

WESTFÄLISCHE WILHELMS-UNIVERSITÄT MÜNSTER

Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung

Institut für Infektiologie

Charakterisierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes
in *Yersinia enterocolitica*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

INGA BLÄDEL

Geboren am 23.07.1983 in Emden

-2012-

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Prüfer
Erster Gutachter:	Prof. Dr. M. Alexander Schmidt
Zweiter Gutachter:	PD Dr. Gerhard Heusipp
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. Theresia Stradal
Tag der mündlichen Prüfung:	09. Oktober 2012
Tag der Promotion:	12. Oktober 2012

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	4
2.1 <i>Yersinia enterocolitica</i> – Taxonomie, Pathogenese und Virulenzfaktoren.....	4
2.1.1 <i>Yersinia</i> – Taxonomie und Vorkommen	4
2.1.2 <i>Yersinia enterocolitica</i> – Charakterisierung und Bionomie	6
2.1.3 Pathogenese einer <i>Yersinia enterocolitica</i> -Infektion.....	8
2.1.4 <i>Yersinia enterocolitica</i> – Virulenzfaktoren.....	10
2.1.4.1 Identifikation neuer Virulenzfaktoren – <i>host responsive</i> <i>elements</i>	14
2.2 Negative Regulation des Pyp-Netzwerkes durch den universellen Regulator H-NS	15
2.2.1 Das regulatorische Pyp-Netzwerk	15
2.2.2 H-NS – ein universeller Regulator	18
2.2.3 Einfluss von H-NS auf das regulatorische <i>pyp</i> -Netzwerk....	21
2.3 Pili – haarähnliche Fortsätze pathogener Bakterien.....	22
2.3.1 Typ IV Pili.....	23
2.3.2 Der Tad-Lokus – Regulation und Vorkommen	24
2.4 Zielsetzung	27
3 Material.....	29
3.1 Bakterienstämme.....	29
3.2 Vektoren und rekombinante Plasmide	30
3.3 Oligonukleotide	32
3.4 Antikörper	34
3.5 Größenstandards	35
3.5.1 DNA-Größenstandards.....	35
3.5.2 Protein-Größenstandards	36
3.6 Medien und Nährböden	36
3.7 Allgemeine Lösungen.....	37
3.8 Enzyme	38
3.9 Laborkits	38
3.10 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	39
4 Methoden	41
4.1 Mikrobiologische Methoden.....	41
4.1.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien.....	41
4.1.2 Bestimmung der optischen Dichte	42

4.1.3	Erstellen einer Wachstumskurve	42
4.2	DNA-Methoden	42
4.2.1	Präparation von genomischer DNA aus Gram-negativen Bakterien.....	42
4.2.1.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	42
4.2.1.2	“illustra Bacteria genomicPrep Mini Spin Kit”	44
4.2.2	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab.....	44
4.2.3	Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab	45
4.2.4	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	46
4.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
4.2.6	Reinigung von DNA	48
4.2.6.1	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	49
4.2.6.2	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Lösungen.....	49
4.2.7	Konzentrationsbestimmung gereinigter Nukleinsäuren	49
4.2.8	Restriktion von DNA.....	50
4.2.9	Dephosphorylierung der 5'-Phosphat-Enden	51
4.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	51
4.2.11	Herstellung kompetenter Zellen und deren Transformation ..	52
4.2.11.1	Calciumchlorid-Methode.....	52
4.2.11.2	Elektroporation.....	53
4.2.12	Sequenzierung von DNA	54
4.2.13	Bakterielle Konjugation.....	54
4.2.14	Cycloserinanreicherung	55
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	57
4.3.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten	57
4.3.2	Heterologe Proteinexpression	57
4.3.3	Reinigung rekombinanter Proteine	58
4.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	59
4.3.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
4.3.6	Coomassie-Färbung	61
4.3.7	<i>Western Blot</i> -Analyse.....	62
4.3.7.1	Elektrophoretischer Transfer mittels <i>Semidry Blot</i> - Verfahren.....	62
4.3.7.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen	64
4.4	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	66
4.5	Messung der Promotoraktivität	67
4.6	Nachweis von Biofilm	69
4.6.1	Nachweis von Biofilm durch Kristallviolett-Färbung	69
4.6.2	Nachweis von Biofilmen durch Kongorot-Nähragarplatten ...	70
5	Ergebnisse	71
5.1	Charakterisierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes in Verbindung mit H-NS als potentiellm Repressor.....	71

5.1.1	Etablierung einer dominant-negativen H-NS-Variante zur Analyse des Effekts von H-NS auf die Genexpression in <i>Y. enterocolitica</i>	72
5.1.2	H-NS interagiert direkt mit den Promotorregionen von <i>hreP</i> , <i>pypA</i> , <i>pypB</i> und <i>pypC</i>	74
5.1.3	Überproduktion von H-NS Δ fördert die Bildung von Biofilm. 76	
5.1.3.1	Untersuchungen der Biofilmbildung in Abhängigkeit von der Zeit.....	76
5.1.3.2	Analyse der Biofilmbildung mit Hilfe von Kristallviolett..	78
5.1.3.3	Nachweis der Biofilmbildung mittels Kongorot-Nähragar	79
5.2	Der Tad-Lokus - Untersuchungen zur Prozessierung des Flp-Pilins unter Einfluss von TadV	82
5.2.1	Verbreitung des Tad-Lokus in <i>Yersinia</i>	83
5.2.2	Prozessierung des Flp-Präproteins in Abhängigkeit von TadV	86
5.2.3	Generierung einer <i>tadV</i> -Deletionsmutante unter Verwendung des Suizid-Vektors pEP185.2.....	88
5.2.4	Funktionalität katalytischer Aspartatreste von TadV und deren Einfluss auf die Prozessierung von Flp	89
5.2.5	Bedeutung des G/(X) ₃ EY-Motivs von Flp für die Prozessierung	93
6	Diskussion.....	103
6.1	Charakterisierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes..	103
6.1.1	H-NS reprimiert die Expression von <i>hreP</i> , <i>pypA</i> , <i>pypB</i> und <i>pypC</i>	104
6.1.2	H-NS ist involviert in der Regulation von Biofilmen.....	113
6.2	Der Tad-Lokus	115
6.2.1	Die Verbreitung des Tad-Lokus in <i>Yersinia</i>	117
6.2.2	Der Tad-Lokus in <i>Y. enterocolitica</i>	120
6.3	Ausblick.....	128
7	Literaturverzeichnis	131
8	Anhang	152
8.1	Plasmidkarten.....	152
8.1.1	pBAD18-Kan	152
8.1.2	pMMB207	153
8.1.3	pFUSE	153
8.1.4	pVLT35	154
8.1.5	pEP185.2.....	154
8.1.6	pET-24b(+).....	155
8.2	Lokalisation der H-NS-Konsensussequenz	155
8.3	Sequenzvergleiche zwischen <i>A. actinomycetem-comitans</i> und <i>Y. enterocolitica</i>	156
8.3.1	Flp	156
8.3.2	TadV.....	156

8.3.3 TadE	156
8.3.4 TadF	156
8.4 Übersicht der Aminosäuren	157
8.4.1 Kodierung.....	157
8.4.2 Strukturformeln der proteinogenen Aminosäuren.....	158
Eidesstattliche Erklärung.....	160
Wissenschaftliche Beiträge	161
Lebenslauf.....	162
Danksagung	163

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 2.1 Überblick über die verschiedenen Infektionswege pathogener *Yersinia*-Arten.
- Abb. 2.2 Vereinfachtes Modell der evolutionären Entwicklung von *Yersinia* basierend auf genomischen Analysen.
- Abb. 2.3 Schematische Übersicht über die Regulationswege des *pyp*-Netzwerkes.
- Abb. 2.4 Oligomerisierung von H-NS innerhalb der beiden Dimerisierungsdomänen.
- Abb. 2.5 Hypothetische Darstellung der Flp-Pilus Biogenese in *A. actinomycetemcomitans*.
- Abb. 4.1 Schematische Darstellung der homologen Rekombination von pEP185.2 in das Chromosom von *Y. enterocolitica*.
- Abb. 5.1 Messung der Promotoraktivität unter dem Einfluss der dominant-negativen Version H-NS Δ auf *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC* in *Y. enterocolitica*.
- Abb. 5.2 *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion zwischen rekombinantem H-NS und den Promotorregionen von *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC*.
- Abb. 5.3 Wachstumskurve zur Untersuchung der Biofilmbildung.
- Abb. 5.4 Nachweis der Biofilmbildung nach 12 h.
- Abb. 5.5 Nachweis der Biofilmbildung in Wildtyp sowie Mutanten-Stämmen mittels Kristallviolett-Färbung.
- Abb. 5.6 Nachweis der Biofilmbildung unter Einsatz eines Kongorot-Agars.
- Abb. 5.7 Vergrößerte Aufnahmen zweier unter Abb. 5.6 dargestellter Kolonien.
- Abb. 5.8 Verteilung und genetische Organisation des Tad-Lokus.
- Abb. 5.9 Schematische Darstellung der Flp-Aminosäuresequenz aus *Y. enterocolitica*.
- Abb. 5.10 *Western Blot*-Analyse zur Prozessierung des Flp-Präproteins in Abhängigkeit von TadV in *E. coli*.
- Abb. 5.11 *Western Blot*-Analyse zur Untersuchung der Funktionalität katalytischer Aspartatreste von TadV bei der Prozessierung des Flp-Präproteins in *Y. enterocolitica* Δ tadV.
- Abb. 5.12 *Western Blot*-Analyse zur Untersuchung des Einflusses eines eingefügten Valinrestes auf die Prozessierung des Flp-Präproteins in *Y. enterocolitica* Δ tadV.

- Abb. 5.13 Schematische Darstellung der einzelnen PCR-Reaktionen zur Generierung verschiedener *flp*-Derivate.
- Abb. 5.14 *Western Blot*-Analyse zur Charakterisierung des G/(X)₃EY-Motivs des Flp-Präproteins in Hinblick auf die Prozessierung durch TadV in *Y. enterocolitica* Δ *tadV*.
- Abb. 5.15 *Western Blot*-Analyse zur Charakterisierung der Prozessierung des Flp-Präproteins in *Y. enterocolitica* Δ *tadV*.
- Abb. 5.16 Sequenzvergleich der verschiedenen *flp*-Derivate.
- Abb. 6.1 Schematische Darstellung der Integration xenogenetischer DNA und deren Regulation durch H-NS.
- Abb. 6.2 Schematische Darstellung der Regulationswege des regulatorischen Pyp-Netzwerkes.
- Abb. 6.3 Schematische Übersicht verschiedener H-NS-Derepressionsmechanismen.
- Abb. 6.4 H-NS bindet AT-reiche DNA über ein konserviertes AT-Haken-Motiv innerhalb der kleinen DNA-Furche.
- Abb. 6.5 Entwicklungszyklus und Verbreitung in Biofilmen.
- Abb. 6.6 Genetische Organisation des Tad-Lokus.
- Abb. 6.7 Membrantopologie von Flp-1- und TadV-Proteinen in *A. actinomycetemcomitans*.
- Abb. 6.8 Vergleich des Flp-Proteins von *Y. enterocolitica* und Flp-1 von *A. actinomycetemcomitans*.
- Abb. 6.9 Venn-Diagramm: Eigenschaften der 20 proteinogenen Aminosäuren.

-
- Tab. 3.1 Verwendete *Yersinia enterocolitica*-Stämme.
- Tab. 3.2 Verwendete *Escherichia coli*-Stämme.
- Tab. 3.3 Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide.
- Tab. 3.4 Verwendete Oligonukleotide.
- Tab. 3.5 Übersicht der verwendeten Antikörper.
- Tab. 3.6 Verwendeter Protein-Größenstandard.
- Tab. 3.7 Verwendete Antibiotika und deren eingesetzte Konzentrationen.
- Tab. 3.8 Allgemein eingesetzte Lösungen.
- Tab. 3.9 Verwendete Enzyme.
- Tab. 3.10 Verwendete Laborkits.
- Tab. 4.1 Übersicht der einzelnen PCR-Reaktionsschritte und deren Einstellungen.
- Tab. 4.2 Übersicht der Elektroporationsparameter für *E. coli* und *Y. enterocolitica*.
- Tab. 4.3 Übersicht der verwendeten Gelkonzentrationen und deren Zusammensetzung.
- Tab. 5.1 Verwendete Plasmide.
- Tab. 5.2 Übersicht über die biochemischen Eigenschaften der 20 proteinogenen Aminosäuren.
- Tab. 5.3 Gerichtete Mutationen des Plasmids pVLT-flp.
- Tab. 5.4 Willkürliche Mutationen des Plasmids pVLT-flp.

Abkürzungsverzeichnis

β	Beta
γ	Gamma
Δ	Delta, Deletion
π	Phi
Ω	Ohm
%	Prozent
&	und
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Adenosin
<i>A.</i>	<i>Aggregatibacter (Actinobacillus)</i>
Abb.	Abbildung
ad	Bis zu/auf
Ail	<i>attachment invasion locus</i>
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ChiY	<i>chitin-binding protein of Yersinia</i>
cm	Zentimeter
C-terminal	Carboxyterminal
Da	Dalton
<i>d.</i>	demineralisiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-phosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EngY	<i>enhacin-like N-acetylglucosamine-binding protein of Y. enterocolitica</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
Flp	<i>fimbrial low molecular weight protein</i>
g	Gramm
G	Guanosin
GAM	<i>goat anti mouse</i>
GAR	<i>goat anti rabbit</i>
h	<i>hour(s)</i>
H ₂ O	Dihydrogenmonoxid
HA	Hämagglutinin
HGT	horizontaler Gentransfer
H-NS	<i>histone-like nucleoid structuring protein</i>
Hre	<i>host responsive element</i>
<i>in silico</i>	im Computer
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LD	Letale Dosis
M	Molar
m	Milli
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
Myf	<i>mucoïd Yersinia fibrillae</i>
M-Zellen	<i>microfold</i> Zellen
n	nano (10 ⁻⁹)
<i>N.</i>	<i>Neisseria</i>
Nal	Nalidixinsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid

NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
N-terminal	Aminoterminal
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
ORF	<i>open reading frame</i>
ori	<i>origin</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PI	Pathogenitätsinsel
PO	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pyp	<i>protein regulating expression of Yersinia hreP</i>
pYV	<i>plasmid involved in Yersinia virulence</i>
PZ	<i>plasticity zone</i>
Rcp	<i>rough colony protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RovA	<i>regulator of virulence A</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
sek.	Sekunde(n)
SRP	Signalerkennungsprotein
ssp.	Subspezies
STM	<i>signature tagged mutagenesis</i>
T	Thymidin
T2SS	Typ-II-Sekretionssystem
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
T4P	Typ IV Pili
T4PPP	Typ IV Präpilinpeptidase
Tab.	Tabelle
Tad	<i>tight adherence</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TYE	<i>trypton-yeast</i>
U	<i>unit</i>
u. a.	unter anderem
UPEC	uropathogener <i>E. coli</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume</i>
WT	Wildtyp
wHTH	<i>winged helix-turn-helix</i>
x	mal
x g	$g=9,81 \text{ m/s}^2$; Vielfaches der Erdbeschleunigung
YGI	<i>Yersinia genomic island</i>
YmoA	<i>Yersinia modulator A</i>
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia adhesion A</i>
YAPI	<i>Yersinia adhesion pathogenicity island</i>

Aminosäure	Abkürzung	Buchstabensymbol
Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

1 Zusammenfassung

Adaption an sich verändernde Umgebungen, aber auch das Wechseln in spezifische ökologische Nischen gehen in Bakterien oftmals mit dem Erwerb xenogenetischer DNA, aber auch mit dem Verlust oder der Inaktivierung von genetischem Ballast einher. Der Erwerb fremder DNA mittels horizontalem Gentransfer sowie deren anschließende Integration in das bakterielle Genom bergen oftmals Risiken, welche potentielle Störungen in der Regulation des Kerngenoms bewirken können. In vielen Bakterien spielt daher die negative Regulation durch das *histone-like nucleoid structuring protein* H-NS eine große Rolle.

Die Identifizierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes, dessen Gene ausschließlich *in vivo* exprimiert werden, erlaubten neue Einblicke in die komplizierte virulenzassoziierte Regulationsmaschinerie von *Y. enterocolitica*. Bestehend aus der Protease HreP (*host responsive element*) und den Pyp-Proteinen A, B und C (*protein regulating expression of Yersinia hreP*), konnte ein komplexes Netzwerk an Regulationskaskaden nachgewiesen werden. So zeigten Expressionsanalysen einerseits, dass die *hreP*-Transkription durch jedes der drei Pyp-Proteine unabhängig aktiviert werden kann, andererseits aber auch, dass sich PypB und PypC in ihrer Expression sowohl gegenseitig als auch selbst regulieren können. Sowohl der niedrige GC%-Gehalt von *hreP* als auch der der *pyp*-Gene im Vergleich zum restlichen Genom von *Y. enterocolitica* lassen zudem eine negative Regulation durch H-NS vermuten.

In Anlehnung an diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit das universelle Regulatorprotein H-NS als Repressor des regulatorischen Pyp-Netzwerkes in *Y. enterocolitica* identifiziert werden. Da H-NS-Nullmutationen für *Y. enterocolitica* letal zu sein scheinen, wurde für diese Untersuchungen eine trunkierte H-NS-Variante (H-NS Δ) verwendet. Dieses dominant-negative H-NS-Protein ist nach wie vor in der Lage zu multimerisieren, kann infolge eines fehlenden C-Terminus jedoch nicht mehr an DNA binden.

Anhand von *in vivo*-Transkriptionsanalysen konnte eindeutig gezeigt werden, dass sowohl *hreP* als auch *pypB* und *pypC* durch H-NS negativ reguliert werden. Darüber hinaus war es möglich eine direkte Interaktion zwischen rekombinantem H-NS und den Promotorregionen von *hreP* sowie *pypB* und *pypC* nachzuweisen. Im Gegensatz dazu konnte für *pypA* keine eindeutige Aussage über die Regulation durch den universellen Regulator getroffen werden. Während *in vivo*-Expressionsanalysen in *Y. enterocolitica* auf keinen Effekt durch die Überproduktion von H-NS Δ hindeuten, konnte eine direkte Interaktion zwischen der Promotorregion und dem rekombinanten Protein detektiert werden.

Weiterhin konnte zudem eine vermehrte Biofilmbildung mit der Überproduktion dieser dominant-negativen Variante von H-NS in Verbindung gebracht werden. Analysen unter der Verwendung von verschiedenen *hreP*- und *pyp*-Mutanten kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass dieser Effekt unabhängig von dem regulatorischen Pyp-Netzwerk in *Y. enterocolitica* auftritt.

In Anlehnung an die Charakterisierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes in *Y. enterocolitica* zeigten *in silico*-Analysen, dass *pypB* nicht nur direkt stromaufwärts des Tad-Lokus lokalisiert ist, sondern auch als direkter Regulator dieser genomischen Insel fungiert. Dieser Tad-Lokus kodiert in vielen Gram-negativen und -positiven Bakterien, aber auch in *Archeae* für eine neuartige Form von Typ IVb Pili, welche unspezifische Bindungen an festen Oberflächen sowie die Bildung von Mikrokolonien und hartnäckigen Biofilmen vermitteln. Obwohl der Tad-Lokus in Bakterien weit verbreitet ist, gibt es nur wenige Informationen über die Pilusexpression, deren Biogenese sowie dem daraus resultierenden Phänotyp in *Y. enterocolitica*.

Zu diesem Zweck sollte im Rahmen dieser Arbeit die Prozessierung des Strukturproteins Flp durch die Präpilinpeptidase TadV näher untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde ein System zur Analyse der Prozessierung des Flp-Präproteins durch TadV sowohl in *E. coli* als auch in einer TadV-Deletionsmutante von *Y. enterocolitica* etabliert. Innerhalb dieses Systems wurden gerichtete Mutationen in *tadV* und *flp* eingefügt und die Effekte mit Hilfe von Immunoblots detektiert. Anhand einzelner Substitutionen innerhalb der konservierten Konsensussequenz des Strukturproteins war es möglich Unterschiede in der Prozessierung zu detektieren, jedoch konnten angesichts dieser Ergebnisse weder Aussagen über die Assemblierung und Funktionalität des Pilins noch über den damit einhergehenden Phänotyp getroffen werden.

2 Einleitung

2.1 *Yersinia enterocolitica* – Taxonomie, Pathogenese und Virulenzfaktoren

2.1.1 *Yersinia* – Taxonomie und Vorkommen

Yersiniae werden als Gram-negative Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* beschrieben, welche 1944 zu Ehren des französischen Bakteriologen Alexandre J. Yersin, dem Entdecker des Pesterregers, ihren heutigen Namen erhielten (van Loghem, 1944; Bottone & Mollaret, 1977).

Bis zum heutigen Tag konnten insgesamt 17 verschiedene Bakterienarten dem Genus *Yersinia* zugeordnet werden, unter denen lediglich drei als Humanpathogene beschrieben sind: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*. Sie haben sowohl den Tropismus zu lymphatischem Gewebe als auch das Tragen eines 70 kb Virulenzplasmids (pYV) gemein. Im Gegensatz dazu werden *Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. entomophaga*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri* und *Y. similis* entweder als avirulent (so genannte Umweltkeime) betrachtet oder deren Pathogenität konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht belegt werden (Wren, 2003; Białaś *et al.*, 2012).

Y. pestis stellt als Erreger der Beulen- und Lungenpest die wohl geläufigste *Yersinia*-Spezies dar. Durch populationsgenetische Studien konnte unlängst gezeigt werden, dass sich *Y. pestis* evolutionär aus der Spezies *Y. pseudotuberculosis* entwickelt hat. Aus dem ehemals weit verbreiteten Enteropathogen entstand ein durch Blut übertragbarer Krankheitserreger mit der Tendenz als Insekten- und Nagetierparasit systemische Erkrankungen herbeizuführen (Achtman *et al.*, 1999; Wren, 2003). *Y. pestis* ist verantwortlich für etliche Epidemien und drei Pandemien, in denen Millionen Menschen zu Tode kamen und die wirtschaftliche und politische Geschichte drastisch beeinflusst wurde (Ligon, 2006; Eisen *et al.*, 2012). Aufgrund des natürlichen Reservoirs in Nagetieren, vornehmlich Ratten, und der Übertragung über den Floh als Vektor wird eine vollkommene Ausrottung der Krankheit nahezu ausgeschlossen. Charakteristisch für die Beulenpest sind die Bubonen, stark angeschwollene Lymphknoten, welche durch die dort angesammelten Bakterien und Immunzellen hervorgerufen werden. Ein Übertritt der Pathogene in den Blutkreislauf oder die Lymphgefäße kann zudem eine Bakteriämie evozieren. Bleiben die Krankheitsbilder unbehandelt, kann sich die Erkrankung darüber hinaus zur hochinfektiösen Form der Lungenpest entwickeln, welche über Aerosole direkt von Mensch zu Mensch übertragen wird und unweigerlich zum Tode führt. Eine Tatsache, deren Nutzen auch den Entwicklern von Biowaffen nicht verborgen geblieben ist (Perry & Fetherston, 1997; Wren, 2003; Ligon, 2006).

Humane Infektionen durch *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind meist Folge einer oralen Aufnahme von kontaminiertem Wasser oder kontaminierten Lebensmitteln, insbesondere durch den Verzehr von rohen oder nicht ausreichend gegarten Schweinefleischprodukten (Keet, 1974; Black *et al.*, 1978). Infektionen gehen zumeist mit einer abszessbildenden mesenterialen Lymphadenitis und Diarrhö einher, können aber auch zu sekundären Komplikationen mit Darmverschluss oder -perforation führen. Nur in sehr wenigen Fällen wurde von einer septischen Infektion berichtet. Als postinfektiöse Folgen treten oftmals reaktive Arthritis und Erythema nodosum auf (Cover & Aber, 1989; Ljungberg *et al.*, 1995; Revell & Miller, 2001; Galindo *et al.*, 2011).

Obwohl sich alle drei Humanpathogene in Art und Weise der Infektion unterscheiden (Abb. 2.1), vermögen sie doch alle die unspezifische Immunantwort des Wirts, z. B. Phagozytose durch Makrophagen, zu umgehen.

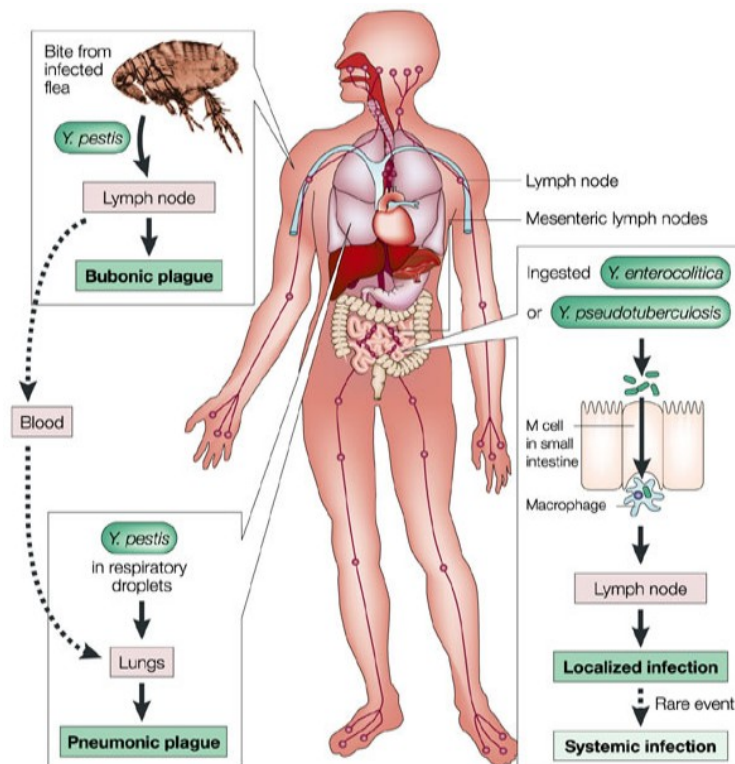


Abbildung 2.1: Überblick über die verschiedenen Infektionswege pathogener *Yersinia*-Arten.

Enteropathogene *Yersinia*-Arten werden überwiegend über kontaminierte Nahrung oder verunreinigtes Wasser aufgenommen. Die Bakterien gelangen über die M-Zellen des Intestinums in das lymphatische System und führen zu unterschiedlichen gastrointestinalen Syndromen. In seltenen Fällen kann sich die Infektion zudem zu einer systemischen Infektion weiterentwickeln. *Y. pestis*, denen Wildnagetiere als natürliches Reservoir dienen, werden hauptsächlich durch infizierte Flöhe, selten durch Tröpfcheninfektion auf den Menschen übertragen. Die durch die Infektion mit *Y. pestis* ausgelöste Beulenpest kann sich unbehandelt zur hochinfektiösen Lungenpest entwickeln (Wren, 2003).

2.1.2 *Yersinia enterocolitica* – Charakterisierung und Bionomie

Y. enterocolitica ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes γ -Proteobakterium, das zu der Familie der *Enterobacteriaceae* gehört. Sowohl Motilität als auch spezifische Virulenzfaktoren werden temperaturabhängig reguliert. So zeigt *Y. enterocolitica* bei 26 °C eine peritriche Begeißelung, welche bei 37 °C nahezu fehlt. Die geographische Verbreitung des psychrotoleranten Bakteriums beschränkt sich weitgehend auf die gemäßigten und subtropischen Klimazonen.

Y. enterocolitica ist weit verbreitet in der Natur; so können sie sowohl in aquatischen und terrestrischen Umgebungen als auch im Magen-Darm-Trakt vieler höher entwickelter Vertebraten, insbesondere Schweinen, nachgewiesen werden (Bottone & Mollaret, 1977; Bottone, 1999; Białas *et al.*, 2012).

Aufgrund unterschiedlicher Substratverwertung wurde *Y. enterocolitica* in die sechs Biovare 1A, 1B sowie 2 bis 5 unterteilt. Biogruppe 1A fasst den überwiegenden Teil der bis dahin als apathogen eingeschätzten Isolate zusammen, wenngleich einige Studien von einzelnen virulenten Stämmen dieses Biovars berichten (Tennant *et al.*, 2003; Wren, 2003). In Europa und Japan kommen überwiegend schwach pathogene Stämme der Biogruppen 2 bis 5 vor. Sie werden auch häufig als „Alte Welt“-Stämme bezeichnet (Abb. 2.2). Der Ursprung der „Neue Welt“-Stämme, der hochvirulenten Biogruppe 1B, liegt indes in Nordamerika.

Unabhängig von der Herkunft der pathogenen Biovare haben sowohl die „Alte Welt“- als auch „Neue Welt“-Stämme das Virulenzplasmid pYV (*plasmid involved in Yersinia yirulence*) gemein (Robins-Browne *et al.*, 1989; Aleksic & Bockemühl, 1990; Wren, 2003). Die Unterschiede in der Ausprägung der Pathogenität korrelieren mit dem Vorhandensein einer chromosomal kodierten Pathogenitätsinsel (*high pathogenicity island*; HPI), deren genetische Elemente die Virulenz dieser Stämme steigern. So kodiert sie u. a. Virulenzgene des Yersiniabactin-Systems, welches für die Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme essentiell ist. Aufgrund des abweichenden GC%-Gehalts gegenüber dem Wirtschromosom wird eine Aufnahme dieser genetischen Elemente über horizontalen Gentransfer vermutet. Zusätzliche Genomsequenzierungen identifizierten darüber hinaus weitere spezifische Bereiche innerhalb des Genoms, die für hochpathogene Stämme charakteristisch zu sein scheinen (Carniel *et al.*, 1996; Hacker *et al.*, 1997; Thomson *et al.*, 2006).

Neben der Einteilung in Biovare wird in der Routinediagnostik noch eine Einteilung in Serovare vorgenommen. Diese Typisierung basiert überwiegend auf der Charakterisierung von Oberflächen- (O-), seltener auf den Geißel- (H-) oder Fimbrien- (F-) Antigenen. Von den über 50 identifizierten O-Serotypen konnten nur 11 mit humanen Erkrankungen assoziiert werden. In Mitteleuropa

wurden hauptsächlich die Serotypen O:3, O:5,27 und O:9 beschrieben, während Infektionen in Nordamerika dem Serotyp O:8 zugeordnet wurden (Aleksić & Bockemühl, 1990; Bottone, 1997; Wren, 2003; Fredriksson–Ahomaa *et al.*, 2006; Białas *et al.*, 2012).

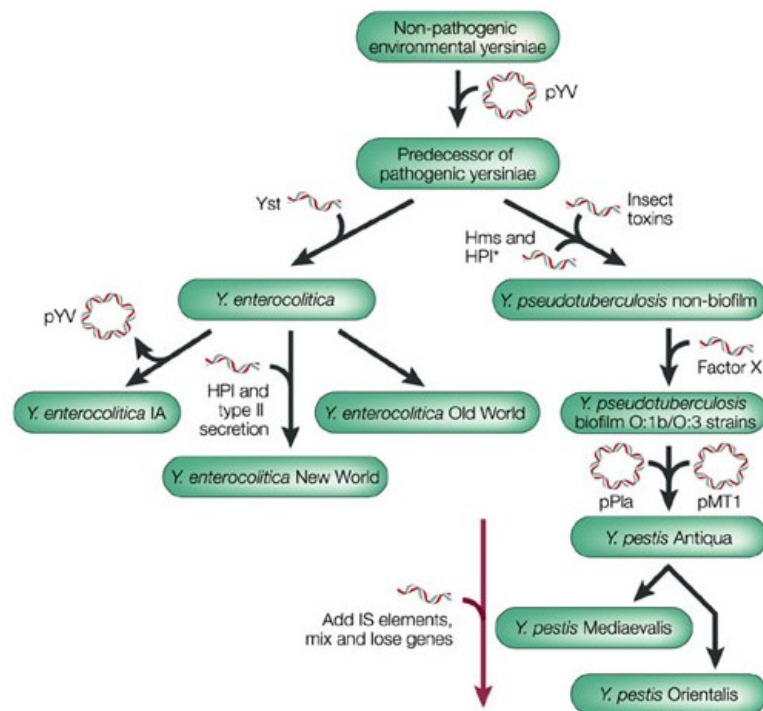


Abbildung 2.2: Vereinfachtes Modell der evolutionären Entwicklung von *Yersinia* basierend auf genomischen Analysen

Durch die Aufnahme verschiedener Virulenzfaktoren entwickelten sich aus apathogenen *Yersinia* die heutigen pathogenen *Yersinia*-Stämme. Abhängig von der Ausprägung der Pathogenität wird *Y. enterocolitica* in apathogene (1A), schwach („Alte Welt“) und stark pathogene („Neue Welt“) Stämme unterteilt. *Y. pseudotuberculosis* erwarb die Fähigkeit Insekten zu parasitieren und Biofilme auszubilden, bevor durch genomische Veränderungen und die Aufnahme der Plasmide pPla und pMT1 die heutige Spezies *Y. pestis* hervorging. Hms: Hämineinlagerung, HPI/HPI*: Pathogenitätsinseln, IS: Insertionselemente (Wren, 2003).

2.1.3 Pathogenese einer *Yersinia enterocolitica*-Infektion

Y. enterocolitica zählt zu den dritthäufigsten bakteriellen Enteritisserregern nach *Salmonella* und *Campylobacter* in Deutschland. In den meisten Fällen erfolgt eine Infektion durch *Y. enterocolitica* nach oraler Aufnahme kontaminierter Lebensmittel. Vor allem Schweinefleisch, aber auch Hühnerfleisch, Rohmilch oder verunreinigtes Wasser stellen hierbei Infektionsquellen dar (Keet, 1974;

Black *et al.*, 1978; Bonardi *et al.*, 2010). Vereinzelt wurden auch Erkrankungen durch direkte Inokulation kontaminierter Bluttransfusionen beschrieben (Stenhouse & Milner, 1982).

Eine Infektion durch *Y. enterocolitica* kann in zwei Phasen unterteilt werden. In der ersten Phase adhären die Bakterien an die mukosalen Epithelzellen des terminalen Dünndarms, wobei spezifische Adhärenz- und Invasionsfaktoren das Anlagern des Enteropathogens an den intestinalen Bürstensaum und dessen anschließende Internalisierung vermitteln (Isberg & Leong, 1990; Paerregaard *et al.*, 1991; Bottone, 1997). Nach selektivem Passieren der intestinalen Epithelbarriere über die M-Zellen (*microfold cells*), welche an der Aufnahme und dem Transport von Antigenen des intestinalen Lumens in das lymphatische Gewebe beteiligt sind, gelangen die Bakterien in die darunter liegenden Peyer'schen Plaques (PP) (Wolf *et al.*, 1981; Wassef *et al.*, 1989; Siebers & Finlay, 1996; Neutra *et al.*, 1996). Ausgehend von Virulenzfaktoren, die auf dem Virulenzplasmid pYV kodiert sind, replizieren sich die Bakterien extrazellulär in den PP und induzieren so die Bildung von Mikroabzessen und granulomatösen Läsionen (Portnoy & Falkow, 1981; Hanski *et al.*, 1989; Autenrieth & Firsching, 1996).

In der zweiten Phase einer *Y. enterocolitica*-Infektion kann es insbesondere in immunsupprimierten Personen zu einer Dissemination der Enteropathogene in tiefer liegendes Gewebe, wie den mesenterialen Lymphknoten, der Milz oder Leber kommen, durch welche eine Mortalitätsrate von bis zu 50 % begründet liegt. Bis heute ist ungewiss, ob darüber hinaus eine Dissemination direkt über den Blutkreislauf erfolgen kann (Cover & Aber, 1989; Pepe & Miller, 1993; Heesemann *et al.*, 2006; Trülsch *et al.*, 2007).

Allgemein zeichnet sich eine enterale Yersiniose durch eine akute, selbstlimitierende Gastroenteritis aus. Die meisten Krankheitsbilder stehen allerdings im Zusammenhang mit dem Alter und Gesundheitszustand des Patienten sowie mit der Virulenz des jeweiligen Erregers. So erkranken überwiegend Kinder an akuter Enteritis, während sich eine Infektion bei Erwachsenen häufig durch eine Pseudoappendizitis und terminale Ileitis äußert

(Bottone, 1997). Nicht selten bleiben zudem Spätfolgen wie Arthritis oder Erythema nodosum (Dequeker *et al.*, 1980).

2.1.4 *Yersinia enterocolitica* – Virulenzfaktoren

Y. enterocolitica besitzt eine Reihe an Virulenzfaktoren, welche es dem Pathogen ermöglichen in den Wirt einzudringen und dort zu überleben. Sie sind sowohl innerhalb des Chromosoms als auch auf Virulenzplasmid pYV kodiert (Fàbrega & Vila, 2012). Ein erfolgreiches Pathogenese-Profil und somit eine optimale Anpassung an die wechselnden Temperaturen wird dabei durch Thermoregulation der assoziierten Virulenzfaktoren manifestiert (Miller *et al.*, 1989; Galindo *et al.*, 2011).

Für den initialen Invasionsschritt der intestinalen Mukosa werden drei Proteine als essentiell beschrieben. Das auf dem Chromosom kodierte Membranprotein Invasin (*inv*) ist *in vitro* der primäre Adhärenz- und Invasionsfaktor. Er bindet an die β_1 -Untereinheit von Integrinen der apikalen M-Zell-Oberfläche und ermöglicht somit die Penetration der Epithelzelle. Invasin wird *in vitro* in Abhängigkeit von der Wachstumsphase bei 26 °C und einem pH-Wert von 5,5 exprimiert; eine Expression während einer Infektion wurde zudem im Mausmodell nachgewiesen (Pepe & Miller, 1993; Pepe *et al.*, 1994). Neben RovA als positivem Regulator der *inv*-Expression wirken H-NS und YmoA sowohl bei 26 °C als auch bei 37 °C als Repressor; OmpR wurde überdies eine negative Regulation bei 26 °C zugeschrieben (Ellison & Miller, 2006; Brzostek *et al.*, 2007).

Ein weiteres chromosomal kodierte Oberflächenprotein stellt Ail (*attachment invasion locus*) dar, welches lediglich in pathogenen *Yersinia*-Stämmen vertreten ist. Es wird ausschließlich bei 37 °C exprimiert und vermittelt neben Invasin die Adhärenz, Internalisierung und Serumresistenz von *Y. enterocolitica* (Portnoy & Falkow, 1981; Galindo *et al.*, 2011).

Abgesehen von den chromosomal kodierten Virulenzfaktoren besitzen pathogene *Yersinia*-Stämme auch noch das Virulenzplasmid pYV, welches außer dem Yop-Virulon den wichtigen Adhäsionsfaktor YadA (*Yersinia adherence A*)

kodiert. YadA ist ein homotrimeres Protein der äußeren Membran, dessen Expression vorwiegend bei Wirtstemperatur erfolgt. Es vermittelt die Bindung an Mukus, epitheliale Zellen, Phagozyten und diverse extrazelluläre Matrixproteine (z. B. Laminin, Kollagen, Fibronectin) und initiiert, ähnlich wie Invasin, die Internalisierung durch Anlagerung an β_1 -Integrin (Isberg, 1990; El Tahir & Skurnik, 2001; Heise & Dersch, 2006; Trülzsch *et al.*, 2007). Gemeinsam mit Ail stellt es einen wichtigen Faktor bei der Umgehung des Immunsystems sowie der Resistenz gegenüber dem Komplementsystem dar. Hierbei rekrutieren sie die Inhibitoren Faktor H und C4b-Bindeprotein und unterbinden so die Aktivierung des Komplementsystems (Kirjavainen *et al.*, 2008; Biedzka-Sarek *et al.*, 2008). Untersuchungen in *Y. pseudotuberculosis* zeigten darüber hinaus, dass eine Mutation im *inv*-Gen, und somit die Fähigkeit der Internalisierung, durch YadA teilweise kompensiert werden kann. Dies gilt allerdings nicht im umgekehrten Fall (Yang & Isberg, 1993).

Neben dem Adhäsionsfaktor YadA kodiert pYV überdies das Yop-Virulon, ein Typ-III-Sekretionssystem (*yop secretion component*; Ysc), bestehend aus einem Nadelkomplex (Injektisom), Chaperonen (*specific Yop chaperone*; Syc) und sechs Effektorproteinen (*Yersinia outer protein*; Yop) (Cornelis, 2002b). Durch das Injektisom, dessen Struktur sowohl beide Membranen der bakteriellen Zellwand als auch die Plasmamembran der Wirtszelle durchspannt, werden die Yops mit Hilfe spezifischer Chaperone direkt in das Zytoplasma transloziert (Boyd *et al.*, 2000; Cornelis, 2006). Effektorproteine weisen eine große Vielzahl von biochemischen und immunmodulatorischen Aktivitäten auf. So verhindern sie u. a. die Phagozytose durch Makrophagen sowie polymorphkernige Neutrophile und inhibieren neben der Zytoskelettdynamik diverse Signalwege des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Cornelis, 2002a; Trosky *et al.*, 2008). Die kodierten Gene des Ysc-Typ-III-Sekretionssystems (Ysc-T3SS) werden *in vitro* ausschließlich bei 37 °C und niedrigen Calciumkonzentrationen exprimiert, eine Translokation der Yops findet zudem nur bei Wirtszellkontakt statt (Straley *et al.*, 1993; Rosqvist *et al.*, 1994; Straley & Perry, 1995).

Während das plasmidkodierte Ysc-T3SS relevant für die Virulenz *Yersinias* innerhalb der systemischen Infektionsphase ist, konnte unlängst ein chromosomal kodiertes T3SS (*Yersinia secretion apparatus*; Ysa) nachgewiesen werden, dessen Einfluss während der frühen Infektionsphase auf die Kolonisierung des gastrointestinalen Gewebes von großer Bedeutung zu sein scheint (Haller *et al.*, 2000; Venecia & Young, 2005; Matsumoto & Young, 2009). Das Ysa-T3SS zeigt große Ähnlichkeiten zu dem Mxi-Spa-T3SS von *Shigella* ssp. und dem T3SS-1 von *Salmonella enterica* (Foultier *et al.*, 2002, 2003). Es ist auf der Ysa-Pathogenitätsinsel (Ysa-PI) inmitten der *plasticity zone* (PZ) lokalisiert, die eine große Anzahl an speziesspezifischen genomischen Variationen, insbesondere von virulenzassoziierten Genen, aufweist. Aufgrund der Ausmaße und Komplexität dieser PZ wird vermutet, dass sie durch eine Reihe unabhängiger Insertionen innerhalb dieser Region hervorgegangen ist (Thomson *et al.*, 2006).

Neben den beiden T3SS besitzt *Y. enterocolitica* der Biogruppe 1B zudem zwei Typ-II-Sekretionssysteme (T2SS), Yts1 (*Yersinia type II secretion 1*) und Yts2 (*Yersinia type II secretion 2*). Während das Yts1-Operon innerhalb der PZ lokalisiert ist, werden die Gene des Yts2 außerhalb dieser Region im Chromosom kodiert. Untersuchungen im Mausmodell ergaben, dass Yts1 die systemische Verbreitung von *Y. enterocolitica* nach oraler Verabreichung wesentlich beeinflusst (Iwobi *et al.*, 2003; Thomson *et al.*, 2006). Im Gegensatz zum Yts2-T2SS konnten für Yts1 bisher drei sekretierte Substrate identifiziert werden. Sowohl ChiY (*chitin-binding protein of Yersinia*) als auch EngY (*enhancin-like N-acetylglucosamine-binding protein of Yersinia*) vermögen an Chitin zu binden. Die Analyse der YE3650-Aminosäuresequenz identifizierte ferner konservierte Motive, welche meist in oligosaccharidbindenden Enzymen vorzufinden sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Yts1-T2SS ausschließlich bei 17 °C bzw. 26 °C sowie durch Magnesiumchlorid induziert werden kann. Aufgrund der Bindeeigenschaften der sekretierten Substrate und der Expression und Sekretion bei niedrigen Temperaturen ist anzunehmen, dass das Yts1-T2SS eine bedeutende Rolle in der Umwelt oder auch während Infektionen in Insekten spielt (Iwobi *et al.*, 2003; Shutinoski *et al.*, 2009).

Abgesehen von dem Yts1-T2SS und dem Ysa-T3SS findet sich in der PZ noch eine weitere Pathogenitätsinsel (*Y. enterocolitica* *adhesion pathogenicity island*; YAPI_{ye}), welche u. a. Gene für einen Typ IV Pilus (T4P) und eine Arsenresistenz kodiert (Thomson *et al.*, 2006). Obwohl wesentlich kleiner, weist YAPI_{ye} große Ähnlichkeiten zu der von *Y. pseudotuberculosis* (YAPI_{ytb}) auf. Darüber hinaus kongruieren sämtliche *Yersinia*-YAPI-Pathogenitätsinseln in Sequenz, Gengehalt und -anordnung mit der Pathogenitätsinsel SPI-7 von *Salmonella typhi* (Collyn *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010).

Lediglich pathogene *Yersinia*-Stämme exprimieren bei 37 °C und unter sauren Bedingungen ein fibrilläres Adhäsion (*mucoide Yersinia fibrillae*; Myf), was den Bakterienkolonien eine mukoide Erscheinung verleiht und die Bindung sowohl an zellulären als auch intestinalen Mukus zu unterstützen scheint (Iriarte *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1996). Myf-Fibrillen weisen eine große Ähnlichkeit gegenüber den CS3-Fibrillen in enterotoxischen *E. coli* (ETEC) auf und sind abgesehen davon dem Protein PsaA, der Hauptuntereinheit des pH6-Antigens in *Y. pestis*, zu 44 % homolog (Ben-Efraim *et al.*, 1961; Lindler & Tall, 1993; Iriarte & Cornelis, 1995)

Generell tragen alle hoch pathogenen „Neue Welt“-Stämme eine Pathogenitätsinsel (*high pathogenicity island*; HPI). Das 45 kb große, chromosomale Fragment kodiert u. a. Proteine, die in der Biosynthese, der Regulation und dem Transport zweier unabhängiger Siderophore involviert sind (Heesemann, 1987; Carniel *et al.*, 1996; Gehring *et al.*, 1998; Rakin *et al.*, 1999). Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit von Eisen chelatieren Siderophore proteingebundene Eisenmoleküle und transportieren diese in die Zelle (Finkelstein *et al.*, 1983; Stojiljkovic & Hantke, 1992).

Neben diesen Virulenzfaktoren sekretiert *Y. enterocolitica* darüber hinaus das chromosomal kodierte, hitzestabile Enterotoxin Yst (*Yersinia stable toxin*), das eine starke Ähnlichkeit zu dem hitzestabilen Toxin STI von *E. coli* aufweist. Ob und welche Rolle Yst im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen spielt, wird bis heute allerdings kontrovers diskutiert (Delor *et al.*, 1990; Delor & Cornelis, 1992; Tennant *et al.*, 2003; Fàbrega & Vila, 2012).

2.1.4.1 Identifikation neuer Virulenzfaktoren – *host responsive elements*

Die Entdeckung immer neuer Virulenzfaktoren in *Y. enterocolitica* ermöglicht ein immer tieferes Verständnis in die Pathogenese sowie Interaktion zwischen Pathogen und Wirt und bietet außerdem alternative Ziele für neuartige Vakzine und Medikamente. Neben postgenomischen Ansätzen – einschließlich genomischen, transkriptomischen und proteomischen Analysen – wurden vor allem durch funktionelle *Screening*-Methoden wie beispielsweise STM (*signature-tagged mutagenesis*) oder IVET (*in vivo expression technology*) neue Gene identifiziert, die an der Pathogenität von Bakterien beteiligt sind (Darwin & Miller, 1999; Young & Miller, 1997; Wu *et al.*, 2008).

Während STM auf der negativen Selektion simultan identifizierter Virulenzgene beruht, gründet IVET auf einer positiven Selektion im Wirtsorganismus. Hierzu werden Promotoren zufällig vor promotorlose Selektionsmarker, wie z. B. Antibiotikaresistenzen, kloniert und die Fusionen über homologe Rekombination in das Chromosom des Pathogens integriert. Der Wirt wird mit den Erregern infiziert und nur die Bakterien, welche einen *in vivo*-aktiven Promotor vor dem Selektionsmarker tragen, können anschließend aus dem Wirt isoliert werden (Hensel *et al.*, 1995; Chiang *et al.*, 1999). Mit Hilfe von IVET-Analysen wurden so über 100 *ivi*-Gene (*in vivo induced genes*) in *Salmonella typhimurium* identifiziert, welche spezifisch während einer Infektion exprimiert werden (Mahan *et al.*, 1993, 1995, 2000).

Im Gegensatz zu dem gut untersuchten Virulenzplasmid pYV in *Y. enterocolitica* ist über chromosomal kodierte Virulenzfaktoren relativ wenig bekannt. 1997 führten Young und Miller IVET-Analysen in einem *Y. enterocolitica*-Mausmodell durch und identifizierten 45 so genannte *hre*-Loci (*host responsive elements*), die nach oraler Inokulation während der frühen Infektionsphase innerhalb der Peyer'schen Plaques, jedoch nicht unter Standardlaborbedingungen, exprimiert werden (Young & Miller, 1997).

Nachfolgende Untersuchungen anhand von Sequenzanalysen und verschiedener Mutanten im Mausmodell identifizierten u. a. den alternativen Sigma-Faktor RpoE sowie RscR (*hre-20*), ein LysR-ähnlicher Transkriptionsregulator, welcher in der systemischen Dissemination von

Y. enterocolitica involviert ist (Nelson *et al.*, 2001; Heusipp *et al.*, 2003). *HreP* (*hre-22*), ein weiteres *host responsive element*, zeigt die höchste Aminosäurenidentität zu der Ca^{2+} -abhängigen Protease PrcA des Cyanobakteriums *Anabaena variabilis* (Baier *et al.*, 1996). Zusätzlich lassen sich ebenfalls Homologien zu Proteinen aus der Familie der eukaryotischen Subtilisin-/Kexin-ähnlichen Proteasen finden (Young & Miller, 1997; Heusipp *et al.*, 2001).

HreP-Mutanten besitzen eine 33-fach höhere LD_{50} und eine verminderte Überlebensrate sowohl in den PP als auch in den mesenterialen Lymphknoten. Aufgrund der deutlich verminderten Virulenz wird vermutet, dass *HreP* an der Zerstörung von Wirtsproteinen beteiligt sein kann (Young & Miller, 1997). Während in *Y. enterocolitica* *hreP* in einem Cluster von Flagellen- und Chemotaxisgenen lokalisiert ist, fehlt das Gen in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* gänzlich. Hinsichtlich der abweichenden Organisation der flankierenden Gene in anderen *Enterobacteriaceae* und aufgrund des niedrigen GC%-Gehalts im Vergleich zum Genom wird der Erwerb von *hreP* via horizontalen Gentransfer nicht ausgeschlossen. Bisher sind keine Laborbedingungen bekannt, unter denen es zu einer Expression von *hreP* in *Y. enterocolitica* kommt. Dies deutet auf eine strenge Kontrolle der *hreP*-Expression hin und bestätigt *hreP* als virulenzassoziiertes Gen, welches nur während einer Infektion im Wirt exprimiert wird (Heusipp *et al.*, 2001).

2.2 Negative Regulation des Pyp-Netzwerkes durch den universellen Regulator H-NS

2.2.1 Das regulatorische Pyp-Netzwerk

Basierend auf den Ergebnissen von Young und Miller konnten Heusipp *et al.* dem *host responsive element* *HreP* (*hre-20*) eine Homologie zu Proteinen aus der Familie der eukaryotischen Subtilisin-/Kexin-ähnlichen Proteasen nachweisen. Mit Hilfe eines genetischen *Screens*, welcher die Identifizierung sowohl negativer als auch positiver Regulatoren erlaubt, konnten drei

vermeintliche *hreP*-Regulatoren (*protein regulating expression of Yersinia hreP*; PypA, B, C) in *Y. enterocolitica* detektiert werden.

PypA (YE2786) besitzt weder signifikante Homologien zu bekannten Proteinen noch konnte dem Protein ein funktionelles Motiv nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass PypA mit 6 oder 8 Transmembrandomänen in der inneren Membran lokalisiert ist, wobei die C- und N-Termini jeweils im Zytoplasma vorliegen. Während sich stromaufwärts des *pypA*-Lokus Gene für einen mutmaßlichen ABC-Transporter befinden, konnten stromabwärts Gene für eine Methyl-tRNA-Synthetase ermittelt werden; eine gemeinsame Operonstruktur scheint allerdings unwahrscheinlich (Wagner *et al.*, 2009).

Das durch die Transposonmutagenese identifizierte Protein PypB (YE3632) konnte unlängst als Regulator des Tad-Operons, das für ein Typ IVb Pili kodiert, in *Y. enterocolitica* charakterisiert werden (Schilling *et al.*, 2010). PypB zeigt im Aufbau Ähnlichkeiten zu ToxR von *Vibrio cholerae* und CadC von *E. coli*. Aufgrund der Topologie werden sowohl ToxR als auch CadC zu der so genannten Familie der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren gezählt. Charakteristisch für Proteine dieser Familie ist die Transmembrandomäne, deren Carboxy-Terminus in das Periplasma ragt und vermutlich eine Rolle in der Wahrnehmung und Weiterleitung von extern induzierten Signalen spielt. Des Weiteren weist der zytoplasmatische Amino-Terminus von PypB Homologien zu den OmpR-ähnlichen wHTH (*winged-helix-turn-helix*) DNA-Bindedomänen auf (Miller *et al.*, 1987; Kato *et al.*, 1989; Martínez-Hackert & Stock, 1997; Wagner *et al.*, 2009). Die Mitglieder der ToxR-ähnlichen Regulatoren zeichnen sich durch einen gemeinsamen modularen Aufbau konservierter Bereiche aus. Neben der DNA-bindenden N-terminalen Domäne mit wHTH-Motiv, einer einzelnen Transmembrandomäne und einer C-terminalen, periplasmatischen Signaleingangsdomäne manifestieren sie sich zudem durch den Signal-Übertragungsweg. Dieser wird, anders als bei anderen Regulatorsystemen, ohne chemische Modifikationen vermittelt. Basierend auf dieser Tatsache werden ToxR-ähnliche Regulatoren oftmals als Ein-Komponenten-Systeme betrachtet, welche sowohl die sensorische Signaltransduktion als auch eine Effektorfunktion

innerhalb eines Polypeptids repräsentieren (Miller *et al.*, 1987; Ulrich *et al.*, 2005; Haneburger *et al.*, 2011).

Das dritte Protein, PypC (YE3351), welches neben PypA und PypB als *hreP*-Regulator ermittelt wurde, weist mit seinem wHTH-Motiv an der C-terminalen DNA-Bindedomäne ebenfalls eine Homologie zu ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren auf. Aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne wird allerdings von einer Lokalisation im Zytoplasma ausgegangen (Wagner *et al.*, 2009). Direkt stromaufwärts des PypC kodierenden Gens findet sich der Gencluster des Yts2-T2SS, dessen Regulation durch PypC jüngst durch Shutinoski *et al.* beschrieben wurde (Shutinoski *et al.*, 2009).

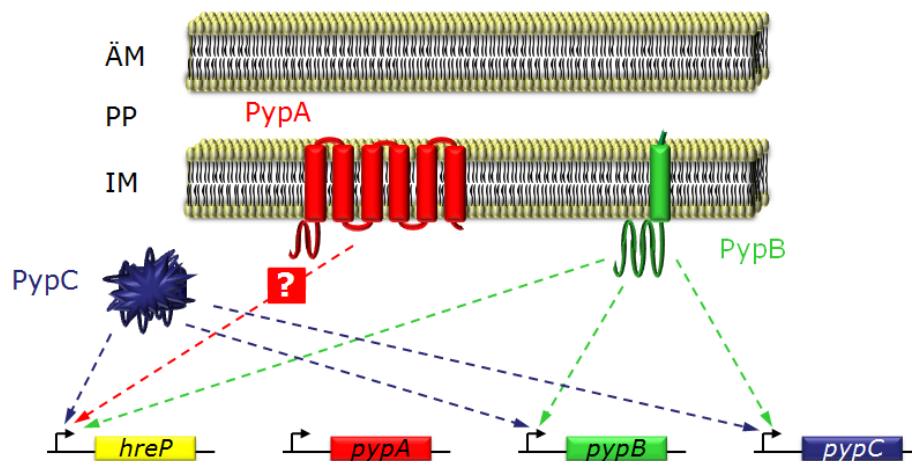


Abbildung 2.3: Schematische Übersicht über die Regulationswege des Pyp-Netzwerkes.

Neben der Aktivierung der *hreP*-Transkription durch PypA, PypB und PypC wird die Expression von PypB und PypC sowohl auto- als auch durch das jeweils andere Pyp-Protein reguliert. Die Pfeilspitzen geben die stromaufwärts gelegenen Promotorregionen von *hreP* und den jeweiligen *pyp*-Genen an. Das Fragezeichen deutet auf einen bisher unbekanntem Mechanismus, durch den die Transkription von *hreP* durch PypA initiiert wird. Gestrichelte Linien weisen auf eine Aktivierung der Transkription (modifiziert nach Karin Wagner).

Obwohl die so genannten Pyps nicht in einem gemeinsamen Operon lokalisiert sind, wurde eine Art Regulationskaskade im Zusammenhang mit der Aktivierung der *hreP*-Expression beobachtet. So konnte nachgewiesen werden, dass sich PypB und PypC in ihrer Expression sowohl gegenseitig als auch autoregulieren. Im Gegensatz zu den beiden Pyp-Proteinen, die direkt an die Promotorregion von *hreP* binden können, besitzt PypA keine offensichtliche DNA-Bindedomäne. Expressionsanalysen zeigen allerdings, dass die *hreP*-

Transkription durch jedes der drei Pyp-Proteine unabhängig aktiviert werden kann (Abb. 2.3); ein Fakt, der *Y. enterocolitica* erlaubt eine Reihe von unterschiedlichsten Signalen zur Aktivierung der *hreP*-Transkription zu nutzen. (Wagner *et al.*, 2009).

2.2.2 H-NS – ein universeller Regulator

Adaption an sich verändernde Umgebungen, aber auch das Wechseln in spezifische Nischen gehen oftmals sowohl mit dem Erwerb xenogenetischer DNA als auch mit dem Verlust oder der Inaktivierung von genetischem Ballast einher (Thomas & Nielsen, 2005; Navarre *et al.*, 2007; Altermann, 2012). In diversen Bakterien konnte bis heute der Erwerb großer DNA-Fragmente via horizontalen Gentransfer (HGT) nachgewiesen werden. Insbesondere während der bakteriellen Evolution und Pathogenese, aber auch zur verbesserten Kolonisierung und Fitness spielt HGT eine große Rolle. Langzeitadaption impliziert zudem Veränderungen des Phänotyps, ausgelöst durch willkürliche Mutationen im Laufe der Evolution (Dobrindt *et al.*, 2004; Brzuszkiewicz *et al.*, 2009; Lesic *et al.*, 2012). Die Eingliederung von Fremd-DNA in das bakterielle Genom birgt jedoch auch Risiken, welche potentielle Störungen in der Regulation des Kerngenoms oder den Verlust der Fitness bewirken können (Dorman, 2004, 2009). In vielen Gram-negativen Bakterien spielt daher die negative Regulation horizontal erworbener Gene durch H-NS (*histone-like nucleoid structuring protein*) eine große Rolle. Es wird vermutet, dass die Unterscheidung zwischen fremder und eigener DNA auf dem Gehalt von Guanosin und Cytosin beruht (Zamenhof *et al.*, 1952; Navarre *et al.*, 2006). So bindet H-NS mit Hilfe eines spezifischen AT-Haken-Motivs vorzugsweise in der kleinen Furche intrinsisch gekrümmter, AT-reicher DNA-Regionen (Aravind & Landsman, 1998; Navarre *et al.*, 2007; Gordon *et al.*, 2011). Durch die Ausbildung eines Nukleoproteinkomplexes infolge der Oligomerisierung von H-NS kann dementsprechend die Bindung oder Aktivität der RNA-Polymerase unterbunden werden (Atlung & Ingmer, 1997; McLeod & Johnson, 2001; Stoebel *et al.*, 2008).

Aufgrund der Topologie wird H-NS neben Fis, HU und einigen anderen zu der Familie der Nukleoid-assoziierten Proteine gezählt. H-NS ist ein kleines Protein von ungefähr 15 kDa, das mit bis zu 20.000 Kopien in jeder Zelle vertreten ist (Dorman *et al.*, 1999; Tendeng & Bertin, 2003). Es ist zusammengesetzt aus einer N-terminalen (Reste 1-64) und einer flexiblen, sekundären Dimerisierungsdomäne (Reste 64-80) sowie aus einer C-terminalen DNA-Bindedomäne (Reste 80-137) (Arold *et al.*, 2010).

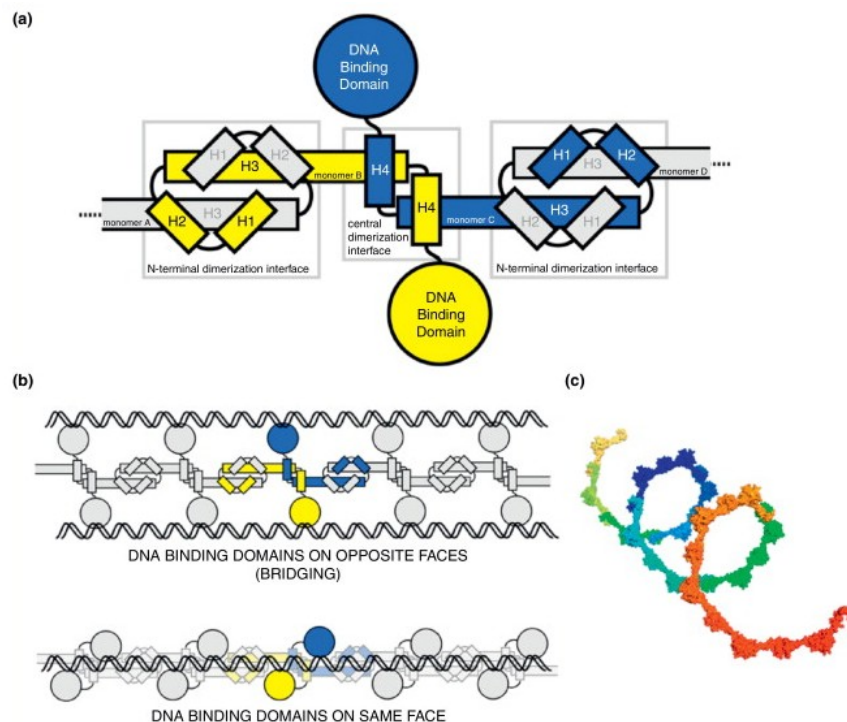


Abbildung 2.4: Oligomerisierung von H-NS innerhalb der beiden Dimerisierungsdomänen.

A) Schematische Darstellung multimerisierter H-NS-Monomere via *head-to-head/tail-to-tail*-Mechanismus. Helices H1, H2 und H3 bilden die N-terminale Dimerisierungsdomäne. Die zentrale Dimerisierungsdomäne wird durch ein HTH-Motiv zwischen H4 und H3 repräsentiert.

B) H-NS-DNA-Bindung: *bridging* und *stiffening*. Die Quervernetzung (*bridging*) benachbarter DNA-Stränge wird durch gegenüberliegende DNA-Bindedomänen innerhalb helikaler Strukturen vermittelt. Das „Versteifen“ (*stiffening*) der DNA-Bindedomänen erfolgt durch Anlagerung entlang eines DNA-Stranges.

C) 3D-Darstellung eines helikalen Filaments von 16 H-NS-Dimeren durch Arold *et al.* (Ali *et al.*, 2012).

Während H-NS bei niedrigen Konzentrationen vorwiegend als Dimer in der Zelle vorliegt, bildet es bei ansteigenden Konzentrationen multimere Komplexe aus (Falconi *et al.*, 1988). Basierend auf dieser komplexen Struktur konnten bisher zwei Formen der (DNA-)H-NS-DNA-Interaktion (*bridging* und *stiffening*) beobachtet werden (Abb. 2.4), deren genaue Regulation allerdings

noch geklärt werden muss. Das *bridging* beschreibt eine Quervernetzung benachbarter DNA-Stränge, die vorwiegend bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen beobachtet wird. Durch das Anlagern von multimeren H-NS-Komplexen können Schleifen und Knicke im DNA-Strang ausgebildet werden, welche eine Verdrillung (*supercoil*) der DNA und so z. B. die Bindung der RNA-Polymerase verhindern. Im Gegensatz dazu bewirken physiologische Mg^{2+} -Konzentrationen ein Anlagern von H-NS entlang eines DNA-Stranges und somit ein Versteifen (*stiffening*) der betroffenen DNA-Region (Tupper *et al.*, 1994; Dame *et al.*, 2005, 2006; Stoebel *et al.*, 2008; Arold *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010).

Die N-terminale Dimerisierungsdomäne von H-NS erlaubt neben der Interaktion mit weiteren H-NS-Kopien zudem solche mit heterologen Proteinen, die ebenfalls solch eine Domäne aufweisen (Madrid *et al.*, 2002). YmoA (*Yersinia modulator A*) gehört zu der Familie der Hha-YmoA-Regulatoren und stellt einen Schlüsselfaktor in der Regulation diverser Virulenzgene in Abhängigkeit von ökologischen Bedingungen, wie Temperatur und Osmolarität, dar. Gemeinsam mit H-NS konnte es bei 37 °C der negativen Regulation von *inv* (Invasin) zugeschrieben werden, einem wichtigen Virulenzfaktor in *Y. enterocolitica* (Cornells *et al.*, 1991; Pepe & Miller, 1993; Mikulskis & Cornelis, 1994; Ellison *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass die Bindung von H-NS an die Promotorregion von *inv* durch die Interaktion mit YmoA weiter stabilisiert wird (Ellison & Miller, 2006). Neben den beiden Repressoren konnte ferner bei 26 °C RovA (*regulator of virulence A*) als Aktivator der *inv*-Expression ermittelt werden. Das Protein gehört zu der Familie der MarR/SlyA-Regulatoren und wirkt bei vielen H-NS-regulierten Genen als Antagonist (Ellison & Miller, 2006; Cathelyn *et al.*, 2007). Untersuchungen ergaben, dass sich die Bindestellen von RovA und H-NS innerhalb der Promotorregionen oftmals überlappen und die regulatorischen Proteine somit um ein Anlagern an diesen Bereich konkurrieren müssen. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch unbekannt (Heroven *et al.*, 2004; Ellison & Miller, 2006; Heroven *et al.*, 2007).

2.2.3 Einfluss von H-NS auf das regulatorische *pyp*-Netzwerk

Vergleichende Genomanalysen zeigen, dass *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* neben speziessübergreifenden auch eine große Anzahl von speziesspezifischen Genen besitzen (Wren, 2003). Untersuchungen auf Genom- und Virulenzebene weisen darüber hinaus auf eine hohe Diversität innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* hin. So existieren verschiedene pathogene und apathogene Isolate, die sich durch den Austausch genomischer DNA, aber auch durch die Adaption an heterogene Lebensräume voneinander differenzieren (Howard *et al.*, 2006). Dies spiegelt sich auch in der genomischen Sequenz von *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 wieder, dessen Genom Regionen mit hoher Flexibilität und horizontalem Gentransfer aufweist (Thomson *et al.*, 2006).

Das ausschließlich *in vivo* exprimierte Gen *hreP* ist spezifisch für *Y. enterocolitica* und wurde bisher in keiner anderen Spezies von *Yersinia* detektiert. Angesichts seiner genomischen Lokalisation und dem niedrigen GC%-Gehalt (43 %GC) im Verhältnis zum Genom (47 %GC) wird von einem Erwerb via HGT ausgegangen (Young & Miller, 1997; Heusipp *et al.*, 2001; Thomson *et al.*, 2006). Darüber hinaus weisen die Gene *pypA*, *pypB* und *pypC* (*pypA*: 34 %GC, *pypB*: 41,5 %GC, *pypC*: 30 %GC), welche für die positiven Regulatoren *hrePs* kodieren, ebenfalls einen erhöhten AT%-Gehalt auf (Wagner *et al.*, 2009).

Sowohl der niedrige GC%-Gehalt von *hreP* als auch der von den *pyp*-Genen lassen eine negative Regulation von H-NS vermuten. Anhand von Enzymaktivitätsmessungen konnte bereits in *E. coli* ein negativer Effekt von H-NS auf die Expression von *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC* beobachtet werden (Daten bisher nicht veröffentlicht). Cathelyn *et al.* berichteten überdies von einer positiven Regulation sowie der Aktivierung von H-NS-reprimierten Genen durch den H-NS-Antagonisten RovA (Cathelyn *et al.*, 2007). Untersuchungen in unserer Gruppe lassen einen positiven Effekt von RovA auf die Expression von *pypC* und einen sehr schwachen auf die Expression von *pypB* erkennen, allerdings nicht auf die von *hreP* oder *pypA* (Daten bisher nicht veröffentlicht).

2.3 Pili – haarähnliche Fortsätze pathogener Bakterien

Ein kritischer Punkt im Anfangsstadium einer jeden Infektion ist das Adhärenieren der pathogenen Bakterien an spezifische Wirtszellen. Dieser Prozess ist für eine erfolgreiche Kolonisierung unumgänglich und wird meist durch oberflächliche Adhäsine vermittelt. Aufgrund der negativen Ladungen, welche sowohl von der Bakterien- als auch von der Wirtszelle ausgehen, verwenden die Pathogene häufig so genannte Pili oder Fimbrien, um an die Wirtsmembran anzuheften. Diese haarähnlichen Fortsätze der bakteriellen Zelloberfläche tragen oftmals Adhäsine an ihrer Spitze und können so die Bindung an die Wirtszelle vermitteln (Proft & Baker, 2009).

Pili werden aufgrund ihrer Biosynthese und Morphologie in verschiedene Klassen unterteilt. In Gram-positiven Bakterien konnten bislang lediglich zwei verschiedene Typen von Pili identifiziert werden. Während sie sich in pathogenen *Streptococcus* spp. durch kurze, dünne Fimbrien von einer Länge zwischen 0,07 und 0,5 μm auszeichnen, konnten in *Corynebacterium diphtheriae* lange, flexible pilusähnliche Strukturen von bis zu 3 μm nachgewiesen werden (Handley & Jacob, 1981; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu weisen Gram-negative Bakterien eine Vielzahl unterschiedlicher Pili auf, welche in vier Gruppen eingeteilt werden: Chaperone-Usher-Pili, zu denen u. a. Typ 1- und P-Pili zählen, CS1-, Curli- und Typ IV Pili (Proft & Baker, 2009). Typ 1- und P-Pili finden sich vorwiegend in uropathogenen *E. coli* (UPEC). Zusammengesetzt über den Chaperon-Usher-Signalweg, der u. a. den Transport mittels Chaperonen über das kanalformende Protein *Usher* an die äußere Membran vermittelt, binden sie spezifisch an mannosehaltige Glykoproteinrezeptoren bzw. Glykolipide eukaryotischer Zellen (Kuehn *et al.*, 1992; Connell *et al.*, 1996; Sauer *et al.*, 2000). CS1-Fimbrien werden als Pili-Prototypen enterotoxischer *E. coli* (ETEC) betrachtet. Sie bestehen aus lediglich vier Untereinheiten, die über einen alternativen Chaperon-Usher-Signalweg zusammengesetzt werden, und scheinen vorwiegend am Hämagglutinin der Wirtszelle zu adhärenieren (Bühler *et al.*, 1991; Sakellaris & Scott, 1998). Eine Reihe biologischer Prozesse einschließlich Biofilmbildung, Wirtszelladhäsion und -invasion werden in Verbindung mit Curli-Pili gebracht.

Beschrieben in einigen *E. coli* und *Salmonella* Spezies binden sie an diverse Proteine eukaryotischer Wirtszellen, so auch an die extrazellulären Matrixproteine Fibronectin und Laminin (Olsén *et al.*, 1989; Austin *et al.*, 1998; Gophna *et al.*, 2001).

2.3.1 Typ IV Pili

Typ IV Pili (T4P) sind charakterisiert als 1–4 µm lange, flexible Filamente mit einem Durchmesser zwischen 5 und 8 nm. Sie stellen die weitest verbreitete Form von Pili dar, deren Funktionen von Adhäsion an Wirtszellen, über DNA-Aufnahme, Biofilm- und Mikrokoloniebildung bis zur Flagellen-abhängigen Bewegung mittels *twitching motility* reichen (Mattick, 2002; Craig *et al.*, 2004; Schilling *et al.*, 2010). Analysen in *Geobacter sulfurreducens* zeichnen T4P zudem als mikrobielle Nanokabel zum Transfer extrazellulärer Elektronen aus (Reguera *et al.*, 2005).

T4P sind zusammengesetzt aus tausenden von Pilinuntereinheiten, welche in Sequenz und Länge von Spezies zu Spezies variieren, jedoch stets über eine konservierte, N-terminale Signalsequenz verfügen (Pugsley, 1993b). Piline werden als Präpiline synthetisiert und durch eine Präpilinpeptidase an einem endständigen Glycinrest (Gly₋₁) der hydrophilen Signalsequenz proteolytisch gespalten. Darüber hinaus verfügen die prozessierten Piline über einen konservierten Glutamatrest (Glu₅), der während der Assemblierung essentiell für die Pilin-Pilin-Interaktion zu sein scheint (Nunn & Lory, 1991; Fronzes *et al.*, 2008). Basierend auf der Länge des N-terminalen Signalpeptids und des reifen Pilins werden T4P in zwei Klassen unterteilt. Während Typ IVa Präpiline eine kurze Signalsequenz von weniger als 10 Aminosäuren besitzen, zeichnen sich die Strukturproteine der Typ IVb Pili durch längere Leitpeptide (10–15 As) und entweder lange (180–200 As) oder sehr kurze (40–50 As) reife Piline aus (Kachlany *et al.*, 2001b; Pelicic, 2008). Weiterhin weisen prozessierte Typ IVa Piline stets einen Phenylalaninrest an erster Position auf. Reife Typ IVb Piline lassen hingegen keinen charakteristischen Aminosäurerest erkennen.

Die Gene für die Typ IVa Pili-Biosynthese sind größtenteils über das Genom verteilt. Vergleichende Analysen ergaben zudem eine weit größere Verbreitung der Typ IVa Pili innerhalb Gram-negativer Bakterien. Dies schließt neben humanpathogenen *Neisseria* spp. und *Pseudomonas aeruginosa* überdies Pilz-, Pflanzen- und diverse Säugetierpathogene mit ein. Im Gegensatz dazu sind die Gene der Typ IVb Pili grundsätzlich in einem Operon organisiert und wurden zumeist in Enterobakterien wie *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi und *Vibrio cholerae* identifiziert (Li *et al.*, 2012).

Obwohl Typ IVa Piline im Vergleich hoch konservierte Aminosäuresequenzen und nur eine geringe Sequenzhomologie zu den Typ IVb Pilinen aufweisen, haben doch beide Klassen eine zentrale Bedeutung für die Pathogenität vieler Bakterien gemein. So geht eine Störung in der T4P-Biosynthese stets mit einer reduzierten Virulenz einher (Bieber *et al.*, 1998).

2.3.2 Der Tad-Lokus – Regulation und Vorkommen

Der sowohl in Gram-negativen und -positiven Bakterien als auch in *Archaea* weit verbreitete Tad-Lokus (*tight adherence*) kodiert für eine neuartige Form von Typ IVb Pili, die Flp-Pili (Tomich *et al.*, 2007). Sie vermitteln unspezifische Bindungen an feste Oberflächen, Mikrokolonie- sowie hartnäckige Biofilmbildung und stellen einen wichtigen Faktor in der Kolonisierung und Persistenz von Pathogenen dar (Planet *et al.*, 2003; Schreiner *et al.*, 2003). Aufgrund der weiten Verbreitung, welche insbesondere auf horizontalen Gentransfer sowie auf Genrekombinationen, -duplikationen und -verluste zurückzuführen ist, wird dieser Lokus auch *widespread colonization island* genannt. Diese genomische Insel ist am besten in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* untersucht, dem Erreger hoch aggressiver lokalisierter juveniler Peridontitis (Kachlany *et al.*, 2001a; Planet *et al.*, 2003).

Die Gene des Tad-Lokus liegen stets in einem Operon organisiert vor, die Kopienzahl kann je Organismus von einem bis mehrere variieren. Der Tad-

Lokus in *A. actinomycetemcomitans* erstreckt sich über 14 Gene, wovon 12 für die Pili-Biosynthese essentiell sind (Kachlany *et al.*, 2001b).

Die Hauptkomponente der Flp-Pili stellt das Strukturprotein Flp (*fimbrial low-molecular-weight protein*) dar. Es wird in *A. actinomycetemcomitans* durch die Gene *flp-1* und *flp-2* kodiert, wobei bisher nur *flp-1* eine Funktionalität zugeschrieben werden konnte. Die Basis des Flp-Pilus ist in der inneren Membran durch die Proteine TadB, TadC und TadG verankert (Abb. 2.5). TadB und TadC stellen zudem die durch die ATPase TadA gewonnene Energie für die Assemblierung der einzelnen Pili-Komponenten bereit, während TadZ für die polare Lokalisation des gesamten Tad-Sekretionsapparats erforderlich ist (Inoue *et al.*, 1998; Tomich *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012; Perez-Cheeks *et al.*, 2012). Darüber hinaus sind die Tad-Komponenten RcpA, RcpB, RcpC (*rough colony protein A, B, C*) und TadD in der äußeren Membran lokalisiert. Während RcpA der Sekretin-Superfamilie zugeordnet wird, welche Pilus-abhängige Poren in der äußeren Membran ausbildet, sind die Funktionen der anderen drei Komponenten noch weitestgehend unbekannt. Aufgrund der Homologie von TadD zu Pilotinen der T2SS und T4P wird diesem eine ähnliche Funktion wie RcpA zugeschrieben. Eine Bedeutung von RcpC in der Flp-Pili-Biosynthese vermutet man zudem in der Extrusion des Pilus durch die äußere Membran (Haase *et al.*, 1999; Iyer & Aravind, 2004; Bayan *et al.*, 2006; Tomich *et al.*, 2007).

Aufgrund der Pilin-ähnlichen Struktur werden TadE und TadF auch als Pseudopiline bezeichnet. Sie gleichen denen der T2SS und formen eine Art oligomeres Stützgerüst, welches sich durch das Periplasma erstreckt und eine Verbindung zwischen dem Sekretinkomplex und der inneren Membran vermittelt (Hobbs & Mattick, 1993; Bleves *et al.*, 1998). Die Pseudopiline sind zu 38 % homolog und besitzen neben einer N-terminalen Signalsequenz auch eine hochkonservierte Konsensussequenz (G/(X)₄EF), die eine starke Ähnlichkeit zu denen von Flp-1 (G/(X)₄EY) sowie T4P und T2SS erkennen lässt (Dubnau, 1997; Kachlany *et al.*, 2001a; Filloux, 2004; Tomich *et al.*, 2006). Sowohl TadE und TadF als auch Flp werden als Vorläuferproteine synthetisiert und in der inneren Membran durch eine spezifische Präpilinpeptidase proteolytisch

gespalten. Hierbei ist die Topologie der Vorläuferproteine mit einer N-terminalen Signalsequenz, einer hydrophoben sowie einer C-terminalen β -faltblattreichen Domäne von großer Bedeutung (Strom & Lory, 1987; Tomich *et al.*, 2006). Die Präpilinpeptidase TadV besitzt ähnlich wie die in T2S- und T4P-Systemen zwei hoch konservierte Aspartatreste, deren Substitution einen Funktionsverlust des Enzyms bewirkt. Aufgrund einer fehlenden N-terminalen Methyltransferase wird TadV in eine neue Unterklasse von Nicht-methylierenden Aspartat-Präpilinpeptidasen eingeteilt (Tomich *et al.*, 2006).

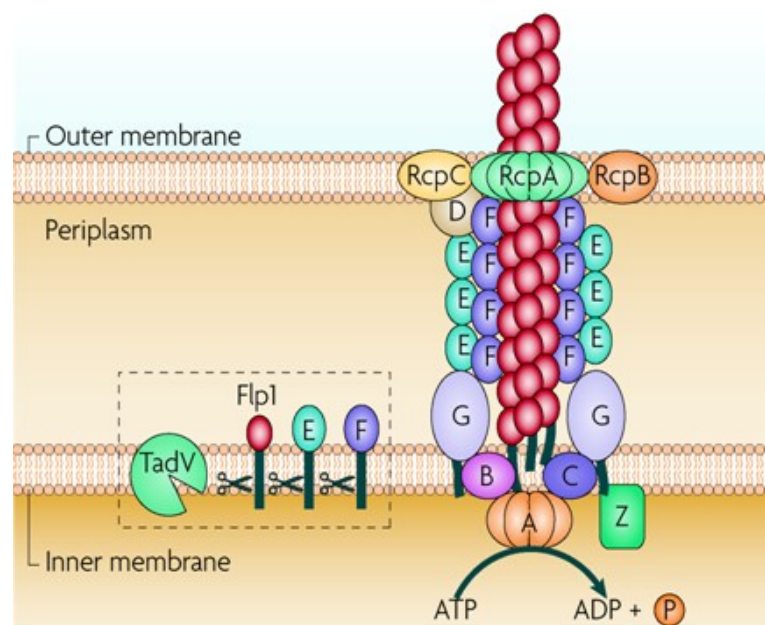


Abbildung 2.5: Hypothetische Darstellung der Flp-Pilus Biogenese in *A. actinomycetemcomitans*.

Dieses Modell basiert auf den Homologien der Tad-Proteine (*t*ight *a*dherence) anderer bakterieller und archaealer Systeme. Die Tad-Proteine sind mit dem vierten Buchstaben ihrer Bezeichnung gekennzeichnet. Flp1 (*f*imbrial *l*ow-*m*olecular-*w*eight *p*rotein): Strukturprotein; A: ATPase TadA; B/C: innere Membranproteine TadB/TadC; D: Sekretinkomplex TadD; E/F: Pseudopiline TadE/TadF; G: Pili-Membrananker TadG; TadV: Nicht-methylierende Aspartat-Präpilinpeptidase; Z: Positions-determinierendes Protein TadZ; RcpA/RcpB/RcpC (*r*ough *c*olony *p*rotein A, B, C): Sekretinkomplex (Tomich *et al.*, 2007).

In *Y. enterocolitica* konnte unlängst, neben einem vollständigen Tad-Lokus, PypB als transkriptioneller Regulator des Tad-Operons identifiziert werden. EMSA-Analysen (*e*lectrophoretic *m*obility *s*hift *a*ssay) ergaben, dass eine direkte Bindung stromaufwärts der Promotorregionen von *pypB* sowie *flp* die Transkription induzieren. Es konnte jedoch kein ausgeprägter Tad-assoziiierter Phänotyp beobachtet werden. Vergleichende Analysen zeigten darüber hinaus

ein ungewöhnlich kurzes Flp-Pilin, dessen Konsensussequenz durch das Fehlen eines Valins um eine Stelle verkürzt ist (G/(X)₃EY). Inwieweit diese Veränderungen die Funktionalität des Flp-Pilus beeinflussen, muss allerdings noch geklärt werden (Schilling *et al.*, 2010).

2.4 Zielsetzung

Humanpathogene *Yersinia enterocolitica* zählen neben *Salmonella* und *Campylobacter* zu den dritthäufigsten Enteritiserregern innerhalb Deutschlands. Ausgehend von einer Vielzahl von Virulenzfaktoren ermöglichen diese die Adhärenz und Invasion des Wirtsorganismus sowie das dortige Überleben. Im Mausmodell konnten mit IVET die *hre*-Gene (*host responsive elements*) identifiziert werden, deren Expression insbesondere in der frühen Infektionsphase innerhalb der PP erfolgt, jedoch nicht unter Laborbedingungen. Dies lässt auf eine strikte Regulation der *hre*-Gene schließen.

Eines dieser Gene kodiert für die Protease HreP. Vorangegangene Untersuchungen konnten drei positive *hreP*-Regulatoren identifizieren: PypA, PypB und PypC (*protein regulating expression of Yersinia hreP*). Obwohl alle drei Pyp-Proteine eine unabhängige Aktivierung der *hreP*-Transkription zeigten, konnte untereinander eine Art Regulationskaskade nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen identifizierten zudem PypB und PypC als Transkriptionsregulatoren stromaufwärts gelegener Gencluster. Angesichts der genomischen Lokalisation von *hreP* und dem niedrigen GC%-Gehalt im Verhältnis zum Genom sowohl bei *hreP* als auch bei *pypA*, *pypB* und *pypC* wird von einem Erwerb via HGT (horizontaler Gentransfer) ausgegangen.

Begründet auf dem niedrigen GC%-Gehalt sollte in dieser Arbeit die negative Regulation des regulatorischen Pyp-Systems durch den universellen Regulator H-NS untersucht werden. Der Schwerpunkt lag hierbei in der Identifizierung von H-NS als regulatorischer Komponente des Pyp-Systems. Weiterhin sollte geklärt werden, in welcher Form eine Interaktion zwischen H-NS und *hreP* sowie den einzelnen *pyp*-Genen zustande kommt und ob weitere Faktoren für die Regulation durch H-NS von Bedeutung sind.

In silico-Analysen konnten unlängst eine Assoziation des Tad-Lokus mit *pypB* nachweisen. Der sowohl in Gram-negativen und -positiven Bakterien als auch in *Archaea* weit verbreitete Tad-Lokus (*tight adherence*) kodiert für eine neuartige Form von Typ IVb Pili, die Flp-Pili. Sie vermitteln unspezifische Bindungen an feste Oberflächen, Mikrokolonie- sowie hartnäckige Biofilmbildung und stellen einen wichtigen Faktor in der Kolonisierung und Persistenz von Pathogenen dar. Frühere Untersuchungen konnten bereits PypB als positiven Regulator dieser genomischen Insel identifizieren. Darüber hinaus konnte eine posttranslationelle Modifikation des Pilinproteins Flp in *Y. enterocolitica* detektiert werden, deren Charakterisierung einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildete. Hierbei galt zu klären, ob die proteolytische Spaltung dieses Strukturproteins durch die nicht-methylierende Aspartat-Präpilinpeptidase TadV vermittelt wird und welchen Einfluss die konservierte Konsensussequenz im Bereich der Prozessierungsstelle auf die posttranslationelle Modifikation durch TadV besitzt.

Die nähere Charakterisierung dieser beiden Systeme soll dazu beitragen, einen tieferen Einblick in die komplexen Regulationsmechanismen zweier virulenzasoziiierter Systeme in *Y. enterocolitica* zu erlangen.

3 Material

3.1 Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Yersinia enterocolitica*- und *Escherichia coli*-Stämme sind in den nachfolgenden Tabellen 3.1 und 3.2 aufgeführt und näher charakterisiert.

Tabelle 3.1: Verwendete *Yersinia enterocolitica*-Stämme. Angegeben sind die Stämme und deren Charakteristika und Quellen bzw. Referenzen.

Stamm	Charakteristika	Quelle/Referenz
JB580v	$\Delta yenR$ ($r^- m^+$) Nal^r , Serotyp O:8, Biotyp 1B	(Kinder <i>et al.</i> , 1993)
GHY14	JB580v, $\Delta hreP$	(Young & Miller, 1997)
GHY19	JB580v, $hreP::lacZYA$	(Wagner <i>et al.</i> , 2009)
GHY306	JB580v, $pypA::lacZYA$	(Wagner <i>et al.</i> , 2009)
GHY307	JB580v, $pypB::lacZYA$	(Wagner <i>et al.</i> , 2009)
GHY320	JB580v, $\Delta pypA$	(Wagner <i>et al.</i> , 2009)
GHY329	JB580v, $\Delta pypB$	(Wagner <i>et al.</i> , 2009)
GHY334	JB580v, $pypC::lacZYA$	(Wagner <i>et al.</i> , 2009)
GHY350	JB580v, $\Delta pypC$	(Wagner <i>et al.</i> , 2009)
GHY656	JB580v, $\Delta tadV$	diese Arbeit

Tabelle 3.2: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme. Angegeben sind die Stämme und deren Charakteristika und Quellen bzw. Referenzen.

Stamm	Charakteristika	Quelle/Referenz
DH5 α	F ⁻ ; <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ M _K ⁺), <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , Δ (<i>argF-lac</i>) U169 (ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15)	(Hanahan <i>et al.</i> , 1991)
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , (DE3)	(Studier & Moffatt, 1986)
S17-1 λ <i>pir</i>	Tp ^f ; Sm ^r ; <i>recA</i> ; <i>thi</i> ; <i>hsdR</i> ⁻ M ^r ; RP4::2-Tc::Mu::Km; Tn7 λ <i>pir</i> lysogen	(Miller & Mekalanos, 1988)

3.2 Vektoren und rekombinante Plasmide

Vektoren und rekombinante Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet bzw. generiert wurden, sind in Tabelle 3.3 näher beschrieben.

Tabelle 3.3: Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide. Angegeben sind die spezifischen Charakteristika sowie Quellen bzw. Referenzen.

Vektor/Plasmid	Charakteristika	Quelle/Referenz
pBAD18-Kan	Kan ^r ; <i>P_{BAD}</i> Expressionsvektor	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD-hns Δ	Kan ^r ; Derivat von pBAD18-Kan; <i>h-ns1-270</i> aus <i>Y. enterocolitica</i> mit fehlender DNA-Bindedomäne am 3'-Ende	(Kiefer A., 2009)
pBAD-tadV	Kan ^r ; Derivat von pBAD18-Kan; <i>tadV</i> ; C-terminaler HA-Tag	diese Arbeit
pBAD-tadV _{mut23}	Kan ^r ; Derivat von pBAD18-Kan; <i>tadV</i> ; Substitution von Asp ₂₃ zu Asn ₂₃ ; C-terminaler HA-Tag	diese Arbeit
pBAD-tadV _{mut77}	Kan ^r ; Derivat von pBAD18-Kan; <i>tadV</i> ; Substitution von Asp ₇₇ zu Asn ₇₇ ; C-terminaler HA-Tag	diese Arbeit
pEP185.2	Cam ^r ; <i>mob</i> ⁺ (RP4); R6K <i>ori</i> (Suizidvektor)	(Kinder <i>et al.</i> , 1993)
pEP- Δ tadV	Cam ^r ; Derivat von pEP185.2; flankierende 5'- und 3'- Regionen von <i>tadV</i>	diese Arbeit
pET24b(+)	Kan ^r ; T7-Promotor Expressionsvektor; C-terminaler His ₆ -Tag	Novagen
pET-hns	Kan ^r ; Derivat von pET24b(+); Expression von <i>h-ns</i> aus <i>Y. enterocolitica</i>	(Kiefer A., 2009)
pFUSE	Cam ^r ; <i>mob</i> ⁺ (RP4); R6K <i>ori</i> (Suizidvektor); <i>lacZYA</i>	(Bäumler <i>et al.</i> , 1996)
pMMB207	Cam ^r ; <i>rep</i> ⁺ ; <i>mob</i> ⁺ ; <i>P_{tac}</i> -Promotor	(Morales <i>et al.</i> , 1991)

Vektor/Plasmid	Charakteristika	Quelle/Referenz
pMMB-pypB-flp+ V	Cam ^r ; Derivat von pMMB207; Sequenz von <i>pypB-flp</i> ; Insertion von Val ₂₆ in <i>flp</i>	(Humberg, V., 2010)
pVLT35	pMMB207-Derivat; Sm/Stp ^r ; <i>rep</i> ⁺ ; <i>mob</i> ⁺ ; <i>P_{tac}</i> -Promotor	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993)
pVLT-flp	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i>	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut1}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Gly ₋₁ zu Ala ₋₁ (D1)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut2}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Gly ₋₁ zu Trp ₋₁ (D2)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut3}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Thr ₁ zu Ser ₁ (D3)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut4}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Thr ₁ zu Tyr ₁ (D4)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut5}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Val ₂ zu Ile ₂ (D5)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut6}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Val ₂ zu Arg ₂ (D6)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut7}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Ile ₃ zu Leu ₃ (D7)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut8}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Ile ₃ zu His ₃ (D8)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut9}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Glu ₄ zu Gln ₄ (D9)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut10}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Glu ₄ zu Tyr ₄ (D10)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut11}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Tyr ₅ zu Phe ₅ (D11)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut12}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Tyr ₅ zu Met ₅ (D12)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut13}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Leu ₋₂₂ zu Phe ₋₂₂ (E1)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut14}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Glu ₄ zu Val ₄ ; Substitution von Tyr ₅ zu Met ₅ (E2)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut15}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Insertion eines Cytosins an Position 6/7, Leu ₇ zu Val _{Ins7} mit folgender Leserasterverschiebung (E3)	diese Arbeit
pVLT-flp _{mut16}	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Substitution von Val ₃₈ zu Asp ₃₈ (E4)	diese Arbeit

Vektor/Plasmid	Charakteristika	Quelle/Referenz
pVLT-flp+ V	Kan ^r ; Derivat von pVLT35; <i>flp</i> ; Insertion von Val _{-1/1}	diese Arbeit

3.3 Oligonukleotide

In der Tabelle 3.4 sind die Oligonukleotide vermerkt, welche während dieser Arbeit zur Verwendung kamen. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 3.4: Verwendete Oligonukleotide. Die palindromischen Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen, während integrierte Markierungen (His6- bzw. HA-Tags) durch eine fette Schreibweise gekennzeichnet sind.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Endonuklease
HNS-f2	<u>GGA</u> <u>ATT</u> <u>CTT</u> ATA ATT TGA GAC CAG GAC AAT G	<i>EcoRI</i>
HNS-r2	GCT <u>CTA</u> <u>GAT</u> TAT TTT GAT TTA GTA GCA GCG GCT TT	<i>XbaI</i>
GH-cpx9	GAA <u>GAT</u> <u>CTG</u> CCC GAT AAA GTT ACG CAC CA	<i>XbaI</i>
KR-cpxA1	CCG <u>CTC</u> <u>GAG</u> ATG CTG GAG CAA CAC ATT GAG	<i>XhoI</i>
JS-hreP2.rev	CGG <u>AAT</u> <u>TCT</u> ATC ATA AGT AAC GTC AAA TCG TT	<i>EcoRI</i>
JS-flhB2X.rev	GCT <u>CTA</u> <u>GAA</u> TCT GGC CTT TCT CGC GAG CCT TC	<i>XbaI</i>
JS-pypA1	CTC AGG GCC AGT AAT GGG GAA	
JS-pypA2	TAT TAG TAC CAG CAC GTA GCG	
JS-pypB1	GCT <u>CTA</u> <u>GAG</u> CCG TTG CAT CAC TAA GAC TG	<i>XbaI</i>
JS-pypB6	CGG <u>AAT</u> <u>TCT</u> TTA AAC ACA ATC TCA TTT GTC TC	<i>EcoRI</i>
JS-pypC1	GCT <u>CTA</u> <u>GAG</u> AAT GCA TTG ACT CAC CGC TT	<i>XbaI</i>
JS-pypC6	CGG <u>AAT</u> <u>TCA</u> ACA ACA GAG ACT GTA TCA ACA TA	<i>EcoRI</i>
IB-tadV2.f	CCG <u>AAT</u> <u>TCA</u> ATC TTA TAT CAG GAT GGT GTA	<i>EcoRI</i>
IB-tadV2.his.r	TAT <u>TCT</u> <u>AGA</u> TTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GGT GAG AAA CGA TAA TAA AAA TCC GGC AGA GAT C	<i>XbaI</i>
IB-tadV4.f	CGG <u>TCG</u> <u>ACA</u> GGA GTT TCC GGC ACA GAA CA	<i>Sall</i>
IB-tadV4.r	AGG <u>ATA</u> <u>TCC</u> AAT ACA CCA TCC TGA TAT AAG	<i>EcoRV</i>
IB-tadV5.f	TTT <u>GAT</u> <u>ATC</u> GTT TCT CAC CTA GCA TAA CAG	<i>EcoRV</i>
IB-tadV5.r	AGT <u>CTA</u> <u>GAT</u> CCG GTG TTT AAT GAG TCC A	<i>XbaI</i>

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Endonuklease
IB-tadV3.inv.f	CGT CTG CTA TAG CAA TAT TCG TTA TCG	
IB-tadV3.inv.r	CGA TAA CGA ATA TTG CTA TAG CAG ACG	
IB-tadV4.inv.f	GGT GGG GGG AAT GTT AAG TTA ATC ACT	
IB-tadV4.inv.r	AGT GAT TAA CTT AAC ATT CCC CCC ACC	
IB-flp1.f	GGG <u>AAT TCT</u> CCC ACT ACA TTT AAC AAG GA	<i>EcoRI</i>
IB-flp1.HA.r	<u>GCT CTA GAT</u> TTA GCG TAG TCT GGG ACG TCG TAT GGG TAT TTA ACC ATG TCT TTT ATG TTT GTC ATG GAT GTA TC	<i>XbaI</i>
IB-big.flp.f	GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA <u>GAA TTC</u> ATG ATG AAT TTA ATC ACT AAA GGT TAC GTT	<i>EcoRI</i>
IB-big.flp.HA.r	CTT CTC TCA TCC GCC AAA ACA GCC <u>AAG CTT</u> TTA GCG TAG TCT GGG ACG TCG TAT GGG TTT AAC CAT GTC TTT TAT GTT TGT CAT GGA	<i>HindIII</i>
IB-flp1.inv2.f	TTT ATA AAA GAT AAT CGT GCT ACG GTT ATT GAG TAC GTG	
IB-flp1.inv2.r	CAC GTA CTC AAT AAC CGT AGC ACG ATT ATC TTT TAT AAA	
IB-flp2.inv2.f	TTT ATA AAA GAT AAT CGT TGG ACG GTT ATT GAG TAC GTG	
IB-flp2.inv2.r	CAC GTA CTC AAT AAC CGT CCA ACG ATT ATC TTT TAT AAA	
IB-flp3.inv.f	GAT AAT CGT GGT TCG GTT ATT GAG TAC	
IB-flp3.inv.r	GTA CTC AAT AAC CGA ACC ACG ATT ATC	
IB-flp4.inv2.f	ATA AAA GAT AAT CGT GGT TAC GTT ATT GAG TAC GTG TTG	
IB-flp4.inv2.r	CAA CAC GTA CTC AAT AAC GTA ACC ACG ATT ATC TTT TAT	
IB-flp5.inv2.f	AAA GAT AAT CGT GGT ACG ATT ATT GAG TAC GTG TTG ATT	
IB-flp5.inv2.r	AAT CAA CAC GTA CTC AAT AAT CGT ACC ACG ATT ATC TTT	
IB-flp6.inv.f	AAT CGT GGT ACG CGT ATT GAG TAC GTG	
IB-flp6.inv.r	CAC GTA CTC AAT ACG CGT ACC ACG ATT	
IB-flp7.inv.f	CGT GGT ACG GTT CTT GAG TAC GTG TTG	
IB-flp7.inv.r	CAA CAC GTA CTC AAG AAC CGT ACC ACG	

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Endonuklease
IB-flp8.inv2.f	GAT AAT CGT GGT ACG GTT CAT GAG TAC GTG TTG ATT ATT	
IB-flp8.inv2.r	AAT AAT CAA CAC GTA CTC ATG AAC CGT ACC ACG ATT ATC	
IB-flp9.inv.f	GGT ACG GTT ATT CAG TAC GTG TTG ATT	
IB-flp9.inv.r	AAT CAA CAC GTA CTG AAT AAC CGT ACC	
IB-flp10.inv.f	GGT ACG GTT ATT TAC TAC GTG TTG ATT	
IB-flp10.inv.r	AAT CAA CAC GTA GTA AAT AAC CGT ACC	
IB-flp11.inv2.f	CGT GGT ACG GTT ATT GAG TTC GTG TTG ATT ATT GCT GTA	
IB-flp11.inv2.r	TAC AGC AAT AAT CAA CAC GAA CAC AAT AAC CGT ACC ACG	
IB-flp12.inv2.f	CGT GGT ACG GTT ATT GAG ATG GTG TTG ATT ATT GCT GTA	
IB-flp12.inv2.r	TAC AGC AAT AAT CAA CAC CAT CAC AAT AAC CGT ACC ACG	
pBAD.f	CTG TTT CTC CAT ACC CGT T	
pBAD.r	CTC ATC CGC CAA AAC AG	<i>EcoRI</i>
pVLT.f	GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA <u>GAA TTC</u>	<i>EcoRI</i>
pVLT-lacI.f	CAT ACT CTG CGA CAT CGT ATA ACG TTA CTG	
pVLT.r	CTT CTC TCA TCC GCC AAA ACA GCC <u>AAG CTT</u>	<i>HindIII</i>

3.4 Antikörper

In Tabelle 3.5 sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und die für *Western Blot*-Analysen empfohlenen Verdünnungen aufgeführt.

Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten Antikörper. Angegeben sind die für *Western Blot*-Analysen eingesetzten Antikörper mitsamt Beschreibung, Referenz und empfohlener Verdünnung.

Name	Verdünnung	Beschreibung	Referenz
Flp-Peptid-antiserum	1:10.000	polyklonaler AK aus dem Kaninchen, konjugiert mit Hämocyanin der großen kalifornischen Schlüssellochnapfschnecke gegen KTPLKEIVDTSMTNIKDMVK	Seqlab (Göttingen)

Name	Verdünnung	Beschreibung	Referenz
Anti-HA	1:2000	monoklonaler AK aus der Maus, gegen Influenza Hämagglutinin-Epitope	Roche Diagnostics (Mannheim)
α -anti Histidin Tag	1:1000	polyklonaler AK aus der Maus gegen Histidin-Epitope	Dianova (Hamburg)
GAM-PO	1:10.000	monoklonaler AK aus der Ziege, konjugiert mit Peroxidase gegen Maus-IgG	Dianova (Hamburg)
GAR-PO	1:7.500	monoklonaler AK aus der Ziege, konjugiert mit Peroxidase gegen Kaninchen-IgG	Jackson Immuno-Research Europe Ltd. (Newmarket, UK)
GAM-AP	1:7.500	monoklonaler AK aus der Ziege, konjugiert mit alkalischer Phosphatase gegen Maus-IgG	Dianova (Hamburg)
GAR-AP	1:7.500	monoklonaler AK aus der Ziege, konjugiert mit alkalischer Phosphatase gegen Kaninchen-IgG	Dianova (Hamburg)

3.5 Größenstandards

3.5.1 DNA-Größenstandards

Zur Bestimmung der Größe getrennter DNA-Fragmente wurden der „100 bp + 1,5 kb DNA Marker“ bzw. „1 kb DNA Marker“ verwendet. Beide Größenstandards wurden von der Firma Segentic (Borken) bezogen.

1 kb DNA Marker 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250

100 bp DNA Marker 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

3.5.2 Protein-Größenstandards

Um die molekulare Masse von Proteinen abschätzen zu können, wurde der „SeeBlue® Plus2 Prestained Protein Ladder“ von Invitrogen (Darmstadt) als Größenstandard eingesetzt (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Verwendeter Protein-Größenstandard. Angegeben sind die Standardproteine und deren molekulare Massen [kDa].

Standardprotein	Molekulare Masse [kDa]
Myosin	250
Phosphorylase	148
BSA	98
Glutamindehydrogenase	64
Alkoholdehydrogenase	50
Carboanhydrase	36
Myoglobinrot	22
Lysozym	16
Aprotinin	6
Insulin, B-Kette	4

3.6 Medien und Nährböden

Die Anzucht der verwendeten *Y. enterocolitica*- sowie *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium und auf LB-Agarnährböden bei 26 °C bzw. 37 °C (Bertani, 1951). Für die in 4.6.2 beschriebenen Biofilmnachweise mittels Kongorotfärbung wurde darüber hinaus TYE-Medium bzw. Agar verwendet, welcher sich lediglich durch die Abwesenheit von Natriumchlorid zur LB-Nährlösung unterscheidet.

LB-Medium (Luria Bertani)

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	NaCl
ad. 1 l dH ₂ O	

Für einen Agarnährboden wurde der Lösung zudem 12 g/l Agar zugesetzt und diese anschließend autoklaviert. Je nach Bedarf konnten die in der nachfolgenden Tabelle 3.7 aufgelisteten Antibiotika nach Abkühlen der Nährlösung zugesetzt werden.

Tabelle 3.7: Verwendete Antibiotika und deren eingesetzte Konzentrationen. Angegeben sind die Konzentrationen [$\mu\text{l/ml}$] sowohl für *Y. enterocolitica* als auch für *E. coli*.

Antibiotikum	Eingesetzte Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	
	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>E. coli</i>
Chloramphenicol (in 100% Ethanol)	12,5	25
Cycloserin (in $d\text{H}_2\text{O}$)	2,5	-
Kanamycin (in $d\text{H}_2\text{O}$)	100	25
Nalidixinsäure (in 0,5M NaOH)	20	-
Streptomycin (in $d\text{H}_2\text{O}$)	50	50

3.7 Allgemeine Lösungen

Tabelle 3.8 gibt die im Rahmen dieser Arbeit allgemein gebräuchlichen Lösungen sowie deren entsprechende Lagerung wieder.

Tabelle 3.8: Allgemein eingesetzte Lösungen. Angegeben ist die Zusammensetzung der Lösungen sowie deren entsprechende Lagerung.

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Acrylamid (30 %)	30 g Acrylamid, 8 g N, N'-Methylenbisacrylamid, ad. 0,1 l $d\text{H}_2\text{O}$, Lagerung bei 4 °C
Arabinose (20 %) [w/v]	20 g Arabinose, ad. 0,1 l $d\text{H}_2\text{O}$, steril filtriert
Chloramphenicol (1000x)	25 mg/ml in 100 % EtOH, Lagerung bei 4 °C
Ethidiumbromid-Lösung	200 μl Ethidiumbromid, 20 ml TAE (50x), ad. 1 l $d\text{H}_2\text{O}$
Glukose (20 %) [w/v]	20 g Glukose, ad. 0,1 l $d\text{H}_2\text{O}$, steril filtriert
IPTG (1M)	2,4 g, ad. 0,1 l $d\text{H}_2\text{O}$, steril filtriert, Lagerung bei -20 °C
Kanamycin (1000x)	100 mg/ml in $d\text{H}_2\text{O}$, steril filtriert, Lagerung bei 4 °C
Nalidixinsäure (1000x)	25 mg/ml in 0,5M NaOH, steril filtriert, Lagerung bei -20 °C
SDS (10 %) [w/v]	25 g SDS, ad. 250 ml $d\text{H}_2\text{O}$
Streptomycin (1000x)	50 mg/ml in $d\text{H}_2\text{O}$, steril filtriert, Lagerung bei -20 °C

3.8 Enzyme

In Tabelle 3.9 sind die eingesetzten Enzyme unter Angabe der Hersteller, Aktivität und Funktion beschrieben.

Tabelle 3.9: Verwendete Enzyme. Angegeben sind die Enzyme, deren Hersteller, Aktivität und Funktion.

Enzym	Hersteller	Aktivität	Funktion
<i>EcoRI</i>	MBI Fermentats	10 U/ μ l	Restriktion 5'-G↓AATTC-3'
<i>EcoRV</i>	MBI Fermentats	10 U/ μ l	Restriktion 5'-GAT↓ATC-3'
<i>HindIII</i>	MBI Fermentats	10 U/ μ l	Restriktion 5'-A↓AGCTT-3'
<i>SalI</i>	MBI Fermentats	10 U/ μ l	Restriktion 5'-G↓TCGAC-3'
<i>XbaI</i>	MBI Fermentats	10 U/ μ l	Restriktion 5'-T↓CTAGA-3'
T4-Ligase	MBI Fermentats	60 U/ μ l	Phosphodiesterbindung zwischen 3'- und 5'-Enden
Alkalische Phosphatase (CIP)	Böhringer	5 U/ μ l	Dephosphorylierung von 5'-Enden
Taq-Polymerase	Segetic	5 U/ μ l	5' → 3' Polymeraseaktivität
Phusion-Polymerase	Finnzymes	2 U/ μ l	5' → 3' Polymeraseaktivität 3' → 5' Exonukleaseaktivität

3.9 Laborkits

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Laborkits sowie die Angabe deren Hersteller sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

Tabelle 3.10: Verwendete Laborkits. Aufgeführt sind die Laborkits unter Angabe der jeweiligen Hersteller.

Laborkit	Hersteller
The illustra™ Bacteria genomicPrep Mini Spin Kit	GE Healthcare (München)
FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit	Favorgen (Wien)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim)
FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit	Favorgen (Wien)
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research (Freiburg)
NucleoBond Xtra® Midi	Macherey-Nagel (Düren)

3.10 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

In der nachfolgenden Übersicht sind die in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien unter Angabe der zugehörigen Hersteller aufgelistet.

AppliChem GmbH	(Darmstadt)
Ascent Scientific Ltd	(Bristol, UK)
Beckmann Coulter	(München)
Becton, Dickinson & Co.	(Le Pont de Claix, F)
Bernd Kraft GmbH	(Duisburg)
Biomol Feinchemikalien GmbH & Co.	(Hamburg)
Boehringer	(Mannheim)
Carl Roth GmbH & Co.	(Karlsruhe)
Dianova	(Hamburg)
Eppendorf AG	(Hamburg)
Favorgen	(Wien)
Finnzymes	(Vantaa, FIN)
Fluka Chemie GmbH	(Buchs, CH)
GE Healthcare	(München)
Gerbu Biotechnik GmbH	(Gaiberg)
Invitrogen	(Darmstadt)
Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.	(Newmarket, UK)
J. T. Baker BV	(Deventer, NL)
Kisker Biotech GmbH & Co. KG	(Steinfurt)
Macherey-Nagel	(Düren)
MBI Fermentas	(St. Leon-Roth)
Merck AG	(Darmstadt)
Millipore	(Schwalbach)
MWG Biotech AG	(Ebersberg)
Omnilab Life Science	(Bremen)
Peqlab Biotechnologie GmbH	(Erlangen)
Promega	(Mannheim)

Roche Biochemicals	(Mannheim)
Roth	(Karlsruhe)
Sarstedt AG & Co.	(Nümbrecht)
Schleicher & Schuell	(Dassel)
Segentic	(Borken)
Seqlab	(Göttingen)
Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG	(Heidelberg)
Sigma Aldrich Chemie GmbH	(Taufkirchen)
Thermo Scientific	(Rockford, USA)
United States Biochemical	(Cleveland, USA)
Zymo Research	(Freiburg)

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Für eine flüssige Übernachtskultur wurde mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Als Nährmedium diente sowohl für *E. coli* als auch für *Y. enterocolitica* LB-Medium, die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C bzw. 26 °C bei 180 rpm. Für eine Subkultivierung am nächsten Tag wurde ein bestimmtes Volumen der Bakteriensuspension in frische Nährlösung überführt.

Eine kurzfristige Konservierung von Bakterien erfolgte durch das Ausstreichen einer Einzelkolonie oder einer Probe aus einer Glycerinkultur auf LB-Agar. Die Agarplatten wurden anschließend für 16 h bei 37 °C (*E. coli*) bzw. für 40 h bei 26 °C (*Y. enterocolitica*) inkubiert und im Anschluss daran bei 4 °C für einige Wochen gelagert.

Für eine langfristige Stammhaltung in Form einer Glycerinkultur wurde 1 ml einer Übernachtskultur für 1 min. bei 10.000 x g abzentrifugiert und 500 µl des Überstandes mit LB-Medium + 30 % Glycerin ersetzt. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -80 °C.

4.1.2 Bestimmung der optischen Dichte

Als Maß für das Bakterienwachstum in Flüssigkulturen wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) spektralphotometrisch bestimmt. Die Messungen erfolgten in Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm.

4.1.3 Erstellen einer Wachstumskurve

Zur Analyse des Wachstumsverhaltens von *Y. enterocolitica* unter spezifischen Bedingungen wurden im Rahmen dieser Arbeit Wachstumskurven über einen Zeitraum von 12 h durchgeführt.

Ausgehend von einer Übernachtskultur wurden 25 ml LB-Medium beimpft ($OD_{600} = 0,15$) und bei 26 °C und 180 rpm für 12 h inkubiert. Währenddessen konnte jede Stunde 1 ml der Kultur abgenommen und die Veränderung der optischen Dichte spektralphotometrisch erfasst werden.

4.2 DNA-Methoden

4.2.1 Präparation von genomischer DNA aus Gram-negativen Bakterien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Isolierung genomischer DNA aus Gram-negativen Bakterien zwei Methoden verwendet.

4.2.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um die gesamte DNA aus Gram-negativen Bakterien isolieren zu können, mussten diese zuvor aufgeschlossen werden. Hierfür wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur für 4 min. bei 1.700 x g abzentrifugiert und das Bakterienpellet anschließend in 300 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl 10 % SDS und 100 µl Pronase E (10 mg/ml) und einer anschließenden

Inkubation von 1 h bei 42 °C wurden die in der Zellmembran befindlichen Lipide und Proteine zerstört. Zur Isolation der DNA wurde der Ansatz mit 150 µl Tris-gesättigtem Phenol pH 7,8 versetzt, vorsichtig invertiert und für eine weitere Stunde bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl Chloroform und dem darauffolgenden 5-sekündigem Vortexen entstand ein Homogenat, welches sich nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 10.000 x g in eine wässrige und organische Phase sowie eine Interphase trennen ließ. Der wässrige Überstand wie auch die Interphase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin befindliche DNA mit 1/10 Volumen eines monovalenten Salzes, in diesem Fall 3 M Natrium-Acetat (pH 4,8), und 2 - 3 Volumen eiskaltem, absolutem Ethanol präzipitiert. Anschließend konnte die DNA auf einen Glasstab gewickelt und in dieser Form zweimal mit 96 % Ethanol gewaschen werden. Zur Entfernung der RNA wurde der Ansatz in 400 µl TE-Puffer + 20 µl RNase E (20 µg/ml) für 1 h bei 37 °C inkubiert und nachfolgend erneut mittels Natrium-Acetat und Ethanol präzipitiert. Die DNA wurde abermals auf einen Glasstab gewickelt und zweimal mit 96 % Ethanol gewaschen, um dann in 50 - 300 µl TE-Puffer aufgenommen zu werden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Resuspensionspuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
50 mM	EDTA, pH 8,0

Pronase E (10 mg/ml)

0,1 g	Pronase E
-------	-----------

ad. 10 ml dH₂O

Inkubation bei 42 °C für 1 h

RNase E (20 µg/ml)

20 mg/ml	RNase E
10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
15 mM	NaCl

Inkubation bei 100 °C für 15 min.

TE-Puffer

2,9 g	EDTA
0,15 g	Tris-HCl
ad. 1 l dH ₂ O	
pH 8,0	

4.2.1.2 “illustra Bacteria genomicPrep Mini Spin Kit”

Eine weitere Methode zur Isolierung der Gesamt-DNA erfolgte mit Hilfe des „illustra Bacteria genomicPrep Mini Spin Kits“ der Firma GE Healthcare (München). Dieses Verfahren beruht auf der spezifischen Bindung von Nukleinsäuren an einer Silikat-Oberfläche und ermöglicht eine DNA-Isolierung frei von Verunreinigungen durch Proteine, Salze oder zelluläre Bestandteile.

Zur Isolierung der Gesamt-DNA wurde 1 ml einer Übernachtskultur für 30 sek. bei 16.000 x g abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 40 µl Lysispuffer Typ 2 resuspendiert. Im Anschluss daran wurden der Suspension 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 10 µl Lysispuffer Typ 3 zugeführt und durch kurzes Vortexen vermischt. Nach einer Inkubation von 7 min. bei 55 °C konnte die Probe abzentrifugiert und erneut für 8 min. auf 55 °C inkubiert werden. Zur Entfernung der RNA wurden der Lösung 5 µl RNase A (20 mg/ml) zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min. bei RT und der anschließenden Zugabe von 500 µl des Lysispuffers Typ 4 erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min.. Die Probe wurde auf eine Säule gegeben und für 1 min. bei 11.000 x g zentrifugiert. Um verbliebene Proteine und RNA zu entfernen, folgten zwei weitere Waschschrte mit je 500 µl Lysispuffer Typ 4 und Waschpuffer Typ 6. Im Anschluss daran konnte die DNA mit 50 µl dH₂O bei 11.000 x g für 1 min. eluiert und bei -20 °C gelagert werden.

4.2.2 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Plasmide stellen extrachromosomale ringförmige doppelsträngige DNA-Moleküle dar, die oftmals z. B. Resistenzen gegenüber Antibiotika oder Schwermetallionen tragen und somit den prokaryotischen Wirtszellen einen Überlebensvorteil bieten.

Für die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde das „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kits“ von Zymo Research (Freiburg) verwendet. Bei dieser Methode werden die Bakterien mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA anschließend durch die spezifische Bindung an eine Silika-Membran gereinigt.

Zum Bakterienaufschluss wurde 1 ml einer Übernachtskultur für 30 sek. bei 11.000 x g abzentrifugiert, das Pellet in 600 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 100 µl des 7x Lysepuffers versetzt. Zur Neutralisation folgte die Zugabe von 350 µl kaltem Neutralisationspuffer, welcher bei vollständiger Neutralisation einen Farbumschlag von blau zu gelb bewirkte. Nach Zentrifugation von 2 - 4 min. bei 16.000 x g wurde der Überstand auf eine Binde-Säule gegeben und für 15 sek. bei 16.000 x g zentrifugiert. Anschließend folgten zwei Waschschritte, bei denen 200 µl Endo-Wasch-Puffer bzw. 400 µl Zyppy™ Wasch-Puffer auf den Säulenfilter gegeben wurden. Im Anschluss an jeweils 1-minütiges Zentrifugieren konnte die Plasmid-DNA mit 30 µl dH₂O nach einer Inkubation von 1 min. eluiert und bei -20 °C gelagert werden.

4.2.3 Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab

Plasmide sind in der Lage sich autonom vom Chromosom der Wirtszelle zu replizieren. Abhängig von dem jeweiligen Replikationsursprung (*ori*), welcher auf jedem Plasmid mindestens einmal vorhanden ist, liegen in einer Bakterienzelle wenige (*low copy*) oder sehr viele Kopien (*high copy*) dieses Plasmids vor.

Um eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA mit einer geringen Kopienzahl aus *E. coli* isolieren zu können, wurde auf das „NucleoBond® Xtra Midi-Kit“ der Firma Macherey-Nagel (Düren) zurückgegriffen. Bei dieser Methode wurden 200 ml einer Übernachtskultur bei 6.000 x g für 10 min. bei 4 °C abzentrifugiert, das Bakterienpellet wurde in 8 ml RES-Puffer + RNase A (60 mg/l) resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden 8 ml des LYS-Puffers der Suspension zugefügt und nach mehrmaligem Invertieren für 5 min. bei RT inkubiert. Im Anschluss an die Äquilibrierung der Silika-Membran-Säule mit 12 ml EQU-Puffer konnte der Ansatz, welcher zuvor mit 8 ml NEU-Puffer

neutralisiert wurde, in den Filter der Säule gegeben werden. Um jegliche Lysatreste zu entfernen, wurde der Säulenfilter mit 5 ml EQU-Puffer gewaschen und anschließend aus der Säule entfernt. Die Silika-Membran wurde mit 8 ml WASH-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml ELU-Puffer eluiert. Nach der Präzipitation der Plasmid-DNA mit 3,5 ml 100 % Isopropanol und Zentrifugation für 30 min. bei 15.000 x g und 4 °C wurde das Pellet mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und anschließend für weitere 5 min. bei 15.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das Pellet an der Luft getrocknet, in 50 µl TE-Puffer oder dH₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

4.2.4 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Größentrennung von DNA-Fragmenten aufgrund ihrer negativen Ladung und wird zur Trennung, Analyse und präparativen Isolierung von linearen DNA-Fragmenten sowie superhelikaler Plasmid-DNA verwendet. Die dabei eingesetzte Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen gewonnen. Durch Aufkochen in 1x TAE und anschließendes Abkühlen geliert die Agarose und bildet Doppelhelices, welche je nach Konzentration ein größer- oder kleinerporiges Gel entstehen lassen. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann es durch die Poren des Gels migrieren (Helling *et al.*, 1974).

Für ein 1,2 %iges Agarosegel wurden 1,2 g niedrig-schmelzender Agarose in 100 ml 1x TAE aufgekocht, bis diese vollständig gelöst vorlag. Anschließend konnte die Lösung in einen horizontalen Gelschlitten mit eingesetzten Kämmen gegossen werden, welche sich nach dem Erstarren wieder entfernen ließen. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen, als Elektrophoresepuffer diente 1x TAE. Um nach der Elektrophorese die Größe einzelner Nukleinsäurefragmente bestimmen zu können, musste stets ein Größenstandard (1.5.1) mit aufgetragen werden. Die anschließende Größentrennung erfolgte bei einer Spannung von 130 V, wobei die einzelnen DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe in Richtung der Anode migrierten.

Für die Visualisierung der DNA wurde das Gel für 15 – 20 min. in einer Lösung mit Ethidiumbromid inkubiert, das mit der DNA interkaliert und längerwelliges Licht durch Anregung mit UV-Licht emittiert.

50x TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

2 M	Tris-Base
1 M	Essigsäure
0,05 M	EDTA
pH 8,5	

6x Ladepuffer

10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
50 mM	EDTA
50 % [v/v]	Glycerin
0,3 % [w/v]	Orange G
0,03 % [w/v]	Xylencyanol

4.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur selektiven Amplifikation definierter Nukleotidsequenzen wurde auf die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zurückgegriffen, deren Mechanismus der semikonservativen Replikation folgt (Saiki *et al.*, 1985).

Eine PCR besteht aus mehreren Zyklen, wobei die DNA-Sequenz nach n Wiederholungen um 2^n vervielfältigt ist. Ein kompletter Zyklus umfasst drei Reaktionsschritte (Tab. 4.1). Nach der thermischen Denaturierung des anzureichernden DNA-Doppelstrangs (I) folgt die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die nun einzelsträngige Nukleotidsequenz (II), so dass mit Hilfe des Enzyms Polymerase ein neuer Doppelstrang synthetisiert werden kann (III).

DNA-Polymerasen sind hitzestabile Enzyme, welche eine automatisierte Durchführung der PCR ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Taq- als auch die Phusion[®]-Polymerase verwendet.

Tabelle 4.1: Übersicht der einzelnen PCR-Reaktionsschritte und deren Einstellungen.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	
I	Initiale Denaturierung	94 °C	3 – 10 min.
	Denaturierung	94 °C	1 min.
II	Annealing	X °C	1 min.
III	Elongation	72 °C	Y min.
	Finale Extension	72 °C	10 min.
	Lagerung	4 °C	∞

} ~ 30 Zyklen

Die Annealingtemperatur X richtete sich, neben der Magnesiumkonzentration, nach der spezifischen Schmelztemperatur (T_m) der eingesetzten Oligonukleotide. Die Dauer der Elongationszeit Y wurde in Abhängigkeit von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Segments gewählt. Dabei galt als Richtwert 1.000 bp pro 1 min. (Taq-Polymerase) bzw. pro 20 sek. (Phusion[®]-Polymerase). Als Matrize wurde generell auf chromosomale oder Plasmid-DNA zurückgegriffen. An Stelle von isolierter DNA konnten allerdings auch einzelne Bakterienkolonien verwendet werden. Hierfür musste der initiale Denaturierungsschritt von 3 min. auf 10 min. verlängert werden.

PCR-Ansatz

10 µl	Polymerasepuffer (10x)
2 µl	dNTP-Mix (je Nukleotid 10 mM)
100 ng/µl	je Oligonukleotid
1 – 200 ng	Matrizen-DNA
2,5 U	Polymerase
ad. 100 µl	dH ₂ O

4.2.6 Reinigung von DNA

DNA-Fragmente wurden sowohl aus Agarose-Gelen als auch aus Lösungen, wie z. B. PCR-Ansätzen, gereinigt.

4.2.6.1 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Horizontale Agarose-Gelelektrophoresen ermöglichen die präparative Isolierung von spezifischen DNA-Fragmenten.

Nach elektrophoretischer Trennung und anschließender Detektion im UV-Licht konnte das Stück Agarose mit dem gewünschten DNA-Fragment aus dem Gel geschnitten werden. Zur Reinigung wurde das „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-Kit“ der Firma Promega (Mannheim) verwendet, welches auf der Bindung von DNA an eine Silika-Membran in Gegenwart von hochkonzentrierten chaotropen Salzen basiert. Nach Zugabe von 10 µl Membran-Bindepuffer je 10 mg Gel wurde der Ansatz bei 60 °C so lange inkubiert, bis das Gelstück vollständig gelöst vorlag. Die Lösung wurde auf ein Säulchen gegeben und nach 1 min. Inkubation bei 16.000 x g für 1 min. zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die Membran mit 700 µl Membran-Waschpuffer gewaschen, dieser Schritt wurde mit 500 µl Waschpuffer wiederholt. Zur Trocknung der Membran wurde die Säule für 5 min. bei 16.000 x g zentrifugiert, und die daran gebundene DNA in 50 µl dH₂O eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

4.2.6.2 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Lösungen

Zur Reinigung von Nukleinsäure-Lösungen, wie z. B. PCR-Ansätzen, wurde diesen die äquivalente Menge an Membran-Bindepuffer des „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System-Kits“ der Firma (Mannheim) zugegeben und wie unter Punkt 4.2.6.1 weiter verfahren.

4.2.7 Konzentrationsbestimmung gereinigter Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit Hilfe des BioPhotometers der Firma Eppendorf (Hamburg) bei einer Verdünnung von 1:100 bestimmt. Darüber hinaus wurde der Reinheitsgrad der Nukleinsäure durch die Berechnung des Verhältnisses von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ analysiert, wobei ein Wert von 1,8 und 2,0 eine proteinfreie Nukleinsäurelösung indiziert.

4.2.8 Restriktion von DNA

Viele Restriktionsendonukleasen werden für DNA-Analysen und Klonierungen eingesetzt. Sie sind in der Lage, spezifische, palindromische Nukleinsäure-Sequenzen zu erkennen und die Phosphodiesterbindungen der doppelsträngigen DNA zu hydrolysieren. Abhängig vom Enzym wird dabei zwischen überhängenden „klebrigen“ (*sticky*) und „stumpfen“ (*blunt*) DNA-Enden unterschieden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Endonukleasen der Klasse II verwendet, welche weder Mg^{2+} noch ATP für ihre Aktivität benötigen. Für einen Verdau wurde 1 Unit (U) Restriktionsendonuklease pro 1 μg DNA eingesetzt. Eine Unit ist definiert als die Menge eines Restriktionsenzym, welche 1 μg DNA pro Stunde vollständig hydrolysiert.

Restriktions-Ansatz

0,1 – 1,0 μg	DNA
2 μl	Restriktionspuffer (10x)
2 μl	Restriktionsendonuklease (1 U/ μl)
ad. 20 μl	dH ₂ O

Die Inkubation erfolgte für 1 – 3 Stunden bei 37 °C. Für den Verdau von chromosomaler DNA wurde die Restriktion bei entsprechender Temperatur über Nacht durchgeführt.

Zur Restriktion von DNA-Fragmenten wurden diese zuvor mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotidprimern, die jeweils am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für spezifische Endonukleasen besaßen, mittels PCR amplifiziert und nach Reinigung (4.2.6.2) enzymatisch verdaut (Scharf *et al.*, 1986).

Um nach einer Plasmid-Restriktion eine Religation zu vermeiden, wurde der Ansatz anschließend elektrophoretisch in einem Agarose-Gel getrennt und das gewünschte Plasmid-Fragment ausgeschnitten, aufgereinigt (4.2.6.1) und dephosphoryliert.

4.2.9 Dephosphorylierung der 5'-Phosphat-Enden

Um die Religation eines restringierten Plasmids zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphat-Enden des Vektors mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIP) entfernt (Sambrook *et al.*, 1989).

Hierfür wurden die einzelnen Substanzen, wie angegeben, vermischt und für 60 min. bei 37 °C inkubiert. Nach Inaktivierung des Enzyms für 15 min. bei 65 °C konnte die Lösung dem Ligations-Ansatz hinzugefügt werden.

Dephosphorylierungs-Ansatz

ca. 50 ng	restringiertes Plasmid
2 µl	Puffer (10x)
1 µl	alkalische Phosphatase (5U)
ad. 20 µl	dH ₂ O

4.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von doppelsträngigen Nukleinsäuren wurde im Rahmen dieser Studie die T4-Ligase verwendet, welche in Abhängigkeit von ATP und Mg²⁺ Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden katalysiert.

Für die erfolgreiche Ligation zwischen Plasmid- und Insert-DNA wurde ein molares Verhältnis von 1:3 in einem Gesamtvolumen von 11 µl gewählt. Der Ligations-Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert und konnte am nächsten Tag nach Inaktivierung bei 65 °C für 15 min. zur Transformation (4.2.11) eingesetzt werden.

Um eine höhere Transformationseffizienz zu erreichen, bediente man sich der *temperature-cycle-ligation*-Methode (TCL), bei der die Temperaturen im 30-sekündigem Takt zwischen 10 °C und 30 °C über einen Zeitraum von 12 - 16 Stunden wechselten (Lund *et al.*, 1996).

Ligations-Ansatz

2 µl	Plasmid-DNA
6 µl	Insert-DNA
1 µl	T4-DNA-Ligasepuffer (10x)
1 µl	T4-DNA-Ligase (60 U)
1 µl	ATP (10 mmol/l)

4.2.11 Herstellung kompetenter Zellen und deren Transformation

Als Transformation wird das Einbringen von DNA in einen für die DNA-Aufnahme kompetenten Empfängerorganismus bezeichnet (Winnacker, 1990). Nur wenige Bakterienarten zeigen eine natürliche Kompetenz, die meisten Empfängerorganismen müssen daher für die Transformation befähigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden für die Herstellung kompetenter Zellen und deren anschließende Transformation verwendet.

4.2.11.1 Calciumchlorid-Methode

Für Calciumchlorid-kompetente *E. coli* wurden 60 ml LB-Medium + 1 % Glukose mit einer Übernachtskultur beimpft (anfangs $OD_{600} = 0,1$) und bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert. Nachdem die Kultur die exponentielle Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6 - 0,8$) erreicht hatte, wurde die Bakteriensuspension bei 4 °C und 1.000 x g für 15 min. zentrifugiert und das Pellet in 50 ml kaltem 50 mM Calciumchlorid aufgenommen. Nach einer Inkubation von 20 min. auf Eis wurde die Lösung ein weiteres Mal zentrifugiert und das entstandene Sediment in 2 ml eiskaltem 50 mM Calciumchlorid sowie 0,5 ml 98% Glycerin resuspendiert. Die Lagerung von je 200 µl-Aliquots erfolgte bei -80 °C.

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit maximal 400 ng DNA versetzt und im Anschluss daran 30 min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 2 min. wurde die Suspension auf Eis abgekühlt und anschließend mit 0,4 ml LB-Medium versetzt und für 60 min.

bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Während dieser Zeit konnten die Bakterien regenerieren und die durch das transformierte Plasmid übertragene Antibiotikumresistenz ausbilden. Diese Resistenz diente beim nachfolgenden Ausplattieren und Wachsen auf Antibiotikum-haltigen LB-Agarplatten bei 37 °C für 17 h zur Selektion der Transformanden.

4.2.11.2 Elektroporation

Eine kürzere und effizientere Methode der Transformation stellt die Elektroporation dar (Calvin & Hanawalt, 1988).

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde eine Übernachtskultur von *Y. enterocolitica* oder *E. coli* mit LB-Medium + 1 % Glukose auf eine $OD_{600} = 0,1$ eingestellt. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6 - 0,8$) wurden jeweils 0,5 ml der Kultur bei 4 °C und 13.000 x g für 5 min. abzentrifugiert und die Pellets zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 40 µl 10 % Glycerol aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von maximal 400 ng DNA zum Bakterienansatz und einer kurzen Inkubation in den vorgekühlten Elektroporationsküvetten (Spaltdurchmesser 2 mm) konnten die Bakterien nach festgelegten Parametern (Tab. 4.2) elektroporiert werden.

Tabelle 4.2: Übersicht der Elektroporationsparameter für *E. coli* und *Y. enterocolitica*.

Parameter	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
Kapazität	25 µF	25 µF
Spannung	1800 V	1800 V
Widerstand	200 Ω	400 Ω
Zeit	4,4-5 ms	9 ms

Anschließend wurde die Suspension in warmes LB-Medium aufgenommen und für 60 min. bei 37 °C bzw. 26 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Ausplattieren auf selektiven LB-Agarplatten wurden die Bakterien für 17 h bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 40 h bei 26 °C (*Y. enterocolitica*) inkubiert.

4.2.12 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der Nukleinsäuresequenz wurde Plasmid-DNA oder ein spezifisch amplifiziertes DNA-Fragment zur Sequenzierung an die Firma SeqLab (Göttingen) versendet. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe des NCBI Online-Services (blast.ncbi.nlm.nih.gov/) und „CLC Sequence Viewer 6“ der Firma CLC bio (Aarhus, DK).

4.2.13 Bakterielle Konjugation

Als Konjugation wird die Übertragung von DNA von einer Donorzelle auf eine Rezipientenzelle über die Zytoplasmabrücke genannt. Sie kann unter anderem durch konjugative Plasmide vermittelt werden, wobei die Übertragung der DNA unabhängig von der Spezies ist (Llosa & de la Cruz, 2005).

Die Übertragung bakterieller DNA wird durch Zell-Zell-Kontakt hervorgerufen. Hierbei bildet die Donorzelle (F^+ -Zelle) einen Sexpilus zu der Rezipientenzelle (F^- -Zelle) aus, durch den die DNA in das Cytosol der Empfängerzelle übertragen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Suizidvektor pEP185.2 verwendet, welcher sich sowohl durch den Besitz des *mob* RP4-Gens als auch durch den π -abhängigen Replikationsstartpunkt *ori* R6K auszeichnet. Nur Plasmide mit dem Mobilisierungsfaktor *mob*⁺ sind in der Lage in eine F^- -Zelle transferiert zu werden. Entscheidend für eine unabhängige Replikation des Plasmids ist der π -abhängige *ori* R6K, welcher nur in Anwesenheit des chromosomal kodierten π -Proteins eine selbstständige Replikation im Zytosol ermöglicht. Um dieses zu gewährleisten, wurde der *E. coli*-Stamm S17-1 λ *pir* verwendet, der über ein chromosomal codiertes π -Protein verfügt. Im Gegensatz zu diesem Stamm ist *Y. enterocolitica* von sich aus in der Lage, Plasmide via Konjugation aufzunehmen, allerdings können diese nicht im Organismus repliziert werden.

Für die Konjugation wurden je 500 μ l einer Übernachtskultur von *E. coli* S17-1 λ *pir* und *Y. enterocolitica* miteinander vermischt und bei 13.000 x g für 1 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet auf

antibiotikafreie LB-Agarplatten ausplattiert und die Platten bei 26 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten die Bakterien mit 5 – 10 ml LB-Medium vom Agarnährboden abgeschwemmt und in verschiedenen Verdünnungen (10^{-2} – 10^{-4}) zur Selektion von merodiploiden Klonen auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen werden.

4.2.14 Cycloserinanreicherung

Um die Funktion spezifischer Gene analysieren zu können, wurden Deletionsmutanten generiert. Hierfür wurden die flankierenden Regionen 3' sowie 5' des Zielgens in den Suizidvektor pEP185.2 kloniert, welcher anschließend mittels bakterieller Konjugation in den Wildtyp *Y. enterocolitica* transferiert wurde. Durch die homologe Rekombination über die flankierenden Sequenzen konnte der Chloramphenicolresistenz-vermittelnde Vektor in das Chromosom integriert werden (Abb. 4.1). Zur Anreicherung von Exintegrenten und zur Entfernung merodiploider Klone wurde eine Zellsuspension Bedingungen des Selektionsdrucks ausgesetzt, unter denen die gewünschten Mutanten nicht wachsen konnten und die proliferierenden, merodiploiden Zellen selektiv abgetötet wurden. Die Abtötung erfolgte dabei durch das Agenz Cycloserin, welches die Synthese der bakteriellen Zellwand inhibiert und in größeren Konzentrationen eine bakterizide Wirkung zeigt.

Um die Exzision des Plasmids aus dem Chromosom durch ein weiteres Rekombinationsereignis zu unterstützen, wurden entsprechende Klone in Abwesenheit von Chloramphenicol für 5 – 7 Tage zweimal pro Tag in 3 ml LB-Medium bei 26 °C und 180 rpm passagiert. Am Tag der Anreicherung wurden die Bakterien auf eine $OD_{600} = 0,1$ eingestellt und in 10 ml Nährmedium + 12,5 µg/ml Chloramphenicol für 3 h bei 26 °C und 180 rpm inkubiert. In diesem Zeitraum wurde das Wachstum der Exintegrenten gehemmt. Im Anschluss daran wurde die Kultur mit Cycloserin in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml versetzt und für 2 h bei 26 °C und 180 rpm inkubiert; dabei sollte die OD_{600} gering ansteigen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min. bei 4.000 x g abzentrifugiert und nach Waschen des Pellets mit 1x PBS in 10 ml

LB-Medium resuspendiert. Nach Anfertigen einer Verdünnungsreihe konnten die Bakterienansätze auf Nalidixinsäure-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert werden. Eine Selektion der Chloramphenicol-sensitiven Deletionsmutanten erfolgte durch Replika-Plattieren auf Nähragar, versetzt mit Nalidixinsäure und Chloramphenicol. Die identifizierten Exintegrenten wurden nachfolgend mittels PCR auf ihren Genotyp analysiert.

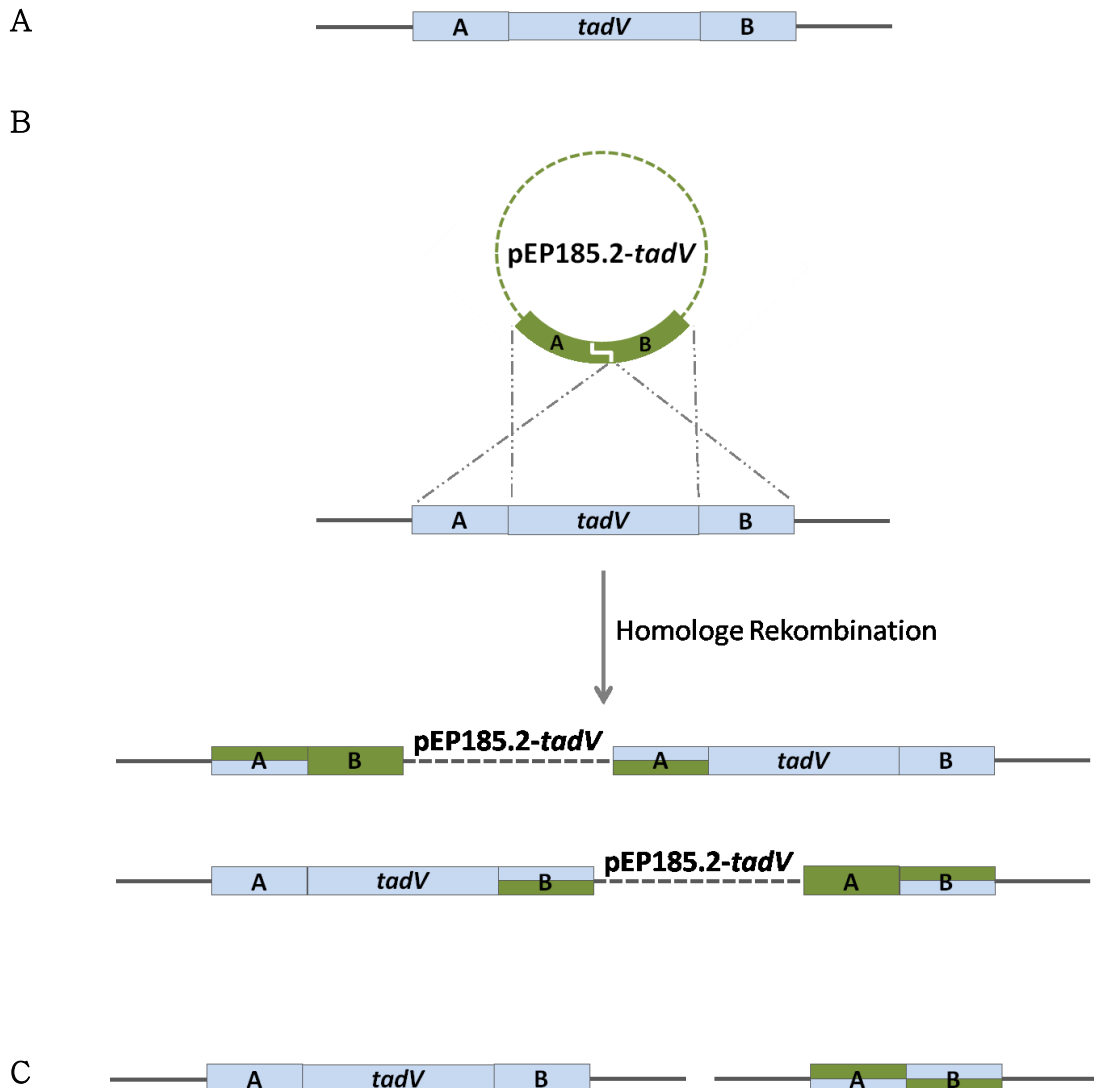


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der homologen Rekombination von pEP185.2 in das Chromosom von *Y. enterocolitica*.

A) Genetische Organisation des *tadV*-Gens im Wildtyp (hell). A und B stellen hierbei die flankierenden Sequenzen von *tadV* dar.

B) Zwei Varianten der genetischen Organisation nach der homologen Rekombination. Die flankierenden Sequenzen wurden in den Suizidvektor pEP185.2 kloniert (dunkel) und mittels homologer Rekombination auf zwei möglichen Wegen in das Chromosom von *Y. enterocolitica* integriert (merodiploider Stamm).

C) Exzision des Plasmids. Exintegrenten können nach erfolgter Exzision des Plasmids entweder das Wildtyp-Allel oder das mutierte Allel aufweisen (modifiziert nach Stephanie Seekircher und Bojan Shutinoski).

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert; das Pellet wurde in 4x SDS-Probenpuffer resuspendiert und anschließend für 10 – 20 min. bei 100 °C gekocht. Proben, bei denen Proteine analysiert werden sollten, welche mit der Zellmembran assoziiert vorliegen, wurden mit 4x SDS-Probenpuffer + 4 M Urea behandelt. Im Anschluss daran konnte der Ansatz mittels SDS-PAGE getrennt und analysiert werden.

4x SDS-Probenpuffer

62,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
10 % [v/v]	Glycerin
3 % [w/v]	SDS
8 % [w/v]	β-Mercaptoethanol
1 Spatelspitze	Bromphenolblau

4.3.2 Heterologe Proteinexpression

Durch die heterologe Expression von Proteinen können rekombinante Proteine in großen Mengen synthetisiert werden. Zu diesem Zweck wurde das Gen des gewünschten Proteins in den Expressionsvektor pET24b(+) kloniert und in den Expressionstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Dieser Bakterienstamm trägt das Gen für die T7 RNA-Polymerase, welche essentiell für die Transkription des unter der Kontrolle des *T7lac*-Promotors stehenden Gens ist.

Zur Expression der Proteine wurde eine Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 in 500 ml LB-Medium überimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ kultiviert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG konnte die Expression der T7-Polymerase und so des Proteins induziert werden. Die Kultur wurde nach 4 – 5 h bei 6.000 x g für 15 min. bei 4 °C abzentrifugiert,

wobei der Überstand anschließend verworfen wurde. Das Pellet wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt zur Proteinisolierung weiter verwendet.

4.3.3 Reinigung rekombinanter Proteine

Die Reinigung der His₆-markierten Proteine erfolgte durch eine immobilisierte Nickelchelate-Affinitätschromatographie (Porath *et al.*, 1975). Hierbei interagiert die angehängte Histidinseitenkette des Proteins mit dem Säulenmaterial „Ni-NTA-Superflow“ der Firma Qiagen (Hilden), deren Bindung erst durch Protonierung der Histidinreste oder durch Zugabe von konkurrierenden Zink-Liganden, wie Imidazol, gelöst werden kann.

Für die Reinigung wurde das Bakterienpellet auf Eis aufgetaut und in 10 ml Lysispuffer resuspendiert; die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (3x 30 sek. 50 %, 1x 30 sek. 100 %). Zwischen den Sonifikationsbehandlungen erfolgte jeweils eine Pause von 30 sek.. Im Anschluss daran wurde die Suspension bei 12.000 x g für 30 min. bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand mit 500 µl Ni-NTA bei 4 °C inkubiert. Der Inkubationszeitraum hing dabei von dem zu reinigenden Protein ab. Nach viermaligem Waschen mit 5 ml Waschpuffer für 30 min. bei 4 °C und anschließendem Zentrifugieren bei 4.000 x g und 4 °C für 5 min. wurde die Matrix in eine Säule überführt. Das Protein wurde mit 5 ml des Elutionspuffers eluiert und in 500 µl-Fractionen aufgefangen. Anschließend konnte die Konzentration der Proteinlösung mittels Bradford (4.3.4) bestimmt werden, die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Lysispuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
250 mM	NaCl
10 mM	Imidazol
10 %	Glycerin
0,1 %	Triton X-100

Waschpuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
250 mM	NaCl
20 mM	Imidazol
10 %	Glycerin
0,1 %	Triton X-100

Elutionspuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
250 mM	NaCl
250 mM	Imidazol
10 %	Glycerin
0,1 %	Triton X-100

4.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen wurde mittels Bradford-Assay quantitativ bestimmt. Die Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm, welche durch die Bindung des „Coomassie Brilliant Blue G-250-Reagenz“ an spezifische Aminosäureseitenketten des Proteins hervorgerufen wird (Bradford, 1976).

Zur Analyse der genauen Proteinkonzentration wurde zunächst eine Eichgerade mit bekannten, stufenweise zunehmenden Konzentrationen des Rinderserumalbumins (BSA) erstellt. Anschließend wurden 750 µl des Bradford-Reagenz mit 30 µl der Proteinprobe bzw. des jeweils verwendeten Puffers (Leerwert) versetzt und für 10 min. im Dunkeln inkubiert. Durch die photometrische Messung der Absorption bei 595 nm und dem Abgleich mit der vorher erstellten Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration berechnet.

4.3.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel zeichnet sich durch einen pH-Wechsel beim Übergang von Sammel- zu Trenngel aus. Es wird verwendet, um Proteingemische zu trennen und die Proteine anhand des Molekulargewichtes zu bestimmen. Die Beweglichkeit der meisten Proteine ist hierbei unter denaturierenden Bedingungen dem Logarithmus ihrer Masse direkt proportional (Kyhse-Andersen, 1984).

Ein SDS-Gel besteht aus Polyacrylamidketten, deren Polymerisierung durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED) eingeleitet wird. Durch eine Hitzedenaturierung der Probe und dem Einsatz von anionischem SDS (*sodium dodecylsulfate*) werden die Proteine entfaltet und zu konstant negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen umgewandelt. Durch die zusätzliche Zugabe von β -Mercaptoethanol werden darüber hinaus vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Bei der anschließenden Gelelektrophorese werden die SDS-Proteinkomplexe entsprechend ihrer Ladung und somit auch ihrer Masse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel in Richtung Anode getrennt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das SDS-Gelelektrophoresesystem mit Tris-Glycin-Puffern verwendet (Laemmli, 1970). Hierfür wurden die Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele) in einer Gießapparatur für fünf Gele mit Hilfe von Glas- und Aluminium-Silikatplatten hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel gemäß der Angaben in Tabelle 4.3 gegossen und mit 100 % Isopropanol überschichtet, um einen luftfreien Abschluss zu gewährleisten. Nach Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen, in welches im Anschluss die Kämme gesteckt wurden. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, konnten die einzelnen Gele in feuchten Tüchern bei 4 °C gelagert oder, nach Entfernen des Kammes, in ein Elektrophoresegerät eingesetzt werden. Nach Auffüllen der Apparatur mit 1x SDS-Laufpuffer wurden die Proben sowie ein Größenstandard (3.5.2) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 25 mA pro Gel.

Tabelle 4.3: Übersicht der verwendeten Gelkonzentrationen und deren Zusammensetzung. Angegeben sind die Volumina der eingesetzten Puffer und Lösungen in ml und μl für je fünf 12,5 % bzw. 20 % Polyacrylamid-Gele.

Zusammensetzung	Trenngel		Sammelgel
	12,5 %	20 %	
Mischung T	7,5 ml	7,5 ml	-
Mischung S	-	-	3 ml
30 % Acrylamid	15 ml	24 ml	3 ml
$d\text{H}_2\text{O}$	13,5 ml	4,5 ml	11,9 ml
10 % APS	330 μl	330 μl	180 μl
TEMED	18 μl	18 μl	9 μl

Mischung T

2 M	Tris-HCl, pH 8,8
0,2 M	EDTA
10 %	SDS

Mischung S

1 M	Tris-HCl, pH 6,8
0,2 M	EDTA
10 %	SDS

10x SDS-Laufpuffer

0,25 M	Tris-Base
1,92 M	Glycin
1 % [v/v]	SDS
pH 8,4 – 8,9	

4.3.6 Coomassie-Färbung

Die Detektion von Proteinen in PAA-Gelelektrophoren ist ein essenzieller Schritt bei der Analyse von Proteinen. Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Proteingel für etwa 20 min. in eine Färbelösung mit „Coomassie Brilliant Blau R250“ unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Farbstoff band in dieser Zeit unspezi-

fisch an das Gel und fast alle Proteine. Anschließend konnte das vollends gefärbte Polyacrylamid-Gel unter leichtem Schwenken in einer Entfärberlösung bis zum gewünschten Färbungsgrad entfärbt werden.

Färbelösung

3,3 mM	Coomassie Brilliant Blue R250
50 % [v/v]	Ethanol
10 % [v/v]	Essigsäure

Entfärbelösung

10 % [v/v]	Ethanol
7 % [v/v]	Essigsäure

4.3.7 Western Blot-Analyse

Das Überführen von Proteinen auf eine Membran und die anschließende Protein-spezifische Nachweisreaktion stellt die Methode des Protein-*Blottings* dar. Als *Western-* oder *Immuno-Blotting* wird die Überprüfung eines Proteinantigens über die Bindung spezifischer Antikörper oder die Spezifität von Antikörpern gegenüber einem Antigen bezeichnet (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979).

Als elektrophoretischer Transfer wurde das *Semidry Blot*-Verfahren angewandt. Der Nachweis gebundener Antikörper über Enzym-gekoppelte Zweitantikörper erfolgte zum einen mit Hilfe der Peroxidase (PO)-, zum anderen mittels alkalischer Phosphatase (AP)-Reaktion.

4.3.7.1 Elektrophoretischer Transfer mittels *Semidry Blot*-Verfahren

Unmittelbar nach Abschluss der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran mittels *Semidry Blot*-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984). Da sich die vorliegende Arbeit vorwiegend mit sehr kleinen Proteinen befasste, diente Poly-

vinylidenfluorid (PVDF) der Firma Millipore (Schwalbach) als Membranmaterial. Diese spezielle Blotting-Membran (ImmobilonP^{SQ}) zeichnet sich unter anderem durch eine hohe Proteinbindekapazität und eine geringe Porengröße aus, so dass auch kleinste Proteine mit einer Größe von 4 -6 kDa ohne große Verluste auf die Membran übertragen werden können (Gültekin & Heermann, 1988).

Um eine bestmögliche Übertragung zu gewährleisten, wurde auf das Anoden-Kathoden-Puffersystem zurückgegriffen, welches in diesem Fall Ethanol statt Methanol enthielt. Entsprechend wurde die Membran ebenfalls mit Ethanol statt mit Methanol äquilibriert. Membran und Filterkartons wurden gemäß der Gelgröße zugeschnitten und in den entsprechenden Lösungen getränkt. Für den Transfer wurden auf die Anodenplatte der Elektroblotapparatur zwei Filterkartons mit Anodenpuffer I und einer mit Anodenpuffer II gelegt. Darauf folgten die zuvor in Ethanol äquilibrierte PVDF-Membran und das PAA-Gel sowie drei Filterkartons getränkt in Kathodenpuffer I. Besonders sollte darauf geachtet werden, dass zwischen Membran und Gel keine Luftblasen den Transfer behindern könnten. Den Abschluss bildete die Kathodenplatte; geblottet wurde für 45 min. bei 20 V.

Anodenpuffer I

1 M	Tris-HCl
10 % [v/v]	Ethanol
pH 10,4	

Anodenpuffer II

25 mM	Tris-HCl
10 % [v/v]	Ethanol
pH 10,4	

Kathodenpuffer

25 mM	Tris-HCl
40 mM	Glycin
10 % [v/v]	Ethanol
pH 9,4	

4.3.7.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nachdem die Proteine mit Hilfe des *Semidry Blot*-Verfahrens auf die PVDF-Membran transferiert waren, mussten zunächst überschüssige Proteinbindstellen der Membran saturiert werden, um einer unspezifischen Antikörperbindung entgegenzuwirken. Hierfür wurde die Membran für 1 h unter Schwenken in 5 % Magermilchpulver in 1x PBS-T abgesättigt (Hauri & Bucher, 1986). Nach zweimaligem kurzen Waschen mit 1x PBS-T wurde die Trägermembran für 1 h oder über Nacht im Erstantikörper (Verdünnung s. 1.4), welcher in 4 ml 1x PBS-T und 400 µl 5 % Blockierungspuffer entsprechend verdünnt worden war, bei 4 °C auf dem Taumelmischgerät inkubiert. Durch nachfolgendes dreimaliges Waschen mit 1x PBS-T wurden ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend konnte die Membran für 45 min. mit dem entsprechenden AP- oder PO-gekoppelten Sekundär-Antikörper (Verdünnung s. 1.4) in 4 ml 1x PBS-T und 400 µl 5 % Blockierungspuffer inkubiert werden. Der Zweit-Antikörper stammt hierbei aus einer anderen Spezies als der Erst-Antikörper und ist gegen bestimmte Bereiche des Erst-Antikörpers gerichtet, dessen Bindung durch die Kopplung an AP oder PO visualisiert werden kann. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 1x PBS-T folgte die Entwicklung des Blots.

Eine Detektion des PO-gekoppelten Sekundär-Antikörpers erfolgte durch die Zugabe des Chemilumineszenz-Substrats „Pierce® ECL Western Blotting Substrat“ der Firma Thermo Scientific (Rockford, USA), welches ein Licht emittierendes Produkt liefert und so die Position der spezifischen, vom Antikörper erkannten Proteinbande sichtbar macht.

Sollte die Membran im Anschluss daran mit einem weiteren Erst-Antikörper inkubiert werden, so wurde diese bei 37 °C über Nacht in einer

Strip-Lösung gewaschen und am folgenden Tag nach kurzem Absättigen mit dem neuen Erst-Antikörper, wie bereits beschrieben, inkubiert.

Eine weitaus sensitivere, jedoch irreversible Methode der Detektion bot der Nachweis von AP-gekoppeltem Sekundär-Antikörper. Hierfür wurden je Blot 5 ml des AP-Puffers mit je 25 μ l 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) vermischt und auf die Membran gegeben. Aufgrund der Dephosphorylierung organischer Phosphatverbindungen durch die alkalische Phosphatase (AP) entstanden bläuliche Präzipitat-Banden auf der Membran.

10x PBS

80 g	NaCl
2 g	KCl
11,5 g	Na ₂ HPO ₄
2 g	KH ₂ PO ₄
ad. 1 l dH ₂ O	
pH 2,5	

PBS-T

100 ml	PBS (10x)
0,1 % [v/v]	Tween 20
ad. 1 l dH ₂ O	

5 % Blockierungspuffer

20 ml	PBS-T
1 g	Magermilchpulver

Strip-Lösung

0,2 M	Glycin
pH 2,5	

AP-Puffer

100 mM	Tris-Base
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
pH 9,5	

BCIP-Lösung

750 mg	BCIP
100 % [v/v]	DMF

NBT-Lösung

750 mg	NBT
70 % [v/v]	DMF
ad. 15 ml dH ₂ O	

4.4 *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)*

Der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) dient zum Nachweis von DNA- oder RNA-Protein-Interaktionen. Hierbei werden spezifische DNA- oder RNA-Sequenzen mit einem Protein inkubiert und anschließend elektrophoretisch getrennt. Die Bildung eines Komplexes zwischen Protein und Nukleinsäure spiegelt sich in einer Veränderung des Laufverhaltens wieder.

Um die Interaktion zwischen DNA-Fragmenten spezifischer Promotorregionen und dem universellen Regulatorprotein H-NS nachzuweisen, wurde auf eine Technik nach Bossé *et al.* zurückgegriffen. Hierfür wurden die spezifischen Nukleotidsequenzen mittels PCR amplifiziert (4.2.5) und anschließend gereinigt. Je 500 ng der DNA wurden mit stufenweise erhöhten Konzentrationen an rekombinantem H-NS versetzt und für 20 min. bei 26 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich eine fremde Nukleotidsequenz definierter Größe vor der Inkubation hinzugegeben. Im Anschluss daran wurden die Ansätze mit 6x-Probenpuffer versetzt und auf einem 1,5 %igem Agarosegel für 3 h bei 75 V elektrophoretisch getrennt (4.2.4).

4.5 Messung der Promotoraktivität

Um die Transkriptionsrate eines spezifischen Gens zu analysieren, wurde die Promotoraktivität mit Hilfe des β -Galaktosidasetests ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die β -Galaktosidasegene *lacZYA* der Kontrolle des gewünschten Promotors unterstellt, so dass sich bei Aktivität des Promotors dieses entsprechend in der Transkription der *lacZYA*-Gene widerspiegelte (Miller, 1972). Der Enzymtest beruht hierbei auf einem Farbumschlag, der photometrisch gemessen werden kann. Die so gemessene β -Galaktosidaseaktivität ist der Transkriptionsaktivität proportional.

Zur Messung der Promotoraktivität wurden 2 ml einer Übernachtskultur in einem Verhältnis von 1:20 überimpft und bei 26 °C für 3 h und 180 rpm inkubiert. Da in diesem Fall die Auswirkung von H-NS Δ auf spezifische Promotoren analysiert werden sollte, mussten dem Medium zusätzlich 0,2 % Arabinose zur Induktion von pBAD-hns Δ zugegeben werden. Anschließend wurde die optische Dichte der Bakteriensuspension bei OD₆₀₀ ermittelt. 1 ml des Ansatzes wurde bei 4 °C für 1 min. bei 13.000 x g abzentrifugiert und das Pellet anschließend mit 1 ml 0,85 % NaCl gewaschen. Danach konnte das Pellet bei -20 °C gelagert oder direkt zur Messung der Promotoraktivität eingesetzt werden.

Hierfür wurde das Bakterienpellet in 1 ml *Working Buffer* aufgenommen und pro Probe drei Wassermannröhrchen mit stufenweise erhöhter Menge (800 μ l, 900 μ l, 950 μ l) des *Working Buffers* und je zwei Tropfen Chloroform und einem Tropfen 0,1 % SDS versetzt. Nach Zugabe der Bakteriensuspension (200 μ l, 100 μ l, 50 μ l) wurden die Zellen zur effektiven Zelllyse gevortext und nachfolgend für kurze Zeit inkubiert.

Zum Start der Reaktion wurden in gleichen Zeitintervallen den Röhrchen 200 μ l ONPG hinzugefügt und diese gevortext. Das verwendete ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid) wird hierbei als Substrat für die β -Galaktosidase genutzt und in Galaktose und o-Nitrophenol hydrolysiert. Nachdem ein Farbumschlag wahrgenommen wurde, spätestens aber nach 10 - 15 min., wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l Natriumcarbonat unter Einhaltung der vorgelegten Zeitintervalle gestoppt und die Reaktionsdauer notiert. Die an-

schließende spektralphotometrische Messung wurde bei OD_{420} als Maß für den Substratumsatz und bei OD_{550} als Maß für den bakteriellen Hintergrund durchgeführt.

Die β -Galaktosidaseaktivität wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

$$Miller\ Units = \frac{1.000 \times [OD_{420nm} - (1,75 \times OD_{550nm})]}{t \times V \times OD_{600nm}}$$

t = Reaktionsdauer in min.

V = eingesetztes Volumen an Bakteriensuspension in ml

Enzyme Assay Buffer

61 mM	$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$
39 mM	$NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$
10 mM	KCl
10 mM	$MgSO_4 \times 7 H_2O$
pH 7,0	

1 M DTT (Dithiotheitol)

3,1 g	DTT
20 ml	Natriumacetat (10 mM), pH 5,2

Working Buffer

100 ml	<i>Enzyme Assay Buffer</i>
40 μ l	DTT (1M)

0,1 % SDS

0,1 ml	SDS (10 %)
ad. 10 ml	dH_2O

1 M Natriumcarbonat21,2 g Na_2CO_3 ad. 200 ml $d\text{H}_2\text{O}$ **0,85 % Natriumchlorid**0,85 g NaCl ad. 100 ml $d\text{H}_2\text{O}$ **ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid)**

4 mg/ml ONPG

25 ml *Enzyme Assay Buffer*

4.6 Nachweis von Biofilm

4.6.1 Nachweis von Biofilm durch Kristallviolett-Färbung

Zum Nachweis von Biofilmen in einem statischen Modell wurde eine Kristallviolett-Färbung durchgeführt (O'Toole & Kolter, 1998). Es handelt sich hierbei um einen basischen Farbstoff, der Matrizen sowie lebende und tote Zellen färbt indem er an negativ geladenen Oberflächenmoleküle und Polysaccharide bindet (Christensen *et al.*, 1985; Li *et al.*, 2003; Pitts *et al.*, 2003).

Zu diesem Zweck wurde eine Übernachtskultur auf $\text{OD}_{600} = 0,1$ eingestellt und je 200 μl wurden in drei Näpfe einer 96-Mikrotiterplatte (PVC) gefüllt. Nach einer statischen Inkubation von 24 h bei 26 °C konnte der Überstand vorsichtig abgenommen und die Polyvinylchloridplatte dreimal mit $d\text{H}_2\text{O}$ gewaschen werden. Anschließend wurden die adhärennten Bakterien mit 200 μl 1 % Kristallviolett für 15 min. gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit $d\text{H}_2\text{O}$ konnte das Kristallviolett aus dem Biofilm durch die Zugabe von 200 μl 33 % Essigsäure gelöst und spektralphotometrisch bei OD_{595} quantifiziert werden.

4.6.2 Nachweis von Biofilmen durch Kongorot-Nähragarplatten

Eine weitere Möglichkeit des Biofilmnachweises bietet der Einsatz von Kongorot-Nähragarplatten. Dazu wurden Übernachtskulturen in TYE auf eine $OD_{600} = 0,1$ eingestellt und je 1 μl , 5 μl , 10 μl und 50 μl der Verdünnung auf den Agar geträufelt und getrocknet. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 4 - 6 Tage bei 26 °C.

Kongorot-Agar (modifiziert nach Freeman *et al.*, 1989)

	TYE-Nährboden
0,08 %	Kongorot

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes in Verbindung mit H-NS als potentielltem Repressor

In vorangegangenen *in vivo*-Studien konnte der Protease HreP eine wichtige Bedeutung in der Virulenz von *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden. Untersuchungen mit *hreP*-Mutantenstämmen zeigten eine 33-fach erhöhte LD₅₀ und eine verminderte Überlebensrate sowohl in den Peyer'schen Plaques (PP) als auch in den mesenterialen Lymphknoten infizierter Mäuse (Young & Miller, 1997; Heusipp *et al.*, 2001). Bisher konnten allerdings keine Laborbedingungen definiert werden, unter denen es zu einer Expression von *hreP* in *Y. enterocolitica* kommt. Dies deutet auf eine strenge Kontrolle der *hreP*-Expression hin und bestätigt *hreP* als virulenzassoziiertes Gen, welches nur während einer Infektion im Wirt exprimiert wird (Heusipp *et al.*, 2001).

Basierend auf diesen Ergebnissen konnten unlängst mit Hilfe einer Transposonmutagenese drei positive Regulatoren der *hreP*-Expression nachgewiesen werden. Obwohl *pypA*, *pypB* und *pypC* in keinem gemeinsamen Operon lokalisiert sind, wurde eine Art Regulationskaskade im Zusammenhang mit der Aktivierung der *hreP*-Expression beobachtet. So konnte gezeigt werden, dass sich *pypB* und *pypC* in ihrer Transkription sowohl gegenseitig als

auch autoregulieren. PypB und PypC besitzen überdies eine DNA-Bindedomäne, die es ihnen erlaubt direkt mit der Promotorregion von *hreP* zu interagieren. Obwohl solch eine Domäne in PypA zu fehlen scheint, ließen Expressionsanalysen eine unabhängige Aktivierung der *hreP*-Transkription durch jedes der drei Pyp-Proteine erkennen (Wagner *et al.*, 2009).

Sowohl der niedrige GC%-Gehalt von *hreP* (43 %GC) als auch der von den *pyp*-Genen (*pypA*: 34 %GC, *pypB*: 41,5 %GC, *pypC*: 30 %GC) im Vergleich zum restlichen Genom (47 %GC) lassen eine negative Regulation durch H-NS vermuten. Basierend auf den bisher gewonnenen Kenntnissen, soll im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung des universellen Regulators H-NS für das regulatorische Pyp-System vertiefend charakterisiert werden.

5.1.1 Etablierung einer dominant-negativen H-NS-Variante zur Analyse des Effekts von H-NS auf die Genexpression in *Y. enterocolitica*

Vorangegangene Transkriptionsmessungen in *E. coli* ließen bereits einen negativen Einfluss von H-NS auf die Transkription von *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC* erkennen (Daten bisher nicht veröffentlicht). Eine Bestätigung dieses Effekts in *Y. enterocolitica* erschwerte allerdings die Tatsache, dass sowohl für *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* als auch für *S. enterica* sv. Typhimurium H-NS-Nullmutationen letal zu sein scheinen (Heroven *et al.*, 2004; Ellison & Miller, 2006; Navarre *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurde eine trunke H-NS-Version (H-NS Δ) generiert. Dieses dominant-negative H-NS-Protein ist nach wie vor in der Lage zu multimerisieren, kann infolge eines fehlenden C-Terminus jedoch nicht mehr an DNA binden. H-NS Δ wirkt als eine Art H-NS-Angel, indem es mit zellulärem H-NS heterodimere Komplexe eingeht und so das Niveau freier, funktionsfähiger H-NS-Proteine in der Zelle verringert. Dieses Phänomen der Derepression durch die Überproduktion natürlich vorkommender dominant-negativer H-NS-Proteine

(H-NST) wurde bereits von Williamson und Free in enteropathogenen *E. coli* beschrieben (Williamson & Free, 2005).

Das Gen *hnsA* wurde unter der Kontrolle des Promotors P_{ara} in das *high copy* Expressionsplasmid pBAD18-Kan kloniert (pBAD-*hnsA*). Anschließend erfolgte die Transformation der *lacZYA*-Reporterstämme GHY19 (*hreP-lacZ*), GHY306 (*pypA-lacZ*), GHY307 (*pypB-lacZ*) und GHY334 (*pypC-lacZ*) von *Y. enterocolitica* mit pBAD-*hnsA*. Eine Überproduktion von H-NS Δ wurde durch das Wachstum der einzelnen Reporterstämme in 0,2 % Arabinose erzielt. Die Messung der Promotoraktivität erfolgte 3 h nach Induktion. Als Negativkontrolle (-) diente der Vektor pBAD18-Kan. Um auszuschließen, dass ein Effekt durch H-NS nur bei 26 °C erfolgt, wurden die Promotoraktivitäten von *hreP* und den einzelnen *pyp*-Genen sowohl nach einer Inkubation bei 26 °C als auch bei 37 °C ermittelt.

Die in Abbildung 5.1 dargestellten Ergebnisse stellen Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Assays nach dreifacher Bestimmung dar, Sternchen zeigen $p < 0,05$ in einem zweiseitig ausgerichteten t-Test an.

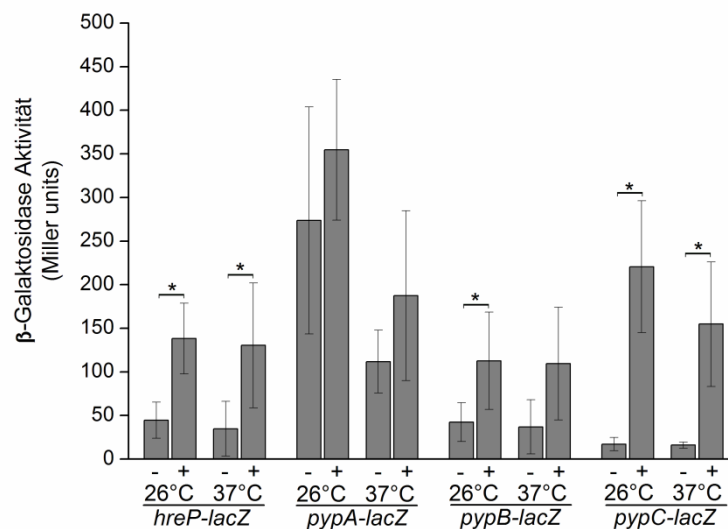


Abbildung 5.1: Messung der Promotoraktivität unter dem Einfluss der dominant-negativen Version H-NS Δ auf *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC* in *Y. enterocolitica*.

Y. enterocolitica *lacZYA*-Reporterstämme GHY19 (*hreP-lacZ*), GHY306 (*pypA-lacZ*), GHY307 (*pypB-lacZ*) und GHY334 (*pypC-lacZ*), welche entweder pBAD18-Kan (-) oder pBAD-*hnsA* (+) tragen, wurden bei 26 °C bzw. 37 °C und 180 rpm kultiviert. Um die Expression von H-NS Δ durch *Para* zu induzieren, wurde das Medium mit 0,2 % Arabinose versetzt. Die Messung der Promotoraktivität erfolgte nach 3 h. Die Daten stellen die Durchschnittswerte und Standardabweichungen von drei unabhängig durchgeführten Experimenten, jeweils in dreifacher Ausführung, dar. Die Sternchen zeigen $p < 0,05$ in einem zweiseitig ausgerichteten t-Test an.

Die berechnete β -Galaktosidaseaktivität steigt nach Überproduktion von H-NS Δ (+) bei 26 °C für die Reporterstämme von *hreP*, *pypB* und *pypC* signifikant an. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt die β -Galaktosidaseaktivität für *hreP* und *pypB* eine 2-3-fache, für *pypC* sogar eine 10-fache Erhöhung, während sich die Werte für *pypA* nahezu gleichen. Ein ähnliches Ergebnis kann zudem bei 37 °C beobachtet werden, wobei die Aktivität für *pypA* und *pypC* insgesamt geringer ist. Ein negativer Einfluss von H-NS auf die Genexpression von *hreP*, *pypB* und *pypC* ist nicht nur in *E. coli*, sondern auch in *Y. enterocolitica* bestätigt, wohingegen H-NS nur einen geringen bis gar keinen Effekt auf die Transkription von *pypA* zu haben scheint.

5.1.2 H-NS interagiert direkt mit den Promotorregionen von *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC*

In vielen Gram-negativen Bakterien spielt die negative Regulation horizontal erworbener Gene durch H-NS eine große Rolle. Diese Gene zeichnen sich oft durch einen niedrigen GC%-Gehalt im Vergleich zum Rest des Genoms aus. Aravind und Landsman konnten in dem Zusammenhang einen spezifischen AT-Haken innerhalb der H-NS-Struktur detektieren, welcher die Bindung intrinsisch gekrümmter AT-reicher DNA-Regionen unterstützt (Aravind & Landsman, 1998; Navarre *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte für die Regulierung einiger Gene in *Y. enterocolitica* ein weiteres Protein (YmoA) ermittelt werden, welches mit H-NS interagiert und somit die Bindung von H-NS an die DNA zu stabilisieren scheint (Ellison & Miller, 2006).

Um eine direkte Interaktion zwischen H-NS und den Promotoreregionen von *hreP* und den *pyp*-Genen in *Y. enterocolitica* bestätigen zu können, wurden *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) durchgeführt. Zu einem Nachweis der DNA-Protein-Bindung *in vitro* wurden 500 bp lange DNA-Fragmente stromaufwärts des Startkodons von *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC* mittels PCR amplifiziert (Primer: JS-hreP2.rev/JS-flhB2X.rev, JS-pypA1/JS-pypA2, JS-pypB1/JS-pypB6, JS-pypC1/JS-pypC6). Jeweils 0,5 μ g der DNA-Fragmente

wurden mit ansteigenden Proteinmengen des gereinigten, rekombinanten H-NS für 20 min. bei 26 °C inkubiert. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 1,5 % Agarosegel bei 75 V. Als unspezifische Kompetitor-DNA wurden 0,5 µg eines ungefähr 200 bp großen PCR-Fragments des *cpxA*-Gens aus *Y. enterocolitica* verwendet (Primer: GH-cpx9/KR-cpxA1).

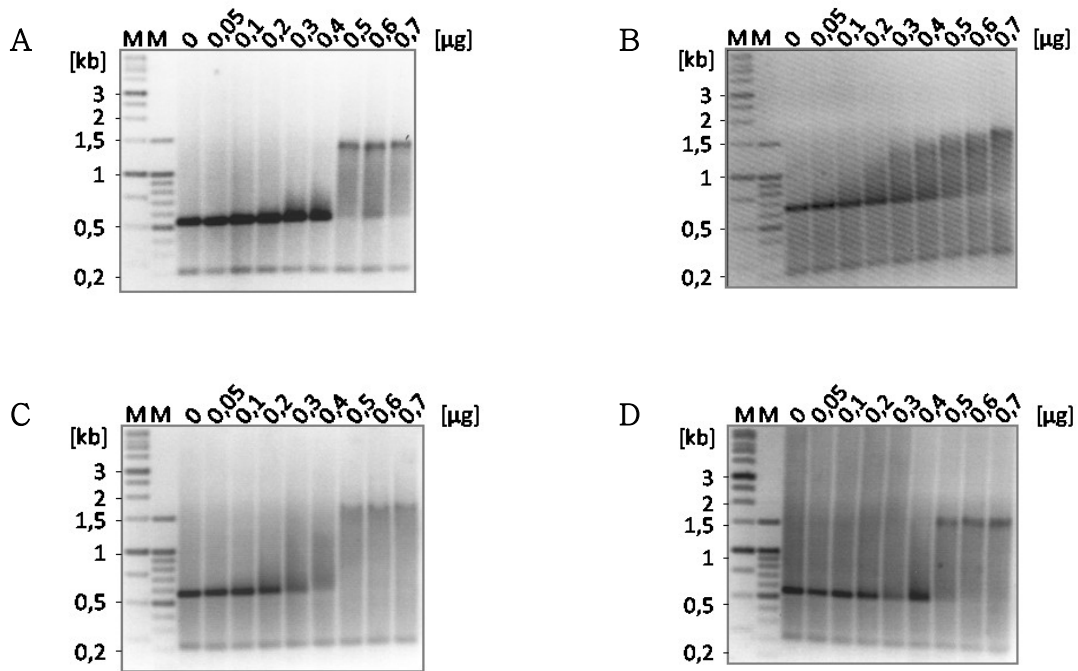


Abbildung 5.2: *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion zwischen rekombinantem H-NS und den Promotorregionen von *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC*.

Stufenweise erhöhte Proteinmengen des rekombinanten H-NS (0 – 0,7 µg) wurden mit 500 bp PCR-Fragmenten der Promotorregionen von *hreP* (A), *pypA* (B), *pypB* (C) und *pypC* (D) für 20 min. bei 26 °C inkubiert und mittels horizontaler Gelelektrophorese in einem 1,5 % Agarosegel getrennt. Als Kontrolle wurde ein unspezifisches 200 bp DNA-Fragment des *cpxA*-Gens der Reaktion hinzugegeben.

In Abbildung 5.2 ist deutlich zu erkennen, dass sich das elektrophoretische Laufverhalten der *hreP*- (A), *pypA*- (B), *pypB*- (C) und *pypC*- (D) DNA-Fragmente (0,5 – ~1,5 kb) durch die Interaktion mit H-NS verändert, während das Kontrollfragment *cpxA* (0,2 kb) konstant durch das Agarosegel migriert. Insbesondere bei *pypA* (Abb. 5.2 B) ist bereits bei einer geringen H-NS-Menge eine Veränderung des Laufverhaltens zu erkennen. Da die Zugabe der Kontroll-DNA keine Auswirkungen auf das Laufverhalten erkennen lässt, kann von einer direkten Interaktion von H-NS mit den einzelnen Promotorregionen ausgegan-

gen werden. Durch das Eingehen eines heteromeren Komplexes migrieren die DNA-Protein-Verbindungen langsamer durch das hochprozentige Agarose-Gel. Dies kann anhand eines so genannten *shifts* detektiert werden.

5.1.3 Überproduktion von H-NS Δ fördert die Bildung von Biofilm

Oftmals schließen sich Bakterien zu einer sessilen Gemeinschaft, den sogenannten Biofilmen, zusammen (Costerton *et al.*, 1999). Eingebettet in einer Matrix aus verschiedensten Biopolymeren schützt es die Mikroorganismen u. a. vor Austrocknung, oxidierenden Agenzien oder angereicherten Bioziden, diversen Antibiotika und einigen humanen Immunabwehrmechanismen (Flemming & Wingender, 2010). Darüber hinaus unterstützen Biofilme aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Proteinen, Polysacchariden und extrazellulärer DNA die Adhäsion an festen Oberflächen und die Stabilität innerhalb der Matrixstruktur (Flemming & Wingender, 2010; Carrolo *et al.*, 2010). Biofilme stellen ein eigenes Ökosystem dar, das sensibel auf Umweltreize reagiert und sogar funktionell mit Geweben höherer Organismen verglichen werden kann (Costerton *et al.*, 1995).

Während der vorangegangenen Experimente zur Bestimmung des Einflusses von H-NS Δ auf die Transkription von *hreP* sowie den *pyp*-Genen konnte die Bildung von Biofilmen in Abhängigkeit von der H-NS Δ -Expression beobachtet werden. Dies ist ein unerwarteter Nebeneffekt, der im Folgenden näher analysiert wird.

5.1.3.1 Untersuchungen der Biofilmbildung in Abhängigkeit von der Zeit

Grundsätzlich konnte eine Biofilmbildung unter H-NS Δ -induzierenden Bedingungen nach mehrstündiger Inkubation bei 26 °C beobachtet werden. Um den initialen Zeitpunkt der Biofilmbildung genauer zu bestimmen, wurden Wachstumsanalysen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden Kulturen von *Y. enterocolitica* Wildtypstämmen (WT), die entweder das Plasmid pBAD-hns Δ (grau) oder als Negativkontrolle den Vektor pBAD18-Kan (schwarz) tragen, untersucht. Für einen Vergleich der Biofilmbildung und dessen Auswirkungen auf die Zelldichte in Suspension wurden Wachstumskurven erstellt. Die Messungen der Zelldichte (OD₆₀₀) erfolgten stündlich über einen Zeitraum von 12 h nach Induktion der *H-NS Δ* -Expression mit 0,2 % Arabinose.

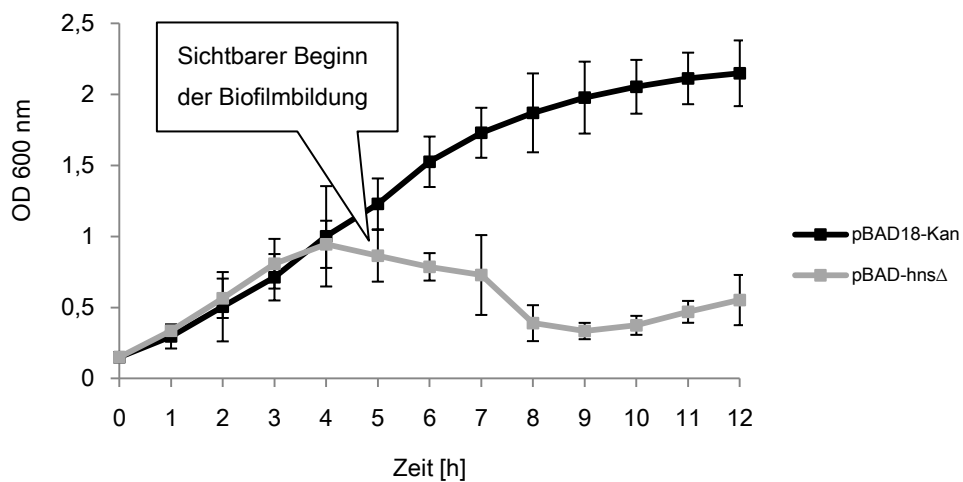


Abbildung 5.3: Wachstumskurve zur Untersuchung der Biofilmbildung.

Y. enterocolitica Wildtypstämmen, welche entweder pBAD18-Kan (schwarz) oder pBAD-hns Δ (grau) tragen, wurden für 12 h bei 26 °C und 180 rpm kultiviert. Um die Expression von H-NS Δ zu induzieren, wurde das Medium mit 0,2 % Arabinose versetzt. Die spektralphotometrische Messung (OD = 600 nm) erfolgte stündlich; ein erkennbarer Biofilm konnte nach 4 h Wachstum beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Negativkontrolle geben hierbei das Wachstum ohne jegliche Akkumulation von Bakterien an der Glaswand des Erlenmeyerkolbens wieder (Abb. 5.3). Im Vergleich zu der stetig ansteigenden Wachstumskurve dieser Kontrollkulturen weist der Graph der Bakterien, die H-NS Δ exprimieren, nach 4 h Inkubation einen Knick auf. Gleichzeitig kann ein leichter Biofilm an der Wand des Glaskolbens verzeichnet werden. Weiterhin ist zu beobachten, dass sich mit der Zunahme der Biofilmbildung die Messwerte der optischen Dichte verringern und diese nach 9 h nur noch gering ansteigen.

Abbildung 5.4 zeigt das Ausmaß der Biofilmbildung von H-NS Δ nach 12 h Inkubation an. Der körnig wirkende Rand spiegelt die starke Akkumulation der Bakterien an der Wand des Glaskolbens wieder.

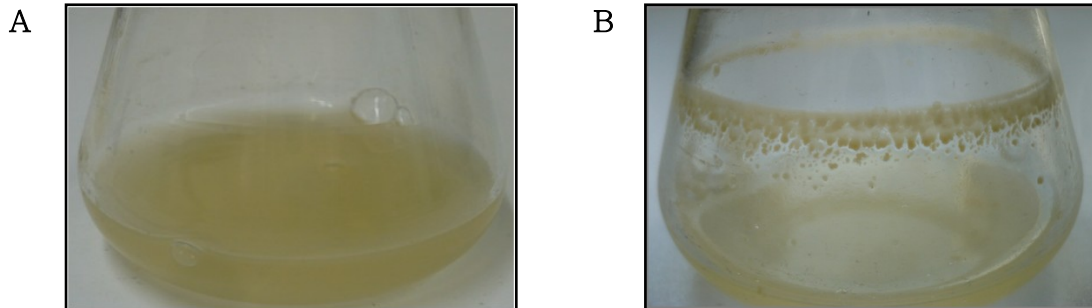


Abbildung 5.4: Nachweis der Biofilmbildung nach 12 h.

Aufnahmen von *Y. enterocolitica* mit pBAD18-Kan (A) bzw. pBAD-hns Δ (B) nach Kultivierung über 12 h bei 26 °C und 180 rpm. Zur Induktion der H-NS Δ -Expression wurde das Medium mit 0,2 % Arabinose versetzt. Während die Negativkontrolle keine Biofilmbildung erkennen lässt, hat sich ein deutlicher Biofilmrand oberhalb der Mediumgrenzfläche der Positivkontrolle gebildet.

5.1.3.2 Analyse der Biofilmbildung mit Hilfe von Kristallviolett

Für einen Nachweis, inwieweit die Bildung von Biofilmen im Zusammenhang mit dem regulatorischen Pyp-Netzwerk steht, wurden Kristallviolett-Assays mit entsprechenden *hreP*⁻ und *pyp*-Mutantenstämmen durchgeführt. Kristallviolett-Färbungen wurden hinsichtlich der Detektion von Biofilmen erstmals durch Christensen *et al.* beschrieben. Es handelt sich hierbei um einen basischen Farbstoff, der Matrizen sowie lebende und tote Zellen färbt indem er an negativ geladenen Oberflächenmoleküle und Polysaccharide bindet (Christensen *et al.*, 1985; Li *et al.*, 2003; Pitts *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Getestet wurde der Effekt der H-NS Δ -Überexpression mit Hilfe des Plasmids pBAD-hns Δ (+) sowie des Vektors pBAD18-Kan (-) als Negativkontrolle auf den WT von *Y. enterocolitica* wie auch auf die Mutantenstämme $\Delta hreP$ (GHY14), $\Delta pypA$ (GHY320), $\Delta pypB$ (GHY329) und $\Delta pypC$ (GHY350). Die spektralphotometrische Auswertung erfolgte 24 h nach Induktion der H-NS Δ -Expression mit 0,2 % Arabinose.

Sowohl für den WT als auch für die einzelnen Mutantenstämme ist ein signifikanter Unterschied zwischen Negativkontrolle und H-NS Δ zu erkennen. So kann ein 30- bis 40-facher Anstieg der Biofilmbildung nach der Überproduktion von H-NS Δ in drei der getesteten Stämme (WT, $\Delta hreP$, $\Delta pypC$) beobachtet werden. Desweiteren lassen $\Delta pypA$ sowie $\Delta pypB$ eine 6- bzw. 12-fache Steigerung erkennen. Aufgrund der allgemein erhöhten Biofilmbildung kann allerdings nicht auf eine Beteiligung einzelner Gene des regulatorischen Pyp-Systems geschlossen werden.

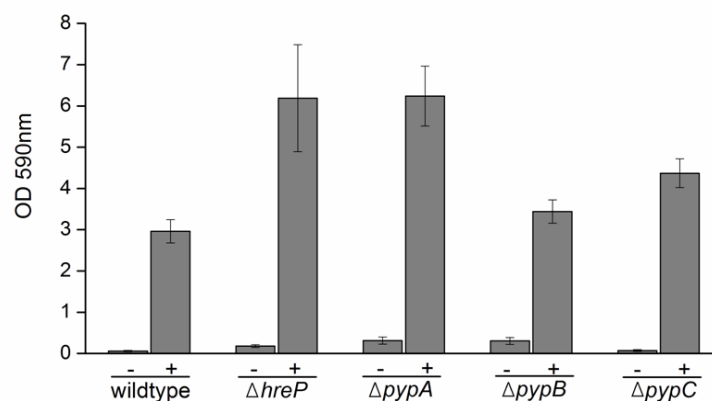


Abbildung 5.5: Nachweis der Biofilmbildung in Wildtyp sowie Mutanten-Stämmen mittels Kristallviolett-Färbung.

Y. enterocolitica WT sowie die Mutanten-Stämme GHY14 ($\Delta hreP$), GHY320 ($\Delta pypA$), GHY329 ($\Delta pypB$) und GHY350 ($\Delta pypC$), welche entweder pBAD18-Kan (-) oder pBAD-hns Δ (+) tragen, wurden für 24 h bei 26°C kultiviert. Um die Expression von H-NS Δ zu induzieren, wurde das Medium mit 0,2 % Arabinose versetzt. Die Messung der Biofilmbildung mittels Kristallviolett-Färbung erfolgte nach 24 h.

5.1.3.3 Nachweis der Biofilmbildung mittels Kongorot-Nähragar

Kongorot ist ein planarer, hydrophober Diazofarbstoff, der an Lipide, Lipoproteine und diverse Makromoleküle bindet. Ursprünglich wurde der Farbstoff zur Analyse hydrophober Oberflächenproteine in enterovirulenten *Shigellae* und Curli-Pili-produzierenden *E. coli*, aber auch zur Detektion Alzheimer-assoziiertes amyloider Plaques verwendet. Erst später fand Kongorot seine Verwendung zum Nachweis von Biofilmen (Freeman *et al.*, 1989; Cangelosi *et al.*, 1999; Ambalam *et al.*, 2012).

Aufgrund der Zusammensetzung von Biofilmen aus einer Vielzahl von Biopolymeren, wie z. B. Exopolysacchariden, ist Kongorot in der Lage an die

Matrix zu binden und so eine Rotfärbung der biofilmbildenden Kolonien zu bewirken. Zu diesem Zweck wurde ein Arabinose-haltiger Indikatoragar verwendet (4.6.2). Getestet wurden *Y. enterocolitica* WT sowie die Mutanten-Stämme $\Delta hreP$ (GHY14), $\Delta pypA$ (GHY320), $\Delta pypB$ (GHY329) und $\Delta pypC$ (GHY350), welche entweder den Vektor pBAD18-Kan (Negativkontrolle) oder das Plasmid pBAD-hns Δ tragen (Abb. 5.6). Die Inkubation erfolgte bei 26 °C über 6 Tage.

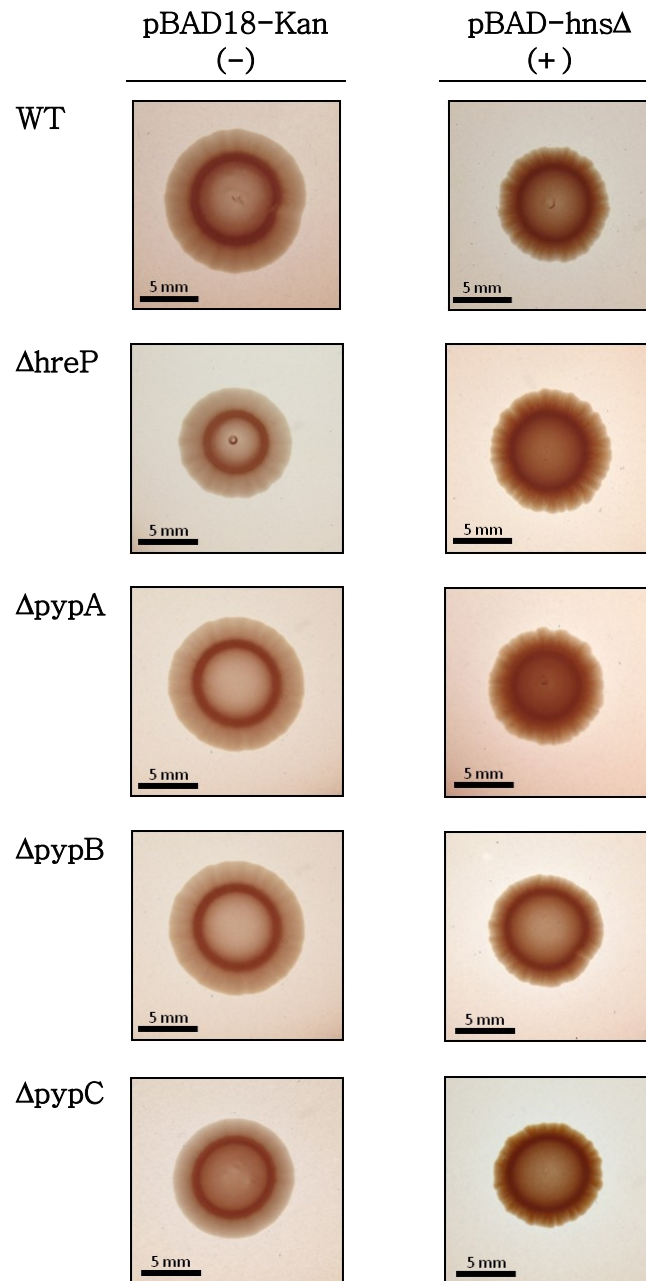


Abbildung 5.6: Nachweis der Biofilmbildung mittels Kongorot-Nähragars.

Untersucht wurden sowohl *Y. enterocolitica* WT als auch die Mutantenstämme GHY14 ($\Delta hreP$), GHY320 ($\Delta pypA$), GHY329 ($\Delta pypB$) und GHY350 ($\Delta pypC$), welche entweder pBAD18-Kan (-) oder pBAD-hns Δ (+) tragen. Um die Expression von H-NS Δ zu induzieren, wurden die Kongorot-Agar mit 0,2 % Arabinose versetzt und für 6 Tage bei 26 °C inkubiert.

Aufgrund der auf den ersten Blick schwachen phänotypischen Ausprägung sind in Abbildung 5.7 zwei Beispiele der beiden Erscheinungsbilder vergrößert dargestellt. Ein besonderes Merkmal stellt der helle Rand und die nur leicht raue Oberfläche der pBAD18-Kan-tragenden *hreP*-Mutante dar (5.7 A). Basierend auf vorangegangene Ergebnisse (5.1.3.1 und 5.1.3.2), weist dieser Phänotyp auf das Fehlen einer Biofilm-assoziierten Matrix hin. Im Gegensatz dazu lässt die Nahaufnahme der pBAD-hns Δ -tragenden *hreP*-Mutante eine raue, braunrote Oberfläche mit fädigen Strukturen erkennen, deren Phänotyp ein Hinweis auf die Bildung von Biofilm ist (5.7 B).

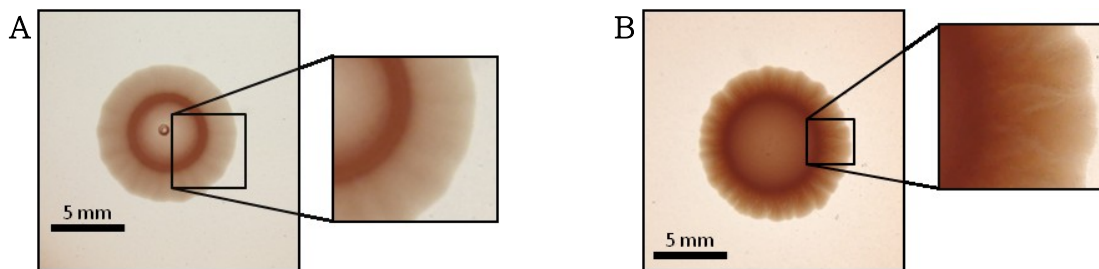


Abbildung 5.7: Vergrößerte Aufnahmen zweier unter Abb. 5.6 dargestellter Kolonien.

Beide Ansichten wurden zur besseren Verdeutlichung als Beispiel der jeweiligen Oberflächenbeschaffenheit gewählt. A stellt die helle und leicht raue, jedoch nicht fädige Oberflächenstruktur von $\Delta hreP$ mit pBAD18-Kan dar, welche keinerlei Biofilmentwicklung aufweist. B lässt im Gegensatz dazu eine rötliche, raue, fädige Oberfläche erkennen, welche ein Indiz für produzierten Biofilm in $\Delta hreP$ mit pBAD-hns Δ ist.

Die Identifizierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes, dessen Gene ausschließlich *in vivo* exprimiert werden, erlaubten neue Einblicke in die komplizierte virulenzassoziierte Regulationsmaschinerie von *Y. enterocolitica*. Bestehend aus der Protease HreP (*host responsive element*) und den Pyp-Proteinen A, B und C (*protein regulating expression of Yersinia hreP*) konnte ein komplexes Netzwerk an Regulationskaskaden nachgewiesen werden. So zeigten Expressionsanalysen einerseits, dass die *hreP*-Transkription durch jedes der drei Pyp-Proteine unabhängig aktiviert werden kann, andererseits aber auch, dass sich PypB und PypC in ihrer Expression sowohl gegenseitig als auch selbst regulieren können. Sowohl der niedrige GC%-Gehalt von *hreP* als auch der der *pyp*-Gene im Vergleich zum restlichen Genom von *Y. enterocolitica* lassen zudem eine negative Regulation durch H-NS vermuten.

In Anlehnung an diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit das universelle Regulatorprotein H-NS als Repressor des regulatorischen Pyp-Netzwerkes in *Y. enterocolitica* identifiziert werden. Da H-NS-Nullmutationen für *Y. enterocolitica* letal zu sein scheinen, wurde für diese Untersuchungen eine trunkierte H-NS-Variante (H-NS Δ) verwendet. Dieses dominant-negative H-NS-Protein ist nach wie vor in der Lage zu multimerisieren, kann infolge eines fehlenden C-Terminus jedoch nicht mehr an DNA binden.

Weiterhin konnte eine vermehrte Biofilmbildung mit der Überproduktion dieser dominant-negativen Variante von H-NS in Verbindung gebracht werden. Analysen unter der Verwendung von verschiedenen *hreP*- und *pyp*-Mutanten kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass dieser Effekt unabhängig von dem regulatorischen Pyp-Netzwerk in *Y. enterocolitica* auftritt.

5.2 Der Tad-Lokus - Untersuchungen zur Prozessierung des Flp-Pilins unter Einfluss von TadV

Typ IV Pili (T4P) sind für die Kolonisierung und oft auch für die Persistenz verschiedenster Bakterien von großer Bedeutung. Eine neuartige Form von Typ IVb Pili beschreiben die sowohl in Gram-negativen und -positiven Bakterien als auch in *Archaea* weit verbreiteten Flp-Pili. Neben unspezifischer Adhärenz an festen Oberflächen vermitteln sie zudem die Bildung von Mikrokolonien sowie hartnäckiger Biofilme (Kachlany *et al.*, 2001b; Tomich *et al.*, 2006).

Die Gene der Flp-Pili sind auf dem *tight adherence*-Lokus (Tad-Lokus) kodiert. Einer der bestuntersuchteten Tad-Loci findet sich in *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*, dem Erreger hoch aggressiver Periodontitis (Kachlany *et al.*, 2001b; Planet *et al.*, 2003).

Die Hauptkomponente der Flp-Pili stellt das Strukturprotein Flp dar. Gemeinsam mit den Pseudopilinen TadE und TadF wird es als Vorläuferprotein synthetisiert und anschließend in der inneren Membran von der spezifischen Präpilinpeptidase TadV proteolytisch gespalten. Hierbei ist die Topologie mit einer N-terminalen Signalsequenz, einer hydrophoben sowie einer C-terminalen

β -faltblattreichen Domäne für eine erfolgreiche Prozessierung durch TadV entscheidend (Strom & Lory, 1987; Tomich *et al.*, 2006).

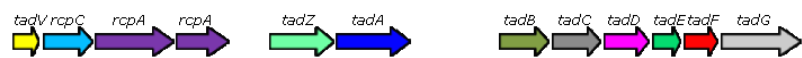
Neben einem vollständig vorhandenen Tad-Lokus konnte in unserer Arbeitsgruppe unlängst PypB als positiver Regulator des Tad-Operons identifiziert werden. Im Gegensatz zu dem Flp-Pilin von *A. actinomycetemcomitans* besitzt *Y. enterocolitica* ein ungewöhnlich kurzes Strukturprotein, dessen vermeintliche Konsensussequenz der Prozessierungsstelle um einen Aminosäurerest reduziert ist (Schilling *et al.*, 2010). Aufgrund der großen Struktur- und Sequenzunterschiede von Flp und der Tatsache, dass bisher nur bedingt ein Tad-assoziiertes Phänotyp in *Y. enterocolitica* beobachtet werden konnte, soll im Rahmen dieser Arbeit anhand von verschiedenen Flp- und TadV-Derivaten die Funktionalität dieser beiden TadV-Komponenten näher untersucht werden. Analysen zu phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der einzelnen Flp-Derivate konnten in diesem Kontext aus Zeitmangel nicht berücksichtigt werden.

5.2.1 Verbreitung des Tad-Lokus in *Yersinia*

Analysen vieler bislang verfügbarer Genomsequenzen lassen die weite Verbreitung des Tad-Lokus in einer Vielzahl von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie in Archaea erkennen. In einigen dieser Organismen konnten zudem nicht nur eine Kopie, sondern gleich mehrere Tad Loci innerhalb des Genoms nachgewiesen werden. Aufgrund des niedrigen GC%-Gehalts dieses Lokus innerhalb der Gattung *Yersinia* und der weiten Verbreitung wird ein Erwerb via horizontalen Gentransfer nicht ausgeschlossen (Tomich *et al.*, 2007). Unabhängig davon konnte erst kürzlich eine direkte Assoziation des Tad-Lokus mit dem direkt stromaufwärts gelegenen Transkriptionsregulator PypB in *Yersinia* belegt werden (Schilling *et al.*, 2010). Bedingt durch die stetige Weiterentwicklung und Sequenzierung bisher noch nicht verfügbarer Genomsequenzen der Gattung *Yersinia* soll im Folgenden eine gegenwärtige Übersicht Einblick in die Organisation verschiedener Tad-Loci innerhalb diverser *Yersinia*-Spezies gewähren (Abb. 5.8).

Hierbei standen sowohl der Tad-Lokus von *A. actinomycetemcomitans* als auch der von *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 und die aller anderen bekannten Genomsequenzen weiterer *Yersinia*-Stämme zum Vergleich. Allgemein ist zu bemerken, dass die einzelnen Gene des Tad-Lokus selten vollständig, jedoch zum Großteil in jedem Genom zu detektieren waren. Die Analysen erfolgten über Vergleiche der Aminosäuresequenzen, ausgehend von der Genomsequenz von *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 sowie über genomische Analysen zur Ermittlung der Organisation einzelner Tad-Loci.

Allen Loci ist eine Organisation innerhalb eines Operons sowie das Fehlen des in *A. actinomycetemcomitans* detektierten *flp-2*-Gens gemein. Darüber hinaus konnte nur in *Y. pestis* kein stromaufwärts gelegener Transkriptionsregulator identifiziert werden. Weitere Vergleiche wiesen in einigen Spezies (*Y. pestis*, *Y. mollaretii*, *Y. aldovae*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii* und *Y. rohdei*) zudem die Abwesenheit des Pilingens *flp* bzw. beider oder nur eines der Pseudopilingene *tadE* und *tadF* auf. Hinzukommend finden sich in den Genomen vieler *Yersiniae* insbesondere im Bereich der Gene *rcpA*, welches für eine Pilus-abhängige Pore in der äußeren Membran kodiert, dem ATPase-kodierenden Gen *tadA* und *tadB* zwei Kopien. Während in *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 und in vielen anderen *Yersinia*-Spezies das Gen *rcpB* fehlt, konnten in *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. kristensenii*, *Y. ruckeri* und *Y. rohdei* parallel zu der Lokalisation in *A. actinomycetemcomitans* hypothetische Proteine nachgewiesen werden. Überdies identifizierte die Sequenzanalyse von *Y. ruckeri* dieses Gen als *rcpBR*.

A. actinomycetemcomitans**Y. enterocolitica subsp. enterocolitica 8081****Y. enterocolitica subsp. palearctica****Y. pseudotuberculosis****Y. pestis****Y. kristensenii****Y. bercovieri****Y. intermedia****Y. mollaretii****Y. ruckeri****Y. frederiksenii****Y. rohdei****Y. aldovae****Abbildung 5.8: Verteilung und genetische Organisation des Tad-Lokus.**

Dargestellt sind die Tad-Loci verschiedener *Yersinia*-Stämme im Vergleich zu dem von *A. actinomycetemcomitans*. Zur besseren Unterscheidung wurden die einzelnen Gene farblich verschieden markiert. Neben *A. actinomycetemcomitans* wurden *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081, *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*, *Y. mollaretii*, *Y. ruckeri*, *Y. frederiksenii*, *Y. rohdei* und *Y. aldovae* auf das Vorhandensein und die Orientierung der dem Tad-Lokus zugehörigen Gene untersucht. Diese Abbildung entspricht nicht der maßstabsgetreuen Darstellung der einzelnen Gene. h. P. = hypothetisches Protein.

5.2.2 Prozessierung des Flp-Präproteins in Abhängigkeit von TadV

Vorangegangene Analysen durch Tomich *et al.* konnten neben der Identifizierung von TadV als spezifische Präpilinpeptidase zudem die Prozessierung von Flp-Präproteinen durch TadV sowohl in *E. coli* als auch in *A. actinomycetemcomitans* nachweisen (Tomich *et al.*, 2006).

Um die Prozessierung des Flp-Präproteins durch die Präpilinpeptidase TadV untersuchen zu können, wurden zunächst über PCR die kodierenden Sequenzen für *flp* und *tadV* amplifiziert (Primer: IB-flp1.f/.HA.r, IB-tadV2.f/.His.r). Damit eine spätere Analyse der Expression möglich ist, wurde jeweils am 3'-Ende des Gens eine DNA-Sequenz für ein Epitop des Influenza-Hämagglutinins (HA) bzw. für eine His₆-Markierung (His) angefügt. Die Produkte wurden gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XbaI* geschnitten und in den *low copy* Vektor pVLT35 (pVLT-flp) bzw. in den Expressionsvektor pBAD18-Kan (pBAD-tadV) kloniert. Der Vorteil dieser Methode besteht in der unabhängigen Induktion der Genexpression durch IPTG (pVLT-flp) oder Arabinose (pBAD-tadV) und anschließenden Detektion durch *tag*-spezifische Antikörper. Zur Kontrolle der Konstrukte wurden *E. coli* BL21 (DE3) zunächst mit den Plasmiden transformiert. Die Selektion erfolgte mittels Antibiotikaresistenzen, die korrekte Organisation der Konstrukte wurde anhand von Sequenzierungen kontrolliert.

Um die Funktionalität der beiden Konstrukte zu testen und gleichzeitig ein neues Analysesystem der Flp-Prozessierung durch TadV zu etablieren, wurde *E. coli* BL21 (DE3) mit pVLT-flp und pBAD-tadV transformiert. Nach einer Induktion der Genexpression über 4 h wurden Bakterienlysate hergestellt und diese in einem 20 % Polyacrylamid-Gel mittels SDS-PAGE getrennt. Die Detektion von Flp erfolgte im *Western Blot* über ein spezifisches Flp-Peptidantiserum, welches die Aminosäurereste KTPLKEIVDTSMTNIKDMVK (dies entspricht den Aminosäureresten 20 bis 39 des reifen Flp-Proteins) erkennt (Schilling *et al.*, 2010).

Zum besseren Verständnis ist in Abbildung 5.9 eine schematische Übersicht über die Proteinorganisation des Flp-Präproteins und der genauen Definition einzelner Aminosäurepositionen dargestellt. Darüber hinaus sind verschiedene Sequenzvergleiche zwischen *A. actinomycetemcomitans* und *Y. enterocolitica* dieser Arbeit angehängt.

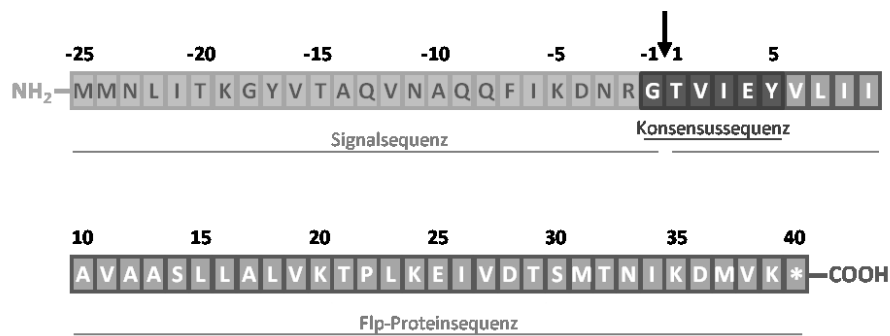


Abbildung 5.9: Schematische Darstellung der Flp-Aminosäuresequenz aus *Y. enterocolitica*.

Das Flp-Präprotein besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, der Konsensussequenz und einem β -faltblattreichen C-Terminus. Die Konsensussequenz ist farblich hervorgehoben. Die Positionen der einzelnen Aminosäuren werden durch die Zahlen wiedergegeben; negative Zahlen beziehen sich auf Positionen innerhalb des Signalpeptids. Ein Pfeil markiert die Schnittstelle, das Sternchen kennzeichnet den Stoppkodon.

Abbildung 5.10 gibt die Ergebnisse der Vorversuche in *E. coli* BL21 (DE3) wieder. Getestet wurde die Proteinexpression von Flp (A1) sowie von Flp und TadV (A2). Eine Prozessierung des Flp-Präproteins sollte durch eine Veränderung der molekularen Masse von 6 kDa auf ungefähr 4 kDa nachgewiesen werden. Zum besseren Vergleich wurden je Bakterienstamm drei unterschiedlich behandelte Kulturen untersucht. So wurde das Medium entweder nur mit 1 mM IPTG (+) oder zusätzlich mit 0,2 % Arabinose (++) versetzt. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Kultur ohne jeglichen Zusatz (-).

Abbildung 5.10 A1 zeigt die Ergebnisse der Überproduktion von pVLT-flp. Sowohl die Behandlung mit IPTG (+) als auch zusätzlich mit Arabinose (++) lassen eine Produktion des Flp-Präproteins mit einer molekularen Masse von 6 kDa erkennen. Im Gegensatz dazu lassen die Ergebnisse in Abbildung 5.10 A2 eine Doppelbande erkennen, sobald Arabinose dem Medium zugesetzt und somit die Genexpression von *tadV* induziert wird (++) , ein Indiz für die Funktionalität der Präpilinpeptidase TadV von *Y. enterocolitica* in *E. coli* und infolgedessen der Prozessierung von Flp-Präproteinen.

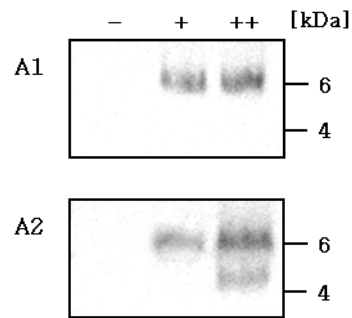


Abbildung 5.10: *Western Blot*-Analyse zur Prozessierung des Flp-Präproteins in Abhängigkeit von TadV in *E. coli*.

E. coli BL21 (DE3)-Stämme, welche entweder nur pVLT-flp (A1) oder pVLT-flp und pBAD-tadV (A2) tragen, wurden für 4 h bei 26 °C und 180 rpm kultiviert. Um sowohl die Expression von Flp als auch die von TadV zu induzieren, wurde das Medium entweder nur mit 1 mM IPTG (+) oder zusätzlich mit 0,2 % Arabinose (++) versetzt. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Kultur ohne jegliche Induktion (-). Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membran überführt. Beide Ansätze wurden im Immunoblot durch ein spezifisches Flp-Peptidantiserum detektiert.

5.2.3 Generierung einer *tadV*-Deletionsmutante unter Verwendung des Suizid-Vektors pEP185.2

Vorangegangene Versuche in *E. coli* (5.2.2) ließen bereits eine Prozessierung des Flp-Präproteins durch die Präpilinpeptidase TadV erkennen. Die Wiederholung dieser Versuche in *Y. enterocolitica* erforderte eine *tadV*-Mutante, um so einen Effekt durch chromosomal-kodiertes TadV auszuschließen.

Zur Konstruktion der *tadV*-Deletionsmutante wurden zunächst jeweils 500 nt der flankierenden Regionen stromaufwärts und stromabwärts des *tadV*-Gens mittels PCR amplifiziert (Primer: IB-tadV4.f/r, IB-tadV5.f/r). Die Produkte wurden gereinigt und mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* geschnitten. Nach erfolgreicher Ligation konnte das nun 1 kb große DNA-Fragment mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *XbaI* erneut restringiert und in den Suizidvektor pEP185.2 ligiert werden. Das daraus resultierende Plasmid pEP- Δ tadV wurde in den Stamm *E. coli* S17-1 λ pir transformiert und nach erfolgreicher Selektion über Konjugation und anschließender homologer Rekombination in das Genom von *Y. enterocolitica* integriert. Die endgültige Deletion des *tadV*-Gens kann durch ein weiteres Rekombinations-Ereignis und dem damit verbundenen Verlust des Plasmids inklusive wildtypischem *tadV*-Allels führen. Hierfür wur-

den positive Transkonjuganten einer Cycloserinanreicherung unterzogen. Die erhaltenen Klone konnten anschließend durch PCR und Sequenzierung als Mutanten des *tadV*-Gens bestätigt werden.

5.2.4 Funktionalität katalytischer Aspartatreste von TadV und deren Einfluss auf die Prozessierung von Flp

Vergleichende Sequenzanalysen des TadV-Proteins aus *A. actinomycetemcomitans* mit TadV-Homologen anderer Organismen lassen eine signifikante Konservierung der Sequenz erkennen. Präpilinpeptidasen des Tad-Lokus besitzen im Gegensatz zu denen in T2S- und T4P-Systemen keine N-terminale N-Methylase, welche für die Methylierung eines Phenylalaninrestes an Position 1 (Phe₁) erforderlich ist. Demzufolge konnten weder in Flp-Pilinen noch in den Pseudopilinen TadE und TadF ein Phenylalaninrest an dieser Position nachgewiesen werden. Basierend auf dieser Feststellung wird sowohl das TadV-Protein von *A. actinomycetemcomitans* als auch enge Homologe in eine neue Unterklasse von Präpilinpeptidasen ohne N-Methylase-Aktivität eingeteilt (Strom *et al.*, 1994; Kachlany *et al.*, 2001b; Tomich *et al.*, 2006).

Weiterhin konnten zwei invariante Aspartatreste an den Positionen 23 (Asp₂₃) und 77 (Asp₇₇) in TadV-Proteinen unterschiedlicher Organismen identifiziert werden. Lokalisiert innerhalb hoch-konservierter Konsensussequenzen in den beiden ersten zytoplasmatischen Schleifen des Proteins weisen diese Bereiche katalytische Aktivität auf. So führen Mutationen dieser Aminosäurereste unwillkürlich zum Funktionsverlust der Präpilinpeptidase (Tomich *et al.*, 2006). Basierend auf den Ergebnissen von Tomich *et al.* wurden zur weiteren Charakterisierung von TadV in *Y. enterocolitica* zwei TadV-Varianten hergestellt und auf deren Aktivität getestet.

Anhand von inverser PCR mit divergenten, überlappenden Oligonukleotidprimern konnten unter der Verwendung von pBAD-tadV als Matrize die Varianten pBAD-tadV_{mut23} und pBAD-tadV_{mut77} generiert werden (Primer: IB-tadV3.inv.f./r und IB-tadV4.inv.f./r). Um die Veränderung der Proteinstruktur

durch den Aminosäureaustausch so gering wie möglich zu halten, handelt es sich bei beiden TadV-Mutationen um eine Substitution des Aspartats durch einen amidierten Asparaginrest. Zur Kontrolle der Plasmide wurden zunächst *E. coli* BL21 (DE3) mit diesen transformiert. Die korrekte Organisation der Konstrukte wurde anhand von Sequenzierungen, die Expression über *Western Blot*-Analysen kontrolliert.

Zur Überprüfung der katalytischen Aktivität von TadV wurden pBAD-tadV_{mut23} sowie pBAD-tadV_{mut77} in *Y. enterocolitica* Δ tadV transformiert, welcher bereits das pVLT-flp-Plasmid trägt. Eine katalytische Funktion der substituierten Aspartatreste (Asp₂₃ und Asp₇₇) würde durch eine fehlende Prozessierung des Flp-Präproteins nachgewiesen werden.

Die Detektion von Flp erfolgte im *Western Blot* über ein spezifisches Flp-Peptidantiserum. Analysiert wurden je Bakterienstamm zwei unterschiedlich induzierte Kulturen. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Kultur ohne jegliche Induktion (-). Getestet wurden *Y. enterocolitica* Δ tadV-Stämme, welche entweder nur zur Kontrolle pVLT-flp (Abb. 5.11 B1) oder überdies pBAD-tadV (Abb. 5.11 B2), pBAD-tadV_{mut23} (Abb. 5.11 B3) bzw. pBAD-tadV_{mut77} (Abb. 5.11 B4) tragen.

Im Vergleich der *Western Blot*-Ergebnisse, konnten sowohl bei der Kontrolle B1, sowie in den TadV-Varianten B3 und B4 keine sichtbare Prozessierung des Flp-Präproteins nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass auch in *Y. enterocolitica* die konservierten Aspartatreste Asp₂₃ und Asp₇₇ eine wichtige Funktion in der katalytischen Aktivität der Präpilinpeptidase besitzen. Gegenüber den Vorversuchen in *E. coli* (5.10 A2) konnte eine fast vollständige Prozessierung von Flp in *Y. enterocolitica* Δ tadV detektiert werden. Neben dem Flp-Präprotein konnte eine weitere Bande durch das Flp-Peptidantiserum detektiert werden. Dies könnte zum einen auf ein Zwischenprodukt der Prozessierung hinweisen, da es über eine molekulare Masse zwischen 6 kDa des Flp-Präproteins und 4 kDa des reifen Flp-Proteins verfügt. Zum anderen könnte dies auf eine mögliche alternative Prozessierung hindeuten oder aber auch auf eine weitere Modifizierung des bereits prozessierten Flp-Proteins.

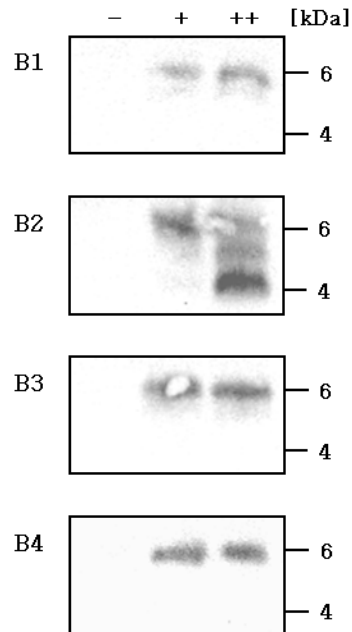


Abbildung 5.11: Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Funktionalität katalytischer Aspartatreste von TadV bei der Prozessierung des Flp-Präproteins in *Y. enterocolitica* Δ tadV.

Y. enterocolitica Δ tadV-Stämme, welche entweder nur pVLT-flp (B1) oder zusätzlich pBAD-tadV (B2), pBAD-tadV_{mut23} (B3) oder pBAD-tadV_{mut77} (B4) tragen, wurden für 4 h bei 26 °C und 180 rpm kultiviert. Um sowohl die Expression von *flp* von *Ptac* als auch die der verschiedenen *tadV*-Derivate von *Para* zu induzieren, wurde das Medium mit 1 mM IPTG (+) oder zusätzlich mit 0,2 % Arabinose (++) versetzt. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Kultur ohne Induktion (-). Die Gesamtzelleextrakte wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membran überführt. Beide Ansätze wurden im Immunoblot durch ein spezifisches Flp-Peptidantiserum detektiert.

In silico-Analysen ergaben, dass nur eine geringe Homologie zwischen Flp-1 von *A. actinomycetemcomitans* und Flp aus *Y. enterocolitica* besteht (siehe Anhang). So weist der N-Terminus des reifen Flp-Proteins u. a. eine verkürzte Konsensussequenz der Prozessierungsstelle auf. Während in vielen T4P insbesondere die Position 5 des invariablen Glutamatrestes (G/(X)₄EY) für die korrekte Pili-Assemblierung von großer Bedeutung ist, befindet sich dieser in *Y. enterocolitica* aufgrund eines fehlenden Valinrestes (Val₁) bereits an Position 4 (G/(X)₃EY). Diese Veränderung findet man in allen Flp-Proteinen der Gattung *Yersinia* und scheint offenbar keine Rolle bei der Prozessierung der Flp-Pilinuntereinheiten zu spielen (Schilling *et al.*, 2010).

Vorangegangene Analysen versuchten bereits eine Beeinträchtigung durch die Änderung der Aminosäuresequenz in der Assemblierung von Flp-Pilinen auszuschließen, indem ein Valin an den N-Terminus des prozessierten Flp-Proteins angehängt wurde (pMMB-pypB-flp+V). Um die Bedeutung des

deletierten Valins für eine erfolgreiche Prozessierung in *Y. enterocolitica* zu ermitteln, wurde das bereits generierte *flp*-Derivat mittels PCR amplifiziert (Primer: IB-*flp*1.f/.HA.r). Das Produkt wurde gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XbaI* geschnitten und in den Vektor pVLT35 (pVLT-*flp*+ V) kloniert. Nach der Transformation von *E. coli* BL21 (DE3) und der erfolgreichen Selektion und Sequenzierung konnte pVLT-*flp*+ V anschließend gemeinsam mit jeweils einer der drei pBAD-*tadV*-Varianten in *Y. enterocolitica* Δ *tadV* übertragen werden. Für die späteren *Western Blot*-Untersuchungen wurde nach dem etablierten Analysesystem verfahren. Die Detektion von Flp erfolgte abermals über ein spezifisches Flp-Peptidantiserum. Eine Zusammenfassung der in den *Western Blot*-Analysen C verwendeten Expressionskonstrukte und deren genetischen Veränderungen sind in der folgenden Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Verwendete Plasmide. Angegeben sind die verwendeten Expressionskonstrukte und deren Mutationen im *tadV*-Gen.

Blot	Stamm	Plasmid	Aminosäurenaustausch	
C1	<i>Y. enterocolitica</i> Δ <i>tadV</i>	pVLT- <i>flp</i> + V pBAD- <i>tadV</i>	+ Val _{-1/1}	-
C2	<i>Y. enterocolitica</i> Δ <i>tadV</i>	pVLT- <i>flp</i> + V pBAD- <i>tadV</i> _{mut23}	+ Val _{-1/1} Asp ₂₃	- → Asn ₂₃
C3	<i>Y. enterocolitica</i> Δ <i>tadV</i>	pVLT- <i>flp</i> + V pBAD- <i>tadV</i> _{mut77}	+ Val _{-1/1} Asp ₇₇	- → Asn ₇₇

Wie bereits in den Abbildungen 5.11 B3 und B4 zu beobachten war, führen auch hier (Abb. 5.12 C2 und C3) die Substitutionen beider Aspartate durch Asparagine zu einem Funktionsverlust der Präpilinpeptidase. So konnte in beiden Immunoblots nur das unprozessierte Flp-Pilin mit einer molekularen Masse von 6 kDa detektiert werden. Demgegenüber lässt das *flp*+ V-Derivat trotz Verschiebung der Konsensussequenz eine proteolytische Spaltung des Flp-Präproteins erkennen (Abb. 5.12 C1). Verglichen mit den Ergebnissen aus den *Western Blot*-Analysen in Abbildung 5.11 B1 scheint diese allerdings geringer zu sein. Auch hier konnte neben den spezifischen Banden von 6 und 4 kDa eine dritte detektiert werden. In wie weit dies allerdings mit der Funktionalität von TadV oder der spezifischen Konsensussequenz in der Gattung *Yersinia* zusammenhängt, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

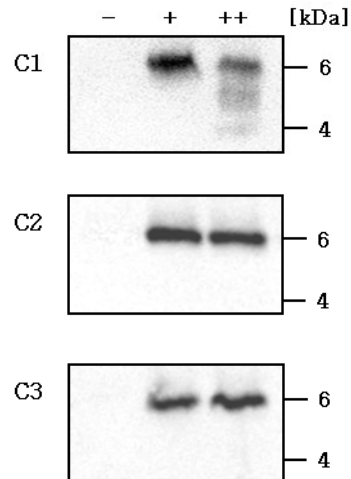


Abbildung 5.12: *Western Blot*-Analyse zur Untersuchung des Einflusses eines eingefügten Valinrestes auf die Prozessierung des Flp-Präproteins in *Y. enterocolitica* Δ *tadV*.

Y. enterocolitica Δ *tadV*-Stämme, welche pVLT-flp+V und pBAD-tadV (C1) oder eines der Derivate pBAD-tadV_{mut23} (C2) oder pBAD-tadV_{mut77} (C3) tragen, wurden für 4 h bei 26 °C und 180 rpm kultiviert. Um sowohl die Expression von *flp* von *Ptac* als auch die der verschiedenen *tadV*-Derivate von *Para* zu induzieren, wurde das Medium mit 1 mM IPTG (+) oder zusätzlich mit 0,2 % Arabinose (++) versetzt. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Kultur ohne jegliche Induktion (-). Die Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membran überführt. Beide Ansätze wurden im Immunoblot durch ein spezifisches Flp-Peptidantiserum detektiert.

5.2.5 Bedeutung des G/(X)₃EY-Motivs von Flp für die Prozessierung

Bei allen T4P, insbesondere bei Typ IVb Pili, weist das G/(X)₄EY-Motiv der TadV-Prozessierungsstelle eine hohe Konserviertheit auf. Wie bereits in Kapitel 5.2.4 erwähnt, besitzen Flp-Pili der Gattung *Yersinia* durch die Deletion des Val₁ ein verkürztes Motiv. Durch eine Insertion dieses Valinrestes konnte bereits gezeigt werden, dass innerhalb der Konsensussequenz die verrückten Positionen der nachfolgenden konservierten Aminosäuren keinen direkten Einfluss auf die Prozessierung des Präproteins durch TadV haben. Anknüpfend an diese Ergebnisse soll die Bedeutung des G/(X)₃EY-Motivs für die Flp-Prozessierung in *Y. enterocolitica* näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden für jeden Aminosäurerest der Konsensussequenz durch Substitutionen jeweils zwei Varianten generiert.

Aminosäuren werden aufgrund ihres entsprechenden Restes u. a. in hydrophobe und hydrophile bzw. saure, basische, aromatische und neutrale

Aminosäuren klassifiziert (Tab. 5.2). Basierend auf dieser Einteilung entspricht die erste Substitutionsvariante einem Rest mit ähnlichen Eigenschaften, während für die zweite Mutation eine Aminosäure mit konträren Merkmalen gewählt wurde.

Tabelle 5.2: Übersicht über die biochemischen Eigenschaften der 20 proteinogenen Aminosäuren. Dargestellt sind die spezifischen Eigenschaften der 20 am weitest verbreiteten Aminosäureseitenketten. Zutreffende Charakteristika sind jeweils mit einem Punkt gekennzeichnet (Kyte & Doolittle, 1982; Taylor, 1986; Koolman & Röhm, 2003; Emery, 2005).

		Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	
Größe	winzig	•				•			•								•					
	klein			•	•	•										•		•			•	
	groß		•				•	•		•	•	•	•	•	•				•	•		
Charakter	aliphatisch	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•			•	•			•	
	aromatisch									•					•				•	•		
	zyklisch															•						
	amidiert			•			•															
	hydroxyliert																•	•		•		
	schwefelhaltig					•								•								
	sauer				•			•														
	neutral	•		•		•	•		•		•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•
	basisch		•							•			•									
Polarität	polar		•	•	•		•	•		•			•	•		•	•	•	•	•	•	
	unpolar	•				•			•		•	•			•						•	
Ladung	kationisch		•							•			•									
	anionisch				•			•														
Hydrophobizität	hydrophob	•				•			•		•	•		•	•	•			•	•	•	
	hydrophil		•	•	•		•	•		•			•				•	•				

Allgemein werden solche Substitutionen durch inverse PCR mit divergent überlappenden Primern erzeugt. Aufgrund der Plasmidgröße des pVLT-flp von 10 kb stellte sich diese Variante allerdings als nicht optimal heraus. Im Gegensatz dazu brachte eine Kombination aus restriktionsfreiem Klonieren und überlappender Extension die gewünschten Ergebnisse (Ho *et al.*, 1989; Unger *et al.*, 2010). Mit dieser Methode wurden die verschiedenen *flp*-Derivate durch drei einzelne PCR-Reaktionen generiert. Eine schematische Übersicht der einzelnen Reaktionsschritte ist in Abbildung 5.13 wiedergegeben.

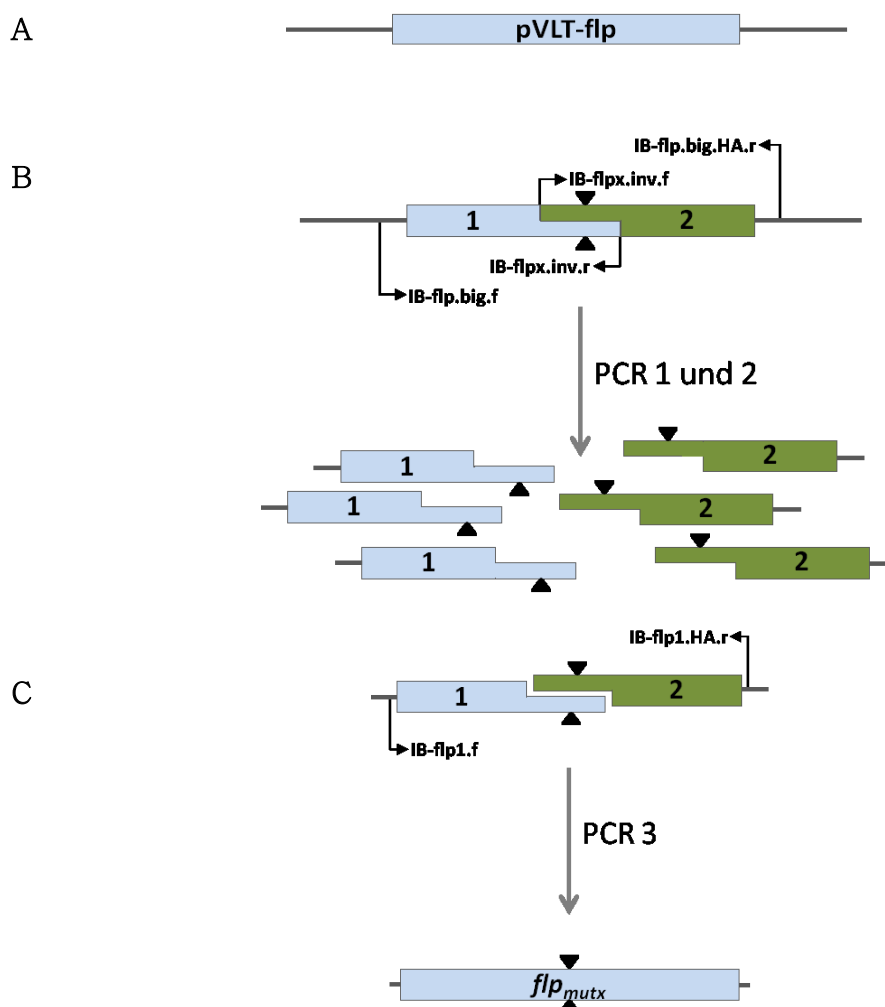


Abbildung 5.13: Schematische Darstellung der einzelnen PCR-Reaktionen zur Generierung verschiedener *flp*-Derivate

A) Genetische Organisation des *flp*-Gens innerhalb des Vektors pVLT35.

B) PCR-Reaktionen 1 und 2. Mit Hilfe der Primer-Paare IB-flp.big.f/IB-flpx.inv.r und IB-flpx.inv.f/IB-flp.big.HA.r werden zwei Einzelfragmente amplifiziert. Das Dreieck markiert die Stelle der über die Primer eingebrachten Mutation.

C) PCR-Reaktion 3. Unter der Verwendung der Primer IB-flp1.f und IB-flp1.HA.r erfolgt die Amplifikation von *flp_{mutx}*. Die zuvor generierten Einzelfragmente von *flp* dienen hierbei als Matrize. Das Amplifikat kann anschließend restringiert und in den Vektor pVLT35 ligiert werden.

Im ersten Schritt wurden mit Hilfe divergent überlappender Primer und Primern, welche sowohl im Plasmid als auch in dem *flp*-Gen binden, zwei Einzelfragmente amplifiziert und die Mutation eingeführt (Abb. 5.13 B) (Primer: IB-flp.big.f/.HA.r, IB-flp1.inv2.f/.r, IB-flp2.inv2.f/.r, IB-flp3.inv.f/.r, IB-flp4.inv2.f/.r, IB-flp5.inv2.f/.r, IB-flp6.inv.f/.r, IB-flp7.inv.f/.r, IB-flp8.inv2.f/.r, IB-flp9.inv.f/.r, IB-flp10.inv.f/.r, IB-flp11.inv2.f/.r, IB-flp12.inv2.f/.r). Diese Produkte dienten in einer weiteren PCR-Reaktion als Matrize (Abb. 5.13 C) (Primer: IB-flp1.f/IB-flp1.HA.r). Anschließend wurde das DNA-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XbaI* geschnitten und in den Vektor pVLT35 ligiert (pVLT-flp_{mutx}). Zur Kontrolle wurden zunächst *E. coli* BL21 (DE3) mit den einzelnen Plasmiden transformiert.

Zum besseren Verständnis finden sich in Tabelle 5.3 detailliertere Informationen über die einzelnen Flp-Derivate mitsamt Plasmidbezeichnung sowie Erklärungen zu den jeweiligen Substitutionen.

Tabelle 5.3: Gerichtete Mutationen des Plasmids pVLT-flp. Angegeben sind die in der *Western Blot*-Reihe D (Abb. 5.14) verwandten Varianten von pVLT-flp mit Erläuterungen zu den einzelnen genetischen Veränderungen.

Blot	Plasmid	Substitution	Aminosäurenaustausch	
D1	pVLT-flp _{mut1}	G <u>C</u> T ACG GTT ATT GAG TAC	Gly ₋₁	→ Ala ₋₁
D2	pVLT-flp _{mut2}	<u>TGG</u> ACG GTT ATT GAG TAC	Gly ₋₁	→ Trp ₋₁
D3	pVLT-flp _{mut3}	GGT <u>TCG</u> GTT ATT GAG TAC	Thr ₁	→ Ser ₁
D4	pVLT-flp _{mut4}	GGT <u>TAC</u> GTT ATT GAG TAC	Thr ₁	→ Tyr ₁
D5	pVLT-flp _{mut5}	GGT ACG <u>A</u> TT ATT GAG TAC	Val ₂	→ Ile ₂
D6	pVLT-flp _{mut6}	GGT ACG <u>CG</u> T ATT GAG TAC	Val ₂	→ Arg ₂
D7	pVLT-flp _{mut7}	GGT ACG GTT <u>C</u> TT GAG TAC	Ile ₃	→ Leu ₃
D8	pVLT-flp _{mut8}	GGT ACG GTT <u>CAT</u> GAG TAC	Ile ₃	→ His ₃
D9	pVLT-flp _{mut9}	GGT ACG GTT ATT <u>C</u> AG TAC	Glu ₄	→ Gln ₄
D10	pVLT-flp _{mut10}	GGT ACG GTT ATT <u>TAC</u> TAC	Glu ₄	→ Tyr ₄
D11	pVLT-flp _{mut11}	GGT ACG GTT ATT GAG <u>T</u> T	Tyr ₅	→ Phe ₅
D12	pVLT-flp _{mut12}	GGT ACG GTT ATT GAG <u>ATG</u>	Tyr ₅	→ Met ₅

Die Expressionsanalysen erfolgten in der TadV-Mutante *Y. enterocolitica* Δ *tadV* über Immunoblots, hierbei wurde nach dem etablierten System unter Verwendung des Plasmids pBAD-tadV zur Kontrolle der Flp-Prozessierung verfahren. Verglichen werden jeweils Mutanten mit verwandten

Aminosäureresten gegenüber Mutanten mit Aminosäuren konträrer Eigenschaften. Die dazugehörigen Ergebnisse sind jeweils nebeneinander abgebildet.

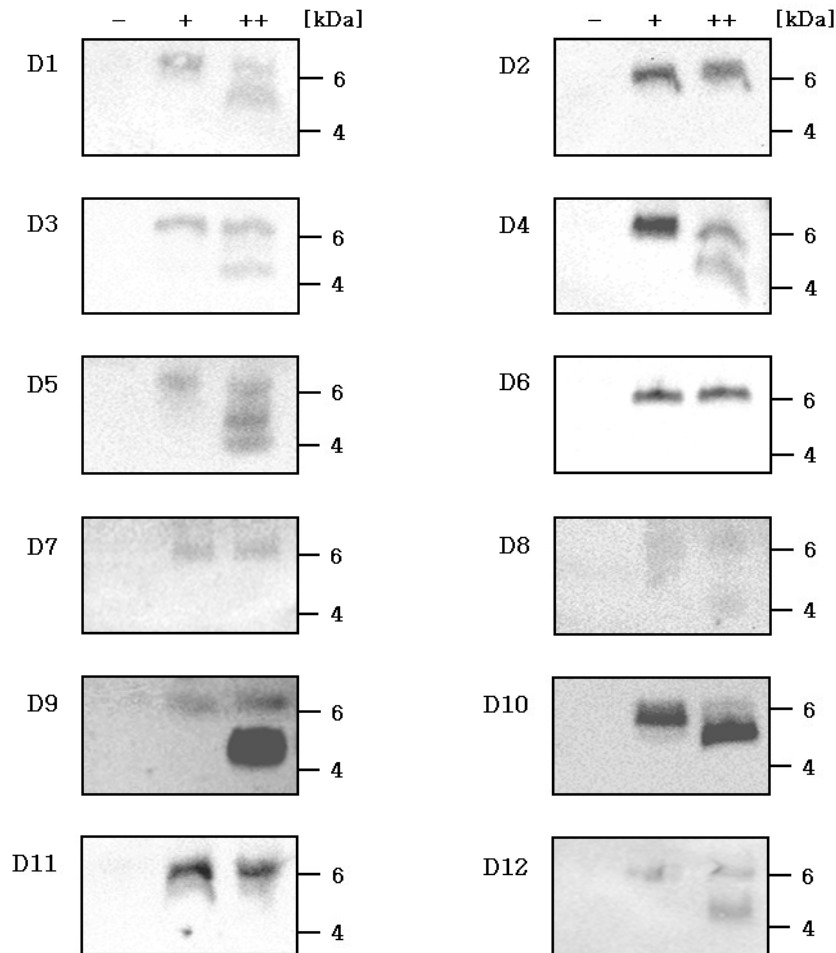


Abbildung 5.14: Western Blot-Analyse zur Charakterisierung des G/(X)₃EY-Motivs des Flp-Präproteins in Hinblick auf die Prozessierung durch TadV in *Y. enterocolitica* Δ tadV.

Y. enterocolitica Δ tadV-Stämme, welche pBAD-tadV und verschiedene Derivate von pVLT-flp tragen, wurden für 4 h bei 26 °C und 180 rpm kultiviert. Zur Charakterisierung der Konsensussequenz wurden gerichtete Substitutionen innerhalb dieser Region des Flp-Präproteins eingebracht. Um sowohl die Expression der verschiedenen flp-Derivate als auch die von tadV zu induzieren, wurde das Medium mit 1 mM IPTG (+) oder zusätzlich mit 0,2 % Arabinose (++) versetzt. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Kultur ohne jegliche Induktion (-). Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membran überführt. Alle 12 Ansätze wurden im Immunoblot durch ein spezifisches Flp-Peptidantiserum detektiert. Übersicht der getesteten Substitutionen: D1: Gly₋₁ → Ala₋₁, D2: Gly₋₁ → Trp₋₁, D3: Thr₁ → Ser₁, D4: Thr₁ → Tyr₁, D5: Val₂ → Ile₂, D6: Val₂ → Arg₂, D7: Ile₃ → Leu₃, D8: Ile₃ → His₃, D9: Glu₄ → Gln₄, D10: Glu₄ → Tyr₄, D11: Tyr₅ → Phe₅, D12: Tyr₅ → Met₅.

In Abbildung 5.14 D1 lässt sich trotz Substitution von Glycin (Gly₋₁) durch eine andere aliphatische Aminosäure (Ala₋₁) mit ähnlicher Größe, neutralem pK_S-Wert und hydrophobem Charakter eine Prozessierung des Flp-Präproteins erkennen, während der Austausch durch eine Aminosäure mit stark abweichen-

den Eigenschaften die proteolytische Spaltung durch TadV blockiert (D2). So weisen Gly₋₁ und Trp₋₁ lediglich in der Hydrophobizität und in ihrem neutralem pK_S-Wert eine Übereinstimmung auf, obgleich sie sich in Größe und Struktur unterscheiden. Dieses Ergebnis bestätigt sich auch für die Substitution des hydrophoben Valinrestes (Val₂). Während der Austausch durch eine andere unpolare und hydrophobe Aminosäure (Ile₂) mit ähnlichem pK_S-Wert keinen Einfluss auf die Prozessierung zu haben scheint (D5), ist dieser Effekt durch das Auswechseln in die hydrophile, basische Aminosäure Arginin (Arg₂) nicht länger zu beobachten (D6). Weiterhin konnte auch in der *Western Blot*-Analyse D5 eine weitere Bande durch das Flp-Peptidantiserum detektiert werden.

Mutationen in den Aminosäuren Isoleucin (Ile₃) und Tyrosin (Tyr₅) scheinen hingegen genau das Gegenteil zu bewirken. So weist sowohl die Substitution von Isoleucin durch die isomere Aminosäure Leucin (Leu₃) (D7) als auch die von Tyrosin durch das ebenfalls aromatische und hydrophobe Phenylalanin (Phe₅) (D11) eine Störung in der proteolytischen Spaltung des Flp-Präproteins auf. Wohingegen der Ersatz durch nicht verwandte Aminosäuren mit anderen Eigenschaften keinen Effekt auf die Prozessierung zu haben scheint. Hierbei handelt es sich zum einen um einen Austausch von Ile₃ durch das aromatische und hydrophile Histidin (His₃) (D8), zum anderen durch die Substitution von Tyr₅ durch das schwefelhaltige und aliphatische Methionin (Met₅) (D12).

Ein weiterer, interessanter Effekt kann überdies in den Abbildungen D9 und D10 beobachtet werden. So wird bei einer Substitution der Glutaminsäure (Glu₄) durch das amidierte Glutamin (Gln₄) vermehrt prozessiertes Flp detektiert (D9). Ein Austausch durch eine aromatische, hydroxylierte Aminosäure mit hydrophobem Charakter wie Tyrosin (Tyr₄) scheint hingegen nur zu einem Teil eine enzymatische Spaltung des Präproteins zu ermöglichen (D10), einen Hinweis darauf gibt die Detektion eines im Vergleich zum Flp-Präprotein etwas kleineren Proteinfragments durch das Flp-Peptidantiserum.

Im Gegensatz dazu lässt der Austausch des Threoninrestes (Thr₁) sowohl durch eine andere hydroxylierte und hydrophile Aminosäure wie Serin (Ser₁) (D3) als auch durch die aromatische Aminosäure Tyrosin (Tyr₁) (D4) eine proteolytische Spaltung von Flp erkennen.

Neben den Flp-Derivaten, welche durch eine gerichtete Mutation genetisch verändert wurden, wurden zudem weitere Varianten untersucht, die durch willkürliche Mutationen entstanden sind. Eine Übersicht dieser einzelnen Flp-Mutanten gibt die Tabelle 5.4 wieder.

Tabelle 5.4: Willkürliche Mutationen des Plasmids pVLT-flp. Angegeben sind die in der *Western Blot*-Reihe E verwandten Varianten von pVLT-flp mit Erläuterungen zu den einzelnen genetischen Veränderungen.

Blot	Plasmid	Mutationen	Genetische Veränderung	Aminosäuren
E1	pVLT-flp _{mut13}	Substitution	T <u>T</u> A → T <u>T</u> T	Leu ₋₂₂ → Phe ₋₂₂
E2	pVLT-flp _{mut15}	Substitution	G <u>A</u> G → G <u>T</u> G	Glu ₄ → Val ₄
		Substitution	T <u>A</u> C → T <u>A</u> T	Tyr ₅ → Met ₅
E3	pVLT-flp _{mut16}	Insertion	TTG → <u>C</u> TT G	Leu ₇ → Val _{ins7}
E4	pVLT-flp _{mut17}	Substitution	G <u>T</u> T → G <u>A</u> T	Val ₃₈ → Asp ₃₈

Während der Generierung der in Tabelle 5.3 dargestellten *flp*-Derivate wurden oftmals willkürliche Mutationen im *flp*-Gen durch Sequenzierungen detektiert. Einige dieser Mutationen, welche Substitutionen, Insertionen und in Folge dessen oftmals eine Verschiebung des Leserasters beinhalten, wurden zur weiteren Charakterisierung konservierter Aminosäuren und deren Bedeutung für die Prozessierung nach bewährtem Verfahren über Immunoblots analysiert. In Abbildung 5.15 sind die Ergebnisse der einzelnen *Western Blot*-Analysen wiedergegeben. Die Reihenfolge steht dabei in Abhängigkeit mit der Position der Mutation innerhalb des *flp*-Gens ausgehend von 5' nach 3'.

Die erste getestete Mutation stellt eine Substitution eines aliphatischen Leucinrestes (Leu₋₂₂) durch einen aromatischen Phenylalaninrest (Phe₋₂₂) innerhalb der Signalsequenz dar (E1). Trotz der strukturellen Unterschiede der Aminosäureseitenketten kann durch den Austausch kein negativer Effekt auf die Prozessierung beobachtet werden.

Während Substitutionen der konservierten Aminosäuren Glutamat (Glu₄) und Tyrosin (Tyr₅) innerhalb der Konsensussequenz nur bedingt einen Einfluss auf die Prozessierung des Flp-Präproteins zu haben scheinen (5.14 D9-D12), bewirkt ein Austausch beider Aminosäuren einen negativen Effekt auf die Reifung des Proteins (E2). Im Vergleich zu dem Ergebnis D12 konnte einem Austausch des Tyrosins durch einen Methioninrest kein Effekt auf die

Prozessierung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu scheint die Substitution des sauren, hydrophilen und zudem anionischem Glutamatrestes durch den eines hydrophoben, ungeladenen Valins die proteolytische Spaltung durch TadV negativ zu beeinflussen.

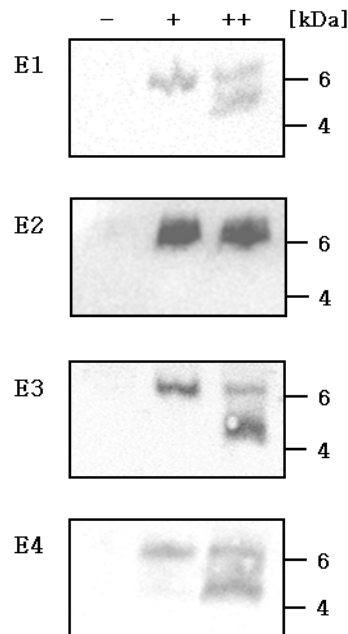


Abbildung 5.15: Western Blot-Analyse zur Charakterisierung der Prozessierung des Flp-Präproteins in *Y. enterocolitica* Δ tadV.

Y. enterocolitica Δ tadV-Stämme, welche pBAD-tadV und verschiedene Derivate von pVLT-flp tragen, wurden für 4 h bei 26 °C und 180 rpm kultiviert. Zur näheren Charakterisierung der Flp-Prozessierung wurden willkürlich Mutationen in das *flp*-Gen eingebracht. Um sowohl die Expression der verschiedenen Flp-Derivate als auch die von TadV zu induzieren, wurde das Medium mit 1 mM IPTG (+) oder zusätzlich mit 0,2 % Arabinose (++) versetzt. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Kultur ohne jegliche Induktion (-). Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membran überführt. Beide Ansätze wurden im Immunoblot durch ein spezifisches Flp-Peptidantiserum detektiert. Übersicht der getesteten Mutationen: E1: Leu₋₂₂ → Phe₋₂₂, E2: Glu₄ → Val₄ und Tyr₅ → Met₅, E3: Leu₇ → Val_{Ins7}, E4: Val₃₈ → Asp₃₈.

Anders verhält es sich bei Mutationen innerhalb der Flp-Proteinsequenz. Sowohl eine Insertion (E3) als auch Substitution (E4) innerhalb dieses Bereichs scheint keinen direkten Einfluss auf die Prozessierung des Proteins zu haben. Jedoch zeigen die für E3 vergleichenden Sequenzanalysen in Abbildung 5.16, dass sich die durch die Insertion eines Cytosins resultierende Proteinstruktur und infolgedessen auch die Funktionalität stark von dem wildtypischen Flp-Pilin unterscheidet. Dies unterstützt jedoch die Vermutung, dass nur die Erken-

nungssequenz und der N-Terminus, nicht aber das C-terminale Ende, für die Reifung des Flp-Pilins von Bedeutung sind.

```

Flp MMNLITKGYVTAQVNAQQFIKDNRGTVIEYVLI IAVAASLLALVKTPLKEIVDTSMTNIKDMVK* - - - - 65
E1 MMNFIKGYVTAQVNAQQFIKDNRGTVIEYVLI IAVAASLLALVKTPLKEIVDTSMTNIKDMVK* - - - - 65
E2 MMNLITKGYVTAQVNAQQFIKDNRGTVIMVLI IAVAASLLALVKTPLKEIVDTSMTNIKDMVK* - - - - 65
E3 MMNLITKGYVTAQVNAQQFIKDNRGTVIEYVLDYCCSRLITGLSKNA - - - VEGDRRYIHDKHKRHG* I 65
E4 MMNLITKGYVTAQVNAQQFIKDNRGTVIEYVLI IAVAASLLALVKTPLKEIVDTSMTNIKDMDK* - - - - 65

```

Abbildung 5.16: Sequenzvergleich der verschiedenen *flp*-Derivate.

Dargestellt sind die einzelnen Flp-Sequenzen im Vergleich zum wildtypischen Flp in *Y. enterocolitica*. Die grauen Buchstaben stellen die durch die Mutationen resultierenden Veränderungen innerhalb der Aminosäuresequenz dar. Das graue Kästchen verdeutlicht noch einmal die Aminosäuresequenz des Flp-Peptidantiserums. * = Stoppkodon.

In Anlehnung an die Charakterisierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes in *Y. enterocolitica* zeigten *in silico*-Analysen, dass *pypB* nicht nur direkt stromaufwärts des Tad-Lokus lokalisiert ist, sondern zudem als direkter Regulator dieser genomischen Insel fungiert. Dieser Tad-Lokus kodiert in vielen Gram-negativen und -positiven Bakterien aber auch in *Archeae* für eine neuartige Form von Typ IVb Pili, welche unspezifische Bindungen an festen Oberflächen sowie die Bildung von Mikrokolonien und hartnäckigen Biofilmen vermitteln. Obwohl der Tad-Lokus in Bakterien weit verbreitet ist, gibt es nur wenige Informationen über die Pilusexpression, deren Biogenese sowie den daraus resultierenden Phänotyp in *Y. enterocolitica*.

Zu diesem Zweck sollte im Rahmen dieser Arbeit die Prozessierung des Strukturproteins Flp durch die Präpilinpeptidase TadV näher untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde ein System zur Analyse der Prozessierung des Flp-Präproteins durch TadV sowohl in *E. coli* als auch in einer TadV-Deletionsmutante von *Y. enterocolitica* etabliert. Innerhalb dieses Systems wurden gerichtete Mutationen in *tadV* und *flp* eingefügt und die Effekte mit Hilfe von Immunoblots detektiert. Anhand einzelner Substitutionen innerhalb der konservierten Konsensussequenz des Strukturproteins war es möglich Unterschiede in der Prozessierung zu detektieren, jedoch konnten angesichts dieser Ergebnisse weder Aussagen über die Assemblierung und Funktionalität des Pilins noch über den damit einhergehenden Phänotyp getroffen werden.

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes

Humanpathogene *Y. enterocolitica* zählen neben *Salmonella* und *Campylobacter* zu den dritthäufigsten Enteritiserregern innerhalb Deutschlands (Bonardi *et al.*, 2010). Die Invasion des Wirtsorganismus sowie das dortige Überleben werden hierbei durch eine Vielzahl von Virulenzfaktoren ermöglicht. Mit Hilfe der *in vivo* Expressionstechnologie (IVET) wurden so in *S. typhimurium* über 100 Gene identifiziert, so genannte *in vivo induced genes (ivi)*. Darüber hinaus konnten in *Y. enterocolitica* mit dieser Methode u. a. die *hre*-Loci ermittelt werden, eine Reihe von unterschiedlichen Virulenzgenen, deren Expression insbesondere in der frühen Infektionsphase innerhalb der Peyer'schen Plaques (PP) erfolgt (Mahan *et al.*, 1993, 1995; Young & Miller, 1997; Mahan *et al.*, 2000).

HreP (*hre-22*) kodiert die virulenzassoziierte Protease HreP, die Homologien zu Proteinen aus der Familie der eukaryotischen Subtilisin-/Kexin-ähnlichen Proteasen besitzt. Eine Transposonmutagenese detektierte zudem drei positive *hreP*-Regulatoren: PypA, PypB und PypC (*protein regulating expression of Yersinia hreP*, PypA, B, C). Während bei PypA bisher wenig über Funktion und Evolution bekannt ist, weisen sowohl PypB als auch PypC Homo-

logien zu Proteinen des Tox-Systems in *Vibrio cholerae* auf (Heusipp *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2009).

Expressionsanalysen zeigten, dass die *hreP*-Transkription durch jedes der drei Pyp-Proteine unabhängig aktiviert werden kann, jedoch eine Art Regulationskaskade in diesem Zusammenhang besteht. So regulieren sich PypB und PypC in ihrer Expression sowohl gegenseitig als auch selbst (Wagner *et al.*, 2009). Des Weiteren konnten sowohl PypB als auch PypC als Transkriptionsregulatoren stromaufwärts gelegener Gencluster identifiziert werden. Während PypC in die Regulation des Typ-II-Sekretionssystems- Yts2-T2SS involviert ist, konnte PypB die positive Regulation des Tad-Operons in *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (Shutinoski *et al.*, 2009; Schilling *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit konnte das universelle Regulatorprotein H-NS als Repressor des regulatorischen Pyp-Netzwerkes in *Y. enterocolitica* identifiziert werden. Die Generierung einer trunkierten H-NS-Variante (H-NS Δ) zeigte, dass sowohl die Expression von *hreP* als auch von dessen Regulatoren *pypA*, *pypB* und *pypC* durch die Überproduktion von H-NS Δ direkt inhibiert wird. Weiterhin konnte eine vermehrte Biofilmbildung mit der Überproduktion dieser dominant-negativen Variante von H-NS in Verbindung gebracht werden.

6.1.1 H-NS reprimiert die Expression von *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC*

Bakterielle Adaption, bedingt durch Veränderungen innerhalb ökologischer Nischen, aber auch durch die Besiedlung neuer Umgebungen, stellt eine treibende Kraft in der genetischen Reorganisation bakterieller Genome dar (Altermann, 2012). Neben der regulatorischen Adaption, die auf der Ebene der Genexpression erfolgt, haben Bakterien weitere Strategien zur Erlangung genetischer Diversität entwickelt. In diesem Zusammenhang wird die genomische Flexibilität häufig durch Punktmutationen, Rekombinationen innerhalb homologer DNA-Regionen und den Einfluss vertauschbarer genetischer Elemente erzielt. Darüber hinaus werden der Erwerb und die Verbreitung von Genen mittels horizontalem Gentransfer (HGT) begünstigt. Neben einer verbesserten

Anpassung an sich fortwährend ändernde Umweltbedingungen birgt die Integration von Fremd-DNA in das bakterielle Genom jedoch auch Risiken, welche potentielle Störungen in der Regulation des Kerngenoms oder den Verlust der Fitness bewirken können (Dorman, 2004, 2009). In vielen Gram-negativen Bakterien spielt daher die Repression horizontal erworbener Gene durch H-NS (*histone-like nucleoid structuring protein*) eine große Rolle. Obwohl bis heute der Mechanismus kontrovers diskutiert wird, weisen diese Gene im Verhältnis zum Genom einen niedrigeren GC%-Gehalt auf. Es wird vermutet, dass diese Abweichungen entscheidend für die Differenzierung zwischen fremder und eigener DNA sind; so bindet H-NS vorzugsweise an AT-reiche DNA-Regionen (Zamenhof *et al.*, 1952; Navarre *et al.*, 2006, 2007; Gordon *et al.*, 2011).

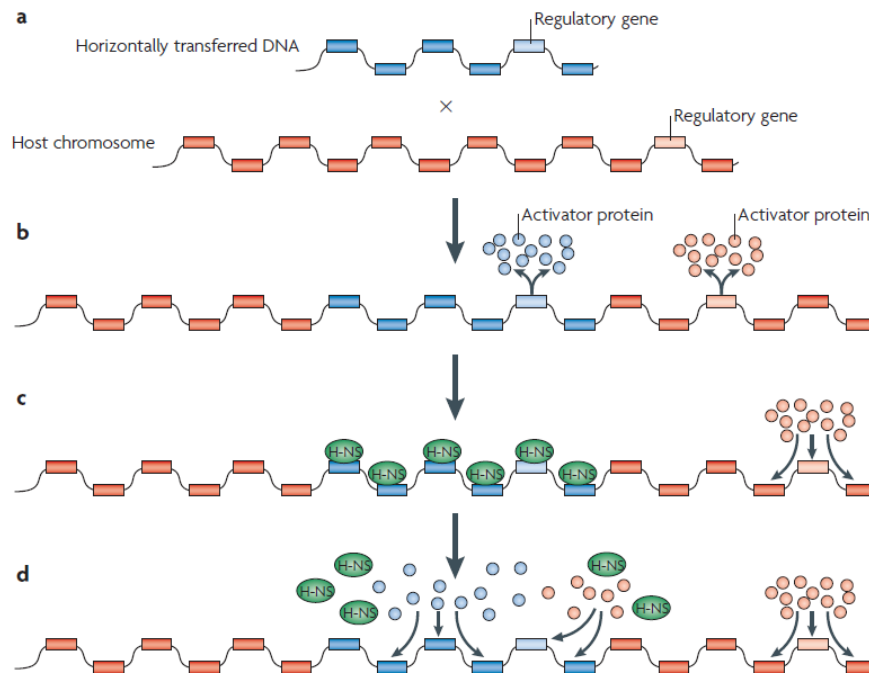


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Integration xenogenetischer DNA und deren Regulation durch H-NS.

A) Als Ergebnis horizontalen Gentransfers wird ein DNA-Segment aus 6 Genen in die Zelle aufgenommen (blau). Eines der Gene (hellblau) stellt ein regulatorisches Gen dar, welches die eigene Transkription, aber auch die der anderen 5 Gene, aktivieren kann.

B) Das DNA-Segment wird in das Wirtschromosom integriert.

C) Sobald die DNA aufgrund ihres niedrigeren AT%-Gehalts durch H-NS als xenogenetisch identifiziert worden ist, werden die Gene durch Anlagerung des universellen Regulators in ihrer Transkription reprimiert. Dies soll potentielle Störungen im Kerngenom durch die neu erworbene DNA unterbinden.

D) Durch verschiedenste Mechanismen kann die Repression durch H-NS aufgehoben und die Expression der Gene induziert werden (Dorman, 2007).

Der Gehalt an Guanosin und Cytosin innerhalb des Genoms von *Y. enterocolitica* beträgt 47 %. Interessanterweise konnte jedoch sowohl für das virulenzassoziierte *hreP*-Gen als auch für die Gene der Regulatoren PypA, PypB und PypC ein geringerer GC%-Gehalt zwischen 30 % und 42,5 % ermittelt werden. Die Assoziation von *pypB* und *pypC* mit Pathogenitätsinseln und flexiblen genomischen Regionen sowie die Tatsache, dass *hreP* in keiner anderen *Yersinia*-Spezies nachgewiesen werden kann, geben zudem weitere Hinweise auf den Erwerb via horizontalem Gentransfer (Heusipp *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2009).

Bereits erste Untersuchungen in einer *H-NS*-Deletionsmutante in *E. coli* ließen einen negativen Einfluss von H-NS auf die Transkription von *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC* erkennen. Um diesen Effekt in gleicher Weise in *Y. enterocolitica* bestätigen zu können, eine H-NS-Nullmutation allerdings sowohl für *Y. pseudotuberculosis* als auch für *S. enterica* sv. Typhimurium letal zu sein scheint, wurde eine dominant-negative H-NS-Variante (H-NS Δ) generiert (Heroven *et al.*, 2004; Navarre *et al.*, 2006; Baños *et al.*, 2008). Eine natürlich-vorkommende H-NS-Variante (H-NS_{EPEC}) dieser Art konnte bereits in enteropathogenen *E. coli* nachgewiesen werden (Williamson & Free, 2005). Diese trunkierten H-NS-Versionen sind nach wie vor in der Lage zu multimerisieren, können infolge eines fehlenden C-Terminus jedoch nicht mehr an DNA binden (Abb. 6.3 A). Stella *et al.* konnten zudem nachweisen, dass die Linker-Region von H-NS in der Dimerisierung des Proteins essentiell zu sein scheint. So vermittelt *in vitro* sowohl die Kopplung der Linkerregion an den C-Terminus als auch an den N-Terminus die Ausbildung dimerer und tetramerer Strukturen. Eine H-NS-Variante, lediglich aus der N-terminalen Domäne bestehend, war hingegen außerstande mit anderen H-NS-Molekülen zu interagieren (Stella *et al.*, 2005).

Unter der Verwendung der dominant-negativen H-NS-Variante konnte im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis eines negativen Effektes dieses Regulators auf *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC* in *Y. enterocolitica* erbracht werden. Während erste Analysen zur Transkriptionsaktivität in *Y. enterocolitica* eine deutliche Repression durch H-NS auf die Expression von *hreP*, *pypB* und *pypC*

bei 26 °C erkennen lassen, scheint H-NS keinen signifikanten Effekt auf die Transkription von *pypA* zu haben. Da es sich jedoch bei den vergleichenden Analysen zwischen *E. coli* und *Y. enterocolitica* um verschiedene Reporterkonstrukte handelt, welche in *E. coli* lediglich als Plasmid, in *Y. enterocolitica* hingegen im Chromosom integriert vorliegen, können abweichende Ergebnisse nicht ganz ausgeschlossen werden (Abb. 6.2).

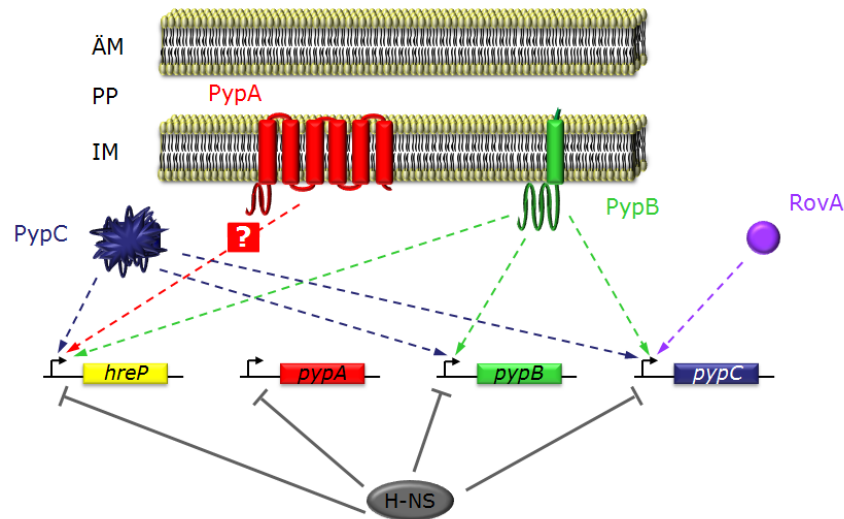


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der Regulationswege des regulatorischen Pyp-Netzwerkes.

Neben der Aktivierung der *hreP*-Transkription durch PypA, PypB und PypC wird die Expression von PypB und PypC sowohl auto- als auch durch das jeweils andere Pyp-Protein reguliert. Zusätzlich kann die *pypC*-Transkription durch RovA induziert werden. Eine negative Regulation von *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC* erfolgt durch H-NS. Die Pfeilspitzen geben die stromaufwärts gelegenen Promotorregionen von *hreP* und den jeweiligen *pyp*-Genen an. Das Fragezeichen deutet auf einen bisher unbekanntem Mechanismus, durch den die Transkription von *hreP* durch PypA initiiert wird. Gestrichelte Linien weisen auf eine Aktivierung der Transkription durch das jeweilige Protein, durchgezogene Linien beziehen sich auf eine Repression der Transkription durch H-NS (modifiziert nach Karin Wagner).

Viele H-NS-regulierte Virulenzgene, wie z. B. das Invasin-kodierende *inv*-Gen, weisen eine thermoregulierte Genexpression auf. Dieser Mechanismus stellt ein Beispiel für die hervorragende Adaption von *Y. enterocolitica* an die wechselnden Umweltbedingungen dar und unterstützt einen perfekten Übergang zwischen dem kühleren Habitat und den Bedingungen innerhalb des humanen Wirts. Sowohl Invasin als auch HreP sind für die Virulenz von *Y. enterocolitica* von großer Bedeutung (Young & Miller, 1997; Ellison *et al.*, 2004; Ellison & Miller, 2006; Fabrega & Vila, 2012). Während Untersuchungen bei 26 °C bei

fast allen *pyp*-Komponenten in *Y. enterocolitica* einen Effekt von H-NS Δ auf die Expression erkennen lassen, zeigen vergleichende Tests bei 37 °C allenfalls einen Effekt von H-NS Δ auf die Genexpression von *hreP* und *pypC*. Obgleich diese beobachteten Effekte weniger ausgeprägt sind, lassen sie auf einen teils thermoregulierten Einfluss von H-NS auf die Expression von Genen erkennen. Hinsichtlich der Präferenz von H-NS an gekrümmte DNA zu binden, ist dies nicht verwunderlich, hängt die DNA-Konformation doch u. a. von physikalischen Parametern wie Osmolarität und Temperatur ab (Liu *et al.*, 2010).

Ein Beispiel solch einer temperaturabhängigen DNA-Konformation stellt die Promotorregion des *virF*-Gens in *Shigella flexneri* dar. Während H-NS bei niedrigen Konzentrationen vorwiegend als Dimer in der Zelle vorliegt, bildet es bei ansteigenden Konzentrationen multimere Komplexe aus (Falconi *et al.*, 1988; Stoebel *et al.*, 2008). Diese bewirken entweder ein Anlagern von H-NS entlang eines DNA-Strangs und somit das Versteifen dieser DNA-Region oder aber eine Quervernetzung zweier benachbarter DNA-Stränge und infolgedessen die Ausbildung von Schleifen und Knicken innerhalb dieser DNA-Region (siehe Einleitung Abb. 2.4) (Dame *et al.*, 2005, 2006; Arold *et al.*, 2010). Im Zusammenhang mit der thermoregulierten Genexpression von *virF* ist die Ausbildung solch einer DNA-Schleife im Bereich der Promotorregion für die Repression unerlässlich. So gibt es zwei H-NS-Bindestellen innerhalb dieser Region, an denen der Regulator anlagern kann. Bei Temperaturen unter 30 °C liegt dieser DNA-Abschnitt in einer Art Schleife vor, welche eine Quervernetzung von H-NS zwischen den beiden Bindestellen ermöglicht. Das Anlagern der RNA-Polymerase wird aufgrund der DNA-Konformation verhindert. Ähnlich wie ToxT in *Vibrio cholerae* gehört VirF in *Shigella flexneri* zu der Klasse der temperaturempfindlichen AraC-ähnlichen Proteine (Stoebel *et al.*, 2008; Stonehouse *et al.*, 2011). Es wird zu Beginn einer Infektion exprimiert und gilt als Aktivator diverser Operons, welche im Zusammenhang mit der Expression essentieller Invasionsfaktoren stehen. Durch den Anstieg der Temperatur auf über 30 °C findet eine Konformationsänderung der *virF*-Promotorregion statt, wodurch die Quervernetzung von H-NS gestört und die Anlagerung der RNA-Polymerase ermöglicht wird (Abb. 6.3 D) (Prosseda *et al.*, 2004; Stoebel *et al.*, 2008).

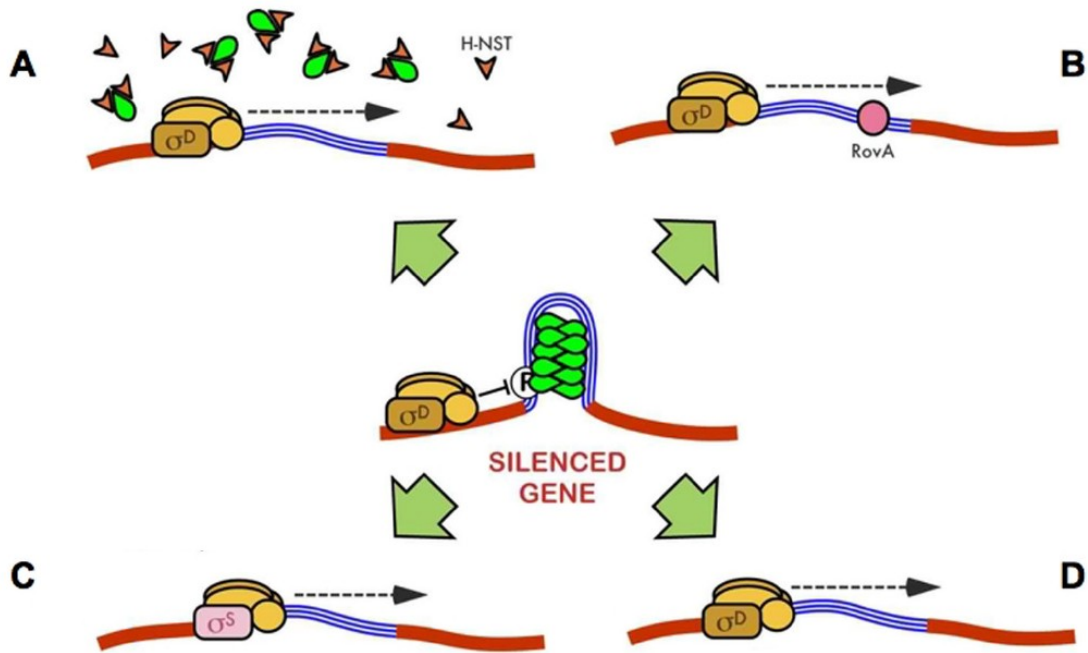


Abbildung 6.3: Schematische Übersicht verschiedener H-NS-Derepressionsmechanismen.

Es wird davon ausgegangen, dass mehrere Varianten an einem Promotor zur Aktivierung der Genexpression und somit der Derepression von H-NS beitragen können. Die dargestellten Mechanismen schließen sich nicht gegenseitig aus.

A) Unterbindung des H-NS-Komplexes durch Multimerisierung mit Antagonisten, wie etwa H-NST in EPEC und UPEC oder H-NS Δ .

B) Konkurrenz um DNA-Bindestelle zwischen H-NS und hochaffinen, sequenzspezifischen Bindeproteinen wie z. B. RovA aus *Y. enterocolitica* oder ToxT aus *Vibrio cholerae*.

C) Promotoraktivierung, wie beispielsweise der *hdeAB*-Promotor in *E. coli*, durch alternativen Sigmafaktor σ^S .

D) Protein- oder temperaturinduzierte Veränderungen innerhalb der Promotor-Binderegion, z. B. des *virF*-Promotors in *Shigella flexneri*, unterbinden die H-NS-Multimerisierung (modifiziert nach Fang & Rimsky, 2008).

In verschiedenen Studien konnte RovA oftmals als Aktivator vermeintlich horizontal erworbener Gene sowie als Antagonist von H-NS in *Y. enterocolitica* identifiziert werden (Cathelyn *et al.*, 2007). Untersuchungen im Zusammenhang mit dem regulatorischen Pyp-Netzwerk erbrachten jedoch den Beweis, dass lediglich die Expression von *pypC* durch die Überproduktion von RovA aktiviert werden kann. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass RovA zugleich in der Derepression des *pypC*-Promotors durch H-NS involviert ist (Abb. 6.2). RovA gehört zu der SlyA/Hor/Rap-Familie dimerischer *winged*-Helix DNA-Bindeproteine und wird ausschließlich bei 26 °C exprimiert (Herbst *et al.*, 2009). Insbesondere der C-Terminus des Proteins scheint für die Funktionalität essentiell zu sein. So wird vermutet, dass dieser Teil die Interaktion mit der RNA-Polymerase weiter stabilisiert und/oder die Funktion anderer

regulatorischer Proteine, wie z. B. H-NS, manipuliert. Darüber hinaus ist noch unklar, ob das C-terminale Ende von RovA in der Lage ist einen interdimeren Kontakt zwischen benachbarten Bindestellen stromaufwärts des *rovA*- oder *inv*-Promotors zu ermöglichen, welcher bedeutend für die Verdrängung von H-NS von diesen Regionen sein könnte (Abb. 6.3 B) (Tran *et al.*, 2005).

Die N-terminale Dimerisierungsdomäne von H-NS erlaubt neben homodimeren und -oligomeren Strukturen zudem die Ausbildung heteromerer Komplexe. Hervorgerufen durch die Interaktion von H-NS mit anderen Nukleoid-assoziierten Proteinen wie YmoA oder dem H-NS-Paralog StpA, wirken diese heterodimeren Strukturen verstärkend auf die Repression diverser Loci (Madrid *et al.*, 2002; Fang & Rimsky, 2008). YmoA (*Yersinia modulator A*) gehört zu der Familie der Hha/YmoA-Proteine. Anders als H-NS sind sie weniger reichlich in der Zelle vertreten. Aufgrund dieser Tatsache und einer fehlenden DNA-Bindedomäne liegen Hha/YmoA-Proteine hauptsächlich als heterodimere Komplexe in Assoziation mit H-NS in der Zelle vor. YmoA hat eine Schlüsselfunktion in der Regulation diverser Virulenzfaktoren in Abhängigkeit von ökologischen Bedingungen, wie z. B. Temperatur und Osmolarität. Gemeinsam mit H-NS reprimiert es in *Y. enterocolitica* u. a. die Expression des initialen Adhärenz- und Invasionsfaktors Invasin (*inv*) bei 37 °C und wirkt somit der Aktivierung durch RovA bei 26 °C entgegen (Pepe & Miller, 1993; Cathelyn *et al.*, 2007; Fang & Rimsky, 2008).

Da bereits gezeigt werden konnte, dass RovA als vermeintlicher Derepressor die Transkription von *pypC* induzieren kann, sollte folglich die Regulation des regulatorischen Pyp-Netzwerkes durch H-NS näher analysiert werden. Untersuchungen durch so genannte *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) konnten eine direkte Interaktion zwischen H-NS und den Promotorregionen von *hreP*, *pypB*, *pypC* und darüber hinaus von *pypA* identifizieren. Anders als bei den anderen Pyp-Komponenten konnte für *pypA* durch vorherige Transkriptionsanalysen keine eindeutige Aussage über die negative Regulation durch H-NS getroffen werden. H-NS kann *in vitro* direkt mit der Promotorregion von *pypA* interagieren, jedoch ist unklar, inwieweit sich dieser Effekt auf *in vivo*-Untersuchungen übertragen lässt. Ähnlich, wie für

hreP, *pypB* und *pypC* lässt auch das Ergebnis von *pypA* lediglich darauf schließen, dass für die Bindung durch H-NS keine weiteren Faktoren notwendig sind und die negative Regulation durch die direkte Interaktion zwischen H-NS und den einzelnen Pro-motorregionen erfolgt. Einen unterstützenden Effekt durch YmoA oder weitere, bisher unbekannt *in vivo*-Faktoren lässt sich an dieser Stelle dennoch nicht ausschließen.

In den letzten Jahren konnten mehrere DNA-Konsensussequenzen ermittelt werden an die H-NS mit hoher Affinität bindet. Sie bestehen meist aus 10 Nukleotiden und besitzen einen zentralen T-A-Basen-Abschnitt, der eine thermische Instabilität und somit eine axiale Torsionsflexibilität gewährleistet (Yakovchuk *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2007; Sette *et al.*, 2009). Im Zusammenhang mit der Präferenz von H-NS an intrinsisch gekrümmte DNA zu binden, finden sich diese spezifischen DNA-Abschnitte meist zwischen den Positionen -150 und +1 der einzelnen Promotorbereiche (Asayama & Ohyama; Perez *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2007). Vergleichende Sequenzanalysen, in denen die in den EMSAs eingesetzten Promotorregionen der einzelnen *pyp*-Komponenten getestet wurden, lassen sowohl für *hreP* als auch für *pypA* und *pypB* eine deutliche Übereinstimmung mit der veröffentlichten Sequenz TCGATTATAT erkennen, während der Abgleich zwischen der Konsensussequenz und der *pypC*-Promotorregion lediglich eine Homologie von 50 % aufweist (siehe Anhang).

Darüber hinaus konnten Gordon *et al.* kürzlich eine Konsensussequenz von H-NS identifizieren, welche dem Protein eine spezifische Bindung an AT-reiche DNA-Regionen ermöglicht. Die H-NS-Protein-Familie wird definiert durch ein spezifisches Motiv (TWTGX₁GX₂) innerhalb der C-terminalen DNA-Bindedomäne. In den meisten Bakterien finden sich an Position X₁ Arginin- oder Glutamin-, an Position X₂ Arginin- oder Lysinreste. In *E. coli*, *Salmonella* aber auch in *Y. enterocolitica* besitzt H-NS einen Glutamin- (X₁) sowie einen Argininrest (X₂) (Abb. 6.4 A).

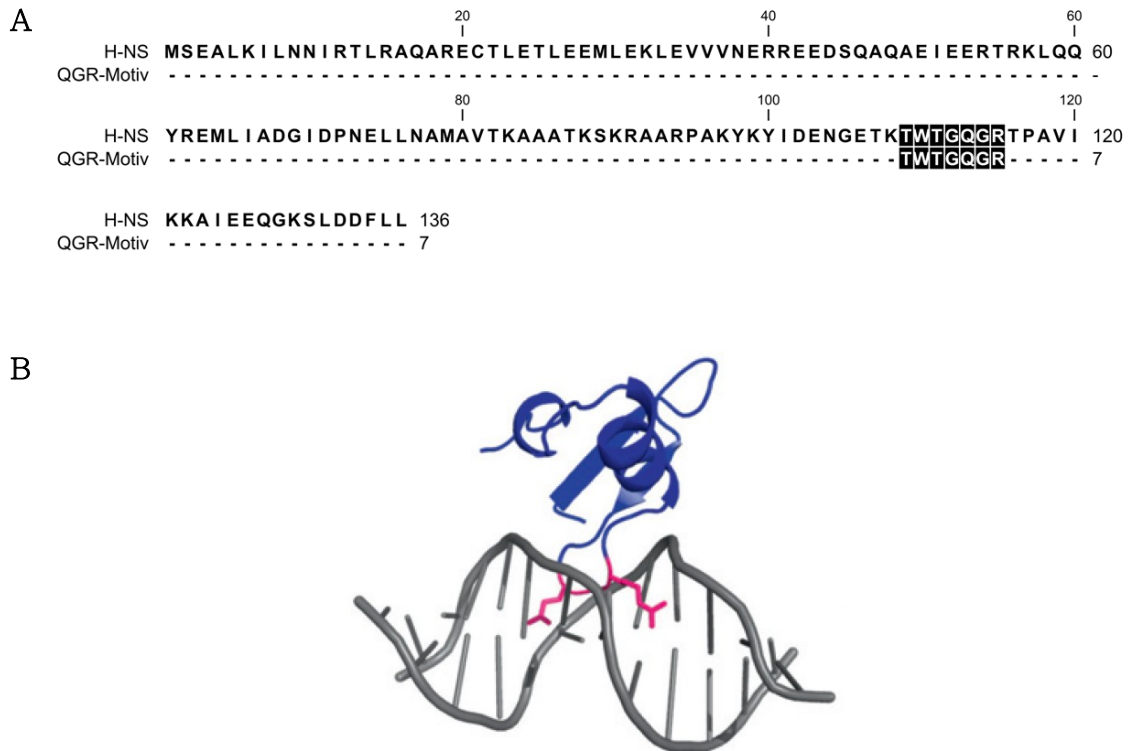


Abbildung 6.4: H-NS bindet AT-reiche DNA über ein konserviertes AT-Haken-Motiv innerhalb der kleinen DNA-Furche.

A) Sequenzvergleich zwischen H-NS aus *Y. enterocolitica* und dem detektierten QGR-Motiv. Die Seitenketten dieser spezifischen Aminosäuren sind in der Lage mit der kleinen Furche von DNA-Fragmenten zu interagieren. Die schwarz umrahmten Aminosäurereste stellen die Übereinstimmenden Sequenzen des C-terminalen Bindemotivs TWTGQGR von H-NS dar. (Analyse via CLC Sequence Viewer 6)

B) Darstellung der H-NS-DNA-Interaktionen. H-NS bindet über einen spezifischen AT-Haken innerhalb der kleinen DNA-Furche. Die pink abgebildeten Proteinregionen stellen die Seitenketten Q112, G113 und R114 der C-terminalen Domäne von H-NS dar. Diese Reste sind innerhalb der Schleifenregion lokalisiert und interagieren mit der DNA-Regionen der kleinen Furche (Ali *et al.*, 2012).

NMR-Titrationsexperimente zeigen, dass sich dieses so genannte QGR-Motiv in die kleine Furche von AT-reicher DNA schiebt, wobei die Seitenketten von Glutamin und Arginin in zwei entgegengesetzte Richtungen weisen (Abb. 6.4 B). Sowohl für H-NS als auch für Lsr2, welches als H-NS-Paralog in Mykobakterien vorzufinden ist und ein ähnliches Motiv (TWTGRGR) aufweist, erinnert diese Protein-DNA-Interaktion an eukaryotische HMG-I(Y)-Proteine (Aravind & Landsman, 1998; Gordon *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2012). Diese HMG-I(Y)-Proteine zählen zu den Nichthiston-Chromatin-Proteinen und spielen u. a. eine Rolle in der transkriptionellen Genregulation von Säugetieren, indem sie spezifische DNA- und Chromatin-Strukturen erkennen und verändern können (Reeves, 2000; Reeves & Beckerbauer, 2001). Eine Erklärung für die

spezifische Bindung von H-NS an AT-reiche DNA lässt sich zudem durch den strukturellen Aufbau der kleinen Furche erklären: AT-reiche DNA besitzt keine exozyklische 6-NH₂-Gruppe. Aufgrund dieses Unterschieds zu GC-reicher DNA bilden sich besonders tiefe und enge kleine Furchen, die wiederum einen erheblichen Anstieg des elektronegativen Potentials bewirken (Lavery *et al.*, 1981; Hizver *et al.*, 2001; Joshi *et al.*, 2007).

6.1.2 H-NS ist involviert in der Regulation von Biofilmen

Eine der bedeutendsten Überlebensstrategien von Bakterien ist die Ausbildung von Biofilmen, welche aus Wasser, bakteriellen Zellen und einer Vielzahl extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) bestehen. Sie stellen eine Art Matrix dar, die die Mikroorganismen u. a. vor Austrocknung, oxidierenden Agenzien oder angereicherten Bioziden, diversen Antibiotika und einigen humanen Immunabwehrmechanismen schützt. Darüber hinaus unterstützt diese sessile bakterielle Lebensform aufgrund ihrer Zusammensetzung die Adhäsion an festen Oberflächen und die Stabilität innerhalb der Matrixstruktur (Costerton *et al.*, 1995, 1999; Flemming & Wingender, 2010; Carrolo *et al.*, 2010).

Der Entwicklungszyklus und die Verbreitung von Biofilmen erstreckt sich über mehrere Phasen, in denen planktonische Zellen an Oberflächen adhären, zu Mikrokolonien und Biofilmen akkumulieren und sich letzten Endes von dort weiter ausbreiten (Abb. 6.5). Die Adhäsion planktonischer Bakterien an feste Oberflächen wird durch verschiedene bakterielle Faktoren, wie z. B. Typ IV Pili, Flagellen und äußere Membranproteine, ermöglicht (Davey & O'Toole, 2000; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; McDougald *et al.*, 2012). Binnen kurzer Zeit nach Oberflächenanheftung entwickeln sich nicht-motile Unterpopulationen, die sich zu Mikrokolonien zusammenschließen. In dieser Phase spielen insbesondere *quorum sensing*- aber auch Eisensignal-Systeme eine große Rolle. Sie begünstigen die Abgabe wichtiger EPS-Materialien an die Umgebung, an denen wiederum motile Unterpopulationen via Flagellum-vermittelter Chemotaxis binden können. Dieser Zusammenschluss von motilen und nicht-motilen Untergruppen führt letztlich zu der Ausbildung pilzförmiger Biofilmstrukturen

mit individueller physiologischer Beschaffenheit. Stress induzierende Bedingungen bewirken eine Aktivierung der Zellen und somit eine aktive bzw. passive Verbreitung des Biofilms (Watnick & Kolter, 2000; Flemming & Wingender, 2010; Yang *et al.*, 2012).

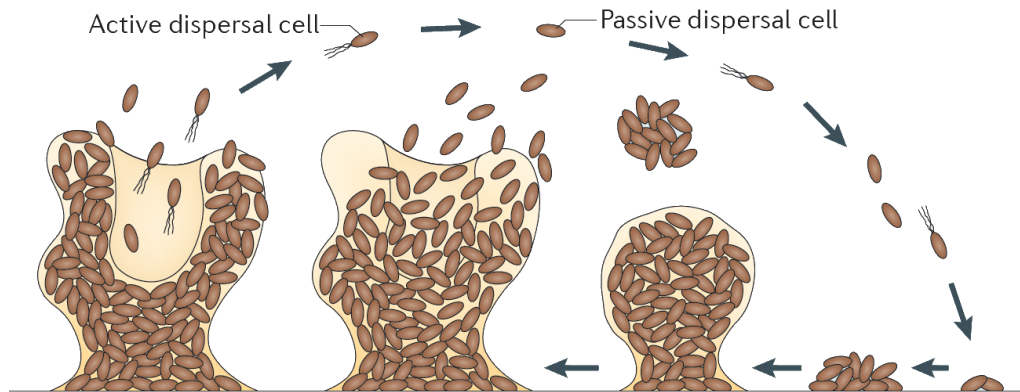


Abbildung 6.5: Entwicklungszyklus und Verbreitung in Biofilmen.

Einzelne planktonische Bakterien adhären an festen Oberflächen. Dort entwickeln sich nicht-motile Unterpopulationen, die die Ausbildung von Mikrokolonien und die Abgabe wichtiger EPS-Materialien vermitteln. Diese werden von motilen Unterpopulationen erkannt und gebunden. Es entsteht ein Zusammenschluss aus motilen und nicht-motilen Mikroorganismen gleicher oder verschiedener Spezies, welcher durch stressinduzierte Bedingungen aktiv oder passiv zur Verbreitung des Biofilms führt (McDougald *et al.*, 2012).

Biofilme können aus einer, aber auch aus verschiedenen Spezies bestehen. Die solide Beschaffenheit solcher Strukturen basiert stets auf einer Vielzahl sozialer Interaktionen und der daraus resultierenden Adaption an die Umgebung. Aufgrund der hohen Populationsdichte, den nahen Zell-Zellkontakten und weiteren spezifischen Struktur- und Funktionseigenschaften zeichnen sich Biofilme oftmals als Mittelpunkte von HGT aus (Aminov, 2011; Madsen *et al.*, 2012). So konnte u. a. belegt werden, dass Konjugationen häufiger zwischen Mitgliedern einer Biofilmgemeinschaft erfolgen als im planktonischen Zustand. Darüber hinaus wird von einer erhöhten Transformationsrate ursprünglich nicht-mobilisierbarer Plasmide ausgegangen (Sørensen *et al.*, 2005; Etchuuya *et al.*, 2011).

Aufgrund der Tatsache, dass viele horizontal erworbene Gene durch H-NS negativ reguliert werden, kann auch ein Einfluss dieses universellen Regulators auf die Bildung von Biofilmen nicht ausgeschlossen werden. Bislang

wird die genaue Bedeutung von H-NS in diesem komplexen System jedoch kontrovers diskutiert. So berichten Untersuchungen anhand von *H-NS*-Mutanten in *E. coli* keinen Effekt auf die Ausbildung von Biofilmen, während Analysen in *Actinobacillus pleuropneumoniae* sowie *Vibrio cholerae* unter der Verwendung verschiedener *H-NS*-Mutanten eine erhöhte Biofilmbildung erkennen lassen (Belik *et al.*, 2008; Dalai *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010; Bossé *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). Letzteres konnte zudem in *Y. enterocolitica* als unerwarteter Nebeneffekt während der Überexpression von H-NS Δ beobachtet werden. Unter der Verwendung unterschiedlicher Mutantenstämme sowie des Wildtyps erbrachten genauere Analysen eine sichtbare Biofilmbildung bereits nach einem Wachstum von 4 Stunden, jedoch unbeeinflusst durch Komponenten des regulatorischen Pyp-Netzwerkes. So konnte bisher für das PypC-gekoppelte Yts2-T2SS kein assoziierter Phänotyp nachgewiesen werden. Ähnlich verhält es sich für den PypB-regulierten Tad-Lokus. Dieser Lokus zeichnet sich in vielen Gram-positiven und -negativen Bakterien sowie *Archaea* u. a. durch die Bildung hartnäckiger Biofilme aus. Untersuchungen in *Y. enterocolitica* zum Nachweis von Biofilmen konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und einer Tad-Mutante, in der das Pilinkodierende *flp*-Gen deletiert ist, detektieren (Shutinoski *et al.*, 2009; Schilling *et al.*, 2010).

6.2 Der Tad-Lokus

Ein kritischer Punkt im Anfangsstadium einer jeden Infektion ist das Adhärenieren der pathogenen Bakterien an spezifische Wirtszellen. Dieser Prozess ist für eine erfolgreiche Kolonisierung unumgänglich und wird oftmals durch haarähnliche Fortsätze der bakteriellen Zelloberfläche, so genannte Pili oder Fimbrien, vermittelt. Aufgrund der unterschiedlichen Biosynthese und Morphologie werden Pili in verschiedene Klassen unterteilt (Proft & Baker, 2009).

Der sowohl in Gram-positiven und -negativen Bakterien als auch in *Archaea* weit verbreitete Tad-Lokus (*tight adherence*) kodiert für eine

neuartige Form von Typ IVb Pili, die Flp-Pili. Sie vermitteln unspezifische Bindungen an feste Oberflächen, Mikrokolonie- sowie hartnäckige Biofilmbildung (Planet *et al.*, 2003; Tomich *et al.*, 2007).

In Anlehnung an die Charakterisierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes in *Y. enterocolitica* konnten *in silico*-Analysen zeigen, dass *pypB* nicht nur direkt stromaufwärts des Tad-Lokus lokalisiert ist, sondern zudem als Regulator dieser genomischen Insel fungiert. In diesem Zusammenhang werden sowohl die Promotorregionen von *pypB* als auch die des *flp*-Gens (*fimbrial low-molecular-weight protein*), das für das Strukturprotein dieses Pilus kodiert, von PypB direkt und spezifisch gebunden. Weitere Analysen lassen darüber hinaus einen zusätzlichen transkriptionellen Terminator stromabwärts von *flp* erkennen. Das *flp*-Genprodukt stellt die Hauptkomponente der Flp-Pili dar. Es wird als Vorläuferprotein (Präpilin) synthetisiert und anschließend in der inneren Membran von der spezifischen Präpilinpeptidase TadV proteolytisch gespalten (Tomich *et al.*, 2006; Schilling *et al.*, 2010).

Obwohl der Tad-Lokus in Bakterien weit verbreitet ist, gibt es nur wenige Informationen über die Pilusexpression, deren Biogenese sowie den daraus resultierenden Phänotyp in *Y. enterocolitica*. Erste Analysen weisen jedoch auf eine ungleichmäßige Verteilung des Flp-Pilins und vereinzelt pilusartige Strukturen auf der Zelloberfläche von *Y. enterocolitica* hin (Schilling *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein System zur Analyse der Prozessierung des Flp-Präproteins durch TadV sowohl in *E. coli* als auch in einer *tadV*-Deletionsmutante von *Y. enterocolitica* etabliert werden. Innerhalb dieses Systems wurden gerichtete Mutationen in *tadV* und *flp* eingefügt und die Effekte mit Hilfe von Immunoblots untersucht. Analysen zu phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der einzelnen Flp-Derivate konnten allerdings in diesem Kontext nicht berücksichtigt werden.

6.2.1 Die Verbreitung des Tad-Lokus in *Yersinia*

Analysen vieler bislang verfügbarer Genomsequenzen lassen die weite Verbreitung des Tad-Lokus in einer Vielzahl von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie in *Archaea* erkennen (Tomich *et al.*, 2007).

In silico-Analysen der bisher verfügbaren Genomsequenzen verschiedener *Yersinia*-Stämme lassen neben einem vorhandenen Tad-Lokus überdies eine genetische Kopplung mit dem am 5'-Terminus lokalisierten *pypB*-Gen erkennen. Obwohl der Tad-Lokus in vielen Organismen weit verbreitet ist, teilweise sogar mit mehreren Kopien in einem Organismus, konnte bisher nur den Tad-Loci in *Yersinia* eine Assoziation mit einem direkt stromaufwärts lokalisierten Transmembran-Transkriptionsregulator nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildet das Gen SF3009 von *Shigella flexneri* 2A Stamm 301, dessen Protein zu 41 % dem PypB-Protein ähnlich ist. Darüber hinaus konnten die Gene *flp* (SF3008) und *tadV* (SF3007) stromabwärts dieses Regulators nachgewiesen werden, während andere Elemente des Tad-Lokus gänzlich fehlen (Schilling *et al.*, 2010).

Eine Besonderheit in *Yersinia* stellt darüber hinaus das Humanpathogen *Y. pestis* dar, in dem die Gene *pypB* sowie *flp* fehlen. Erste Untersuchungen durch Kachlany *et al.* führten zu der Hypothese, dass der Tad-Lokus für die Kolonisierung innerhalb des Flohvektors und somit für die anschließende Verbreitung essentiell ist. Durch die Ausbildung von Biofilmen innerhalb des Floh-Vormagens wird die Nahrungsaufnahme des Flohs blockiert. Dieser droht zu verhungern, befällt einen neuen Wirt und würgt den entstandenen Blutklumpen mitsamt Bakterien in die Bisswunde (Kachlany *et al.*, 2000; Jarrett *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006). Spätere Analysen erbrachten jedoch den Beweis, dass der Tad-Lokus nur unvollständig in *Y. pestis* vorliegt. In allen drei humanpathogenen *Yersinia*-Stämmen sind die Gene des Tad-Lokus auf der *Yersinia genomic island 1* (YGI-1) kodiert. Während diese Genregionen in *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* intakt sind, weisen die Genelemente des YGI-1 in *Y. pestis* eine Insertion auf, die zu der Deletion des essentiellen Pilingenes *flp* führt. Unabhängig davon verfügen zudem alle bisher sequenzierten *Y. pestis*-Arten eine identische Leserasterverschiebung in dem Gen *rcpA*, dessen Protein für

die Ausbildung Pilus-abhängiger Poren in der äußeren Membran verantwortlich ist (Haase *et al.*, 1999; Thomson *et al.*, 2006).

Trotz der weiten Verbreitung des Tad-Lokus gibt es bisher nur wenige Informationen über die Regulation der so genannten *widespread colonization island*. So konnte in *Pseudomonas aeruginosa* beispielsweise das Zwei-Komponenten-System PprAB als positiver Regulator identifiziert werden. Anders als bei *A. actinomycetemcomitans*, *Y. enterocolitica* und vielen anderen Bakterien, in denen der Tad-Lokus als polycistronische mRNA transkribiert wird, besitzt *P. aeruginosa* eine charakteristische genetische Organisation aus fünf transkriptionellen Einheiten (Abb. 6.6) (Haase *et al.*, 2003; Tomich *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2009). Diese divergente Orientierung von *flp*- und *rcp*-*tad*-Genen lässt vermuten, dass verschiedenste regulatorische Prozesse an der Flp-Produktion, -Reifung und -Assemblierung beteiligt sind (de Bentzmann *et al.*, 2006).

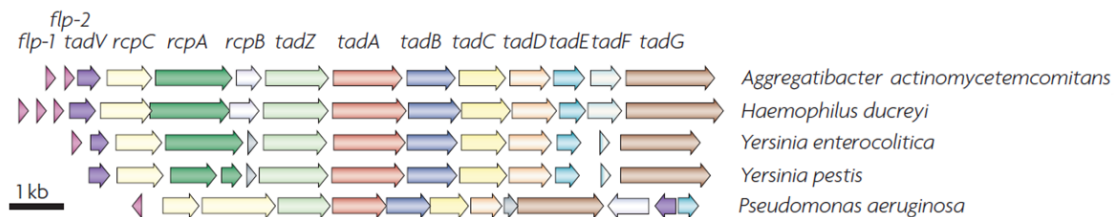


Abbildung 6.6: Genetische Organisation des Tad-Lokus.

Dargestellt ist die genetische Verteilung und Organisation des Tad-Lokus von *A. actinomycetemcomitans*, *H. ducreyi*, *Y. enterocolitica* und *Y. pestis* sowie *P. aeruginosa*. Die Pfeile geben die jeweilige Lokalisation, Größe und Richtung der Transkription des offenen Leserasters (ORF) an. Gleichfarbige ORFs kodieren für *tad*-Genprodukte mit signifikanter Ähnlichkeit (modifiziert nach Tomich *et al.*, 2007).

Im Vergleich zu der genetischen Organisation des Tad-Lokus in *A. actinomycetemcomitans* oder in *Haemophilus ducreyi* besitzen fast alle bisher detektierten Loci in *Yersinia* nur ein *flp*-Gen. Eine Ausnahme stellen hierbei *Y. pestis*, *Y. aldovae* sowie *Y. mollaretii* dar; sie weisen gar kein Strukturgen innerhalb des *tad*-Operons auf. Im Gegensatz dazu konnten in *A. actinomycetemcomitans* sowie in *Haemophilus ducreyi* weitere Genkopien von *flp* detektiert werden. Während das zweite *flp*-Gen (*flp-2*) in *A. actinomycetemcomitans* nur ein Pseudogen ohne funktionelle Relevanz

darstellt, sind die ersten zwei *flp*-Gene in *Haemophilus ducreyi* essentiell für die Ausbildung von Mikrokolonien. Die genaue Funktion des *flp-3*-Gens ist bislang unbekannt (Nika *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2006; Janowicz *et al.*, 2011).

Überdies gibt es Hinweise, dass das Protein RcpB (*rough colony protein B*) in *A. actinomycetemcomitans* von essentieller Bedeutung ist. Während das *rcpB*-Gen in den meisten *Yersinia*-Stämmen fehlte bzw. aufgrund fehlender Annotation nicht eindeutig als solches identifiziert werden konnte, war es unmöglich eine lebensfähige *rcpB*-Mutante in *A. actinomycetemcomitans* zu generieren. Es wird vermutet, dass der bisher unbekannte Aufbau eines RcpB-defizienten Tad-Systems eine hoch toxische Wirkung auf das Bakterium ausübt. Die genaue Funktion des in der äußeren Membran lokalisierten Proteins konnte bisher allerdings nicht geklärt werden (Clock *et al.*, 2008).

Neben einem vorhandenen *rcpB*-Gen identifizierten IVET-Analysen in dem Fischpathogen *Y. ruckeri* u. a. *tadD* als einen wichtigen Virulenzfaktor. Angelehnt an *in vivo*-Untersuchungen in *Pasteurella multocida*, in denen *tadD*-Mutanten über eine verringerte Virulenz im Mausmodell verfügen, weist dieses Ergebnis auf eine mögliche *in vivo*-Rolle des Flp-Pilus bei der Adhärenz an wirtsspezifische Gewebe hin (Fuller *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2004).

Obwohl der Tad-Lokus in einer Vielzahl von Bakterien und *Archaea* weit verbreitet ist und in vielen Organismen für die Ausbildung von Mikrokolonien und hartnäckigen Biofilmen verantwortlich gemacht werden konnte, ist es jedoch schwierig, für die meisten der hier analysierten *Yersinia*-Stämme eine eindeutige Aussage über die Funktionalität der Flp-Pili zu treffen. Einerseits gibt es kaum Veröffentlichungen, die über einen Zusammenhang zwischen Komponenten des Tad-Lokus und einzelnen *Yersinia*-Spezies berichten, andererseits wird die Bedeutung dieser Komponenten in der Literatur zu einem Großteil kontrovers diskutiert. Infolgedessen werden beispielsweise in *A. actinomycetemcomitans* als essentiell definierte *tad*-Gene in anderen Organismen als nicht essentiell identifiziert. Die genetische Diversität der einzelnen *flp*-Operons in *Yersinia* kann zudem durch die unterschiedlich starke Virulenzausprägung beeinflusst sein. Aufgrund dieser Kontroverse können anhand der vorliegenden Sequenzanalysen weder Rückschlüsse auf die

Bedeutung von *rcpB* oder anderer *tad*-Genprodukte gezogen werden, noch erlauben diese Analysen einen eindeutigen Hinweis auf die phänotypischen Ausprägungen in den verschiedenen *Yersinia*-Spezies geben.

6.2.2 Der Tad-Lokus in *Y. enterocolitica*

Mindestens 12 der 14 Gene des Tad-Lokus in *A. actinomycetemcomitans* sind für die Synthese der Flp-Pili essentiell. Die Hauptkomponente dieser Pili stellt das Strukturprotein Flp dar. Ebenso wie die Pseudopiline TadE und TadF wird es als Vorläuferprotein synthetisiert und anschließend in der inneren Membran proteolytisch modifiziert (Inoue *et al.*, 1998; Kachlany *et al.*, 2001b).

Die Assemblierung der Flp-Pili weist hierbei große Ähnlichkeit zu denen anderer Typ IV Pili sowie T2SS auf. Die Präproteine werden kotranslational durch das Signalerkennungsprotein (SRP) gebunden und zu dem Sec-System geleitet. Dieses in der inneren Membran lokalisierte System besteht aus mehreren Komponenten, die das entfaltete Präprotein stabilisieren und als bitopisches Protein, mit der Signalsequenz im Zytoplasma und dem C-Terminus im Periplasma, in die innere Membran integrieren (Abb. 6.7) (Paetzel *et al.*, 2002; Arts *et al.*, 2007; Fuchs & Schlegel, 2006; Francetic *et al.*, 2007). Die anschließende Prozessierung dieser Prä-Piline und Pilin-ähnlichen Proteine anderer Pilus-Biogenese- und Proteinsekretions-Systeme erfolgt durch so genannte Präpilinpeptidasen. Sowohl für die korrekte Erkennung des Präproteins als auch für dessen erfolgreiche Prozessierung spielt die Topologie eine große Rolle. Sie wird durch eine N-terminale Signalsequenz, einer 20 – 25 Aminosäuren langen hydrophoben Domäne sowie einer C-terminalen β -Falt-blattstruktur charakterisiert (Strom & Lory, 1987; Pugsley & Dupuy, 1992; Tomich *et al.*, 2006).

Typ IV Präpilinpeptidasen (T4PPP) stellen integrale zytoplasmatische Membranproteine mit einer Vielzahl von transmembranen Domänen dar. Aufgrund der Membranorientierung der Präpiline wird davon ausgegangen, dass die proteolytische Reaktion auf der zytoplasmatischen Seite stattfindet. Während anfänglich alle T4PPP als Cysteinproteasen klassifiziert wurden, erlaubten spä-

tere Sequenz- und Strukturanalysen eine genauere Unterteilung anhand weiterer katalytischer Mechanismen (Strom & Lory, 1987; LaPointe & Taylor, 2000). Eine dieser neueren Klassifizierungen schließt T4PPP mit katalytischen Aspartatresten mit ein, denen die erste große zytoplasmatische Domäne mit vier hochkonservierten Cysteinresten fehlt. *In vivo*-Aktivitäts- sowie *in vitro*-Protease-Assays identifizierten innerhalb der T4PPP TcpJ aus *Vibrio cholerae* zwei hochkonservierte Aspartatreste, die für die proteolytische Aktivität dieses Proteins essentiell sind (LaPointe & Taylor, 2000). Ähnliche Ergebnisse konnten auch im Zusammenhang mit der Präpilinpeptidase TadV aus *A. actinomycetemcomitans* und *Y. enterocolitica* beobachtet werden (Abb. 6.7). In diesem Fall handelt es sich jedoch um eine neue Untergruppe von Aspartat-Präpilinpeptidasen: aufgrund einer fehlenden N-terminalen Methylasedomäne werden diese als so genannte Nicht-methylierende Aspartat-Präpilinpeptidasen bezeichnet (Pepe & Lory, 1998; Kachlany *et al.*, 2001b; Tomich *et al.*, 2006).

Bereits die Substitution eines der katalytischen Aspartate innerhalb der T4PPP inhibiert sowohl in *Vibrio cholerae*, *A. actinomycetemcomitans* als auch in *Y. enterocolitica* und in dem Archaeon *Methanococcus voltae* die proteolytische Modifikation der verschiedenen Präpiline. Dies weist einerseits auf die große Bedeutung beider Aspartatreste für die Funktionalität der Präpilinpeptidasen, andererseits aber auch auf eine spezifische Prozessierung der Präproteine durch das jeweilige Enzym hin (LaPointe & Taylor, 2000; Bardy & Jarrell, 2003; de Bentzmann *et al.*, 2006; Tomich *et al.*, 2006). Sowohl der Austausch der katalytischen Aspartatreste durch Asparagin als auch durch Aminosäuren mit konträren Eigenschaften lassen keine proteolytische Aktivität des Proteins erkennen. Ein Hinweis dafür, dass der Funktionsverlust nicht bloß auf einer Konformationsänderung des Proteins beruht. Einzig die Substitution durch Glutamat konnte die Funktionalität in der Präpilinpeptidase TcpJ aus *V. cholerae* wieder herstellen. Der Verlust der Proteolyseaktivität ist auf die fehlenden Carbonsäuregruppen der Aspartate zurückzuführen, welche direkt an der allgemeinen Säure-Base-Katalyse beteiligt sind und dadurch die Hydrolyse der Peptidbindung bewirken (Rao *et al.*, 1998; LaPointe & Taylor, 2000; Bardy & Jarrell, 2003).

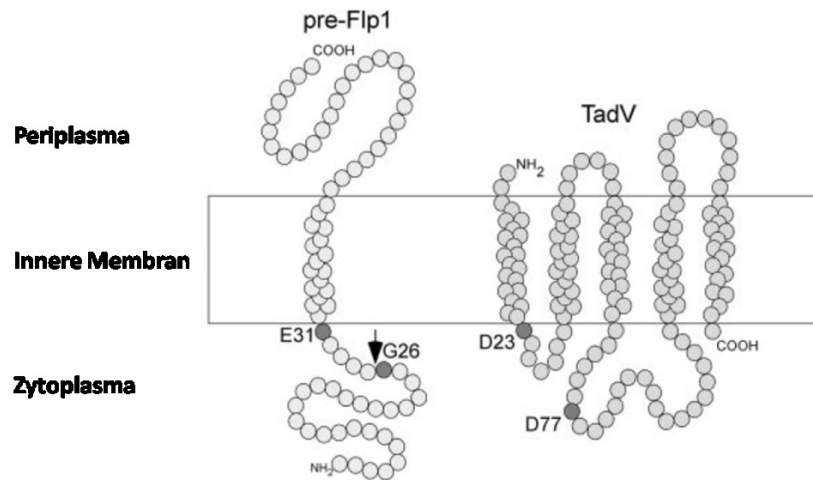


Abbildung 6.7: Membrantopologie von Flp-1- und TadV-Proteinen in *A. actinomycetemcomitans*.

Abgebildet sind die erwarteten Proteinstrukturen der Proteine Flp-1 und TadV in der inneren Membran von *A. actinomycetemcomitans*. Die katalytischen Aspartatreste der Präpilinpeptidase TadV an Position D23 und D77 sind in dunklerem Grau hervorgehoben, die Markierungen G26 und E31 des Flp-1-Präproteins kennzeichnen die Region der Präpilin-Konsensussequenz. Der Pfeil stellt die proteolytische Schnittstelle des Vorläuferproteins dar (modifiziert nach Tomich *et al.*, 2006).

Flp-Piline werden zu einer Untergruppe der Typ IVb-Familie gezählt, die sich durch kurze Polypeptide von weniger als 90 Aminosäuren und einem Tyrosinrest an 6. Position der Konsensussequenz von anderen Pilinarten unterscheiden (Kachlany *et al.*, 2001a). Im Gegensatz zu dem Flp-Pilin von *A. actinomycetemcomitans* besitzt *Y. enterocolitica* ein ungewöhnlich kurzes Strukturprotein. Darüber hinaus ergeben *in silico*-Analysen, dass nur eine geringe Homologie zwischen Flp-1 von *A. actinomycetemcomitans* und Flp aus *Y. enterocolitica* besteht (Abb. 6.8). So weist der C-Terminus des reifen Flp-Proteins u. a. eine verkürzte Konsensussequenz der Prozessierungsstelle auf. Während in vielen T4P insbesondere die Position 5 des invariablen Glutamatrestes (G/(X)₄EY) für die korrekte Pili-Assemblierung von großer Bedeutung ist, befindet sich dieser in *Y. enterocolitica* aufgrund eines fehlenden Valinrestes (Val₁) bereits an Position 4 (G/(X)₃EY). Diese Veränderung findet man in allen Flp-Proteinen der Gattung *Yersinia* (Schilling *et al.*, 2010).

Eine phänotypische Darstellung von Flp-Pili auf der Bakterienoberfläche von *Y. enterocolitica* mittels Elektronenmikroskopie ist bisher nicht gelungen. Vorangegangene Analysen versuchten daher bereits eine Beeinträchtigung in der Assemblierung von Flp-Pilinen durch das Einfügen des fehlenden

Valinrestes an Position 1 (Val_{-1/1}) des Flp-Proteins auszuschließen. Anhand von *Western Blot*-Analysen konnte nun eindeutig belegt werden, dass eine Prozessierung dieses Flp-Derivats durch die Präpilinpeptidase TadV möglich, jedoch im Vergleich zur Modifikation des wildtypischen Flp-Präproteins weniger stark ausgeprägt ist. Eine abschließende Beurteilung im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings nicht mehr durchgeführt werden.

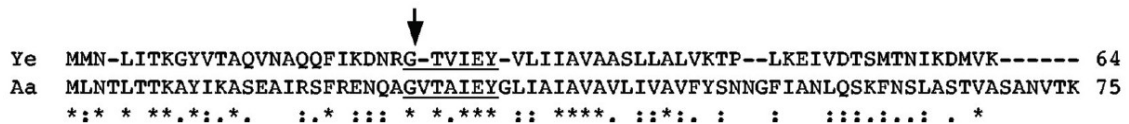


Abbildung 6.8: Vergleich des Flp-Proteins von *Y. enterocolitica* und des Flp-1-Proteins von *A. actinomycetemcomitans*.

Dargestellt sind die Flp- bzw. Flp-1-Proteinsequenzen von *Y. enterocolitica* (Ye) und *A. actinomycetemcomitans* (Aa). Der Pfeil markiert die potentielle Prozessierungsstelle. Die konservierten Konsensussequenzen G/(X)₃EY und G/(X)₄EY sind unterstrichen. Sternchen weisen auf identische Aminosäurereste in allen Sequenzen hin. Doppelpunkte kennzeichnen zudem konservierte und Punkte halbkonservierte Aminosäurereste innerhalb der Proteinsequenz (Schilling *et al.*, 2010).

Neben zwei detektierten Banden, die auf eine partielle Prozessierung des Proteins hindeuten, konnten sowohl bei den *Western Blot*-Untersuchungen des Flp- und Flp+V-Proteins als auch des Flp_{mut5}-Derivats ein weiteres Prozessierungsprodukt detektiert werden, dessen genaue Struktur und Funktion bislang unbekannt ist. Da es durch das spezifische Flp-Peptidantiserum detektiert werden konnte, wird von einem N-terminal verkürzten Flp-Protein ausgegangen. Die Entstehung solch eines Prozessierungsprodukts kann einerseits in einer einfachen Degradierung des N-Terminus, andererseits aber auch in verschiedensten alternativen Prozessierungsmechanismen begründet liegen. So könnte dies ein Hinweis auf eine weitere, jedoch unspezifische Prozessierung sein, wodurch ein fehlerhaftes und nicht funktionelles Protein entstehen würde oder aber ein alternatives, funktionelles Produkt, welches bisher keinem anderen Flp-Protein zugeordnet werden konnte. Eine weitere Möglichkeit stellt die posttranslationale Modifikation u. a. durch Glykosylierung, Phosphorylierung oder Methylierung dar.

Proteinglykosylierungen finden sich hauptsächlich in eukaryotischen Zellen, werden allerdings auch immer häufiger in prokaryotischen Systemen de-

tektiert. So weisen sowohl die Flp-Pili in *A. actinomycetemcomitans* als auch Typ IV Fimbrien in *N. meningitidis* und *P. aeruginosa* eine Glykosylierung in dem jeweiligen Strukturprotein auf (Inoue *et al.*, 2000; Tomich *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu Glykosylierungen und Methylierungen werden Phosphorylierungen nur selten als posttranslationale Modifikationen von Flagellen oder Pili nachgewiesen. Jedoch konnten vereinzelte Phosphorylierungen des Pilinproteins in *N. gonorrhoeae* und des Flagellin A- und B-Typs in *P. aeruginosa* detektiert werden (Ng *et al.*, 2006).

Einige der T2SS- und T4P-Präpilinpeptidasen werden auch als bifunktionale Enzyme bezeichnet: während die C-terminale Domäne als Peptidase fungiert, besitzt der N-Terminus eine Methylasedomäne. Letzteres ist für die Proteinmethylierung des an Position 1 befindlichen Aminosäurerests verantwortlich. In den meisten Fällen findet sich an dieser Position ein konservierter Phenylalaninrest, jedoch konnte auch für andere Aminosäuren an dieser Stelle eine Methylierung nachgewiesen werden. Ähnlich wie der TadV-Präpilinpeptidase in *A. actinomycetemcomitans* fehlt auch der in *Y. enterocolitica* eine N-terminale Methylasedomäne (Strom & Lory, 1991, 1992; Pugsley, 1993a; Tomich *et al.*, 2006). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass andere Faktoren innerhalb von *Y. enterocolitica* eine Methylierung oder sonstige Modifizierung des Flp-Pilins bewirken.

Neben chemischen Modifikationen könnte die Detektion eines weiteren Prozessierungsprodukts zudem der Nachweis für eine Art Zwischenprodukt sein. Dieses könnte im Verlauf der Prozessierung des Flp-Präproteins durch TadV entstehen und als Proprotein weiterhin assoziiert vorliegen. In Anlehnung an die Charakterisierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes in *Y. enterocolitica* wurde solch ein Propeptid bereits für die virulenzassoziierte Protease HreP beobachtet (Heusipp *et al.*, 2001).

Aufgrund der Vielzahl an möglichen Erklärungen und den damit verbundenen strukturellen, funktionellen und phänotypischen Veränderungen könnte eine Sequenzierung Aufschluss über die Bedeutung des unbekanntenen Prozessierungsprodukts für die Flp-Pili und womöglich für die Virulenz von *Y. enterocolitica* geben. Da es sich hierbei um *in vitro*-Versuche handelt, in

denen sowohl Flp als auch TadV mit Hilfe von Expressionsvektoren überproduziert werden, sollte darüber hinaus geklärt werden, ob es sich bei den Beobachtungen nicht nur um ein Artefakt dieses Analysesystems handelt.

Bei allen T4P, insbesondere bei Typ IVb Pili, weist das G/(X)₄EY-Motiv der TadV-Prozessierungsstelle eine hohe Konserviertheit auf. Analysen zeigen, dass die Konsensussequenz in *Y. enterocolitica* um eine Position verkürzt vorliegt (G/(X)₃EY), dies jedoch keinen Einfluss auf die erfolgreiche Prozessierung des Flp-Präproteins hat. Insbesondere der Glycinrest an Position -1 (Gly₋₁) ist in vielen Präproteinen verschiedenster Bakterien für eine korrekte proteolytische Spaltung von großer Bedeutung (Pugsley & Dupuy, 1992; Francetić *et al.*, 1998; Paetzel *et al.*, 2002; Tomich *et al.*, 2006). So kann nicht nur bei Präpilinen von *N. gonorrhoeae* sondern auch beim Pilin-ähnlichen PulG von *Klebsiella oxytoca* nach Substitution des hydrophilen Gly₋₁ durch Alanin (Ala) keine weitere Prozessierung nachgewiesen werden (Koomey *et al.*, 1991; Pugsley, 1993a). Im Gegensatz dazu scheint der Aminosäureaustausch im Flp-1-Präprotein von *A. actinomycetemcomitans* keinen Einfluss auf die Prozessierung und infolgedessen auf die Funktionalität des Flp-Pilus zu haben. Weder in der Bildung von Biofilmen noch in der Expression und Prozessierung konnte ein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante detektiert werden (Tomich *et al.*, 2006). Wiederum anders verhält es sich in *P. aeruginosa*. So kann aufgrund der Substitution lediglich eine unvollständige proteolytische Modifizierung des Präpilins PilA beobachtet werden. Eine Assemblierung dieses Prozessierungsprodukts ist jedoch nicht möglich. Obwohl im Zusammenhang mit der Substitution des Gly₋₁ in *Y. enterocolitica* ein Prozessierungsprodukt nachgewiesen werden konnte, scheint es sich hierbei vielmehr um ein weiteres Modifikationsprodukt zu handeln. So weist die Größe Ähnlichkeiten zu dem im Wildtyp (WT) detektierten unbekanntem Prozessierungsprodukt auf. Inwieweit sich die in den *Western Blot*-Analysen nachgewiesenen Produkte jedoch um das erwartete unprozessierte Flp-Präprotein und ein funktionelles Prozessierungsprodukt handelt, kann ohne weitere Untersuchungen an dieser Stelle nur spekuliert werden (Strom & Lory, 1992).

Eine Erklärung für die noch teilweise vorhandene proteolytische Spaltung des Präproteins könnten die strukturellen Gemeinsamkeiten der beiden Aminosäuren sein. So besitzen weder Gly noch Ala eine große Seitenkette, darüber hinaus werden beide als hydrophobe und unpolare Aminosäuren eingestuft (Abb. 6.9). Eine Substitution von Gly₋₁ durch Tryptophan (Trp), einer sehr großen, aromatischen und zudem polaren Aminosäure, lassen aufgrund dieser konträren Eigenschaften sowohl für das Flp-Präpilin in *Y. enterocolitica* als auch in *A. actinomycetemcomitans* keine weitere proteolytische Modifikation durch die Präpilinpeptidase TadV erkennen (Tomich *et al.*, 2006).

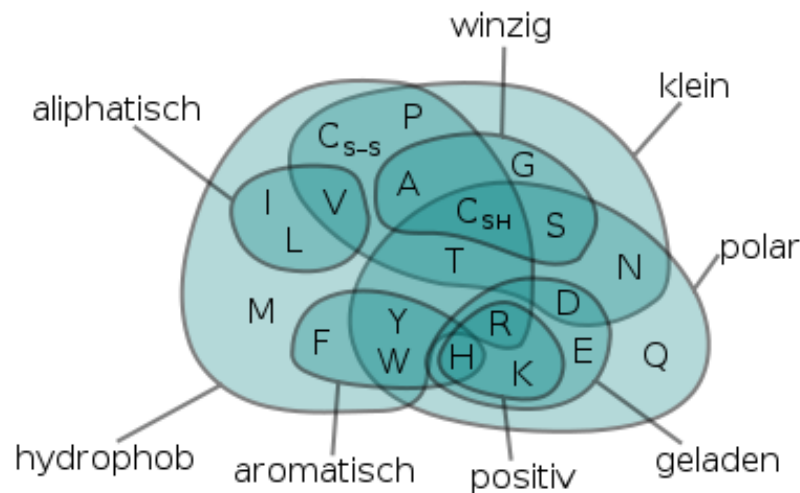


Abbildung 6.9: Venn-Diagramm: Eigenschaften der 20 proteinogenen Aminosäuren.

Das Venn-Diagramm fasst das Verhältnis der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren und deren chemisch-physikalischen Eigenschaften zusammen, welche eine Bedeutung in der Unterscheidung der Protein-Tertiär-Strukturen besitzt. Das Diagramm bezieht sich ausschließlich auf die Größe und Hydrophobie der einzelnen Aminosäuren. Die Aminosäuren sind in zwei Hauptgruppen unterteilt, die erste enthält solche mit polaren Gruppen, die zweite bezieht sich auf Aminosäuren, die einen hydrophoben Effekt aufweisen. Eine weitere Gruppe verweist auf die kleinsten bzw. winzigsten Aminosäuren. Die Einteilung von Cystein ist doppeldeutig, während die reduzierte Form C_{SH} mehr Ähnlichkeiten zu Serin aufweist, besitzt die oxidierte Variante C_{S-S} mehr Übereinstimmungen zu Valin. Andere Gruppierungen verweisen auf geladene, aromatische und aliphatische Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren. Da sich letztere Unterteilungen auf verzweigte aliphatische Seitenketten beziehen, wurden sowohl Prolin als auch Glycin aus diesem Diagrammteil ausgeschlossen (Wikipedia, modifiziert nach Taylor, 1986).

Eine weitere hochkonservierte Aminosäure des G/(X)₃EY-Motivs von Flp stellt das Glutamat (Glu₄) dar, welches als einzig geladener Rest im N-Terminus des reifen Pilins vertreten ist. Die Substitution dieser Aminosäure durch einen Glutaminrest (Gln), der sich durch eine Amidierung der Carboxylgruppe von Glu₄ unterscheidet, lässt weiterhin eine proteolytische Spaltung in

Y. enterocolitica erkennen. Ähnliche Beobachtungen können zudem nach dem Austausch von Glu₄ durch Tyrosin (Tyr), einer hydroxylierten, aromatischen Aminosäure mit hydrophobem Charakter, gemacht werden. Auffällig ist in diesem Fall, dass sowohl die Substitution durch Gln als auch durch Tyr eine vermehrte Prozessierung des Flp-Derivats bewirken. Allerdings ist auch bei diesen Ergebnissen erneut fraglich, ob es sich bei dem dabei entstandenen Produkt um ein reifes Flp-Pilin oder um ein andersartiges Prozessierungsprodukt handelt. Diese Hypothese wird durch weitere Substitutionen des hochkonservierten Glu in anderen Präpilinen noch bekräftigt. So weisen Untersuchungen eines durch Leucin (Leu) substituierten Präpilins in *N. gonorrhoeae* zwar auf eine Prozessierung hin, jedoch entstehen nur sehr kurze bis gar keine Pili. Ähnlich verhält es sich bei einem Austausch durch Ala in *A. actinomycetemcomitans*. So kann trotz positivem Nachweis einer proteolytischen Modifikation keine Biofilmbildung nachgewiesen werden. Ein Indiz dafür, dass ein Austausch durch Ala kritisch für die Funktion von Flp, allerdings nicht für dessen Stabilität und Prozessierung ist (Tomich *et al.*, 2006; Aas *et al.*, 2007).

Neben Mutationen innerhalb der Flp-Konsensussequenz können auch Veränderungen des Signalpeptids oder der Proteinsequenz die Struktur des Pilins derart modifizieren, dass es zum Erliegen der proteolytischen Spaltung oder der anschließenden Assemblierung führen kann. So bewirkt eine Insertion innerhalb der kodierenden Region der N-terminalen Signalsequenz eine Verschiebung des Leserasters und dadurch die korrekte Proteinexpression, während eine Substitution innerhalb dieser Region keinen Einfluss auf die Prozessierung und somit auf den Transport des Präproteins zur inneren Membran zu haben scheint. Anders verhält es sich bei Mutationen, die den C-terminalen Teil des Flp-Proteins betreffen. Da es sich hierbei um eine Veränderung der Proteinsequenz und nicht der Signal- oder Konsensussequenz handelt, kann das Präprotein weiterhin prozessiert werden, während die jeweilige Mutation die Expression des Polypeptids und somit dessen Funktionalität beeinflusst (Kachlany *et al.*, 2001a, 2001b).

Basierend auf diesen Ergebnissen können erste Rückschlüsse auf die Prozessierung des Flp-Präproteins durch die Präpilinpeptidase TadV in *Y. enterocolitica* gezogen werden. Anhand einzelner Substitutionen innerhalb der konservierten Konsensussequenz des Strukturproteins ist es möglich, Unterschiede in der Prozessierung zu detektieren, jedoch können angesichts dieser Ergebnisse weder Aussagen über die Assemblierung und Funktionalität des Pilins noch über den damit einhergehenden Phänotyp getroffen werden.

6.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte H-NS als negativer Regulator des Pyp-Netzwerkes identifiziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen bleiben jedoch weiterhin viele Fragen bezüglich der Regulierung aber auch der Funktionalität der einzelnen Pyp-Komponenten offen. Während sowohl PypB als auch PypC als assoziierte positive Regulatoren des Tad-Lokus bzw. des Yts2-T2SS identifiziert werden konnten, ist die Rolle von PypA innerhalb dieses Systems aufgrund seiner Lokalisation in der inneren Membran gänzlich ungeklärt. Zu diesem Zweck würde eine Isolierung des Proteins nach dem Vorbild von Gebhard *et al.* von großem Nutzen sein. Bei dieser Methode werden membranständige Proteine aus der Membran gereinigt und für anschließende Untersuchungen zur Protein-DNA-Interaktionen wieder in Proteoliposomen eingesetzt. Basierend auf dieser Liposomeneinbettung könnten so mögliche PypA-Bindedomänen sowie deren Spezifität durch eine Interaktion mit *hreP*, *pypB* oder *pypC* näher untersucht und etwaige konkurrierende Bindepartner detektiert werden (Gebhard *et al.*, 2009).

Eine weitere Frage, die durch diese spezielle Art der Proteinisolierung möglicherweise geklärt werden könnte, betrifft die Funktionalität der sehr kurzen periplasmatischen Domäne von PypB. Frühere Versuche konnten bereits belegen, dass diese Domäne nach Überproduktion des trunkierten PypB Δ c nicht für die Transkriptionsaktivierung von *hreP* und *pypC* erforderlich ist. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Membranständigkeit von PypB für die Signalerkennung von großer Bedeutung ist.

Unabhängig von der Struktur und der einhergehenden Funktionalität der einzelnen Pyp-Komponenten bleibt die Ausbildung von Biofilmen im Zusammenhang mit der Derepression von H-NS weiterhin ungeklärt. Frühere Untersuchungen zur Charakterisierung des Flp-Pili-assoziierten Phänotyps, ließen bereits erkennen, dass eine Überproduktion des Tad-Lokus-assoziierten Aktivators PypB keinen Einfluss auf die Ausbildung von Biofilmen hat. Weitere Versuche, in denen der Effekt der H-NS Δ -Überexpression auf verschiedene Mutantenstämme des regulatorischen Pyp-Netzwerkes getestet wurde, belegten überdies, dass die Derepression der einzelnen Pyp-Komponenten in keinem Zusammenhang mit der Ausbildung von Biofilmen steht. So bleibt weiterhin zu klären, welche anderen Gene die Biofilmbildung positiv beeinflussen und zu welchem Zeitpunkt diese durch H-NS-reprimierten Gene *in vivo* aktiviert werden.

Abgesehen von der Biofilmbildung in *Y. enterocolitica* wirft die Aktivierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes weitere Fragen auf. Viele Bemühungen wurden bereits in vorangegangenden Studien unternommen *in vivo*-Bedingungen zu ermitteln, welche die Expression von *hreP*, *pypA*, *pypB* und *pypC* induzieren, jedoch konnten bisher keine Laborbedingungen gefunden werden, welche eine Aktivierung des regulatorischen Pyp-Systems zur Folge haben. Eine Möglichkeit zur Detektion potentieller Aktivatoren bzw. aktivierenden Faktoren könnten *in vivo*-Versuche mit entsprechenden Mutantenstämmen im *Y. enterocolitica*-Mausmodell darstellen. So könnte insbesondere die Bedeutung von PypA, PypB und PypC für die Virulenz in *Y. enterocolitica* u. a. über die Bestimmung der LD₅₀ ermittelt werden.

Da PypB zudem als assoziierter Regulator des Tad-Lokus identifiziert wurde, könnten diese Untersuchungen überdies zum näheren Verständnis des Tad-Lokus in *Y. enterocolitica* beitragen. Anders als bei *A. actinomycetemcomitans* oder *P. aeruginosa*, in denen ein deutlicher Tad-assoziiertes Phänotyp detektiert werden konnte, weist *Y. enterocolitica* nur einen gering ausgeprägten Phänotyp auf. Obwohl PypB bereits als positiver Regulator des Systems identifiziert wurde, könnten anhand von Untersuchungen mit entsprechenden Mutantenstämmen im *Y. enterocolitica*-Mausmodell weitere

Regulatoren detektiert werden, welche eine Expression des Tad-Lokus unabhängig von PypB ermöglichen.

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen zur näheren Charakterisierung des Tad-Lokus konnten erste Rückschlüsse auf die Prozessierung des Flp-Präproteins durch die Präpilinpeptidase TadV in *Y. enterocolitica* gezogen werden. Anhand einzelner Mutationen innerhalb der konservierten Konsensussequenz des Strukturproteins war es möglich Unterschiede in der Prozessierung zu detektieren, jedoch konnten angesichts dieser Ergebnisse keine Aussagen über die Funktionalität der einzelnen Prozessierungsprodukte getroffen werden. Aufgrund der Vielzahl an möglichen Erklärungen und den damit verbundenen strukturellen, funktionellen und phänotypischen Veränderungen könnte eine Sequenzierung Aufschluss über die Bedeutung der einzelnen Prozessierungsprodukte für die Flp-Pili und womöglich für die Virulenz von *Y. enterocolitica* geben. Darüber hinaus sollte die phänotypische Ausprägung der jeweiligen Flp-Derivate auf Mikrokoloniebildung, aber auch elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein von Pili untersucht werden.

Ein weiterer Ansatz stellt zudem die Untersuchung der beiden Peusopiline TadE und TadF dar. Ähnlich wie Flp, werden diese als Präproteine synthetisiert und von der Nicht-methylierenden Präpilinpeptidase TadV in der inneren Membran prozessiert. Analysen in *A. actinomycetemcomitans* ließen darüber hinaus erkennen, dass auch die Pseudopräpiline über eine spezifische Konsensussequenz verfügen, deren Mutation, vergleichbar wie in Flp, eine Prozessierung durch TadV inhibieren kann. Basierend auf diesen Beobachtungen sollte in *Y. enterocolitica* die proteolytische Spaltung durch TadV in den Pseudopilinen TadE und TadF näher analysiert werden. Dies kann mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Systems in entsprechenden *Y. enterocolitica* *tadE*- und *tadF*-Deletionsmutanten erfolgen.

7 Literaturverzeichnis

Aas FE, Winther-Larsen HC, Wolfgang M, Frye S, Løvold C, Roos N, Van Putten JPM & Koomey M (2007) Substitutions in the N-terminal alpha helical spine of *Neisseria gonorrhoeae* pilin affect Type IV pilus assembly, dynamics and associated functions. *Molecular Microbiology* **63**: 69–85

Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A & Carniel E (1999) *Yersinia Pestis*, the Cause of Plague, Is a Recently Emerged Clone of *Yersinia Pseudotuberculosis*. *PNAS* **96**: 14043–14048

Aleksić S & Bockemühl J (1990) Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections. *Immun. Infekt.* **18**: 178–185

Ali SS, Xia B, Liu J & Navarre WW (2012) Silencing of foreign DNA in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **15**: 175–181

Altermann E (2012) Tracing lifestyle adaptation in prokaryotic genomes. *Front. Microbio.* **3**: 48

Ambalam P, Kondepudi KK, Nilsson I, Wadström T & Ljungh Å (2012) Bile stimulates cell surface hydrophobicity, Congo red binding and biofilm formation of *Lactobacillus* strains. *FEMS Microbiology Letters* **1**: 10–19

Aminov RI (2011) Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota. *Front Microbiol* **2**: 1–19

Aravind L & Landsman D (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **26**: 4413–4421

Arold ST, Leonard PG, Parkinson GN & Ladbury JE (2010) H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 15728–15732

- Arts J, van Boxtel R, Filloux A, Tommassen J & Koster M (2007) Export of the Pseudopilin XcpT of the *Pseudomonas aeruginosa* Type II Secretion System via the Signal Recognition Particle–Sec Pathway. *J Bacteriol* **189**: 2069–2076
- Asayama M & Ohshima T (2005) Curved DNA and Prokaryotic Promoters. In *DNA Conformation and Transcription* pp 37–51. Boston, MA: Springer US
- Atlung T & Ingmer H (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Molecular Microbiology* **24**: 7–17
- Austin JW, Sanders G, Kay WW & Collinson SK (1998) Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**: 295–301
- Autenrieth IB & Firsching R (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
- Baier K, Nicklisch S & Lockau W (1996) Evidence for Propeptide-Assisted Folding of the Calcium-Dependent Protease of the Cyanobacterium *Anabaena*. *European Journal of Biochemistry* **241**: 750–755
- Baños RC, Pons JI, Madrid C & Juárez A (2008) A global modulatory role for the *Yersinia enterocolitica* H-NS protein. *Microbiology (Reading, Engl.)* **154**: 1281–1289
- Bardy SL & Jarrell KF (2003) Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Molecular Microbiology* **50**: 1339–1347
- Bäumler AJ, Tsolis RM, van der Velden AWM, Stojiljkovic I, Anic S & Heffron F (1996) Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Gene* **183**: 207–213
- Bayan N, Guilvout I & Pugsley AP (2006) Secretins take shape. *Molecular Microbiology* **60**: 1–4
- Belik AS, Tarasova NN & Khmel' IA (2008) Regulation of biofilm formation in *Escherichia coli* K12: effect of mutations in HNS, StpA, lon, and rpoN genes. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **4**: 3–5
- Ben-Efraim S, Aronson M & Bichowsky-Slomnicki L (1961) New antigenic component of *Pasteurella pestis* formed under specified conditions of pH and temperature. *J Bacteriol* **81**: 704–714
- de Bentzmann S, Aurouze M, Ball G & Filloux A (2006) FppA, a Novel *Pseudomonas aeruginosa* Prepilin Peptidase Involved in Assembly of Type IVb Pili. *J Bacteriol* **188**: 4851–4860

- Bertani G (1951) Studies on Lysogenesis I. *J Bacteriol* **62**: 293–300
- Białaś N, Kasperkiewicz K, Radziejewska-Lebrecht J & Skurnik M (2012) Bacterial Cell Surface Structures in *Yersinia enterocolitica*. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **60**: 199–209
- Bieber D, Ramer SW, Wu C-Y, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R & Schoolnik GK (1998) Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**: 2114–2118
- Biedzka-Sarek M, Salmenlinna S, Gruber M, Lupas AN, Meri S & Skurnik M (2008) Functional Mapping of YadA- and Ail-Mediated Binding of Human Factor H to *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect Immun* **76**: 5016–5027
- Black RE, Jackson RJ, Tsai T, Medvesky M, Shayegani M, Feeley JC, MacLeod KI & Wakelee AM (1978) Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N. Engl. J. Med.* **298**: 76–79
- Bleves S, Voulhoux R, Michel G, Lazdunski A, Tommassen J & Filloux A (1998) The secretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of a fifth pseudopilin, XcpX (GspK family). *Molecular Microbiology* **27**: 31–40
- Bonardi S, Paris A, Bassi L, Salmi F, Bacci C, Riboldi E, Boni E, D’Incau M, Tagliabue S & Brindani F (2010) Detection, semiquantitative enumeration, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in pork and chicken meats in Italy. *J. Food Prot.* **73**: 1785–1792
- Bossé JT, Sinha S, Li MS, O’Dwyer CA, Nash JH, Rycroft AN, Kroll JS & Langford PR (2010) Regulation of *pga* operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by sigmaE and H-NS. *J Bacteriol* **192**: 2414–23
- Bottone EJ (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 257–276
- Bottone EJ (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection* **1**: 323–333
- Bottone EJ & Mollaret H-H (1977) *Yersinia Enterocolitica*: A Panoramic View of a Charismatic Microorganism. *Critical Reviews in Microbiology* **5**: 211–241
- Boyd AP, Lambermont I & Cornelis GR (2000) Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for Delivery into Eukaryotic Cells: Role of the SycE Chaperone Binding Domain of YopE. *J Bacteriol* **182**: 4811–4821
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254

- Brzostek K, Brzóstkowska M, Bukowska I, Karwicka E & Raczkowska A (2007) OmpR Negatively Regulates Expression of Invasin in *Yersinia Enterocolitica*. *Microbiology* **153**: 2416–2425
- Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Ron E, Hacker J & Dobrindt U (2009) Adaptation of Pathogenic *E. coli* to Various Niches: Genome Flexibility is the Key. *Genome Dyn* **6**: 110–125
- Bühler T, Hoschützky H & Jann K (1991) Analysis of colonization factor antigen I, an adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* O78:H11: fimbrial morphology and location of the receptor-binding site. *Infect Immun* **59**: 3876–3882
- Burnette WN (1981) ‘Western Blotting’: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* **112**: 195–203
- Calvin NM & Hanawalt PC (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* **170**: 2796–2801
- Cangelosi GA, Palermo CO, Laurent J-P, Hamlin AM & Brabant WH (1999) Colony morphotypes on Congo red agar segregate along species and drug susceptibility lines in the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Microbiology* **145**: 1317–1324
- Carniel E, Guilvout I & Prentice M (1996) Characterization of a large chromosomal ‘high-pathogenicity island’ in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **178**: 6743–6751
- Carrolo M, Frias MJ, Pinto FR, Melo-Cristino J & Ramirez M (2010) Prophage Spontaneous Activation Promotes DNA Release Enhancing Biofilm Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* **5**: 1–10
- Cathelyn JS, Ellison DW, Hinchliffe SJ, Wren BW & Miller VL (2007) The RovA regulons of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* are distinct: evidence that many RovA-regulated genes were acquired more recently than the core genome. *Molecular Microbiology* **66**: 189–205
- Chen PE, Cook C, Stewart AC, Nagarajan N, Sommer DD, Pop M, Thomason B, Thomason MPK, Lentz S, Nolan N, Sozhamannan S, Sulakvelidze A, Mateczun A, Du L, Zwick ME & Read TD (2010) Genomic characterization of the *Yersinia* genus. *Genome Biol* **11**: R1
- Chiang SL, Mekalanos JJ & Holden DW (1999) *In Vivo* Genetic Analysis of Bacterial Virulence. *Annual Review of Microbiology* **53**: 129–154
- Christensen GD, Simpson WA & Younger JJ (1985) Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: A quantitative model for

the adherence of *staphylococci* to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* **22**: 996–1006

Clock SA, Planet PJ, Perez BA & Figurski DH (2008) Outer Membrane Components of the Tad (Tight Adherence) Secretion of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Bacteriol* **190**: 980–990

Collyn F, Billault A, Mullet C, Simonet M & Marceau M (2004) YAPI, a New *Yersinia pseudotuberculosis* Pathogenicity Island. *Infect Immun* **72**: 4784–4790

Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Mårild S & Svanborg C (1996) Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *PNAS* **93**: 9827–9832

Cornelis GR (2002a) *Yersinia* type III secretion. *J Cell Biol* **158**: 401–408

Cornelis GR (2002b) The *Yersinia* Ysc–Yop ‘type III’ weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 742–752

Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 811–825

Cornelis GR, Sluiter C, Delor I, Geib D, Kaniga K, de Rouvoit CL, Sory M-P, Vanooteghem J-C & Michiels T (1991) *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Molecular Microbiology* **5**: 1023–1034

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR & Lappin-Scott HM (1995) Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**: 711–745

Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP (1999) Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **284**: 1318–1322

Cover TL & Aber RC (1989) *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* **321**: 16–24

Craig L, Pique ME & Tainer JA (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 363–378

Dalai B, Zhou R, Wan Y, Kang M, Li L, Li T, Zhang S & Chen H (2009) Histone-like protein H-NS regulates biofilm formation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogenesis* **46**: 128–134

Dame RT, van Mameren J, Luijsterburg MS, Mysiak ME, Janićijević A, Pazdzior G, van der Vliet PC, Wyman C & Wuite GJL (2005) Analysis of scanning force microscopy images of protein-induced DNA bending using simulations. *Nucleic Acids Res* **33**: e68

Dame RT, Noom MC & Wuite GJL (2006) Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* **444**: 387–390

- Darwin AJ & Miller VL (1999) Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular Microbiology* **32**: 51–62
- Davey ME & O'Toole GA (2000) Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 847–867
- Delor I & Cornelis GR (1992) Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* **60**: 4269–4277
- Delor I, Kaeckenbeeck A, Wauters G & Cornelis GR (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
- Dequeker J, Jamar R & Walravens M (1980) HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Rheumatol.* **7**: 706–710
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U & Hacker J (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 414–424
- Dorman CJ (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 391–400
- Dorman CJ (2007) H-NS, the genome sentinel. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 157–161
- Dorman CJ (2009) Regulatory integration of horizontally-transferred genes in bacteria. *Front. Biosci.* **14**: 4103–4112
- Dorman CJ, Hinton JC. & Free A (1999) Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends in Microbiology* **7**: 124–128
- Dubnau D (1997) Binding and transport of transforming DNA by *Bacillus subtilis*: the role of type-IV pilin-like proteins – a review. *Gene* **192**: 191–198
- Eisen RJ, Borchert JN, Mpanga JT, Atiku LA, MacMillan K, Boegler KA, Monteneri JA, Monaghan A & Gage KL (2012) Flea Diversity as an Element for Persistence of Plague Bacteria in an East African Plague Focus. *PLoS One* **7**: 1–8
- El Tahir Y & Skurnik M (2001) YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 209–218
- Ellison DW, Lawrenz MB & Miller VL (2004) Invasin and beyond: regulation of *Yersinia* virulence by RovA. *Trends in Microbiology* **12**: 296–300

- Ellison DW & Miller VL (2006) H-NS Represses *inv* Transcription in *Yersinia enterocolitica* through Competition with RovA and Interaction with YmoA. *J Bacteriol* **188**: 5101–5112
- Ellison DW, Young B, Nelson K & Miller VL (2003) YmoA negatively regulates expression of invasin from *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **185**: 7153–7159
- Emery PW (2005) Amino acids | Chemistry and Classification. In *Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition)* pp 76–84. Oxford: Elsevier
- Etchuuya R, Ito M, Kitano S, Shigi F, Sobue R & Maeda S (2011) Cell-to-Cell Transformation in *Escherichia coli*: A Novel Type of Natural Transformation Involving Cell-Derived DNA and a Putative Promoting Pheromone. *PLoS One* **6**: 1–12
- Fàbrega A & Vila J (2012) *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **30**: 24–32
- Falconi M, Gualtieri MT, La Teana A, Losso MA & Pon CL (1988) Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD *Escherichia coli* DNA binding protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **2**: 323–329
- Fang FC & Rimsky S (2008) New Insights into Transcriptional Regulation by H-NS. *Curr Opin Microbiol* **11**: 113–120
- Fernández L, Márquez I & Guijarro JA (2004) Identification of Specific *In Vivo*-Induced (*ivi*) Genes in *Yersinia ruckeri* and Analysis of Ruckerbactin, a Catecholate Siderophore Iron Acquisition System. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5199–5207
- Filloux A (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1694**: 163–179
- Finkelstein RA, Sciortino CV & McIntosh MA (1983) Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis.* **5 Suppl 4**: S759–777
- Flemming H-C & Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 623–633
- Foultier B, Troisfontaines P, Müller S, Opperdoes FR & Cornelis GR (2002) Characterization of the *ysa* Pathogenicity Locus in the Chromosome of *Yersinia enterocolitica* and Phylogeny Analysis of Type III Secretion Systems. *Journal of Molecular Evolution* **55**: 37–51
- Foultier B, Troisfontaines P, Vertommen D, Marenne M-N, Rider M, Parsot C & Cornelis GR (2003) Identification of Substrates and Chaperone from the *Yersinia enterocolitica* 1B *Ysa* Type III Secretion System. *Infect Immun* **71**: 242–253

- Francétic O, Buddelmeijer N, Lewenza S, Kumamoto CA & Pugsley AP (2007) Signal Recognition Particle-Dependent Inner Membrane Targeting of the PulG Pseudopilin Component of a Type II Secretion System. *J Bacteriol* **189**: 1783–1793
- Francetić O, Lory S & Pugsley AP (1998) A second prepilin peptidase gene in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology* **27**: 763–775
- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A & Korkeala H (2006) Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**: 315–329
- Freeman DJ, Falkiner FR & Keane CT (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. *J Clin Pathol* **42**: 872–874
- Fronzes R, Remaut H & Waksman G (2008) Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J* **27**: 2271–2280
- Fuchs G & Schlegel HG (2006) Allgemeine Mikrobiologie 8., völlig überarb. u. erw. A. Thieme, Stuttgart
- Fuller TE, Kennedy MJ & Lowery DE (2000) Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microbial Pathogenesis* **29**: 25–38
- Galindo CL, Rosenzweig JA, Kirtley ML & Chopra AK (2011) Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *J Pathog* **2011**: 1–16
- Gebhard S, Gaballa A, Helmann JD & Cook GM (2009) Direct Stimulus Perception and Transcription Activation by a Membrane-bound DNA Binding Protein. *Mol Microbiol* **73**: 482–491
- Gehring AM, DeMoll E, Fetherston JD, Mori I, Mayhew GF, Blattner FR, Walsh CT & Perry RD (1998) Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chemistry & Biology* **5**: 573–586
- Gophna U, Barlev M, Seijffers R, Oelschläger TA, Hacker J & Ron EZ (2001) Curli Fibers Mediate Internalization of *Escherichia coli* by Eukaryotic Cells. *Infect Immun* **69**: 2659–2665
- Gordon BRG, Li Y, Cote A, Weirauch MT, Ding P, Hughes TR, Navarre WW, Xia B & Liu J (2011) Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 10690–10695
- Gültekin H & Heermann KH (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Analytical Biochemistry* **172**: 320–329

- Guzman LM, Belin D, Carson MJ & Beckwith J (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121–4130
- Haase EM, Zmuda JL & Scannapieco FA (1999) Identification and Molecular Analysis of Rough-Colony-Specific Outer Membrane Proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **67**: 2901–2908
- Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I & Tschäpe H (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology* **23**: 1089–1097
- Haller JC, Carlson S, Pederson KJ & Pierson DE (2000) A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Molecular Microbiology* **36**: 1436–1446
- Hall-Stoodley L, Costerton JW & Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 95–108
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557–580
- Hanahan D, Jessee J & Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. In *Bacterial Genetic Systems* pp 63–113. Academic Press
- Handley PS & Jacob AE (1981) Some Structural and Physiological Properties of Fimbriae of *Streptococcus faecalis*. *J Gen Microbiol* **127**: 289–293
- Haneburger I, Eichinger A, Skerra A & Jung K (2011) New Insights into the Signaling Mechanism of the pH-responsive, Membrane-integrated Transcriptional Activator CadC of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **286**: 10681–10689
- Hanski C, Naumann M, Hahn H & Riecken EO (1989) Determinants of invasion and survival of *Yersinia enterocolitica* in intestinal tissue. *Medical Microbiology and Immunology* **178**: 289–296
- Hauri H-P & Bucher K (1986) Immunoblotting with monoclonal antibodies: Importance of the blocking solution. *Analytical Biochemistry* **159**: 386–389
- Heesemann J (1987) Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microbiology Letters* **48**: 229–233
- Heesemann J, Sing A & Trülzsch K (2006) *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 55–61

- Heise T & Dersch P (2006) Identification of a Domain in *Yersinia* Virulence Factor YadA That Is Crucial for Extracellular Matrix-Specific Cell Adhesion and Uptake. *PNAS* **103**: 3375–3380
- Helling RB, Goodman HM & Boyer HW (1974) Analysis of Endonuclease R·EcoRI Fragments of DNA from Lambdoid Bacteriophages and Other Viruses by Agarose-Gel Electrophoresis. *J Virol* **14**: 1235–1244
- Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E & Holden DW (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**: 400–403
- Herbst K, Bujara M, Heroven AK, Opitz W, Weichert M, Zimmermann A & Dersch P (2009) Intrinsic Thermal Sensing Controls Proteolysis of *Yersinia* Virulence Regulator RovA. *PLoS Pathog* **5**: e1000435
- Heroven AK, Böhme K, Tran-Winkler H & Dersch P (2007) Regulatory elements implicated in the environmental control of *invasin* expression in enteropathogenic *Yersinia*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **603**: 156–166
- Heroven AK, Nagel G, Tran HJ, Parr S & Dersch P (2004) RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of *invasin* and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Molecular Microbiology* **53**: 871–888
- Heusipp G, Schmidt MA & Miller VL (2003) Identification of *rpoE* and *nadB* as host responsive elements of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiology Letters* **226**: 291–298
- Heusipp G, Young GM & Miller VL (2001) HreP, an *In Vivo*-Expressed Protease of *Yersinia enterocolitica*, Is a New Member of the Family of Subtilisin/Kexin-Like Proteases. *J Bacteriol* **183**: 3556–3563
- Hizver J, Rozenberg H, Frolow F, Rabinovich D & Shakked Z (2001) DNA bending by an adenine–thymine tract and its role in gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8490–8495
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK & Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51–59
- Hobbs M & Mattick JS (1993) Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Molecular Microbiology* **10**: 233–243
- Hong SH, Wang X & Wood TK (2010) Controlling Biofilm Formation, Prophage Excision, and Cell Death by Rewiring Global Regulator H-NS of *Escherichia coli*. *Microb Biotechnol* **3**: 344–356

- Howard SL, Gaunt MW, Hinds J, Witney AA, Stabler R & Wren BW (2006) Application of Comparative Phylogenomics To Study the Evolution of *Yersinia enterocolitica* and To Identify Genetic Differences Relating to Pathogenicity. *J Bacteriol* **188**: 3645–3653
- Inoue T, Ohta H, Tanimoto I, Shingaki R & Fukui K (2000) Heterogeneous Post-Translational Modification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Fimbrillin. *microbiology and immunology* **44**: 715–718
- Inoue T, Tanimoto I, Ohta H, Kato K, Murayama Y & Fukui K (1998) Molecular Characterization of Low-Molecular-Weight Component Protein, Flp, in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Fimbriae. *microbiology and immunology* **42**: 253–258
- Iriarte M & Cornelis GR (1995) MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **177**: 738–744
- Iriarte M, Vanooteghem J-C, Delor I, Diaz R, Knutton S & Cornelis GR (1993) The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology* **9**: 507–520
- Isberg RR (1990) Pathways for the penetration of enteroinvasive *Yersinia* into mammalian cells. *Mol. Biol. Med.* **7**: 73–82
- Isberg RR & Leong JM (1990) Multiple β 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**: 861–871
- Iwobi A, Heesemann J, Garcia E, Igwe E, Noelting C & Rakin A (2003) Novel Virulence-Associated Type II Secretion System Unique to High-Pathogenicity *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **71**: 1872–1879
- Iyer LM & Aravind L (2004) The emergence of catalytic and structural diversity within the beta-clip fold. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **55**: 977–991
- Janowicz DM, Cooney SA, Walsh J, Baker B, Katz BP, Fortney KR, Zwickl BW, Ellinger S & Munson RS (2011) Expression of the Flp proteins by *Haemophilus ducreyi* is necessary for virulence in human volunteers. *BMC Microbiology* **11**: 208
- Jarrett CO, Deak E, Isherwood KE, Oyston PC, Fischer ER, Whitney AR, Kobayashi SD, DeLeo FR & Hinnebusch BJ (2004) Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *J Infect Dis.* **190**: 782–792
- Joshi R, Passner JM, Rohs R, Jain R, Sosinsky A, Crickmore MA, Jacob V, Aggarwal AK, Honig B & Mann RS (2007) Functional specificity of a Hox protein mediated by the recognition of minor groove structure. *Cell* **131**: 530–543

- Kachlany SC, Planet PJ, Bhattacharjee MK, Kollia E, DeSalle R, Fine DH & Figurski DH (2000) Nonspecific Adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Requires Genes Widespread in Bacteria and *Archaea*. *J Bacteriol* **182**: 6169–6176
- Kachlany SC, Planet PJ, DeSalle R, Fine DH & Figurski DH (2001a) Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: from plaque to plaque to pond scum. *Trends in Microbiology* **9**: 429–437
- Kachlany SC, Planet PJ, Desalle R, Fine DH, Figurski DH & Kaplan JB (2001b) *flp-1*, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol. Microbiol.* **40**: 542–554
- Kato M, Aiba H, Tate S, Nishimura Y & Mizuno T (1989) Location of phosphorylation site and DNA-binding site of a positive regulator, OmpR, involved in activation of the osmoregulatory genes of *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **249**: 168–172
- Keet EE (1974) *Yersinia enterocolitica* septicemia. Source of infection and incubation period identified. *N Y State J Med* **74**: 2226–2230
- Kinder SA, Badger JL, Bryant GO, Pepe JC & Miller VL (1993) Cloning of the YenI restriction endonuclease and methyltransferase from *Yersinia enterocolitica* serotype O8 and construction of a transformable R-M+ mutant. *Gene* **136**: 271–5
- Kirjavainen V, Jarva H, Biedzka-Sarek M, Blom AM, Skurnik M & Meri S (2008) *Yersinia enterocolitica* Serum Resistance Proteins YadA and Ail Bind the Complement Regulator C4b-Binding Protein. *PLoS Pathog* **4**: 1–10
- Koolman J & Röhm K-H (2003) Taschenatlas der Biochemie 3., vollst. überarb. u. erw. A. Thieme, Stuttgart
- Koomey M, Bergstrom S, Blake M & Swanson J (1991) Pilin expression and processing in pilus mutants of *Neisseria gonorrhoeae*: critical role of Gly-1 in assembly. *Molecular Microbiology* **5**: 279–287
- Kuehn MJ, Heuser J, Normark S & Hultgren SJ (1992) P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. , *Published online: 19 March 1992; | doi:10.1038/356252a0* **356**: 252–255
- Kyhse-Andersen J (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **10**: 203–209
- Kyte J & Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**: 105–132

- Laemmli UK (1970)** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. , *Published online: 15 August 1970; / doi:10.1038/227680a0* **227**: 680–685
- Lang B, Blot N, Bouffartigues E, Buckle M, Geertz M, Gualerzi CO, Mavathur R, Muskhelishvili G, Pon CL, Rimsky S, Stella S, Babu MM & Travers A (2007)** High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **35**: 6330–6337
- LaPointe CF & Taylor RK (2000)** The Type 4 Prepilin Peptidases Comprise a Novel Family of Aspartic Acid Proteases. *J. Biol. Chem.* **275**: 1502–1510
- Lavery R, Pullman B & Corbin S (1981)** The molecular electrostatic potential and steric accessibility of poly (dA–dT). poly (dA–dT) in various conformations: B-DNA, D-DNA and ‘alternating-B’ DNA. *Nucleic Acids Res* **9**: 6539–6552
- Lesic B, Zouine M, Ducos–Galand M, Huon C, Rosso M–L, Prévost M–C, Mazel D & Carniel E (2012)** A Natural System of Chromosome Transfer in *Yersinia pseudotuberculosis*. *PLoS Genet* **8**: 1–12
- Li J, Egelman EH & Craig L (2012)** Structure of the *Vibrio cholerae* Type IVb Pilus and Stability Comparison with the *Neisseria gonorrhoeae* Type IVa Pilus. *Journal of Molecular Biology* **418**: 47–64
- Li X, Yan Z & Xu J (2003)** Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* **149**: 353–362
- Ligon BL (2006)** Plague: A Review of its History and Potential as a Biological Weapon. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* **17**: 161–170
- Lindler LE & Tall BD (1993)** *Yersinia pestis* pH 6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages. *Mol. Microbiol.* **8**: 311–324
- Liu Y, Chen H, Kenney LJ & Yan J (2010)** A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes. *Genes Dev* **24**: 339–344
- Ljungberg P, Valtonen M, Harjola VP, Kaukoranta–Tolvanen SS & Vaara M (1995)** Report of four cases of *Yersinia pseudotuberculosis* septicemia and a literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 804–810
- Llosa M & de la Cruz F (2005)** Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Research in Microbiology* **156**: 1–6
- van Loghem J (1944)** The classification of the plague–bacillus. *Antonie van Leeuwenhoek* **10**: 15–16

- de Lorenzo V, Eltis L, Kessler B & Timmis KN (1993) Analysis of *Pseudomonas* gene products using lacIq/P_{trp}-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17–24
- Lund AH, Duch M & Pedersen FS (1996) Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res* **24**: 800–801
- Madrid C, Nieto JM & Juárez A (2002) Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 425–432
- Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH & Sørensen SJ (2012) The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **65**: 183–195
- Mahan MJ, Heithoff DM, Sinsheimer RL & Low DA (2000) Assessment of Bacterial Pathogenesis by Analysis of Gene Expression in the Host. *Annual Review of Genetics* **34**: 139–164
- Mahan MJ, Slauch JM & Mekalanos JJ (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**: 686–688
- Mahan MJ, Tobias JW, Slauch JM, Hanna PC, Collier RJ & Mekalanos JJ (1995) Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 669–673
- Martínez-Hackert E & Stock AM (1997) Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *Journal of Molecular Biology* **269**: 301–312
- Matsumoto H & Young GM (2009) Translocated effectors of *Yersinia*. *Curr Opin Microbiol* **12**: 94–100
- Mattick JS (2002) Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology* **56**: 289–314
- Mattos-Guaraldi AL, Duarte Formiga LC & Pereira GA (2000) Cell surface components and adhesin in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbes and Infection* **2**: 1507–1512
- McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD & Kjelleberg S (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 39–50
- McLeod SM & Johnson RC (2001) Control of transcription by nucleoid proteins. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 152–159
- Mikulskis AV & Cornelis GR (1994) A new class of proteins regulating gene expression in enterobacteria. *Mol. Microbiol.* **11**: 77–86

- Miller VL (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory
- Miller VL, Farmer JJ, Hill WE & Falkow S (1989) The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun* **57**: 121–131
- Miller VL & Mekalanos JJ (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol* **170**: 2575–2583
- Miller VL, Taylor RK & Mekalanos JJ (1987) Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* **48**: 271–279
- Morales VM, Bäckman A & Bagdasarian M (1991) A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* **97**: 39–47
- Navarre WW, McClelland M, Libby SJ & Fang FC (2007) Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes Dev.* **21**: 1456–1471
- Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ & Fang FC (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**: 236–238
- Nelson KM, Young GM & Miller VL (2001) Identification of a Locus Involved in Systemic Dissemination of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **69**: 6201–6208
- Neutra MR, Pringault E & Kraehenbuhl J-P (1996) Antigen Sampling Across Epithelial Barriers and Induction of Mucosal Immune Responses. *Annual Review of Immunology* **14**: 275–300
- Ng SYM, Chaban B & Jarrell KF (2006) Archaeal Flagella, Bacterial Flagella and Type IV Pili: A Comparison of Genes and Posttranslational Modifications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **11**: 167–191
- Nika JR, Latimer JL, Ward CK, Blick RJ, Wagner NJ, Cope LD, Mahairas GG, Munson RS & Hansen EJ (2002) *Haemophilus ducreyi* Requires the *flp* Gene Cluster for Microcolony Formation In Vitro. *Infect Immun* **70**: 2965–2975
- Nunn DN & Lory S (1991) Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3281–3285
- O'Toole GA & Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**: 449–461

- Olsén A, Jonsson A & Normark S (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**: 652–655
- Paerregaard A, Espersen F, Jensen OM & Skurnik M (1991) Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect. Immun.* **59**: 253–260
- Paetzel M, Karla A, Strynadka NCJ & Dalbey RE (2002) Signal Peptidases. *Chem. Rev.* **102**: 4549–4580
- Pelicic V (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Molecular Microbiology* **68**: 827–837
- Pepe JC, Badger JL & Miller VL (1994) Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica inv* gene. *Molecular Microbiology* **11**: 123–135
- Pepe JC & Lory S (1998) Amino Acid Substitutions in PilD, a Bifunctional Enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*: effect on leader peptidase and n-methyltransferase activities in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**: 19120–19129
- Pepe JC & Miller VL (1993) *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6473–6477
- Perez BA, Planet PJ, Kachlany SC, Tomich M, Fine DH & Figurski DH (2006) Genetic Analysis of the Requirement for flp-2, tadV, and rcpB in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Biofilm Formation. *J Bacteriol* **188**: 6361–6375
- Perez-Cheeks BA, Planet PJ, Sarkar IN, Clock SA, Xu Q & Figurski DH (2012) The product of tadZ, a new member of the parA/minD superfamily, localizes to a pole in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Molecular Microbiology* **83**: 694–711
- Perry RD & Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 35–66
- Pitts B, Hamilton MA, Zelter N & Stewart PS (2003) A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods* **54**: 269–276
- Planet PJ, Kachlany SC, Fine DH, DeSalle R & Figurski DH (2003) The Widespread Colonization Island of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Nat. Genet.* **34**: 193–198
- Porath J, Carlsson J, Olsson I & Belfrage G (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598–599

- Portnoy DA & Falkow S (1981) Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **148**: 877–883
- Proft T & Baker E (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**: 613–635
- Prosseda G, Falconi M, Giangrossi M, Gualerzi CO, Micheli G & Colonna B (2004) The virF promoter in *Shigella*: more than just a curved DNA stretch. *Molecular Microbiology* **51**: 523–537
- Pugsley AP (1993a) Processing and methylation of PulG, a pilin-like component of the general secretory pathway of *Klebsiella oxytoca*. *Molecular Microbiology* **9**: 295–308
- Pugsley AP (1993b) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50–108
- Pugsley AP & Dupuy B (1992) An enzyme with type IV prepilin peptidase activity is required to process components of the general extracellular protein secretion pathway of *Klebsiella oxytoca*. *Molecular Microbiology* **6**: 751–760
- Rakin A, Noelting C, Schubert S & Heesemann J (1999) Common and Specific Characteristics of the High-Pathogenicity Island of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **67**: 5265–5274
- Reeves R (2000) Structure and Function of the HMGI(Y) Family of Architectural Transcription Factors. *Environmental Health Perspectives* **108**: 803–809
- Reeves R & Beckerbauer L (2001) HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression* **1519**: 13–29
- Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT & Lovley DR (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **435**: 1098–1101
- Revell PA & Miller VL (2001) *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**: 159–164
- Robins-Browne RM, Miliotis MD, Cianciosi S, Miller VL, Falkow S & Morris JG (1989) Evaluation of DNA colony hybridization and other techniques for detection of virulence in *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* **27**: 644–650
- Rosqvist R, Magnusson KE & Wolf-Watz H (1994) Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* **13**: 964–972
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and

restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350–1354

Sakellaris H & Scott JR (1998) New tools in an old trade: CS1 pilus morphogenesis. *Molecular Microbiology* **30**: 681–687

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory

Sauer FG, Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ & Hultgren SJ (2000) Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **3**: 65–72

Scharf SJ, Horn GT & Erlich HA (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**: 1076–1078

Schilling J, Wagner K, Seekircher S, Greune L, Humberg V, Schmidt MA & Heusipp G (2010) Transcriptional Activation of the tad Type IVb Pilus Operon by PypB in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **192**: 3809–3821

Schreiner HC, Sinatra K, Kaplan JB, Furgang D, Kachlany SC, Planet PJ, Perez BA, Figurski DH & Fine DH (2003) Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 7295–7300

Sette M, Spurio R, Trotta E, Brandizi C, Brandi A, Pon CL, Barbato G, Boelens R & Gualerzi CO (2009) Sequence-specific Recognition of DNA by the C-terminal Domain of Nucleoid-associated Protein H-NS. *J Biol Chem* **284**: 30453–30462

Shutinoski B, Schmidt MA & Heusipp G (2009) Transcriptional regulation of the Yts1 type II secretion system of *Yersinia enterocolitica* and identification of secretion substrates. *Molecular Microbiology* **75**: 676–691

Siebers A & Finlay BB (1996) M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends in Microbiology* **4**: 22–29

Sørensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N & Wuertz S (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 700–710

Stella S, Spurio R, Falconi M, Pon CL & Gualerzi CO (2005) Nature and mechanism of the in vivo oligomerization of nucleoid protein H-NS. *EMBO J* **24**: 2896–2905

Stenhouse MA & Milner LV (1982) *Yersinia enterocolitica*. A hazard in blood transfusion. *Transfusion* **22**: 396–398

- Stoebel DM, Free A & Dorman CJ (2008) Anti-Silencing: Overcoming H-NS-Mediated Repression of Transcription in Gram-Negative Enteric Bacteria. *Microbiology* **154**: 2533–2545
- Stojiljkovic I & Hantke K (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J* **11**: 4359–4367
- Stonehouse EA, Hulbert RR, Nye MB, Skorupski K & Taylor RK (2011) H-NS binding and repression of the ctx promoter in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **193**: 979–988
- Straley SC & Perry RD (1995) Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends in Microbiology* **3**: 310–317
- Straley SC, Plano GV, Skrzypek E, Haddix PL & Fields KA (1993) Regulation by Ca²⁺ in the *Yersinia* low-Ca²⁺ response. *Molecular Microbiology* **8**: 1005–1010
- Strom MS & Lory S (1987) Mapping of export signals of *Pseudomonas aeruginosa* pilin with alkaline phosphatase fusions. *J Bacteriol* **169**: 3181–3188
- Strom MS & Lory S (1991) Amino acid substitutions in pilin of *Pseudomonas aeruginosa*. Effect on leader peptide cleavage, amino-terminal methylation, and pilus assembly. *J. Biol. Chem.* **266**: 1656–1664
- Strom MS & Lory S (1992) Kinetics and sequence specificity of processing of prepilin by PilD, the type IV leader peptidase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **174**: 7345–7351
- Strom MS, Nunn DN & Lory S (1994) Posttranslational processing of type IV prepilin and homologs by PilD of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Bacterial Pathogenesis Part A: Identification and Regulation of Virulence Factors* pp 527–540. Academic Press
- Studier FW & Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**: 113–130
- Taylor WR (1986) The classification of amino acid conservation. *Journal of Theoretical Biology* **119**: 205–218
- Tendeng C & Bertin PN (2003) H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiol.* **11**: 511–518
- Tennant SM, Grant TH & Robins-Browne RM (2003) Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **38**: 127–137

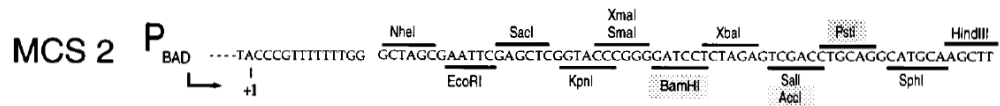
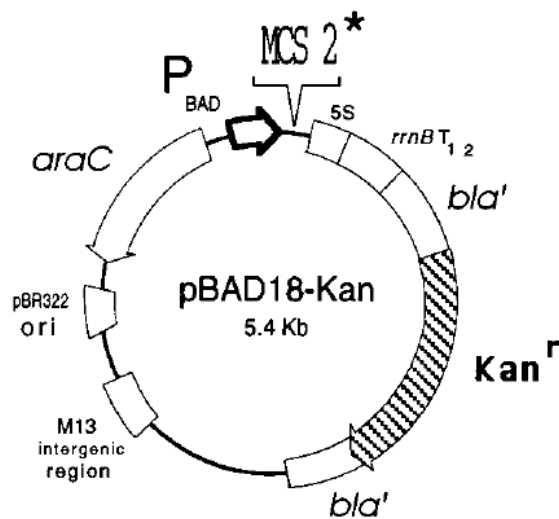
- Thomas CM & Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 711–721
- Thomson NR, Howard S, Wren BW, Holden MTG, Crossman L, Challis GL, Churcher C, Mungall K, Brooks K, Chillingworth T, Feltwell T, Abdellah Z, Hauser H, Jagels K, Maddison M, Moule S, Sanders M, Whitehead S, Quail MA, Dougan G, *et al* (2006) The Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of the High Pathogenicity *Yersinia enterocolitica* Strain 8081. *PLoS Genet* **2**: 2039–2051
- Tomich M, Fine DH & Figurski DH (2006) The TadV Protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Is a Novel Aspartic Acid Prepilin Peptidase Required for Maturation of the Flp1 Pilin and TadE and TadF Pseudopilins. *J Bacteriol* **188**: 6899–6914
- Tomich M, Planet PJ & Figurski DH (2007) The tad locus: postcards from the widespread colonization island. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 363–375
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350–4354
- Tran HJ, Heroven AK, Winkler L, Spreter T, Beatrix B & Dersch P (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
- Trosky JE, Liverman ADB & Orth K (2008) *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cellular Microbiology* **10**: 557–565
- Trülsch K, Heesemann J & Oellerich M (2007) Invasion and Dissemination of *Yersinia enterocolitica* in the Mouse Infection Model. In *The Genus Yersinia*, Perry RD & Fetherston JD (eds) pp 279–285. Springer New York
- Tupper AE, Owen-Hughes TA, Ussery DW, Santos DS, Ferguson DJ, Sidebotham JM, Hinton JC & Higgins CF (1994) The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology in vitro. *EMBO J* **13**: 258–268
- Ulrich LE, Koonin EV & Zhulin IB (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* **13**: 52–56
- Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R & Peleg Y (2010) Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology* **172**: 34–44
- Venecia K & Young GM (2005) Environmental Regulation and Virulence Attributes of the Ysa Type III Secretion System of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B. *Infect Immun* **73**: 5961–5977

- Wagner K, Schilling J, Fälker S, Schmidt MA & Heusipp G (2009) A Regulatory Network Controls Expression of the *In Vivo*-Expressed HreP Protease of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **191**: 1666–1676
- Wang H, Ayala JC, Silva AJ & Benitez JA (2012) The Histone-Like Nucleoid Structuring Protein (H-NS) Is a Repressor of *Vibrio cholerae* Exopolysaccharide Biosynthesis (*vps*) Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 2482–2488
- Watnick P & Kolter R (2000) Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol* **182**: 2675–2679
- Williamson HS & Free A (2005) A truncated H-NS-like protein from enteropathogenic *Escherichia coli* acts as an H-NS antagonist. *Molecular Microbiology* **55**: 808–827
- Winnacker E-L (1990) Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie Weinheim: Wiley-VCH
- Wren BW (2003) The Yersiniae – a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology* **1**: 55–64
- Wu H-J, Wang AH-J & Jennings MP (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**: 93–101
- Yakovchuk P, Protozanova E & Frank-Kamenetskii MD (2006) Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res* **34**: 564–574
- Yang L, Liu Y, Wu H, Song Z, Høiby N, Molin S & Givskov M (2012) Combating biofilms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **65**: 146–157
- Yang Y & Isberg RR (1993) Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis yadA* product. *Infect. Immun.* **61**: 3907–3913
- Yang Y, Merriam JJ, Mueller JP & Isberg RR (1996) The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infect Immun* **64**: 2483–2489
- Young GM & Miller VL (1997) Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Molecular Microbiology* **25**: 319–328
- Zamenhof S, Brawerman G & Chargaff E (1952) On the desoxyribose nucleic acids from several microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta* **9**: 402–405
- Zhou D, Han Y & Yang R (2006) Molecular and physiological insights into plague transmission, virulence and etiology. *Microbes and Infection* **8**: 273–284

8 Anhang

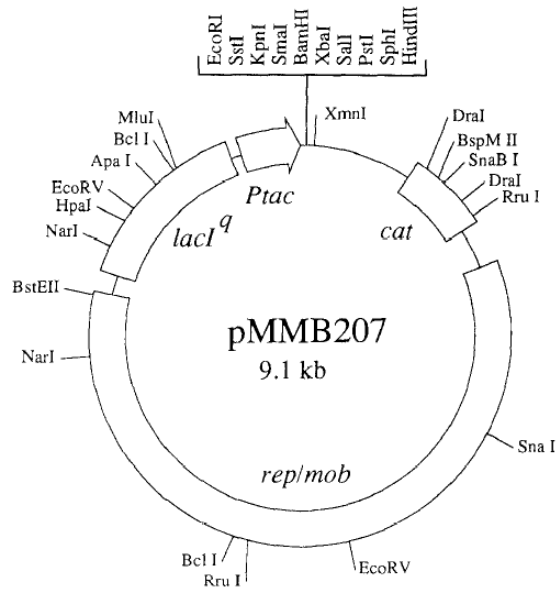
8.1 Plasmidkarten

8.1.1 pBAD18-Kan



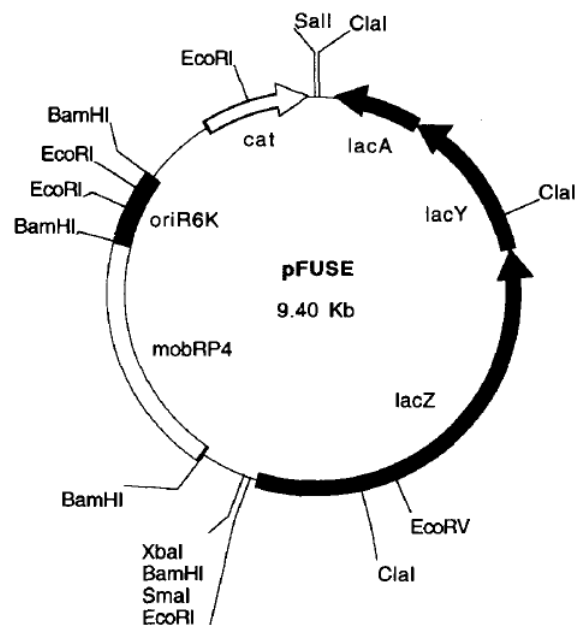
(Guzman *et al.*, 1995)

8.1.2 pMMB207



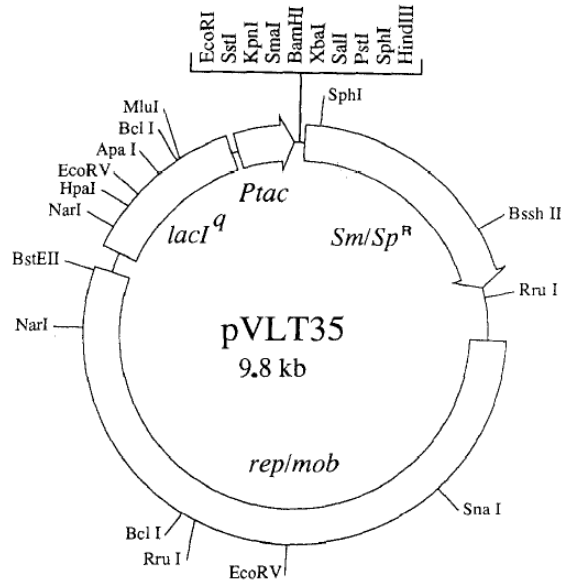
(Morales *et al.*, 1991)

8.1.3 pFUZE



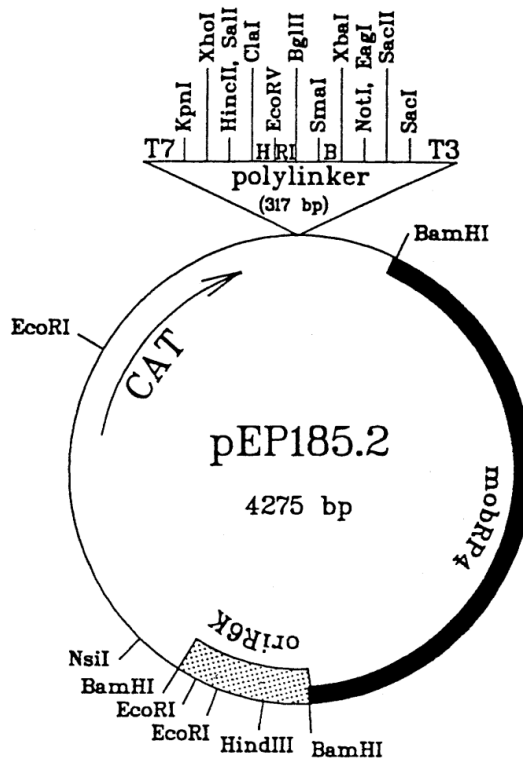
(Bäumler *et al.*, 1996)

8.1.4 pVLT35



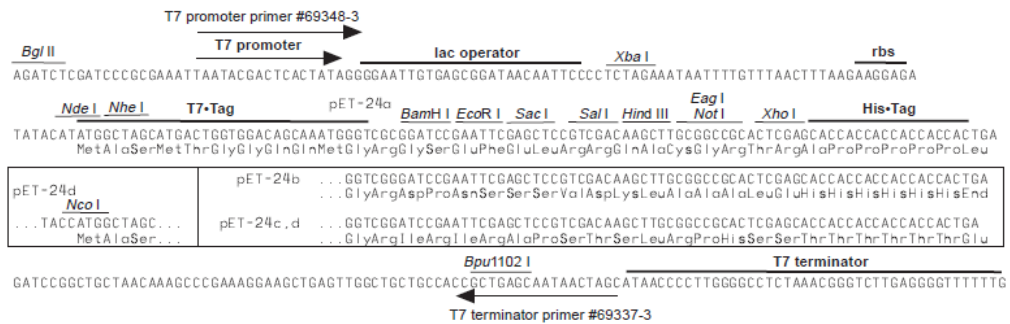
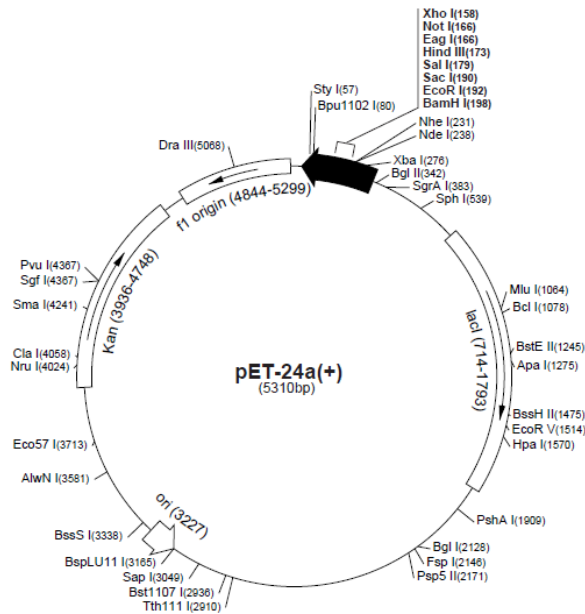
(de Lorenzo *et al.*, 1993)

8.1.5 pEP185.2



(Kinder *et al.*, 1993)

8.1.6 pET-24b(+)



(Novagen)

8.2 Lokalisation der H-NS-Konsensussequenz

Gen	Promotorregion (-500 bis -1)	H-NS-Konsensussequenz (TCGATTATAT)	Sequenzübereinstimmung
<i>hreP</i>	-84 bis -75	TCGACTGCTG	50 %
	-446 bis -437	TCGCTTTTGT	70 %
<i>pypA</i>	-148 bis -139	GCGATAATAT	80 %
	-176 bis -167	AACCTTATAT	60 %
<i>pypB</i>	-251 bis -243	ACAATTACAT	70 %
<i>pypC</i>	-10 bis -1	GGGGTTATTT	50 %

8.3 Sequenzvergleiche zwischen *A. actinomycetemcomitans* und *Y. enterocolitica*

8.3.1 Flp

```

A. actinomycetemcomitans  MLNLTLTAKAYIKAI EAIRSEKKNQAGVTAIEYGLIAIAVAVLIIVAVFYSEGGFIAKLQSK 60
Y. enterocolitica 8081  MMN-LITKGYVTAQVNAQQFIKDNRG-TVIEY-----VLIIVAVAAAS---LLALVKTP 47

A. actinomycetemcomitans  FNDLTSITSSASVK--K 75
Y. enterocolitica 8081  LKEIVDT-SMTNIKDMVK 64

```

8.3.2 TadV

```

A. actinomycetemcomitans  MNWFINAVIIMLL-LITLSITDIRSRISNRVVLFLLLV IIPFSLK YQTFIVFIPALC 59
Y. enterocolitica 8081  MDT-LNLIISALLMLQLLFVCYSDIRYRTISNKFIIITIAINALALGFTMNHITVNIVIPFS 59

A. actinomycetemcomitans  TLIIGFLFLSLRFIGAGDKLASVLM LA VPSDEVFSFFF TTFAGLGLI IIGWLFRRKSI 119
Y. enterocolitica 8081  ALLIGYSLFHFHLIGGDVKLITVLLALTTAKSLDFILY TAMMGGVVM IIGMLVNRREDI 119

A. actinomycetemcomitans  KENGLPYGVAISLGFMINLALSN 142
Y. enterocolitica 8081  QQRGVVPYAVAISAGFL--LSFLT 140

```

8.3.3 TadE

```

A. actinomycetemcomitans  ME---KFLSNKKGASTVEFALTVVVFYFIVFLILEFCRISITTAYWDLAITE SARI AKN 56
Y. enterocolitica 8081  MNGNVIIFFRSNNGSI AIEFLIVFILFIFILLSSAEITRLLYISSNLDLAFSEATKTAKN 60

A. actinomycetemcomitans  RTAEGNDYAAEFKALKQQLVYQETSTIG-YLARLDKNGGYEIDVKYVDCGSESSCIKSL 115
Y. enterocolitica 8081  RNITDN---RDYNTILRQRLI AQ-TGVGCAFI A--DSN--IVTDVTF-----SNSINDI 106

A. actinomycetemcomitans  LDGKFRQPTKDRDGGKIIPPNGRLATLAVYSLTYKYEFVLSL PFLPRDSVGSLLSRKFVA V 175
Y. enterocolitica 8081  INN-----AQQDNNL-----ALAKYTVSYTYR-AVFFP- IPTIFANTLLKREVI FV 151

A. actinomycetemcomitans  QEFNRSKFQHPGRSNK 191
Y. enterocolitica 8081  QEY----- 154

```

8.3.4 TadF

```

A. actinomycetemcomitans  MKKNIITSIKKFFRNKKCAV TLELLFMLILLIFIFAFITDLVIVRTTQCKLDNASYSLVN 60
Y. enterocolitica 8081  MFKNIINN--KFIINSNCTV IIELVFVVTIIALFIKLLSVAAYNSTV GKLDRISYSIAG 57

A. actinomycetemcomitans  ILRERNQLY-NDNG-----TEK LKSTDLT EY EKMA--KLIFGDKDSPNKVG 104
Y. enterocolitica 8081  IVRERVKLYSNDNVLTQE QVNQLKLLTEQMLLNSGTHYNNVAMRIETLHFNDTDSSEPEH 117

A. actinomycetemcomitans  VTIEHWEKKTPEMLTNLCTCQPYRKLDDNLSYLSRSESANPDNQKRIPLYQVTLGVEV 164
Y. enterocolitica 8081  KTIID--DEKSVS--FSIGNCQPAQLLRD-MSDLSPYNGTNG----RWIPLYQVTLCLPT 166

A. actinomycetemcomitans  GSFFKNLITRKENQSGFMLS SSSLAVAR 192
Y. enterocolitica 8081  IPWYSNLFST--DVSVPAIKSSAITIER 192

```

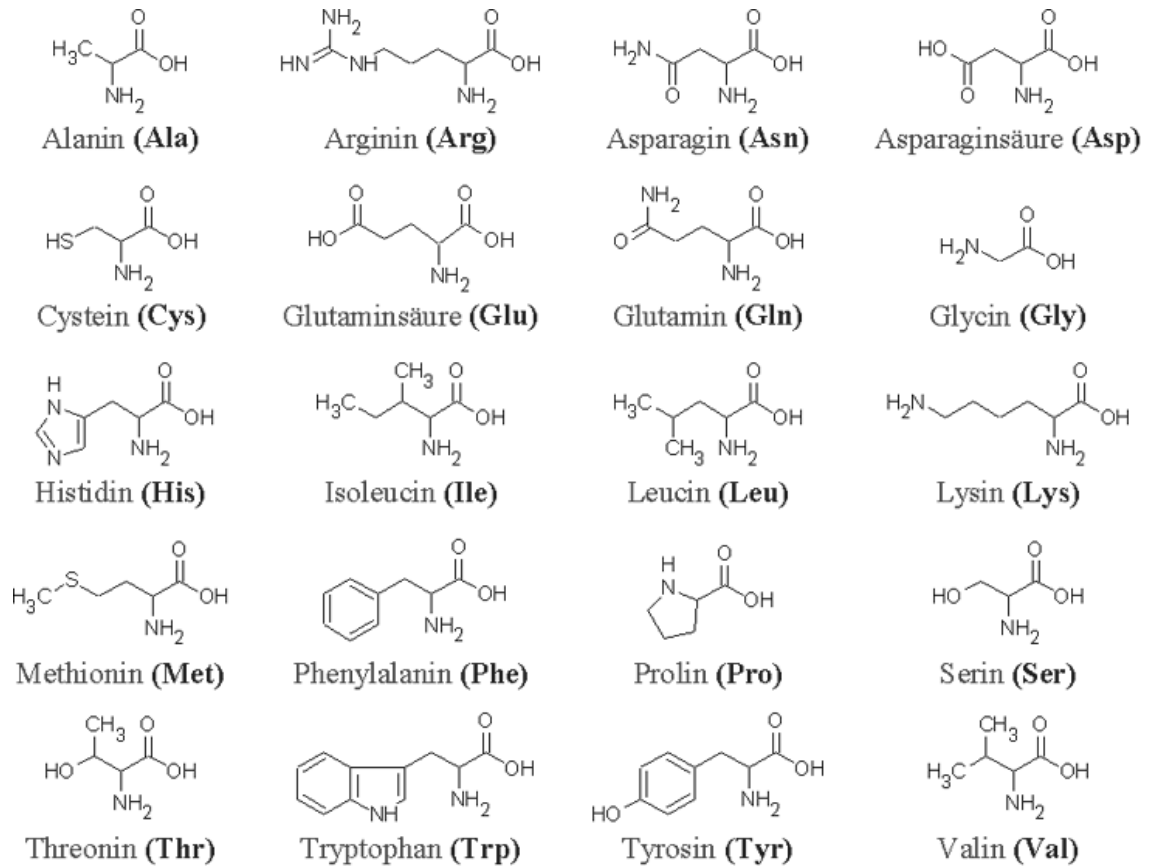
8.4 Übersicht der Aminosäuren

8.4.1 Kodierung

Ala = Alanin, Arg = Arginin, Asn = Asparagin, Asp = Aspartat, Cys = Cystein, Gln = Glutamin, Glu = Glutamat, Gly = Glycin, His = Histidin, Ile = Isoleucin, Leu = Leucin, Lys = Lysin, Met = Methionin, Phe = Phenylalanin, Pro = Prolin, Pyl = Pyrrolysin, Sec = Selenocystein, Ser = Serin, Thr = Threonin, Trp = Tryptophan, Tyr = Tyrosin, Val = Valin

		Zweite Basenposition								
		U	C	A	G					
Erste Basenposition (5'-Ende)	U	UUU	UCU UCC UCA UCG	UAU UAC UAA UAG	UGU UGC UGA UGG	Dritte Basenposition (3'-Ende)				
		UUC					Phe (F)	Tyr (Y)	Cys (C)	U
		UUA								Leu (L)
		UUG					Ser (S)	Stop Pyl	Trp	
	C	CUU	CCU CCC CCA CCG	CAU CAC CAA CAG	CGU CGC CGA CGG	U				
		CUC				Leu (L)	His (H)	Arg (R)	C	
		CUA							Pro (P)	Gln (Q)
		CUG				Gly (G)				
	A	AUU	ACU ACC ACA ACG	AAU AAC AAA AAG	AGU AGC AGA AGG				U	
		AUC				Ile (I)	Asn (N)	Ser (S)	C	
		AUA							Met (M)	Lys (K)
		AUG				Thr (T)				
	G	GUU	GCU GCC GCA GCG	GAU GAC GAA GAG	GGU GGC GGA GGG				U	
		GUC				Val (V)	Asp (D)	Gly (G)	C	
		GUA							Ala (A)	Glu (E)
		GUG								

8.4.2 Strukturformeln der proteinogenen Aminosäuren



(<http://www.chemie-online.net/biochemie/images/20.gif>)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Privatdozent Dr. Gerhard Heusipp am Institut für Infektiologie, Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE), an der Westfälischen Wilhelms-Universität in der Zeit von Oktober 2009 bis Oktober 2012 angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen worden sind, als solche kenntlich gemacht habe.

Münster,

Inga Blädel

Wissenschaftliche Beiträge

1 Publikationen

Blädel, I, Wagner K, Beck A, Schilling J, Schmidt MA & Heusipp G (2012) The H-NS protein silences the *pyp* regulatory network of *Yersinia enterocolitica* and is involved in controlling biofilm formation. *Manuscript in preparation*.

von Tils D, Blädel I, Schmidt MA & Heusipp G (2012) Type-II secretion in *Yersinia* – a secretion system for pathogenicity and environmental fitness. *Manuscript in preparation*.

2 Poster

Blädel, I, Wagner K, Beck A, Schilling J, Schmidt MA & Heusipp G. The H-NS protein silences the *pyp* regulatory network of *Yersinia enterocolitica* and is involved in controlling biofilm formation. GRK Evaluation, Münster (2010)

Blädel, I, Wagner K, Beck A, Schilling J, Schmidt MA & Heusipp G. The H-NS protein silences the *pyp* regulatory network of *Yersinia enterocolitica* and is involved in controlling biofilm formation. 111th General meeting of the american society for microbiology (ASM), New Orleans (2011)

Blädel, I, Wagner K, Beck A, Schilling J, Schmidt MA & Heusipp G. The H-NS protein silences the *pyp* regulatory network of *Yersinia enterocolitica* and is involved in controlling biofilm formation. 2. Summer school im Rahmen des GRK 1409/2, Münster (2011)

Blädel, I, Wagner K, Beck A, Schilling J, Schmidt MA & Heusipp G. The H-NS protein silences the *pyp* regulatory network of *Yersinia enterocolitica* and is involved in controlling biofilm formation. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Essen (2011)

3 Vorträge

Blädel, I, Wagner K, Beck A, Schilling J, Schmidt MA & Heusipp G. H-NS – potential inhibitor of the regulatory *pyp*-network in *Yersinia enterocolitica*? GRK 1409/2, Februar 2011

Blädel I, Schilling J, Schmidt MA & Heusipp G. Biogenesis of flp-pili. GRK 1409/2, Dezember 2011

Lebenslauf

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Gerhard Heusipp bedanken. Vielen Dank, dass Du mir dieses Projekt anvertraut hast, für Deine Unterstützung, Dein offenes Ohr, für so manch motivierendes Wort und Deinen unerschütterlichen Optimismus.

Weiterhin gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. M. Alexander Schmidt. Danke, dass ich die Möglichkeit hatte ein Teil dieser Arbeitsgruppe und der Graduate school zu sein. Darüber hinaus möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Frau Prof. Dr. Theresia Stradal, die als Prüferin meiner Dissertation zur Verfügung stand.

Ein großer Dank gebührt den ehemaligen und aktuellen Arbeitskollegen, den Ifis. Erst der Zusammenhalt und das harmonische Miteinander machen das Arbeiten zu dem was es eben war. Vielen Dank für Eure Unterstützung, für so manch hilfreiche Diskussion oder auch nur einen Tee unter Freunden, für eine wundervolle Zeit in Amerika und so manch lustigen Abend in Münster. Es wird schwer solch eine freundschaftliche Arbeitsatmosphäre woanders zu finden!

Ich möchte mich darüber hinaus besonders bei meiner Namensvetterin Inga bedanken, die mich nach Gerds Abschied unter ihre Fittiche genommen hat. Vielen Dank für Dein offenes Ohr und die vielen Antworten, die Du mir auf noch viel mehr Fragen gegeben hast.

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde, die vielleicht nicht immer verstanden haben, was ich da warum und wie mache, aber die es immer wieder geschafft haben mich außerhalb des Labors auf andere Gedanken zu bringen.

Weiterhin bin ich meiner Familie zu Dank verpflichtet, die mich immer wieder ermutigt hat durchzuhalten und die sich dank Julian noch um viele weitere liebe Menschen vergrößert hat.

Ein großer Dank gebührt meinen Eltern, die mich in all den Jahren finanziell aber auch moralisch immer unterstützt haben. Die für mich da waren, wenn ich sie brauchte und die mir bei all meinen großen Entscheidungen den Rücken gestärkt haben. Danke für Eure Hilfe und passt bitte auf Euch auf!

Ich danke Julian für sein Durchhaltevermögen. Ich danke Dir für die vielen Stunden im Zug bzw. Auto, um zu mir nach Münster zu kommen, für das Ertragen meiner Launen, für die Lösung und Rettung so manch großer Computerkatastrophe, für die motivierenden und aufbauenden Worte. Danke für Deine Liebe und Deinen Rückhalt, Dein unendlich großes Verständnis und für die vielen (großen) Kleinigkeiten, die Du auf dich genommen hast, damit ich mich auf diese Arbeit und vor allem auf das Zusammenschreiben konzentrieren kann.