) BcsQ is an essential component of the Escherichia coli cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. *Mol Microbiol* **72**: 724-740.
- Lebbink, R. J., T. de Ruiter, J. Adelmeijer, A. B. Brenkman, J. M. van Helvoort, M. Koch, R. W. Farndale, T. Lisman, A. Sonnenberg, P. J. Lenting & L. Meyaard, (2006) Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *The Journal of experimental medicine* **203**: 1419-1425.
- Leitinger, B. & E. Hohenester, (2007) Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* **26**: 146-155.
- Leo, J. C., H. Elovaara, D. Bihan, N. Pugh, S. K. Kilpinen, N. Raynal, M. Skurnik, R. W. Farndale & A. Goldman, (2010) First analysis of a bacterial collagen-binding protein with collagen Toolkits: promiscuous binding of YadA to collagens may explain how YadA interferes with host processes. *Infect Immun* **78**: 3226-3236.
- Leo, J. C., H. Elovaara, B. Brodsky, M. Skurnik & A. Goldman, (2008) The Yersinia adhesin YadA binds to a collagenous triple-helical conformation but without sequence specificity. *Protein Eng Des Sel* **21**: 475-484.
- Leo, J. C., I. Grin & D. Linke, (2012) Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **367**: 1088-1101.
- Leong, J. M., P. E. Morrissey, A. Marra & R. R. Isberg, (1995) An aspartate residue of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein that is critical for integrin binding. *EMBO J* **14**: 422-431.
- Lillard, J. W., Jr., J. D. Fetherston, L. Pedersen, M. L. Pendrak & R. D. Perry, (1997) Sequence and genetic analysis of the hemin storage (hms) system of Yersinia pestis. *Gene* **193**: 13-21.
- Lindler, L. E. & B. D. Tall, (1993) Yersinia pestis pH 6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages. *Mol Microbiol* **8**: 311-324.
- Linke, D., T. Riess, I. B. Autenrieth, A. Lupas & V. A. Kempf, (2006) Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* **14**: 264-270.
- Liu, Q., K. Ponnuraj, Y. Xu, V. K. Ganesh, J. Sillanpaa, B. E. Murray, S. V. Narayana & M. Hook, (2007) The Enterococcus faecalis MSCRAMM ACE binds its ligand by the Collagen Hug model. *J Biol Chem* **282**: 19629-19637.
- Logan, S. M., T. J. Trust & P. Guerry, (1989) Evidence for posttranslational modification and gene duplication of Campylobacter flagellin. *J Bacteriol* **171**: 3031-3038.
- Long, C. G., E. Braswell, D. Zhu, J. Apigo, J. Baum & B. Brodsky, (1993) Characterization of collagen-like peptides containing interruptions in the repeating Gly-X-Y sequence. *Biochemistry* **32**: 11688-11695.
- Lopez-Gomez, A., V. Cano, D. Moranta, P. Morey, F. Garcia del Portillo, J. A. Bengoechea & J. Garmendia, (2012) Host cell kinases, alpha5 and beta1 integrins, and Rac1 signalling on the microtubule cytoskeleton are important for non-typable

- Haemophilus influenzae invasion of respiratory epithelial cells. *Microbiology* **158**: 2384-2398.
- Lucattelli, M., E. Cavarra, M. M. de Santi, T. D. Tetley, P. A. Martorana & G. Lungarella, (2003) Collagen phagocytosis by lung alveolar macrophages in animal models of emphysema. *Eur Respir J* **22**: 728-734.
- Mack, D., J. Heesemann & R. Laufs, (1994) Characterization of different oligomeric species of the Yersinia enterocolitica outer membrane protein YadA. *Med Microbiol Immunol* **183**: 217-227.
- Mack, D., M. Pulz & J. Heesemann, (1991) Recognition by peptide mapping of three different structural groups of outer membrane protein YOP-1 of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. *Med Microbiol Immunol* **180**: 205-211.
- Maldonado-Arocho, F. J., C. Green, M. L. Fisher, M. K. Paczosa & J. Mecsas, (2013) Adhesins and host serum factors drive Yop translocation by yersinia into professional phagocytes during animal infection. *PLoS Pathog* **9**: e1003415.
- Mallya, S. K., K. A. Mookhtiar & H. E. Van Wart, (1992) Kinetics of hydrolysis of type I, II, and III collagens by the class I and II Clostridium histolyticum collagenases. *Journal of protein chemistry* **11**: 99-107.
- Mantle, M. & S. D. Husar, (1994) Binding of Yersinia enterocolitica to purified, native small intestinal mucins from rabbits and humans involves interactions with the mucin carbohydrate moiety. *Infect Immun* **62**: 1219-1227.
- Marra, A. & R. R. Isberg, (1997) Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of Yersinia pseudotuberculosis across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect Immun* **65**: 3412-3421.
- McDonald, C., P. O. Vacratsis, J. B. Bliska & J. E. Dixon, (2003) The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* **278**: 18514-18523.
- Meyaard, L., (2010) LAIR and collagens in immune regulation. *Immunology letters* **128**: 26-28.
- Meyaard, L., G. J. Adema, C. Chang, E. Woollatt, G. R. Sutherland, L. L. Lanier & J. H. Phillips, (1997) LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* **7**: 283-290.
- Mikula, K. M., R. Kolodziejczyk & A. Goldman, (2012) Yersinia infection tools-characterization of structure and function of adhesins. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2**: 169.
- Mikulskis, A. V., I. Delor, V. H. Thi & G. R. Cornelis, (1994) Regulation of the Yersinia enterocolitica enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol Microbiol* **14**: 905-915.
- Miller, E. J. & L. G. Lunde, (1973) Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptides from the alpha 1(II) chain of bovine and human cartilage collagen. *Biochemistry* **12**: 3153-3159.
- Miller, V. L., J. B. Bliska & S. Falkow, (1990) Nucleotide sequence of the Yersinia enterocolitica ail gene and characterization of the Ail protein product. *J Bacteriol* **172**: 1062-1069.
- Miller, V. L. & S. Falkow, (1988) Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **56**: 1242-1248.
- Mittal, R., S. Y. Peak-Chew & H. T. McMahon, (2006) Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 18574-18579.

- Mittal, R., S. Y. Peak-Chew, R. S. Sade, Y. Vallis & H. T. McMahon, (2010) The acetyltransferase activity of the bacterial toxin YopJ of *Yersinia* is activated by eukaryotic host cell inositol hexakisphosphate. *J Biol Chem* **285**: 19927-19934.
- Moe, K. K., J. Mimura, T. Ohnishi, T. Wake, W. Yamazaki, M. Nakai & N. Misawa, (2010) The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. *J Vet Med Sci* **72**: 411-416.
- Monack, D. M., J. Mecsas, N. Ghorri & S. Falkow, (1997) *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10385-10390.
- Monteiro, C., I. Saxena, X. Wang, A. Kader, W. Bokranz, R. Simm, D. Nobles, M. Chromek, A. Brauner, R. M. Brown, Jr. & U. Romling, (2009) Characterization of cellulose production in *Escherichia coli* Nissle 1917 and its biological consequences. *Environ Microbiol* **11**: 1105-1116.
- Morita-Ishihara, T., M. Ogawa, H. Sagara, M. Yoshida, E. Katayama & C. Sasakawa, (2006) Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem* **281**: 599-607.
- Morita, H., H. Yasumitsu, Y. Watanabe, K. Miyazaki & M. Umeda, (1993) Characterization of cell-adhesive proteins secreted by cell lines growing in protein- and lipid-free synthetic medium: mouse L.P3 cells secrete a procollagen molecule with potent cell-attachment activity. *Cell structure and function* **18**: 61-72.
- Mota, L. J., L. Journet, I. Sorg, C. Agrain & G. R. Cornelis, (2005) Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**: 1278.
- Mueller, C. A., P. Broz, S. A. Muller, P. Ringler, F. Erne-Brand, I. Sorg, M. Kuhn, A. Engel & G. R. Cornelis, (2005) The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* **310**: 674-676.
- Mukherjee, S., G. Keitany, Y. Li, Y. Wang, H. L. Ball, E. J. Goldsmith & K. Orth, (2006) *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**: 1211-1214.
- Murphy, K. P., (2012) Janeway's Immunobiology: 8th edition. *Garland Science*
- Murray, P. J. & T. A. Wynn, (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**: 723-737.
- Myllyharju, J. & K. I. Kivirikko, (2001) Collagens and collagen-related diseases. *Annals of medicine* **33**: 7-21.
- Myllyharju, J. & K. I. Kivirikko, (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* **20**: 33-43.
- Nagel, G., A. Lahrz & P. Dersch, (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.
- Nägele, V., J. Heesemann, S. Schielke, L. F. Jimenez-Soto, O. Kurzai & N. Ackermann, (2011) *Neisseria meningitidis* adhesin NadA targets beta1 integrins: functional similarity to *Yersinia* invasin. *J Biol Chem* **286**: 20536-20546.
- Nathan, C., (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**: 173-182.
- Navarro, L., A. Koller, R. Nordfelth, H. Wolf-Watz, S. Taylor & J. E. Dixon, (2007) Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase A. *Mol Cell* **26**: 465-477.
- Nummelin, H., M. C. Merckel, J. C. Leo, H. Lankinen, M. Skurnik & A. Goldman, (2004) The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J* **23**: 701-711.

- O'Reilly, P. J., M. T. Hardison, P. L. Jackson, X. Xu, R. J. Snelgrove, A. Gaggar, F. S. Galin & J. E. Blalock, (2009) Neutrophils contain prolyl endopeptidase and generate the chemotactic peptide, PGP, from collagen. *Journal of neuroimmunology* **217**: 51-54.
- O'Riordan, K. & J. C. Lee, (2004) Staphylococcus aureus capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* **17**: 218-234.
- Öllerich, M. F., C. A. Jacobi, S. Freund, K. Niedung, A. Bach, J. Heesemann & K. Trulzsch, (2007) Yersinia enterocolitica infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect Immun* **75**: 3802-3811.
- Oomen, C. J., P. van Ulsen, P. van Gelder, M. Feijen, J. Tommassen & P. Gros, (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J* **23**: 1257-1266.
- Orgad, O., Y. Oren, S. L. Walker & M. Herzberg, (2011) The role of alginate in Pseudomonas aeruginosa EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. *Biofouling* **27**: 787-798.
- Orth, K., (2002) Function of the Yersinia effector YopJ. *Curr Opin Microbiol* **5**: 38-43.
- Orth, K., L. E. Palmer, Z. Q. Bao, S. Stewart, A. E. Rudolph, J. B. Bliska & J. E. Dixon, (1999) Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* **285**: 1920-1923.
- Patti, J. M., J. O. Boles & M. Hook, (1993) Identification and biochemical characterization of the ligand binding domain of the collagen adhesin from Staphylococcus aureus. *Biochemistry* **32**: 11428-11435.
- Pendrak, M. L. & R. D. Perry, (1993) Proteins essential for expression of the Hms+ phenotype of Yersinia pestis. *Mol Microbiol* **8**: 857-864.
- Perry, R. D., P. B. Balbo, H. A. Jones, J. D. Fetherston & E. DeMoll, (1999) Yersiniabactin from Yersinia pestis: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology* **145 (Pt 5)**: 1181-1190.
- Perry, R. D., A. G. Bobrov, O. Kirillina, H. A. Jones, L. Pedersen, J. Abney & J. D. Fetherston, (2004) Temperature regulation of the hemin storage (Hms+) phenotype of Yersinia pestis is posttranscriptional. *J Bacteriol* **186**: 1638-1647.
- Perry, R. D. & J. D. Fetherston, (1997) Yersinia pestis--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**: 35-66.
- Perry, R. D., M. L. Pendrak & P. Schuetze, (1990) Identification and cloning of a hemin storage locus involved in the pigmentation phenotype of Yersinia pestis. *J Bacteriol* **172**: 5929-5937.
- Persson, C., N. Carballeira, H. Wolf-Watz & M. Fallman, (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.
- Pilling, D., T. Fan, D. Huang, B. Kaul & R. H. Gomer, (2009) Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One* **4**: e7475.
- Plano, G. V. & S. C. Straley, (1993) Multiple effects of lcrD mutations in Yersinia pestis. *J Bacteriol* **175**: 3536-3545.
- Plano, G. V. & S. C. Straley, (1995) Mutations in yscC, yscD, and yscG prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in Yersinia pestis. *J Bacteriol* **177**: 3843-3854.
- Portnoy, D. A. & R. J. Martinez, (1985) Role of a plasmid in the pathogenicity of Yersinia species. *Curr Top Microbiol Immunol* **118**: 29-51.
- Prehna, G., M. I. Ivanov, J. B. Bliska & C. E. Stebbins, (2006) Yersinia virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* **126**: 869-880.



- Prockop, D. J. & A. Fertala, (1998) Inhibition of the self-assembly of collagen I into fibrils with synthetic peptides. Demonstration that assembly is driven by specific binding sites on the monomers. *J Biol Chem* **273**: 15598-15604.
- Ramshaw, J. A., N. K. Shah & B. Brodsky, (1998) Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol* **122**: 86-91.
- Rastawicki, W. & R. Gierczynski, (2009) Expression, purification, and characterization of the humoral immune response to recombinant MyfA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**: 1491-1494.
- Reis, R. S. & F. Horn, (2010) Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog* **2**: 8.
- Remijnsen, Q., T. W. Kuijpers, E. Wirawan, S. Lippens, P. Vandenabeele & T. Vanden Berghe, (2011) Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* **18**: 581-588.
- Revell, P. A. & V. L. Miller, (2000) A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol* **35**: 677-685.
- Ricard-Blum, S. & F. Ruggiero, (2005) The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie-biologie* **53**: 430-442.
- Roggenkamp, A., N. Ackermann, C. A. Jacobi, K. Truelzsch, H. Hoffmann & J. Heesemann, (2003) Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* **185**: 3735-3744.
- Roggenkamp, A., H. R. Neuberger, A. Flugel, T. Schmoll & J. Heesemann, (1995) Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**: 1207-1219.
- Roggenkamp, A., K. Ruckdeschel, L. Leitritz, R. Schmitt & J. Heesemann, (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.
- Rosqvist, R., A. Forsberg & H. Wolf-Watz, (1991) Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* **59**: 4562-4569.
- Ross, G. D., W. Reed, J. G. Dalzell, S. E. Becker & N. Hogg, (1992) Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3b-opsonized erythrocytes. *J Leukoc Biol* **51**: 109-117.
- Ross, P., R. Mayer & M. Benziman, (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological reviews* **55**: 35-58.
- Ruckdeschel, K., O. Mannel, K. Richter, C. A. Jacobi, K. Trulzsch, B. Rouot & J. Heesemann, (2001) *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* **166**: 1823-1831.
- Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, V. Lafont, P. Mangeat, J. Heesemann & B. Rouot, (1997) Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect Immun* **65**: 4813-4821.
- Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, S. Schubert & J. Heesemann, (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* **64**: 724-733.

- Ruter, C., C. Buss, J. Scharnert, G. Heusipp & M. A. Schmidt, (2010) A newly identified bacterial cell-penetrating peptide that reduces the transcription of pro-inflammatory cytokines. *J Cell Sci* **123**: 2190-2198.
- Sabroe, I., E. C. Jones, L. R. Usher, M. K. Whyte & S. K. Dower, (2002) Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* **168**: 4701-4710.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich, (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sansonetti, P., (2002) Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut* **50 Suppl 3**: III2-8.
- Sansonetti, P. J., D. J. Kopecko & S. B. Formal, (1982) Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **35**: 852-860.
- Sarratt, K. L., H. Chen, M. M. Zutter, S. A. Santoro, D. A. Hammer & M. L. Kahn, (2005) GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood* **106**: 1268-1277.
- Sauvonnet, N., I. Lambermont, P. van der Bruggen & G. R. Cornelis, (2002) YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Microbiol* **45**: 805-815.
- Schlee, M., T. Krug, O. Gires, R. Zeidler, W. Hammerschmidt, R. Mailhammer, G. Laux, G. Sauer, J. Lovric & G. W. Bornkamm, (2004) Identification of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 (EBNA2) target proteins by proteome analysis: activation of EBNA2 in conditionally immortalized B cells reflects early events after infection of primary B cells by EBV. *J Virol* **78**: 3941-3952.
- Schmid, A., W. Neumayer, K. Trulzsch, L. Israel, A. Imhof, M. Roessle, G. Sauer, S. Richter, S. Lauw, E. Eylert, W. Eisenreich, J. Heesemann & G. Wilharm, (2009) Cross-talk between type three secretion system and metabolism in *Yersinia*. *J Biol Chem* **284**: 12165-12177.
- Schnoor, M., P. Cullen, J. Lorkowski, K. Stolle, H. Robenek, D. Troyer, J. Rauterberg & S. Lorkowski, (2008) Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol* **180**: 5707-5719.
- Schriefer, E. M., S. Hoffmann-Thoms, F. X. Schmid, A. Schmid & J. Heesemann, (2013) *Yersinia enterocolitica* and *Photobacterium asymbiotica* beta-lactamases BlaA are exported by the twin-arginine translocation pathway. *Int J Med Microbiol* **303**: 16-24.
- Schulte, R. & I. B. Autenrieth, (1998) *Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation. *Infect Immun* **66**: 1216-1224.
- Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson & I. B. Autenrieth, (2000a) *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* **14**: 1471-1484.
- Schulte, R., S. Kerneis, S. Klinke, H. Bartels, S. Preger, J. P. Kraehenbuhl, E. Pringault & I. B. Autenrieth, (2000b) Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol* **2**: 173-185.
- Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, T. Kirsch, B. Swoboda, C. Bull, S. Goodman & F. Emmrich, (1993) Outer membrane protein YadA of enteropathogenic

- yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect Immun* **61**: 2513-2519.
- Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, K. von der Mark & F. Emmrich, (1992) Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect Immun* **60**: 2153-2159.
- Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, K. von der Mark & F. Emmrich, (1995) Characterization of the binding region for the Yersinia enterocolitica adhesin YadA on types I and II collagen. *Arthritis Rheum* **38**: 1283-1289.
- Schütz, M., E. M. Weiss, M. Schindler, T. Hallstrom, P. F. Zipfel, D. Linke & I. B. Autenrieth, (2010) Trimer stability of YadA is critical for virulence of Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* **78**: 2677-2690.
- Shao, F., P. M. Merritt, Z. Bao, R. W. Innes & J. E. Dixon, (2002) A Yersinia effector and a Pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**: 575-588.
- Shao, F., P. O. Vacratsis, Z. Bao, K. E. Bowers, C. A. Fierke & J. E. Dixon, (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.
- Shoulders, M. D. & R. T. Raines, (2009) Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* **78**: 929-958.
- Siljander, P. R., I. C. Munnix, P. A. Smethurst, H. Deckmyn, T. Lindhout, W. H. Ouwehand, R. W. Farndale & J. W. Heemskerk, (2004) Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood* **103**: 1333-1341.
- Simonet, M., B. Riot, N. Fortineau & P. Berche, (1996) Invasin production by Yersinia pestis is abolished by insertion of an IS200-like element within the inv gene. *Infect Immun* **64**: 375-379.
- Singh, I. & J. S. Viridi, (2004) Production of Yersinia stable toxin (YST) and distribution of yst genes in biotype 1A strains of Yersinia enterocolitica. *J Med Microbiol* **53**: 1065-1068.
- Sixt, M. & T. Lämmermann, (2011) In vitro analysis of chemotactic leukocyte migration in 3D environments. *Methods Mol Biol* **769**: 149-165.
- Skrzypek, E., C. Cowan & S. C. Straley, (1998) Targeting of the Yersinia pestis YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* **30**: 1051-1065.
- Skurnik, M., (1985) Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of Yersinia enterocolitica under different growth conditions. *Infect Immun* **47**: 183-190.
- Skurnik, M., I. Bolin, H. Heikkinen, S. Piha & H. Wolf-Watz, (1984) Virulence plasmid-associated autoagglutination in Yersinia spp. *J Bacteriol* **158**: 1033-1036.
- Skurnik, M. & P. Toivanen, (1992) LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. *J Bacteriol* **174**: 2047-2051.
- Skurnik, M. & S. Toivonen, (2011) Identification of distinct lipopolysaccharide patterns among Yersinia enterocolitica and Y. enterocolitica-like bacteria. *Biochemistry. Biokhimiia* **76**: 823-831.
- Skurnik, M. & H. Wolf-Watz, (1989) Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of Yersinia spp. *Mol Microbiol* **3**: 517-529.
- Snelgrove, R. J., (2011) Targeting of a common receptor shared by CXCL8 and N-Ac-PGP as a therapeutic strategy to alleviate chronic neutrophilic lung diseases. *Eur J Pharmacol* **667**: 1-5.

- Sorg, I., U. M. Goehring, K. Aktories & G. Schmidt, (2001) Recombinant Yersinia YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infect Immun* **69**: 7535-7543.
- Sorg, J. A., B. Blaylock & O. Schneewind, (2006) Secretion signal recognition by YscN, the Yersinia type III secretion ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16490-16495.
- Straley, S. C. & R. D. Perry, (1995) Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in Yersinia. *Trends Microbiol* **3**: 310-317.
- Suggs, S. V., R. B. Wallace, T. Hirose, E. H. Kawashima & K. Itakura, (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6613-6617.
- Suzuki, H., Y. Kurihara, M. Takeya, N. Kamada, M. Kataoka, K. Jishage, O. Ueda, H. Sakaguchi, T. Higashi, T. Suzuki, Y. Takashima, Y. Kawabe, O. Cynshi, Y. Wada, M. Honda, H. Kurihara, H. Aburatani, T. Doi, A. Matsumoto, S. Azuma, T. Noda, Y. Toyoda, H. Itakura, Y. Yazaki, T. Kodama & et al., (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* **386**: 292-296.
- Szymanski, C. M., D. H. Burr & P. Guerry, (2002) Campylobacter protein glycosylation affects host cell interactions. *Infect Immun* **70**: 2242-2244.
- Szymanski, C. M., R. Yao, C. P. Ewing, T. J. Trust & P. Guerry, (1999) Evidence for a system of general protein glycosylation in Campylobacter jejuni. *Mol Microbiol* **32**: 1022-1030.
- Tahir, Y. E., P. Kuusela & M. Skurnik, (2000) Functional mapping of the Yersinia enterocolitica adhesin YadA. Identification Of eight NSVAIG - S motifs in the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. *Mol Microbiol* **37**: 192-206.
- Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz & T. A. Springer, (2002) Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **110**: 599-511.
- Takao, T., N. Tominaga, Y. Shimonishi, S. Hara, T. Inoue & A. Miyama, (1984) Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by Yersinia enterocolitica. *Biochemical and biophysical research communications* **125**: 845-851.
- Takeda, K., T. Kaisho & S. Akira, (2003) Toll-like receptors. *Annual review of immunology* **21**: 335-376.
- Tamm, A., A. M. Tarkkanen, T. K. Korhonen, P. Kuusela, P. Toivanen & M. Skurnik, (1993) Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of Yersinia enterocolitica. *Mol Microbiol* **10**: 995-1011.
- Terti, R., M. Skurnik, T. Vartio & P. Kuusela, (1992) Adhesion protein YadA of Yersinia species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun* **60**: 3021-3024.
- Thomas, C. A., Y. Li, T. Kodama, H. Suzuki, S. C. Silverstein & J. El Khoury, (2000) Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *The Journal of experimental medicine* **191**: 147-156.
- Tiger, C. F., F. Fougerousse, G. Grundstrom, T. Velling & D. Gullberg, (2001) alpha11beta1 integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells. *Developmental biology* **237**: 116-129.
- To, W. S. & K. S. Midwood, (2011) Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & tissue repair* **4**: 21.
- Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon, (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**: 145-149.

- Tran, H. J., A. K. Heroven, L. Winkler, T. Spreter, B. Beatrix & P. Dersch, (2005) Analysis of RovA, a transcriptional regulator of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence that acts through antirepression and direct transcriptional activation. *J Biol Chem* **280**: 42423-42432.
- Trülzsch, K., A. Roggenkamp, M. Aepfelbacher, G. Wilharm, K. Ruckdeschel & J. Heesemann, (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.
- Tulla, M., O. T. Pentikainen, T. Viitasalo, J. Kapyla, U. Impola, P. Nykvist, L. Nissinen, M. S. Johnson & J. Heino, (2001) Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J Biol Chem* **276**: 48206-48212.
- Ude, S., D. L. Arnold, C. D. Moon, T. Timms-Wilson & A. J. Spiers, (2006) Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ Microbiol* **8**: 1997-2011.
- Underhill, D. M. & A. Ozinsky, (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology* **20**: 825-852.
- van der Laan, L. J., E. A. Dopp, R. Haworth, T. Pikkarainen, M. Kangas, O. Elomaa, C. D. Dijkstra, S. Gordon, K. Tryggvason & G. Kraal, (1999) Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J Immunol* **162**: 939-947.
- Viboud, G. I. & J. B. Bliska, (2005) *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **59**: 69-89.
- Vincent, S. & J. Settleman, (1997) The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol* **17**: 2247-2256.
- Visser, L. G., A. Annema & R. van Furth, (1995) Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect Immun* **63**: 2570-2575.
- Visser, L. G., P. S. Hiemstra, M. T. van den Barselaar, P. A. Ballieux & R. van Furth, (1996) Role of Yada in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect Immun* **64**: 1653-1658.
- Vogel, W., C. Brakebusch, R. Fässler, F. Alves, F. Ruggiero & T. Pawson, (2000) Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin. *J Biol Chem* **275**: 5779-5784.
- Vogel, W. F., R. Abdulhussein & C. E. Ford, (2006) Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cellular signalling* **18**: 1108-1116.
- Von Pawel-Rammingen, U., M. V. Telepnev, G. Schmidt, K. Aktories, H. Wolf-Watz & R. Rosqvist, (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.
- Wachtel, M. R. & V. L. Miller, (1995) In vitro and in vivo characterization of an ail mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **63**: 2541-2548.
- Waller, L. N., N. Fox, K. F. Fox, A. Fox & R. L. Price, (2004) Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Methods* **58**: 23-30.
- Wang, X., J. F. Preston, 3rd & T. Romeo, (2004) The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 2724-2734.
- Wattiau, P. & G. R. Cornelis, (1994) Identification of DNA sequences recognized by VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* yop regulon. *J Bacteriol* **176**: 3878-3884.

- Wauters, G., K. Kandolo & M. Janssens, (1987) Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 14-21.
- Weathington, N. M., A. H. van Houwelingen, B. D. Noerager, P. L. Jackson, A. D. Kraneveld, F. S. Galin, G. Folkerts, F. P. Nijkamp & J. E. Blalock, (2006) A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat Med* **12**: 317-323.
- Weber, K. & M. Osborn, (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**: 4406-4412.
- Weiss, S. J., (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* **320**: 365-376.
- Whitfield, C., (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* **75**: 39-68.
- Wiedemann, A., S. Linder, G. Grassl, M. Albert, I. Autenrieth & M. Aepfelbacher, (2001) *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol* **3**: 693-702.
- Wollmann, P., K. Zeth, A. N. Lupas & D. Linke, (2006) Purification of the YadA membrane anchor for secondary structure analysis and crystallization. *International journal of biological macromolecules* **39**: 3-9.
- Yipp, B. G. & P. Kubers, (2013) NETosis: how vital is it? *Blood* **122**: 2784-2794.
- Yoshimura, T., W. Matsuyama & H. Kamohara, (2005) Discoidin domain receptor 1: a new class of receptor regulating leukocyte-collagen interaction. *Immunologic research* **31**: 219-230.
- Zaleska, M., K. Lounatmaa, M. Nurminen, E. Wahlstrom & P. H. Makela, (1985) A novel virulence-associated cell surface structure composed of 47-kd protein subunits in *Yersinia enterocolitica*. *EMBO J* **4**: 1013-1018.
- Zhang, F. L. & P. J. Casey, (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**: 241-269.
- Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz & U. Romling, (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**: 1452-1463.
- Zong, Y., Y. Xu, X. Liang, D. R. Keene, A. Hook, S. Gurusiddappa, M. Hook & S. V. Narayana, (2005) A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *EMBO J* **24**: 4224-4236.

## 6 Anhang

### Veröffentlichungen

#### Artikel:

- **Gramlich K.**, Tost S., Welsch U., Heesemann J.  
New structural and functional insights into collagen binding of *Yersinia enterocolitica*  
In Vorbereitung

#### Vorträge:

- Gramlich K.**, Heesemann J.  
Revisiting collagen binding by Yersinia adhesin YadA  
3<sup>rd</sup> national Yersinia meeting, Juli 2012, Tübingen, Deutschland

#### Posterpräsentationen:

- Kristina Gramlich**, Susanne Kaditzky and Rudi F. Vogel  
Screening of brewing yeasts and lactobacilli for potential aroma precursors and components  
2nd International Symposium for Young Scientists and Technologists in Malting, Brewing and Distilling, Mai 2010, Freising-Weihenstephan, Deutschland  
Poster Award
- Gramlich K.**, Heesemann J.  
Revisiting collagen binding by Yersinia adhesin YadA  
64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Oktober 2012, Hamburg, Deutschland
- Gramlich K.**, Heesemann J.  
Revisiting collagen binding by Yersinia adhesin YadA  
Society for General Microbiology's Spring Conference, März 2013, Dublin, Irland
- Gramlich K.**, Heesemann J.  
Revisiting collagen binding by Yersinia adhesin YadA  
FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Congress, Juli 2013, Leipzig, Deutschland

**Gramlich K.**, Heesemann J.

Characterization of YadA collagen binding and its impact on Yersinia pathogenicity  
4th national Yersinia meeting, Mai 2014, Hamburg, Deutschland



## Danksagung

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

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl möchte ich mich besonders für die Betreuung am WZW der TU München, hilfreiche Diskussionen und Anregungen und das Interesse an meiner Forschungsarbeit, sowie die Hilfsbereitschaft bei organisatorischen Angelegenheiten für die Einreichung der Dissertation bedanken.

Ganz herzlich möchte ich meinen Kollegen vom Max von Pettenkofer-Institut danken, die für ein immer angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben:

Mein Büro mit wechselnder Belegschaft, besonders Emmi und Bettina, die mich zum Ende hin immer zum Durchhalten motiviert haben und meinen Arbeitsalltag durch ihr fröhliches Gemüt bereichert haben.

Mein Labor mit in den Jahren immer dünner werdender Belegschaft, Kristin, schön, dass ich dich noch kennenlernen durfte, danke für deine wertvollen Labortipps und dein immer offenes Ohr für meine Problemchen, nochmal Bettina, danke für all deine labortechnischen Tipps und Tricks, besonders für die Methode der Kollagengele, die wir beide über die Jahre kennen und lieben gelernt haben!

Die restlichen verbleibenden Mitglieder der AG Heesemann, Eva, Steffi, Nico, Max, Saskia, Debora, Catharina und Ombeline für eure Anregungen und Unterstützung in Yersinia-Fragen.

Allen restlichen Mitarbeitern des MVP (ich kann jetzt nicht alle aufzählen) der Bakteriologie und Virologie am Mittagstisch und Teilnehmern an fröhlichen Abendrunden.

Vielen Dank an all meine Freunde außerhalb des Labors, dass ihr mir seit so vielen Jahren die Treue haltet und in allen Lebenslagen ein offenes Ohr für mich habt!

Zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie, vor allem meiner Mutter, für die Unterstützung und vor allem für die Geduld und das immer währende Verständnis vor allem in der anstrengenden Endphase bedanken.