

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
des Diagnostikzentrums

Direktor Prof. Dr. Martin Aepfelbacher

# **Effekte bakterieller Infektionen auf die Zellmigration am Beispiel von Yersinien**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

**Anna Franziska Peters**

aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 24.11.2010

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg:

Prüfungsausschuss: der Vorsitzende: Prof. Dr. M. Aepfelbacher

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. I. Sobottka

Meinen Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Pathogenitätsfaktoren von Yersinien.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Adhäsion und Invasion der Yersinien.....	6
1.1.2 Der Typ-III-Sekretionsapparat und die Translokation der Effektorproteine (Yops).....	9
1.1.3 Die Effektorproteine der Yersinien, Yersinia outer proteins (Yops).....	12
<b>1.2 Angriffspunkte der Yops im humanen Organismus .....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Rho-GTPasen .....	19
1.2.2 Zytoskelett.....	21
1.2.3 Phagozytose .....	22
1.2.4 Zellmigration.....	23
1.2.5 Angiogenese.....	29
1.2.6 Zellteilung .....	30
1.2.7 Apoptose .....	30
<b>1.3 Zielsetzung.....</b>	<b>31</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1. Arbeitsmaterial .....</b>	<b>32</b>
2.1.1 Laborgeräte und Mikroskope .....	32
2.1.2 Chemikalien, Antikörper und Puffer.....	33
2.1.3 Plasmide und verwendete Mikroorganismen.....	36
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.2.1 Arbeiten mit DNA.....	38
2.2.2 Ermittlung von Protein Konzentrationen (Bradford).....	39
2.2.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.2.4 Western-Blots.....	40
<b>2.3 Zellkultur und zellbiologische Methoden .....</b>	<b>41</b>
2.3.1 Zellkultur: Zellen, Medien und Matrixes .....	41
2.3.2 Infektion.....	44
2.3.3 Transfektion .....	44
<b>2.4 Migrations-Assay .....</b>	<b>46</b>
2.4.1 Wundreparaturmodell .....	46
2.4.2 Chemotaxis-Assay .....	49
<b>2.5 Immunfluoreszenztechniken.....</b>	<b>52</b>

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>56</b>
3.1	Phagozytose .....	58
3.2	Migrationsmessung in einem Wundreparaturmodell .....	61
3.2.1	Analyse der Gesamt-Migrations-Strecke der Zellen.....	63
3.2.2	Zeitliche Veränderung des Migrations-Verhaltens .....	71
3.2.3	Verteilung der Migrations-Richtung.....	74
3.2.4	Teilungsverhalten.....	79
3.2.5	Apoptose .....	80
3.3	Beeinflussung des Aktinzytoskeletts.....	81
3.4	Chemotaxis-Assay .....	87
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>130</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Amp	Ampicillin
APC/C	anaphase-promoting complex/cyclosome
BSA	bovine serum albumin
Cm	Chloramphenicol
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonuklein Säure
ECBM	endothelial cell basal medium, Basalmedium für HUVEC
ECGM	endothelial cell growth medium, Wachstumsmedium für HUVEC
F-Aktin	filamentous Aktin
FAK	filamentous adhesion hinase
FBS	fötales bovines Serum
FMLP	N-Formyl-Met-Lue-Phe
G-Aktin	globular Aktin
GAP	GTPase activating Protein
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitor
Gen	Gentamycin
GEF	GTP exchange factor
GFP	green fluorescent protein
HPI	high pathogenicity island
HUVEC	„human umbilical vein endothelial cell“, Endothelzellen, die aus menschlichen Nabelschnüren gewonnen werden
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani-Medium
moi	„multiplicity of infection“, Verhältnis der Anzahl von Bakterien pro Zelle
Nal	Nalidixin Säure
OD	optical desity, optische Dichte
PAGE	Poly-acrylamid gel Elektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline
pYV	Vierulenzplasmid der Yersinien
RAW	264.7-RAW-Makrophagen
rm MCP-1	Recombinant Murine Monocyte Chemotactic Protein-1

rpm	revolutions per minute
RPMI	RPMI Medium 1640
SAC	Spindle-assembly checkpoint
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sm	Spectinomycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTSS	Typ III Sekretionssystem
VEGF	vascular endothelial growth factor
WASP	Wiskott Alderich syndrome protein
WT	Wildtyp
Yop	„Yersinia outer protein“, die von den Yersinien sezernierten Proteine

## Zusammenfassung

Ein zentraler erster Schritt des humanen Immunsystems bei einem Bakterienbefall mit enteropathogenen Yersinien ist die Phagozytose durch Immunzellen, wodurch das Bakterium abgebaut und seine Bausteine zur Herstellung von Antikörpern genutzt werden. Um im Wirt überleben zu können, ist deshalb das Verhindern der Phagozytose eine äußerst erfolgversprechende Strategie. Gelingt dies nicht vollständig, kann zusätzlich eine weitere, dem ersten Schritt folgende Funktion der Immunzellen beeinträchtigt oder ausgeschaltet werden: die Wanderung der Zellen zum nächstgelegenen lymphatischen Organ bzw. Lymphknoten. Die Beeinflussung der Zellmigration stellt eine relevante aber bisher nicht genau untersuchte Möglichkeit von enteropathogenen Yersinien dar, entscheidende Prozesse des Immunsystems zu modulieren.

Yersinien translozieren über ihr Typ-III-Sekretionssystem Effektorproteine („Yersinia outer proteins“; Yops) direkt in ihre Zielzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Effekt des *Yersinia enterocolitica* Wildtyps und aller 6 -Yops einzeln auf die Phagozytose, die Integrin-abhängige Migration und das Aktinzytoskelett von primären humanen Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Unter Verwendung eines Migrations-Assays und verschiedener Färbe-Systeme wurden folgende Ergebnisse erzielt: Der Yersinien-Wildtyp (WA-314) ist in der Lage, seine eigene Phagozytose nahezu vollständig zu unterbinden. Dazu ist, wie hier quantitativ bestimmt wurde, keines der einzelnen Yops allein in der Lage. Zusätzlich beeinflussen die Yersinien auch das Wanderverhalten von infizierten Zellen. Dabei wurde der Einfluss der einzelnen Yops und des Yersinien-Wildtyps auf die Wandergeschwindigkeit und -orientierung der infizierten HUVEC-Zellen bestimmt. Von allen Yops übt YopH alleine, bezogen sowohl auf das Wanderverhalten als auch auf die Phagozytose, bereits den Hauptteil des Effekts des Wildtyp-Stamms aus. YopP zeigte keinen Einfluss auf die Phagozytose, sehr wohl aber auf das Aktin-Zytoskelett und das Wanderverhalten. Die beiden Funktionen Phagozytose und Migration können also von den Yops getrennt gesteuert werden. Der Wildtyp als auch die einzelnen Yops verändern, jeweils in unterschiedlichem und hier quantitativ beschriebenem Ausmaß, das Aktin-Zytoskelett der infizierten Zellen. Der Bakterienbefall reduziert das Teilungsverhalten der HUVEC-Zellen, dagegen beeinflussen weder der Yersinien-Wildtyp, noch einzelne Yops die Apoptose-Rate der infizierten HUVEC-Zellen.

Liegen Yersinien längere Zeit bei 37 °C vor, sind sie größtenteils Phagozytoseresistent und können die Zellmigration inhibieren, ein Prozess, der die Einleitung der sekundären Immunantwort verzögern kann und damit entscheidend zur Virulenz der Yersinien beiträgt.



## 1 Einleitung

Bakterien werden nach ihrer Form, ihrem gram-Verhalten oder ihren Stoffwechsel-Leistungen in verschiedene Gruppen eingeteilt. Im Folgenden wird näher auf die Gattung Yersinien eingegangen, dem Thema dieser Arbeit. Yersinien sind nach Alexandre Yersin benannt, der *Yersinia pestis* isolierte und sie 1894 als Verursacher der Pest identifizierte (Schleifstein und Coleman 1939; Frederiksen 1964). Yersinien gehören in die Familie der *Enterobacteriaceae*, welche aus gram-negativen, stäbchenförmigen, fakultativ anaeroben, Katalase-positiven, Oxidase-negativen, nicht sporenbildenden Bakterien besteht (Brenner 1979; Finlay und Falkow 1988). Es sind 11 *Yersinia*-Spezies bekannt, von denen drei, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica*, pathogen für den Menschen und Nager sind. Die pathogenen Yersinien-Stämme verursachen Symptome, die von Gastroenteritiden bis hin zur tödlich verlaufenden Pest reichen (Brenner 1979; Cornelis et al. 1987; Knapp 1988).

Die medizinisch relevanten Yersinien wachsen auf passendem Medium bei Temperaturen von 5 bis 42 °C. Im Gegensatz zu *Yersinia pestis*, welches unabhängig von der Umgebung-Temperatur immobil ist (Cover und Aber 1989; Bottone 1999), sind die enteropathogenen *Yersinia* bei 27 °C beweglich und verlieren diese Beweglichkeit wieder bei 37°C, also der Temperatur in der Wirtsumgebung (Badger und Miller 1998). Generell können Mikroorganismen durch biochemische („Bunte Reihe“) und serologische Reaktionen identifiziert und differenziert werden, *Yersinia enterocolitica* auch durch „phage-typing“-Methoden (Aleksic und Bockemuhl 1990).

Auf Grund biochemischer Eigenschaften wird *Yersinia enterocolitica* in 6 Biogruppen unterteilt: 1A (nicht pathogen), 1B (hoch pathogen) und die schwach pathogen Gruppen 2, 3, 4 und 5 (Wauters et al. 1987). Die für den Menschen pathogenen *Yersinia*-Arten besitzen ein 70 kb Virulenz-Plasmid (pYV). Die apathogenen Stämme des Biovar 1A sind pYV<sup>-</sup> (Bockemühl und Roggentin 2004). Serologisch kann *Yersinia enterocolitica* in ca. 60 Serotypen unterteilt werden, von denen nur 11 Serotypen typischerweise mit humanen Infektionen assoziiert werden. Weltweit werden die meisten dieser Infektionen durch die Serotypen O:3, O:9, O:5,27 (schwach pathogen) und O:8 (hoch pathogen) verursacht.

In Deutschland lag 2001 die bundesweite Inzidenz bei 8,8 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern, 2002 bei 9,1 und 2005 bei 6,8. Für 2005 bedeutet dies deutschlandweit insgesamt 5.624 gemeldete Erkrankungen, die durch *Yersinia enterocolitica* bedingt sind (Robert-

Koch-Institut 2008). Die Dunkelziffer dürfte vermutlich, wie bei Infektionen mit *Salmonellen*, wesentlich höher liegen, da u.a. weder jeder Betroffene mit milder Durchfallssymptomatik zum Arzt geht, noch jeder behandelnde Arzt eine Erregerdiagnostik einleitet.

Alle drei human-pathogenen *Yersinia spp.* sind invasive lymphotrope Bakterien, welche die Fähigkeit besitzen, der unspezifischen Immunabwehr, insbesondere der Phagozytose, zu entgehen (Cornelis et al. 1998). Yersinien besitzen zahlreiche chromosomal- und plasmid-assoziierte Faktoren, die für ihre Virulenz und damit für ihr Überleben im humanen Wirt und Flöhen entscheidend sind (Brubaker 1991; Straley und Perry 1995). Die drei human-pathogenen Arten unterscheiden sich allerdings erheblich in ihrer Invasivität; während *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* in der Lage sind, die gastrointestinale Mukosa zu überwinden und das darunter liegende Gewebe zu infizieren, wird *Yersinia pestis* von Insekten in den Körper injiziert (Cornelis et al. 1998).

Schätzungen besagen, dass im Laufe der Geschichte 200 Millionen Menschen an einer Infektion durch *Yersinia pestis* verstorben sind (Perry und Fetherston 1997). Eine Infektionsdosis von weniger als 10 *Yersinia pestis* Bakterien ist für nicht-humane Primaten und viele Nager letal (Brubaker 1991). *Yersinia pestis* ist ein obligates, von einem Infektionszyklus abhängiges Pathogen. Die Bakterien werden durch infizierte Insekten (z.B. den Rattenfloh *Xenopsylla cheopis*) in den Körper injiziert und müssen daher die Körperoberfläche nicht selbstständig überwinden (Cornelis et al. 1998). Der Erreger wird dann von Phagozyten aufgenommen. Allerdings können internalisierte Bakterien über die Aktivierung von Plasmidgenen den Phagozyten zerstören (Heesemann 2001). Die Plasmidgene werden über den Temperaturwechsel vom Floh zum Menschen und durch die intrazellulär niedrige Calciumkonzentration aktiviert. Die dann extrazellulären Bakterien werden wahrscheinlich durch die Produktion des F1-Kapselproteins phagozytose-resistent. Eine schnelle extrazelluläre Vermehrung des Erregers sowie die Produktion von Plasminogenaktivator (Pla) begünstigen eine lymphogene Ausbreitung bis hin zur Sepsis. Eine Infektion von Mensch zu Mensch ist bei der Lungenpest möglich, wenn Lungenpest-Kranke husten und die Bakterien per Tröpfcheninfektion, über Aerosole, übertragen werden. Bei den Menschen, die die Yersinien über Aerosole aufnehmen, kann innerhalb von 2 bis 5 Tagen eine dann meist tödlich verlaufende Lungenpest auftreten (Heesemann 2001).

Im Gegensatz zu *Yersinia pestis* sind *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* zoonotische Mikroorganismen und Lebensmittel-Pathogene. Kontaminierte Milch und Schweineprodukte sind die Hauptquelle von *Yersinia enterocolitica* Infektionen (Black et al. 1978). *Yersinia pseudotuberculosis* führt überwiegend zu Infektionen bei Tieren und nur selten beim Menschen (Bockemühl und Roggentin 2004).

Infektionen mit den enteropathogenen Yersinien können ein breites Spektrum an Symptomen verursachen. Das Auftreten von Erkrankungen ist abhängig vom Alter, dem Abwehrzustand, dem Histokompatibilitätstyp (HLA) und dem Geschlecht des Patienten (Heesemann 2001).

Vier bis 7 Tage nach oraler Aufnahme verursacht *Yersinia enterocolitica* normalerweise Symptome wie milde, selbstlimitierende Diarrhö (zusammen mit gering erhöhter Temperatur und Erbrechen), kann aber auch eine akute mesenteriale Lymphangitis verursachen (Bottone 1997). Gastroenteritiden sind die häufigste Form der Yersiniose, an der für gewöhnlich Säuglinge und kleine Kinder erkranken; Symptome wie Fieber, wässrige bis blutige Durchfälle, Erbrechen und andere dauern 1 bis 2 Wochen an. Bei Jugendlichen kann sich eine Infektionen mit *Yersinia enterocolitica* mit Symptomen einer akuten mesenterialen Lymphangitis im Ileozökalwinkel mit Fieber, abdominalen Schmerzen im rechten unteren Quadranten („Pseudo-Appendizitis“) und Durchfällen präsentieren. Auch diese Infektion heilt nach etwa 2 Wochen spontan aus (Heesemann 2001). Eine Infektion mit Yersinien kann bei Erwachsenen sehr unterschiedliche Symptome ausbilden, wie z. B. einen gripalen Infekt mit Pharyngitis, Myralgien und Fieber oder eine rezidivierende Ileokolitis mit Beteiligung der mesenterialen Lymphknoten. Bei Erwachsenen mit Grunderkrankungen können extramesenteriale Infektionen, wie z. B. eine Hepatitis mit Leberabszess, Pleuritis, Perikarditis, Endokarditis oder Osteomyelitis auftreten. Folgeerkrankungen, die überwiegend bei jungen Erwachsenen vorkommen, sind eine reaktive Arthritis, ein Erythema nodosum, eine Glomerulonephritis, Myralgien und Arthralgien (Fredriksson-Ahomaa et al. 2006). Als seltene Komplikation einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* tritt eine Sepsis auf, es sei denn, Patienten haben eine zugrunde liegende, prädispositionierende Erkrankung (Winblad 1969; Dequeker et al. 1980). Die mesenteriale Form der Yersiniose verläuft meist selbstlimitierend und benötigt keine Therapie; septische Verläufe müssen allerdings antibiotisch therapiert werden (Heesemann 2001).

## 1.1 Pathogenitätsfaktoren von Yersinien

Pathogene Yersinien verfügen über Virulenzfaktoren, die auf chromosomalen und extra-chromosomalen Elementen kodiert sind (siehe Tabelle 1). Die Regulation der Genexpression dieser Elemente ist von der Umgebung der Yersinien abhängig (Bölin et al. 1985). Enteropathogene Yersinien müssen in der Lage sein, ihre Umgebung wahrzunehmen, da diese Bakterien in ihrem Lebenszyklus sowohl auf das Überleben außerhalb eines Wirtes, sowie auf das Überleben in einem (humanen) Wirt angewiesen sind und entsprechend die Genexpression reguliert sein muss. Beispiele für Eigenschaften, die bei Umgebungstemperatur stark und bei 37 °C kaum oder gar nicht ausgeprägt sind, sind die Beweglichkeit, Membran-Anlagerung von Lipopolysacchariden (LPS), Expression des Adhesin Invasin (Inv) und des hitzestabilen Enterotoxin (Yst) (Straley und Perry 1995).

Determinante	Phänotyp/Funktion	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<b>Chromosomal</b>				
Inv	Invasin, Interaktion mit $\beta$ 1-Integrin	-	+	+
HPI	Pathogenitätsinsel	+	+	±
Hms	Hämin-Speicherprotein	+	-	-
<b>Extrachromosomal pYV (70 kb)</b>				
Ysc	Typ III-Sekretion/ Translokation	+	+	+
YadA	Yersinia- Adhäsion	-	+	+
Yops	Yersinia outer proteins	+	+	+

**Tabelle 1:** Pathogenitätsfaktoren der humanpathogenen Yersinien mit einem Schwerpunkt auf den enteropathogenen Yersinien. Tabelle modifiziert nach Heesemann, 2001.

Kommt es zur Infektion des Menschen über kontaminierte Nahrungsmittel oder durch den Kontakt mit infektiösen Haustieren, verfügen enteropathogene Yersinien über das chromosomal kodierte Inv und ein Virulenzplasmid pYV (*Yersinia pestis* besitzt zwei weitere Virulenzplasmide, pFRA und pCPC). Diese Faktoren ermöglichen ihnen das Eindringen und extrazelluläre Überleben im humanen Wirt (Heesemann 2001). Die Fähigkeit der Yersinien, der unspezifischen Immunabwehr zu widerstehen, hängt vom Vorhandensein des 70 kb Virulenzplasmides (pYV) ab (Bölin et al. 1985).

Das Plasmid kodiert für eine Reihe von Proteinen:

- die „*Yersinia* outer proteins“ (Yops) (Heesemann et al. 1986),
- die Proteine, die dafür benötigt werden, die Yops in eine Wirtszelle zu sekretieren (den Typ-III-Sekretionsapparat (TTSS))
- Regulatoren der Genexpression und Yop-Sekretion/Translokation und
- das Adhesin YadA (Snelling et al. 2001; Cornelis 2002; Barnes et al. 2006).

### 1.1.1 Adhäsion und Invasion der Yersinien

Viele pathogene Bakterien exprimieren auf ihrer Oberfläche multifunktionale Proteinstrukturen, die als Adhäsine fungieren und/oder Schutzschilder gegen die zahlreichen antibakteriellen Waffen des Wirtes darstellen. Typische Mitglieder der Adhäsine in enteropathogenen Yersinien sind das chromosomal kodierte Invasin und das Virulenzplasmid kodierte „*Yersinia* adhesin“ YadA (Hultgren et al. 1993; Hoiczky et al. 2000). Insbesondere *Yersinia enterocolitica* als ein Pathogen, das nach oraler Aufnahme den Dünndarm besiedelt, muss in der Lage sein, an der interstinalen Mucosa zu adherieren. *Yersinia enterocolitica* kann über seine Oberflächen-Adhäsine an interstinalen Mucin der Epithelzellen binden und durchwandert dann die Epithelbarriere der Darmmucosa, um in das darunter liegende lymphatische Gewebe zu gelangen (Autenrieth und Firsching 1996). Die Translokation findet im Dünndarm statt, wo die Bakterien die epitheliale Barriere selektiv durch M-Zellen im Follikel-assoziierten Epithel der Peyer-Plaques durchwandern. M-Zellen sind spezialisierte Zellen, die Partikel oder Antigene aufnehmen und zum „Darm-assoziierten“ lymphatischen Gewebe transportieren (Neutra et al. 2001; Grassl et al. 2003).

#### 1.1.1.1 Der Invasionsfaktor Invasin

Das chromosomale Genprodukt Invasin (92 kDa), welches stark bei niedrigen Temperaturen (26 °C, pH 8,0 oder 37 °C, pH 5,5) aber schwach bei 37 °C (pH 8,0) exprimiert wird, ist der Invasionsfaktor für *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* (Isberg et al. 1987; Pepe und Miller 1993; Revell und Miller 2000). Invasin bindet mit hoher Affinität direkt an einen Abschnitt einer  $\beta$ 1-Kette des Integrinrezeptors und beschleunigt die darauf folgende Internalisation (Isberg und Leong 1990; Van Nhieu und Isberg 1991). Im Maus-Infektionsmodell ist eine *Yersinia enterocolitica* Inv<sup>-</sup>-Mutante stark in ihrer Fähig-

keit beeinträchtigt, das interstinale Epithel zu durchwandern. In späteren Phasen der Infektion ist Invasin aber nicht an der Aufrechterhaltung der Infektion beteiligt (Pepe und Miller 1993). Im Dünndarm sind die M-Zellen die einzigen Zellen, die  $\beta$ 1-Ketten in Richtung des Darmlumens präsentieren, was die Spezifität der Mikroorganismen für diese Zellen zum Beginn der Infektion erklärt (Clark et al. 1998; Isberg und Barnes 2001). Invasin vermittelt nicht nur die Internalisation in Epithelzellen, sondern auch, unabhängig von der Aufnahme, die Aktivierung von Signalkaskaden, die zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und zur Produktion von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen führt (Schulte und Autenrieth 1998; Kampik et al. 2000; Schulte et al. 2000).

Die hochaffine Integrin-Bindung erlaubt es Invasin, mit anderen Liganden effektiv um die Bindung an Integrin-Rezeptoren zu konkurrieren. Die Invasin-Bindung führt zu einem stabilen Kontakt zwischen Wirtszelle und der bakteriellen Membran, was nach Besetzung einer großen Anzahl von Integrin-Molekülen zu einer Aufnahme des Bakteriums führt (Isberg und Barnes 2001). An der Invasin-vermittelten Phagozytose sind zahlreiche Proteine beteiligt: Src-Kinasen zur Aktinzytoskelett-Steuerung und Rho-GTPasen (Alrutz et al. 2001; McGee et al. 2001; Wiedemann et al. 2001).

#### **1.1.1.2 Das *Yersinia* Adhäsın A (YadA)**

Das Adhäsın YadA der enteropathogenen *Yersinia*-Spezies wird durch ein Gen auf dem *Yersinia* Virulenzplasmid (pYV) kodiert (Bölin und Wolf-Watz 1984; Balligand et al. 1985; Simonet et al. 1996). Das YadA Gen von *Yersinia pestis* weist eine einzelne Nukleotid-Deletion auf. Dieser „Frameshift“ führt zu einer Reduktion der mRNA-Halbwertszeit und zu einer verminderten Expression von YadA in *Yersinia pestis* Stämmen (Rosqvist et al. 1988). Die Transkription ist abhängig vom Faktor VirF/LcrF, der die Expression von YadA bei Temperaturen von 30 bis 37 °C aktiviert (Lambert et al. 1992). YadA kann in der äußeren Membran der Bakterien Minuten nach der Temperaturerwärmung auf 37°C detektiert werden (Bolin et al. 1982). YadA ist ein essentieller Virulenzfaktor von *Yersinia enterocolitica* O:8 und scheint bei *Yersinia enterocolitica* (im Gegensatz zu *Yersinia pseudotuberculosis*) eine entscheidende Rolle in der Persistenz des Erregers zu spielen (Han und Miller 1997).

Das YadA-Protein ist ein homotrimeres 200 bis 240 kDa Protein, das als Prä-Protein exprimiert wird und posttranslational modifiziert wird (Bölin und Wolf-Watz 1984). Das

YadA-Protein ist multifunktional: es fördert die Bindung an (i) Epithelzellen, (ii) professionelle Phagozyten sowie an (iii) viele extrazelluläre Matrix-Moleküle (wie Laminin, Collagen und Fibronectin). Des Weiteren schützt es Yersinien gegen Defensin, das Serumkomplement sowie gegen Lipopolysaccharid-Erkennungsproteine, ein Schutz der eventuell durch Beschichten der Oberfläche mit extrazellulären Matrix-Molekülen erfolgt (Balligand et al. 1985; Roggenkamp et al. 1996; Hoiczyk et al. 2000).

Unabhängig von der Aufnahme von Bakterien in humane Zellen kann YadA wie auch das bereits beschriebene Invasin die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen induzieren (Bliska et al. 1993; Yang und Isberg 1993; Eitel und Dersch 2002; Schmidt et al. 2004).

### 1.1.1.3 Weitere wichtige Adhäsine

*Yersinia pestis* exprimiert weder YadA noch Invasin. Die Gene, die für diese Adhäsine kodieren, sind zwar vorhanden, sind aber nicht funktional (Rosqvist et al. 1988; Simonet et al. 1996). Zwei potente Adhäsine, die von *Yersinia pestis* exprimiert werden, sind Pla (Plasminogen activator protease) und pH6 Antigen (pH6-Ag). Pla ist in der äußeren Membran lokalisiert und besitzt eine proteolytische Aktivität, die Plasminogen aktiviert. Seine Funktion ist notwendig, damit sich *Yersinia pestis* nach der Übertragung durch einen Flohbiss im humanen Organismus ausbreiten kann (Sodeinde et al. 1992; Makoveichuk et al. 2003). Durch Pla soll auch die Adhäsion und Invasion von *Yersinia pestis* an Epithelzellen vermittelt werden (Cowan et al. 2000).

pH6-Ag wurde zunächst als ein Antigen identifiziert, das nur bei  $\text{pH} < 6$  bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  exprimiert wird (Ben-Efraim et al. 1961). Später zeigte sich, dass die fimbrienartige Struktur von pH6-Ag auf der Oberfläche von *Yersinia pestis* bei  $\text{pH} 6,7$  in den Phagolysosomen der Makrophagen des Wirts und extrazellulär in Abszessen wie Bubonen, auftritt (Zav'yalov et al. 1996). Das Operon, das für pH6-Ag kodiert, vermittelt die Agglutination von Erythrozyten vieler Spezies und das Binden an Epithelzellen (Yang et al. 1996; Makoveichuk et al. 2003). Weil pH6-Ag an Apolipoprotein B- (apoB) haltige Lipoproteine bindet, wird vermutet, dass pH6-Ag *Yersinia pestis* vor einer Interaktion mit Wirts-Immunzellen schützt (das Bedecken der bakteriellen Oberfläche mit Wirts-Lipoproteinen versteckt das Pathogen vor dem Immunsystem des Wirts) (Makoveichuk et al. 2003).

Ein weiteres Adhäsins, welches von enteropathogenen Yersinien exprimiert wird, ist Ail. Ail ist ein chromosomal kodiertes Membran-assoziiertes Protein, das eine (geringe) Rolle

bei der Anheftung an und folgenden Invasion in eukaryotische Zellen spielt (Miller und Falkow 1988). Im Gegensatz zu anderen Adhäsinen wie Invasin und YadA ist das Ail-Gen, zumindest im Mausmodell, für die Pathogenität von *Yersinia enterocolitica* von untergeordneter Bedeutung (Pepe et al. 1995).

Enteropathogene Bakterien sind also in der Lage, über Invasin und eventuell Ail die M-Zellen des Darmepithels des Menschen zu überwinden. Die sich dann im Wirtsorganismus befindenden Bakterien sind durch die Expression von YadA in der Lage, an Strukturen des humanen Organismus zu binden. Weitere Faktoren sind allerdings notwendig, um *Yersinia enterocolitica* das Überleben im extrazellulären Milieu zu ermöglichen.

### **1.1.2 Der Typ-III-Sekretionsapparat und die Translokation der Effektorproteine (Yops)**

Die Typ-III-Sekretion ist ein Mechanismus, mit dem gram-negative Bakterien Proteine durch die eigenen Membranen und durch die Wirtszellmembran in eukaryotische Zellen schleusen. Es wurden mehr als 20 Typ-III-Sekretionssysteme bei Tieren, Pflanzen und Insekten-Pathogenen entdeckt. Alle Typ-III-Sekretionssysteme stellen einen Mechanismus dar, der es dem Bakterium erlaubt, mit der Wirtszelle zu interagieren. Das tun Bakterien, indem sie Effektor-Proteine, die generell mehr Sequenz-Homologien zu eukaryotischen als zu bakteriellen Proteinen zeigen, in die Wirtszelle transferieren (Cornelis 2002).

Das Plasmid-kodierte (pYV) Typ-III-Sekretionssystem erlaubt es Yersinien, Effektor-Proteine (*Yersinia* outer proteins, „Yops“) insbesondere in Zellen des Immunsystems zu injizieren (Marketon et al. 2005). Die Yops beeinflussen dann beispielsweise die Zellproliferation und die Dynamik des Zytoskeletts mit dem Ziel, das Überleben und die extrazelluläre Vermehrung der Yersinien in lymphatischem Gewebe und die Verteilung der Bakterien in andere Organsysteme zu ermöglichen (Simonet et al. 1990; Fällman et al. 1995; Cornelis 2002).

Gelingt die Inhibition der Phagozytose nicht vollständig, kann ein weiteres, zusätzliches Ziel der Yersinien die Verhinderung der Migration von aktivierten Immunzellen (z.B. dendritischen Zellen) zum regionalen Lymphknoten sein, um so - über einen zusätzlichen Mechanismus - die weitere Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken.

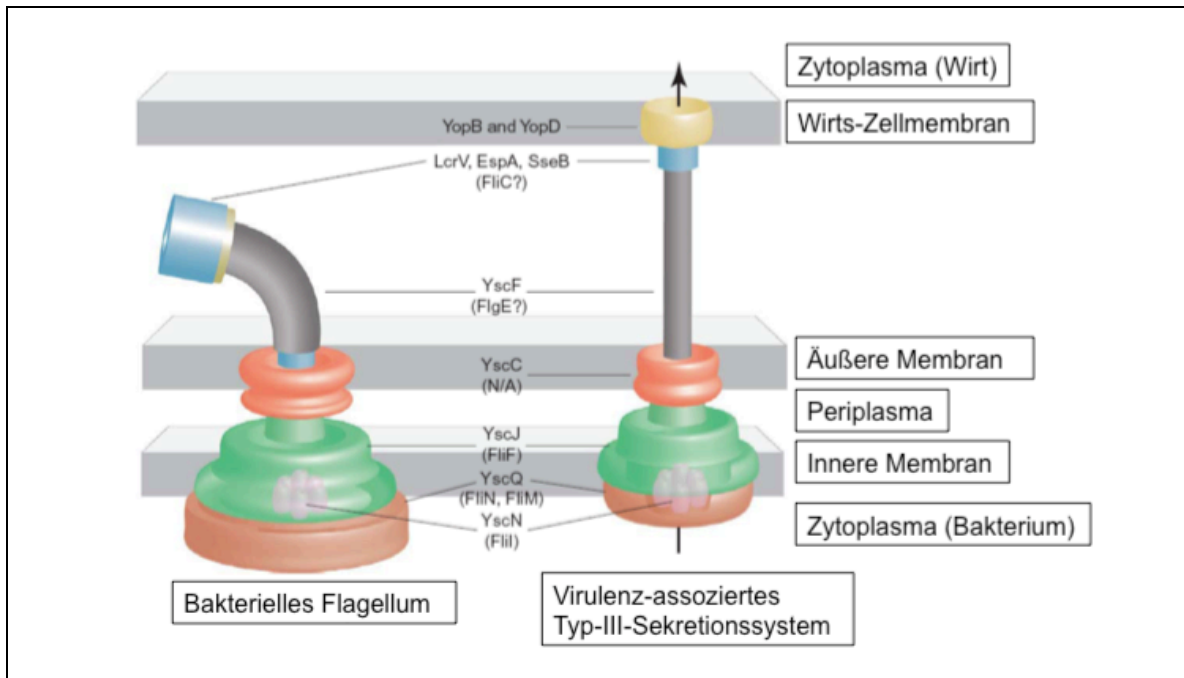
Insbesondere dieser Frage wird in dieser Arbeit nachgegangen.



### 1.1.2.1 Der Aufbau des Injektosoms

Das Injektosom ist eine Organelle, die die äußere Membran, die Peptidoglycan-Schicht und die zytoplasmatische Membran des Bakteriums durchspannt. Sein basaler Anteil durchzieht die zytoplasmatische innere Seite und besteht aus Proteinen, die Homologien zu Proteinen eines bakteriellen Flagellum zeigen (siehe Abbildung 1). Der basale Anteil besitzt eine Ringstruktur mit einer zentralen Pore, die die Verbindung zu einer Hohl-Nadel herstellt. Die Nadel besteht aus den polymerisierten Proteinen YscC und YscF (Hoiczyk und Blobel 2001). Das Lumen der Injektions-Nadel hat einen Durchmesser von 2 nm und es wird vermutet, dass die exportierten Proteine in einem Schritt durch diese Röhre, durch die beiden Membranen und die Peptidoglykanschicht geschleust werden (Cornelis 2002; Cornelis 2006). Um die Effektor-Yops durch die eukaryotische Zellmembran zu schleusen, sind die sogenannten Translokator-Yops (YopB, YopD und LcrV, die kein integraler Bestandteil der Injektosoms sind), absolut notwendig (Håkansson et al. 1996); deshalb kann die Struktur des Injektosoms nicht als Spritze verstanden werden, die in der Lage ist, die eukaryote Wirtszellmembran alleine zu penetrieren. Da YopB und YopD in der Lage sind, Poren in artifiziellen Liposomen zu bilden, wurde gefolgert, dass die Effektor-Yops durch die Poren, die von diesen Translokator-Yops gebildet werden, transportiert werden können (Tardy et al. 1999).

Yersinien lassen, wenn sie in einer zellfreien Umgebung inkubiert werden, keine Yops nach außen; nur nach Kontakt mit der eukaryoten Zelle (oder unter artifiziellen Umständen: 37°C und Entfernung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Puffer) wird der gerichtete Transport durch die bakteriellen Membranen induziert (Rosqvist et al. 1994). Eine weitere Besonderheit des Yersinien-Injektosoms ist, dass viele Yops, um sekretiert zu werden, Hilfe von speziellen Chaperonen („Specific Yop chaperone“; Syc) benötigen. Diese kleinen, sauren Proteine haben wenig oder gar keine Sequenzhomologie untereinander, haben aber alle eine mutmaßliche Carboxy-terminale amphiphile  $\alpha$ -Helix (Birtalan und Ghosh, 2001). Die Chaperone haben auch keine Sequenz- oder funktionale Ähnlichkeit mit ATP-abhängigen Chaperonen (Wattiau et al. 1994; Cornelis 2002). Im Allgemeinen liegt das Yop-Gen auf dem bakteriellen Virulenzplasmid neben dem entsprechenden Chaperon-Gen. Die Chaperone werden im Gegensatz zu den Yops nicht sekretiert.



**Abbildung 1:** Morphologie und Organisation eines bakteriellen Flagellums und des Typ-III-Sekretionsapparates (TTSS). (Modifiziert nach Yip and Strynadka, 2006).

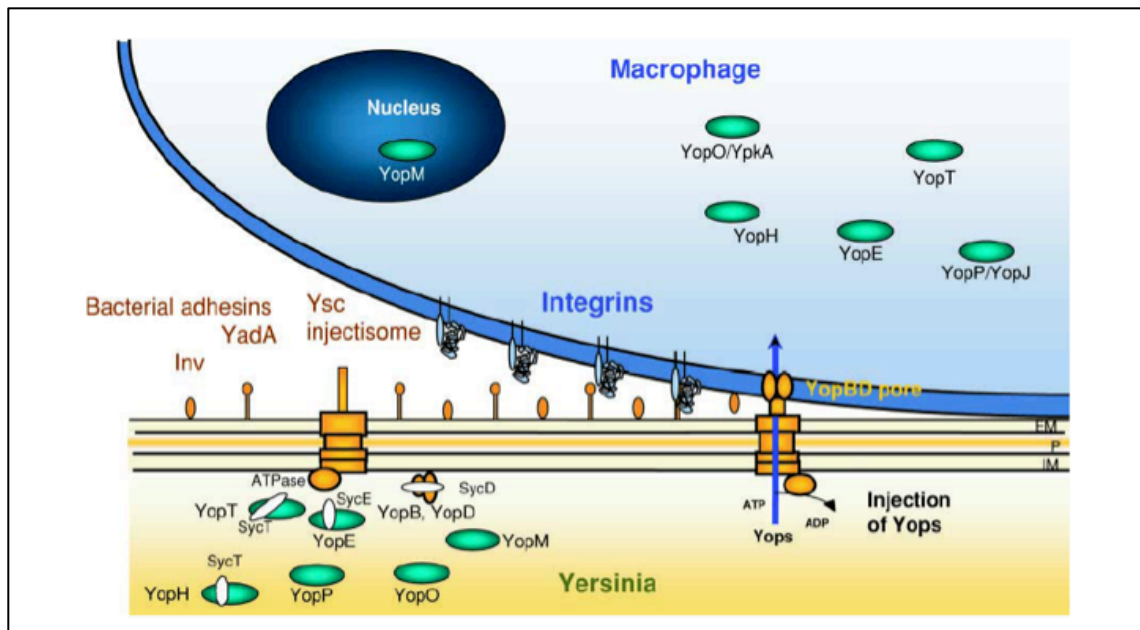
Die Morphologie des bakteriellen Flagellums und des TTSS sind sehr ähnlich: jedes besitzt eine innere Membranring-Struktur (grün und braun) und eine äußere Membranring-Struktur (rot), eine Membran assoziierte ATPase (pink) und helikale extrazelluläre Strukturen (grau). Der Typ-III-Sekretions-Apparat transloziert bakterielle Proteine direkt in das Zytoplasma von eukaryoten Wirtszellen (Pfeil), ein Prozess der auf LcrV (blau) und die Translokationspore, gebildet durch YopB und YopD (gelb), angewiesen ist. In Klammern sind die Flagellaten-Proteine angegeben, die den Proteinen des TTSS entsprechen.

Der Durchmesser der Injektosom-Nadel ist zu klein, um bereits gefalteten, globulären Proteinen die Passage zu ermöglichen. Vermutlich ist deshalb die Funktion der Chaperone, den Yops im Bakterium eine Struktur zu geben, über die sie durch die Nadel in die Wirtszelle injiziert werden können (Hoiczky und Blobel 2001; Cornelis 2002). Es wurden Chaperone für die Effektorproteine YopE, YopT und YopH beschrieben. Ohne diese Chaperone ist die Sekretion und Translokation der Yops stark reduziert oder sogar vollständig aufgehoben (Trülzsch et al. 2003). Auch YopO ist auf ein Chaperon angewiesen (Letzelter et al. 2006).

### 1.1.3 Die Effektorproteine der Yersinien, „Yersinia outer proteins“ (Yops)

Die 6 Effektorproteine, die *Yersinia enterocolitica* in die Wirtszelle transloziert, sind: YopO (YpkA in *Yersinia pseudotuberculosis*), YopM, YopP (YopJ in *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis*), YopT, YopE und YopH.

*Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* translozieren nur 5 der Effektorproteine, YopT ist auf ihrem Virulenzplasmid nicht kodiert (Viboud und Bliska 2005).



**Abbildung 2:** Das Typ-III-Sekretionssystem

Interaktion von Yersinien mit Makrophagen und Translokation der Yops. (Modifiziert nach Cornelis 2002).

#### 1.1.3.1 Das Effektorprotein YopO

YopO, gebildet von *Yersinia enterocolitica* (YpkA in *Yersinia pseudotuberculosis*), ist ein 80 kDa (729 Aminosäuren) großes Protein mit mehreren, funktionellen Domänen. Es besteht aus einer N-terminalen Sekretions-, Translokations-, Membran-bindenden Domäne, gefolgt von einer Serin/Threonin-Kinase-Domäne (Aminosäuren 1-436). YopO wird als inaktive Serin/Threonin-Kinase produziert, die durch die Interaktion mit Aktin aktiviert werden soll (Viboud und Bliska 2005). Die C-terminale Hälfte des Proteins beinhaltet vier Regionen (Aminosäure 436-710), die Ähnlichkeiten zu Rho-bindenden Domänen (RBDs) zeigen. Es wird angenommen, dass durch YopO die GDP-gebundene inaktive Form der GTPase stabilisiert wird (siehe Abbildung 3), da die Rho-bindenden Domänen Ähnlichkeiten zu Wirtszell „Guanin Nucleotid Dissoziations Inhibitoren“ (GDI's) zeigen. Die letzten

20 Aminosäuren (709-729) zeigen Ähnlichkeiten zu dem Aktin-bündelnden Protein Coronin (Dukuzumuremyi et al. 2000; Juris et al. 2000; Aepfelbacher 2004). Über diese letzten 20 Aminosäuren soll die Kinase-Aktivität von YopO aktiviert werden (Viboud und Bliska, 2005).

Zusammen mit anderen Yops scheint auch YopO zur antiphagozytären Wirkung von *Yersinia enterocolitica* beizutragen (Grosdent et al. 2002) und soll so Yersinien ermöglichen, andere Gewebe zu kolonisieren und in ihnen zu persistieren (Logsdon und Melsas 2003; Aepfelbacher 2004). Von YopO wird auch angenommen, dass es das Aktinzytoskelett beeinflusst und so zu der Fähigkeit der Yersinien beiträgt, der Phagozytose durch Makrophagen zu entgehen (Trasak et al. 2007).

Menschliche Zervixkarzinom (HeLa)-Zellen, die mit einer *Yersinia pseudotuberculosis* Mutante, die YopO überexprimiert, infiziert wurden, zeigten Zellkontraktion (Abrundung) und das Auftreten von prominenten „retraction fibers“, ein Phänotyp, der als „arborization“ bezeichnet wird. In diesen Experimenten lokalisierte YopO an der Plasmamembran, eine Fähigkeit, die in der N-terminalen Region des Proteins kodiert wird (Håkansson et al. 1996; Dukuzumuremyi et al. 2000; Aepfelbacher 2004). YopO soll mit den Rho-GTPasen RhoA und Rac1 interagieren, nicht aber mit Cdc42 (Barz et al. 2000; Dukuzumuremyi et al. 2000; Aepfelbacher 2004). Angenommen wird, dass YopO sowohl den intrinsischen als auch den „guanine nucleotide exchange factor“ (GEF)-vermittelten Austausch von GDP zu GTP in Rac1 inhibiert (siehe Abbildung 3), was zu deren Hemmung führen kann und z.B. die Bildung von Stressfasern verhindern könnte (Trosky et al. 2008).

YopO ist angewiesen auf das Chaperon SycO. Im Bakterium assoziiert SycO mit dem N-Terminus von YopO. Es bedeckt die Membran-Lokalisationsdomäne von YopO und schützt YopO dabei vermutlich vor einer intrabakteriellen Aggregation (Letzelter et al. 2006).

### **1.2.3.2 Das Effektorprotein YopM**

YopM (42 kDa) ist ein Leucin-reiches Protein, das abhängig vom Yersinien-Stamm, der es exprimiert, Unterschiede in Größe und Sequenz zeigt. Die funktionale Konsequenz dieser Variabilität ist nicht bekannt. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass YopM wichtig ist für die Virulenz von *Yersinia pestis* und *Yersinia enterocolitica* (Mulder et al. 1989; Leung et al. 1990). YopM zeigt als einziges der Effektor-Proteine keine enzymatische Aktivität. YopM

wird intrazellulär über einen Vesikel-assoziierten Weg zum Kern transportiert. Wie aber die kernnahe Lage von YopM mit dessen Funktion zusammenhängt, ist nicht klar (Skrzypek et al. 2003). Aufgrund der kernnahen Lage ist eine Beeinflussung der Gentranskription anzunehmen (Hoffmann et al. 2004). Gentranskriptions-Microarray-Analysen, die mit *Yersinia enterocolitica* infizierten Makrophagen durchgeführt wurden, zeigten divergierende Ergebnisse: nachdem eine Gruppe herausfand, dass YopM Gene reguliert, die in die Zellzyklus-Kontrolle und das Zellwachstum eingreifen (Sauvonnet et al. 2002), haben andere keinen Anhalt für eine Genregulation durch YopM finden können (Hoffmann et al. 2004). Die beiden zytoplasmatischen Kinasen Prk2 (Protein kinase C- like 2) und Rsk1 (ribosomal S6 Protein kinase 1) wurden als direkte Interaktionspartner von YopM identifiziert (McDonald et al. 2003).

### 1.1.3.3 Das Effektorprotein YopP

Das 33 kDa Protein YopP wurde zuerst in *Yersinia pestis* identifiziert und „YopJ“ genannt (Straley und Bowmer 1986), bevor es in *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* entdeckt wurde und als „YopP“ beschrieben wurde (Cornelis et al. 1987).

Das bakterielle Protein YopP greift hemmend in die MAPK- und NF- $\kappa$ B-Signalwege der Wirtszelle ein. Die molekularen Ziele von YopP sind MAPK-Kinasen (MKKs) und I $\kappa$ B-Kinase  $\beta$  (IKK- $\beta$ ) (Orth et al. 1999). YopP mit seiner katalytischen Domäne acetyliert Serin- und Threonin-Reste der Kinasen und verhindert so die Phosphorylierung und Aktivierung dieser Proteine (Mukherjee et al. 2006), um die Funktion dieser Proteine in Signaltransduktionswegen innerhalb der Wirtszelle abzuschwächen (Mittal et al. 2006; Mukherjee et al. 2006). Die Hemmung dieser Signalwege durch YopP soll helfen die angeborene Immunabwehr zu unterdrücken und soll die Apoptose von Makrophagen vermitteln (Palmer et al. 1998). Diese inhibitorischen Aktivitäten von YopP führen zu einer Suppression der IL-8 Produktion in Epithelzellen und der TNF- $\alpha$  Produktion in Makrophagen (Aepfelbacher et al. 1999; Orth 2002; Ruckdeschel 2002). Die Anwesenheit von bakteriellem YopP korrelierte mit einer erhöhten Apoptose-Rate der infizierten Zellen, die Transfektion von YopP in eukaryotische Zellen alleine resultierte allerdings nicht im Sterben der Zellen (Monack et al. 1997; Palmer et al. 1999). Die Apoptose von Makrophagen scheint die Ausbildung einer systemischen Infektion mit Yersinien zu erleichtern. Im Mausmodell ist YopP wichtig für die Virulenz von enteropathogenen Yersinien. Eine *Yersinia enterocoli-*

*tica* YopP<sup>-</sup>-Mutante ist in seiner Wirkung abgeschwächt (Trulzsch et al. 2004), und auch eine *Yersinia pseudotuberculosis* YopP<sup>-</sup>-Mutante war im Gegensatz zu Wildtyp-Bakterien nicht in der Lage, die gleiche Konzentration an Bakterien im lymphatischen Gewebe zu erreichen; zusätzlich wurde die Mutante schneller aus dem infizierten Organ entfernt (Mönack et al. 1998). Inwieweit die Apoptose ein Mechanismus ist, der den Yersinien einen Vorteil verschafft, ist fraglich, da apoptotische Zellen zahlreiche Signale ausschütten und das Immunsystem vermutlich eher aktivieren (siehe Diskussion).

YopP besitzt eine geringe Ähnlichkeit zu der „ubiquitin-like“ Protease Ulp1 der Hefe. Demnach wäre es denkbar, dass YopP Ubiquitin schneidet oder eine Ubiquitin-ähnliche Struktur von Zielproteinen in der Wirtszelle abtrennen könnte. Protein-Ubiquitylierung kann Moleküle reversibel aktivieren und sie zum Abbau markieren (Orth 2002; Aepfelbacher 2004; Viboud und Bliska 2005).

#### **1.1.3.4 Das Effektorprotein YopT**

YopT (35 kDa, 322 Aminosäuren) wird von *Yersinia enterocolitica* exprimiert, nicht aber, bedingt durch eine Deletion auf dem Virulenz-Plasmid, von dem virulenten *Yersinia pseudotuberculosis* Stamm Serotyp O:3 und von *Yersinia pestis* (Iriarte und Cornelis 1998; Shao et al. 2002; Viboud und Bliska 2005). Die katalytische Aktivität von YopT ist C-terminal lokalisiert, die Rho GTPasen-bindende Region N-terminal (Sorg et al. 2003). Es wird angenommen, dass drei Aminosäuren in der katalytischen Domäne von YopT (Cys-139, His-258 und Asp-274) für die enzymatische Aktivität als Cystein-Protease benötigt werden. (Shao et al. 2002). Es soll als Enzym fungieren, welches Lipidanker von Rho-GTPasen (RhoA, Rac und Cdc42) abspaltet (Shao et al. 2003), so dass die Rho-GTPasen ihren Anker in der Zellmembran verlieren. Die veränderte Struktur soll zu einer Bindung an Aktin führen (Shao et al. 2003). Es wird angenommen, dass bakteriell transloziertes YopT *in vivo* überwiegend auf RhoA und weniger auf Rac oder Cdc42 wirkt. Weiter wird vermutet, dass RhoA von der Plasmamembran und seinem zytoplasmatischen Bindungspartner, Guanine Nucleotid Dissoziations- Inhibitor 1 (GDI-1), abgespalten wird und dann als monomeres Protein im Zytoplasma akkumuliert (Zumbihl et al. 1999). Ob YopT die Phagozytose von Bakterien verhindern kann, wurde für *Yersinia enterocolitica* in humanen Neutrophilen und in Maus-Makrophagen untersucht. Bakterielle Mutanten, die kein YopT enthielten, konnten signifikant häufiger phagozytiert werden als Wildtyp-Bakterien. Yersi-

nien, die nur YopT exprimierten, waren aber nicht resistent gegenüber der Phagozytose durch Neutrophile oder Makrophagen (Grosdent et al. 2002; Aepfelbacher 2004). Auf der zellulären Ebene konnte gezeigt werden, dass YopT-überexprimierende Yersinien-Mutanten Aktin-reiche phagozytotische „cups“ und podosomale Adhäsionen zerstören. Phagozytotische „cups“ werden von Zellen nach Kontakt zu Yersinien-Invasin ausgebildet (Aepfelbacher et al. 2003). Die Zerstörung dieser beiden Strukturen schwächt die Funktion von Immunzellen und schützt Yersinien vor der Phagozytose. In der Verhinderung der Phagozytose ist YopT weniger wirksam als YopE; es ist aber genauso effektiv wie YopE in der Regulation der Pore der Typ-III-Sekretion (Viboud et al. 2006).

YopT und YopE verändern kooperativ Zellfunktionen (Aepfelbacher et al. 2007). YopE kann GTP-gebundenes Rac1 herunterregulieren und produziert so GDP-gebundenes Rac1, welches inaktiv ist und zytoplasmatisch vorliegt. Im Gegensatz dazu soll YopT die aktive GTP-gebundene Form von Rac1 von der Plasmamembran trennen; die aktiven Rac1 Moleküle sollen in den Zellkern wandern, wo sie mit Guanosin Nucleotid Austauschfaktoren kolokalisieren. Eine Infektion mit Yersinien-Mutanten, die nur YopT und YopE exprimieren, führte zu einem Pool an aktiviertem kernassoziierten Rac1 und inaktivem zytoplasmatischen Rac1 (Wong und Isberg 2005). In wieweit dieser Mechanismus zur Virulenz von Yersinien beiträgt, ist unklar (Aepfelbacher et al. 2007).

### **1.1.3.5 Das Effektorprotein YopE**

YopE ist ein 25 kDa Protein (219 Aminosäuren), welches, wie die homologen Domänen in Exoenzym S von *Pseudomonas aeruginosa* und SptP von *Salmonella typhimurium*, als GAP (Ausschalter) für Rho-Proteine fungiert (siehe Abbildung 3) (Fu und Galan 1999; Goehring et al. 1999; Black et al. 2000; Andor et al. 2001; Aepfelbacher 2004). YopE hat N-terminal eine Membran-Lokalisationsdomäne (Krall et al. 2004). Die N-terminalen Aminosäuren 54-75 sind essentiell, um YopE perinukleär zu platzieren. Die Aminosäuren 96-219 beinhalten die Rho-GAP-Domäne (Krall et al. 2004).

Es wird angenommen, dass YopE an GTPasen bindet und so über seine GAP-Domäne eine effiziente GTP-Hydrolyse vermittelt. Von besonderer Bedeutung für die GAP-Aktivität soll hierbei Arg144 im sog. „Arginin Finger“-Motiv sein (Scheffzek et al. 1998; Würtele et al. 2001; Aili et al. 2003; Aepfelbacher 2004). YopE mit seiner GAP-Aktivität zielt, wie beschrieben wird, auf die Rho-Proteine RhoA, Rac1 und Cdc42 in vitro (von Pawel-

Rammingen et al. 2000; Andor et al. 2001; Aili et al. 2006). Diese GTPasen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Struktur des Aktinzytoskeletts. Eine Inaktivierung dieser Proteine soll zu einer unregulierten Depolymerisation von Aktinfilamenten in Zielzellen führen (Trosky et al. 2008). In Wirtszellen, die Kontakt zu dem Yersinien-Oberflächenprotein Invasin haben, werden RhoG, Rac1 und Cdc42 aktiviert, was zu einer Aufnahme des Bakteriums führt. Translozieren Yersinien allerdings YopE in die Wirtszelle, kann YopE diesem Effekt entgegenwirken. YopE inhibiert RhoG und Rac1 und erreicht so, dass die Bakterien extrazellulär bleiben (Roppenser et al. 2009). YopE trägt somit zusammen mit anderen Yops zu der antiphagozytären Aktivität von *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* bei (Aepfelbacher 2004). Des Weiteren verursacht YopE (i) die Zerstörung von Aktin-Filamenten, (ii) eine vollständige Zellabrundung und (iii) die Ablösung der infizierten Zellen unter Zellkultur-Bedingungen, ein Phänomen, das als „Zytotoxizität“ bezeichnet wird. Zum einen ist beschreiben, dass die YopE GAP-Mutante (R144A) bei Mausinfektionen keine Virulenz mehr zeigte und nicht mehr in der Lage war, zytotoxische Effekte in HeLa-Zellen auszulösen (Black 2000; von Pawel-Rammingen et al. 2000; Aili et al. 2006). Andere Arbeiten zeigten jedoch, dass YopE-Mutanten, denen die *in vitro* GAP-Aktivität für RhoA, Rac1 und Cdc42 fehlte, immer noch zytotoxisch für HeLa-Zellen waren (Aili et al. 2003). Auch in dieser Arbeit zeigt die YopE-Mutante, der die GAP-Aktivität fehlt, ein dem GAP-aktiven YopE ähnliches Verhalten (siehe Ergebnisse). Dies lässt vermuten, dass diese Aufgaben nicht die einzigen YopE-Funktionen während der Infektion sind (Aili et al. 2006). Während der Injektion von Effektor-Proteinen soll die GAP-Aktivität von YopE der Porenbildung des Injektosoms entgegen wirken (Viboud und Bliska 2001). YopE reguliert vermutlich darüber hinaus, wie viele andere Yops in die Wirtszelle gelangen (Aili et al. 2007). YopE O:8 von *Yersinia enterocolitica* wird im Gegensatz zu YopH und YopP im Wirtszell-Proteasom abgebaut. Dies impliziert, dass das Proteasom ein integraler Bestandteil der zellulären Wirts-Immunantwort gegen immunmodulatorische Aktivitäten von translozierten bakteriellen Proteinen ist (Ruckdeschel et al. 2006). YopE hat während des Infektionszyklusses also sowohl individuelle als auch zu anderen Yops synergistische Funktionen (Aepfelbacher 2004).



### 1.1.3.6 Das Effektorprotein YopH

YopH ist eine hoch aktive Tyrosinphosphatase (PTP), die Signalwege angreift, die wichtig für die primäre und sekundäre Immunabwehr sind (Guan et al. 1990; Aepfelbacher 2004; Viboud und Bliska 2005). Das Protein besteht aus 468 Aminosäuren (50 kDa) mit definierten N- und C-terminalen Domänen, die über eine Prolin-reiche Region verbunden sind. Die N-terminale Region enthält Typ-III-Sekretions Signale, eine Chaperon-Bindungs-Region und eine Substratbindungs-Domäne. Die C-terminale Region (Aminosäuren 206-468) enthält die katalytische Domäne und ist in ihrer Struktur den eukaryotischen Protein-Tyrosinphosphatasen ähnlich (Black et al. 1998; Khandelwal et al. 2002; Viboud und Bliska 2005). YopH ist eine der aktivsten Phosphatasen, die bis heute isoliert wurden (Trosky et al. 2008). Aktives YopH führt in infizierten Wirtszellen zu einer generellen Reduktion der Phosphorylierung von Tyrosin (Viboud und Bliska 2005). Viele YopH-Substrate sind Bestandteile von fokalen Adhäsionen. Fokale Adhäsionen spielen eine Rolle in der Regulation dynamischer Interaktionen zwischen dem Aktinzytoskelett und extrazellulären Matrix-Proteinen (Brakebusch und Fassler 2003). Das Hauptziel von YopH ist p130<sup>Cas</sup>, ein Protein aus fokalen Adhäsionen, dessen Aktivität auch für die Phagozytose benötigt wird (Viboud und Bliska 2005). Die Inaktivierung von p130<sup>Cas</sup> durch YopH vermittelte Dephosphorylierung führt zu einer Zerstörung von Aktinstrukturen, die mit einem Verlust von fokalen Adhäsionen einhergeht und so die Phagozytose inhibiert (Andersson et al. 1996). Weitere Zielstrukturen von YopH sind fokale Adhäsions-Kinasen (FAK): Paxillin, Lck, Fyb und SKAP-HOM (Cornelis 2002). Die YopH vermittelte Dephosphorylierung ist sehr schnell und innerhalb von 2 min nach Infektion sichtbar. Dies kann erklären, warum YopH eines der effektivsten Yops in Hinblick auf Maus-Virulenz und antiphagozytäre Aktivität ist (Andersson et al. 1996; Cornelis 2002; Aepfelbacher 2004). YopH ist für bis zu 50% der antiphagozytären Aktivität von Yersinien gegenüber Neutrophilen und J774-Makrophagen verantwortlich (Fällman et al. 1995; Ruckdeschel et al. 1996; Aepfelbacher 2004). YopH besitzt eine Vielzahl weiterer immun-modulatorischer Effekte. Zu diesen gehört (i) die Inhibition der Produktion von Chemoattractance Protein 1 in Makrophagen (Sauvonnet et al. 2002) und (ii) die Hemmung von Signalkaskaden, die mit der T- und B-Zell-Aktivierung durch Antigene assoziiert werden (Yao et al. 1999; Cornelis 2002).

YopH wird im Bakterium wahrscheinlich durch die Assoziation zu einem Chaperon (SycH) inaktiviert. SycH bindet an den N-Terminus von YopH. Darüber hinaus hat der N-

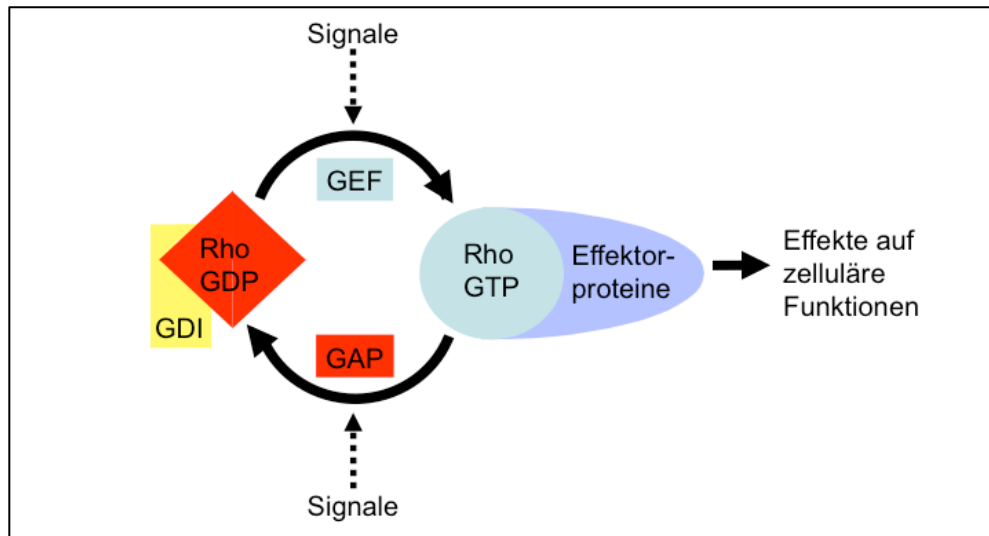
Terminus von YopH die Funktion, die Bindung an Substrate in fokalen Adhäsionen zu vermitteln; er enthält zusätzlich Typ-III-Sekretions Signale (Black et al. 1998).

## 1.2 Angriffspunkte der Yops im humanen Organismus

Enteropathogene Yersinien adhären im Dünndarm an M-Zellen und erreichen, indem sie diese durchwandern, die Submucosa meistens im Bereich des intestinalen lymphatischen Systems (Peyer Plaques). Im subepithelialen/submucosalen Gewebe des Darms sind Yersinien in der Lage, sich extrazellulär zu vermehren. Das Plasmid-kodierte Typ-III-Sekretionssystem erlaubt es den Yersinien, Yops in Zellen des Immunsystems und möglicherweise auch in andere Zellen zu sezernieren. Über die Yops können die Yersinien die Zellen des Immunsystems angreifen und damit die Immunantwort des Menschen abschwächen. Die Yersinien sind lymphotrophe Bakterien und haben dadurch nicht nur Kontakt zu Immunzellen, sondern vermutlich auch z. B. zu Endothelzellen. Kontakt zu den Endothelzellen besteht vermutlich in den „high endothelial venules“ der afferenten Lymphgefäße und bei den Yersinien, die in die Blutbahn gelangt sind (*Yersinia pestis*), zu den Endothelzellen dieser Gefäße. Über die Sekretion der Yops in humane Zellen greifen die Yersinien in zahlreiche zelluläre Prozesse ein, einige dieser Angriffspunkte der Yersinien sind nachfolgend aufgeführt. Zunächst wird allerdings näher auf die Rho-GTPasen eingegangen.

### 1.2.1 Rho-GTPasen

Rho-Proteine scheinen ideale Ziele für Pathogene darzustellen, weil sie als eukaryotische Schalter eine Vielzahl von zellulären Prozessen regulieren. Rho-GTPasen sind Regulatoren des Aktinzytoskeletts, sind aber auch beteiligt an der Kontrolle von Zell-Zell-Kontakten, Integrin-vermittelten Signalkaskaden, der Endozytose, intrazellulärem Vesikeltransport, der Gentranskription und der Kontrolle des Zellzyklus (Symons und Settleman 2000; Aepfelbacher 2004; Schwartz 2004; Aktories et al. 2005). Rho-GTPasen sind in ihrer GDP-gebundenen Form inaktiv. In diesem Zustand können sie an einem Guanin Nucleotid Dissoziations-Hemmer (GDI) gebunden vorliegen (siehe Abbildung 3). Rho-GTPasen werden aktiviert durch einen GDP/GTP-Austausch, der durch Guanin Nucleotid Austauschfaktoren (GEFs) vermittelt wird. Die Stimulierung der intrinsischen GTP Hydrolyse erfolgt durch eine andere spezifische Proteingruppe, die GAPs (Bishop und Hall 2000; Aepfelbacher 2004). Durch sie wird der Kreislauf geschlossen (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Darstellung des Aktivationszyklus der Rho GTPasen und deren Regulatoren. GEF = Guanine Nucleotide Exchange Factor, GAP = GTPase-Activating Proteins, GDI= Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor.

In ihrer aktiven Form können Rho-Proteine mit Effektorproteinen interagieren und diese stimulieren. Zu den Effektorproteinen gehören Protein- und Lipidkinasen und „scaffolds“ (van Aelst und D’Sourg-Schorey 1997). Die am besten charakterisierten Rho-Proteine sind RhoA, Rac1 und Cdc42; jedes von diesen kontrolliert die Ausbildung zytoskelettaler Elemente in der Zelle:

- Cdc42 kontrolliert unter anderem die Bildung von Filopodien/Mikrospikes und fokalen Kontakten. Mikrospikes sind stachelförmige Ausläufer an der Zellperipherie und die Vorstufe von Filopodien. Die Begriffe werden aber häufig synonym verwendet. Fokale Kontakte sind Vorläufer von fokalen Adhäsionen.
- Rac1 kontrolliert die Organisation von Lamellipodien und von fokalen Komplexen. Lamellipodien sind breite Fortsätze an der Zellperipherie.
- RhoA kontrolliert die Bildung von kontraktile Stressfasern. Das sind Aktinstrukturen, die in mehr oder weniger parallel verlaufenden, konzentrischen Aktinbündeln im Zellinneren vorliegen (Nobes und Hall 1995; Ridley et al. 1992; Raftopoulou und Hall 2003).

### 1.2.2 Zytoskelett

Wie unter 1.2.1 beschrieben, regulieren Rho-GTPasen zahlreiche Elemente des Zytoskeletts. Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen stellt das Grundgerüst jeder Zelle dar und ist daher ein ideales Ziel für bakterielle Substanzen. Es ist aus Proteinen aufgebaut und ist verantwortlich für die aktive Bewegung von Zellen, für Transporte innerhalb der Zelle, für die mechanische Stabilität und für die äußere Form der Zelle. Die drei Haupttypen der Proteinfilamente des Zytoskeletts sind Mikrofilamente (v. a. Aktin), Mikrotubuli und Intermediär-Filamente.

Das Mikrofilament Aktin ist an der lokalen Formgebung der Zelle sowie an der Kontraktion und der Fortbewegung der Zelle beteiligt. Für die Kontraktion der Zelle oder bestimmter Zellbereiche müssen die Aktin-Filamente mit Myosin interagieren. Die Mikrofilamente spielen so z. B. eine Rolle bei der Phagozytose und der Bildung des Zellteilungsrings. In eukaryoten Zellen ist das monomere G-Aktin in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem polymerisierten F-Aktin. Schnelle Signal-induzierte Aktin-Polymerisation, auch die Wirtszell-Pathogen-Wechselwirkung, kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden, z. B. durch „*de novo* nucleation“, die den Arp2/3 (actin related Protein 2/3) Komplex involviert (Boquet und Lemicker 2003). Rac1 und Cdc42 führen zu morphologisch charakteristischen Vorwölbungen der Plasmamembran (z.B. Lamellipodia und Filopodia), die Ausbildung dieser Strukturen beruht auf Veränderungen im Aktinzytoskelett (Bishop und Hall 2000).

Mikrotubuli sind aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Molekülen aufgebaute, unverzweigte, lange, steife Polymere. Die Tubulin-Moleküle dienen der Herstellung der Zellform und der Bildung von komplexen Aggregaten (z. B. der Kernteilungsspindel oder des Zentriols). Mikrotubuli fungieren auch als Gleitschiene für intrazelluläre Bewegungsabläufe. Bei sich nicht in Zellteilung befindenden Zellen stellt das Zytozentrum den Ausgangspunkt des Mikrotubuli-Systems dar. Das Zytozentrum besteht aus dem Zentriol und einer angelagerten, diffusen Masse von Proteinen, z. B. dem  $\gamma$ -Tubulin. Da Zentriolen der Ausgangspunkt für die Polymerisation von Mikrotubuli sind, werden sie auch Mikrotubuli-Organisationszentrum „microtubule organizing center“ (MTOC) genannt.

Intermediärfilamente sind die variabelsten Komponenten des Zytoskeletts. Es sind widerstandsfähige Proteinfasern, sie verleihen der Zelle mechanische Stabilität.

### 1.2.3 Phagozytose

Rho-GTPasen spielen eine essentielle Rolle bei der Phagozytose, wie an Makrophagen gezeigt werden konnte. Immunglobulin-Rezeptor (FcγR)-vermittelte Phagozytose ist abhängig von Cdc42 und Rac1, Komplement-Rezeptor (CR)-vermittelte Phagozytose hingegen von RhoA (Caron und Hall 1998). Beide Signalwege aktivieren den Arp2/3-Komplex der Aktin-Polymerisation in einer Cdc42-/Rac1- oder RhoA-abhängigen Weise (May et al. 2000; Jaffe und Hall 2005). Die durch Yersinien getriggerte Phagozytose involviert Rac1, abhängig vom Zelltyp entweder allein oder zusammen mit Rho und Cdc42 (Alrutz et al. 2001; McGee et al. 2001; Wiedemann et al. 2001). Die zentrale Rolle der Rho-GTPasen in der Zusammenlagerung und dem Wiederauflösen von peripheren Aktinfilamenten ist nötig für die Phagozytose und kann eine Erklärung dafür liefern, warum Rho-GTPasen Substrate für bakterielle Toxine sind (Aktories und Barbieri 2005). Von mehreren Yops ist beschrieben, dass sie über eine Beeinflussung der Rho-GTPasen die Phagozytose der Yersinien beeinflussen können. Da bei der Phagozytose Umwandlungen des Aktin-Zytoskeletts essentiell sind, ist die Beeinflussung von Rho-GTPasen ein einfacher und wirksamer Mechanismus.

Dies trifft z. B. auf YopE zu. Toxine von Clostridien und Exoenzyme anderer gram-negativer Bakterien (wie „C3-like ADP-Ribosyltransferases“) modifizieren kovalent und inaktivieren Rho-GTPasen, wohingegen *Yersinia* YopE auf RhoG als GAP (Roppenser et al. 2009) wirkt. In beiden Fällen wird die Phagozytose der Bakterien vermindert (Aktories et al. 2004). Da YopE mit seiner GAP-Aktivität auf die Proteine RhoA, Rac1 und Cdc42 abzielt (von Pawel-Rammingen et al. 2000; Andor et al. 2001; Aili et al. 2006), beeinflusst YopE den Immunglobulin-Rezeptor-vermittelten und den Komplementrezeptor-vermittelten Weg der Phagozytose.

Auch YopT wirkt primär auf GTPasen, aber im Gegensatz zu YopE als eine Cystein-Protease, die Lipidanker von den Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 abspaltet (Shao et al. 2003). Das führt dazu, dass die G-Proteine ihren Anker in der Zellmembran verlieren. YopT soll so Aktin-reiche phagozytotische „cups“ und podosomale Adhäsionen zerstören. Die Zerstörung dieser beiden Strukturen schwächt die Funktion von Immunzellen und trägt dazu bei Yersinien vor der Phagozytose zu schützen.

Auch YopO assoziiert mit Rho-GTPasen, allerdings nur mit RhoA und Rac1, nicht aber mit Cdc42 (Barz et al. 2000; Dukuzumuremyi et al. 2000; Aepfelbacher 2004). YopO hemmt den GEF-vermittelten Austausch von GDP zu GTP, was zu einer Hemmung der

Funktion von Rac1 führt und die Bildung von Stressfasern verhindert (Trosky et al. 2008). Somit trägt auch YopO zur antiphagozytären Wirkung bei.

YopH ist hingegen für bis zu 50% der antiphagozytären Aktivität von Yersinien gegenüber Neutrophilen und J774-Makrophagen verantwortlich (Fällman et al. 1995; Ruckdeschel et al. 1996; Aepfelbacher 2004) und inhibiert die Phagozytose über die Inaktivierung von p130<sup>Cas</sup>, was zu einem Verlust von fokalen Adhäsionen führt (Andersson et al. 1996) und nicht Rho-GTPase abhängig ist.

Gelingt die Inhibition der Phagozytose durch die oben beschriebenen Mechanismen nicht vollständig, kann ein zusätzliches Ziel der Yersinien, in der Beeinflussung der Zellmigration von aktivierten Immunzellen (z.B. dendritischen Zellen) liegen. Da insbesondere dieser Frage in dieser Arbeit nachgegangen wird, wird im Folgenden näher auf die Zellmigration eingegangen.

#### **1.2.4 Zellmigration**

Unter Zellmigration versteht man die aktive Fortbewegung von Zellen. Die Zellmigration ist ein essentieller Prozess in allen mehrzelligen Organismen und ist nicht nur während der Entwicklung sondern auch während des Lebens, z. B. bei der Heilung von Wunden und der Überwachung des Organismus durch das Immunsystem, entscheidend (Wittmann und Watterman-Storer 2001; Raftopoulou und Hall 2003). Viele Zelltypen migrieren als individuelle Zellen, wie Leukozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und neuronale Zellen, hingegen bewegen sich Epithel- und Endothelzellen als Zellflächen oder Zellgruppen, z. B. bei der Wundheilung oder der Angiogenese (Ridley 2001). In Lebewesen wird die Zellmigration durch extrazelluläre Reize gesteuert, die entweder als Lockstoffe oder abstoßende Substanzen fungieren. Die Reize können löslich sein und über weite Entfernungen wirken oder lokale Signale der Nachbarzelle bzw. der extrazellulären Matrix sein (Raftopoulou und Hall 2003). Die Lockstoffe stimulieren dann Transmembran-Rezeptoren und initiieren so intrazelluläre Signalkaskaden (Ridley 2001). Die Reize rufen eine Vielzahl von intrazellulären Reaktionen hervor, wie Veränderungen in der Struktur des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts, im Vesikeltransport und in der Gentranskription (Raftopoulou und Hall 2003). Migrations-Mechanismen wurden bereits umfassend in der Zellkultur, in der die Untersuchungs-Bedingungen leicht kontrolliert und beeinflusst werden können, studiert (Lehmann 2001).

#### 1.2.4.1 Integrin-unabhängige Zellmigration

Zellen wie z. B. Epithel- und Endothelzellen bewegen sich entlang ganz bestimmter Routen (Ridley 2001; Lämmermann et al. 2008). Das Integrin-Repertoire jeder dieser Zellen bestimmt, welche Substrate für die adhäsionsabhängige Migration genutzt werden können. Diese limitierten Möglichkeiten zwischen substratspezifischer Bindung und Migration bewirken die Wanderung der Zellen auf vorbestimmten Wegen. Zelltypen wie Leukozyten, die als individuelle Zellen migrieren, sind besondere Zellen, da sie durch den gesamten Körper wandern und in der Lage sind, jedes Gewebe zu infiltrieren; sie sind nicht vom Substrat und damit von vorbestimmten Wegen abhängig (Lämmermann et al. 2008). Dendritische Zellen (DC) sind ruhende Phagozyten in Geweben, sie werden durch Verletzungen oder Infektionen aktiviert und wandern über die afferenten Lymphgefäße zu dem drainierenden Lymphknoten. In dem Lymphknoten fungieren sie als Antigen-präsentierende Zelle. Die Migration von DC wird vor allem durch die Chemokine CCL19 und CCL21 gesteuert, welche von den lymphatischen Endothelzellen und der T-Zell-Region im Lymphknoten produziert werden (Lämmermann et al. 2008). Die Chemokine binden an C-Chemokin Rezeptor 7 (CCR7) der DC; dieser wird in den DC nach ihrer Aktivierung hochreguliert. Unter Bedingungen, unter denen alle Integrin-Heterodimere von Maus-DC entfernt wurden, konnte gezeigt werden, dass diese Integrine nicht für die Migration in der 3-dimensionalen Umgebung benötigt werden (Lämmermann et al. 2008). Die Migration der Leukozyten und DC in der 3-dimensionalen Umgebung wird durch die Kraft getrieben, die durch die langsame Aktinverlängerung in Wanderrichtung entsteht. Veränderungen im Aktinzytoskelett bewirken einen Aktinfluss am Leitsaum („leading edge“) der Zellen. Die Erweiterung des führenden Endes der Zelle ist unabhängig vom Schrumpfen des hinteren Zellanteils. Die Vorwölbung der Zelle und die Kontraktion des Zellschwanzes sind örtlich und zeitlich getrennt und unabhängig voneinander ablaufende Mechanismen. Die Myosin II-abhängige Kontraktion wird von den Leukozyten nur bei der Passage durch schmale Lücken (bei der Extravasation) benötigt, da die Kontraktion des Zellschwanzes den rigidem Nukleus durch die Lücke quetscht (Lämmermann et al. 2008). B-Zellen und Granulozyten scheinen auch Integrin-unabhängig zu migrieren (Lämmermann et al. 2008); eventuell können Zellen des Immunsystems gerade deshalb so schnell wandern (100 mal schneller als Endothelzellen).

Da in dieser Arbeit die Migration von Endothelzellen untersucht wurde, wird im Folgenden näher auf die adhäsions-abhängige Migration eingegangen.

### 1.2.4.2 Integrin-abhängige Zellmigration

Eine wichtige Voraussetzung für die Zellmigration in der 2-dimensionalen Ebene und für die Migration von Zellen, die Integrin-abhängig wandern, ist die Zelladhäsion. Die Zelladhäsion führt zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und zur Induktion von Signalkaskaden. Intrazelluläre Prozesse werden durch die Zelladhäsion in Gang gesetzt. Durch spezielle Zelloberflächen-Rezeptoren (vor allem durch Integrine) wird die Zelladhäsion vermittelt. Generell wird angenommen, dass die Hauptkraft, die die Migration treibt, die Erweiterung des führenden Anteils der Zelle, des Leitsaums ist. Die Polymerisation der Mikrofilamente liegt der Bewegung des Leitsaums zugrunde. Dieser Prozess der Migration setzt sich bei der Adhäsions-abhängigen Migration aus der Bildung von Lamellipodien, der Ausbildung neuer Adhäsionen an der führenden Seite, der Zell-Kontraktion und der Ablösung des hinteren Endes der Zelle zusammen (Raftopoulou und Hall 2003). All diese Schritte beinhalten die Ansammlung und Auflösung oder die Reorganisation des Zytoskeletts. Jeder Schritt muss in seinem Ausmaß und der zeitlichen Abfolge koordiniert werden, um reine Vorwärts-Bewegungen zu ermöglichen (Ridley 2001; Raftopoulou und Hall 2003). Unter Zellkultur-Bedingungen zeigen wandernde Zellen einen einzigartigen, polarisierten Aufbau:

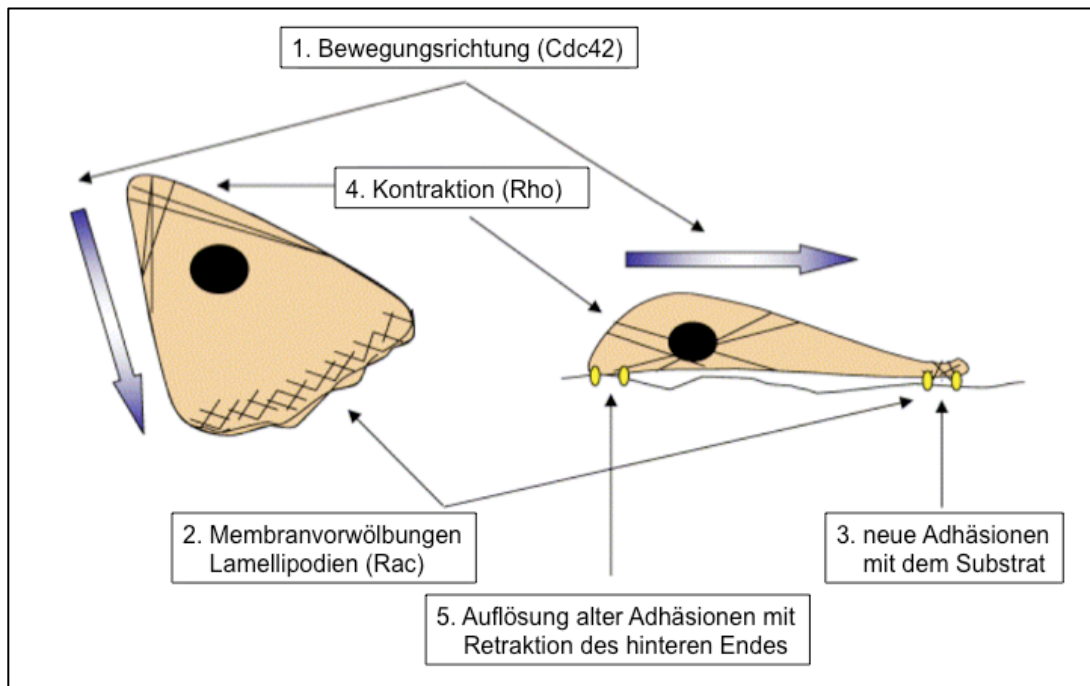
1. breite, flache Lamellen, die sich in die Wanderungsrichtung ausbreiten und sich in „ruffle-artige“ Lamellipodien umwandeln, und
2. einen schmalen, sich zurückziehenden Schwanz am hinteren Ende der Zelle (Abercrombie et al. 1970).

Viele intrazelluläre Signalmoleküle werden mit der Zellmigration in Verbindung gebracht. Dabei scheinen Rho-GTPasen die zentrale Rolle in der Regulation der biochemischen Signalwege der Migration zu spielen (Raftopoulou und Hall 2003). Aktin wird durch kleine GTPasen der Rho-Familie reguliert. Das Aktin-Zytoskelett stellt die Hauptantriebskraft für die Zellmigration dar (Wittmann und Waterman-Storer 2001). Eventuell verändern Mikrotubuli die Aktivität der Rho-GTPasen und beeinflussen so das Aktinzytoskelett. Andere Ergebnisse zeigen dagegen, dass Rho-GTPasen nicht nur das Aktinzytoskelett sondern auch die Dynamik der Mikrotubuli organisieren (Wittmann und Waterman-Storer 2001).

Die Adhäsions-abhängige Zellmigration kann in vier, mechanisch getrennte Schritte unterteilt werden: (i) Verlängerung von Lamellipodien, (ii) Bildung neuer Adhäsionskontakte, (iii) Kontraktion des Zellkörpers und (iv) Ablösung des Zellschwanzes (Lauffenburger und Horwitz 1996). Des Weiteren ist die Wander-Richtung entscheidend; Cdc42 scheint eine



wichtige Rolle in der Regulation der Wander-Richtung zu spielen (Raftopoulou und Hall 2003).



**Abbildung 4:** Die Zellmigration

Darstellung einer migrierenden Zelle von oben und von der Seite. Die Richtung der Zellmigration wird über Cdc42 reguliert. Cdc42 ist mit verantwortlich für die Bildung von Filopodien. Rac1 induziert über viele, nachgeschaltete Signalmoleküle die Ausbildung von Membran-Ausstülpungen. Am Leitsaum der Zelle werden neue Adhäsionen ausgebildet. Fokale Komplexe entstehen Rac1-abhängig. Der Umbau der fokalen Komplexe zu reifen fokalen Adhäsionen ist abhängig von der Ausbildung von Stressfasern und ist damit RhoA-abhängig. RhoA vermittelt auch die Aktin-Myosin-Kontraktion, die z. B. für die Ablösung des hinteren Zellendes und für das Reifen der fokalen Komplexe benötigt wird (Raftopoulou und Hall 2003; Le Clainche und Carlier 2008).

### Regulation der Migrations-Richtung

Es ist zu vermuten, dass Cdc42, welches die Bildung von Filopodien reguliert, für das „Fühlen“ der Richtung während der Chemotaxis benötigt wird (Allen et al. 1998, Nobes und Hall, 1999). Durch die Verlängerung der Zelle in die Umgebung können Rezeptoren auf den Filopodien Veränderungen der extrazellulären Signale detektieren und diese Veränderungen dann in die Zelle zurück vermitteln (Ridley 2001). Die Rolle von Cdc42 in diesem Prozess ist vermutlich, die Aktin-Polymerisation zu initiieren, die für die Verlängerung des Filopodiums benötigt wird. Im Gegensatz zu der Arp2/3 induzierten Aktin-

Polimerisation, die Rac1-abhängig über die Interaktion von Rac1 mit WASp und N-WASp zu der Ausbildung von Lamellipodien führt, wird die Aktin-Polymerisation, die Cdc42-abhängig zur Ausbildung von Filopodien führt, vermutlich über das Formin mDial („mammalian diaphanous-related formin“) reguliert (Le Clainche und Carlier 2008). Die nahen Cdc42-Verwandten TC10 und TCL können mit WASp-Proteinen interagieren und haben so das Potential, die Aktin-Polymerisation zu stimulieren (Neudauer et al. 1998).

### Ausbreitung von Lamellipodien

Die Ausbreitung von Lamellipodien beinhaltet eine Aktin-Polymerisation. Es wird postuliert, dass Rac1 durch viele nachfolgende Signalproteine die F-Aktin-Akkumulation am Leitsaum der Zelle reguliert. Im Lamellipodium wird somit über die Stimulation des Arp2/3-Komplexes die Aktin-Polymerisation durch Rac1 induziert (Ridley 2001). Die Rac1-abhängig im Lamellipodium gebildeten, kleinen Filamente stellen den Ausgangspunkt für den Aufbau höherer Aktinstrukturen wie Stressfasern dar (Small et al. 1998).

Effekte von konstitutiv aktivem Rac1 auf die Migration zeigen differierende Ergebnisse, die eventuell auf den unterschiedlichen Effekten der Zelltypen, der Stimuli, der Expressionslevel und der zeitlichen Abfolge der Expression beruhen (Ridley 2001). Konstitutiv aktives Rac1 inhibiert z. B. die Wachstumsfaktor-induzierte Makrophagen-Wanderung, weil sich die Lamellipodien um die ganze Zelle herum ausbilden, so dass diese nicht polarisiert (Allen et al. 1998).

Rac-Proteine sind Schlüsselregulatoren der Migration (Ridley 2001). Der Signaltransduktionsweg über Rac1 kann aber umgangen werden; die Expression von Rab5 (ein Endozytose-Regulator) kann Lamellipodien unabhängig von Rac1 hervorrufen (Spaargaren und Bos 1999). In Kolonkarzinom-Zellen konnte dominant negatives Rac1 die Ausbildung von Lamellipodien und damit die Zellausbreitung nicht verhindern, dafür scheint RhoA in die Ausbildung von Lamellipodien verwickelt zu sein. RhoA könnte mit dem Arp2/3-Komplex verbunden sein, da RhoA und der Arp2/3-Komplex und nicht Rac1 und Cdc42 für die Integrin-vermittelte Phagozytose benötigt werden (May et al. 2000).

### Ausbildung neuer Adhäsionen

Fokalkontakte („small focal complex structures“) sind in den Lamellipodien der meisten wandernden Zellen vorhanden, und es wird angenommen, dass sie wichtig für die Vermittlung des Haftens der sich ausbreitenden Lamellipodien an der extrazellulären Matrix sind (Lauffenburger und Horwitz 1996). Rac1 wird für die Ansammlung fokaler Komplexe benötigt (Nobes und Hall 1995; Allen et al. 1997); es ist aber nicht klar, ob diese Ansammlung ein aktiver Rac1-vermittelter Prozess ist, oder ob fokale Komplexe sich nur in Lamellipodien bilden (Ridley 2001). Die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix führt zu einer Aktivierung von Rac1 und Cdc42 (Price et al. 1998). Es ist daher möglich, dass die kontinuierliche Bildung neuer Bindungen zwischen Integrinen und der extrazellulären Matrix am führenden Ende der Zelle Rac1 hier aktiv hält und dass so eine positive „Feedback-Schleife“ gebildet wird, die es der Zelle erlaubt, weiter zu wandern (Allen et al. 1998; Bailly et al. 2000), da aktives Rac1 die weitere Ausbildung von Lamellipodien vorantreiben könnte. Die Rac1-vermittelte Rekrutierung von aktivierten Integrinen an das führende Ende der Zelle kann auch einen Beitrag zu Aufrechterhaltung der Zellmigration leisten (Kiosses et al. 2001). In langsam wandernden Zellen werden die fokalen Kontakte in stabilere, fokale Adhäsionen umgebaut. Dieser Vorgang ist von dem RhoA-ROCK-Signalweg abhängig (Le Clainche und Carlier, 2008).

### Kontraktion des Zellkörpers

Die von den fokalen Adhäsionen ausgehenden Stressfasern aus Aktomyosin sind nach diffuser Auffächerung an das restliche Mikrofilament-System der Zelle angebunden. Die Stressfasern vermögen so eine Zugkraft auszuüben, die bei der Ablösung der Fokalkontakte vom Substrat als auch bei der Vorwärtsbewegung der Zelle hilft. Die Kontraktion des Zellkörpers ist von der Aktomyosin-Kontraktilität abhängig (Mitchison und Cramer 1996) und kann durch RhoA reguliert werden (Ridley 2001). RhoA aktiviert in seiner GTP-gebundene Form ROCK (Rho-kinase). Dies führt zu einer Phosphorylierung der Myosin II-Leichtkette und inhibiert die Myosin II-Leichtketten-Phosphatase. Phosphoryliertes Myosin II verbindet sich mit Myosin, assoziiert mit Aktinfilamenten und bildet so kontraktile Stressfasern (Le Clainche und Carlier, 2008). Die RhoA-ROCK-abhängige Ausbildung der kontraktile Stressfasern ist, neben der Vermittlung der Zellkontraktion, auch für die Ausbildung von fokalen Adhäsionen mit verantwortlich. Wenn RhoA inhibiert ist, fahren

Makrophagen fort, Lamellipodien zu bilden, der Zellkörper bewegt sich aber kaum (Allen et al. 1997; Allen et al. 1998), da die Zelle sich nicht kontrahiert.

### Lösung des Zellschwanzes

Der Mechanismus, der die Ablösung des Zellschwanzes bewirkt, hängt vom Zelltyp und von der Stärke der Adhäsion zur extrazellulären Matrix ab (Palecek et al. 1998). In langsam migrierenden Zellen scheint die Lösung des Zellschwanzes von der Protease Calpain abzuhängen (Palecek et al. 1998; Glading et al. 2000). Es gibt keinen Hinweis darauf, dass Rho-Proteine den Vorgang regulieren (Ridley 2001). Eine Reduktion der Rho-Aktivität konnte aber die Ablösung des Zellendes durch herunterregulierte Aktomyosin-Kontraktion inhibieren (Cox und Huttenlocher 1998). Auch andere Signale wie Src, FAK und PAK können zur Auflösung von fokalen Adhäsionen führen (Jones et al. 2000; Zhao et al. 2000) und so die Ablösung des Zellschwanzes bewirken (Cox und Huttenlocher 1998).

### **1.2.5 Angiogenese**

Unter Angiogenese wird die Ausbildung neuer Blutgefäße verstanden. Es ist ein Prozess, bei dem Blutgefäße aus einem bereits vorhandenen Blutgefäßsystem entstehen. Die Bildung dieser neuen Gefäße ist ein integraler Bestandteil von normalen Körperprozessen, wie z. B. der Wundheilung. Die Angiogenese spielt zusätzlich eine Rolle bei pathologischen Prozessen, wie beim Tumorwachstum und der Metastasierung. Maßgeblich an der Neubildung beteiligt sind Endothelzellen, die die Blutgefäße von innen auskleiden. Die Endothelzellen aus den bereits vorhandenen Blutgefäßen reagieren auf externe Stimuli. Die angiogenetischen Stimuli, die zu einer gerichteten Migration der Endothelzellen führen, werden von Tumorzellen, aktivierten Lymphozyten oder Makrophagen, die an der Wundreparatur beteiligt sind, ausgeschüttet. Die Endothelzellen durchbrechen daraufhin die Basalmembran, migrieren in Richtung der Stimuli und teilen sich, um die nötige Zellzahl, die zur Auskleidung neuer Gefäße benötigt wird, bereitzustellen. Die Angiogenese beinhaltet also mehrere Schritte: das Durchbrechen der Basalmembran, Zellmigration, Zellteilung und „Tube formation“ (Auerbach et al. 2003). Jeder dieser Einzelschritte kann von bakteriellen Proteinen inhibiert werden. Demzufolge stellt auch die Angiogenese einen möglichen Angriffspunkt der Yops dar.

### 1.2.6 Zellteilung

Yops beeinflussen (über die Veränderung des Aktinzytoskeletts) nicht nur die Phagozytose und eventuell die Zellmigration sondern (über andere Wege) vermutlich zusätzlich auch die Zellteilung und Apoptose. Eukaryotische Zellen durchlaufen einen Zellzyklus, der an verschiedenen Stellen durch Kontrollpunkte („Checkpoints“) reguliert ist. Ist die Zelle ausreichend gewachsen (G1-Phase), beginnt sie, das Genom zu duplizieren (S-Phase) und sich dann auf die Zellteilung vorzubereiten (G2). Wird die Zellteilung eingeleitet (Prometa-Phase), wird die Genexpression eingestellt, die Kernmembran aufgelöst und eine Reihe von Proteinkomplexen neu arrangiert. An den Zentromeren wird der Kinetochor-Komplex von einer Reihe zusätzlicher Proteinen gebunden, die den weiteren Verlauf der Mitose regulieren. Sind alle Zentromere von Mikrotubuli gebunden, wird der mitotische Checkpoint (<sup>M</sup>SAC) inaktiviert und so der Anaphase-Promoting-Komplex (APC/C) aktiviert, der dann den Übergang von der Meta- zur Anaphase und schließlich zur Zytokinese steuert (Cheeseman und Desai, 2008).

Um den Prozess der Zellteilung zu stören oder anzuhalten, besteht bei einer Vielzahl von Proteinen die Möglichkeit, in ihre Funktion einzugreifen. Zum einen könnte das innere Kinetochor mit seinen essentiellen Proteinen CENP-A oder CENP-C beeinflusst werden, zum anderen besteht die Möglichkeit, die Funktion des mitotischen Checkpoints zu stören.

### 1.2.7 Apoptose

Gelingt es den generellen Reparatur-Mechanismen nicht, auftretende Fehler zu beseitigen, kann die Zelle in den Ruhezustand oder einen seneszenten Zustand übergehen, in dem die zellulären Prozesse weiter ablaufen, die Zelle sich aber nicht mehr teilt. Bei größeren Fehlern kann die Zelle einen Signalweg zur Selbstzerstörung („Apoptose“) einleiten, um nicht karzinogen zu werden. Zur Regulation dieser Prozesse verfügt die Zelle über verschiedene Signalwege. Bei der Regulation der Apoptose spielt p53, der „Wächter des Genoms“, eine zentrale Rolle.

### 1.3 Zielsetzung

Yersinien infizieren insbesondere Neutrophile, dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen des Immunsystems (Marketon et al. 2005), vermutlich aber auch Darmepithel- und Endothelzellen. Bei Infektion translozieren Yersinien Proteine („Yersinia outer proteins“; Yops), über das Typ-III-Sekretionssystem in die Zielzellen und üben dort ihre Wirkung aus. Dabei wurde beobachtet, dass einige der Effektorproteine am Aktin-Zytoskelett lokalisieren, mit diesem spezifisch interagieren und die Struktur des Zytoskeletts beeinflussen (Juris et al. 2000). Dies ist eine Voraussetzung für die Beeinflussung der Phagozytose und der Zellmigration. Beide Prozesse sollen deshalb in dieser Arbeit untersucht werden. Dabei soll der Schwerpunkt der Arbeit auf der Untersuchung der Eigenschaften einzelner Yops im Vergleich zum Wildtyp, auf die Phagozytose und die Zellmigration von HUVEC-Zellen liegen. Die Versuche sollen mit Mutanten, die einzelne Yops über das Typ-III-Sekretionssystem translozieren, durchgeführt werden. Für die Migrationsstudien soll ein Assay etabliert werden, das es erlauben soll, die Wanderstrecke und Wandergeschwindigkeit sowie die Wanderorientierung von Zellen zu analysieren. In einem zweiten Schritt sollen die mit der Migration assoziierten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts näher beleuchtet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Arbeitsmaterial

#### 2.1.1 Laborgeräte und Mikroskope

Folgende Geräte wurden im Labor benutzt:

Gerät	Hersteller
Inkubator	Heraeus, BBD 6220, Hanau Typ B20
sterile Arbeitsbanken	Thermo Scientific, Thermo Electron Corporation, Hera safe
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5810R
Tischzentrifugen	1K1S, Sigma; 3K30, Eppendorf
Vortexer	ProScientific, Oxford, USA
Photometer	Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000
Gefrierschrank - 20	Liebber
Gefrierschrank - 80	Freez

**Tabelle 2:** Geräte

Um Zellen mittels Fluoreszenz-, Hellfeld-, und Phasenkontrast-Mikroskopie zu beurteilen und zu verfolgen, wurden die folgenden Systeme verwendet:

Gerät	Hersteller
Konfokales Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Nicht - konfokales Mikroskop Axioplan	Zeiss, Jena

**Tabelle 3:** Mikroskope

Für die Live-Cell-Mikroskopie wurde das konfokale Mikroskop der Firma Zeiss (Jena) verwendet. Die technischen Spezifikationen des Mikroskops sind nachfolgend aufgeführt:

- Mikroskop Zeiss Axiovert 200M mit folgenden Objektiven:
  - 10x/0,3 EC Plan-Neofluar
  - 20x/0,5 EC-Plan-Neofluar
  - 63x/1,4 Plan-Apochromat Ph3 (Öl-Immersionsobjektiv)

Zur Durchführung der Live-Cell-Mikroskopie wurde das Mikroskop mit den unten aufgeführten Geräten ausgestattet.

- Spinning Disk CSU22 (Confocal Scanner Unit) von Yokogawa Electric Corporation (Japan)
- Digitalkamera EM-CCD C9100-02 (Electron multiplier CCD) mit 1000x1000 Pixel von Hamamatsu Photonics (Japan)
- Festphasenlaser Cobolt Calypso CW 491 nm & Cobolt Jive CW 561 nm von Cobolt AB (Stockholm, Schweden)
- UV-Quelle X-cite Series 120 von EXFO Life Sciences & Industrial division (Ontario, Canada) mit Quecksilber-Lampe
- Fluoreszenz-Emissionsfilter ET525/50 (grün) und ET 620/60 (rot) (Chroma Technology Corp.)
- Inkubationskammer (Maßanfertigung), CO<sub>2</sub>-Regler und Temperaturregler von Solent Scientific (Segensworth, England)
- Zusätzlich CO<sub>2</sub>-Controller von Zeiss, Jena

Die Aufnahme der Bilder und Teile der Auswertung erfolgte mit der Software „Volocity“ von Improvision (Version 4.3.1, Coventry, England).

### 2.1.2 Chemikalien, Antikörper und Puffer

Alle Chemikalien und Antibiotika wurden bezogen von Amersham/ GE Healthcare (München, Deutschland), Biozym (Oldendorf, Deutschland), Dianova (Hamburg, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland) und Sigma – Aldrich (München, Deutschland).

Antibiotika	Abkürzung	gelöst in	Endkonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Ampicillin	Amp	ddH <sub>2</sub> O	100
Kanamycin	Kan	ddH <sub>2</sub> O	50
Chloramphenicol	Cm	70% Ethanol	20
Spectinomycin	Sm	ddH <sub>2</sub> O	50
Nalidixinsäure	Nal	0,5 N NaOH	50
Gentamycin	Gen	ddH <sub>2</sub> O	50

**Tabelle 4:** Antibiotika



Zur Herstellung endotoxinfreier Plasmide fand das EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen GmbH (Hilden) Verwendung. Zur Transfektion der hergestellten Plasmide in Zelllinien wurden die nachfolgend aufgelisteten Reagenzien verwendet:

Name	Zelllinie	Hersteller
Cell Line Nucleofector Kit V	HUVEC	Amaxa, Köln
FuGENE HD	RAW-Makrophagen	Invitrogen, Carlsbad

**Tabelle 5:** Transfektions - Kits

Als chemotaktisch wirkende Substanzen wurden eingesetzt:

Lockstoff	Hersteller
N-Formyl-Met-Leu-Phe (FMLP)	Fluka Bio Chemica
Recombinant Murine Monocyte Chemotactic Protein-1 (rm MCP-1)	ImmunoTools GmbH
Fetales Bovines Serum mit Endothelial Cell Growth Medium (FBS + ECGM)	GIBCO bzw. PromoCell

**Tabelle 6:** Chemotaktische Substanzen

Bei der Durchführung der Western-Blots und zur Immunfluoreszenz wurden die folgenden Primär-Antikörper verwendet.

Anti-	Spezies	Hersteller
JL8 (GFP)	Maus, monoklonal	Clontech
Yersinia enterocolitica O:8	Kaninchen, polyklonal	Sifin
Yersinia enterocolitica O:9	Kaninchen, polyklonal	Sifin
YopT	Kaninchen, polyklonal	Feng Shao (Labor Jack Dixon)

**Tabelle 7:** Primäre - Antikörper

Zur Detektion der Primär-Antikörper wurden die unten aufgelisteten Sekundär-Antikörper benutzt.

Anti-	Beschreibung	Hersteller
Maus	alkalische-Phosphatase-(AP)-konjugierter Sekundär-Antikörper	Amersham-Biosciences
Kaninchen	alkalische-Phosphatase-(AP)-konjugierten Sekundär-Antikörper	Amersham-Biosciences
Kaninchen	Alexa Flour 488 goat anti rabbit	Molecular Probes
Kaninchen	Alexa Flour 568 goat anti rabbit	Molecular Probes

**Tabelle 8:** Sekundär-Antikörper

Durch den Einsatz von Alexa Fluor 568 markiertem Phalloidin (Molecular Probes, USA), welches in Aktin-Filamente interkaliert, wurde das Aktin sichtbar gemacht.

Unter anderem wurden die nachfolgend aufgeführten Puffer verwendet.

Bezeichnung	Inhalt	Konzentration	Anwendung
PBS, pH 7,4	NaCl	1,37 M	Waschpuffer
	KCl	26,5 mM	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	83 mM	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	26,5 mM	
SOC, pH 7,0	Bacto-Trypton	2%	Transformation
	Hefeextrakt	0,55%	
	NaCl	10 mM	
	KCl	10 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM	
	Glucose	20 mM	
Lysepuffer, pH 7,4	Tris	50 mM	Lysieren von HUVEC
	NaCl	150 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM	
	Triton-X-100	1%	
	Glycerol	10%	
	Protease Inhibitor	Complete Mini, Roche	
	in ddH <sub>2</sub> O		

**Tabelle 9:** Puffer

Bezeichnung	Inhalt	Konzentration	Anwendung
Ladepuffer, pH 6,8	Tris/HCl	0,5 M	SDS-Gel
	Glycerol	20%	
	SDS	0,08%	
	Bromphenolblau	0,05%	
	in ddH <sub>2</sub> O		
Laufpuffer	Tris/HCl	25 mM	SDS-Gel
	Glycerin	0,2 M	
	SDS	0,1%	
	in ddH <sub>2</sub> O		

Fortsetzung Tabelle 9: Puffer

### 2.1.3 Plasmide und verwendete Mikroorganismen

Die hier aufgeführten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit vervielfältigt und transfiziert.

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pEGFP-C1	Fluoreszenz-Protein; MCS C-terminal von GFP	BD Clontech
pEGFP-C3	Fluoreszenz-Protein; MCS C-terminal von GFP	BD Clontech
pEGFP-N1	Fluoreszenz-Protein; MCS N-terminal von GFP	BD Clontech
pEGFP-Yop-O (C1)	Vollängen wt YopO	Gerhardt Zenner
pEGFP-Yop-P	Vollängen wt YopP	Klaus Ruckdeschel
pEGFP-Yop-T (C1)	Vollängen wt YopT	Feng Shao (Labor Jack Dixon)
pEGFP-Yop-E (N1)	Vollängen wt YopE, Serotyp O:9	Bernhard Roppenser
pEGFP-Yop-M (C3)	Vollängen wt YopM	Moritz Hentschke

Tabelle 10: Plasmide

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgelisteten Yersinien-Stämme wurden im Rahmen der Arbeit zur Infektion eingesetzt.

Stamm	Resistenz	Beschreibung
WA-314 (O:8)	Nalidixin	Wildtyp, mit Virulenz-Plasmid pYV O:8 (Heesemann und Laufs, 1983)
WA-C (O:8)	Nalidixin	Wildtyp ohne Virulenz-Plasmid (Heesemann und Laufs, 1983)
Y.e. 5/15	Kanamycin	Wildtyp mit Mutation in der LcrD-Region (Ruckdeschel 1996)
WA-C pTTSS	Spectinomycin	WA-C mit Plasmid welches für den Typ III Sekretionsapparat des WA-314 Stamms kodiert (Trülsch et al. 2003)
WA-C pTTSSYopM	Spectinomycin, Chloramphenicol	WA-CpTTSS und YopM (im Labor vorhanden )
WA-CpTTSSYopT (O:9)	Spectinomycin, Chloramphenicol	WA-CpTTSS und YopT (im Labor vorhanden )
WA-CpTTSSYopT C139A	Spectinomycin, Chloramphenicol	WA-CpTTSS und YopT Mutante (im Labor vorhanden )
WA-CpTTSSYopE (O:9)	Spectinomycin, Chloramphenicol	WA-CpTTSS und YopE O:9 (Hentschke et al. 2007)
WA-CpTTSSYopE (O:8)	Spectinomycin, Chloramphenicol	WA-CpTTSS und YopE O:8 (Hentschke et al. 2007)
WA-CpTTSS YopE R144A(O:9)	Spectinomycin, Chloramphenicol	WA-CpTTSS und YopE O:9 Mutante (Roppenser et al. 2008)
WA-CpTTSS YopE $\Delta$ MLD(O:9)	Spectinomycin, Chloramphenicol	WA-CpTTSS und YopE O:9 Mutante (Roppenser et al. 2008)
WA-C pTTSSYopO	Spectinomycin, Chloramphenicol	WA-CpTTSS und YopO (im Labor vorhanden)
WA-C pTTSSYopP	Nalidixin, Chloramphenicol	WA-CpTTSS und YopP (im Labor vorhanden)
WA-CpTTSSYopH	Spectinomycin, Chloramphenicol	WA-CpTTSS und YopH (im Labor vorhanden)
WA-314 $\Delta$ YopH	Chloramphenicol	Wildtyp Stamm ohne YopH (Gaede und Heesemann, 1995)

**Tabelle 11:** Bakterien – Stämme

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit DNA

#### Transformation

Das Einbringen von dem GFP-Leervektor (pEGFP-C1) erfolgte mittels Hitzeschock in *E.coli BL 21* (Hanahan 1985). Zu 50 µl der kompetenten *E.coli BL 21* wurde 1 µg der Plasmid-DNA (pEGFP-C1) gegeben. Die Lösung wurde für 5 sec in einem 42 °C warmen Wasserbad aufgewärmt und anschließend für weitere 2 min zurück auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz wurden anschließend 500 µl 37 °C warmes SOC-Medium (siehe Tabelle 10) gegeben. Die Inkubation des Transformations-Ansatz erfolgte für 1 h bei 37 °C, anschließend wurden 2 Agar-Platten (10 ml LB-Agar (Roth, Karlsruhe) versetzt mit 100 µg/ml Ampicilin) mit je 50 µl und 100 µl des Transformations-Ansatzes beimpft. Die Platten befanden sich über Nacht im Inkubator bei 37 °C. Als Positiv-Kontrolle diente pUC18 DNA in *E.coli BL* auf einer Agar-Platte mit Kanamycin-Resistenz (50 µg/ml) und als Negativ-Kontrolle wurde nur *E.coli BL 21* mitgeführt.

#### Aufreinigung von Plasmid-DNA

Für Transfektionen und Sequenzierungen fand Plasmid-DNA von hoher Reinheit und im µg-Bereich Einsatz. Zunächst wurden, wie oben beschrieben, kompetente *E.coli BL 21*, die mit der gewünschten Plasmid-DNA transformiert waren, unter Selektionsbedingungen auf Agar-Platten gezüchtet. Anschließend wurde eine Einzelkolonie, die auf der Agar-Platte gewachsen war, gepickt und wieder über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert, allerdings jetzt in einer Flüssigkultur (100 ml LB-Medium versetzt mit 50 µg/ml Ampicilin). Das Ernten der Bakterien fand am Ende der exponentiellen Wachstumsphase statt, wenn die Expression des Plasmids am höchsten ist. Zum Gewinnen reiner Plasmid-DNA wurden die Bakterien lysiert und genomische DNA sowie denaturierte Proteine mit Hilfe des Endo-Free Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH) über Silicagel-Anionenaustauschersäulen entfernt. Die Plasmid-DNA wurde eluiert, gewaschen, getrocknet und anschließend in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Abschließend erfolgte die Ermittlung der DNA-Konzentration mittels Quarzküvetten im Photometer.

### Bestimmung der DNA-Reinheit

Die Konzentrationsmessung der Plasmid-DNA erfolgte mit einer mit ddH<sub>2</sub>O passend verdünnten Probe (Verdünnung circa 1:50). Im Photometer wurde die Absorption bei 260 nm in Quarzküvetten gemessen. Eine Aussage über die Reinheit der Plasmid-DNA erhält man durch die Bildung der Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> und OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> ist ein Maß für die Reinheit der DNA gegenüber chemischen Substanzen. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>, der bei reiner DNA bei 1,8 liegen sollte, gibt Aufschluss über die Verunreinigung der Plasmid-DNA mit Proteinen, da diese bevorzugt bei 280 nm absorbieren. Bei den hier durchgeführten DNA-Präparationen wurde routinemäßig eine hohe Reinheit erzielt (Quotient größer als 1,7).

### cDNA-Sequenzen der Yop-Proteine

Verschiedene Yop-Proteine lagen kloniert vor. Sie wurden mit EGFP fusioniert und für Transfektionen bereitgestellt. Die korrekte Sequenz der Konstrukte wurde durch Sequenzierung (MWG, München) verifiziert.

## **2.2.2 Ermittlung von Protein Konzentrationen (Bradford)**

Die Konzentration von löslichen Proteinen wurde mit dem „Bio-Rad Protein Assay“ (Bio-Rad, München), welcher auf der Methode nach Bradford basiert, bestimmt. Es wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

## **2.2.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

HUVEC-Zellen wurden mit GFP-Yop-Vektorkonstrukten transfiziert, um den Phänotyp der transfizierten Zellen zu studieren und um die korrekte Größe der jeweils exprimierten Yop-Proteine, nach Lyse der Zellen, zu messen. Für die untersuchten Yop-Proteine lagen GFP- sowie, Rabbit-Anit-Yop-Antikörper vor, die durch sekundäre Antikörper nachzuweisen sind.

Je Konstrukt fand eine Transfektion von 10<sup>6</sup> HUVEC-Zellen mittels Amaxa statt. Die Zellen wurden nach 24 h durch 1 ml 0.05%igem Trypsin aus ihrem Zellkulturgefäß gelöst, zentrifugiert (5 min, 200 g, 23 °C), mit 1 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 200 g, 23 °C). Das Zellpellet wurde mit Lysepuffer (10-20 µl; siehe Tabelle 10) versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 10.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentri-

fugiert. Nach Zentrifugation des Zelllysates wurde der Überstand, sowie bei einigen Konstrukten das Pellet mit Ladepuffer (siehe Tabelle 10) im Verhältnis 1:4 versetzt. Die mit dem Ladepuffer verdünnten Proben denaturierten für 5-10 min bei 95 °C. Die Auftrennung der im Zelllysate bzw. Pellet enthaltenen Proteine fand mit Hilfe der SDS-PAGE statt.

Es wurden zweiphasige Gele verwendet, die aus 10%igem Trenngel und 4%igem Sammelgel bestehen. Um das 10%ige Trenngel zu gießen, wurde 6,7 ml 30%iger Acrylamid-Lösung zu 7,9 ml ddH<sub>2</sub>O, 1 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) und 800 µl SDS gegeben. 8 µl TEMED (Sigma) und 800 µl 10%iges Ammoniumpersulfat (APS) wurden zum Start der Polymerisation hinzu gegeben. Die Flüssigkeit wurde in die dafür vorgesehene BioRad-Apparatur pipettiert und mit Ethanol überschichtet. Nach 30-60 min lag das Gel polymerisiert vor, das Ethanol konnte entfernt werden. Das Sammelgel, in welches der Probenkamm eingesetzt wurde, wurde aus 5,5 ml ddH<sub>2</sub>O, 1 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 1,3 ml 30%iger Acrylamid-Lösung, 800 µl 10%iges SDS, 800 µl APS und 8 µl TEMED gegossen. Die Proben und ein Molekulargewichtsmarker („prestained high range marker“, Peqlab, Heidelberg) konnten aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 bis 35 mA in Laufpuffer (siehe Tabelle 10).

#### **2.2.4 Western-Blots**

Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden diese auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF-) Membran übertragen. Das Semi-Dry-Blot-Verfahren fand Anwendung. In der Blotapparatur wurden auf die Anode 2 Filterpapiere, welche mit Anodepuffer 1 (300 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20% Methanol) befeuchtet wurden, gelegt, dann ein Filterpapier, welches in Anodepuffer 2 (25 mM Tris-HCl (pH 10,4), 20% Methanol) getränkt wurde und anschließend die PVDF-Membran, welche mit Methanol benetzt und in Kathodenpuffer (40 mM 6-Aminocapronsäure (pH 6,7), 20% Methanol) äquilibriert wurde. Auf die PVDF-Membran wurde das Trenngel gelegt und darauf wiederum 3 Filterpapiere, welche zuvor in Kathodenpuffer lagen. Die Blotapparatur wurde mit einem Deckel, welcher als Kathode dient, verschlossen. Der Proteintransfer erfolgte bei einem konstanten Stromfluss von 120 mA für 1 h.

Die auf der PVDF-Membran gebundenen Proteine konnten mittels Immunodetektion sichtbar gemacht werden. Um dies zu erreichen, fand zunächst eine einstündige Inkubation der Membran in Blockierlösung TBST (0,5 mM Tris ultra, 13 mM NaCl, 0,3% Tween 20, 2% BSA) bei Raumtemperatur statt, um unspezifische Bindungsstellen der PVDF-

Membran abzusättigen. Danach wurde einmalig für 5 min mit TBST gewaschen. Es folgte die Inkubation (1 h) mit dem in TBST verdünnten Primär-Antikörper, der 1:1000 verdünnt eingesetzt wurde. Anschließend wurde 3mal mit TBST für je 10 min gewaschen. Es folgte die Inkubation für eine Stunde mit dem alkalische-Phosphatase-(AP)-konjugierten Sekundär-Antikörper und anschließend das erneut 3malige Waschen mit TBST. Die Membran wurde zuletzt mit Substrat behandelt (ECL Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences), das durch die alkalische-Phosphatase umgesetzt wird. Das bei dieser Reaktion entstehende Signal konnte mittels Filmbelichtung (FUJIFILM FUJI, Medical X-Ray Film 100 NIF 13×18) messbar gemacht werden.

## 2.3 Zellkultur und zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Zellkultur: Zellen, Medien und Matrixes

Im Folgenden werden Zellen, mit denen gearbeitet wurde, sowie Kulturmedien und Zellkultur-Medienzusätze tabellarisch aufgeführt.

Zellen	Beschreibung	Quelle
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Primärzellen	Eigene Präparation
RAW-Makrophagen	RAW 264.7	Promochem

**Tabelle 12:** Zellen

Zellkulturmedien	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline mit Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid (PBS)	Sigma
RPMI 1640 mit L-Glutamine (RPMI 1640)	GIBCO
Trypsin 0,05%, EDTA	GIBCO
L-Glutamine 200 nM	GIBCO
Fetal Bovine Serum (FBS)	GIBCO
Endothelial Cell Basal Medium (ECBM)	PromoCell
Endothelial Cell Growth Medium Low Serum (ECGM)	PromoCell
Opti-MEM I	GIBCO
Opti-MEM + GlutaMAX I	GIBCO

**Tabelle 13:** Zellkulturmedien



Die folgenden Substanzen wurden zum Beschichten von Plastik-Oberflächen, damit die Zellen besser Adhärenz zeigen, eingesetzt:

Name	Beschreibung	Hersteller
Fibronectin	Fibronectin, Rinder-Plasma	Calbiochem
Matrigel	Basement Membrane Matrix Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Mouse Tumor	BD Biosciences
Collagen IV	Collagen from human placenta	Sigma
Gelatine	2% Solution Type B : From Bovine Skin	Sigma

**Tabelle 14:** Beschichtung von Oberflächen

### Isolierung der HUVEC-Zellen und Subkultivierung der Zellen

Die Isolierung der HUVEC-Zellen erfolgte aus zur Verfügung gestellten Nabelschnüren von Frauen aus dem Marienkrankenhaus (Hamburg), die dieser Verwendung explizit zugestimmt haben. Die Nabelschnur gelangte nach der Geburt eines Kindes in ein Transportgefäß, wurde kühl gelagert und innerhalb von 24 h verarbeitet. Das weitere Vorgehen fand unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur statt. Nach Überführung der Nabelschnur vom Transportbehälter in eine Petrischale wurde an beiden Nabelschnur-Enden 1 cm gerade abgeschnitten und verworfen, die Nabelschnur dann mit einer Pinzette gegriffen und eine Knopfkanüle in die Vene eingeführt. Die Vene wurde um die Knopfkanüle mit zwei großen Arterienklemmen abgedichtet und an einem Ständer fixiert. Es folgte das Säubern der Nabelschnur mit Antifekt. Dann wurde die innere Oberfläche der Vene mit circa 40 ml PBS durchgespült, bis eine klare Lösung aus der Nabelschnur austrat. Mit ca. 10 ml  $\alpha$ -Chymotrypsin (Konzentration 1 mg/ml) wurde daraufhin das PBS ausgespült. Es folgte das Verschließen des unteren Endes der Nabelschnur mit einer kleinen Klemme und anschließend das Einspritzen von  $\alpha$ -Chymotrypsin, bis die Nabelschnur leicht gebläht war und  $\alpha$ -Chymotrypsin oben aus der Nabelschnur austrat. Nun wurde die mit  $\alpha$ -Chymotrypsin gefüllte Nabelschnur für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die so an der inneren Oberfläche der Vene abgelösten Zellen wurden in einem Falcon-Röhrchen nach Inkubation aufgefangen, welches zur Neutralisation des  $\alpha$ -Chymotrypsins 3 ml FCS enthielt. Anschließend erfolgte das Nachspülen der Vene mit 20 – 30 ml PBS, um die restlichen Endothelzellen abzulösen. Diese Zellsuspension wurde 8 min bei 1000 rpm bei Raumtemperatur (23 °C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml Endothelial Cell Growth Medium (ECGM, welches mit Gentamicin (50  $\mu$ g/ml) und Amphotericin B (0,5  $\mu$ g/ml) versetzt ist)

resuspendiert. Nun wurde die Endothelzelllösung in eine mit 0,2%iger Gelatine beschichtete Zellkulturflasche überführt. Die HUVEC-Zellen sedimentierten ca. 2 h in einem Inkubator, dann wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 3 ml ECGM (versetzt mit Gentamicin und Amphotericin B) gewaschen und schließlich 5 ml frisches Antibiotikum- und Antimykotikum-haltiges ECGM zu den Zellen gegeben. Für die folgenden Versuche wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel, bis ein konfluenten Zellrasen entstand. Anschließend wurden die Zellen mehrfach passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, einmal kurz mit 2 ml 0.05%igem Trypsin vorgespült, dann mit 2 ml 0.05%igem Trypsin circa 2 min inkubiert und die Reaktion dann mit 8 ml ECGM plus 10% Fetal Bovine Serum (FBS) abgestoppt. Die Zelllösung wurde zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 23 °C), das Pellet in 10 ml ECGM (versetzt mit Gentamicin und Amphotericin B) resuspendiert und die Zelllösung dann in Zellkulturflaschen verteilt. Grundsätzlich ist eine Nutzung der HUVEC-Zellen bis Passage 7 möglich, hier wurden die HUVEC-Zellen allerdings nur von Passage 2 – 4 benutzt, da diese Zellen bessere Wandereigenschaften aufzeigen.

#### Arbeiten mit RAW-Makrophagen

Im Gegensatz zu den primären Endothelzellen sind RAW-Makrophagen (RAW 264.7, Promochem, Heidelberg), d. h. Abelson-Maus-Leukämie-Virus-induzierte Tumor-Zellen, kontinuierlich weiter kultivierbar. RAW-Makrophagen wurden in 125 ml Zellkulturflaschen in RPMI 1640-Medium unter Zugabe von L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin und FBS angezogen. Die Antibiotika dienen der Selektion gegen Bakterien-Kontamination. Vor dem Passagieren wurden die Zellen zweimal mit 5 ml RPMI 1640-Medium gewaschen. Dieses Medium ist bei RAW-Makrophagen dem Waschen mit PBS-Medium vorzuziehen. Aus der Zellkulturflasche wurden die Zellen mit einem Zell-Schaber abgekratzt. Dieses Vorgehen hatte zur Folge, dass die RAW-Makrophagen von Passage zu Passage immer weniger adhären wurden. Daraufhin erfolgte das Ablösen der Zellen nicht mehr mechanisch, sondern enzymatisch mittels 0.05%igem Trypsin. Die Reaktion des Trypsins wurde nach 3 min durch Zugabe von RPMI 1640-Medium abgestoppt. Trypsinierte Zellen wurden bei 200 rpm und 37 °C für 5 min zentrifugiert, anschließend in einem kleineren Volumen von frischem RPMI 1640-Medium resuspendiert und dann in Zellkulturgefäße ausgesät.

### 2.3.2 Infektion

Eine geringe Menge der verschiedenen Yersinien-Stämme (einige Kolonien, gepickt von einer Agarplatte) wurde jeweils in 5 ml LB-Medium aufgenommen, mit dem entsprechenden Antibiotikum (siehe Tabelle 4) im Verhältnis 1:1000 versetzt und bei 27 °C über Nacht bei 180 rpm geschüttelt. Bei dieser Temperatur teilen sich die Bakterien, das Virulenzplasmid wird aber nicht aktiviert.

Die LB-Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen 1:20 mit LB-Medium verdünnt und bei 37 °C 1,5 h geschüttelt (120 rpm), wobei die Transkription der Yop-Gene induziert wird (Trülzsch et al. 2003). Es folgte die Zentrifugation (15 min bei 4 °C, 6.000 rpm) der Bakterien. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 2 ml PBS aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Bakterienlösung 1:10 (oder, falls notwendig, 1:100) mit PBS verdünnt und eine OD<sub>600nm</sub>-Messung durchgeführt. Die resuspendierte Bakterienlösung wurde anschließend durch Zugabe von PBS auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,36 eingestellt. Die Yersinien waren so in einer Form vorhanden, die geeignet ist, um Zellen zu infizieren. Es wurden zum einen HUVEC-Zellen infiziert, die zu einem konfluenten Rasen in einer 6-Well-Platte gewachsen waren, oder solche, die einen Zellrasen auf einem Deckglas gebildet hatten. Mit 100 µl der hergestellte Bakteriensuspension wurden die Endothelzellen in der 6-Well-Platte infiziert; dies entspricht 10 Bakterien pro Zelle (Multiplicity of Infection (MOI) = 10). HUVEC-Zellen, die auf Deckgläsern in 12-Well-Platten zu einem Monolayer gewachsen waren, wurden mit 42 µl der Bakteriensuspension infiziert, auch das entspricht einer MOI von 10. Um eine gleichzeitige Infektion aller Zellen zu gewährleisten, wurden die Bakterien für 2 min bei 1.000 rpm auf die HUVEC-Zellen zentrifugiert. Anschließend folgte die Inkubation der Endothelzellen für 2 h bei 37 °C. Danach wurde das Medium abgesaugt und durch Gentamicin-haltiges Medium (ECGM) ersetzt, das die Bakterien abtötete.

### 2.3.3 Transfektion

Die Zell-Linen wurden mit den Reagenzien Amaxa oder FuGENE transfiziert.

**Amaxa:** Die Transfektion von Vektoren, die zu transient transfizierten RAW-Makrophagen führt, wurde zunächst mit Hilfe des Nucleofector-Kits V (Amaxa, Köln) durchgeführt. In eukaryotische Zellen erfolgt der Transfer von Vektoren durch eine Kombination aus Elektroporation und Lipofektion. Es wurde entsprechend der Angaben des

Herstellers gearbeitet. Beim Amaxa-System wurden die RAW-Makrophagen mittels Trypsin von der Oberfläche abgelöst, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Anzahl der Zellen bestimmt, anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^6$  Zellen aufgenommen und dann bei 90 rpm und 37 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Nucleofector-Lösung V resuspendiert. Es folgte die Vermischung der Zellsuspension mit einer für die verschiedenen Yops und den Leervektor unterschiedlichen Menge an Vektor-DNA. Das Gemisch aus Nucleofector-Lösung V, Zellen und DNA wurde in eine Amaxa-Küvette gegeben. Nach Nukleofektion erfolgte die Überführung der 100 µl transfizierte Zellsuspension in eines der 6 Kompartimente einer 6-Well-Platte, in der sich bereits 1 ml RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin und FBS befand. Nach 24 h erfolgte die Bestimmung der Transfektions-Effizienz. Die Transfektion mit Hilfe des Amaxa-Systems führte bei RAW-Makrophagen zu relativ hohen Transfektionsraten. Allerdings starben bei dieser Methode ca. 50% der eingesetzten Zellen, vermutlich auf Grund der Zentrifugation und der toxischen Nucleofector-Lösung.

**FuGENE:** Die zu transfizierenden RAW-Makrophagen wurden 24 h vor Transfektion in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro ml in 6-Well-Platten ausgesät, es wurden 2 ml der Zellsuspension in ein Well gegeben. Anschließend wurde mit FuGENE (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert und entsprechend der Angaben des Herstellers gearbeitet.

Im Vergleich zu Amaxa wurden mit dem FuGENE-Transfektions-Reagens bessere Ergebnisse erzielt. 30 min vor Transfektion wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt. Die Vektor-DNA wurde mit 100 µl serumfreien Medium vermischt und anschließend mit dem Transfektions-Reagens versetzt. Die Menge an eingesetzter DNA (1–4 µg) pro Transfektion variierte von Versuch zu Versuch. Nach 15 min wurde die Suspension tropfenweise auf die sich in den 6-Well-Platte befindlichen Zellen gegeben. 3 h nach Transfektion erfolgte die Zugabe von serumhaltigem Medium. Mit FuGENE wurden hohe Transfektionsraten erzielt, wobei nur wenige Zellen abstarben. 24 h nach Transfektion wurden die RAW-Makrophagen erneut mittels Trypsin von der Oberfläche gelöst, dann wurden die Zellen sanft zentrifugiert und in RPMI 1640-Medium aufgenommen. Diese Yop-haltigen oder mit dem Leervektor transfizierten Zellen wurden anschließend in die Mikroslices des Chemotaxis-Assays überführt.

## 2.4 Migrations-Assay

### 2.4.1 Wundreparaturmodell

Verwundete, einschichtige Zellrasen reagieren auf die Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte und auf die erhöhte Konzentration von Wachstumsfaktoren an den Wundrändern mit einem Wundverschluss durch Zellproliferation und Migration (Wong und Gotlieb 1988; Coomber und Gotlieb 1990; Zahm et al. 1997). Dieser Prozess reflektiert das Verhalten individueller Zellen wie auch die Eigenschaften des Zellrasens. Um einen „Scratch-Assay“ („wound healing assay“) durchführen zu können, wird die „Wunde“ für gewöhnlich mit einer Pipettenspitze oder einer Nadel herbeigeführt und der Assay auf Deckgläsern oder in Multiwell-Platten durchgeführt. Der Zellrasen erholt sich wieder und verschließt die Wunde in einem Prozess, der 3 – 24 Stunden dauert. Die „Wunde“ verschließt sich auf eine stereotype Art: Zellen polarisieren in Richtung der Wunde, initiieren Vorwölbungen, wandern und verschließen schließlich den Defekt. Die Progression dieser Ereignisse kann (i) durch fixierte Proben zu einem Zeitpunkt oder (ii) durch „Time-lapse“-Mikroskopie kontinuierlich beobachtet werden.

In dieser Arbeit erfolgte die Durchführung des „Scratch-Assay“ mit HUVEC-Zellen. Dafür wurden die Endothelzellen in 6-Well-Platten überführt, und zwar  $10^5$  Zellen pro Well entsprechend  $10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Die 6-Well-Platten lagen mit 2% Gelatine beschichtet vor. Nach 4 Tagen sind die Zellen in den 6-Well-Platten zu einem konfluenten Rasen gewachsen. Migrationsversuche wurden zum einen mit unbehandelten HUVEC-Zellen durchgeführt, zum anderen mit HUVEC-Zellen, die mit Bakterien infiziert wurden. Kurz vor Bakterien-Infektion wurde das antibiotikumhaltige Medium durch frisches Antibiotikum-freies ECGM (2 ml) ersetzt. Nach einer Infektionszeit von 2 h wurde dieser Prozess wieder rückgängig gemacht, und die Zellen erhielten erneut antibiotikumhaltiges Medium, damit die Infektion beendet wird. In den mit Bakterien infizierten HUVEC-Zellrasen wurde mit einer 10 µl Pipettenspitze ein circa 300 µm breiter Streifen gezogen (Entschladen et al. 2005), auf dem dann keine HUVEC-Zellen mehr gebunden waren. Der Zellrasen erhielt so eine wohl-definierte „Wunde“, die von den Zellen am Wundrand wieder geschlossen wird. Dieser Prozess des Zuwachsens wurde quantitativ verfolgt und so die Migration der Endothelzellen in die Wunde gemessen. Bei dem Zuwachsen der Wunde tritt neben der Migration auch Zellteilung auf.

Migrations-Versuch wurden mit unbehandelten HUVEC-Zelle (PBS-Kontrolle) oder mit HUVEC-Zellen, die mit Wildtyp-Yersinien oder Yersinien Mutanten infiziert wurden, durchgeführt. Die Anzahl der durchgeführten Versuche sowie die Anzahl der erstellten Migrationspfade sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Stämme	Anzahl der erstellten Trajektorien	Anzahl der Versuche
PBS	120	3
WA-C	80	2
WA-CpTTSS	80	2
Y.e. 5/15	80	2
WA-CpTTSSYopO	120	3
WA-CpTTSSYopM	120	3
WA-CpTTSSYopP	120	3
WA-CpTTSSYopT	120	3
WA-CpTTSSYopT C139A	120	3
WA-CpTTSSYopE O :9	80	2
WA-CpTTSSYopE O :8	80	2
WA-CpTTSSYopE R144A	80	2
WA-CpTTSSYopE $\Delta$ MLD	40	1
WA-CpTTSSYopH	120	3
WA-314( $\Delta$ YopH)	120	3
WA-314	120	3

**Tabelle 15:** Anzahl der durchgeführten Versuche und der erstellten Trajektorien für die unbehandelten HUVEC-Zellen sowie für die mit den aufgelisteten Yersinien-Stämmen infizierten Zellen.

### Vorgehensweise der Analyse der Gesamt-Migrations-Strecke der HUVEC-Zellen

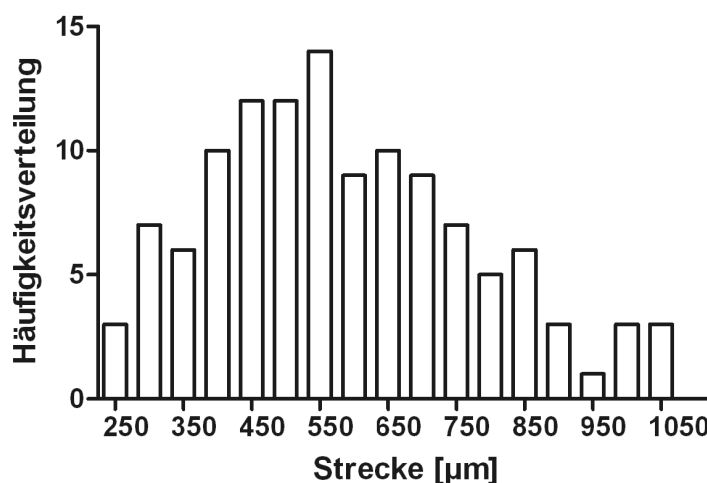
Über die Gesamtzeitdauer des Versuches von 15 h wurde alle 5 min ein Bild erstellt, auf dem die einzelnen, ausgewählten Zellen immer wieder neu identifiziert und ihre xy-Position bestimmt wurden. Die Koordinaten wurden in einer Excel-Tabelle gespeichert und aus diesen Daten die Gesamt-Trajektorie berechnet. Das Maß der Strecke ist „zurückgelegte Pixel pro 5 min“, das dann über die Mikroskop-Parameter in die Strecke in „ $\mu\text{m}/5\text{min}$ “ umgerechnet wird. In einer ersten Analyse wird nur die Gesamtstrecke vom Ursprungsort bei 0 h bis zum Endpunkt nach 15 h betrachtet.

Da keine Kenntnisse über die Statistik der Messwert-Verteilung bestehen, werden die gemessenen Daten in Kapitel 3.4.1 als Median-Wert angegeben. Dies ist der Wert, für den die Hälfte aller Messwerte kleiner und ebenso auch die Hälfte aller Messwerte größer sind. Die

Verteilungsbreite der Messwerte wird hier zum einen durch denjenigen Messwert, für den 25% der Messwerte kleiner sind (25% Perzentile) und zum anderen durch den Messwert, für den nur 25% größer sind (75% Perzentile), angegeben. Mit dieser Darstellung der Daten wird die Art der Messwert-Verteilung veranschaulicht. Der Median ist stabil gegenüber extrem kleinen oder großen Messwerten („Ausreißern“). Daher ist die Darstellung des Medians und der Perzentilen in einem „Boxplot“ eine gute Methode, um einen Überblick über die Verteilung der Messwerte nach 15 h zu erhalten.

### Vorgehensweise der Analyse der zeitlichen Veränderung des Migrations-Verhaltens der HUVEC-Zellen

Wir vermuteten, dass die gemessenen Daten annähernd normalverteilt sind (siehe „Boxplots“). Eine Normal-Verteilung ist in biologischen Systemen aber nicht immer gegeben. Deshalb wurde der Datensatz zunächst über ein linear gemischtes Modell aufgearbeitet, welches zur Analyse von „longitudinalen“ (also über einen Zeitverlauf erhobene) Daten geeignet ist. Die Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Kersten vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass die zu untersuchenden Daten-Gruppen sich über die Zeit gleichsinnig und linear verhalten. Die vorliegenden Daten in Kapitel 3.2.3 werden deshalb mit Hilfe des Mittelwertes und der Standardabweichung angegeben. Für einen Kontroll-Datensatz, gemessen über 15 h, ergab sich folgende Häufigkeitsverteilung (siehe Abbildung 5), die exemplarisch veranschaulicht, dass es sich in der Tat um annähernd normalverteilte Daten handelt.



**Abbildung 5:** Migrationsstrecke der nicht-infizierten HUVEC-Zellen nach 15 h.

Aufgetragen ist die Häufigkeit der gemessenen Werte innerhalb von 18 Bereichen zwischen Minimum und Maximum der Messwerte. Die Verteilung der HUVEC-Zellen (PBS-Kontrolle) nach 15 h entspricht annähernd einer Normalverteilung.

### Vorgehensweise der Analyse der Migrations-Richtung der HUVEC-Zellen

Durch das Verletzen des Zellrasens entsteht ein zellfreier Streifen, an dessen Rand HUVEC-Zellen liegen, die zum Streifen hin keinen Zell-Zellkontakt haben und deshalb in diese Richtung wandern können. Die Migrations-Richtung der Endothelzellen wurde mit der Software „Chemotaxis and Migration Tool Version 1.01“ (ImageJ) bestimmt. Dabei wurden die HUVEC-Zellen gezählt, die in einem 10°-Sektorfeld während der Laufzeit auftauchen (siehe 3.2.4). Für alle 10°-Sektorfelder wurde diese Gesamtzahl in einer Rosette dargestellt, deren Sektorfeld-Länge die aufsummierte Zellzahl angibt. Die Fläche der einzelnen Sektoren hat somit keine Aussagekraft sondern nur die dazugehörige „Höhe“, die den aufsummierten Zellen entspricht. Für die 18 10°-Sektorfelder, die dem zellfreien Rasen anliegen (jeweils 18 am linken und 18 am rechten Rand der „Wunde“), wird die Anzahl der Zellen, die in diesem Areal während der 15 h vorkommen, gezählt und in Bezug auf alle HUVEC-Zellen analysiert. Außerdem wurde die Anzahl der HUVEC-Zellen, die sich in den Sektorfeldern  $90^{\circ} \pm 30^{\circ}$  für die linke Hälfte und  $270^{\circ} \pm 30^{\circ}$  für die rechte Hälfte befinden, berechnet und in Bezug auf alle gezählten HUVEC-Zellen betrachtet.

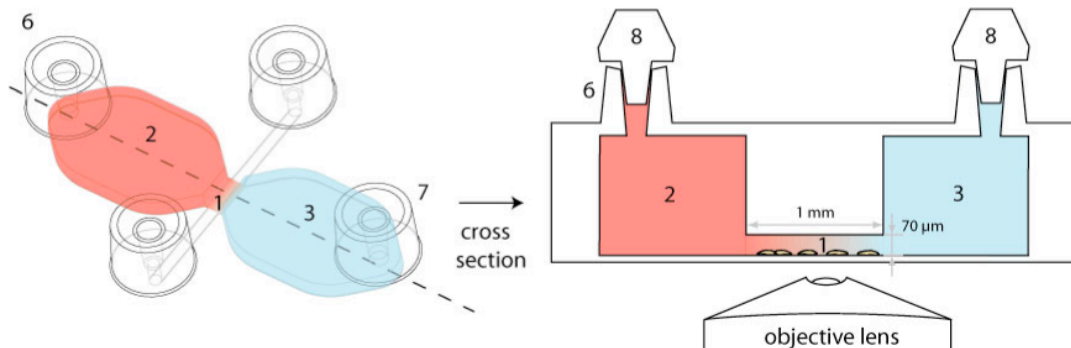
#### **2.4.2 Chemotaxis-Assay**

Chemotaxis ist definiert als die gerichtete Bewegung von Zellen entlang eines chemischen Gradienten. Die Chemotaxis ist streng von der Chemokinese, der ungerichteten Bewegung, zu trennen. Zellen z. B. des Immunsystems nehmen über spezifische Rezeptoren das von Bakterien häufig freigesetzte Formyl-Methionylleucylphenylalanin (fMLP) wahr. Die Zellen folgen dann dem Gradienten des fMLP und sammeln sich am Ort der Infektion. Neutrophile Granulozyten können durch sich bildende Lücken in Blutkapillaren in den Extravasalraum wandern (Diapedese). Das wichtigste Chemokin, das diesen Vorgang zu regulieren scheint, ist MCP-1. Viele weitere Chemotaxis auslösende Substanzen sind bekannt. Mit Hilfe von fMLP oder MCP-1 sollte herausgefunden werden, ob Effektorproteine der Yersinien die gerichtete Migration von z. B. dendritischen Zellen inhibieren können. Dazu sollte ein Chemotaxis-Assay aufgebaut werden.

Die Migration der HUVECs und RAW-Makrophagen wurde daraufhin mit der  $\mu$ -Slide Chemotaxis (ibidi, München; Application Note 14, [www.ibidi.de](http://www.ibidi.de)) untersucht. Diese Kammern sind ein Hilfsmittel, um adhärente, migrierende Zellen über lange Zeiträume zu beobachten. Es sind drei Versuchs-Kammern auf einem Objektträger vorhanden. Die Ver-



suchskammern bestehen aus zwei Reservoiren, die über das Beobachtungsfeld miteinander verbunden sind.



**Abbildung 6:** Chemotaxiskammer

Links: µ-Slid für Chemotaxis, eine Versuchs-Kammer von oben. Rechts: µ-Slid für Chemotaxis im Querschnitt. 1 = Der Beobachtungsraum, indem die Zellen ausgesät werden, er ist 1 mm breit und 70 µm hoch. 2 = Reservoir, welches den Lockstoff enthält. 3 = Das zweite Reservoir. 6 und 7 = Füllstutzen, über die die Kammer befüllt wird. 8 = Verschluss, der der Verdunstung des Mediums vorbeugt.

Innerhalb von 4 h baut sich in dem System ein linearer Konzentrationsgradient auf, dieser Gradient bleibt für mindestens 48 h stabil. Dabei ist die Konzentration des Lockstoffs, der die Zellen im Beobachtungsfeld erreicht, deutlich geringer als die ursprünglich eingesetzte Konzentration des Chemotaxis auslösenden Agens.

Die Konzentration des Lockstoffs, die letztendlich die Zellen erreicht, wird über die folgende Formel berechnet:

$$C_{100} = \frac{18\mu\text{l} * C_{\text{applied}}}{40\mu\text{l}}$$

$C_{100}$  = Konzentration des Lockstoffs in dem Beobachtungsfeld  
 $C_{\text{applied}}$  = Ursprungskonzentration des Lockstoffs

**Abbildung 7:** Formel zur Berechnung der Lockstoffkonzentration, die die Zellen im Beobachtungsraum erreicht.

Um die Migration der HUVEC-Zellen zu untersuchen, wurden µ-Slide Chemotaxis-Kammern benutzt, die mit Collagen IV (ibidi, München) beschichtet waren. Bevor die Chemotaxis-Kammern befüllt wurden, mussten diejenigen Einfüllstutzen verschlossen werden, durch die später die Kammern mit Medium und Lockstoffen gefüllt wurden. Für die Chemotaxis-Versuche wurden die HUVEC-Zellen nach Trypsinierung in Basalmedium aufgenommen und auf eine Konzentration von  $6 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. 6 µl der HU-

VEC-Zellsuspension wurden mit einer 200 µl Pipettenspitze (Greiner, Heidelberg) auf den entsprechenden Einfüllstutzen gegeben; die Zellsuspension wurde dann über den gegenüberliegenden Einfüllstutzen mit der gleichen Pipettenspitze in den Beobachtungsraum gezogen. Es musste besonders darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen in das System gezogen werden. Falls Luftblasen im Bereich des Einfüllstutzens waren, wurden diese mit einer Injektionsnadel entfernt. Anschließend wurden die Slides für 2 h zurück in den Inkubator gestellt. Nach diesen 2 h, in denen die Zellen im Slide adhärent wurden, wurde über denjenigen Einfüllstutzen, auf den die Zellsuspension gegeben wurde, mit einer 200 µl Pipettenspitze 40 µl ECBM in eine der Kammern gegeben. Über die Kammer, die sich gefüllt hat, wurden weitere 40 µl ECBM in die Kammer pipetiert, die noch leer war. Es wurden 18 µl Lockstoff beliebig auf den oberen oder unteren Füllstutzen gegeben und 18 µl ECBM von der gegenüberliegenden Seite herausgezogen, so dass sich ein Konzentrationsgradient im System aufbauen konnte. Als Lockstoff wurden 18 µl ECGM plus FBS (Verhältnis 1:1) eingesetzt.

Zur Beobachtung der RAW-Makrophagen wurden hydrophobe, unbeschichtete µ-Slides für die Chemotaxis eingesetzt, die dann im Laufe der durchgeführten Versuche selbst beschichtet wurden. Die Slides wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 100 µg/ml Fibronectin (Rinderplasma, Calbiochem) beschichtet, welches mit *E-coli* LPS 0,1 µg/ml versetzt wurde.

Um das Fibronectin auf die richtige Konzentration zu verdünnen, wurde es mit PBS versetzt. 80 µl der hergestellten Beschichtungsflüssigkeit wurden über den unteren Füllstutzen in die Chemotaxis-Kammer gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurde die Kammer mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Die Entfernung der Flüssigkeiten aus der Migrationskammer erfolgte durch Absaugung mittels der Zellkultur-Vorrichtung.

Zu Untersuchung der Migration der RAW-Makrophagen wurden die selbst beschichteten Slides verwendet. Auch hier wurden zunächst diejenigen Einfüllstutzen verschlossen, durch die später die Reservoirs mit Medium und Lockstoffen gefüllt wurden. Nach Ablösung der RAW-Makrophagen aus dem Zellkulturgefäß wurden diese in einem kleineren Volumen von frischem RPMI 1640-Medium resuspendiert, so dass eine Konzentration von circa  $6 \cdot 10^6$  Zellen pro ml entstand. 6 µl dieser Zellsuspension wurden im Folgenden mit einer 200 µl Pipettenspitze (Greiner, Heidelberg) für den Migrations-Assay in das Analyse-System eingebracht, damit sie dort adhärent werden konnten. Anschließend wurden die Slides für 2 h zurück in den Inkubator gestellt. Dann wurde über denjenigen Einfüllstutzen,

auf den die Zellsuspension gegeben wurde, 40  $\mu$ l RPMI 1640 in eine der Kammern gegeben. Die noch leere Kammer wurde über die mit Medium befüllte Kammer mit weiteren 40  $\mu$ l RPMI 1640 beladen. Es wurden 18  $\mu$ l fMLP oder rekombinantes murines Monocyte Chemotactic Protein 1 („rm MCP-1“) als Lockstoff verwendet und beliebig auf den oberen oder unteren Füllstutzen gegeben. 18  $\mu$ l RPMI 1640 wurde von der gegenüberliegenden Seite aus dem System herausgezogen, so dass das fMLP oder rm MCP-1 in das Reservoir gezogen wurde.

fMLP wurde in einer Ausgangskonzentration von 100  $\mu$ M eingesetzt; die Konzentration, die das Beobachtungsfeld erreichte, betrug 45  $\mu$ M. Rm MCP-1 wurde in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml auf den Einfüllstutzen pipettiert, so dass nach der oben genannten Formel 0,45  $\mu$ g/ml rm MCP-1 die Zellen im Beobachtungsfeld tatsächlich erreichten.

## 2.5 Immunfluoreszenztechniken

### Fixieren der mit Yop-Proteinen transfizierten HUVEC-Zellen

Die HUVEC-Zellen wurden mit Vektoren transfiziert, die unterschiedliche Gene von pEGFP-fusionierten Yop-Proteinen enthielten.

Nach Transfektion erfolgte die Aussaat von 50.000 HUVEC-Zellen auf einem mit Gelatine (0,2%) beschichteten Deckglas. Die Deckgläser befanden sich in 6-Well-Platten. Eine Stunde nach Zellzugabe wurden 2 ml ECGM in die 6-Well-Platten gegeben, da zu diesem Zeitpunkt ein Großteil der transfizierten Zellen adhärent ist. Nach 24 h wurden die Zellen auf den Deckgläsern fixiert. Zunächst erfolgte die Absaugung des Mediums, anschließend das dreimalige Waschen mit PBS, gefolgt von der Zugabe von 3,7%igem Formaldehyd (in PBS). Nach einer Inkubationszeit von 8 min in Formaldehyd wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen, die Deckgläser wurden anschließend getrocknet und mit Mowiol (Calbiochem, Darmstadt), versetzt mit 0,18% p-Phenylendiamin (Sigma-Aldrich, München), auf einen Objektträger gebracht. Unter dem Mikroskop wurden Zellen mit niedriger Transfektionsrate für die Beobachtung ausgewählt.

### Färbung des Aktinzytoskeletts

Sowohl für die Färbung des Aktin-Zytoskelettes als auch für die Innen- und Außenfärbung von Bakterien wurden HUVEC-Zellen verwendet. Es wurden 20.000 Endothelzellen in 80 µl ECGM auf mit 0.2%iger Gelatine beschichteten Deckgläsern ausgesät. Die Deckgläser befanden sich in 12-Well-Platten. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank wurde in jede Vertiefung der 12-Well-Platte 1 ml Antibiotikum-haltiges ECGM gegeben. Die HUVEC-Zellen waren nach 3 Tagen zu einem einschichtigen Zellrasen gewachsen. Um bakterielle Effekte auf das Aktin-Zytoskelett untersuchen und die Anzahl der extrazellulären und intrazellulären Bakterien ermitteln zu können, wurden die Zellen für 2 h mit Wildtyp-Yersinien oder deren Mutanten infiziert; als Kontrolle wurden HUVEC-Zellen unbehandelt belassen. Nach dieser 2stündigen Infektionszeit wurde Antibiotikum in das Medium gegeben, um die Bakterien abzutöten. Anschließend wurden Färbungen vorgenommen, um das Aktin oder die Bakterien mikroskopisch inspizieren zu können.

Da Aktin-Filamente (F-Aktin) bei der Bewegung von Zellen eine wichtige Rolle spielen, sollte das F-Aktin mit Phalloidin sichtbar gemacht werden. Phalloidin interkaliert in Aktin-Filamente und macht, wenn mit Farbstoff Alexa-488 gekoppelt, das F-Aktin sichtbar. Da der Einfluss bakterieller Proteine auf das Aktin unter Migrationsbedingungen untersucht werden sollte, wurde der HUVEC-Zellrasen mit einer Pipettenspitze (siehe oben) verletzt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min oder 2 h zurück in den Brutschrank gestellt, so dass die HUVEC-Zellen in das zellfreie Areal wandern konnten. Nach diesen 10 min bzw. 2 h erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen. Zunächst wurde das ECGM abgesaugt, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wurde, um die Zellen zu fixieren, 3,7%iges Formaldehyd (in PBS) für 8 min auf die Zellen gegeben. Es folgte das Überführen der Deckgläser in 12-Well-Platten, in denen sich Triton-X-100 (0,1%) befand. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die fixierten Zellen erneut dreimalig für je 5min mit PBS gewaschen. Für 30 min schloss sich die Behandlung der Zellen mit Phalloidin, welches 1:200 mit PBS (siehe Tabelle 10) verdünnt war, an. Wieder wurde im Anschluss dreimal mit PBS für je 5 min gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläser mit Mowiol, welches mit 0,18% p-Phenylendiamin (Sigma-Aldrich, München) versetzt ist, eingebettet und mit Nagellack versiegelt. Unter dem Mikroskop wurde das Aktinzytoskelett derjenigen Zellen, die zum zellfreien Bereich (der "Wunde") hin liegen, näher untersucht.

### Innen- und Außenfärbung von Yersinien

Um bestimmen zu können, inwieweit die translozierten Proteine der Yersinien einen Phagozytose-Schutz vermitteln, wurden HUVEC-Zellen mit unterschiedlichen Yersinien-Stämmen infiziert, und anschließend die Yersinien innerhalb und außerhalb der Zellen getrennt voneinander angefärbt. Wie bereits beschrieben, wurden die HUVEC-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und, nachdem sich ein konfluenten Zell-Rasen gebildet hatte, mit Yersinien-Stämmen infiziert (siehe Kapitel 2.3.2). Nach einer Infektionszeit von 2 h wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden anschließend in eine 12-Well-Platte, in der sich 3,7%iges Paraformalin in PBS befindet, für 10 min fixiert. Nach Fixation wurde zweimal mit 1% BSA-PBS für je 5 min gewaschen und im Anschluß für 10 min mit 1% BSA-PBS geblockt. Die Deckgläser wurden für 45 min auf 25 µl Pufferlösung mit dem ersten Antikörper (*Yersinia enterocolitica* O:8 (1:50 mit 1% BSA-PBS verdünnt) oder *Yersinia enterocolitica* O:9 (1:25 mit 1% BSA-PBS verdünnt)) gelegt. Nach dieser Inkubationszeit wird dreimal mit 1% BSA-PBS für je 5 min gewaschen. Die Deckgläser wurden anschließend für 30 min mit 25 µl Pufferlösung mit dem zweiten Antikörper (gelabelt mit Alexa-568 (Molecular Probes, USA) (1:100 mit 1% BSA-PBS verdünnt)) inkubiert. Zur Permeabilisierung der Zellen fand 0,1% Triton-X-100 für 5 min Einsatz, um nun die intrazellulären Bakterien mit anfärben zu können. Es folgte das erneute dreimalige Waschen mit 1% BSA-PBS für je 5 min. Die Deckgläser wurden wiederum für 45 min mit 25 µl Pufferlösung mit dem ersten Antikörpers (*Yersinia enterocolitica* O:8 (1:50 mit 1% BSA-PBS verdünnt) oder O:9 (1:25 mit 1% BSA-PBS verdünnt)) inkubiert. Es schloss sich das dreimalige Waschen mit 1% BSA-PBS für je 5 min an. Die Deckgläser wurden nun für 30 min mit 25 µl mit Pufferlösung des zweiten Antikörpers (markiert mit Alexa-488 (Molecular Probes, USA) (1:200 mit 1% BSA-PBS verdünnt)) inkubiert. Nach Trocknen der Deckgläser wurden diese mit Mowiol, versetzt mit 0,18% p-Phenylendiamin (Sigma-Aldrich, München), eingebettet und auf einem Objektträger mit Nagellack versiegelt (Ilchmann et al. 2002). Unter dem Mikroskop wurde die Gesamtmenge der gefärbten (grünen und roten) Bakterien gezählt und getrennt davon die Anzahl der intrazellulären (grünen) Bakterien, so dass die Anzahl der extrazellulären Yersinien errechnet werden konnte.

### Anfärbung der apoptotischen Zellen

Denkbar ist, dass ein erhöhter Anteil an apoptotischen Zellen einen Effekt von bakteriellen Proteinen auf die Migration vortäuscht, da eine Reduktion in der zurückgelegten Migrations-Strecke dadurch bedingt sein kann, dass die Zellen sterben. Um diesen Effekt auszuschließen, wurden erneut HUVEC-Zellen mit Yersinien-Stämmen infiziert. Die Endothelzellen wurden mit Bakterien-Stämmen infiziert, von denen vermutet werden konnte, dass sie bei diesen Zellen Apoptose auslösen. Deshalb wurden die HUVEC-Zellen für 2 h mit verschiedenen Yersinien-Stämmen infiziert (siehe Kapitel 2.3.2). Die Infektion wurde durch die Zugabe von Antibiotikum-haltigem Medium gestoppt und die HUVEC-Zellen anschließend weitere 3 h im Brutschrank belassen. Als Positiv-Kontrolle dienten HUVEC-Zellen, die für 5 h mit 5  $\mu$ M Staurosoprin (Sigma-Aldrich, München) infiziert wurden. Nach dieser Inkubationszeit schloss sich das dreimalige Waschen der Deckgläser, auf denen sich die Zellen befanden, mit PBS für je 5 min an. Um apoptotische Zellen anzufärben, wurden die HUVEC-Zellen für 15 min mit einer Annexin V-haltigen Lösung (20  $\mu$ l Annexin-V-Fluos Stammlösung (Boehringer Mannheim, Mannheim)) in 1000  $\mu$ l HEPES-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 20  $\mu$ l Propidiumiodid) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend die HUVEC-Zellen auf den Deckgläsern mit 3,7% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nachdem die Deckgläser getrocknet waren, wurden sie wie oben beschrieben eingedeckelt und anschließend mikroskopiert.

### 3 Ergebnisse

Um Infektionen auszulösen, müssen Bakterien die Abwehrmechanismen des Wirts möglichst weitgehend ausschalten oder umgehen. Ein zentraler erster Schritt des Immunsystems ist die Aufnahme der Bakterien in Makrophagen, die das Bakterium abbauen und seine Bausteine zur Antigen-Präsentierung nutzen. Dies ist ein wichtiger Schritt, damit das Immunsystem spezifische Antikörper herstellen kann, mit denen die Bakterien dann eliminiert werden können. Um im Wirt zumindest kurzfristig zu überleben und zu proliferieren, ist es eine äußerst erfolgversprechende Strategie, diese Aufnahme (Phagozytose) in Makrophagen zu verhindern. Eine zusätzliche Methode der Immunsuppression ist die Hemmung der Migration von Immunzellen, wie dendritischen Zellen (DC's), damit diese nicht zum nächstgelegenen lymphatischen Organ gelangen und dort das adaptive Immunsystem in Gang setzen.

Die hier untersuchten Yersinien verfolgen eine solche Doppel-Strategie. Dazu injizieren sie Proteine („Yops“) in die Zielzellen. Einige diese Effektorproteine werden für die Umorganisation des Aktin-Zytoskelettes der humanen Zellen durch Wildtyp-Yersinien verantwortlich gemacht (siehe Kapitel 1.1.3). Sowohl die Phagozytose als auch die Zellmigration beruhen auf der Funktion des Aktin-Zytoskeletts. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, inwieweit die Infektion mit Wildtyp-Yersinien oder Yersinien-Mutanten die Phagozytose verhindert und die Integren-abhängige Migration von humanen Endothelzellen (HUVEC) beeinflusst. Die Versuche wurden mit humanen Endothelzellen durchgeführt, vor dem Hintergrund, dass das Endothel zu einem relevanten Zielorgan für Yersinien gehört, vermutlich weil es für die Extravasation von Leukozyten in entzündliche Darmregionen verantwortlich ist (Denecker et al. 2002)

In den Yersinien befinden sich die Yop-Gene auf dem Virulenz-Plasmid. Sie werden in den Yersinien synthetisiert und, meist mit Hilfe von Chaperonen, derart gefaltet, dass sie durch das nadelförmige Translokations-System (Typ-III-Sekretions-Apparat) ausgeschleust werden können (siehe Einleitung). Das Translokations-System ist zu schmal, um globulär gefaltete Proteine hindurchzulassen. Deshalb wird angenommen, dass die Yops in Bakterien nur partiell gefaltet werden und ihre funktionelle Struktur erst in der Wirtszelle annehmen. Vermutlich ist die Translokation kein ausschließlich passiver Prozess; zumindest YopH ist über ein N-terminales Translokations-Signal aktiv an der Translokation be-

eteiligt (Blakck et al. 1998; Khandelwal et al. 2002; Viboud und Bliska 2005). Zur Funktions-Untersuchung der Yops ist es deshalb wichtig, dass die Yops im Bakterium synthetisiert und über den natürlichen Translokations-Apparat in die humanen Zellen injiziert werden, so dass die Yops in der Wirtszelle wie bei einer natürlichen Infektion sofort voll funktionsfähig vorliegen; nur diese Prozedur folgt dem natürlichen Verfahren. Werden stattdessen die Yops transfiziert, werden also die Gene (und nicht die Proteine) in die Wirtszelle eingeschleust, dort werden die Proteine dann über einen längeren Zeitraum synthetisiert und akkumulieren nur langsam. Bei diesem Vorgehen wird die Chaperon-beeinflusste Synthese im Bakterium als auch die Translokation umgangen. Bei Transfektion wäre es also notwendig zu beweisen, dass die transfizierten Proteine den translozierten hinsichtlich der Funktionskinetik und -dynamik gleich sind.

Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit die untersuchten Proteine über das bakterielle Translokations-System injiziert (für nähere Beschreibung des bakterielle Translokations-System siehe Diskussion 4.2).

In infizierten Zellen ist es schwierig, die korrekte Länge der einzelnen Yop-Proteine nachzuweisen, da die Protein-Konzentration besonders niedrig ist. Deshalb wurden die Zellen mit Vektoren transfiziert, die jeweils ein Yop-Gen enthalten. Dies führte zu höheren Expressions-Werten der Yop-Proteine, die dann nach Lyse der transfizierten Zellen durch Western-Blots gut nachweisbar waren. Durch die zusätzliche Expression eines GFP-Tags, fusioniert an jedes der Yop-Proteine, wurden nicht nur die erfolgreich transfizierten Zellen sichtbar und die Beurteilung ihres Phänotyps ermöglicht, sondern darüber hinaus konnten auch die GFP-Yop-Konstrukte durch Western-Blots mittels eines anti-GFP-Antikörpers nachgewiesen werden.

Mit allen, im Folgenden beschriebenen GFP-Yop-Konstrukten (siehe Tabelle 10 in Material und Methoden) wurden HUVEC-Zellen transfiziert und anschließend lysiert (siehe Kapitel 2.3.3). Der Zellextrakt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, und die Yop-Proteine mittels des anti-GFP-Antikörpers nachgewiesen (siehe Kapitel 2.2.3). Aus der Banden-Intensität wurde ihr Expressions-Level bestimmt. Außerdem wurden für die Yops über die Position der Banden im Gel die Expression in voller Proteinelänge (im richtigen Molekulargewicht) verifiziert. Darüber hinaus wurden die Phänotypen der infizierten mit denen der transfizierten Zellen verglichen. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden.



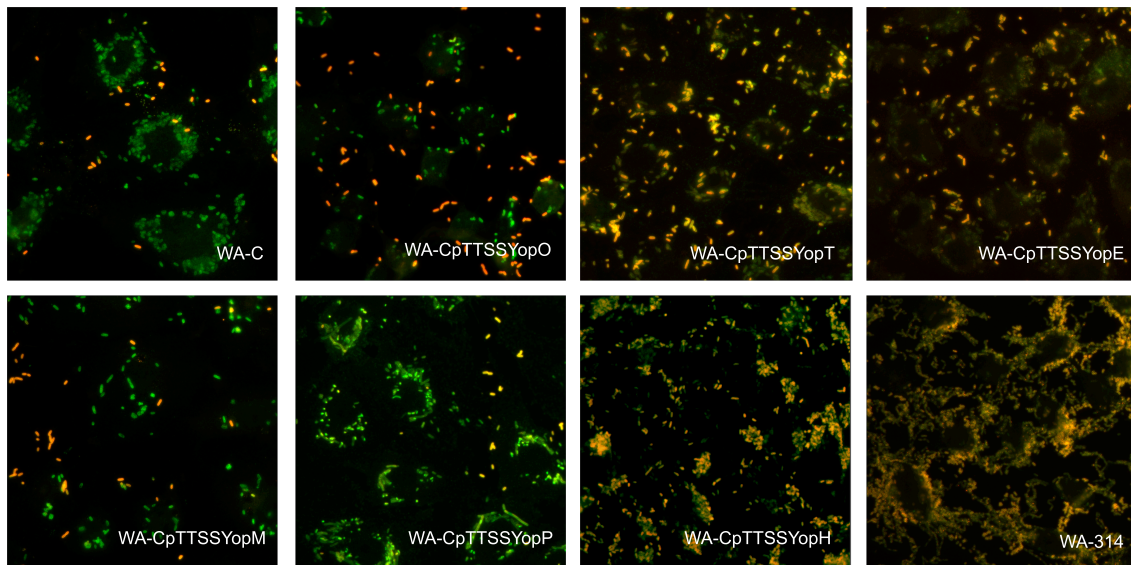
### 3.1 Phagozytose

Damit sich Yersinien extrazellulär im Wirt vermehren können, ist es für sie essentiell, ihre eigene Phagozytose zu inhibieren. Der antiphagozytäre Effekt der Yops wurde bereits mit Hilfe von anderen Yersinien-Mutanten durch zahlreiche Publikationen gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Phagozytose erneut untersucht, um zusätzlich mittels eines funktionalen Tests die Eigenschaften der Monosekretions-Mutanten (Trülsch et al. 2003), die jeweils nur eines der 6 Effektorproteine (Yops) translozieren, zu bestimmen.

Um zu überprüfen, inwieweit der Wildtyp und in welchem Ausmaß einzelne Yops, die mit Hilfe der Monosekretions-Mutanten in die Yersinien gelangen, die Phagozytose der Yersinien verhindern können, wurden HUVEC-Zellen auf Deckgläsern für drei Tage kultiviert und dann für 2 h mit den Wildtyp-Yersinien sowie den Monosekretions-Mutanten infiziert. Zunächst wurden die Bakterien, die nicht aufgenommen wurden, mit TRITC rot markiert; anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und alle, die intrazellulären sowie die extrazellulären Bakterien, mit Alexa 488 sichtbar gemacht (grün) Ilchmann et al. (2002). In der anschließenden Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung erschienen die phagozytierten Bakterien grün und die extrazellulären Bakterien durch Überlagerung des grünen und roten Farbstoffs gelb. Es wurden je Stamm 8 - 9 Gesichtsfelder (in 40facher Vergrößerung) mit insgesamt  $200 \pm 40$  Zellen pro Stamm ausgezählt (siehe Abbildung 8). Die Wildtyp Yersinien lagerten sich zu Konglomeraten zusammen, sodass es kaum möglich war, die extrazellulär vorliegenden Bakterien zu zählen. Die wenigen, intrazellulären Wildtyp-Yersinien ließen sich hingegen eindeutig quantitativ bestimmen.

Die Auswertung ergab, dass ca. 95% der Bakterien, die über kein Virulenzplasmid pVY verfügen (WA-C), phagozytiert wurden (siehe Abbildung 8). Im Mittel wurden 90% der Bakterien, die die Yop-Proteine nicht sekretieren können (Yersinien mit nichtfunktionellem, mutierten Typ-III-Sekretionssystem, Negativ-Kontrolle, Y.e.5/15), von den HUVEC-Zellen aufgenommen (siehe Abbildung 9). Dagegen konnten HUVEC-Zellen, die mit Wildtyp-Yersinien (WA-314) mit intaktem Virulenzplasmid infiziert wurden, kaum noch Yersinien phagozytieren: nur ca. 2% der Wild-Yersinien wurden internalisiert.

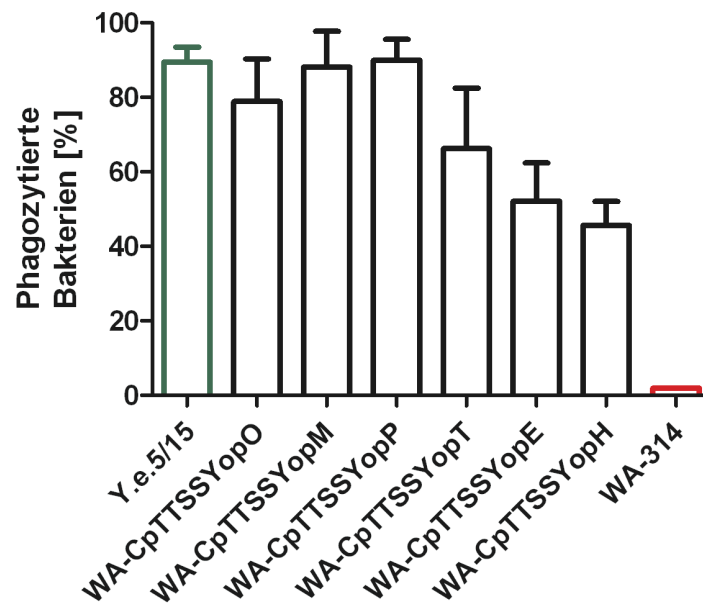
Yersinien-Mutanten, die nur YopO, YopM oder YopP translozieren, vermittelten nur einen geringen Phagozytoseschutz (WA-CpTTSSYopO: 79% der Bakterien werden aufgenommen; WA-CpTTSSYopM: 88%; WA-CpTTSSYopP: 90%; für eine genauere Beschreibung der Mutanten siehe Kapitel 3.2.1).



**Abbildung 8:** Innen- /Außenfärbung von Yersinien zur Darstellung der antiphagozytären Wirkung von Yops. HUV-EC-Zellen wurden mit einem Kontroll-Stamm (WA-C), dem Wildtyp (WA-314) und den gekennzeichneten Monosekretionsmutanten infiziert. Anfärbt sind die intrazellulären (grünen) und extrazellulären (gelben) Yersinien.

WA-CpTTSSYopT (66%) und WA-CpTTSSYopE (52%) trugen hingegen erkennbar zu einem Phagozytose-Schutz bei. Im Einklang damit fanden Viboud et al. (2006) ebenfalls einen stärkeren Phagozytose-Schutz für YopE im Vergleich zu YopT. Den deutlichsten Effekt auf die Reduktion der Phagozytose übte jedoch die Bakterien-Mutante aus, die nur YopH exprimiert: WA-CpTTSSYopH Stämme bewirkten, dass nur 46% der Bakterien aufgenommen wurden.

Das Adhäsins YadA, über welches der Kontroll-Stamm Y.e.5/15 und alle anderen hier verwendeten Mutanten verfügt (wobei dieser Stamm aber keine Yops sezernieren kann), vermittelte nur einen minimalen Phagozytoseschutz. Ein zusätzlicher Phagozytose-Schutz wird offensichtlich durch die Yops vermittelt. Die Daten zeigen aber, dass kein einzelnes Yop auch nur annähernd in der Lage ist, den Phagozytose-Schutz des Wildtyps zu generieren. Wenn die Yersinien über den Typ-III-Sekretions-Apparat keine weiteren Proteine/Substanzen in die Wirtszelle übertragen (Heesemann et al. 2006), würden in der Tat mehrere Yops gemeinsam (vermutlich YopT, -E und -H) den hohen Phagozytose-Schutz verursachen.



**Abbildung 9:** Unterschiedliche antiphagozytäre Wirkung von Yersinia-Mutanten

Endothelzellen wurden für 2h mit einem Kontroll-Stamm Y.e.5/15 (grün), Wildtyp-Yersinien WA-314 (rot) und Monosekretions -Mutanten, die jeweils nur ein Yop injizieren, infiziert. Die Anzahl der in die Zellen aufgenommenen Bakterien in Bezug auf die Gesamtzahl der zellgebundenen Bakterien wurde bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der phagozytierten Bakterien, angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Für jeden Wert wurden 8-9 Gesichtsfelder, d.h. ca. 200 Zellen in 2 unabhängigen Versuchen ausgezählt.

Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Monosekretions-Mutanten die erwarteten Effekte auf die Inhibition der Phagozytose aufweisen und ergänzen die bereits für WA-CpTTSSYopT beschriebene Funktionalität der Monosekretions-Mutanten (Trülzsch et al. 2003).

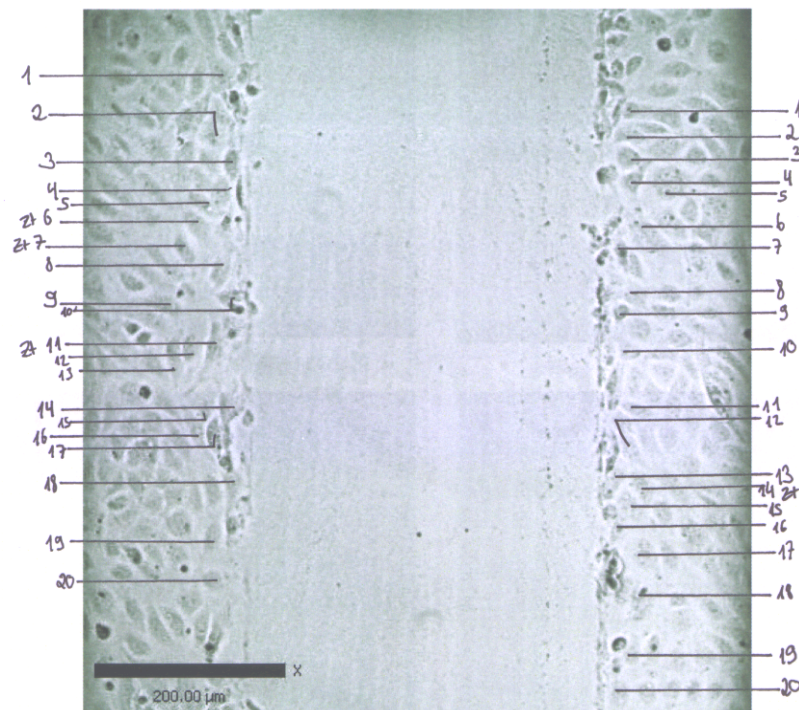
Die Ergebnisse zeigen zum anderen, dass die Yersinien die Phagozytose äußerst erfolgreich, aber nicht vollständig unterdrücken. Zum Überleben im Gewebe ist es für die Yersinien also wichtig, das Immunsystem zusätzlich zu schwächen. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob Wildtyp-Yersinien und Monosekretions-Mutanten die Migration der Zellen beeinflussen.

### 3.2 Migrationsmessung in einem Wundreparaturmodell

In einem einschichtigen, konfluenten HUVEC-Zellrasen („monolayer“), der sich in 6-Well-Platten befand, wurde mit einer Pipettenspitze ein zellfreier Streifen von 300 bis 400  $\mu\text{m}$  Breite erzeugt (Abbildung 10). In diese „Wunde“ wandern die HUVEC-Zellen hinein. Der Vorgang kann mikroskopisch untersucht und quantitativ ausgewertet werden. Infiziert wurden die Zellen mit Wildtyp-Yersinien und Monosekretions-Mutanten; als Kontrolle dienten uninfizierte HUVEC-Zellen.

Verschiedene Infektionsbedingungen mit einem Zell/Bakterien Verhältnis (MOI) von: 1:10, 1:30 und 1:100, die jeweils das Mengenverhältnis von Zellen zu Bakterien angeben, wurden analysiert. Morphologische Effekte wurden bereits bei einer MOI von 10 beobachtet. Deshalb wurde für die folgenden Versuche stets eine MOI von 10 verwendet.

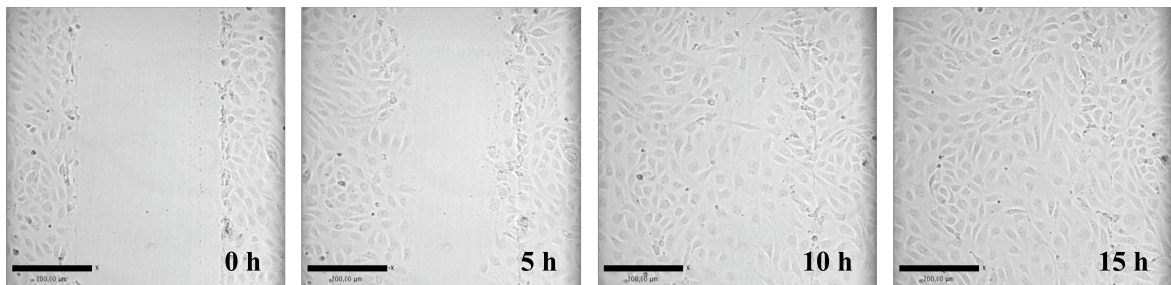
Die Auswertung des Versuches wurde auf folgende Weise durchgeführt (Abbildung 10). Am rechten und linken Rand des Bildes, nach der „Verletzung“, befindet sich ein dichter HUVEC-Zellrasen, in der Mitte getrennt durch den zellfreien Streifen. Vierzig verschiedene HUVEC-Zellen (20 je Seite), die sich direkt am „Wundrand“ befanden, wurden für die quantitative Analyse ausgewählt (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** HUVEC Zellrasen kurz nach der „Verletzung“, Markierung untersuchter Zellen am Rand des Zellrasens.

Die durchnummerierten Zellen am Rand des zellfreien Areals („Wunde“) wurden zur quantitativen Analyse ausgewählt. Der schwarze Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

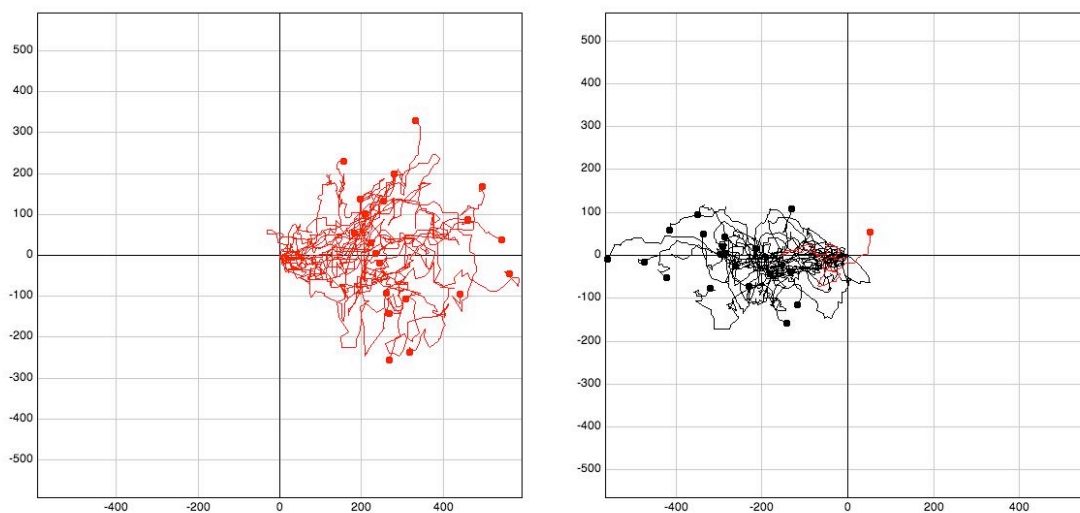
Innerhalb von 15 h wandern die Zellen am Wundrand in den zellfreien Streifen ein. Der Zeitverlauf der Zellwanderung ist in Abbildung 11 gezeigt.



**Abbildung 11:** Zeitverlauf der „Wundreparatur“ im HUVEC-Zellrasen

Dargestellt ist der Zeitverlauf der Repopulation des zellfreien Areal in 5 h-Intervallen. Der schwarze Balken entspricht 200 µm.

Über den Verlauf von 15 h wurde alle 5 min ein Bild aufgenommen. In jedem dieser Bilder wurden die markierten Zellen identifiziert (wie in Abbildung 10) und in ihrer Position bestimmt. Für jede einzelne diese Zellen entstand so über die Zeit eine Trajektorie, die auf unterschiedliche Art und Weise ausgewertet werden kann. Die Trajektorien für die 40 ausgewählten HUVEC-Zellen (Abbildung 10) sind in Abbildung 12 für die rechte (schwarz) und die linke (rot) Seite aufgeführt.



**Abbildung 12:** Trajektorien von wandernden HUVEC-Zellen bei der „Wundreparatur“.

Die Anfangspunkte der je 20 Trajektorien sind im Koordinaten-Ursprung übereinander gelegt. Dabei sind die Trajektorien der 20 Zellen auf der linken Seite, die nach rechts wandern, rot und die Trajektorien der Zellen auf der rechten Seite, die nach links wandern, schwarz markiert (19 Trajektorien). Eine Zelle des rechten „Wundrandes“ läuft zwar erst, wie alle anderen, in die Wunde, dann aber schließlich in den Zellrasen hinein und ist daher rot markiert. Die x- und y-Achse gibt die Strecke in µm an.

Folgende drei, überschaubaren und leicht nachvollziehbaren, quantitativen Analysen der Trajektorien erlauben es, die essentiellen Aussagen dieser Versuche abzuleiten:

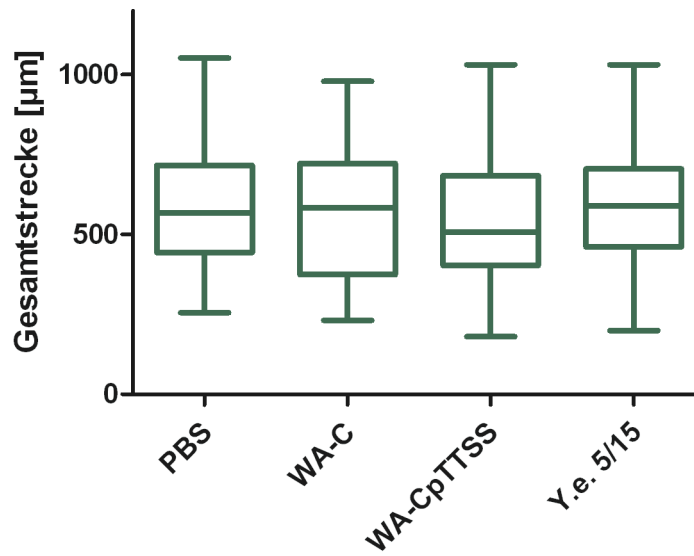
1. Die Gesamtlänge der Migrations-Strecke ( $\mu\text{m}$ ) während 15 h wurde bestimmt. Diese Länge geteilt durch die Zeit ergibt die mittlere Wander-Geschwindigkeit der Zellen.
2. Die zurückgelegte Wanderstrecke jeder Zelle wurde in 5 Abschnitten à 180 min unabhängig bestimmt. Diese Auswertung erlaubt es, die zeitliche Veränderung der Wander-Geschwindigkeit innerhalb der 15 h zu bestimmen.
3. Die Orientierung des Endpunktes relativ zum Startpunkt wurde bestimmt. Der Wert gibt an, wie viele Zellen in eine bestimmte Richtung gewandert sind. Es ist ein Maß für die Richtungs-Orientierung der Zellen.

### **3.2.1 Analyse der Gesamt-Migrations-Strecke der Zellen**

Über die Gesamtzeitdauer des Versuches von 15 h wurde alle 5 min ein Bild erstellt, und auf jedem dieser Bilder die xy-Position einer ausgewählten Zelle identifiziert (Abbildung 10). Aus den xy-Positionen wurde für jede Zelle eine Trajektorie erstellt. In einer ersten Analyse wird nur die Gesamtstrecke vom Ursprungsort bei 0 h bis zum Endpunkt nach 15 h betrachtet. Die Datensätze werden mit Hilfe von „Boxplots“ präsentiert. Dies erlaubte den Vergleich der Datensatzverteilung nicht nur über die Mediane sondern auch über die oberen und unteren Perzentilen als auch über die Minimal- und Maximal-Werte der Datensätze (nähere Beschreibung siehe 2.4.1).

Das Migrations-Verhalten von jeweils 40 nicht-infizierten Zellen in 3 voneinander unabhängigen Versuchen (120 Trajektorien) wurde auf die beschriebene Weise untersucht und zeigte eine mittlere Wanderstrecke von 569  $\mu\text{m}$  (siehe PBS, Abbildung 13). In einem zweiten Versuch wurden die HUVEC-Zellen mit einer Yersinien-Mutante (WA-C) infiziert, die nicht mehr über das Virulenzplasmid (pYV) verfügt und somit keine Plasmid-kodierten Virulenz-Faktoren enthält. Wie für eine Negativ-Kontrolle zu erwarten, zeigten diese Zellen (80 Trajektorien) das gleiche Wanderverhalten wie die nicht-infizierten (PBS) Endothelzellen (Median: 584  $\mu\text{m}$ ; siehe WA-C, Abbildung 13). In einem weiteren Kontrollschritt wurden die HUVEC-Zellen (80 Trajektorien) mit einer Yersinien-Mutante (WA-CpTTSS) infiziert, die Plasmid-kodiert nur über das Typ-III-Sekretionssystem nicht aber über Yop-Gene verfügt. Auch für diese Negativ-Kontrolle wurde ein vergleichbares Wan-

derverhalten der Zellen beobachtet (Median: 507  $\mu\text{m}$ ; siehe WA-CpTTSS, Abbildung 13). Abschließend wurden Zellen mit einer weiteren nicht-effektiven Yersinien-LcrD-Mutante (Y.e. 5/15) infiziert, die diesmal zwar die Virulenzfaktoren, dafür aber ein mutiertes und damit nicht-funktionales Typ-III-Sekretionssystem enthielt. Wieder wurde ein normales HUVEC-Wanderverhalten gemessen (Median: 589  $\mu\text{m}$ ; siehe Y.e.5/15, Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Gesamt-Migrationsstrecken der uninfizierten oder mit Kontroll-Yersinienstämmen infizierter HUVEC-Zellen nach 15 h.

Konfluente HUVEC-Kulturen wurden nicht infiziert (PBS) oder mit den gekennzeichneten Stämmen infiziert, wie in Methoden beschrieben „verwendet“ und die zurückgelegte Strecke von 120 bzw. 80 am Zellrand befindlichen Zellen quantifiziert. Die Mediane und Percentilen ergeben sich aus 120 bzw. 80 Werten, die in 3 bzw. 2 Versuchen, in denen je 40 Zellen verfolgt wurden, ermittelt wurden (für die Anzahl der ausgewerteten Zellen je Migrationsversuch siehe Tabelle 15). Die vier Datensatz-Verteilungen zeigen ähnliche Parameter, es besteht kein signifikanter Unterschied in der Messwert-Verteilung.

Wurden die HUVEC-Zellen dagegen mit Wildtyp-Yersinien (WA-314) infiziert, zeigten sie ein stark reduziertes Migrations-Verhalten. In drei unabhängigen Versuchen wurde 120 Trajektorien vermessen und die Gesamtwanderstrecke betrug im Mittel 80  $\mu\text{m}$  (siehe WA-314, Abbildung 14). Die Gesamt-Wanderstrecke nach 15 h war im Vergleich zu den Kontrollen um 86% reduziert. Die sechs in die HUVEC-Zellen transferrierten Yop-Proteine beeinflussten also das Wanderverhalten der Zellen stark. Der oben beschriebene Kontrollversuch belegt dagegen, dass weder das zusätzlich im Yersinien-Wildtyp vorhandene Se-

ekretionssystem noch weitere Plasmid- oder chromosomal kodierte Elemente einen Einfluss auf das Wanderverhalten ausüben.

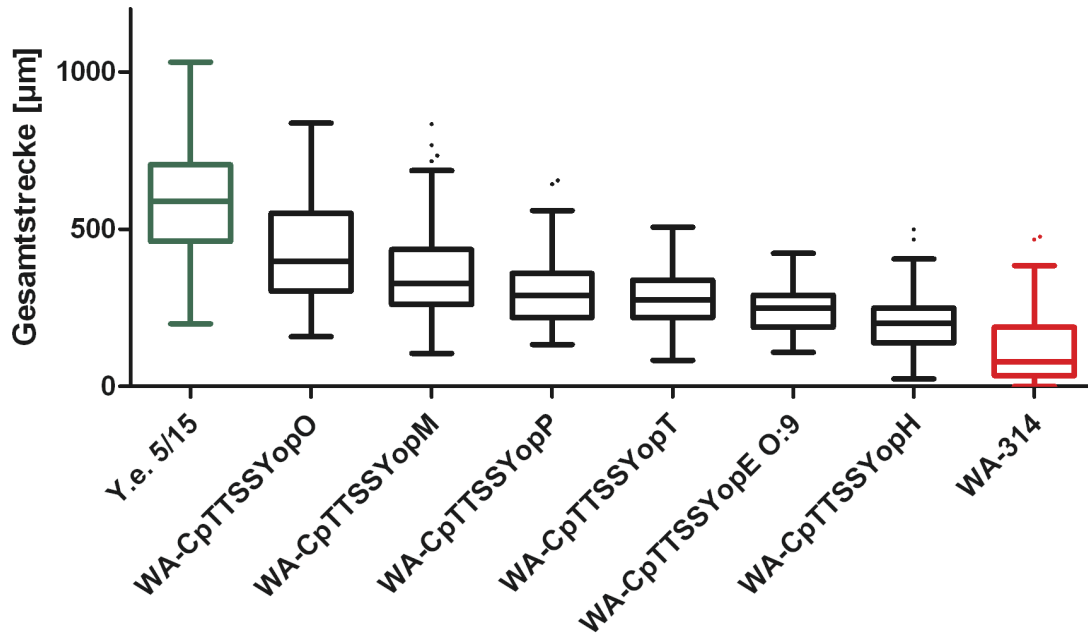
Eventuell sind nur wenige oder sogar nur ein einziges der Yop-Proteine für den antimigratorischen Effekt verantwortlich. Deshalb wurden im Folgenden HUVEC-Zellen mit Yersinien-Mutanten infiziert (siehe Tabelle 15), die das Typ-III-Sekretionssystem und jeweils ein einziges Yop-Protein exprimieren.

Zellen, die mit WA-CpTTSSYopO infiziert wurden, zeigten ein mäßig reduziertes Migrationsverhalten (Gesamtstrecke um 33% reduziert; Median: 397  $\mu\text{m}$ ; siehe WA-CpTTSSYopO, Abbildung 14). Der Einfluss von WA-CpTTSSYopM war etwas stärker: die Gesamtstrecke reduzierte sich um 44% (Median: 332  $\mu\text{m}$ ; siehe WA-CpTTSSYopM, Abbildung 14). Die Infektion mit WA-CpTTSSYopP führte zu einer Reduktion der Gesamtstrecke um 51% (Median: 291  $\mu\text{m}$ ; siehe WA-CpTTSSYopP, Abbildung 14). HUVEC-Zellen infiziert mit WA-CpTTSSYopT wanderten in 15 h nur circa 275  $\mu\text{m}$  (Median), das entspricht einer Reduktion der Gesamtstrecke um 53% (Abbildung 14 und 17).

Als Arbeitshypothese wurde vermutet, dass hauptsächlich YopE und YopH den Einfluss des Yersinien-Wildtyps auf das Migrations-Verhalten der HUVEC-Zellen verursachen. Davon ist auszugehen, da von YopE mit seiner GAP-Aktivität bekannt ist, dass es Rho-GTPasen inaktiviert und dadurch das Aktinzytoskelett beeinflusst (Aktories et al. 2004). Über YopH ist unter anderem bekannt, dass es fokale Komplexe auflöst (Andersson et al. 1996). Auch diese zellulären Strukturen sind essentiell für die Migration vor allem im 2-dimensionalen Raum (Laufenburger und Horwitz 1996). Es ist somit zu vermuten, dass YopH die Migration der HUVEC in starkem Ausmaß beeinflusst.

Die Zellen wurden zunächst mit der WA-CpTTSSYopE (Serotyp O:9) Monosekretions-Mutante infiziert. Diese Zellen zeigten ein um 58% reduziertes Wanderverhalten (Median: 249  $\mu\text{m}$ ; siehe WA-CpTTSSYopE O:9, Abbildung 14 und 16). Wie vermutet, reduziert YopE (Serotyp O:9) das Wanderverhalten der HUVEC-Zellen noch stärker, allerdings ist der Unterschied zu der Hemmung durch WA-CpTTSSYopT und -YopP nur gering (siehe oben). WA-CpTTSSYopE erreicht aber nicht den Einfluss des Wildtyps. WA-CpTTSSYopH beeinflusst die Migration am stärksten, die zurückgelegte Gesamtstrecke wird um 66% reduziert (Median: 201  $\mu\text{m}$ ; siehe WA-CpTTSSYopH, Abbildung 14 und 17). Aber auch YopH allein erreicht nicht den Effekt des Wildtyps.



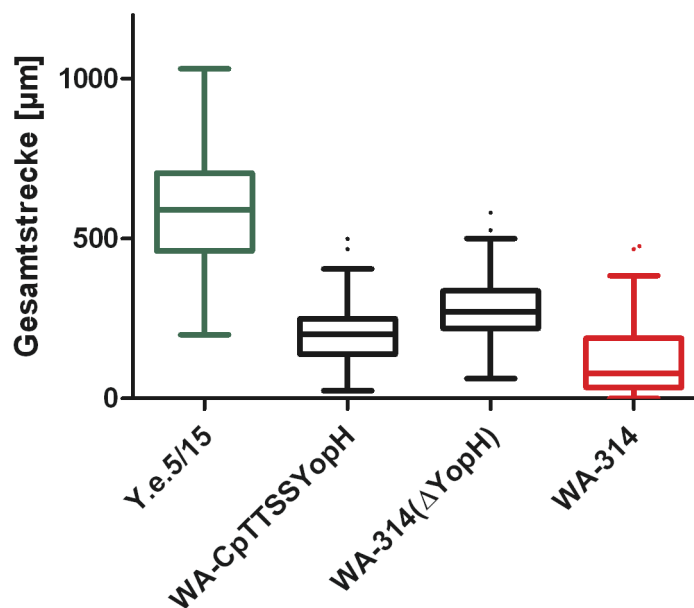


**Abbildung 14:** Gesamt-Migrationsstrecken der Endothelzellen (HUVEC), die mit den gekennzeichneten Monosekretions-Mutanten, einer Kontrolle (grün) und dem Wildtyp (rot) infiziert wurden.

Konfluente HUVEC-Zellrasen wurden mit den gekennzeichneten Stämmen infiziert, der Migrationsversuch wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt (für die Anzahl der ausgewerteten Zellen je Migrationsversuch siehe Tabelle 15). Die Mediane und Percentilen ergeben sich aus 120 bzw. 80 Werten, die in 3 bzw. 2 unabhängigen Versuchen, in denen je 40 Zellen verfolgt wurden, ermittelt wurden.

### 3.2.1.1 Das Migations-Verhalten von HUVEC-Zellen infiziert mit WA-314( $\Delta$ YopH)

Im vorangehenden Abschnitt wurde beschrieben, dass der Einfluss von WA-CpTTSSYopH auf die Migration stärker ist als der Einfluss der durch alle anderen Monosekretions-Mutanten hervorgerufen wird. Daher sollen HUVEC-Zellen nun mit Yersinien infiziert werden, die ein Virulenzplasmid tragen, das für alle Yops kodiert, außer für YopH. Das Ergebnis dieses Versuches ist, dass die Infektion mit der Monosekretions-Mutante WA-CpTTSSYopH zu einer Reduktion der Gesamt-Migrationsstrecke um 66% (Median 201; siehe WA-CpTTSSYopH, Abbildung 14 und 15) führt, wohingegen die Infektion mit dem Yersinien-Stamm (WA-314( $\Delta$ YopH)), der alle Yops bis auf YopH sekretiert, zu einer Reduktion der Gesamt-Migrationsstrecke um 54% führt (Median 270; siehe WA-314( $\Delta$ YopH), Abbildung 15). YopH allein zeigt also einen stärkeren Einfluss auf die Migration als alle anderen Yops zusammen.



**Abbildung 15:** Gesamt-Migrationsstrecken der Endothelzellen (HUVEC), die mit WA-CpTTSSYopH, WA-314( $\Delta$ YopH), einer Kontrolle (grün) und dem Wildtyp (rot) infiziert wurden.

HUVEC-Zellen, die konfluent vorlagen, wurden mit den gekennzeichneten Stämmen infiziert und, wie in Material und Methoden beschrieben, auf ihre Migration hin untersucht (siehe 2.4.1). Die zurückgelegte Strecke von 120 bzw. 80 am Zellrand befindlichen Zellen wurde quantifiziert (für die Anzahl der ausgewerteten Zellen je Versuch siehe Tabelle 15). Die Datensätze werden auch hier durch Box-Plots dargestellt.

### 3.2.1.2 Das Migrations-Verhalten von HUVEC-Zellen infiziert mit Yop Mutanten

#### **YopE-Mutanten**

##### WA-CpTTSSYopE(R144A)

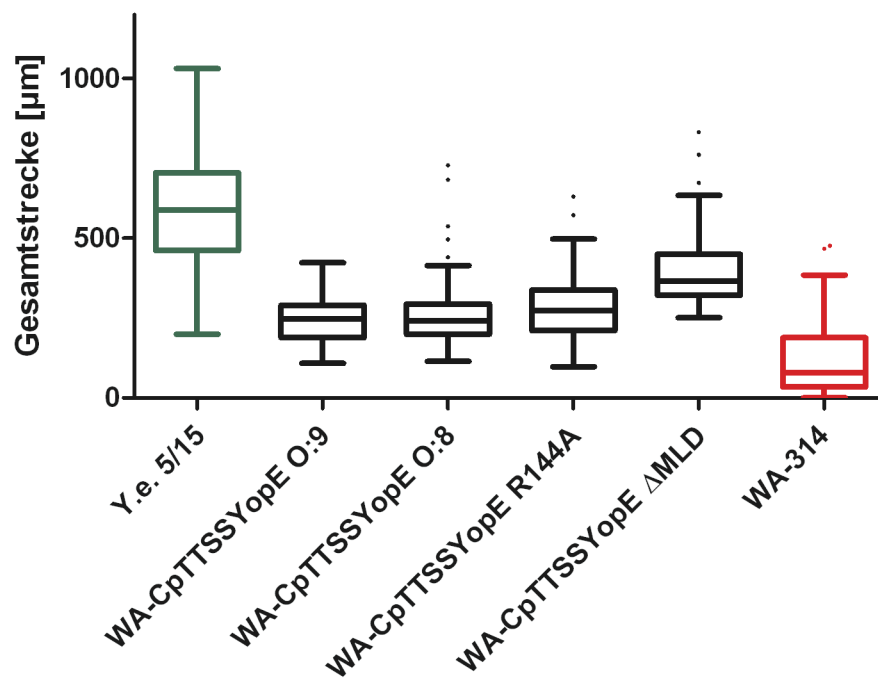
YopE wirkt als GAP u.a. auf die GTPase RhoG (Roppenser et al. 2009), die an der Regulation der Zellmigration beteiligt ist (Raftopoulou und Hall 2003). Die YopE-Mutante R144A hat keine GAP-Aktivität mehr (Roppenser et al. 2009). Es ist daher zu vermuten, dass Zellen infiziert mit dieser Mutante entsprechend den Kontroll-Yersinien-Stämmen wandern, da kein Einfluss auf u.a. RhoG und damit auf die Migration möglich sein sollte. HUVEC-Zellen wurden daher mit WA-CpTTSSYopE(R144A) infiziert. Die Zellen zeigten überraschenderweise doch ein verändertes Wanderverhalten, welches dem Verhalten der Zellen, die mit dem WA-CpTTSSYopE (Serotyp O:9) infiziert wurden, ähnelt (Reduktion um 54%; Median: 273  $\mu\text{m}$ ; siehe WA-CpTTSSYopE(R144A), Abbildung 16). Die R144A-Mutation verändert also die Eigenschaften von YopE in Bezug auf seinen Einfluss auf das HUVEC-Wanderverhalten nicht. Die GAP-Aktivität von YopE ist also nicht die Protein-Funktion, die für die Reduktion der Migration verantwortlich ist.

##### WA-CpTTSSYopE( $\Delta$ MLD)

Eine andere YopE-Mutante (WA-CpTTSSYopE $\Delta$ MLD) mit Deletion der Membran-Lokalisations-Domäne (MLD) zerstört die Membran-Bindefunktion von YopE (Roppenser 2009). HUVEC-Zellen infiziert mit dieser YopE-Mutante (WA-CpTTSSYopE $\Delta$ MLD) zeigten eine Migration, die der der nicht-infizierten HUVEC-Zellen ähnlicher ist als die geringe Migration von Zellen, die mit WA-CpTTSSYopE (Serotyp O:9) infiziert waren (Reduktion um 38%; Median: 367 $\mu\text{m}$ ; siehe WA-CpTTSSYopE( $\Delta$ MLD), Abbildung 16). Die MLD-Domäne von YopE scheint somit eine Protein-Funktion zu sein, die für die Reduktion der Migration mit verantwortlich gemacht werden kann. Es muss allerdings weitere Proteinfunktionen von YopE geben, die die Migration von Zellen beeinflussen.

### Lysine in YopE

YopE vom Yersinien Serotyp O:8 enthält zwei N-terminale Lysine (K62 und K75), die polyubiquitinyliert werden können (Hentschke et al. 2007). Diese Lysine fehlen in YopE vom Yersinien Serotyp O:9. YopE vom Yersinien Serotyp O:8 wird deshalb schneller abgebaut als das vom Yersinien Serotyp O:9. Es soll daher überprüft werden, ob der Einfluss von YopE vom Yersinien Serotyp O:8 auf die Hemmung der Migration von HUVEC-Zellen geringer ist als der Einfluss von YopE vom Yersinien Serotyp O:9. Dies kann vermutet werden, da das YopE vom Yersinien Serotyp O:8 schneller in HUVEC-Zellen abgebaut wird. Zellen infiziert mit YopE vom Yersinien Serotyp O:8 zeigten aber, entgegen der obigen Annahme, kein verändertes Wanderverhalten (Reduktion um 59%; Median: 242  $\mu\text{m}$ ; siehe WA-CpTTSSYopE O:8, Abbildung 16) gegenüber den Zellen, die mit dem YopE vom Yersinien Serotyp O:9 infiziert wurden. Die Lysine und ihre potentielle Modifikation haben also keinen Einfluss auf das Wanderverhalten der so infizierten HUVEC-Zellen.

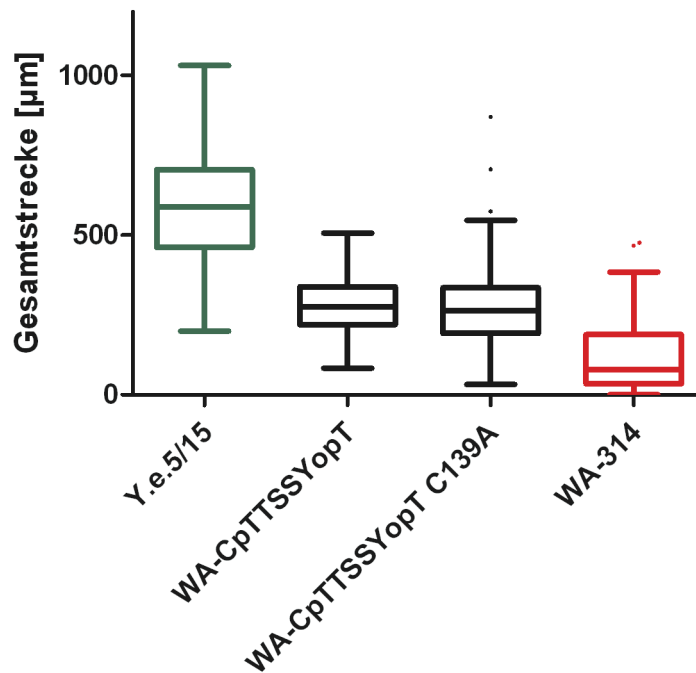


**Abbildung16:** Gesamt-Migrationsstrecken der HUVEC-Zellen, die mit den gekennzeichneten Mutanten, einem Kontroll-Stamm (grün) und dem Wildtyp (rot) infiziert wurden.

Die konfluenten HUVEC-Zellrasen wurden mit den gekennzeichneten Stämmen infiziert, die Migration über 15 h beobachtet und anschließend die zurückgelegte Strecke von sich am Zellrand befindlichen Zellen analysiert (für die Anzahl der ausgewerteten Zellen je Migrationsversuch siehe Tabelle 15).

### YopT-Mutanten

Ausschalten der funktionellen Protease-Domäne von WA-CpTTSSYopT durch die Mutante WA-CpTTSSYopT(C139A) (Shao et al. 2002) erlaubt eine Aussage darüber, ob die Protease-Domäne von YopT für das Wanderverhalten der WA-CpTTSSYopT-infizierten HUVEC-Zellen relevant ist. Zellen infiziert mit WA-CpTTSSYopT(C139A) zeigten eine Reduktion der Gesamtstrecke um 55% (Median 263; siehe WA-CpTTSSYopT(C139A), Abbildung 17), während die Infektion mit WA-CpTTSSYopT zu einer Reduktion der Gesamtmigrationsstrecke um 53% führte (Median 275; siehe WA-CpTTSSYopT, Abbildung 14 und 17). Demnach scheint die Protease-Funktion von YopT für den Einfluss auf das Wanderverhalten der HUVEC-Zellen nicht relevant zu sein.



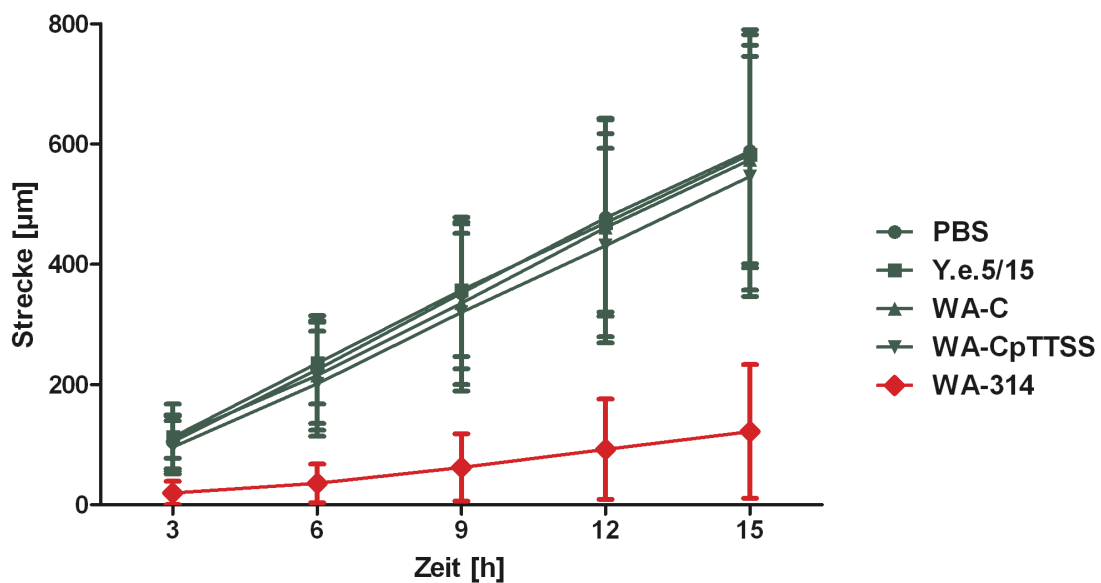
**Abbildung 17:** Gesamt-Migrationsstrecken der HUVEC-Zellen, die mit den gekennzeichneten Mutanten, einem Kontroll-Stamm (grün) und dem Wildtyp (rot) infiziert wurden.

Die HUVEC-Zellen wurden mit den gekennzeichneten Stämmen infiziert, wie in Material und Methoden beschrieben herangezogen und die zurückgelegte Strecke von 120 bzw. 80 am Zellrand befindlichen Zellen wurde quantifiziert (für die Anzahl der ausgewerteten Zellen je Versuch siehe Tabelle 15). Die Mediane und Percentilen ergeben sich aus 120 bzw. 80 Werten.

### 3.2.2 Zeitliche Veränderung des Migrations-Verhaltens

Die zurückgelegte Wanderstrecke der HUVEC-Zellen wurde nicht nur für die Gesamtstrecke nach 15 h bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.) sondern auch jeweils nach 3 h Intervallen, d. h. nach einer Zeit von 3 h, 6 h, 9 h, 12 h und 15 h. Die Daten wurden zunächst über ein gemischt lineares Modell aufgearbeitet und sind im Folgenden über die Mittelwerte und Standardabweichung präsentiert (siehe zusätzlich 2.4.1). Es könnte vermutet werden, dass die injizierten Yop-Proteine in den Zellen erst mit der Zeit ihre volle Funktion entfalten und/oder möglicherweise innerhalb der 15 h abgebaut werden und damit ihre Funktion verlieren. Entsprechend wäre der Einfluss auf das HUVEC-Wanderverhalten zeitabhängig.

Es wurden zunächst alle Kontrollen sowie der Wildtyp auf einen zeitabhängigen Einfluss auf die Migrationsstrecke untersucht (siehe Abbildung 18).



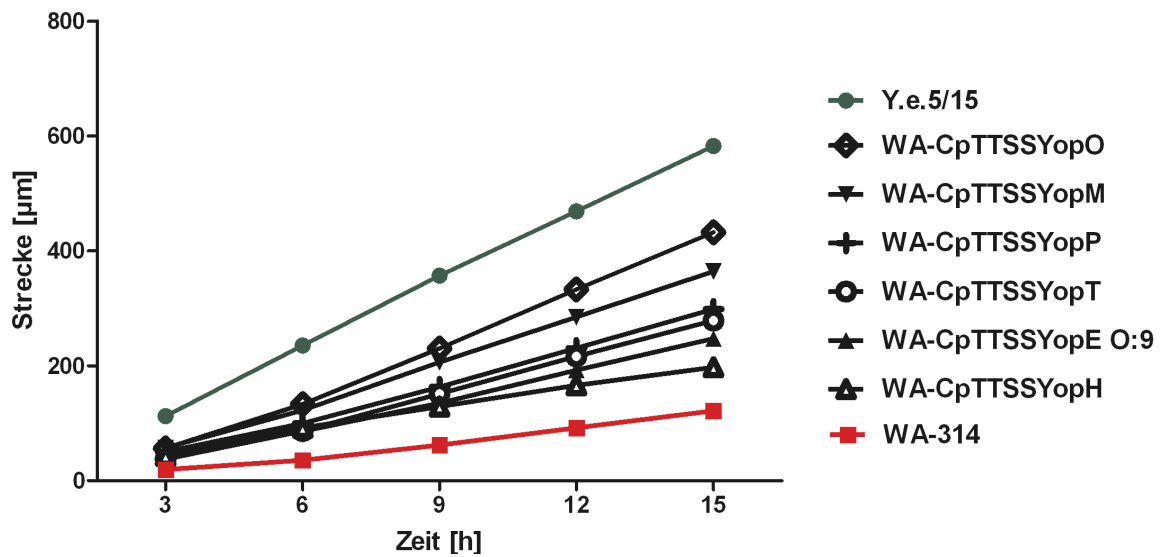
**Abbildung 18:** Migrationsstrecken der HUVEC-Zellen, die mit den gekennzeichneten Kontroll-Stämmen (grün) und dem Wildtyp (rot) infiziert wurden, im zeitlichen Verlauf.

Konfluente HUVEC-Zellrasen wurden nicht infiziert (PBS) oder mit den gekennzeichneten Stämmen infiziert, wie in Material und Methoden beschrieben eingesetzt und die zurückgelegte Strecke quantifiziert (für die Anzahl der ausgewerteten Zellen je Versuch siehe Tabelle 15). Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden für die 120 bzw. 80 Zellen berechnet und sind aufgetragen. Abzulesen ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll-Stämme und dem Wildtyp, zu jedem Zeitpunkt während des 15-stündigen Beobachtungszeitraums.

Als Negativ-Kontrolle (Y.e. 5/15) dienten HUVEC-Zellen, die mit einer Mutante infiziert wurden, die alle Yop-Proteine, aber einen nicht funktionalen Typ-III-Sekretionsapparat enthielten. Diese Negativ-Kontrolle zeigte ein (im Rahmen des Messfehlers) lineares Wanderverhalten: Die in den jeweiligen Zeiten zurückgelegten Strecken (Mittelwerte) betrugen: 112  $\mu\text{m}$  (0-3 h), 124  $\mu\text{m}$  (3-6 h), 121  $\mu\text{m}$  (6-9 h), 112  $\mu\text{m}$  (9-12 h) und 114  $\mu\text{m}$  (12-15 h). Die mittlere zurückgelegte Strecke war im mittleren Zeitsegment der Messung (3-9 h) geringfügig (< 10%) größer als zu Beginn und am Ende der Messung, dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Die Zellen bewegten sich also in etwa linear über die Zeit (siehe Abbildung 18). Die Negativ-Kontrollen zeigen ein über die Zeit gleiches Wanderverhalten.

HUVEC-Zellen infiziert mit dem Yersinien-Wildtyp (WA-314) zeigten ebenfalls kein vom Beobachtungszeitraum abhängiges Migrations-Verhalten. Die zurückgelegte Strecke über die verschiedenen 3 h-Intervalle waren innerhalb der Messfehler konstant (Mittelwerte): 20  $\mu\text{m}$  (0-3 h), 16  $\mu\text{m}$  (3-6 h), 26  $\mu\text{m}$  (6-9 h), 30  $\mu\text{m}$  (9-12 h) und 20  $\mu\text{m}$  (12-15 h). Auch hier bewegten sich die infizierten Endothelzellen über die Zeit annähernd linear (siehe Abbildung 18). Die zurückgelegte Strecke war allerdings für die mit Wildtyp-Yersinien infizierten Zellen wesentlich geringer als für die Negativ-Kontrollen.

Entsprechend wurden HUVEC-Zellen, in getrennt voneinander durchgeführten Versuchen, mit den Monosekretions-Mutanten infiziert und der Zeitverlauf des Wanderverhaltens bestimmt. Wie oben für die Negativ-Kontrolle und den Wildtyp beschrieben, wurde eine über die Beobachtungszeit konstante Wanderstrecke gemessen (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Migrationsstrecken der Endothelzellen, die mit den angegebenen Bakterien-Stämmen infiziert wurden, im zeitlichen Verlauf.

Die HUVEC-Zellrasen wurden mit den gekennzeichneten Stämmen infiziert, die Zellmigration aufgezeichnet und die zurückgelegte Strecke von am Zellrand befindlichen Zellen quantifiziert (für die Anzahl der ausgewerteten Zellen je Versuch siehe Tabelle 15). Angegeben sind die Mittelwerte. Die Größe der Messfehler (circa  $\pm 15\%$ ) entspricht den Messfehlern in Abbildung 18 und wird der Übersichtlichkeit wegen nicht gezeigt.

Generell zeigte die Wanderstrecke innerhalb der beobachteten 15 h keine Zeitabhängigkeit. Die oben (Kapitel 3.2.1) abgeleiteten Aussagen zum Verhalten der einzelnen Mutanten gelten also auch für die kürzeren Zeitintervalle. Der Einfluss von WA-CpTTSSYopO auf das Wanderverhalten ist am geringsten und wird geringfügig durch den von WA-CpTTSSYopM übertroffen. Größer, untereinander aber ähnlich, ist der Einfluss von WA-CpTTSSYopP, -YopT und -YopE (Serotyp O:9). WA-CpTTSSYopH übt den größten Effekt aus. Keine dieser Mutanten allein erreicht aber den Einfluss des Wildtyps, auch nicht zu einem kürzeren Zeitpunkt als 15 h.



### 3.2.3 Verteilung der Migrations-Richtung

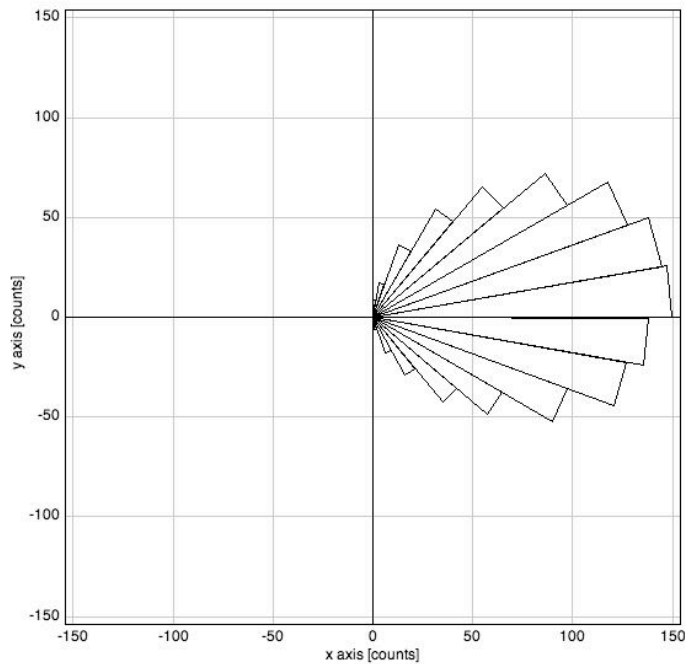
Durch das Verletzen des Zellrasens entsteht ein zellfreier Streifen, an dessen Rand HUVEC-Zellen liegen, die zum Streifen hin keinen Zell-Zellkontakt haben und deshalb in diese Richtung wandern können (siehe 2.4.1). Es ist also zu erwarten, dass die Migration eindeutig gerichtet ist. Die Migrations-Richtung der Endothelzellen wurde bestimmt, indem die HUVEC-Zellen gezählt wurden, die in einem 10°-Sektorfeld während der Laufzeit auftauchen. Für alle 36 10°-Sektorfelder wurde diese Gesamtzahl in einer Rosette dargestellt, deren Sektorfeld-Länge die addierte Zellzahl angibt. Für die 18 10°-Sektorfelder, die dem zellfreien Rasen anliegen (jeweils 18 am linken und 18 am rechten Rand der „Wunde“), wird die Anzahl der Zellen, die in diesem Areal während der 15 h vorkommen, gezählt und in Bezug auf alle HUVEC-Zellen analysiert. Die Werte der rechten und linken Seite wurde zu einem Wert zusammengefasst (siehe auch 2.4.1). Hierüber lässt sich eine Aussage über den Grad der Richtungsorientierung machen, da dieses die Sektorbereiche sind, die in die „Wunde“ zeigen.

Nicht-infizierte HUVEC-Zellen wanderten direkt in die Mitte des zellfreien Streifens. Die Richtungs-Rosette zeigte eine mittlere Verteilung senkrecht zum Rand (Abbildung 20). Nicht infizierte HUVEC-Zellen (PBS-Kontrolle) bewegten sich zu 97% in den Sektorfeldern, die zu dem zellfreien Rasen zeigen. Das zeigt eine gerichtete Bewegung in das zellfreie Areal an.

Zellen infiziert mit den Negativ-Kontrollen verhalten sich ebenso. Der Mittelwert der Richtungsverteilung blieb bei 90° bzw. 270°, während die Verteilungsbreite wuchs:

HUVEC-Zellen infiziert mit:	Prozentualer Anteil der Zellen, die in den 18 der „Wunde“ zugewandten Sektorfeldern vorkommen
WA-C	98 %
WA-CpTTSS	95 %
Y.e 5/15	98 %

**Tabelle 16:** Prozentuale Anteile der Zellen, die mit den aufgeführten Kontroll-Sämen infiziert wurden und in den der „Wunde“ zugewandten Sektorfeldern vorkommen. Für Richtungs-Rosetten siehe Anhang A1-A3.

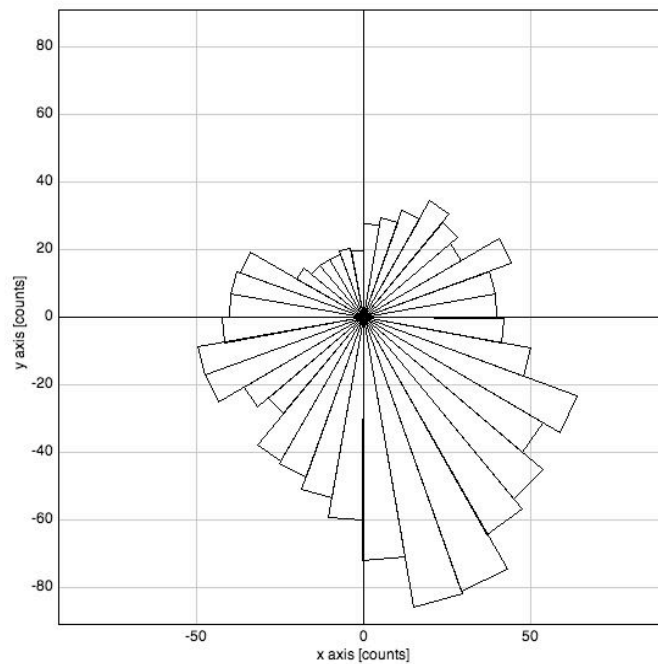


**Abbildung 20:** Richtungs-Rosette für nicht-infizierte Endothelzellen (PBS-Kontrolle)

Ein konfluenter HUVEC-Zellrasen wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, verletzt, die Migration der nicht infizierten Zellen aufgezeichnet und die Migrations-Richtung durch Verwendung von Richtungs-Rosetten ausgewertet. Die Richtungs-Rosette wird gebildet aus  $10^\circ$ -Sektorfeldern, die Sektorfeld-Länge gibt die gezählte Gesamtzahl der HUVEC-Zellen an, die sich im Laufe der 15 h in diesem Areal befanden. Die Abbildung zeigt die Wander-Orientierung der Zellen des linken Wundrandes. Abzulesen ist eine Orientierung der Zellen in die Richtung des zellfreien Areals.

Generell wurde beobachtet, dass nahezu keine (2-5%) HUVEC-Zellen in Richtung des unverletzten Zellrasens wanderten.

Die Situation änderte sich stark, wenn die Endothelzellen mit Wildtyp Yersininen (WA-314) infiziert wurden. Diese Zellen wanderten nur zu 54% in Richtung des zellfreien Areals (siehe Abbildung 21). Gleichzeitig zeigte die Auswertung, dass 46% der Zellen in Richtung des unverletzten Zellrasens wanderten (gegenüber 3% für die Negativ-Kontrollen).



**Abbildung 21:** Richtungs-Rosette für Endothelzellen (HUVEC), die mit dem Yersinien-Wildtyp (WA-314) infiziert wurden.

Konfluente HUVEC-Kulturen wurden mit Wildtyp-Yersinien infiziert, der Zellrasen „verletzt“, die Migration aufgezeichnet und die Migrationsrichtung von 120 Zellen aus 3 Versuchen ausgewertet, hier aufgetragen sind die Richtungen von 20 Zellen aus einem Versuch. Die Abbildung zeigt die Wander-Orientierung der Zellen des linken Wundrandes. Zu sehen ist, dass HUVEC-Zellen infiziert mit Wildtyp Yersinien ihre Wander-Orientierung in das zellfreie Areal verloren haben.

Eine Ausrichtung von circa 50% in eine Richtungshälfte bedeutet Richtungslosigkeit; mit Wildtyp infizierte HUVEC-Zellen zeigen also keine Wanderausrichtung mehr. Die infizierten Zellen wanderten somit in alle möglichen Richtungen der Rosette. Offensichtlich hatten die infizierten Zellen den Kontakt zu Nachbarzellen im unverletzten Zellrasen, der ihnen eine bevorzugte Wanderrichtung vorgeben könnte, verloren. Demzufolge war nicht nur die zurückgelegte Strecke, wie bereits in Kapitel 3.2.1 beobachtet wurde, beeinflusst sondern darüber hinaus auch die Richtungs-Orientierung.

Wurden die HUVEC-Zellen dagegen mit den Monosekretions-Mutanten infiziert, zeigte die Rosette des Wanderverhaltens in vier von sechs Fällen eine überwiegende Wanderung der Zellen in Richtung des zellfreien Streifens (siehe Abbildung 22).

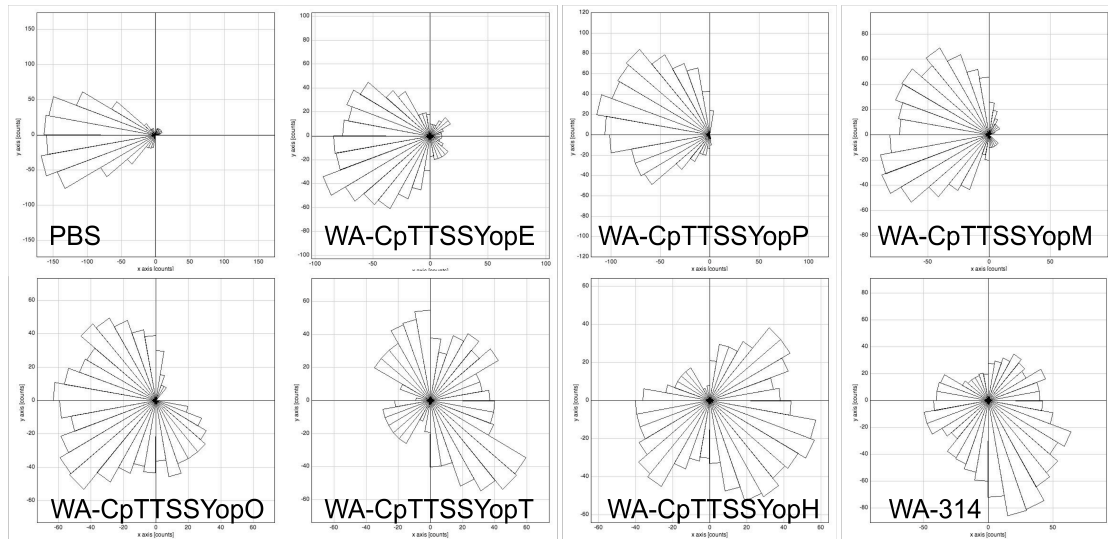
Die Rosetten der Migrations-Richtungen für HUVEC-Zellen infiziert mit WA-CpTTSSYopO, -YopM, -YopP, -YopT, -YopE O:9 und -YopH sind in Abbildung 22 gezeigt. Die Rosetten der Migrations-Richtungen für HUVEC-Zellen infiziert mit WA-314( $\Delta$ YopH), WA-CpTTSSYopE R144A, WA-CpTTSSYopE  $\Delta$ MLD und WA-CpTTSSYopT C139A sind im Anhang zu sehen (siehe Abbildungen A4 – A7).

HUVEC-Zellen infiziert mit den WA-CpTTSSYopE-Mutanten -YopE O:9, -YopEO:8, -YopE R144A und -YopE  $\Delta$ MLD wanderten je zu 90%, 93%, 93% und 85% in den Sektoren, die dem zellfreien Rasen zugewandt sind, und zeigten damit eine hohe Richtungs-Orientierung. Mit WA-CpTTSSYopP, -YopM und -YopO infizierte Zellen wanderten je zu 87%, 83% und 77% auf das zellfreie Areal zu (siehe Abbildung 22). Die Richtungs-Orientierung ist hier geringer, aber immer noch hoch. Der Anteil der Zellen, die in Richtung des Zellrasens wanderten, betrug 7-23%.

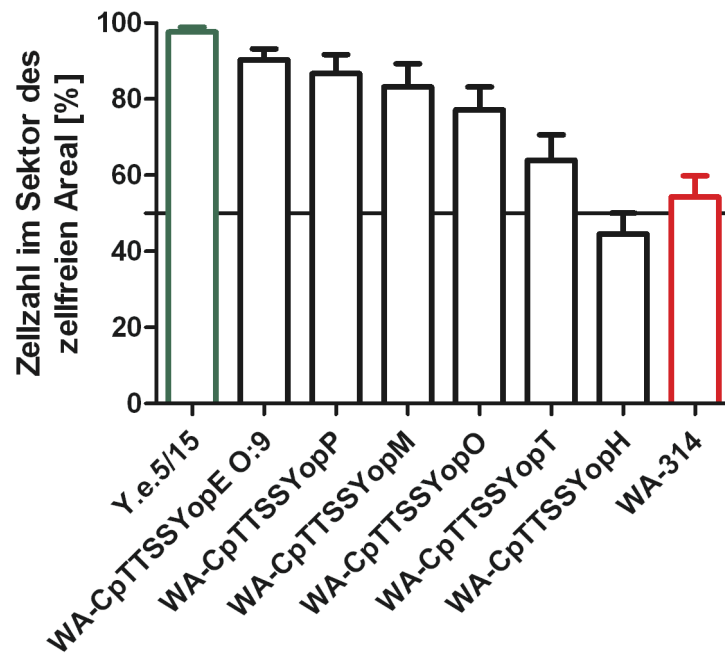
HUVEC-Zellen, die mit WA-CpTTSSYopT infiziert wurden, zeigten stärkere Veränderungen in der Wanderrichtung, konnten aber den Effekt, der durch Wildtyp-Yersinien erreicht wurde, nicht hervorrufen. In Richtung des zellfreien Rasens orientiert, wanderten 64% der WA-CpTTSSYopT-infizierten Zellen. Die WA-CpTTSSYopT Mutante, WA-CpTTSSYopT C139A, zeigt nur ein geringfügig anderes Bild. In dem Bereich, der der „Wunde“ zugewandt liegt, wurden 71% der HUVEC-Zellen gezählt (siehe Abbildungen A7). Die Protease-Domäne von YopT scheint demnach nicht für die Wander-Orientierung relevant zu sein. Dies wurde bereits für die Beeinflussung der Migrations-Strecke beschrieben (siehe 3.2.1.2). WA-CpTTSSYopT beeinflusst somit weder die Migrations-Strecke noch die Migrations-Richtung über seine Protease-Domäne.

Zellen, die mit WA-CpTTSSYopH infiziert wurden, wanderten zu 45% in die Richtung des zellfreien Areals. Der größere Anteil (55%) der Zellen wanderte somit entgegengesetzt zur erwarteten Richtung (siehe Abbildung 22). Die Monosekretionsmutante WA-CpTTSSYopH ruft die geringste Orientierung des Zell-Wanderverhaltens hervor; die HUVEC-Zellen wanderten orientierungslos ähnlich wie bei der Infektion mit dem Yersinien-Wildtyp. Mit WA-314  $\Delta$ YopH infizierte Zellen wanderten allerdings zu 87% auf das zellfreie Areal zu (siehe A4). Die Richtungs-Orientierung ist hier wieder hoch. Wie schon für die Beeinflussung der Migrations-Strecke gezeigt, hat YopH allein also einen stärkeren Einfluss auf die Migrations-Richtung als alle anderen Yops zusammen.

A:



B:



**Abbildung 22:** Richtungs-Orientierung, der mit den aufgetragenen Yersinien-Stämmen infizierten HUVEC-Zellen, bei Wanderung in das zellfreie Areal.

HUVEC-Zellen, die sich konfluent in 6-Well-Platten befanden, wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, herangezogen und ihre Wanderorientierung zum zellfreien Areal hin untersucht (siehe 2.4.1). A: Richtungs-Rosetten für Endothelzellen (HUVEC), die nicht infiziert wurden oder mit den entsprechend angegebenen Yersinien Stämmen infiziert wurden. Aufgetragen sind die Sektoren, der Zellen des rechten Wundrandes, die nach links in das zellfreie Areal wandern. B: Aufgetragen ist der prozentuale Anteil (Mittelwert und Standardabweichung) der Zellen, die in das zellfreie Areal während des 15 h Untersuchungszeitraums wandern. Der 50%-Wert bedeutet Richtungslosigkeit. Dieser Wert wird innerhalb des Messfehlers für den Wildtyp (WA-314; rot) erreicht. Innerhalb des Messfehlers verursachen auch die mit WA-CpTTSSYopH infizierten Zellen Richtungslosigkeit ähnlich wie der Wildtyp.

Offensichtlich beeinflussen die einzelnen Yop-Proteine die Wanderrichtung der infizierten HUVEC-Zellen unterschiedlich stark.

Visuelle Inspektion der Mikroskop-Bilder zeigte, dass die infizierten HUVEC-Zellen zu unterschiedlichen Anteilen aus dem Zellverband des Zellrasens gelöst sind. Dieser Effekt korrelierte mit der Stärke der Änderung der Wanderrichtung und ist am größten für die Zellen, die mit der Monosekretionsmutante WA-CpTTSSYopH und den Yersinien-Wildtyp WA-314 infiziert wurden. Für die anderen Monosekretions-Mutanten ist der Effekt des Herauslösens der Endothelzellen aus dem Zellrasen aber geringer und zeigte eine abgestufte Auswirkung auf die Wanderrichtung (siehe Abbildung 22). Je stärker die Endothelzellen den Kontakt zu ihren Nachbarzellen verlieren, desto geringer die Wanderorientierung.

#### **3.2.4 Teilungsverhalten**

Während der Migration teilten sich die HUVEC-Zellen. Dieser Prozess zeigte sich bei der Wanderanalyse des Wundreparaturmodells dadurch, dass sich aus einer Zelle zwei Zellen ergeben, die dann getrennt und hauptsächlich in entgegengesetzte Richtungen weiter wanderten. Die Zellteilung während der Wanderung wurde quantitativ verfolgt. Bei den nicht-infizierten HUVEC-Zellen wurden in einem Zeitraum von 15 h 22% Zellteilungen in wandernden Zellen beobachtet. Die Infektion scheint einen sehr unterschiedlichen Einfluss auf die Zellteilung zu haben (siehe Tabelle 17): Bei der Infektion mit der Yersinien-Mutante WA-CpTTSS änderte sich die Zahl der Zellteilungen nicht (21% Zellteilungen in 15 h), bei den anderen Negativ-Kontrollen mit Infektion durch Mutante WA-C oder Y.e. 5/15 wurden 14% bzw. 6% Zellteilungen in 15 h gemessen.

Für HUVEC-Zellen, infiziert mit dem Yersinien-Wildtyp (WA-314), lag die Anzahl der Zellteilungen während der 15-stündigen Beobachtungszeit der Migration bei 13% und damit im Bereich der WA-C Negativ-Kontrolle. Bei Infektion mit einzelnen Yop-Proteinen wurden Teilungsraten für WA-CpTTSSYopO von 11% gemessen. Bei allen weiteren Infektionen mit den Monosekretions-Mutanten zeigten die HUVEC-Zellen deutlich geringere Zellteilungsraten. Generell lag die Teilungsrate bei infizierten Zellen niedriger als bei nicht-infizierten (Ausnahme: WA-CpTTSS, das nur über das Typ-III-Sekretionssystem verfügt).

Stamm	Anzahl der Zellteilungen in %
PBS	22
WA-CpTTSS	21
WA-C	14
Y.e. 5/15	6
WA-314	13
WA-CpTTSSYopO	11
WA-CpTTSSYopM	8
WA-CpTTSSYopP	7
WA-CpTTSSYopI	3
WA-CpTTSSYopI(C139A)	3
WA-CpTTSSYopE O:9	6
WA-CpTTSSYopE O:8	5
WA-CpTTSSYopE(R144A)	8
WA-CpTTSSYopE( $\Delta$ MLD)	3
WA-CpTTSSYopH	2

**Tabelle 17:** Zellteilungsraten der uninfizierten oder mit den aufgetragenen Kontroll-Yersinien-Stämmen oder Monosekretions-Mutanten infizierten Endothelzellen. Die Anzahl der durchgeführten Versuche entspricht der Anzahl der Migrationsversuche (siehe Tabelle 15).

Um den Effekt der Infektion auf das Teilungsverhalten quantitativ zu bestimmen und signifikante Unterschiede interpretieren zu können, wäre eine wesentlich höhere Versuchszahl und bessere Statistik mit einer großen Zahl weiterer Kontrollen (Verfolgen der Zellpassagen, Veränderung der Infektionsbedingungen) notwendig. Diese Versuche konnten aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Insgesamt konnte keine klare Beziehung der Zellteilung zur An- oder Abwesenheit des Typ-III-Sekretionsapparat oder mehrerer oder einzelner Yops gemacht werden.

### 3.2.5 Apoptose

Visuelle Auswertungen der Mikroskop-Bilder zeigten, dass während der Messdauer von 15 h einige der beobachteten HUVEC-Zellen in Apoptose gingen. Um den Einfluss der Infektion auf die Apoptose bei HUVEC-Zellen bestimmen zu können, wurden diese Zellen nach bakterieller Infektion mit Annexin V gefärbt. Die Auszählung der mikroskopischen Bilder ergab einen apoptotischen Anteil von circa 0,5% der nicht-infizierten Zellen. Die Endo-

thelzellen wurden dann mit Yersinien-Mutanten infiziert, von denen angenommen werden konnte, dass diese Apoptose auslösen. Die Auswertung ergab, dass Zellen, die mit dem Kontroll-Stamm (Y.e.5/15) infiziert wurden, keinen erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen aufwiesen (0,5%). Das gleiche gilt für HUVEC-Zellen, die mit der Monosekretions-Mutante WA-CpTTSSYopH infiziert wurden. Endothelzellen, die mit dem Yersinien-Stamm WA-CpTTSSYopP oder dem Wildtyp (WA-314) infiziert wurden, zeigten einen Anteil an apoptotischen Zellen von nur 1,0%. Generell scheint also die Infektion mit Yersinien bei Endothelzellen im Rahmen des Meßfehlers keine erhöhte Apoptose-Rate auszulösen. Das hier eingesetzte Verfahren zur Bestimmung der Apoptose-Rate ist für so kleine Zahlen wie hier gemessen nicht gut geeignet und deshalb besonders fehlerbehaftet. Alternative Verfahren zur Bestimmung der Apoptose-Rate müssten im Labor etabliert werden, was den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Weitere Untersuchungen der Apoptose wurden deshalb hier nicht durchgeführt.

### 3.3 Beeinflussung des Aktinzytoskeletts

Das Zytoskelett der Zellen ist unter anderem beteiligt an der Phagozytose, der Zellteilung und ist mitverantwortlich für die aktiven Bewegungen der Zelle. Es baut sich auf aus Aktin, Tubulin und Intermediär-Filamenten. Aktin ist prozentual das häufigste intrazelluläre Protein eukaryotischer Zellen (bis zu 20% des Gesamtproteins) und ist an vielen essentiellen Vorgängen wie der Phagozytose und der Zellmigration beteiligt. Die Auswirkung der Infektion, durch den *Yersinia enterocolitica* Wildtyp und die Monosekretions-Mutanten, auf das filamentöse (F-)Aktin der migrierenden HUVEC-Zellen wurde daher in dieser Arbeit näher untersucht. Diese Versuche wurden durchgeführt um herauszustellen ob der *Yersinia enterocolitica* Wildtyp oder die Monosekretions-Mutanten die Zellmigration über die Modulation des F-Aktin's beeinflussen.

HUVEC-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und waren nach 3 Tagen zu einem Zellrasen gewachsen. Für 2 h wurden die HUVEC-Zellen mit Wildtyp-Yersinien oder deren Mutanten infiziert, als Kontrolle wurden HUVEC-Zellen unbehandelt belassen. Anschließend wurde der Zellrasen mit einer Pipettenspitze verletzt. Nach Migrationszeiten von 10 min und 2 h wurden die Zellen fixiert und das filamentöse (F-) Aktin mit Alexa-488-gekoppeltem Phalloidin sichtbar gemacht. Unter dem Mikroskop wurden dann die Zellen, die direkt am zellfreien Bereich liegen, näher untersucht. Dazu wurde jeweils ein Phasen-

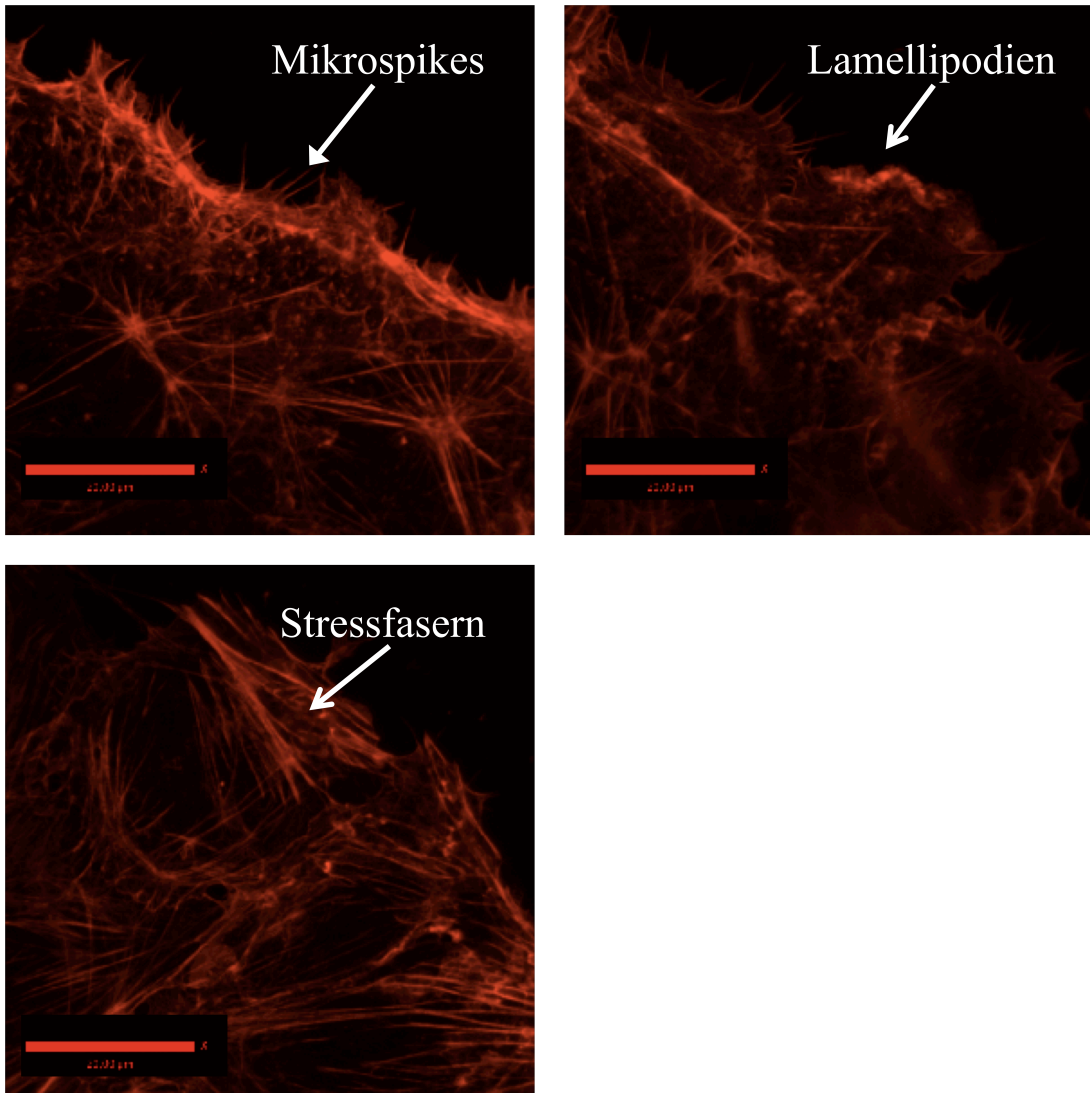


kontrastbild, eine Aktinfärbung (siehe Abbildung 23) und eine Überlagerung dieser beiden Aufnahmen („Merge“) ausgewertet. Dabei wurden drei unterschiedliche, zelluläre Strukturen beschrieben und quantitativ bestimmt: „Mikrospikes“, „Lamellipodien“ und „Stressfasern“:

- Mikrospikes sind stachelförmige Ausläufer der Zellperipherie und die Vorstufe von Filopodien.
- Lamellipodien sind hingegen breite Fortsätze der Zellperipherie und
- Stressfasern sind Aktinstrukturen, die in mehr oder weniger parallel verlaufenden, konzentrischen Aktinbündeln im Zellinneren vorliegen (Ridley et al. 1992; Raftopoulou und Hall 2003; Nobes und Hall 1995).

Diese Untersuchungen wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (nach 10 min und nach 2 h), da sich die drei Strukturen selbst zeitlich unterschiedlich entwickeln: Zelltyp-abhängig bilden sich Mikrospikes und Lamellipodien früh und Stressfasern später aus. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass ein zeitlich unterschiedlicher Einfluss der Yops auf die Entwicklung der Strukturen detektiert werden konnte. Als Negativkontrollen dienten unbehandelte HUVEC-Zellen (PBS-Kontrolle) und die Mutanten WA-C (Yersinien ohne Virulenz-Plasmid) und Y.e. 5/15 (Yersinien mit Virulenzplasmid, aber mit mutiertem nicht-funktionsfähigen Translokations-Apparat).

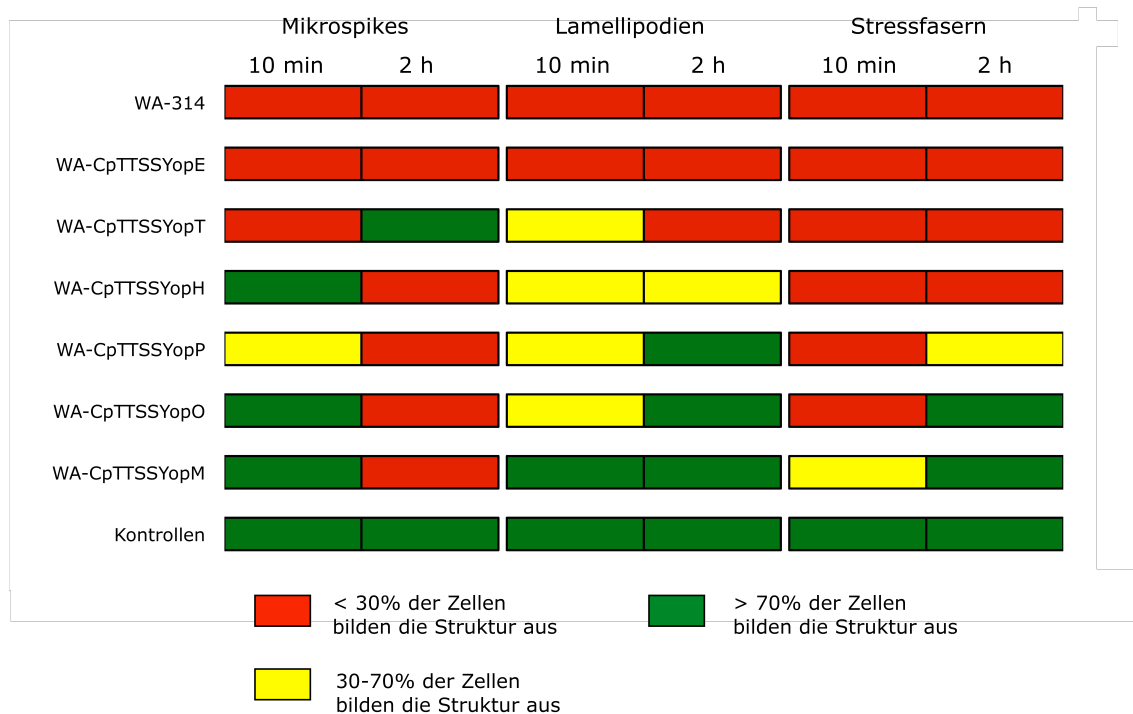
Zur Quantifizierung wurden zum einen die Anzahl (Z) der Zellen am Zellrand abgeschätzt, die eine definierte Struktur aufwiesen. Zum Anderen wurde der Ausprägungsgrad (A) einer definierten Struktur mit bestimmt aber nicht weiter ausgewertet (siehe Anhang A8). In einigen Fällen hatten alle Zellen (Z=100%) stark ausgeprägte Stressfasern, während in anderen Fällen keine Zelle (Z=0%) Stressfasern ausprägten. Entsprechend wurden Zellen beobachtet, die alle (Z=100%) Mikrospikes in einem hohen Ausmaß ausbildeten, während unter bestimmten Bedingungen gar keine Mikrospikes beobachtet wurden (Z=0%). Für Lamellipodien gab es Bedingungen, unter denen wenig Zellen in starkem Ausmaß Lamellipodien ausbildeten (Z=30%), während diese unter anderen Bedingungen reduziert waren (Z=0%). Die vollständigen, quantitativen Ergebnisse sind in Tabelle A8 (siehe Anhang) dargestellt.



**Abbildung 23:** Färbung des Aktinzytoskeletts von HUVEC-Zellen am Verletzungsrand.

Der zellfreie Bereich befindet sich, bei den hier gezeigten Bildern, oben bzw. oben-rechts. Die gezeigten HUVEC-Zellen wurden mit Kontroll-Yersinien (WA-C) infiziert. Anschließend wurde der Zellrasen verletzt und die Wanderung der HUVEC-Zellen in Richtung des zellfreien Areals nach 10 min (Mikrospikes und Lamellipodien) sowie nach 2 h (Stressfasern), über die Ausbildung der Aktin-Strukturen, näher untersucht. Der rote Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . Auf den oben ausgewählten Aufnahmen sind Aktinreiche phagozytotische „cubs“ zu sehen.

Die relative Anzahl der Zellen Z, die eine Aktin-Struktur ausbildeten (bezogen auf die Werte der nicht-infizierten HUVEC-Zellen), ist in Abbildung 24 wiedergegeben. Die Prozentsätze sind farblich unterschieden, damit die definierten Strukturen klar erkennbar sind: <30% (rot), 30-70% (gelb) und >70% (grün).



**Abbildung 24:** Darstellung der Anzahl der Zellen, die Mikrospiques, Lamellipodien oder Stressfasern ausbildeten. HUVEC-Zellen wurden nicht infiziert oder mit den aufgetragenen Yersinien-Stämmen infiziert und nach 10 min und 2 h auf die Ausbildung von Mikrospiques, Lamellipodien und Stressfasern hin untersucht. Es wurden je 5 Gesichtsfelder in 2 unabhängigen Versuchen ausgewertet. Die Werte in den Kontrollzellen wurden 100% gleichgesetzt.

Nach Verletzung des Zellrasens wanderten die uninfizierten Endothelzellen sowie die HUVEC-Zellen, die mit den Kontroll-Yersinien-Stämmen infiziert wurden, mit einer konstanten Geschwindigkeit und einer klaren Orientierung in das zellfreie Areal.

Bei der Untersuchung des Aktinzytoskeletts zeigte sich, dass in unbehandelten HUVEC-Zellen als auch in den mit Kontroll-Yersinien-Stämmen infizierten Endothelzellen Mikrospiques und Stressfasern in allen Zellen sowohl nach 10 min als auch nach 2 h, stark ausgeprägt sind ( $Z=100\%$ ). Lamellipodien wurden in unbehandelten und in den mit Kontroll-Yersinien-Stämmen infizierten Endothelzellen zu beiden Zeitpunkten nicht von allen Zellen ausgebildet ( $Z=20\%$ ). Allein durch die Anwesenheit der Kontroll-Yersinien-Stämme war kein Effekt auf das Aktinzytoskelett der Endothelzellen zu beobachten, da dieses dem

der unbehandelten HUVEC-Zellen entsprach. Folglich sind die Werte zusammengefasst und unter dem Begriff „Kontrolle“ in Abbildung 24 aufgetragen.

Die oben beschriebenen Zytoskelett-Strukturen waren weniger stark ausgeprägt in Zellen in einem intakten Zellrasen. Dies wurde bereits von Aepfelbacher et al. (1997) gezeigt. Hier ist die Wunde im Zellrasen der Stimulus, der die beschriebenen Aktin-Strukturveränderungen der unbehandelten und der mit Kontroll-Yersinien-Stämmen infizierten HUVEC-Zellen hervorruft. Diese Veränderungen sind Ausdruck eines Migrationsverhaltens der Zellen. Im Folgenden wurden nur die Zellen untersucht, die sich direkt am Rand des Zellrasens befanden.

Wurden die Endothelzellen mit Wildtyp-Yersinien infiziert, war das Aktin-Zytoskelett stark verändert: Lamellipodien wurden zu beiden Zeitpunkten nicht mehr beobachtet ( $Z=0\%$ ), Stressfasern und Mikrospikes traten sowohl nach 10 min als auch nach 2 h in Anzahl und Ausprägung erkennbar reduziert auf ( $Z=20\%$ ) (siehe Abbildung 24).

Die zunächst durchgeführten Infektionen der Endothelzellen mit den Kontroll-Yersinien-Stämmen zeigen, dass weder der Typ-III-Sekretionsapparat, noch weitere Plasmid- oder chromosomal kodierte Elemente für die Veränderung im Aktinzytoskelett der HUVEC-Zellen verantwortlich sind. Die 6 gemeinsam in die Wirtszelle geschleusten Yops rufen somit den Effekt des Wildtyps hervor. Um nun die Yops einzeln auf ihre Aktin-modulierende Wirkung hin zu untersuchen, wurden HUVEC-Zellen mit den Monosekretions-Mutanten infiziert und die Aktin-Strukturen der am Wundrand befindlichen Zellen untersucht.

Das Aktin-Zytoskelett wurde geringfügig durch die Infektion mit WA-CpTTSSYopO oder -YopM beeinflusst: Mikrospikes wurden nach 2 h vermindert ausgebildet. Stressfasern waren nach 10 min vermindert, aber nach einer Migrationszeit von 2 h wieder entsprechend der Strukturen in den Kontrollzellen ausgebildet. Ansonsten war das Aktinzytoskelett dem der nicht-infizierten, bzw. mit Kontroll-Yersinien-Stämmen infizierten Zellen am Wundrand ähnlich.

Veränderungen im Aktin-Zytoskelett, hervorgerufen durch die Infektion mit WA-CpTTSSYopP, waren deutlicher: bereits kurzfristig (schon nach 10 min) wurden die Mikrospikes in einem deutlich reduzierten Ausmaß gebildet und waren nach 2 h nahezu vollständig verschwunden. Die Lamellipodien waren in Zellen, die nur mit WA-CpTTSSYopP infiziert wurden, nach 10 min geringfügig reduziert, hingegen nach 2 h wieder stärker ausgeprägt. Die Stressfasern waren bereits nach kurzer Migrationszeit in geringerer Anzahl

vorhanden und weniger stark ausgebildet und auch nach einer Migrationszeit von 2 h in reduziertem Ausmaß vorhanden.

Die Infektion mit WA-CpTTSSYopH führt dazu, dass die Mikrospiques nach 10 min unverändert ausgebildet werden, nach einer Migrationszeit von 2 h treten die Mikrospiques allerdings in Anzahl und Ausprägung stark reduziert auf. Die Lamellipodien waren in Zellen, die mit WA-CpTTSSYopH infiziert wurden, nach einer Migrationszeit von 10 min und 2 h geringfügig reduziert. Die Stressfasern waren sowohl nach kurzer als auch nach einer Migrationszeit von 2 h in geringerer Anzahl vorhanden und weniger stark ausgebildet.

Die Infektion mit WA-CpTTSSYopT führt dazu, dass die Mikrospiques nach 10 min in Anzahl und Ausprägung stark reduziert auftreten, nach einer Migrationszeit von 2 h werden die Mikrospiques unverändert ausgebildet. Die Lamellipodien und Stressfasern waren in Endothelzellen, die mit WA-CpTTSSYopT infiziert wurden, nach einer Migrationszeit von 10 min und 2 h stark reduziert.

Anders als bei den anderen Yops zeigten mit WA-CpTTSSYopE vom Serotyp O:9-infizierte Zellen zu beiden Untersuchungszeitpunkten eine starke Reduktion sowohl der Anzahl der Stressfasern als auch der Zahl der Lamellipodien und Mikrospiques, und waren damit dem Wildtyp sehr ähnlich.

Die durch die Monosekretions-Mutanten infizierten Yops mit Ausnahme von WA-CpTTSSYopE zeigten ein Spektrum an Werten, das zwischen den unbehandelten und denen mit Wildtyp-Yersinien infizierten Endothelzellen lag. WA-CpTTSSYopM und -YopO beeinflussten das Aktin-Zytoskelett kaum, WA-CpTTSSYopP und -YopH dagegen erkennbar stark und WA-CpTTSSYopT und -YopE in stärkstem Ausmaß (siehe Abbildung 24).

In einigen Fällen setzte der Einfluss auf die Aktin-Strukturen zeitlich verzögert ein (zum Beispiel bei mit WA-CpTTSSYopM, -YopO und -YopH infizierten Zellen in Bezug auf die Mikrospiques), in anderen Fällen bildeten sich die anfänglich reduzierten Strukturen wieder zurück (bei Infektion durch WA-CpTTSSYopT in Bezug auf die Mikrospiques und bei Infektion mit WA-CpTTSSYopO und -YopM bei den Stressfasern). Generell zeigte die Infektion der Endothelzellen mit WA-CpTTSSYopE einen durchgehend ähnlichen Effekt wie der Wildtyp.

Die Daten zeigen eindeutig, dass die Yops das Aktin-Zytoskelett beeinflussen. Dies wurde sowohl für WA-CpTTSSYopE als auch für -YopT, -YopH und -YopO bereits beschrieben (Aepfelbacher et al. 2007). Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wer-

den, dass dieser Einfluss auch von WA-CpTTSSYopM und –YopP ausgeübt wird. Erstaunlich ist allerdings, dass die Infektion mit WA-CpTTSSYopO kaum das Aktinzytoskelett der HUVEC-Zellen verändert.

Die von den Yops verursachten Veränderungen im Aktinzytoskelett sind zweifellos eine mögliche Erklärung für das veränderte Wanderverhalten der HUVEC-Zellen.

### **3.4 Chemotaxis-Assay**

Im Labor wurde versucht, ein Chemotaxis-Assay zu etablieren, der die Untersuchung der Migration von Säugerzellen erlauben soll. Für diese Untersuchungen wurde das System der Firma Ibidi (Martinsried) eingesetzt. In einem Mikrosystem-Slide werden kleine Mengen von Zellsuspension in das Untersuchungsvolumen gegeben, dort wachsen die Zellen adhären an der beschichteten Oberfläche. Das Ibidi-System erlaubt es dann, das Untersuchungsvolumen einem chemischen Gradienten auszusetzen, in dem sich die Zellen ausrichten und im Gradienten wandern (siehe Abbildung 6).

Das experimentelle System wurde an HUVEC-Zellen getestet. Menschliche Endothelzellen wurden kultiviert, von der Oberfläche durch Trypsinierung gelöst und nach Waschen und Zentrifugation in Basalmedium (ECBM) resuspendiert, so dass den Zellen die Nährstoffe entzogen wurden, und sie hungerten. Nach 2 h waren die Zellen adhären, die Kammern des Untersuchungssystems wurden mit ECBM befüllt, und die Zellen wurden dann mit serumhaltigem Medium gelockt. Unter diesen Bedingungen beginnen gesunde Zellen, sich in Richtung des Gradienten auszurichten, einige wandern im Gradienten zur Nahrungsquelle.

Um den Einfluss der Effektorproteine der Yersinien auf das Migrationsverhalten von natürlichen Zielzellen weiter zu untersuchen, erfolgte die Etablierung des Chemotaxis-Assay für Makrophagen. Murine RAW-Makrophagen zeigen gute Adhärenz-Eigenschaften, die denen von alternativen Makrophagen-Linien wie J774 überlegen sind. Aus diesen Gründen wurden die RAW-Makrophagen für die weiteren Studien ausgewählt.

Die für die Migrations-Versuche eingesetzten Mikro-Slides müssen so vorbehandelt werden, dass die RAW-Makrophagen im Untersuchungs-Volumen auf der Oberfläche adhären werden können. Zunächst wurde die innere Oberfläche der Slides mit Rinder-Fibronectin beschichtet. Verschiedene Konzentrationen von Fibronectin wurden untersucht: 16, 50, 100 und 150 µg/ml. Unter diesen Bedingungen wurden die RAW-

Makrophagen nur in seltenen Fällen und nicht reproduzierbar adhären. Daraufhin wurde einer 100 µg/ml Konzentration von Fibronectin 0,1 µg/ml *E.coli* Lipopolysacharid (LPS) zugesetzt. *E.coli* LPS ist Hauptbestandteil der äußeren Zellwand von Gram-negativen Bakterien und wirkt als genereller Aktivator von Zellen des Immunsystems. Mit diesem Zusatz werden die RAW-Makrophagen reproduzierbar adhären.

Alternativ wurde Matrigel-Basement-Membrane-Matrix als Beschichtungs-Agens untersucht. Matrigel wird als besonders effektiv für die Anbindung von Zellen an Oberflächen beschrieben ([www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)), da es der natürlichen extrazellulären Matrix sehr ähnlich ist und neben Laminin, Kollagen IV und Proteoglycanen auch weitere Faktoren wie TGFβ, Wachstumsfaktoren und Plasminogen-Aktivator enthält. Matrigel wurde gemäß der Empfehlungen des Herstellers in einer Konzentration von 240 µg/ml bei Zugabe von 0,1 µg/ml *E. coli* LPS eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wurden RAW-Makrophagen aber nicht adhären. Matrigel wurde deshalb nicht weiter untersucht. In den folgenden Versuchen wurde als Beschichtungs-Agens die Lösung 100 µg/ml Fibronectin versetzt mit 0,1 µg/ml LPS eingesetzt.

RAW-Makrophagen wurden in das Analyse-System gegeben und untersucht. Nach Anlegen eines fMLP-Gradienten mit einer Ausgangskonzentration von 100 µM wurde die normale Chemokinese der Zellen beobachtet, aber weder konnte eine Ausrichtung noch eine Migration der Zellen beobachtet werden.

Anschließend wurde rm MCP-1 als Lockstoff in einer Konzentration von 1µg/ml eingesetzt. In diesem Gradienten zeigten die RAW-Makrophagen eine klar beobachtbare Ausrichtung und ein gutes Wanderverhalten. Um den Einfluss von Yop-Proteinen auf das Wanderverhalten von RAW-Makrophagen zu studieren, erfolgte eine Transfektion von Yop-kodierenden Plasmiden. Zur Kontrolle wurden die Makrophagen parallel mit GFP-Leervektoren transfiziert. In einer Vielzahl von Versuchen gelang es dann allerdings nicht, die transfizierten RAW-Makrophagen reproduzierbar in der Untersuchungskammer adhären zu lassen. Eine weitere Testung der RAW-Makrophagen in Bezug auf Chemotaxis-Vorgänge wurde nicht durchgeführt.

## 4 Diskussion

Enteropathogene Yersinien sind Bakterien, die über die Nahrungsaufnahme in den Darm höherer Lebewesen gelangen. Es gelingt ihnen dann, von spezifischen Darm-Epithelzellen (M-Zellen) aufgenommen zu werden und diese zu durchlaufen, um auf der Basalseite die M-Zellen wieder zu verlassen. Von nun an bleiben die Yersinien im Körper größtenteils extrazellulär. Die besondere Fähigkeit der M-Zellen, Yersinien aufzunehmen, liegt darin begründet, dass nur sie eine  $\beta$ 1-Integrin-Kette zum Darmlumen hin präsentieren. Die M-Zellen werden von den Yersinien in ihrer Funktion kaum beeinflusst; Yersinien sind vermutlich auch nicht in der Lage, M-Zellen abzutöten. Dies wäre kompatibel mit einer potentiellen Gesamtstrategie: Yersinien wollen die Ressourcen des Körpers nutzen und nicht über ein Abtöten der M-Zellen die Zerstörung des Wirts riskieren.

Der Körper versucht sich gegen diesen Bakterienbefall dadurch zu wehren, dass die Bakterien nach dem Durchlaufen der M-Zellen bereits im subepithelialen Gewebe des Ileums u. a. auf follikulär dendritische Zellen, Neutrophile und Makrophagen treffen, die die Aufgabe haben, die Bakterien zu phagozytieren und dafür zu sorgen, dass sie vom Immunsystem erkannt werden. Wenn aber die Yersinien die Ressourcen des Körpers nutzen wollen, um dort zu überleben und sich zu vermehren, müssen sie Mechanismen bereitstellen, die die Funktion der Immunzellen ausschalten und insbesondere die Phagozytose verhindern. Für diese zentrale Aufgabe verfügen die Yersinien über ein System von Proteinen, unter anderem über das Oberflächenprotein YadA und über die „Yersinia outer proteins“ (Yops), über die die Yersinien intrazelluläre Prozesse insbesondere von dendritischen Zellen, Makrophagen und Neutrophilen beeinflussen (Marketon et al. 2005). Darüberhinaus unterdrücken die Yersinien die Zellmigration. In dieser Arbeit wird für den Yersinien-Wildtyp, für Kontroll-Mutanten als auch für die Yops jeweils einzeln bestimmt, in welchem Ausmaß sie die Phagozytose inhibieren und die Migration der Zellen beeinflussen. Inwieweit der Einfluss auf die Zellmigration mit dem Einfluss auf das Aktinzytoskelett korreliert, wird herausgestellt.



#### 4.1 Expression der „Yersinia outer proteins“ (Yops)

Die human-pathogenen Yersinien tragen ein Virulenz-Plasmid (pYV) von 70 kb Größe. Yersinien, die kein Virulenzplasmid tragen, sind avirulent. Wird aber das Virulenzplasmid in avirulente Yersinien-Stämme überführt, sind die Bakterien im Tierversuch pathogen (Bölin et al. 1985). Die Plasmid-kodierten Elemente tragen somit entscheidend zu der Pathogenität von Yersinien bei. Das Yersinien-Virulenzplasmid kodiert für zahlreiche Proteine (Snellings et al. 2001), von denen allerdings nur die „Yersinia outer proteins“ (Yops) über die Typ-III-Sekretion ausgeschleust werden. Die Yops werden also von den Yersinien benötigt, um die Funktion der Körperzellen im subepithelialen Gewebe zu beeinflussen. Vorher, im Darm und in den M-Zellen, werden die Yops noch nicht benötigt. Entsprechend wird die bakterielle Expression der Proteine geregelt: Bei Umgebungstemperatur teilen sich die Yersinien häufig (Optimum bei 27 °C), exprimieren die Yops aber nicht (Bölin et al. 1985; Straley, 1991). Durch die Aufnahme in den Körper erhöht sich die Umgebungstemperatur der Yersinien auf 37 °C. Yersinien sind offensichtlich in der Lage, Umgebungsparameter zu bestimmen (Bölin et al. 1985). Von Zahorchak (1979) wurde vorgeschlagen, dass *Y. pestis* die intrazellulär niedrige und die extrazellulär hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wahrnimmt. Die niedrige intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration könnte die Expression der Plasmid-kodierten Determinanten (V- und W-Antigene) triggern (Bölin et al. 1985). Dies wird auch für die Expression der Yops von Straley (1991) beschrieben.

Eventuell trifft dieser Mechanismus auch auf die Regulation der Genexpression der enteropathogenen Yersinien zu. Die Expression der Yops könnte durch den Aufenthalt der Yersinien in den M-Zellen des Darms (37 °C und niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration) ausgelöst werden. Liegen die Yersinien nach Durchwandern der M-Zellen im subepithelialen Gewebe wieder extrazellulär vor, können sie sich mit den nun gebildeten Yops gegen z.B. Neutrophile und dendritische Zellen durch die Vermittlung eines Phagozytose-Schutzes und der Inhibition der Migration von Immunzellen verteidigen. Im extrazellulären Milieu verlieren die Yersinien dann eventuell die Fähigkeit, die Yops zu synthetisieren, sind aber in der Lage, sich erneut zu teilen. Nach der Teilung fehlt den Yersinien, da sie nicht intrazellulär vorliegen, der erneute optimale Trigger (37 °C und niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration), um Yops in hoher Konzentration zu produzieren; sie haben also den hohen Schutz gegenüber dem Immunsystem verloren. Dies könnte dazu führen, dass im Verlauf der Infektion die Yersinien nun von Zellen des Immunsystems aufgenommen werden. Neutrophile sind wichtige Zellen der angeborenen humanen Abwehr, die zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infekti-

on bereits zum Infektionsort gelockt werden. In den Neutrophilen, anders als in den M-Zellen des Darms, können die Yersinien eventuell die Yops nicht herstellen, da sie zu schnell abgebaut werden.

Ein solcher Expressionsmechanismus würde die selbst-limitierte Infektion erklären, die durch Yersinien bei immun-kompetenten Menschen hervorgerufen wird. So wären die Yops Proteine, die es den Yersinien erlauben würden, kurz den Menschen zu befallen und sich in ihm zu vermehren, eventuell mit dem Ziel, von den Ressourcen des humanen Wirts zu profitieren und über den Stuhl wieder ausgeschieden zu werden.

## 4.2 Das Infektions-Modell und die Phagozytose

Enteropathogene Yersinien verfügen über chromosomal und virulenzplasmid (pYV) kodierte Pathogenitätsfaktoren. Das Plasmid kodiert für: die „*Yersinia* outer proteins“ (Yops) (Heesemann et al. 1986), den Typ-III-Sekretionsapparat (TTSS), Regulatoren der Genexpression und Yop-Sekretion/Translokation und das Adhesin YadA (Snelling et al. 2001; Cornelis 2002; Barnes et al. 2006). Die Yops werden in den Yersinien synthetisiert und, meist mit Hilfe von Chaperonen, derart gefaltet, dass sie durch das nadelförmige Translokations-System ausgeschleust werden können.

Zur Funktionsuntersuchung der Yops ist es deshalb wichtig, dass die Yops im Bakterium synthetisiert und über den bakteriellen Translokations-Apparat in die humanen Zellen transloziert werden. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit die untersuchten Proteine über das Typ-III-Sekretions-System transloziert.

Neben dem Yersinien Wildtyp (WA-314) und den Kontroll-Stämmen (WA-C, WA,CpTTSS und Y.e.5/15) wurden die von Trültzsch hergestellten Monosekretions-Mutanten verwendet (Trültzsch et al. 2003). Die Monosekretions-Mutanten sind Yersinien, die die chromosomal kodierten Elemente (WA-C) und zusätzlich 2 Plasmid-Gene beinhalten. Eines der Plasmidgene trägt die Typ-III-Sekretions-Region des *Yersinia enterocolitica* WA-314 Virulenz-Plasmids pYVO:8 und das *Yersinia* Adhäsine *yadA*. Das zweite Plasmid trägt die Yop-Gene und im Fall von YopE, YopH und YopT die zugehörigen Gene der Chaperone.

Es wurde bereits durch einen „Released Proteins-Assay“ und anschließende SDS-PAGE und Coomassie-Färbung gezeigt, dass die Monosekretions-Mutanten YopO, YopM, YopP, YopT, YopE und YopH in den Überstand sezernieren. Aus HeLa-Zellen wurden YopE,

YopM und YopT isoliert, welche durch die Monosekretions-Mutanten in die Zellen transloziert wurden. Durch eine nachgewiesene Modifikation von RhoA durch YopT konnte die Aktivität der Monosekretions-Mutante, die nur YopT transloziert, bereits gezeigt werden (Trülzsch et al. 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels eines funktionalen Tests, der Inhibition der Phagozytose, die Eigenschaften der Monosekretions-Mutanten ergänzend überprüft. Der antiphagozytäre Effekt der Yops wurde bereits mit Hilfe von anderen Yersinien-Mutanten durch zahlreiche Publikationen gezeigt. Die Phagozytose wurde hier aber erneut untersucht, um die Eigenschaften der Monosekretions-Mutanten herauszustellen.

Um zu überprüfen, inwieweit der Wildtyp und in welchem Ausmaß einzelne Yops, die mit Hilfe der Monosekretions-Mutanten in die humanen HUVEC-Zellen gelangen, die Phagozytose der Yersinien verhindern können, wurden HUVEC-Zellen mit den Wildtyp-Yersinien sowie den Monosekretions-Mutanten infiziert. Dieser Versuch erlaubt Rückschlüsse auf die Aktivität der durch Monosekretions-Mutanten in humane Zellen injizierten Effektorproteine und bestätigt die Funktionalität dieser Mutanten.

Wurden die Endothelzellen mit Wildtyp-Yersinien (WA-314) infiziert, wurden die Bakterien kaum noch phagozytiert: nur ca. 2% der Bakterien lagen intrazellulär vor. Bei den hier durchgeführten Kontroll-Versuchen wurde wie erwartet beobachtet, dass die HUVEC-Zellen alle drei genannten Yersinien-Kontroll-Mutanten (WA-C, WA,CpTTSS und Y.e.5/15) zum großen Teil (zu 90%) phagozytierten. Die Yersinien-Mutanten, die jeweils nur YopO oder YopM exprimierten, wurden von den Endothelzellen zum größten Teil phagozytiert (78% der Bakterien wurden aufgenommen). YopO trägt, synergistisch mit anderen Yops, zur antiphagozytären Wirkung von *Yersinia enterocolitica* bei (Grosdent et al. 2002). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass Yersinien, die nur YopO exprimieren (WA-CpTTSSYopO), zu 17% weniger phagozytiert werden als Yersinien, die über keine funktionalen Yops verfügen: WA-CpTTSSYopO allein vermittelt also nur einen geringen Phagozytose-Schutz. Yersinien, die nur YopP exprimieren, vermittelten keinen Phagozytose-Schutz (im Mittel werden 90% der Bakterien aufgenommen). WA-CpTTSSYopT-infizierte Endothelzellen phagozytieren 58% dieser Yersinien-Mutante. WA-CpTTSSYopE O:9-infizierte Zellen phagozytierten die Bakterien-Mutanten in den meisten Fällen (58% der Bakterien liegen intrazellulär vor). WA-CpTTSSYopH-infizierte Zellen phagozytierten 44% dieser Yersinien.

Der Yersinien-Wildtyp (WA-314) war in der Lage, seine Phagozytose nahezu vollständig zu verhindern. Dazu war keines der einzelnen Yops allein fähig. WA-CpTTSSYopH vermittelte einen 56%igen Phagozytose-Schutz. WA-CpTTSSYopE und -YopT konnten jeweils allein die Phagozytose der Yersinien durch HUVEC-Zellen auf ca. 65% bzw. 50% reduzieren. Eventuell erreichen diese drei Yops gemeinsam eine nahezu vollständige Verhinderung der Phagozytose, wie im Wildtyp realisiert; möglicherweise ist dies die Hauptfunktion der Yops. Eine starke Verringerung des Wanderverhaltens mag darüber hinaus eine weitere sinnvolle Ergänzung in der Beeinflussung der befallenen Zellen sein, um ein Wandern z.B. von Immunzellen zum nächstgelegenen lymphatischen Organ bzw. Lymphknoten zu verhindern.

### **4.3 Verhalten der Wirtszellen ohne Injektion von Yops**

Zellen wie z. B. Epithel- und Endothelzellen bewegen sich entlang ganz bestimmter Routen (Ridley 2001; Lämmermann et al. 2008). Das Integrin-Repertoire jeder dieser Zellen bestimmt, welche Substrate für die adhäsionsabhängige Migration genutzt werden können. Diese limitierten Möglichkeiten zwischen substratspezifischer Bindung und Migration bewirken die Wanderung der Zellen auf vorbestimmten Wegen. Eine wichtige Voraussetzung für die Zellmigration in der 2-dimensionalen Ebene und für die Migration von Zellen, die integrinabhängig wandern, ist die Zelladhäsion. Die Zelladhäsion führt zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und zur Induktion von Signalkaskaden. Durch spezielle Zelloberflächen-Rezeptoren (vor allem durch Integrine) wird die Zelladhäsion vermittelt. Dieser Prozess der Migration setzt sich bei der adhäsionsabhängigen Migration aus der Bildung von Lamellipodien, der Ausbildung neuer Adhäsionen an der führenden Seite, der Zell-Kontraktion und der Ablösung des hinteren Endes der Zelle zusammen (Raftopoulou und Hall 2003). Um den Einfluss der Yersinien auf die Migration in 2-dimensionalen Raum zu untersuchen, eignen sich Endothelzellen, da diese Zellen auch in ihrer natürlichen Umgebung integrinabhängig und daher 2-dimensional wandern. Zusätzlich können Endothelzellen Bakterien phagozytieren und zeigen Ähnlichkeiten zu professionellen Zellen des Immunsystems (Pober und Sessa 2007).

Es wurden daher primäre humane Endothelzellen (HUVEC) als Wirtszellen verwendet.

Nach Verletzung des Zellrasens wanderten die Zellen mit einer konstanten Geschwindigkeit von 38  $\mu\text{m}/\text{h}$  mit einer klaren Ausrichtung in das zellfreie Areal. Circa 22% der Zellen

teilten sich während 15 h, und nur wenige Zellen (0,5%) gingen in Apoptose. In den zum Wundrand gelegenen Zellen war das Aktin-Zytoskelett während der Migration stark ausgeprägt.

Im Folgenden wurden diese Parameter für Zellen, infiziert mit Yersinien, bestimmt, ohne dass Yops in die Wirtszellen übertragen wurden. Drei verschiedene Yersinien-Mutanten wurden eingesetzt:

- Mutante WA-C enthält kein Virulenzplasmid (pYV). Auf dem Virulenzplasmid sind neben den Yops auch das bakterielle Oberflächen-Protein YadA und das Typ-III-Sekretions-System kodiert. Der WA-C-Mutante fehlen also die Yops, YadA und das Translokations-System.
- Mutante WA-CpTTSS enthält das Typ-III-Sekretions-System und YadA ohne weitere Elemente des Virulenzplasmids. Diese Mutante verfügt also nicht über die Yops.
- Mutante Y.e. 5/15 enthält ein mutiertes Virulenzplasmid, in dem das Typ-III-Sekretions-System verändert und nicht funktional ist, so dass YadA und die Yops exprimiert werden, die Yops aber nicht übertragen werden können.

Mit diesen drei Mutanten infizierte Endothelzellen zeigten das gleiche Wanderverhalten wie nicht-infizierte HUVEC-Zellen. Dies betraf sowohl die Wander-Geschwindigkeit als auch die Wander-Orientierung in den zellfreien Raum. Das bedeutet, dass weder das chromosomal-kodierte Oberflächenprotein Inv noch das plasmid-kodierte, bakterielle Oberflächen-Protein YadA noch das Typ-III-Sekretions-System noch irgendein anderer mit Infektion verbundener, zellulärer Parameter einen relevanten Einfluss auf das Wanderverhalten der HUVEC-Zellen haben. Diese mutierten Yersinien beeinflussten die Zellen allerdings, wenn auch nur sehr geringfügig, in der Verteilungsbreite der Wander-Orientierung. Dieser, wenn auch kleine Effekt zeigte aber, dass ein bakterieller Einfluss nachweisbar ist, der mit dem Zell-Zell-Kontakt in Verbindung gebracht werden kann. Verwundete, einschichtige Zellrasen reagieren auf die Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte und auf die erhöhte Konzentration von Wachstumsfaktoren an den Wundrändern mit einem Wundverschluss durch Zellproliferation und Migration (Wong und Gotlieb 1988; Coomber und Gotlieb 1990; Zahm et al. 1997). Da bei Infektion mit den Yersinien-Kontrol-Mutanten zusätzlich zu der Wunde im Zellrasen Oberflächen-Strukturen der HUVEC-Zellen durch den Bakterien-

Wirtszell-Kontakt beeinflusst sind, mag dies eine Erklärung für die Beeinflussung der Verteilungsbreite der Wander-Orientierung sein.

Es traten auch keine Abweichungen in der Struktur des Aktin-Zytoskeletts auf: es wurden keine Unterschiede in der Anzahl und Ausprägung der Stressfasern, der Lamellipodien und der Mikrospikes beobachtet. Die Anwesenheit der Yersinien beeinflusste also nicht die zellinterne Struktur des Aktin-Zytoskeletts. Dieses Ergebnis ist konsistent mit dem oben beschriebenen, unveränderten Wanderverhalten der Zellen, da das Aktin-Zytoskelett als Grundstruktur in direktem Zusammenhang mit dem Zellwandern steht. Dabei beeinflusste die Phagozytose der nicht-virulenten Yersinien offensichtlich die Struktur des Aktin-Zytoskeletts der HUVEC-Zellen kaum.

Erkennbare Unterschiede zwischen nicht-infizierten und mit Kontroll-Stämmen infizierten HUVEC-Zellen wurden hingegen für die Zellteilung beobachtet. Offensichtlich verringert die Anwesenheit der Yersinien die Zellteilungs-Rate der HUVEC-Zellen.

#### **4.4 Infektion mit dem Yersinien-Wildtyp (WA-314)**

Das Wanderverhalten der Zellen, die mit Wildtyp-Yersinien infiziert wurden, war stark beeinflusst: die Wander-Geschwindigkeit war reduziert auf 14% des Wertes der nicht-infizierten Zellen. Darüber hinaus war die Wander-Orientierung in den zellfreien Bereich praktisch völlig verloren: die Wildtyp-infizierten HUVEC-Zellen wanderten in alle Richtungen, ohne Bevorzugung der Richtung des zellfreien Raumes. Die Zellteilung war stark reduziert. Dabei war die Apoptoserate weiterhin sehr niedrig und gegenüber den nicht-infizierten HUVEC-Zellen nicht meßbar erhöht. Das Aktin-Zytoskelett war stark verändert: Lamellipodien wurden nicht mehr beobachtet, Stressfasern und Mikrospikes traten in Anzahl und Ausprägung erkennbar reduziert auf. Ein kleiner, aber klar messbarer Anteil der Zellen war in der Lage, die Zellteilung einzuleiten, aber nicht erfolgreich abzuschließen; offensichtlich war die Zytokinese gestört. Dies könnte verursacht sein durch die beobachtete Veränderung des Zytoskeletts, d. h. der Reduktion der Stressfasern, Lamellipodien und Mikrospikes.

Da das Zytoskelett jeder Zelle die Basis für die aktive Bewegung der Zelle darstellt, können die Veränderungen im Aktin-Zytoskelett die Reduktion der Migration der HUVEC-Zellen gut erklären.

Die Yersinien sind also in der Lage, die Funktion der Zellen stark zu beeinflussen: sie verhindern die eigene Phagozytose und blockieren eine gerichtete Bewegung der Zellen. Der Vergleich dieser Ergebnisse für mit dem Wildtyp infizierte HUVEC-Zellen mit den Daten zu den oben beschriebenen Yersinien-Mutanten zeigt eindeutig, dass diese Veränderungen der Zelleigenschaften durch die Injektion der Yops zustande kommen. Es bleibt bei diesen Beobachtungen aber unklar, inwieweit diese Zellveränderungen über die vielfältige Funktion des Aktin-Zytoskeletts kausal miteinander verknüpft sind.

#### **4.5 Injektion einzelner Yops**

Um die Zellen des subepithelialen Gewebes in ihren Eigenschaften zu verändern, injizieren die Yersinien eine Reihe von Proteinen, die Yops, in ihre Zielzellen (Heesemann et al. 2006). Diese Yops sind in der Lage, essentielle Parameter der Zellen, wie oben für HUVEC-Zellen gezeigt, mehr oder minder stark zu beeinflussen: das Teilungsverhalten, das Zytoskelett und die gerichtete Bewegung (nicht aber, wie hier gezeigt, die Apoptose). In dieser Arbeit wurde deshalb bestimmt, welche der Yops jeweils in welchem Ausmaß für diese Veränderungen verantwortlich sind. Die Yops wurden mit Hilfe der bereits beschriebenen Monosekretions-Mutanten in die HUVEC-Zellen injiziert.

##### **4.5.1 YopO, YopM**

Wurden Zellen mit WA-CpTTSSYopO oder -YopM infiziert, reduzierte sich die Wandergeschwindigkeit geringfügig auf 70% des Wertes der nicht-infizierten Zellen für mit WA-CpTTSSYopO und auf 58% für mit WA-CpTTSSYopM infizierten Zellen. Die Wanderorientierung in Richtung des zellfreien Raumes war leicht reduziert, aber eindeutig weniger reduziert als für den Yersinien-Wildtyp. Auch die Zellteilungsrate war leicht verringert. Das Aktin-Zytoskelett wurde geringfügig durch Infektion mit WA-CpTTSSYopO oder -YopM beeinflusst: Mikrospikes wurden nach 2 h und Stressfasern nach 10 min vermindert ausgebildet. Ansonsten war das Aktinzytoskelett dem der Kontrollzellen ähnlich.

YopO wird als inaktive Serin/Threonin-Kinase produziert, die durch die Interaktion mit Aktin aktiviert wird (Viboud und Bliska 2005). Die hier beobachtete Aktin-beeinflussende Wirkung von YopO ist nur gering ausgeprägt und kann den geringen Phagozytose-Schutz und die geringe migrationshemmende Wirkung von YopO gut erklären. Dies Ergebnisse

decken sich nicht mit den Daten von Trasak et al. (2007), die eine vollständige Zerstörung des Zytoskeletts durch transfiziertes GFP-markiertes YopO beobachteten.

YopO assoziiert mit Rac1. Im Lamellipodium wird die Aktin-Polymerisation durch Rac1 induziert (Ridley 2001). Die Rac1-abhängig entstehenden, kleinen Filamente bilden den Ausgangspunkt für den Aufbau höherer Aktinstrukturen wie Stressfasern (Small et al. 1998). YopO könnte Rac1 teilweise oder ganz inhibieren. Im Einklang mit diesem molekularen Wirkmechanismus wurde in den hier durchgeführten Versuchen nach einer 10 minütigen Wanderzeit eine geringere Anzahl und Ausprägung der Lamellipodien und Stressfasern beobachtet, also eine Reduktion im Vergleich zur Wirkung der Yersinien-Mutanten, die keine Yops exprimierten. Nach einer Migrationszeit von 2 h dagegen waren aber die Aktinstrukturen wieder entsprechend der Strukturen in den Kontrollzellen ausgebildet (siehe Abbildung 24). Rac1 scheint in HUVEC-Zellen also, wenn überhaupt, nur zu Beginn der Migrationsphase durch Infektion mit WA-CpTTSSYopO inhibiert zu sein, oder es gibt weitere Signalwege, über die es Rac1-unabhängig zur Ausbildung der entsprechenden Strukturen kommen kann.

Die hier gefundene Wirkung durch Infektion mit WA-CpTTSSYopM auf die Phagozytose und das Aktin-Zytoskelett sind gering. YopM verursacht allerdings, dass HUVEC-Zellen, die mit WA-CpTTSSYopM infiziert wurden, in ihrer Migrationsfähigkeit inhibiert sind. Die Wanderorientierung der Zellen bleibt aber unverändert gut. YopM wirkt v.a. auf die Wander-Geschwindigkeit, aber nicht über direkten Einfluß auf das Aktinzytoskelett. Andere Yops beeinflussen die Teilungsrate stärker als YopM. Eventuell sind die beobachteten Veränderungen nur ein Begleiteffekt der tatsächlichen Wirkung von YopM.

#### **4.5.2 YopP**

Yersinien, die nur YopP exprimieren, zeigten eine verringerte Wandergeschwindigkeit auf 51% (bezogen auf nicht-infizierte Zellen) mit einer nur geringfügig verminderten Wanderorientierung. Veränderungen im Aktin-Zytoskelett waren deutlicher: bereits kurzfristig (schon nach 10 min) wurden die Mikrospikes in einem deutlich reduzierten Ausmaß gebildet und waren nach 2 h nahezu vollständig verschwunden. Die Lamellipodien waren in Zellen, die nur mit YopP infiziert wurden, nach 10 min geringfügig reduziert, hingegen nach 2 h wieder stärker ausgeprägt. Die Stressfasern waren bereits nach kurzer Migrations-



zeit in geringerer Anzahl vorhanden und weniger stark ausgebildet. Die Zellteilungsrate der HUVEC-Zellen war, wie bei Infektion mit WA-CpTTSSYopO und -YopM, nur leicht verringert und der Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zu den Kontrolle-Zellen kaum verändert.

Als einziges der Yop-Proteine zeigt YopP eine starke Veränderung des Aktin-Zytoskeletts und der Migration, gekoppelt mit fehlendem Phagozytose-Schutz. Dies weist darauf hin, dass beide Prozesse, Phagozytose und Migration, nicht automatisch miteinander funktionell verknüpft sind.

Die Hemmung der MAPK- und NF- $\kappa$ B-Signalwege durch YopP wird benötigt, um die angeborene Immunabwehr zu unterdrücken; außerdem soll YopP die Apoptose von Makrophagen vermitteln (Palmer et al. 1998). Die Transfektion von YopP in eukaryotische Zellen resultierte aber nicht im Sterben der Zellen (Monack et al. 1997; Palmer et al. 1999). Mit WA-CpTTSSYopP infizierte HUVEC-Zellen zeigten, wie hier beobachtet, auch keinen signifikant erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen. Möglicherweise löst YopP nur in Makrophagen, nicht aber in Endothelzellen Apoptose aus. Ein solcher zellspezifischer Effekt wäre möglich, ist aber zur Zeit nicht bewiesen: sollten Makrophagen durch die bakterielle Translokation von YopP apoptotisch werden, wäre die Inhibition der Phagozytose durch andere Yops irrelevant, da die phagozytierenden Zellen ohnehin sterben. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Yops evtl. zeitlich versetzt transloziert werden, desweiteren ist die Menge der translozierten Yops vermutlich relevant.

Invasin, das die Yersinien auf ihrer Oberfläche exprimieren, vermittelt nicht nur die Internalisation in Epithelzellen des Darms, sondern auch, unabhängig von der Aufnahme, die Aktivierung von Signalkaskaden, die zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und zur Produktion von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen führen (Schulte und Autenrieth 1998; Kampik et al. 2000; Schulte et al. 2000). Unabhängig von der Aufnahme von Bakterien in humane Zellen kann auch YadA die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen induzieren. Wirtszell-Signalkaskaden, die in Gang gesetzt werden, führen zu einer ähnlichen Zytokin-Freisetzung wie die, die durch Invasin hervorgerufen wird (Bliska et al. 1993; Yang und Isberg 1993; Eitel und Dersch 2002; Schmidt et al. 2004). Die Hemmung der MAPK- und NF- $\kappa$ B-Signalwege durch YopP und die Aktivierung dieser Signalwege durch Invasin und YadA sind gegensätzliche Mechanismen, die eventuell zeitgleich ablaufen. Makrophagen werden vermutlich resistent gegenüber der Apoptose, da sie mit dem aktivierten Immunsystem in Kontakt kommen. Im Laufe der Infektion ist die Entwicklung einer Endotoxin-

Toleranz potenziell vorteilhaft für den Wirt, weil die LPS-Desensibilisierung die Phagozytose-Funktion der Makrophagen nicht beeinflusst, aber einen Schutz vor der Yersinien induzierten Apoptose liefert. Das Reprogrammieren der Makrophagen während des Infektionsprozesses resultiert in einer Endotoxin-Toleranz und kann dem Wirt helfen, die Infektion zu beenden (Ruckdeschel und Richter 2002). Desweiteren wird zu Beginn der Infektion YopE in die Makrophagen sezerniert. YopE ist ein bakterielles Protein, dem die Rolle des Porenverschlusses zugeschrieben wird. YopE könnte somit das Übertreten von YopP blockieren; dies würde die Apoptose zu Beginn der Infektion ebenfalls verhindern. Auch andere Zellen können phagozytieren (Poher und Sessa 2007), die sehr wahrscheinlich nicht apoptotisch werden, z. B. Endothelzellen. Eventuell vermittelt YopP nur in der Zellkultur die Apoptose der Makrophagen, nicht aber *in vivo*.

Die hier erzielten Daten deuten an, dass andere Yops für das extrazelluläre Überleben der Yersinien verantwortlich zu sein scheinen, insbesondere die Yops, die die Phagozytose inhibieren und die Migration beeinflussen. Welchen Stellenwert die Inhibition der Migration, hervorgerufen durch die Translokation von YopP, auf das Pathogenitäts-Potential der Yersinien hat, ist unklar.

#### 4.5.3 YopT

Von Aepfelbacher et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass YopT überexprimierende Yersinien-Mutanten Aktin-reiche, phagozytotische „cups“ und podosomale Adhäsionen zerstören. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen die oben getroffenen Aussagen: Yersinien, die nur über das Effektorprotein YopT verfügen, werden zu 42% weniger phagozytiert als Yersinien, die über keine Yops verfügen. YopT-infizierte Zellen zeigten eine Wandergeschwindigkeit von 48% des Wertes der nicht-infizierten Zellen, allerdings mit stark reduzierter Wander-Orientierung. Die Zellteilungsrate ist ähnlich beeinflusst wie bei anderen Yops. Das Aktin-Zytoskelett ist in allen drei Struktur-Typen reduziert.

Die zerstörende Wirkung von YopT auf Stressfasern wurde bereits beschrieben (Iriarte et al. 1998). YopT fungiert als Cystein-Protease, die Lipidanker von RhoA, Rac1 und Cdc42 abspaltet (Zumbihl et al. 1999; Shao et al. 2003). Bakteriell transloziertes YopT wirkt *in vivo* überwiegend auf RhoA und weniger auf Rac1 oder Cdc42. Die Kontraktion des Zellkörpers wird unter anderem durch RhoA reguliert (Ridley 2001; Mitchison und Cramer 1996). Die von den Fokalkontakten ausgehenden Stressfasern aus Aktomyosin sind an das

restliche Mikrofilamentsystem der Zelle angebunden und helfen bei der Vorwärtsbewegung der Zelle. In dieser Arbeit wurde in mit WA-CpTTSSYopT-infizierten HUVEC-Zellen eine starke Reduktion der Stressfasern beobachtet, was mit der ebenfalls beobachteten Reduktion der Migration in Verbindung gebracht werden kann. Diese Beobachtung wäre konsistent mit der beschriebenen Wechselwirkung von YopT mit RhoA, da YopT über die Veränderung von RhoA die Bildung von kontraktilen Stressfasern inhibieren könnte. Entsprechend dieser Vermutung würde eine Cystein-Protease-Minus-Mutante von YopT (WA-CpTTSSYopT(C139A)), die nicht mit der GTPase RhoA interagieren kann, nicht mehr dieses sondern das Verhalten der mit Kontroll-Stämmen infizierten HUVEC-Zellen zeigen (keine Beeinflussung des Zytoskeletts und der Migration). Dies ist aber nicht der Fall (siehe unten): die oben beschriebene Funktion von YopT ist für diese Prozesse also nicht verantwortlich.

Zusätzlich kann YopT über seine Cystein-Protease-Aktivität die aktive GTP-gebundene Form von Rac1 von der Plasmamembran trennen (Wong und Isberg 2005). Zu berücksichtigen ist, dass diese Daten durch Überexpression der Reaktionskomponenten gewonnen wurden. Rac1 reguliert durch viele nachfolgende Signalproteine die F-Aktin-Akkumulation am Leitsaum der Zelle, die die Basis für die Ausbildung von Lamellipodien darstellt. Desweiteren entstehen Rac1-abhängig kleine Filamente, die den Ausgangspunkt für den Aufbau von Stressfasern bilden (Small et al. 1998). Eventuell kann das durch YopT nicht mehr an der Plasmamembran gebundene Rac1 die F-Aktin-Akkumulation am Leitsaum der Zelle (und damit die Ausbildung von Lamellipodien) nicht mehr regulieren, was direkt die Migrations-Eigenschaften der Zelle beeinflussen würde. Wieder müsste eine YopT-Cystein-Protease-Minus-Mutante (WA-CpTTSSYopT (C139A)), die ja nicht mehr Rac-1 modifiziert, das Verhalten der Kontroll-Mutanten zeigen. Dies wurde in den hier vorgestellten Versuchen nicht gefunden.

Die katalytische Aktivität von YopT ist C-terminal lokalisiert (Sorg et al. 2003) und drei Domänen in dieser Region (Cys-139, His-258 und Asp-274) werden für die enzymatische Aktivität von YopT als Cystein-Protease benötigt. Wird die katalytische Proteaseaktivität von YopT inaktiviert (Mutante WA-CpTTSSYopT(C139A)), änderte sich überraschenderweise und im Widerspruch zu den obigen Erklärungs-Vorschlägen weder die Wander-geschwindigkeit noch die Zellteilungsrate; die Wander-Orientierung ist allerdings leicht verbessert. Die hier erzielten Ergebnisse belegen also, dass die Protease-Domäne von

YopT offensichtlich nicht die Aktivität ist, die die Veränderungen des Wanderverhaltens der infizierten Zellen bestimmt.

#### 4.5.4 YopE

YopE ist in verschiedenen Yersinien-Serotypen leicht unterschiedlich. WA-CpTTSSYopE O:9-infizierte Zellen zeigten eine Wandergeschwindigkeit von 44% relativ zu nicht-infizierten Zellen mit einer hohen Wander-Orientierung. Anders als bei den anderen Yops zeigten mit WA-CpTTSSYopE O:9-infizierte Zellen eine starke Reduktion sowohl der Anzahl der Stressfasern als auch der Zahl der Lamellipodien und Mikrospikes, und waren damit dem Wildtyp sehr ähnlich. Eine YopE-Mutante mit zusätzlichen Ubiquitylierungsstellen wird schneller proteosomal abgebaut (Hentschke et al. 2007). Wurden Zellen mit einer entsprechenden Mutante mit zusätzlichen Ubiquitylierungsstellen (WA-CpTTSSYopE O:8) infiziert, änderte sich, wie hier beobachtet wurde, weder die Wandergeschwindigkeit, noch die Wander-Orientierung oder die Zellteilung.

YopE bindet über seine GAP-Domäne an GTPasen und vermittelt eine effiziente GTP-Hydrolyse speziell bei den Rho-Proteinen RhoA, Rac1 und Cdc42 (von Pawel-Rammingen et al. 2000; Andor et al. 2001; Aili et al. 2006). Eine Inaktivierung dieser Proteine führt zur Depolymerisation von Aktinfilamenten (Trosky et al. 2008). Dies steht im Einklang mit den in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen im Aktin-Zytoskelett. In Wirtszellen, die Kontakt zum Yersinien-Invasin haben, werden RhoG und Rac1 hoch reguliert, was zur Phagozytose des Bakteriums führt. YopE in der Wirtszelle kann diesem Effekt entgegenwirken: YopE inhibiert RhoG und Rac1 und erreicht so, dass die Bakterien extrazellulär bleiben (Roppenser et al. 2008). Auch dieser Mechanismus ist konsistent mit den hier gemessenen Ergebnissen. Allerdings vermittelt YopE nur einen ca. 50%igen Phagozytose-Schutz.

Ein essentieller Bestandteil für die GAP-Aktivität ist Arg144 im „Arginin Finger“-Motiv (Aepfelbacher 2004). Wird die katalytische GAP-Aktivität ausgeschaltet (Mutante WA-CpTTSSYopE(R144A)), veränderten sich aber, wie hier beobachtet wurde, das Zytoskelett und die Migration der infizierten Zellen gegenüber GAP-aktivem YopE nicht. Offensichtlich hat die GAP-Aktivität also keinen Einfluss auf die Wander-Eigenschaften der Zellen. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Aili et al. (2003), dass YopE-Mutanten, denen die *in vitro* GAP-Aktivität für RhoA, Rac1 und Cdc42 fehlte, dennoch zytotoxisch für He-

La-Zellen waren. Von Aziz Awa (2004) wird ebenfalls herausgestellt, dass die GAP-negative YopE-Mutante podosomale Adhäsionen zerstört, eine Funktion, die der GAP-Aktivität zugeschrieben wurde. Demnach würde die Funktion der Rho-GTPasen, die ja durch YopE moduliert wird, die Zell-Migration nicht beeinflussen. Andere Gruppen dagegen stellten im Widerspruch dazu fest, dass die YopE GAP-Mutante (R144A) bei Mausinfektionen keine Virulenz mehr zeigte und nicht mehr in der Lage war, zytotoxische Effekte in HeLa-Zellen auszulösen (Black und Bliska 2000; von Pawel-Rammingen et al. 2000; Aili et al. 2006). Diese Frage ist also nicht abschließend geklärt.

N-terminal hat YopE eine Membran-Lokalisationsdomäne, über die es in Wirtszellen an der Plasmamembran verankert wird (Krall et al. 2004). Wurde die Membran-Lokalisationsdomäne (MLD) entfernt (Mutante WA-CpTTSSYopE( $\Delta$ MLD)), erhöhte sich die Wandergeschwindigkeit der infizierten Zellen auf 64% des Wildtyp-Verhaltens mit einer leicht verringerten Orientierung. Die beobachteten Veränderungen im Aktin-Zytoskelett bei mit dieser Mutante infizierten HUVEC-Zellen korrelierten mit der leicht verbesserten Migrationsfähigkeit: Mikrospiques und Stressfasern wurden etwas häufiger und in stärkerem Ausmaß ausgebildet als bei mit WA-CpTTSSYopE O:9 infizierten Zellen. Die Membran-Bindedomäne von YopE beeinflusste also das Wanderverhalten der Zellen. Sie ist aber nicht die einzige YopE-Funktion, weil ihre Inaktivierung nicht den Phenotyp der nicht-infizierten Zellen wiederherstellte.

Diese hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass YopE die Wander-Eigenschaften der infizierten Zellen nicht über die GAP-Aktivität wohl aber über die Membran-Bindedomäne beeinflusst, und dass YopE neben der MLD-Domäne weitere Aktivitäten besitzen muss.

#### **4.5.5 YopH**

WA-CpTTSSYopH-infizierte Zellen zeigten ein stark reduziertes Wanderverhalten: die Wandergeschwindigkeit betrug 34% der Geschwindigkeit der mit Wildtyp-Yersinien (WA-314) infizierten Zellen, mit vollständig reduzierter Wander-Orientierung. Visuelle Inspektion der Mikroskop-Bilder zeigte, dass mit WA-CpTTSSYopH infizierte HUVEC-Zellen zu einem großen Teil aus dem Zellverband des Zellrasens gelöst waren. Dieser Effekt korrelierte mit der Stärke der Änderung der Wanderrichtung. YopH ist also bereits allein in der Lage, die Richtungslosigkeit der mit Wildtyp infizierten Zellen hervorzurufen. Generell waren mit YopH infizierte Zellen in Bezug auf ihr Wanderverhalten dem Wildtyp am

nächsten. Die Zellteilungs-Rate war bei mit WA-CpTTSSYopH infizierten Zellen stark reduziert, die Apoptoserate hingegen war kaum verändert.

Das Aktin-Zytoskelett war in allen drei Elementen reduziert, aber nicht so stark wie bei mit WA-CpTTSSYopE und dem Wildtyp (WA-314) infizierten Zellen. Viele YopH-Substrate sind Anteile von fokalen Adhäsionen wie z.B. p130<sup>Cas</sup> (Viboud und Bliska 2005) und fokale Adhäsions-Kinasen (FAK): Paxillin, Lck, Fyb und SKAP-HOM (Cornelis 2002). Fokalkontakte („small focal complex structures“) sind in den Lamellipodien der meisten wandernden Zellen vorhanden, und es wird angenommen, dass sie wichtig für die Vermittlung des Haftens der sich ausbreitenden Lamellipodien an der extrazellulären Matrix sind (Lauffenburger und Horwitz 1996). Rac1 wird für die Ansammlung fokaler Komplexe benötigt (Nobes und Hall 1995; Allen et al. 1997). Die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix führt zu einer Aktivierung von Rac1 und Cdc42 (Price et al. 1998). Cdc42 scheint eine wichtige Rolle in der Regulation der Wanderrichtung zu spielen (Raftopoulou und Hall, 2004). Wird die Zelladhäsion der HUVEC-Zellen durch die Anwesenheit von YopH gestört, ist eventuell auch Cdc42 in der Aktivität eingeschränkt, und die Zellen wandern eventuell deshalb richtungslos.

Der Hauptangriffspunkt von YopH ist p130<sup>Cas</sup>. Die Inaktivierung von p130<sup>Cas</sup> durch YopH-vermittelte Dephosphorylierung führt zu einer Zerstörung von Aktinstrukturen, die über den Verlust von fokalen Adhäsionen die Phagozytose inhibiert. Diese Inhibition der Phagozytose wird durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigt. Die durch Andersson et al. (1996) beschriebene Zerstörung des Zytoskeletts kann die hier beobachtete verminderte Migrationsleistung der HUVEC-Zellen durch YopH-Infektion gut erklären.

Die vorgestellten Daten zeigen, dass der Hauptteil des Effekts des Wildtyp-Stamms (WA-314) auf das Wanderverhalten von infizierten HUVEC-Zellen bereits allein durch die Injektion von YopH erzielt werden kann. Allerdings ist derzeit unklar, ob die Monosekretions-Mutanten gleiche Mengen der jeweiligen Yops translozieren wie die Wildtyp Yersinien. Aus den hier durchgeführten Versuchen kann nicht abgeleitet werden, welche funktionelle Aktivität von YopH bevorzugt für diesen Einfluss verantwortlich ist. In Frage kommt hierfür weniger die N-terminale Domäne, die für die YopH-Sekretion aus dem Bakterium und Translokation in die Zelle zuständig ist (Evdokimov et al. 2001), als vielmehr die Phosphatase-Aktivität (aa 223-460), da diese Domäne unter anderem für die generelle Reduktion der Phosphorylierung von Tyrosin verantwortlich gemacht wird (Viboud und Bliska 2005). Auch die anderen Yops haben einen, wenn auch geringeren Einfluss auf das

Wanderverhalten und verstärken vermutlich den YopH-Einfluss, so dass konzentriert das Wildtyp-Verhalten hieraus resultiert.

Neben YopH beeinflusste auch YopE die Migration der HUVEC-Zellen stark. Ob die beiden Yops gemeinsam in der Lage sind, den Effekt des Wildtyps auszulösen, bleibt zu klären. Für diese Fragen sind Studien mit Yop-Doppelmutanten, insbesondere von YopE mit YopH, notwendig.

#### **4.6 Beeinflussung der Migrations-Richtung**

Es ist zu vermuten, dass Cdc42, welches die Bildung von Filopodien/Mikrospikes reguliert, für das „Fühlen“ der Richtung während der Chemotaxis benötigt wird (Allen et al. 1998, Nobes und Hall, 1999). Die Rolle von Cdc42 in diesem Prozess ist vermutlich, die Aktin-Polymerisation zu initiieren, die für die Verlängerung des Filopodiums benötigt wird.

Wurden die HUVEC-Zellen mit den Monosekretions-Mutanten WA-CpTTSSYopE, -YopP, -YopM und -YopO infiziert, zeigte die Rosette des Wanderverhaltens keinen deutlichen Unterschied zum Verhalten der nicht-infizierten HUVEC-Zellen.

Von den hier untersuchten Yops wird YopE u.a. eine Cdc42 modifizierende Wirkung zugeschrieben (von Pawel-Rammingen et al. 2000). Außerdem verhindert YopE schon zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion die Ausbildung von Mikrospikes. Beide Gründe sprächen dafür, dass YopE die Migrations-Richtung beeinflusst. Ein Einfluss von YopE auf die Migrations-Richtung wurde hier aber überraschenderweise nicht gefunden.

Neben YopH, welches die Migrations-Richtung in stärkstem Ausmaß beeinflusst, nimmt auch YopT auf die Migrations-Richtung Einfluss. Von YopT ist allerdings primär die RhoA modifizierende Wirkung beschrieben. Die Infektion mit WA-CpTTSSYopT bewirkt zu einem frühen Zeitpunkt, dass keine Mikrospikes mehr ausgebildet werden, was auf eine modifizierende Wirkung von YopT auf Cdc42 schließen lassen würde. HUVEC-Zellen, die mit der WA-CpTTSSYopT-Mutante sowie WA-CpTTSSYopT C139A infiziert wurden, zeigten allerdings nur ein geringfügig anderes Bild.

Die Monosekretionsmutante WA-CpTTSSYopH ruft die geringste Orientierung des Zellwanderverhaltens hervor; die HUVEC-Zellen wanderten orientierungslos ähnlich wie bei der Infektion mit dem Yersinien-Wildtyp. YopH ist eine hoch aktive Tyrosinphosphatase, und YopH-Substrate sind Bestandteile von fokalen Adhäsionen. Fokale Adhäsionen spie-

len eine Rolle in der Regulation dynamischer Interaktionen zwischen dem Aktinzytoskelett und extrazellulären Matrix-Proteinen (Brakebusch und Fassler 2003). Das Hauptziel von YopH ist p130<sup>Cas</sup>, dessen Inaktivierung führt zu einer Zerstörung von Aktinstrukturen, die mit einem Verlust von fokalen Adhäsionen einhergeht und so die Phagozytose inhibiert (Andersson et al. 1996) und möglicherweise so auch die Migration und Migrations-Richtung angreifen.

#### **4.7 Kopplung von Phagozytose und Migration**

Der Yersinien-Wildtyp WA-314 war in der Lage, seine Phagozytose nahezu vollständig zu verhindern. Dazu war keines der einzelnen Yops allein fähig. Eventuell erreichen aber YopH, YopE und YopT gemeinsam eine nahezu vollständige Verhinderung der Phagozytose, wie im Wildtyp realisiert; möglicherweise ist dies die Hauptfunktion der Yops. Eine starke Verringerung des Wanderverhaltens mag darüber hinaus eine weitere, sinnvolle Ergänzung in der Beeinflussung der befallenen Zellen sein, um ein Wandern der Zellen zum nächstgelegenen lymphatischen Organ bzw. Lymphknoten zu verhindern und damit die Einleitung der sekundären Immunantwort zu verzögern. Eventuell ist dies aber für das Überleben und die Vermehrung der Yersinien nicht unbedingt notwendig, und man könnte spekulieren, dass die Beeinflussung des Wanderverhaltens eher ein Nebeneffekt als eine gezielte, zusätzliche Beeinflussung ist. Dies wäre möglich, da zur Verhinderung der Phagozytose Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts angegriffen werden, die auch für das Wanderverhalten verantwortlich zeichnen. Die Yops interagieren mit Proteinen zellulärer Signalwege, so dass solche Nebeneffekte durchaus wahrscheinlich wären. In diesem Zusammenhang sind die Eigenschaften von YopP bedeutsam: YopP zeigt keinen Einfluss auf die Phagozytose sehr wohl aber auf das Aktin-Zytoskelett und das Wanderverhalten. Dies zeigt, dass diese beiden Funktionen, Phagozytose-Unterdrückung und Migrations-Behinderung, von den Yops entkoppelt und getrennt voneinander erreicht werden.



#### **4.8 Teilungs-Verhalten**

In dieser Arbeit wurde die Teilungsrate der HUVEC-Zellen abgeschätzt. Durch Infektion mit Yersinien als auch mit einzelnen Yops wird die Teilungsrate herabgesetzt. Zum einen könnte diese Reaktion der HUVEC-Zellen zur gezielt ausgelösten Strategie der Yersinien gehören, zum anderen könnte es sich dabei aber auch um einen generellen Schutz der Zellen gegen Bakterienbefall handeln. Der Reaktionsweg könnte über das Auslösen der Caspase-Signalkaskade in Gang gesetzt werden. Caspase 8 ist in der Lage, Caspase 7 zu aktivieren, die das innere Kinetochor-Protein CENP-C und INCENP schneidet (Faragher et al. 2007) und damit die Funktion des Kinetochor-Komplexes zerstört. Damit wäre eine fehlerfreie Zellteilung in der Mitose nicht mehr möglich. In der Tat wurden hier fehlerhafte Zellteilungen in Yersinien-infizierten HUVEC-Zellen beobachtet.

#### **4.9 Apoptose**

HUVEC-Zellen zeigten eine nur geringe Apoptose-Rate, die sich auch nach Infektion mit Kontroll-Mutanten nicht erhöhte. Die Apoptose-Rate blieb gering, wenn nur mit YopH infiziert wurde, und erhöhte sich im Rahmen des Meßfehlers auch nicht bei Infektion mit YopP oder dem Wildtyp-Stamm. Die hier gemessenen Daten zeigen, dass Yersinien bei HUVEC-Zellen praktisch keine Apoptose auslösen. Dies wäre eventuell auch keine erfolgversprechende Strategie: vermutlich setzen in Apoptose gehende Makrophagen Botenstoffe frei, die das Immunsystem aktivieren, so dass das Sterben von Makrophagen die Immunabwehr eher verstärkt als unterdrückt. Eine Verstärkung der Immunabwehr würde die Überlebenschancen der Yersinien stark beeinträchtigen.

#### **4.10 Migration von Immunzellen**

Um definitive Aussagen über die Migration von Immunzellen machen zu können, müsste die Integrin-unabhängige Migration im 3-dimensionalen Raum untersucht werden. Es ist zu vermuten, dass der Einfluss von YopH unter diesen Bedingungen weniger stark ausgeprägt ist, da den fokalen Adhäsionen, auf die YopH zerstörend wirkt (Andersson 1996), unter diesen Bedingungen eine weit geringere Bedeutung zugeschrieben wird (Lämmermann et al. 2008). Die Migration von Immunzellen ist aber auch von der Dynamik des

Aktin-Zytoskelletts abhängig. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die Migration dieser Zellen in einem starken Ausmaß von den Yops beeinträchtigt wird.

Von Rüssmann et al. (1996) konnte gezeigt werden, dass polymorphkernige Leukozyten (PMNs), die mit Yersinien infiziert wurden und Yersinien internalisiert hatten, in der Lage waren, einen artifiziellen einschichtigen Zellrasen, der sich auf einer mikroporösen Membran befand, zu überwinden. Dies bedeutet, dass die von Rüssmann et al. (1996) beschriebenen Yersinien (Y-108-P) nicht über die Fähigkeit verfügten, ihre eigene Phagozytose zu verhindern und die Migration von Immunzellen zu inhibieren. Nur auf den ersten Blick stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu den hier erzielten Daten, denn Rüssmann et al. (2006) haben die Virulenzplasmid-tragenden Yersinien (Y-108-P) bei 26 °C kultiviert, sodass die Yops bei den niedrigen Temperaturen nicht exprimiert wurden und die Yersinien deshalb nicht über die Virulenzplasmid-kodierten Pathogenitätsfaktoren verfügten. Die von Rüssmann et al. (1996) erzielten Ergebnisse sind deshalb mit den Negativ-Kontroll-Daten dieser Arbeit zu vergleichen. Liegen dagegen Yersinien (WA-314) wie hier beschrieben bei 37 °C vor, exprimieren sie die Yops, verfügen also über die Virulenzplasmid-kodierten Determinanten, sind damit weitestgehend Phagozytose-resistent und können, wie hier gezeigt, sehrwohl die Migration der Zellen inhibieren, ein Prozess, der die Einleitung der sekundären Immunantwort verzögern kann und damit vermutlich entscheidend zur Virulenz der Yersinien beiträgt. Somit verfügen enteropathogene Yersinien, wie hier zum ersten Mal gezeigt wird, über eine zweite (neben der Inhibition der Phagozytose) immunsuppressive Strategie: über die Fähigkeit, die Migration von Immunzellen zu inhibieren. Es wäre wichtig, diese Zusammenhänge auch für dendritische Zellen (DCs) nachzuweisen. DCs wird eine Schlüssel-Rolle in der Schnittstelle zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität zugeschrieben, u.a. durch ihr Wandern vom primären Infektionsherd zum regionalen Lymphknoten. Es wäre eine erfolgsversprechende Strategie der Yersinien, auch die Beeinflussung der Initiation einer Immunantwort durch DCs dadurch zu hemmen, dass deren Migration behindert wird. Wir vermuten einen solchen Einfluss von Yersinien auf DCs.

Für *Yersinia pestis* (37°C) wurde eine inhibierende Wirkung auf die Migration von DCs bereits beschrieben (Velan et al. 2006; Robinson et al. 2008): die Migration der DCs ist Temperatur- und Virulenzplasmid-abhängig. Dies wird in der vorliegenden Arbeit auch für

die Inhibition der Migration durch enteropathogene Yersinien gezeigt. Für die Inhibition der Migration der DC durch *Yersinia pestis* wird von Robinson et al. (2008) zwar eine Abhängigkeit vom Virulenzplasmid gesehen, aber kein Zusammenhang mit den Yops hergestellt. Robinson et al. (2008) sehen die Ursache der Hemmung der Migration von DC durch *Yersinia pestis* in einer Temperatur- und Virulenzplasmid-abhängigen Veränderung in der Struktur des Lipids A. In dieser Arbeit werden die Yops für die Inhibition der Migration von Zellen verantwortlich gemacht. Es bleibt abschließend zu klären, ob die gefundenen Mechanismen kausal miteinander verknüpft sind.

#### **4.11 Zukunftsvision: Yop-Proteine in der Tumorthherapie**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Yop-Proteine die Migration von Endothelzellen inhibieren. Diese Migration spielt aber nicht nur bei der Wundheilung eine wichtige Rolle sondern auch bei der Neubildung von Gefäßen, der Angiogenese.

Die Angiogenese ist ein Prozess, bei dem Blutgefäße aus einem bereits vorhandenen Blutgefäßsystem entstehen (Auerbach et al. 2003). Die Angiogenese ist ein integraler Bestandteil von normalen Körperprozessen, spielt aber auch eine Rolle bei pathologischen Prozessen wie dem Tumorwachstum und der Metastasierung (Auerbach et al. 2003). Die angiogenetischen Stimuli, die zu einer gerichteten Migration der Endothelzellen führen, werden von Tumorzellen, aktivierten Lymphozyten oder Makrophagen ausgeschüttet. Die Endothelzellen durchbrechen daraufhin die Basalmembran, migrieren in Richtung der Stimuli und teilen sich, um die nötige Zellzahl, die zur Auskleidung neuer Gefäße benötigt wird, bereitzustellen (Auerbach et al. 2003). Die meisten Tumore sind von der Angiogenese abhängig, um weiter wachsen zu können und um Metastasen bilden zu können (Verheul et al. 2004). Die Tumore benötigen eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und müssen Abfallprodukte entsorgen; dafür ist eine vermehrte Blutversorgung essentiell (Verheul et al. 2004). Anti-angiogenetische Substanzen könnten daher entscheidend zur Verbesserung der Tumorthherapie beitragen. Die anti-angiogenetische Therapie hat nicht die Zerstörung des Tumors zur Folge, könnte aber zu einer Reduktion der Tumormasse oder zu einer Wachstumshemmung des Tumorgewebes führen (Folkman 1996).

Hashimoto et al. (2007) zeigten, dass Alandronat die Migration von HUVEC-Zellen und die Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen *in vitro* inhibieren. Diese Effekte sind assoziiert mit einer reduzierten Rho-Aktivität und einer verminderten Bildung von Stress-

fasern und fokalen Adhäsionen. HUVEC-Zellen, die für 10 min mit „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) behandelt wurden, zeigten vermehrt Rho-GTP, d. h. Rho in seinem aktivierten Zustand. In Anwesenheit von Alandronat konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, was die verminderte Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen erklären kann. Alandronat hat *in vitro* anti-angiogenetische Effekte, die über das Eingreifen in die VEGF-induzierte Rho-Aktivierung vermittelt werden. Die Therapie mit Alandronat reduzierte die Intra-Tumor-Angiogenese bei Ovarial-Krebs bei Mäusen, obwohl die VEGF-Expression nicht verändert war (Hashimoto et al. 2007).

Da auch die Yops in viele intrazelluläre Prozesse über eine Beeinflussung von Rho-GTPasen eingreifen, könnten Yops ähnlich auf Tumore wirken wie Alandronat. Um dies zu überprüfen, müsste zuerst der Einfluss von Yop-Proteinen auf die Angiogenese *in vitro* untersucht werden. Gerade YopH und YopE scheinen Proteine zu sein, die möglicherweise die Angiogenese sehr effektiv inhibieren; eventuell zeigen diese Proteine *in vivo* einen ähnlichen Effekt auf Tumore wie Alandronat. Es müsste allerdings sichergestellt werden, dass die Proteine keine, nicht mit dem Leben vereinbarende Effekte auf das vorhandene Gefäßsystem ausüben. YopO, -M, -P und -T zeigen vermutlich einen zu geringen Effekt auf die Zellmigration, um als anti-angiogenetische Proteine Einsatz zu finden. Eine genauere Untersuchung von YopM ist aber dennoch wichtig, da vermutet wird, dass YopM auch ohne Typ-III-Sekretion in humane Zellen gelangen kann. Denkbar ist, dass andere Yop-Proteine (besonders erfolgversprechend wären YopH oder YopE) mit Hilfe von YopM in die Zellen eingebracht werden können um so das Tumorwachstum einzuschränken.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM (1970) The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res* 59, 393-398.
- Aepfelbacher M, Trasak C, Ruckdeschel K (2007). Effector functions of pathogenetic *Yersinia* species. *Thromb Haemost* 98, 521-529.
- Aepfelbacher M (2004) Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of *Yersinia*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152, 65-77.
- Aepfelbacher M, Trasak C, Wilharm G, Wiedemann A, Trulzsch K, Krauss K, Gierschik P, Heesemann J (2003) Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J Biol Chem* 278, 33217-33223.
- Aepfelbacher M, Zumbihl R, Ruckdeschel K, Jacobi CA, Barz C, Heesemann J (1999) The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defense. *Biol Chem* 380, 795-802.
- Aepfelbacher M, Essler M, Huber E, Sugai M, Weber PC (1997) Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17, 1623-1629
- Aili M, Isaksson EL, Carlsson SE, Wolf-Watz H, Rosqvist R, Francis MS (2007) Regulation of *Yersinia* Yop-effector delivery by translocated YopE. *Int J Med Microbiol* 298, 183-192.
- Aili M, Isaksson EL, Hallberg B, Wolf-Watz H, Rosqvist R (2006) Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Cell Microbiol* 8, 1020-1033.
- Aili M, Telepnev M, Hallberg B, Wolf-Watz H, Rosqvist R (2003) In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity. *Microb Pathog* 34, 297-308.
- Aktories K and Barbieri JT (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* 3, 397-410.
- Aktories K, Wilde C, Vogelsang M (2004) Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152, 1-22.
- Aleksic S und Bockemuhl J (1990) Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections. *Immun Infekt* 18, 178-185.
- Allen WE, Jones GE, Pollard JW, Ridley AJ (1997) Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci* 110, 707-720.

Allen WE, Zicha D, Ridley AJ, Jones GE (1998) A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol* 141, 1147-1157.

Alrutz MA, Srivastava A, Wong KW, D'Souza-Schorey C, Tang M, Ch'Ng LE, Snapper SB, Isberg RR (2001) Efficient uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function. *Mol Microbiol* 42, 689-703.

Andersson K, Carballeira N, Magnusson KE, Persson C, Stendahl O, Wolf-Watz H, Fällman M (1996) YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol Microbiol* 20, 1057-1069.

Andor A, Trülzsch K, Essler M, Roggenkamp A, Wiedemann A, Heesemann J, Aepfelbacher M. (2001) YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* 3, 301-310.

Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N (2003) Angiogenesis Assay: A Critical Overview. *Clinical Chemistry* 49, 32-40.

Autenrieth IB und 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.

Aziz Awa (2004) Der Einfluss von *Yersinia*-Effektoren auf podosomale Adhäsionsstrukturen primärer humaner Makrophagen. Medizinische Dissertation aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

Badger JL und Miller VL (1998) Expression of invasin and motility are co-ordinately regulated in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 180, 793-800.

Bailly M, Wyckoff J, Bouzahzah B, Hammerman R, Sylvestre V, Cammer M, Pestell R, Segall JE (2000) Epidermal growth factor receptor distribution during chemotactic responses. *Mol Biol Cell* 11, 3873-3883.

Balligand G, Laroche Y, Cornelis G (1985) Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect Immun* 48, 782-786.

Barnes PD, Bergman MA, Mecsas J, Isberg RR (2006) *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *J Exp Med* 203, 1591-1601.

Barz C, Abahji TN, Trülzsch K, Heesemann J (2000) The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett* 482, 139-143.

Ben-Efraim S, Aronson M, Bichowsky-Slomnicki L (1961) New antigenic component of *Pasturella Pestis* formed under specified conditions of pH and temperature. *J Bacteriol* 81, 704-714.

Birtalan S und Ghosh P (2001) Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nat Struct Biol* 8, 974-978.

Bishop AL und Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348, 241-255.

Black DS und Bliska JB (2000) The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* 37, 515-527.

Black DS, Montagna LG, Zitsmann S, Bliska JB. (1998) Identification of an amino-terminal substratebinding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. *Mol Microbiol* 29, 1263-1274.

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.

Bliska JB, Copass MC, Falkow S. (1993) The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEP-2 cells. *Infect Immun* 61, 3914-3921.

Bockemühl J und Roggentin P (2004) Intestinal yersiniosis. Clinical importance, epidemiology, diagnosis, and prevention. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 47, 685-691.

Bölin I, Norlander L, Wolf-Watz H (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* 37, 506-512.

Bölin I und Wolf-Watz H (1984) Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 43, 72-78.

Bölin I, Portnoy D A, Wolf-Watz H (1985) Expression of Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersiniae*. *Infect Immun* 48, 234-240.

Boquet P and Lemichez E (2003) Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis? *Trends Cell Biol* 13, 238-246.

Bottone EJ (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* 10, 257-276.

Bottone EJ (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect* 1, 323-333.

- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.
- Brakebusch C and Fassler R (2003) The integrin-actin connection, an eternal love affair. *Embo J* 22, 2324-2333.
- Brenner DJ (1979) Speciation in *Yersinia*. *Contrib Microbiol Immunol* 5, 33-43.
- Brubaker RR (1991) Factors promoting acute and chronic diseases caused by *yersiniae*. *Clin Microbiol Rev* 4, 309-324.
- Caron E und Hall A (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721.
- Cheeseman IM und Desai A (2008) Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 33-46.
- Clark MA, Hirst BH, Jepson MA (1998) M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infection & Immunity* 66, 1237-1243.
- Coomber BL und Gotlieb AI (1990) In vitro endothelial wound repair. Interaction of cell migration and proliferation. *Arteriosclerosis* 10, 215-222.
- Cornelis G, Laroche Y, Balligand G, Sory MP, Wauters G (1987) *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev Infect Dis* 9, 64-87.
- Cornelis G, Vanootegem JC, Sluiter C (1987). Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* 2, 367-379.
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1315-1352.
- Cornelis GR (2002) *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* 158, 401-408.
- Cornelis GR (2002) The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 742-752.
- Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4, 811-825.
- Cover TL and Aber RC (1989) *Yersinia enterocolitica*. *N Engl J Med* 321, 16-24.
- Cowan C, Jones HA, Kaya YH, Perry RD, Straley SC (2000) Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis*-specific invasin. *Infect Immun* 68, 4523-4530.



Cox EA, Huttenlocher A (1998) Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc Res Tech* 43, 412-419.

Dequeker J, Jamar R, Walravens M (1980) HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. *J Rheumatol* 7, 706-710.

Denecker G, Töttemeyer S, Mota LJ, Troisfontaines P, Lambermont I, Youta C, Stainier I, Ackermann M, Cornelis GR (2002) Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun.* 70, 3510-3520.

Dukuzumuremyi JM, Rosqvist R, Hallberg B, Akerström B, Wolf-Watz H, Schesser K (2000) The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem* 275, 35281-35290.

Eitel J und Dersch P (2002) The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasion is repressed. *Infect Immun* 70, 4880-4891.

Entschladen F, Drell TL 4th, Lang K, Masur K, Palm D, Bastian P, Niggemann B, Zaenker KS (2005) Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res* 307, 418-426.

Evdokimov AG, Tropea JE, Routzahn KM, Copeland TD, Waugh DS (2001) Structure of the N-terminal domain of *Yersinia pestis* YopH at 2.0 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 57, 793-799.

Fällman M, Andersson K, Håkansson S, Magnusson KE, Stendahl O, Wolf-Watz H (1995) *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect Immun* 63, 3117-3124.

Faragher AJ, Sun XM, Butterworth M, Haper N, Mulheran M, Ruchaud S, Earnshaw WC, Cohen GM (2007) Death Receptor-induced Apoptosis Reveals a Novel Interplay between the Chromosomal Passenger Complex and CEMP-C during Interphase. *Molecular Biology of the Cell* 18, 1337-1347.

Finlay BB und Falkow S (1988) Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella cholerae-suis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie.* 70, 1089-1099.

Folkman J (1996) Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American* 275, 150-157.

Frederiksen W (1964) A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella X*). Proc. 14th. Scand. Congr. Path. Microbiol 108.

Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H (2006) Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47, 315-329.

- Fu Y and Galan JE (1999) A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401, 293-297.
- Glading A, Chang P, Lauffenburger DA, Wells A (2000) Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 275, 2390-2398.
- Goehring UM, Schmidt G, Pederson KJ, Aktories K, Barbieri JT (1999) The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* 274, 36369-36372.
- Grassl GA, Bohn E, Müller Y, Bühler OT, Autenrieth IB (2003) Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol* 293, 41-54.
- Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP, Cornelis GR (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* 70, 4165-4176.
- Guan KL, Haun RS, Watson SJ, Geahlen RL, Dixon JE (1990) Cloning and expression of a protein-tyrosinephosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1501-1505.
- Håkansson S, Galyov EE, Rosqvist R, Wolf-Watz H (1996) The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol* 20, 593-603.
- Håkansson S, Schesser K, Persson C, Galyov EE, Rosqvist R, Homblé F, Wolf-Watz H (1996) The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *Embo J* 15, 5812-5823.
- Han YW und Miller VL (1997) Reevaluation of the virulence phenotype of the *inv yadA* double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 65, 327-330.
- Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, Tahara M, Shimizu S, Ogata S, Sakata M, Tasaka K, Kimura T (2007) Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354, 478-484.
- Heesemann J, Gross U, Schmidt N, Laufs R (1986) Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect Immun* 54, 561-567.
- Heesemann (2001) Die Gattung *Yersinia*, *Yersiniosen*, in: Köhler, Eggers, Fleischer, Marre, Pfister, Pulver (Hrsg.) *Medizinische Mikrobiologie*, Urban und Fischer, München, Jena, 8 Auflage, S.315
- Heesemann J, Sing A, Trülzsch K (2006) *Yersinia's* strategem: targetting innate and adaptive immune defense. *Current option in Mikrobiologie* 9, 55-61.

- Hentschke M, Trülsch K, Heesemann J, Aepfelbacher M, Ruckdeschel K (2007) Serogroup-Related Escape of *Yersinia enterocolitica* YopE from Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Infection and Immunity* 75, 4423-4431
- Hoffmann R, van Erp K, Trülsch K, Heesemann J (2004) Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol* 6, 377-390.
- Hoiczky E und Blobel G (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4669-4674.
- Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO Journal* 19, 5989-5999.
- Hultgren SJ, Abraham S, Caparon M, Falk P, St Geme JW 3rd, Normark S (1993) Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 73, 887-901.
- Isberg RR, Voorhis DL, Falkow S (1987) Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* 50, 769-778.
- Isberg RR and Leong JM (1990) Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60, 861-871.
- Iriarte M und Cornelis GR (1998) YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 29, 915-929.
- Isberg RR und Barnes P (2001) Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J Cell Sci* 114, 21-28.
- Jaffe AB and Hall A (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.
- Jones RJ, Brunton VG, Frame MC (2000) Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *Eur J Cancer* 36, 1595-1606.
- Juris SJ, Rudolph AE, Huddler D, Orth K, Dixon JE (2000) A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9431-9436.
- Kampik D, Schulte R, Autenrieth IB (2000) *Yersinia enterocolitica* invasins protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections. *Infect Immun* 68, 2484-2492.

Khandelwal P, Keliikuli K, Smith CL, Saper MA, Zuiderweg ER (2002) Solution structure and phosphopeptide binding to the N-terminal domain of *Yersinia* YopH: comparison with a crystal structure. *Biochemistry* 41, 11425-11437.

Kiosses WB, Shattil SJ, Pampori N, Schwartz MA (2001) Rac recruits high-affinity integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat Cell Biol* 3, 316-320.

Knapp W (1988) Die Gattung *Yersinia* - Yersiniosen. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. H.Brandis und G.Pulverer (ed.): 348-358.

Krall R, Zhang Y, Barbieri JT (2004) Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and *Yersinia* YopE in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 2747-2753.

Lämmermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Söldner R, Hirsch K, Keller M, Förster R, Critchley DR, Fässler R und Sixt M (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453, 51-57

Lambert de Rouvroit C, Sluiter C, Cornelis GR (1992) Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 6, 395-409.

Lauffenburger DA und Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.

Le Clainche C und Carlier MF (2008) Regulation of Actin Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiol Rev* 88, 489-513.

Lehmann R (2001) Cell migration in invertebrates: clues from border and distal TIPP cell. *Curr Opin Genet Dev* 11, 457-463.

Letzelter M, Sorg I, Mota LJ, Meyer S, Stalder J, Feldman M, Kuhn M, Callebaut I, Cornelis GR (2006) The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *Embo J* 25, 3223-3233.

Leung KY, Reisner BS, Straley SC (1990) YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* 58, 3262-3271.

Logsdon LK und Mecsas J (2003) Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. *Infect Immun* 71, 4595-4607.

Makoveichuk E, Cherepanov P, Lundberg S, Forsberg A, Olivecrona G (2003) pH6 antigen of *Yersinia pestis* interacts with plasma lipoproteins and cell membranes. *J Lipid Res* 44, 320-330.

Marketon MM, DePalolo RW, DeBord KL, Jabri B, Schneewind O (2005) Plague Bacteria Target Immune Cells During Infection. *Science* 309, 1739-1741.

- May RC, Caron E, Hall A, Machesky LM (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat Cell Biol* 2, 246-248.
- McDonald C, Vacratsis PO, Bliska JB, Dixon JE (2003) The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* 278, 18514-18523.
- McGee K, Zettl M, Way M, Fällman M (2001) A role for N-WASP in invasin-promoted internalisation. *FEBS Lett* 509, 59-65.
- Miller VL and Falkow S (1988) Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 56, 1242-1248.
- Mittal R, Peak-Chew SY, McMahon HT (2006) Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 18574-18579.
- Mitchison TJ und Cramer LP (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371-379.
- Monack DM, Mecsas J, Ghori N, Falkow S (1997) *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 10385-10390.
- Monack DM, Mecsas J, Bouley D, Falkow S (1998) *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. *J Exp Med* 188, 2127-2137.
- Mukherjee S, Keitany G, Li Y, Wang Y, Ball HL, Goldsmith EJ, Orth K (2006) *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 312, 1211-1214.
- Mulder B, Michiels T, Simonet M, Sory MP, Cornelis G (1989) Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun* 57, 2534-2541.
- Neudauer CL, Joberty G, Tatsis N, Macara IG (1998) Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10. *Curr Biol* 8, 1151-1160.
- Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature Immunology* 2, 1004-1009.
- Nobes CD und Hall A (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 144, 1235-1244.
- Nobes CD und Hall A (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.

Orth K, Palmer LE, Bao ZQ, Stewart S, Rudolph AE, Bliska JB, Dixon JE (1999) Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* 285, 1920-1923.

Orth K (2002) Function of the *Yersinia* effector YopJ. *Curr Opin Microbiol* 5, 38-43.

Palecek SP, Huttenlocher A, Horwitz AF, Lauffenburger DA (1998) Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J Cell Sci* 111, 929-940.

Palmer LE, Hobbie S, Galán JE, Bliska JB (1998) YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* 27, 953-965.

Palmer LE, Pancetti AR, Greenberg S, Bliska JB (1999) YopJ of *Yersinia* spp. is sufficient to cause downregulation of multiple mitogen-activated protein kinases in eukaryotic cells. *Infect Immun* 67, 708-716.

Pepe JC and Miller VL (1993) *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6473-6477.

Pepe JC, Wachtel MR, Wagar E, Miller VL (1995) Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun* 63, 4837-4848.

Perry RD und Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 10, 35-66.

Pober und Sessa (2007) Evolving function of endothelial cells in inflammation. *Nature* 7, 803-815.

Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM (1998) Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell* 9, 1863-1871.

Raftopoulou M und Hall A (2003) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.

Revell PA und Miller VL (2000) A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol* 35, 677-685.

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.

Ridley AJ (2001) Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility. *FEBS Lett* 498, 168-171.

- Roggenkamp A, Ruckdeschel K, Leitritz L, Schmitt R, Heesemann J (1996) Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* 64, 2506-2514.
- Roppenser B, Röder A, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M (2009) *Yersinia enterocolitica* differentially modulates RhoG activity in host cells. *J Cell Sci* 1, 696-705.
- Rosqvist R, Skurnik M, Wolf-Watz H (1988) Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature* 334, 522-524.
- 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.
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* 64, 724-733.
- Ruckdeschel K (2002) Immunomodulation of macrophages by pathogenic *Yersinia* species. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50, 131-137.
- Ruckdeschel K und Richter K (2002) Lipopolysaccharide Desensitization of Makrophages Provides Protection against *Yersinia enterocolitica*-Induced Apoptosis. *Infection and Immunity* 70, 5259-5264.
- Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Trülzsch K, Zenner G, Richter K, Heesemann J, Aepfelbacher M (2006) The proteasome pathway destabilizes *Yersinia* outer protein E and represses its antihost cell activities. *J Immunol* 176, 6093-6102.
- Sauvonnet N, Pradet-Balade B, Garcia-Sanz JA, Cornelis GR (2002) Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J Biol Chem* 277, 25133-25142.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Wiesmüller L, Kabsch W, Stege P, Schmitz F, Wittinghofer A (1998) Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. *Embo J* 17, 4313-4327.
- Schleifstein JI und Coleman MB (1939) An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *N Y State J Med* 39, 1749-1753.
- Schmid Y, Grassl GA, Bühler OT, Skurnik M, Autenrieth IB, Bohn E (2004) *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. *Infect Immun* 72, 6780-6789.
- Schulte R und Autenrieth IB (1998) *Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation. *Infect Immun* 66, 1216-1224.

Schulte R, Kerneis S, Klinke S, Bartels H, Preger S, Kraehenbuhl JP, Pringault E, Autenrieth IB (2000) Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol* 2, 173-185.

Schwartz M (2004) Rho signalling at a glance. *J Cell Sci* 117, 5457-5458.

Shao F, Merritt PM, Bao Z, Innes RW, Dixon JE (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109, 575-588.

Shao F, Vacratsis PO, Bao Z, Bowers KE, Fierke CA, Dixon JE (2003) Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 904-909.

Simonet M, Richard S, Berche P (1990) Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect Immun* 58, 841-845.

Simonet M, Riot B, Fortineau N, Berche P (1996) Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect Immun* 64, 375-379.

Skrzypek E, Myers-Morales T, Whiteheart SW, Straley SC (2003) Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eucaryotic cells. *Infect Immun* 71, 937-947.

Small JV, Rottner K, Kaverina I, Anderson KI (1998) Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta* 1404, 271-281.

Snellings NJ, Popek M, Lindler LE (2001) Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon. *Infect Immun* 69, 4627-4638.

Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD (1992) A surface protease and the invasive character of plague. *Science* 258, 1004-1007.

Sorg I, Hoffmann C, Dumbach J, Aktories K, Schmidt G (2003) The C terminus of YopT is crucial for activity and the N terminus is crucial for substrate binding. *Infect Immun* 71, 4623-4632.

Spaargaren M und Bos JL (1999) Rab5 induces Rac-independent lamellipodia formation and cell migration. *Mol Biol Cell* 10, 3239-3250.

Straley SC und Bowmer WS (1986) Virulence genes regulated at the transcriptional level by Ca<sup>2+</sup> in *Yersinia pestis* include structural genes for outer membrane proteins. *Infect Immun* 51, 445-454.



- Straley SC (1991) The low-Ca<sup>2+</sup> response virulence regulon of human-pathogenic yersiniae. *Microbial Pathogenesis* 10, 87-91.
- Straley SC und Perry RD (1995) Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends in Microbiology* 3, 310-317.
- Symons M and Settleman J (2000) Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* 10, 415-419.
- Tardy F, Homblé F, Neyt C, Wattiez R, Cornelis GR, Ruyschaert JM, Cabiaux V (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *Embo J* 18, 6793-6799.
- Trasak C, Zenner G, Vogel A, Yüksesdag G, Rost R, Haase I, Fischer M, Israel L, Imhof A, Linder S, Schleicher M, Aepfelbacher M (2007) *Yersinia* Protein Kinase YopO Is Activated by A Novel G-actin Binding Process. *J Biol Chem* 282, 2268-2277.
- Trosky JE, Liverman AD, Orth K (2008) *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* 10,557-65.
- Trülzsch K, Roggenkamp A, Aepfelbacher M, Wilharm G, Ruckdeschel K, Heesemann J (2003) Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int J Med Microbiol.* 293, 167-177.
- Trülzsch K, Sporleder T, Igwe EI, Rüssmann H, Heesemann J (2004) Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* 72, 5227-5234.
- Van Aelst L und D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11, 2295-2322.
- Van Nhieu GT und Isberg RR (1991) The *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein and human fibronectin bind to mutually exclusive sites on the alpha 5 beta 1 integrin receptor. *J Biol Chem* 266, 24367-24375.
- Verheul HMW, Voest EE, Schlingemann RO (2004) Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol* 202, 5-13.
- Viboud GI and Bliska JB (2001) A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *Embo J* 20, 5373-5382.
- Viboud GI and Bliska JB (2005) *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 59, 69-89.
- Viboud GI, Mejía E, Bliska JB (2006) Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Cell Microbiol* 8,1504-1515.

Von Pawel-Rammingen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K, Wolf-Watz H, Rosqvist R (2000) GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* 36, 737-748.

Wattiau P, Bernier B, Deslée P, Michiels T, Cornelis GR (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10493-10497.

Wauters G, Kandolo K, Janssens M (1987) Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* 9, 14-21.

Wiedemann A, Linder S, Grassl G, Albert M, Autenrieth I, Aepfelbacher M (2001) *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol* 3, 693-702.

Winblad S (1969) Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*. *Scand J Infect Dis* 1, 11-16.

Wittmann T und Waterman-Storer CM (2001) Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci* 114, 3795-3803.

Wong MK und Gotlieb AI (1988) The reorganization of microfilaments, centrosomes, and microtubules during in vitro small wound reendothelialization. *J Cell Biol* 107, 1777-1783.

Wong KW and Isberg RR (2005) *Yersinia pseudotuberculosis* spatially controls activation and misregulation of host cell Rac1. *PLoS Pathog* 1, 16.

Würtele M, Wolf E, Pederson KJ, Buchwald G, Ahmadian MR, Barbieri JT, Wittinghofer A (2001) How the *Pseudomonas aeruginosa* ExoS toxin downregulates Rac. *Nat Struct Biol* 8, 23-26.

Yang Y and 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.

Yao T, Meccas J, Healy JJ, Falkow S, Chien Y (1999) Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J Exp Med* 190, 1343-1350.

Yip CK und Strynadka NC (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci*. 31, 223-230.

Zahm JM, Kaplan H, Hérard AL, Doriot F, Pierrot D, Somelette P, Puchelle E (1997) Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil Cytoskeleton* 37, 33-43.

Zahorchak RJ, Charnetzky WT, Little RV, Brubaker RR (1979) Consequences of Ca<sup>2+</sup> deficiency on macromolecular synthesis and adenylate energy charge in *Yersinia pestis*. *J Bacteriology* 139, 792-799.

Zav'yalov VP, Abramov VM, Cherepanov PG, Spirina GV, Chernovskaya TV, Vasiliev AM, Zav'yalova GA (1996) pH6 antigen (PsaA protein) of *Yersinia pestis*, a novel bacterial Fc-receptor. *FEMS Immunol Med Microbiol* 14, 53-57.

Zhao ZS, Manser E, Loo TH, Lim L (2000) Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* 20, 6354-6363.

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

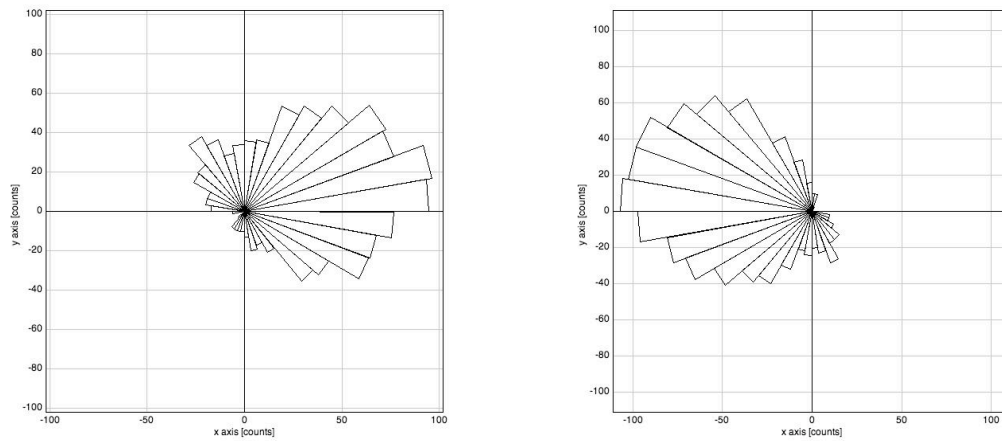
Internetquelle:

URL: <http://rki.de.html>, 10.10.2008.

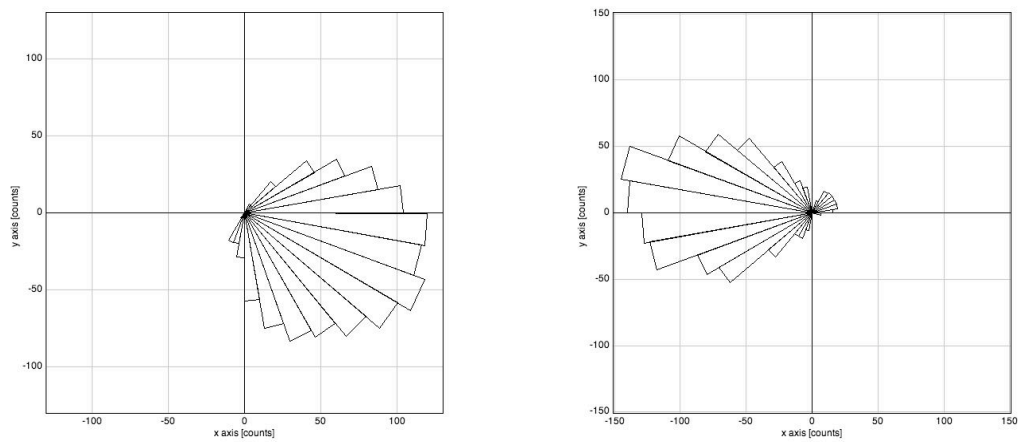
## 6 Anhang

### Anhang 1:

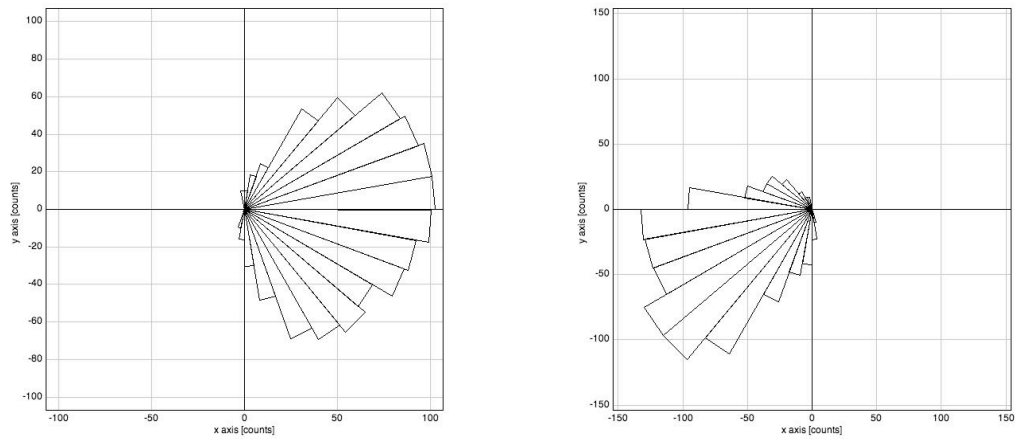
Richtungs-Rosetten für HUVEC-Zellen, die mit den „Kontroll“ Yersinien-Stämmen infiziert wurden.



**Abbildung A1:** Richtungsrosetten für HUVEC-Zellen, die mit „WA-C“ infiziert wurden.



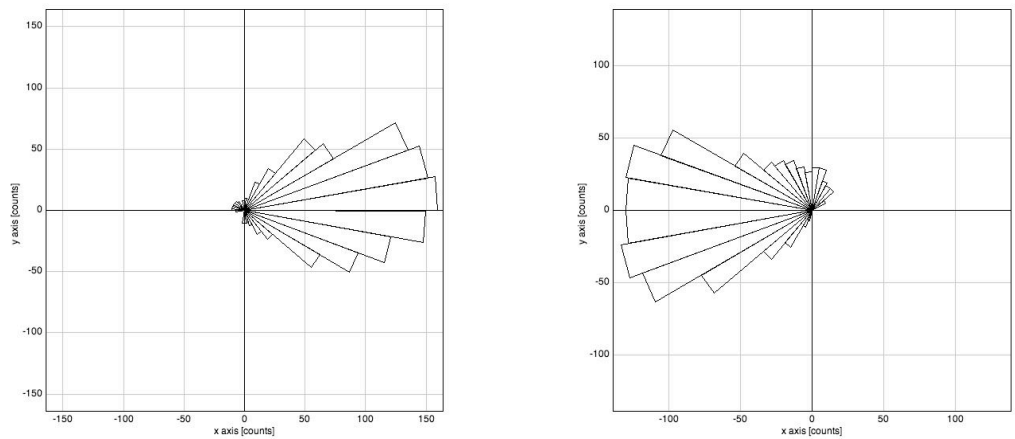
**Abbildung A2:** Richtungsrosetten für HUVEC-Zellen, die mit „WA-CpTTSS“ infiziert wurden.



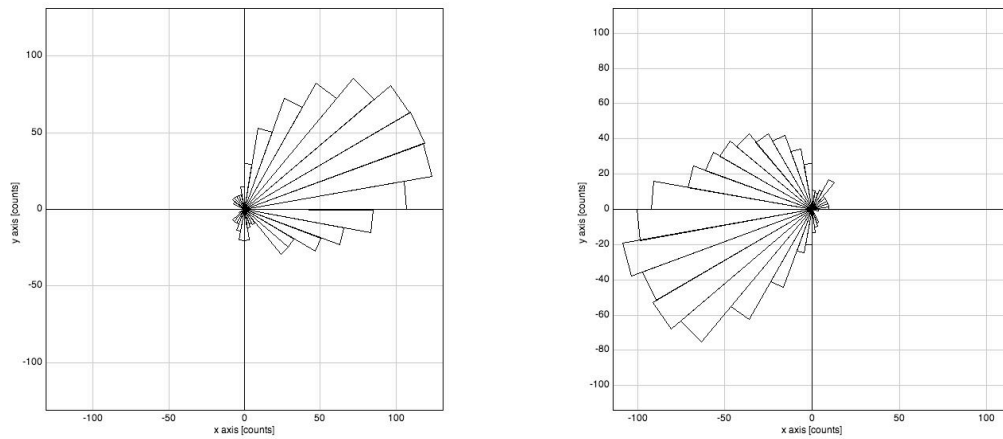
**Abbildung A3:** Richtungsrosetten für HUVEC-Zellen, die mit „Y.e.5/15“ infiziert wurden.

### Anhang 2:

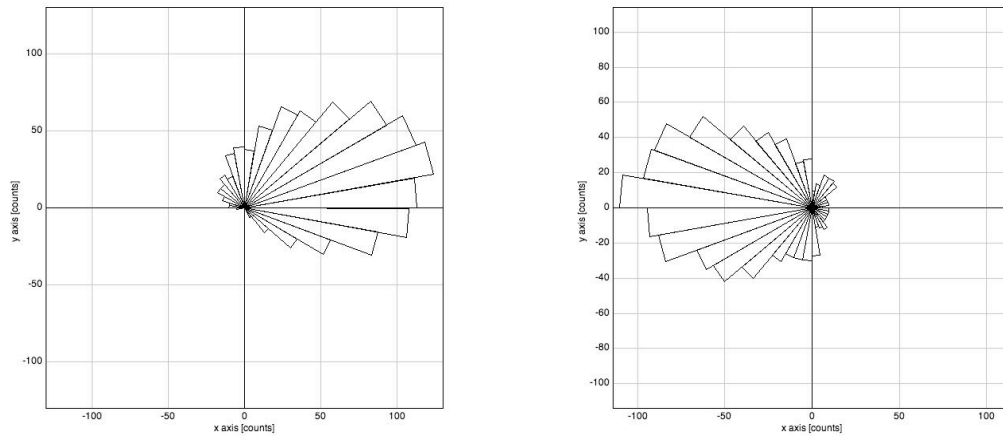
Die Rosetten der Migrations-Richtungen für HUVEC-Zellen infiziert mit WA-314( $\Delta Y_{opH}$ ), WA-CpTTSSYopE R144A, WA-CpTTSSYopE  $\Delta$ MLD und WA-CpTTSSYopT C139A sind anschließend aufgeführt.



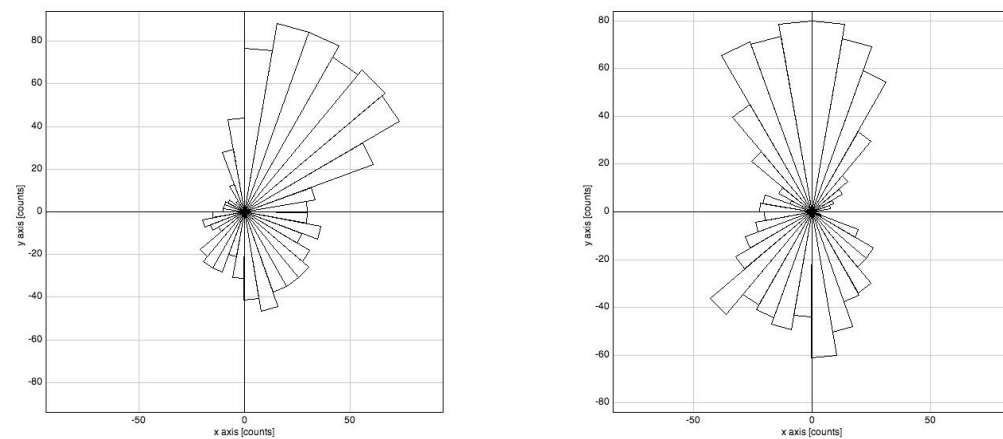
**Abbildung A4:** Richtungsrosetten für HUVEC-Zellen, die mit „WA-314( $\Delta Y_{opH}$ )“ infiziert wurden.



**Abbildung A5:** Richtungsrosetten für HUVEC-Zellen, die mit „WA-CpTTSSYopE R144A“ infiziert wurden.



**Abbildung A6:** Richtungsrosetten für HUVEC-Zellen, die mit „WA-CpTTSSYopE  $\Delta$ MLD“ infiziert wurden.



**Abbildung A7:** Richtungsrosetten für HUVEC-Zellen, die mit „WA-CpTTSSYopT C139A“ infiziert wurden.

**Anhang 3:** Untersuchungen des Aktinzytoskeletts: Mikrospikes, Lamellipodien und Stressfasern zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (nach 10 min und nach 2 h).

Stamm	Stressfasern 10 min	Stressfasern 2h	Lamellipodien 10min	Lamellipodien 2h	Mikrospikes 10min	Mikrospikes 2h
PBS	Z 100 A 80	Z 100 A 50	Z 20 A 20	Z 20 A 20	Z 100 A 80	Z 100 A 50
WA-C	Z 100 A 50	Z 100 A 80	Z 20 A 20	Z 20 A 20	Z 100 A 80-100	Z 100 A 20
Y.e. 5/15	Z 100 A 50	Z 100 A 50	Z 20 A 50	Z 20 A 20	Z 100 A 100	Z 100 A 50
WA-314	Z 20 A 20	Z 20 A 20	Z 0 A 0	Z 0 A 0	Z 20 A 10	Z 10 A 10
WA- CpTTSSYopO	Z 10 A 10	Z 50 A 80	Z 10 A 10	Z 30 A 80	Z 80 A 80	Z 30 A 80
WA- CpTTSSYopM	Z 50 A 50	Z 100 A 80	Z 50 A 80	Z 30 A 80	Z 80 A 80	Z 30 A 30
WA- CpTTSSYopP	Z 0 A 0	Z 80 A 50	Z 10 A 10	Z 30 A 50	Z 50 A 80	Z 80 A 100
WA- CpTTSSYopT	Z 10 A 10	Z 20 A 20	Z 10 A 80	Z 0 A 0	Z 10 A 10	Z 80 A 100
WA- CpTTSSYopE	Z 0 A 0	Z 0 A 0	Z 0 A 0	Z 0 A 0	Z 0 A 0	Z 0 A 0
WA- CpTTSSYopE R144A	Z 0 A 0	Z 50 A 10	Z 0 A 0	Z 0 A 0	Z 20 A 80	Z 0 A 0
WA- CpTTSSYopE $\Delta$ MLD	Z 10 A 10	Z 50 A 80	Z 0 A 0	Z 0 A 0	Z 20 A 50	Z 50 A 80
WA- CpTTSSYopH	Z 10 A 10	Z 30 A 30	Z 10 A 10	Z 10 A 10	Z 80 A 80	Z 10 A 10
WA- 314( $\Delta$ YopH)	Z 10 A 10	Z 20 A 30	Z 0 A 0	Z 10 A 80	Z 10 A 20	Z 50 A 80

**Tabelle A8:** Die Untersuchungen des Aktinzytoskeletts wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (nach 10 min und nach 2 h), da sich die drei Strukturen Mikrospikes, Lamellipodien und Stressfasern zeitlich unterschiedlich entwickeln. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass ein eventuell zeitlich unterschiedlicher Einfluss der Yops auf die Entwicklung der Strukturen detektiert wird. Als Negativ-Kontrollen dienten unbehandelte HUVEC-Zellen (PBS) und die Mutanten WA-C (Yersinien ohne Virulenz-Plasmid) und Y.e. 5/15 (Yersinien mit Virulenzplasmid, aber mit mutiertem nicht funktionsfähigen Translokalisations-Apparat). Zur Quantifizierung wurden zum einen die Anzahl (Z) der Zellen gezählt, die diese Struktur aufwiesen, zum anderen wurde das Ausmaß (A) der Ausprägung in diesen identifizierten Zellen bestimmt.

## 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher für das Vertrauen, das er mir bei dieser Arbeit entgegen gebracht und den Freiraum, den er mir gegeben hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Martin Christner, Dr. Nicole Fischer, Dr. Gefion Franke, Dr. Moritz Hentschke, Dr. Martin Kuhns, Dr. Holger Rohde und PD Dr. Klaus Ruckdeschel für ihre Unterstützung. Für statistische Fragen stand mir insbesondere Martin Christner als Ansprechpartner zur Verfügung, wofür ich mich ganz herzlich bei ihm bedanke. Weiterhin möchte ich die Unterstützung von Dr. Holger Rohde hervorheben, der mir während meiner Arbeit zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch möchte ich allen Doktoranden des mikrobiologischen Institutes Franziska Albrecht, Michael Busch, Anne Deuretzbacher, Kristin Gaus, Melanie Michel, Anja Röder, Bernhard Roppenser, Nina Schommer, Bettina Schwamb, Kristin Stieler und Bernd Zobiak für die kontinuierliche, geduldige und konstruktive Hilfe danken. Für Unterstützung am Mikroskop möchte ich im speziellen Bernd Zobiak und Bernhard Roppenser nennen. Ich bedanke mich bei Anja Röder für die wertvolle Kritik, die mich in der Korrekturphase meiner Arbeit weitergebracht und motiviert hat.

Für die vielen weiterführenden Gespräche danke ich Claudia Trasak, Nicole Czymmeck und Gesche Kroll, die mir die Grundlagen der Arbeitstechniken im Labor gezeigt haben und mir immer für Fragen zur Verfügung standen.

Insbesondere möchte ich meiner Familie danken, die mich in jeder Hinsicht unterstützte. Ein besondere Dank gilt auch Annika Basedow, Christin Klebe, Johanna Jänner und Jannika Wiskemann, die mich durch mein Studium begleitet haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



## **8 Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Name: Anna Franziska Peters

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die von den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werks kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: \_\_\_\_\_

(Anna Franziska Peters)