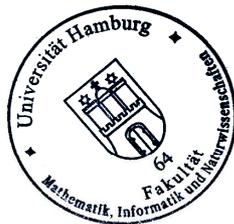

**Charakterisierung der zellulären Funktionen
und Interaktionspartner des *Yersinia enterocolitica*
(Schleifstein and Coleman 1939) outer protein
YopO**

Der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Department Biologie der Universität Hamburg
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
vorgelegte Dissertation

von
Dipl.-Biochem. Franziska Albrecht
Hamburg 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. M. AEPFELBACHER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W. STREIT
Tag der Disputation: 30. April 2010

Hamburg, den 15. April 2010



A. Temming
Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

Diese Arbeit ist meinem Opa gewidmet, der immer an mich geglaubt hat und leider nicht mehr warten konnte.

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINLEITUNG	2
1. Die Gattung <i>Yersinia</i>	2
2. <i>Yersinia enterocolitica</i>	3
3. Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren	4
3.1 High Pathogenicity Island (HPI)	5
3.2 Ail (<i>attachment invasion locus</i>)	5
3.3 Invasin	6
4. Das <i>Yersinia</i> Virulenzplasmid (pYV)	8
4.1 Allgemeine Eigenschaften	8
4.2 <i>Yersinia</i> Adhäsın A (YadA)	9
4.3 Das Typ-III-Sekretionssystem (TTSS)	10
4.4 YopM – ein Protein mit Leucin-reichen Sequenzen	13
4.5 YopT - eine Cysteintransferase	14
4.6 YopH – eine Tyrosin-Phosphatase	14
4.7 YopP/YopJ – eine Acetyltransferase	15
4.8 YopE – ein Protein mit GAP-Aktivität	16
5. YopO – ein multifunktionales Protein	17
5.1 Der strukturelle Aufbau von YopO	17
5.2 Die funktionelle Bedeutung von YopO	18
5.3 Die Kinase-Aktivität von YopO	20
6. Das Calcium- und Integrin-bindende Protein CIB1	21
6.1 CIB1 bindende Proteine	22
6.2 CIB1 und das Integrin $\alpha_{Iib}\beta_3$	23
7. Die Rolle von Calcium in Infektionen	25
III. FRAGESTELLUNG	28
IV. MATERIAL UND METHODEN	29
1. Verwendete Materialien und Geräte	29
1.1 Geräte	29
1.2 Chemikalien und Enzyme	30

INHALTSVERZEICHNIS

1.3	Bakterienstämme und Plasmide	31
1.4	Oligonukleotide	33
1.5	Antikörper	34
2.	Molekularbiologische Methoden	35
2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2	Agarosegelelektrophorese	36
2.3	Nukleinsäure-Analytik	37
2.4	CaCl ₂ -kompetente Bakterien	38
3.	Zellbiologische Methoden	40
3.1	Zelllinien und Kulturbedingungen	40
3.2	Beschichtung von Latex- <i>Beads</i>	42
3.3	Transfektion von Zellen	43
3.4	Infektion von Zellen	43
3.5	Immunfluoreszenzfärbung bei Zellen	44
3.6	Radioaktive Markierung von Zellen	44
3.7	<i>Spreading-Assay</i>	45
4.	Proteinbiochemische Methoden	46
4.1	GST-Fusionsproteine	46
4.2	SDS-PAGE (<i>sodium dodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis</i>)	47
4.3	Immunpräzipitation und Koimmunpräzipitation von Proteinen	50
4.4	Kinase-Assay	51
4.5	Dual-Luciferase-Assay	53
4.6	Fluorimetrische Bestimmung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration	54
V.	ERGEBNISSE	57
1.	Charakterisierung der Interaktion zwischen YopO und CIB	57
1.1	Die Kinase YopO phosphoryliert CIB1	57
1.2	YopO wird im Komplex mit endogenem CIB präzipitiert	62
1.3	YopO bindet an den CIB1-enthaltenden Komplex über die MLD-Domäne	64
2.	Zelluläre Funktionen des <i>Yersinia Outer Proteins YopO</i>	65
2.1	Das <i>spreading</i> der Zellen auf Fibrinogen wird durch YopO beeinflusst	65
2.2	Etablierung einer stabil YopO exprimierenden Zelllinie	71

INHALTSVERZEICHNIS

2.3	Der zytosolische Ca ²⁺ -Einstrom aus dem ER ist durch YopO vermindert _____	77
2.4	YopO vermindert die NFκB-Aktivierung _____	83
VI.	DISKUSSION _____	87
1.	Die Interaktion der Kinase YopO mit CIB1 _____	87
2.	Zelluläre Funktionen des YopO _____	90
VII.	LITERATUR _____	94
VIII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS _____	107
IX.	DANKSAGUNG _____	110

I. ZUSAMMENFASSUNG

Das enteropathogene Bakterium *Yersinia enterocolitica* hat verschiedene Virulenzmechanismen entwickelt, um die Immunantwort zu modulieren, der Phagozytose zu entgehen und sich das Überleben im Extrazellularraum lymphoider Gewebe zu sichern. Über das Typ-III-Sekretionssystem schleust dieser Erreger nach dem Kontakt mit der eukaryotischen Wirtszelle sechs verschiedene Effektorproteine, die sogenannten Yersinia outer proteins (Yops), in die Zelle. Diese modulieren verschiedenste Signalwege und beeinträchtigen so antibakterielle Abwehrmechanismen, wie die Phagozytose, die Ausschüttung von Zytokinen und zelluläres Überleben durch unterschiedliche biochemische Aktivitäten. Eines dieser Effektorproteine in *Y. enterocolitica* ist die 729 Aminosäuren große Serin/Threonin-Kinase YopO. Neben seiner Kinase-Domäne (Aminosäuren 89-440) beinhaltet das Protein noch eine Membran-Lokalisations-Domäne (MLD, Aminosäuren 1-89) und eine C-terminale GDI-ähnliche Region (Aminosäuren 440-729). Die Translokation von YopO führt zu einer Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts und damit zur Inhibition der Phagozytose, dabei sind die verursachenden Mechanismen und die Beteiligung der verschiedenen Domänen allerdings noch unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit CIB1 ein Substrat für die Serin/Threonin-Kinase YopO identifiziert werden, welches *in vitro* an den Serinen -185 und -186 phosphoryliert wird. Mit Hilfe von Koimmunpräzipitationsversuchen konnte zum einen die Interaktion bestätigt werden und zum anderen der CIB1-YopO-Interaktionsbereich innerhalb des YopO-Moleküls identifiziert werden. Dabei ist die MLD-Domäne von YopO essentiell für die Interaktion mit CIB1. Bei der Untersuchung der Rolle der CIB1-Phosphorylierung für die Zellmorphologie mit Hilfe eines Spreading-Assays konnte allerdings kein Einfluss dieser Phosphorylierung auf die Morphologie der Zellen festgestellt werden. Für die Charakterisierung weiterer zellulärer Effekte von transloziertem YopO wurde mit Hilfe des Flp-InTM-T-RExTM-Systems eine HEK293Zelllinie etabliert, die tetracyclinabhängig das Effektorprotein YopO exprimiert. So konnte mit Hilfe von fluorimetrischen Ca²⁺-Messungen ein inhibitorischer Einfluss von YopO auf den zytosolischen Ca²⁺-Einstrom aus intrazellulären Speichern, der für verschiedenste antibakterielle Abwehrmechanismen essentiell ist, in dieser stabilen Zelllinie dargestellt werden. Luciferase-Assays zeigten außerdem in Abhängigkeit von YopO eine verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, der für die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und Apoptoseregulatoren während der Inflammation verantwortlich ist.

II. EINLEITUNG

1. Die Gattung *Yersinia*

Der Name der Gattung *Yersinia* geht auf Alexandre J. Yersin zurück, der 1894 den Stamm *Yersinia pestis* isolierte und damit als den Erreger der Pest identifizierte (Schleifstein and Coleman 1939; Frederiksen 1964). Yersinien sind gramnegative Stäbchen aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, sie wachsen fakultativ anaerob, sind Katalase-positiv und bilden keine Sporen (Brenner 1979; Miller et al. 1988). Ihr Wachstumsoptimum liegt bei 27 °C, wobei sie aber auch bei niedrigeren Temperaturen zur Vermehrung fähig sind. *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* zeigen eine mono- bis peritriche Begeißelung und sind damit im Gegensatz zu *Y. pestis* bei 20-28 °C beweglich (Aepfelbacher and Heesemann 2001).

Es sind mittlerweile 11 *Yersinia*-Arten bekannt, von denen drei (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*) humanpathogene Bedeutung besitzen (Heesemann 1990; Putzker et al. 2001). Die Bandbreite der Erkrankungen, die sie auslösen, reicht dabei von der tödlichen Pest bis zur Gastroenteritis (Brenner 1979; Cornelis et al. 1987; Knapp 1988).

Y. pestis als Erreger der Pest wird über den „Rattenfloh“ auf den Menschen übertragen und hat nach Schätzungen ca. 200 Mio Menschenleben im Verlauf von 3 großen Pandemien gefordert (Perry and Fetherston 1997; Keeling and Gilligan 2000). Der Erreger verfügt über zwei spezifische Virulenzplasmide, die für Pathogenitätsfaktoren kodieren. Einerseits sind diese für den Befall des „Rattenfloh“ und dessen Funktion als Krankheitsvektor notwendig (Hinnebusch et al. 2002), andererseits sind sie für die Ausbildung einer Proteinschutzkapsel verantwortlich (Brubaker 1972; Benner et al. 1999). Nach dem Biss des „Rattenfloh“ zeigt sich in der Regel nach 1-7 Tagen Inkubationszeit das Krankheitsbild der Beulenpest. Dabei treten klinisch blauschwarze und schmerzhafte Schwellungen der Lymphknoten (Bubonen) auf, die dieser Form der Pest ihren Namen gegeben haben. Bei einem systemischen Verlauf endet die sich anschließende Pestsepsis unbehandelt in 50 –90 % der Fälle lethal.

Die sekundäre Lungenpest resultiert aus einer Streuung des Erregers in die Lunge. Dieser kann dann durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen werden und ist damit hochansteckend. Nach einer Inkubationszeit von nur wenigen Stunden weist die Pestpneumonie unbehandelt eine Lethalitätsrate von nahezu 100 % auf (Josko 2004).

Mit einer Homologie in der chromosomalen DNA von 97 % ist *Y. pseudotuberculosis* *Y. pestis* phylogenetisch am nächsten. Die durch sie verursachten Krankheitsbilder unterscheiden sich jedoch trotz dieser Ähnlichkeiten enorm, was auf die unterschiedlichen plasmidkodierten Pathogenitätsfaktoren zurückzuführen ist. Der enteropathogene Erreger *Y. pseudotuberculosis* befällt vorwiegend Tiere (Brubaker 2004; Chain et al. 2004), wobei die Infektion beim Menschen vor allem durch Verzehr von Fleisch latenter infizierter Tiere erfolgt. Diese führt nach einer Inkubationszeit von 1-2 Wochen zu einer Yersiniose, bei der mesenteriale Lymphknoten und lymphatisches Gewebe des terminalen Ileums befallen werden. Neben landwirtschaftlichen Nutztieren sind Nager ein wichtiges Erregerreservoir für *Y. pseudotuberculosis*. Bei infizierten Tieren tritt meist eine Septikämie auf und es kommt zu einer Ausbildung von tuberkuloseähnlichen Herden in Milz, Leber, Niere und Lymphknoten, die namensgebend für das Bakterium waren.

Neben *Y. pseudotuberculosis* ist *Y. enterocolitica* ein Erreger der humanen Yersiniose (Arvastson et al. 1971; Vantrappen et al. 1977) und wird auch über kontaminierte Lebensmittel wie Milch und Schweinefleisch auf den Menschen übertragen. Er ist neben *Salmonella* und *Campylobacter* der dritthäufigste bakterielle Enteritiserreger.

Alle drei humanpathogenen *Yersinia*-Bakterien sind invasiv, lymphotrop und können der angeborenen Immunantwort, dabei im speziellen der Beseitigung durch Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten (PMN's), entgehen (Cornelis et al. 1998). Sie unterscheiden sich allerdings massiv in ihrer Invasivität. *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* können die gastrointestinale Mukosa überwinden und darunter liegendes Gewebe infizieren, während *Y. pestis* durch den „Rattenfloh“ in den Körper injiziert wird und damit selbst keine Epithelien durchdringen muss (Cornelis et al. 1998).

2. *Yersinia enterocolitica*

Dieser Erreger ist weit verbreitet und findet sich meist in aquatischen und tierischen Reservoiren, wobei das Hausschwein als Hauptreservoir für human pathogene Stämme dient (Bottone 1997). Die Infektion mit *Y. enterocolitica* erfolgt oral durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln (Cover and Aber 1989; Aleksic and Bockemuhl 1990). Dabei gelangen die Bakterien in das terminale Ileum, durchwandern dort spezielle Epithelzellen der intestinalen Mukosa (sogenannte M-Zellen) und besiedeln schließlich das darmassoziierte lymphatische

Gewebe der Peyerschen Plaques. Dabei scheint das Oberflächenprotein Invasin von großer Bedeutung in diesem frühen Stadium der Infektion zu sein, indem es β 1-Integrin-Signalwege aktiviert und damit die Internalisierung der Bakterien ermöglicht (Grassl et al. 2003). Im submukosalen Lymphgewebe kann die Vermehrung der Yersinien stattfinden, Abzessbildung durch die M-Zellen kann beobachtet werden bzw. die Yersinien können sich über abfließende lymphatische Gefäße bis in die mesenterialen Lymphknoten ausbreiten. Nach einer Inkubationszeit von 4-7 Tagen können je nach Alter und Immunstatus des Patienten Symptome von leichtem Durchfall mit Erbrechen und leichtem Fieber, bis hin zu akuter mesenterialer Lymphadenitis auftreten (Bottone 1997). Im Allgemeinen verläuft die Krankheit gutartig und selbstlimitierend. Ein septischer Verlauf tritt meist nur bei immunsupprimierten Patienten auf und kann antibiotisch behandelt werden. Bei 30 % der Infizierten können Folgerkrankungen wie das Erythema nodosum, die reaktive Arthritis, eine Urethritis und das sogenannte Guillain-Barré-Syndrom auftreten (Fredriksson-Ahomaa et al. 2006).

Aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften lässt sich *Y. enterocolitica* in biochemischen Tests in 6 verschiedene Biotypen (1A, 1B und die Gruppen 2, 3, 4 und 5) einteilen (Wauters et al. 1987). Serologisch kann *Y. enterocolitica* zudem noch nach der Expression verschiedener Oberflächen- (O) bzw. Geißelantigene (H) unterschieden werden. Bisher sind fast 60 verschiedene Serotypen beschrieben, von denen 11 mit Infektionen im Menschen in Verbindung gebracht werden. Die Serotypen O:3, O:9, O:5,27 und O:8 verursachen weltweit die meisten Infektionen, wobei in den USA meist die Serotypen O:4, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 zu finden sind, die alle dem hoch pathogenen Biotyp 1B angehören. In Europa dagegen treten vermehrt O:3, O:5,27 und O:9 als Serotypen auf, die zu den weniger pathogenen Biotypen 2 bis 5 gezählt werden (Aleksic and Bockemuhl 1990). Bisweilen kann auch ein *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 in Deutschland isoliert werden (Schubert et al. 2003).

3. Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren

Der Lebenszyklus von enteropathogenen Yersinien setzt ein Überleben außerhalb des Wirtes voraus, was durch eine Anpassung der Genexpression an die jeweilige Umgebung erreicht wird. Bevor diese Mikroorganismen durch den Menschen aufgenommen werden, können sie aufgrund hochadaptiver Stoffwechselwege, die typisch für solche frei lebenden Enterobakterien sind, auch feuchte natürliche Lebensräume bzw. Lebensmittel besiedeln. Dabei ist die

Umgebungstemperatur von entscheidender Bedeutung für die Genexpression. So werden Flagellen, die für die Motilität der Bakterien wichtig sind, s-LPS (*smooth lipopolysaccheride*), das Adhäsion Invasin und das hitzestabile Enterotoxin Yst bei Temperaturen unter 30 °C stark exprimiert, bei 37 °C jedoch nur sehr schwach bzw. gar nicht (Straley and Perry 1995). Verschiedene Virulenzfaktoren sind für Resistenzen gegenüber der Immunabwehr des Wirtes verantwortlich, aber auch für den Tropismus für lymphatisches Gewebe und die Fähigkeit sich im Wirt weiter zu verbreiten. Diese Virulenzfaktoren sind in Yersinien im Genom verankert bzw. liegen zum Teil auch plasmidkodiert vor.

3.1 High Pathogenicity Island (HPI)

Einer dieser genomkodierten Virulenzfaktoren ist ein Eisenaufnahmesystem, welches in allen drei human pathogenen Yersinien nahezu identisch ist und für die Versorgung der Yersinien mit Eisenionen aus ihrer Umgebung eine wichtige Rolle spielt. Die Gene dafür liegen auf einer ca. 45 kb großen Pathogenitätsinsel (*high pathogenicity Island* = HPI) und kodieren für das Yersiniabaktin-Siderophor dessen Biosynthese, Transport und Aufnahmemechanismus (Heesemann et al. 1993; Carniel et al. 1996; Schubert et al. 2004). Das exprimierte Siderophor komplexiert Eisenionen in der Wirtszelle und wird über das Membranprotein FyuA (*ferric yersiniabactin uptake*) von den Yersinien wieder aufgenommen. Die HPI ist für eine systemische Infektion essentiell und daher meist bei hochpathogenen Stämmen zu finden. Bei Patienten mit erhöhten Eisenspiegeln (z.B. Hämochromatose) können Infektionen mit pathogenen Yersinien deshalb leichter zu schweren Septikämien führen.

3.2 Ail (*attachment invasion locus*)

Ail ist ein Membranprotein, dem eine Rolle bei der Anheftung an Epithelzellen und der anschließenden Invasion dieser durch *Y. enterocolitica* zugeschrieben wird. Nicht adhäsive *E. coli* Stämme konnten durch die Übertragung des *ail*-Gens an verschiedene Epithelzellen adhären (Hep-2) und bestimmte Zelllinien, wie z.B. CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*), auch invadieren (Miller and Falkow 1988). *Ail*-Sequenzen wurden nur in pathogenen *Yersinia* Stämmen gefunden, wobei die Übertragung dieser Sequenz in nicht pathogene *Yersinia* Stämme jedoch zu keinem invasiven Phänotyp führte. Allerdings zeigten diese Stämme Resistenzen

bezüglich der Abtötung durch humanes Serum (Pierson and Falkow 1993). Ail ist ein 17 kDa großes Protein, dessen Expression abhängig ist von der Temperatur und der Wachstumsphase der Bakterien. Im Gegensatz zu Invasin, das nur bei geringeren Temperaturen (30 °C) exprimiert wird, kann Ail sowohl bei 30 °C in der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien exprimiert werden als auch bei höheren Temperaturen (37 °C) in der stationären Phase (Pierson and Falkow 1993). Bei der Infektion von Mäusen spielte Ail verglichen mit den anderen Adhäsinen Invasin und YadA eine eher untergeordnete Rolle (Pepe et al. 1995).

3.3 Invasin

Invasin ist der wichtigste Internalisierungsfaktor in *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*. Es weist Ähnlichkeiten zur Familie der Intimine auf, die vor allem für die Besiedlung des Darms durch enteropathogene *E. coli*-Stämme eine wichtige Rolle spielen (Hayward et al. 2006). Invasin ist chromosomal kodiert und wird bei einer Temperatur von 26 °C und einem pH von 8 bzw. bei 37 °C und einem pH von 5,5 auf der Oberfläche von *Y. enterocolitica* (92 kDa) und *Y. pseudotuberculosis* (103 kDa) exprimiert (Isberg et al. 1987; Pepe and Miller 1993; Revell and Miller 2000). Damit kann eine Expression von Invasin im Darmgewebe durchaus angenommen werden. Hier vermittelt Invasin die Internalisierung der Bakterien durch M-Zellen, indem es an verschiedene β_1 -Integrine, wie z.B. $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_v\beta_1$, binden kann (Isberg and Leong 1990). Invasin bindet an die gleiche Region der β_1 -Integrine wie das natürliche Substrat Fibronectin, jedoch mit einer sehr viel höheren Affinität. Dadurch wird ein stabiler Kontakt zwischen Wirt und Bakterie gewährleistet und eine Reihe von Regulatoren des Aktinzytoskeletts werden aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer effizienten Internalisierung der Bakterien (Van Nhieu and Isberg 1991) und involviert sowohl Tyrosin-Kinasen der Src-Familie als auch die Phosphatidylinositol-3-Kinase, Proteine der WASP-Familie (*Wiskott-Aldrich syndrome proteins*), den Arp2/3-Komplex und Mitglieder der Rho-GTPasen (Mecasas et al. 1998; Black and Bliska 2000; Fincham et al. 2000; Von Pawel-Rammingen et al. 2000; Alrutz et al. 2001; Isberg and Barnes 2001; McGee et al. 2001; Wiedemann et al. 2001).

Bei Infektionen von Mäusen zeigten *Y. enterocolitica*-Stämme, bei denen das *inv*-Gen deletiert war, eine sehr viel geringere Invasivität, wobei Invasin in späteren Phasen der Infektion keine Rolle mehr für die Infektion von Mäusen spielt (Pepe and Miller 1993). Die β_1 -Integrine werden im Dünndarm ausschließlich auf der Oberfläche der M-Zellen exprimiert, was die Spezifität der

enteropathogenen Yersinien für diesen Zelltyp in der frühen Phase der Infektion erklärt (Clark et al. 1998; Isberg and Barnes 2001). *Y. pestis* zeigt keine Darminvasivität, da bei diesem Erreger das *inv*-Gen durch eine Insertion inaktiviert ist.

Für die Bindung der Integrine sind die 192 c-terminalen Aminosäuren des Invasin in *Y. pseudotuberculosis* essentiell und ausreichend (Leong et al. 1990; Wiedemann et al. 2001). In diesem Bereich sind die Proteine aus den zwei enteropathogenen Yersinien zu 79 % homolog, wobei die Gesamtproteine eine Homologie von 69 % und eine Identität von 57 % zeigen. Der c-terminale extrazelluläre Bereich des Proteins aus *Y. pseudotuberculosis* konnte strukturell über Röntgenkristallografie aufgeklärt werden. Diese 497 Aminosäuren sind stabförmig angeordnet und können in fünf Domänen unterteilt werden. Dabei zeigen die Domänen D1-D4 Immunglobulin-ähnliche Faltstrukturen und die Domäne D5 weist eine C-Typ-Lektin-ähnliche Domäne auf (Hamburger et al. 1999). Für die β_1 -Integrin vermittelte Adhäsion und Invasion sind vorwiegend die Domänen D4 und D5 verantwortlich, daher werden sie auch als Zelladhäsions- bzw. Invasionsdomäne bezeichnet (Dersch and Isberg 1999). Die essentiellen Aminosäuren konnten bei *Y. enterocolitica* als die Aspartatreste 659 und 760 bzw. bei *Y. pseudotuberculosis* als Aspartatreste 811 und 911 identifiziert werden (Leahy et al. 1996; Hamburger et al. 1999; Isberg and Barnes 2001).

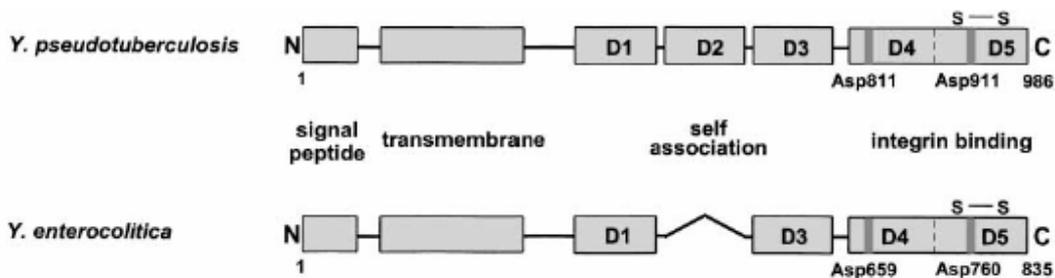


Abbildung II-1 Funktionale Domänen des *Yersinia* Invasins (Grassl 2003, modifiziert)

Das Protein ist über den transmembranen N-Terminus in der äußeren Membran verankert. Invasin aus *Y. pseudotuberculosis* besteht aus 5 extrazellulären Domänen (D1-D5), wobei D4 und D5 die Integrin-Bindungsmotive enthalten (die hervorgehobenen Aspartat-Reste Asp811 und Asp 911 sind essentiell für die Integrin-Bindung). Integrin-Moleküle aus *Y. pseudotuberculosis* bilden Homomultimere über die Domäne D2. Das Protein aus *Y. enterocolitica* ist stark homolog mit Ausnahme der fehlenden Domäne D2. Die Aspartatreste Asp 659 und Asp 760 sind die korrespondierenden Aminosäuren, die essentiell für die Integrin-Bindung sind.

Die Domäne D2, auch als Homomultimerisierungsdomäne bezeichnet, findet sich nur in *Y. pseudotuberculosis* und ist für dessen Invasivität von besonderer Bedeutung. Sie induziert die Bildung von Multimeren in der Außenmembran, was zu einer Anhäufung der Integrine

(*clustering*) führt, wenn eine direkte Wechselwirkung der Rezeptoren mit der Wirtszelle vorliegt. Dadurch werden vermutlich Signalwege verstärkt, die zur Reorganisation des Zytoskeletts führen und den Invasionsvorgang einleiten (Dersch and Isberg 1999).

RovA (*regulator of virulence*) wurde als ein Regulator für die Transkription des *inv*-Gens identifiziert. Es ist in allen drei human pathogenen *Yersinia*-Spezies zu finden und aktiviert die Transkription des *inv*-Gens. Ein weiterer Regulator der *inv*-Transkription ist das DNA-bindende Protein H-NS, welches die Expression von Invasin reprimiert (Nagel et al. 2001; Nagel et al. 2003; Heroven et al. 2004). RovA ist außerdem für die Regulation weiterer Virulenzmechanismen enteropathogener *Yersinia*-Spezies verantwortlich, wie z.B. für die Resistenzvermittlung gegen Hitze und oxidativen Stress (Nagel et al. 2003). Die Virulenz von *Y. enterocolitica* und *Y. pestis* ist bei Mutanten ohne das *rovA*-Gen deutlich vermindert (Pepe and Miller 1993; Nagel et al. 2001; Revell and Miller 2001; Dube et al. 2003; Cathelyn et al. 2006).

Neben der Internalisierung der Bakterien durch Epithelzellen vermittelt Invasin auch die Aktivierung von NFκB und damit verbunden die Expression diverser proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Schulte and Autenrieth 1998; Kampik et al. 2000; Schulte et al. 2000).

4. Das *Yersinia* Virulenzplasmid (pYV)

4.1 Allgemeine Eigenschaften

Die Fähigkeit der Yersinien, sich extrazellulär im Wirt zu vermehren und dabei der angeborenen unspezifischen Immunabwehr zu entgehen, hat ihre Ursache im 70 kb großen Virulenzplasmid pYV. Die Virulenzplasmide verschiedener *Yersinia*-Spezies sind sich sehr ähnlich, bis auf einige Transposons, die im Laufe der Evolution aufgetreten sind. Bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* unterscheiden sich die Virulenzplasmide durch eine Inversion, die fast die halbe Sequenz des Plasmids betrifft (Biot and Cornelis 1988). pYV kodiert neben dem Adhäsin YadA und einigen regulatorischen Proteinen auch ein Typ-III-Sekretionssystem (TTSS), welches die ebenfalls auf diesem Plasmid kodierten Effektorproteine, die sogenannten *yersinia outer proteins* (Yops), in die Wirtszelle transloziert (Heesemann et al. 1986; Snellings et al. 2001; Cornelis 2002).

4.2 Yersinia Adhäsion A (YadA)

Das Adhäsion YadA wird in *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* auf der äußeren Bakterienmembran exprimiert. In *Y. pestis* weist das *yadA*-Gen eine Punktmutation auf und wird so nicht exprimiert (Rosqvist et al. 1988). Für die Virulenz von *Y. pseudotuberculosis* scheint es eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, da ein im *yadA*-Gen mutierter Stamm von *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O:3 verglichen mit dem Wildtyp-Stamm keinen Unterschied in der Virulenz gezeigt hat (Bolin and Wolf-Watz 1984). In späteren Studien konnte zwar eine größere Virulenz für den Wildtyp-Stamm nachgewiesen werden (Han and Miller 1997), der Unterschied zur Mutante war jedoch sehr gering. Für *Y. enterocolitica* ist YadA ein wichtiger Virulenzfaktor. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass *yadA*-Mutanten des *Y. enterocolitica* Serotyps O:9 effizienter durch die Immunabwehr des Wirtes aus dem Darmgewebe beseitigt werden konnten (Kapperud et al. 1987) und *yadA*-Mutanten des Serotyps O:8 sich völlig avirulent verhielten (Kapperud et al. 1987; Tamm et al. 1993). YadA scheint also eine wichtige Rolle für die Persistenz der Bakterien in den lymphatischen Geweben einzunehmen, indem es für eine einwandfreie Translokation der Yops in die Wirtszellen sorgt (Rosqvist et al. 1991; Bliska et al. 1993).

Das *yadA*-Gen ist in *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* auf dem Virulenzplasmid pYV kodiert (Bolin and Wolf-Watz 1984; Balligand et al. 1985; Simonet et al. 1996) und wird bei einer Temperatur von 37 °C in Abhängigkeit seines Aktivators VirF/LcrF transkribiert (Lambert de Rouvroit et al. 1992; Skurnik and Toivanen 1992). Die Transkription ist dabei nicht Ca²⁺-abhängig, wie bei anderen von VirF/LcrF regulierten Genen (Bolin et al. 1982; Skurnik et al. 1984; Skurnik 1985). Das Protein kann bereits Minuten nach einer Änderung der Wachstumstemperatur zu 37 °C auf der äußeren Membran der Bakterien detektiert werden (Bolin et al. 1982). Es wird als homotrimeres Protein mit einer Größe von 200-240 kDa (Bolin et al. 1982; Skurnik et al. 1984; Mack et al. 1994) exprimiert. Dabei entsteht zunächst ein Präprotein, welches post-translational modifiziert wird, indem eine N-terminale Signalsequenz von 25 Aminosäuren bei der Einlagerung in die Membran abgetrennt wird (Bolin and Wolf-Watz 1984). YadA bildet oligomere Fibrillen und Köpfchenstrukturen (*lollipop*) aus und vermittelt die Adhärenz an Zellen und Gewebe (Heesemann et al. 1987; Roggenkamp et al. 1996) über die Bindung an extrazelluläre Matrixproteine, wie z.B. Kollagen, Fibronectin und Laminin (Emody

et al. 1989; Schulze-Koops et al. 1992; Terti et al. 1992; Flugel et al. 1994). YadA ist in der Lage, über Fibronectin in einem sogenannten Brückenmechanismus auch an β 1-Integrine zu binden, und vermittelt so auch die Invasion in eukaryotische Zellen (Yang and Isberg 1993). Dabei werden über Tyrosinkinase der Src-Familie Signaltransduktionswege induziert, die zur Ausbildung von Pseudopodien und zur Internalisierung YadA-exprimierender Bakterien führen (Eitel and Dersch 2002). Darüberhinaus schützt YadA die Yersinien vor Defensinen und der Beseitigung durch das Komplementsystem, indem es den Komplementfaktor H bindet und zur Inaktivierung des Komplementfaktors C3b führt. Infolgedessen werden vermindert aktive Membranangriffskomplexe auf der Oberfläche der Bakterien ausgebildet (Balligand et al. 1985; Pilz et al. 1992; China et al. 1993; Roggenkamp et al. 1996; Hoiczky et al. 2000).

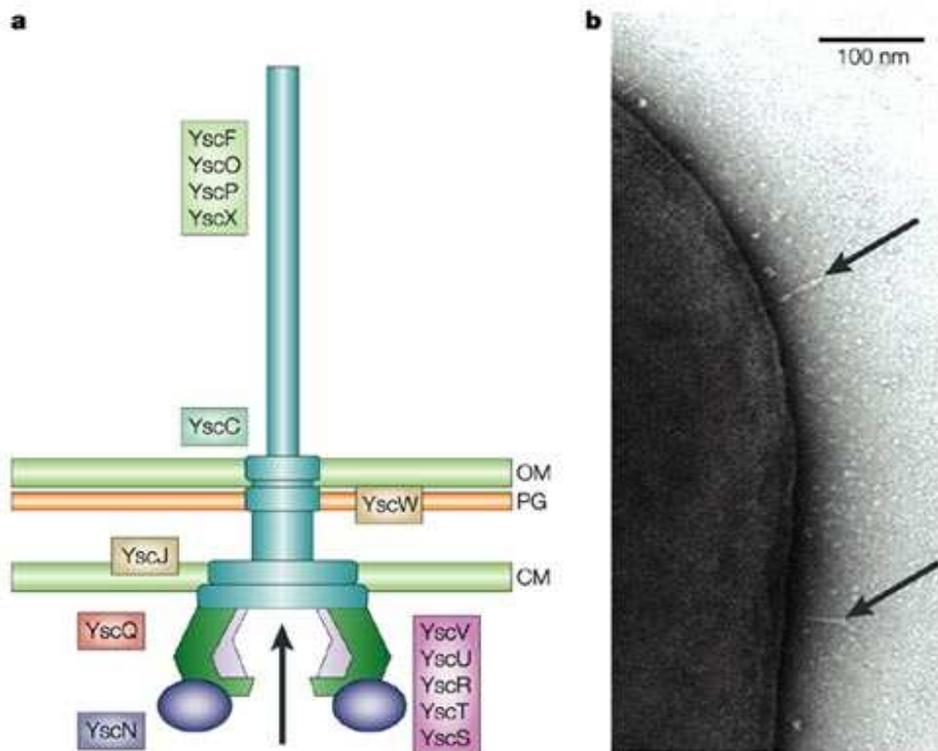
YadA kann an die Oberfläche von Neutrophilen und Makrophagen binden, begünstigt damit die Translokation der Yop-Effektorproteine und kann so der Eliminierung der Bakterien durch Phagozytose entgegenwirken (Rosqvist et al. 1994; Ruckdeschel et al. 1996). Die Autoagglutination von Yersinien kann auch auf die Interaktion von YadA-Molekülen zurückgeführt werden (Hoiczky et al. 2000; El Tahir and Skurnik 2001), was bei der Ausbildung von Mikrokolonien und Abzessen in lymphatischen Geweben und Organen, ganz besonders in Leber und Milz, von Bedeutung ist. YadA ist auch fähig Hämagglutination zu vermitteln, indem es mit Erythrozyten in Wechselwirkung tritt (Kapperud et al. 1985).

4.3 Das Typ-III-Sekretionssystem (TTSS)

Alle drei human pathogenen Yersinien exprimieren auf dem Virulenzplasmid pYV ein Typ-III-Sekretionssystem (TTSS), welches den wichtigsten Virulenzfaktor der Bakterien darstellt. Das TTSS befähigt die Mikroorganismen, im lymphatischen Gewebe ihres Wirtes extrazellulär zu überleben und dessen angeborene Immunität zu manipulieren (Aepfelbacher et al. 1999; Cornelis 2002; Wren 2003). Mehr als 20 verschiedene Typ-III-Sekretionssysteme konnten bisher in human- und zoopathogenen Bakterien (z.B. *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bordetella*) und phytopathogenen Erregern (z.B. *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*) nachgewiesen werden. Es dient gramnegativen Bakterien als Translokationsapparat, über den Effektorproteine direkt in die eukaryotische Wirtszelle eingeschleust werden (Rosqvist et al. 1994; Macnab 2004; Gerlach and Hensel 2007). Yersinien im Speziellen translokieren 6 verschiedene Effektoren, sogenannte Yops (*yersinia*

outer proteins) in Immunzellen und blockieren so Phagozytose und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Weiterhin induzieren sie Apoptose und die Reorganisation des Zytoskeletts und kontrollieren neben vielen weiteren Effekten die Proliferation der Zellen. Dadurch wird das Überleben und die extrazelluläre Vermehrung der Bakterien in lymphatischen Geweben gewährleistet und die Verbreitung in andere Organe vermittelt (Simonet et al. 1990; Fallman et al. 1995; Cornelis 2002). Das sequenzierte Virulenzplasmid von *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 kodiert nicht nur für das TTSS an sich, sondern auch für die sekretierten Yops, ihre Chaperone und weitere regulatorische Faktoren (Snellings et al. 2001).

Das Sekretionssystem wird von mehr als 20 sogenannten Ysc-Proteinen (*yersinia secretion proteins*) gebildet, welche sowohl die äußere und innere Bakterienmembran als auch die eukaryotische Membran der Zielzelle umfassen. Es besitzt eine nadelartige Struktur, die Homologien zu bakteriellen Flagellen aufweist. Die Nadel ist in die Peptidoglycanschicht und die zytoplasmatische Membran der Bakterien integriert. Die Ysc-Proteine übernehmen verschiedenste Funktionen bei der Ausbildung des Sekretionsapparates. Der Basalkörper wird von den Proteinen YscD, YscR, YscS, YscT, YscU und YscV gebildet und umschließt ringförmig die zur Nadel führende zentrale Pore. YscC und YscF bilden durch Polymerisation die Nadel aus, die etwa 600-800 Å lang ist und einen Innendurchmesser von etwa 20 Å hat (Hoiczyk and Blobel 2001; Cornelis 2002; Cornelis 2006). Das Protein YscN ähnelt der F₀F₁-ATPase-Protonenpumpe der Flagellen (Woestyn et al. 1994; Aizawa 2001) und übernimmt damit eine wichtige Funktion bei der Translokation.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abbildung II-2 **Der Nadelkomplex (Cornelis, 2002, modifiziert)**

links: schematische Darstellung der Injektionsnadel von Yersinia; OM: äußere Membran; PG: Peptidoglycanschicht, CM: cytoplasmatische Membran; rechts: elektronenmikroskopische Aufnahme der Nadel auf der Bakterienmembran;

Zunächst werden die Effektorproteine von den Yersinien der Bakterienzelle ausgeschleust, dabei werden die innere und äußere Bakterienmembran passiert. Für den eigentlichen Translokationsprozess müssen die Yops die eukaryotische Plasmamembran überwinden, um in deren Zytosol zu gelangen. Der isolierte Sekretionsprozess kann *in vitro* durch den Entzug von Ca^{2+} aus dem Wachstumsmedium induziert werden. Bei einer Inkubation der Yersinien bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Ca^{2+} -defizientem Medium kommt es zum Stillstand des bakteriellen Wachstums und die Sekretion der Effektoren in den Kulturüberstand erfolgt (Carter et al. 1980). Es wird vermutet, dass der Entzug von Ca^{2+} die Blockierung des Sekretionskanals durch das Regulatorprotein YopN aufhebt (Forsberg et al. 1991; Cornelis and Wolf-Watz 1997). Die Translokation *in vivo* erfolgt allerdings nur nach Kontakt mit der Wirtszelle. Die Transmembran-proteine YopB und YopD bilden in der eukaryotischen Membran eine Pore, die über YopQ und LcrV stabilisiert

wird (Hakansson et al. 1996; Tardy et al. 1999). Einige der translozierten Effektoren benötigen für den Transport in die Wirtszelle bestimmte Chaperone, sogenannte Syc-Proteine (*Specific yop chaperone*). Diese Chaperone sind in Genabschnitten kodiert, die direkt neben dem Gen des zu translozierenden Effektorproteins liegen, und werden bei der Sekretion der Effektoren nicht sekretiert (Wattiau et al. 1994; Trulzsch et al. 2003). Es wird angenommen, dass die Chaperone das Effektorprotein in einem partiell entfaltenen Zustand stabilisieren, da für die Translokation des vollständig gefalteten Effektors der Durchmesser des Nadelkomplexes zu gering ist (Hoicyk and Blobel 2001; Cornelis 2002).

Die sechs translozierten Effektoren sind YopH, YopM, YopT, YopP (YopJ bei *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) YopE und YopO (YpkA bei *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*). Allein vier von ihnen (YopT, YopO/YpkA, YopE und YopH) beeinflussen das Aktinzytoskelett der Wirtszelle, das für die Phagozytose eine wichtige Rolle spielt (Rosqvist et al. 1990; Hakansson et al. 1996; Iriarte and Cornelis 1998).

4.4 YopM – ein Protein mit Leucin-reichen Sequenzen

YopM ist ein Protein, das in seiner Größe variiert, je nachdem aus welchem *Yersinia*- Stamm es isoliert wurde. Diese Variabilität ist auf die unterschiedliche Anzahl der Leucin-reichen Sequenzen (LRR) in der *yopM* Sequenz zurückzuführen. Die ersten drei LRRs bilden dabei zusammen mit den 32 C-terminalen Aminosäuren ein Kernlokalisierungssignal (NLS) (Benabdillah et al. 2004) aus. Nach der Injektion des 40 kDa großen Proteins ins Zytoplasma wird es vesikelassoziiert zum Zellkern transportiert (Skrzypek et al. 1998). Im Zytoplasma bindet und aktiviert YopM die Serin-/Threonin-Kinasen PRK2 (*protein kinase C-like 2*) und RSK1 (*ribosomal S6 protein kinase 1*), deren Zielmoleküle die Expression von Genen regulieren, die für das Zellwachstum und den Zellzyklus eine wichtige Rolle spielen. (McDonald et al. 2003). Dies geht einher mit früheren *Microarray*-Studien von Makrophagen, die mit *Y. enterocolitica* infiziert waren. Hier konnte für YopM auch eine regulatorische Funktion für die Expression bestimmter Gene gezeigt werden, die in die Regulation von Zellwachstum und Zellzyklus involviert sind (Sauvonnet et al. 2002). YopM besitzt als einziges Effektorprotein keine enzymatische Aktivität und hat keine offensichtliche antiphagozytäre Funktion. Für die Virulenz in Mäusen ist es jedoch unabdingbar (Leung et al. 1990; Aepfelbacher 2004).

4.5 YopT - eine Cysteintransferase

YopT wurde als letztes Effektorprotein in *Yersinia* identifiziert (Carniel 2002). Es wird in *Y. pestis* und *Y. enterocolitica* als ein 35 kDa großes Protein exprimiert, jedoch nicht in den virulenten *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen des Serotyps O:3. Es gehört zur Gruppe der CA-Cysteinproteasen und kann aktive Rho-GTPasen von der Membran ablösen und damit die Translokation ins Zytosol bewirken (Iriarte and Cornelis 1998; Shao et al. 2002; Viboud and Bliska 2005). Dies geschieht über Abspaltung des C-terminalen Geranylgeranyl-Cystein-Restes, der den GTPasen als Lipid-Anker dient (Shao et al. 2003; Aepfelbacher 2004). *In vitro* konnte die proteolytische Aktivität von YopT auf RhoA, Rac1 und Cdc42 gezeigt werden. *In vivo* scheint RhoA das bevorzugte Substrat zu sein, was mit der beobachteten Zerstörung der Aktin-Stressfasern einhergeht (Iriarte and Cornelis 1998; Aepfelbacher et al. 2003).

Nach der Injektion von YopT in das Zytoplasma der Wirtszelle transloziert YopT zur Plasmamembran, kann dort RhoA binden und den Lipid-Anker abspalten. Zusätzlich kann es auch an GDI (*guanine dissociation inhibitor*) gebundenes RhoA proteolytisch spalten, was die Akkumulation von RhoA im Zytosol zur Folge hat (Aepfelbacher et al. 2003). YopT inhibiert über die Modifikation der Rho-GTPasen die Phagozytose von opsonierten und nicht-opsonierten Yersinien durch Makrophagen und Neutrophile (Grosdent et al. 2002). Auch die Reorganisation von Aktin in sogenannten *phagocytic cups* und podosomalen Adhäsionsstrukturen, die für die Chemotaxis benötigt werden, wird durch YopT exprimierende Yersinien in humanen Makrophagen inhibiert (Aepfelbacher et al. 2003; Aepfelbacher 2004). Eine andere Studie konnte das Zusammenspiel von YopT mit dem Effektorprotein YopE bei der Modifikation von transfiziertem Rac1 zeigen (Wong and Isberg 2005). Dabei konkurrierten die zwei Effektoren um membrangebundenes GTP-Rac1, was sowohl zu aktivem deprenyliertem Rac1 im Zellkern als auch zu inaktivem Rac1 im Zytoplasma führte. Inwieweit dieser Mechanismus zur Virulenz beiträgt, ist noch nicht bekannt (Aepfelbacher et al. 2007).

4.6 YopH – eine Tyrosin-Phosphatase

Dieses Effektorprotein ist eine sehr aktive Tyrosin-Phosphatase, deren katalytische Domäne im C-terminalen Bereich des 50 kDa großen Proteins angesiedelt ist (Juris et al. 2002). YopH hat Effekt auf verschiedene Signalwege sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immun-

antwort (Guan et al. 1990; Aepfelbacher 2004; Viboud and Bliska 2005). Viele Substrate von YopH gehören zu Proteinen in fokalen Adhäsionskomplexen, die eine regulatorische Rolle bei der Interaktion des Aktinzytoskeletts mit Integrinen spielt (Brakebusch and Fassler 2003). Proteine wie p130 cas, FAK (*focal adhesion kinase*), Paxilin, FyB (*Fyn binding protein*) und SKAP-HOM werden von YopH in verschiedensten Zelllinien dephosphoryliert (Black and Bliska 1997; Persson et al. 1997; Hamid et al. 1999). Es wird angenommen, dass diese in fokalen Adhäsionskomplexen lokalisierten Proteine auch während der Invasin-vermittelten Phagozytose von YopH modifiziert werden und damit die Phagozytose der Bakterien inhibiert wird (Aepfelbacher 2004).

Infektionsstudien mit *Y. enterocolitica* bei Mäusen zeigten, dass die Virulenz der Yersinien nach der Deletion von YopH stark vermindert (Trulzsch et al. 2004) und auch die Kolonisation der Lunge durch *Y. pseudotuberculosis* stark beeinträchtigt war. *In vitro* Daten lassen vermuten, dass YopH für bis zu 50 % der antiphagozytären Wirkung der Yersinien gegenüber Neutrophilen und murinen J774-Makrophagen verantwortlich ist (Fallman et al. 1995; Ruckdeschel et al. 1996).

YopH ist aber auch in der Lage andere Signalwege der Immunantwort negativ zu beeinflussen. So kann es sowohl die Produktion des *macrophage chemoattractant protein 1* inhibieren (Sauvonnet et al. 2002) als auch die Aktivierung von T- und B-Lymphozyten (Yao et al. 1999; Viboud and Bliska 2005). Es ist allerdings noch nicht bekannt, ob diese Effekte auch auf der Dephosphorylierung bekannter Substrate bzw. unbekannter Substrate beruhen (Aepfelbacher et al. 2007).

4.7 YopP/YopJ – eine Acetyltransferase

Bevor das 33 kDa große Protein bei *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden konnte und als YopP bezeichnet wurde (Cornelis et al. 1987), konnte es in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* als YopJ beschrieben werden (Straley and Bowmer 1986). Es spielt für die Virulenz der enteropathogenen Stämme in Mäusen eine wichtige Rolle (Monack et al. 1998; Trulzsch et al. 2004). YopP/J interagiert direkt mit dem NFκB (*nuclear factor κB*) aktivierenden IKK-Komplex und mehreren Kinasen der MAPK-Kinase-Familie (MKK), den Aktivatoren der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Es wirkt damit als Inhibitor der nachgeschalteten MAPK- und NFκB-Signalwege in Wirtszellen, was zu einer Suppression der Zytokinproduktion in Makrophagen (TNFα), Epithel- (IL-8) und Endothelzellen (IL-6, IL-8) führt. Auch die

verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM1, *intercellular adhesion molecule-1*) auf der Oberfläche und der Zelltod durch Apoptose bei Makrophagen wird durch YopP/J vermittelt (Mills et al. 1997; Monack et al. 1997; Ruckdeschel et al. 1997; Palmer et al. 1998; Ruckdeschel et al. 1998; Schesser et al. 1998; Orth et al. 1999; Denecker et al. 2002).

Der molekulare Mechanismus, der diese Effekte vermittelt, war lange umstritten. Zunächst wurde angenommen, dass YopP/J aufgrund seiner Homologien zu entsprechenden Proteasen in Säugerzellen und Hefen eine Cysteinprotease ist, die das ubiquitin-ähnliche SUMO-1 von zellulären Signalproteinen abspaltet (Boland and Cornelis 1998; Orth et al. 2000; Cornelis and Denecker 2001). Durch diese Modifikation würde die subzelluläre Lokalisation verändert und die Stabilität von Proteinkomplexen und intrazelluläre Signaltransduktionswege gehemmt. Später konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen gezeigt werden, dass YopJ als Acetyltransferase fungiert, und so wichtige Serin- und Threoninreste in der Aktivierungsschleife von IKK α , β , sowie MKK1, 2 und 6 acetyliert. Dadurch wird die Aktivierung dieser Signalproteine durch die Phosphorylierung an diesen Aminosäuren gehemmt (Mittal et al. 2006; Mukherjee et al. 2006).

4.8 YopE – ein Protein mit GAP-Aktivität

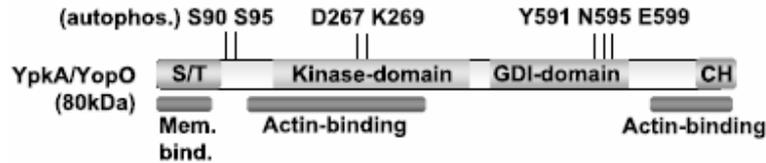
YopE ist ein ca. 25 kDa großes GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für Rho-GTP bindende Proteine (Black and Bliska 2000; Von Pawel-Rammingen et al. 2000; Andor et al. 2001). YopE bindet die GTPasen und überführt sie in einen inaktiven Zustand, indem es die Hydrolyse von GTP zu GDP katalysiert. Da Rho-GTPasen unter anderem die Organisation des Aktinzytoskeletts regulieren, hat die Inaktivierung eine Inhibition der Aktinmikrofilamentbildung zur Folge und begünstigt die Phagozytoseresistenz der Yersinien (Black and Bliska 2000; Aepfelbacher and Heesemann 2001; Cornelis 2002). Die Inaktivierung durch YopE konnte *in vitro* bei Rho, Rac und Cdc42 beobachtet werden (Black and Bliska 2000; Von Pawel-Rammingen et al. 2000). Auch nach der Infektion mit Yersinien, nicht aber mit *yopE*-Mutanten konnte wesentlich weniger GTP gebundenes und damit aktives RhoA und Rac1 in den Zellen nachgewiesen werden (Aili et al. 2006; Ruckdeschel et al. 2006). Neben der direkten Inaktivierung von Rac1 kann YopE auch über die Inhibition von RhoG und damit über die ausbleibende Aktivierung des Rac1-GEFs (*guanine exchange factor*) Dock180 die Rac1-Aktivierung verhindern (Roppenser et al. 2009).

YopE inhibiert die Phagozytose von opsonierten und nicht-opsonierten Yersinien durch Makrophagen, Neutrophile und Epithelzellen (Grosdent et al. 2002; Juris et al. 2002). Andere Effekte, die durch YopE hervorgerufen werden sind die Inhibition der Kaspase-1 vermittelten Reifung von Immunzellen, die Sekretion von Interleukin-1 β und die Blockierung der Translokationspore der Yersinien (Viboud and Bliska 2001; Schotte et al. 2004; Viboud et al. 2006). Die meisten zellulären Effekte von YopE können durch die Inaktivierung von RhoA und Rac1 erklärt werden, obwohl eine direkte Interaktion von YopE mit diesen GTPasen, z.B. durch Koimmunopräzipitationen, noch nicht gezeigt wurde. Es wäre daher auch möglich, dass YopE mit andere GTP-bindenden Proteinen interagiert und diese wiederum die Aktivität von RhoA und Rac1 regulieren (Aepfelbacher et al. 2007). YopE ist ein wichtiger Bestandteil für die Pathogenität von Yersinien, der einmal als Inhibitor der Immunabwehr und des Weiteren als Regulator für die Translokation der anderen Effektorproteine fungiert. (Aepfelbacher et al. 2007).

5. YopO – ein multifunktionales Protein

5.1 Der strukturelle Aufbau von YopO

YopO aus *Y. enterocolitica* bzw. das homologe YpkA (*Yersinia protein kinase A*) aus *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* ist ein ca. 80 kDa großes Protein mit 4 Domänen von unterschiedlicher funktionaler Bedeutung. Der N-Terminus von YopO, der sich über die Aminosäuren 1-77 erstreckt, erfüllt zwei Aufgaben. Zum einen vermittelt er die Sekretion aus den Bakterien und die Translokation in die Wirtszelle, zum anderen ist er für die Lokalisation von YopO an der Zellmembran der Wirtszelle verantwortlich (Galyov et al. 1993; Hakansson et al. 1996; Dukuzumuremyi et al. 2000; Letzelter et al. 2006).



AbbildungII-3 Funktioneller Aufbau des *Yersinia YopO* (Aepfelbacher et al. 2007, modifiziert)

S/T-Sekretions- und Translokationsdomäne für das TTSS; Die Serinreste 90 und 95 werden autophosphoryliert. Der Aspartatrest 267 und das Lysin 269 sind essentiell für die Aktivität der Kinaase-Domäne. Die Aminosäuren Tyrosin 591, Asparagin 595 und Glutamat 599 sind für die Bindung von Rho-GTPasen an die GDI-ähnliche Domäne essentiell. Die CH-Domäne zeigt in der Sequenz Ähnlichkeiten.

Für die Translokation benötigt YopO ein Chaperon, das vor kurzem identifizierte SycO. Es bindet den N-Terminus von YopO in den Yersinien, verhindert so die Aggregation von YopO in den Bakterien und verdeckt die Membranlokalisationsdomäne (Letzelter et al. 2006). Die Kinase-Domäne erstreckt sich über 250 Aminosäuren (150-400), wobei die Mutation eines Aspartat- (267) und eines Lysinrestes (269) die Kinase-Domäne fast gänzlich inaktiviert (Dukuzumuremyi et al. 2000; Trasak et al. 2007). Die Kristallisation des C-Terminus von YopO (Aminosäuren 434-732) offenbarte eine Rac1-Bindungsdomäne, die strukturell und funktionell den GDIs (*guanidine nucleotide dissociation inhibitor*) von Rho-GTPasen ähnelt (Prehna et al. 2006). Wie bei eukaryotischen GDIs inhibiert die GDI-ähnliche Domäne von YopO den Austausch von GDP zu GTP bei RhoA und Rac1, was für die Aktivität der GTPasen unabdingbar ist. Es konnte gezeigt werden, dass zelluläre Effekte von YpkA durch drei Mutationen in der GDI-ähnlichen Domäne verhindert werden konnten. Diese Mutationen veränderten das Bindungsmotiv derart, dass eine Bindung von RhoGTPasen an das mutierte YpkA *in vitro* nicht mehr möglich war (Prehna et al. 2006). Es konnte weiterhin ein C-terminales Aktinbindungsmotiv in dieser GDI-ähnlichen Domäne identifiziert werden. Bisher konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen 21 Aminosäuren (709-729), die Homologien zum Aktin-bindenden Protein Coronin aufweisen, essentiell für die Aktinbindung sind (Juris et al. 2000; Trasak et al. 2007).

5.2 Die funktionelle Bedeutung von YopO

Als morphologischer Effekt in HeLa-Zellen, die mit einer YpkA überexprimierenden *Y. pseudotuberculosis* Mutante infiziert wurden, konnte eine Abrundung der Zellen und die

Ausbildung sogenannter *retraction fibers* (Arborisierung) beobachtet werden. (Hakansson et al. 1996). Zusätzlich zu diesem Phänotyp konnte in Experimenten, in denen Zellen mit YpkA/YopO-Expressionsvektoren transfiziert wurden, auch die Zerstörung sogenannter Aktin-Stressfasern gezeigt werden (Dukuzumuremyi et al. 2000; Juris et al. 2000; Prehna et al. 2006; Wiley et al. 2006; Trasak et al. 2007). Wenn in den transfizierten Expressionsvektoren eine oder mehrere Funktionen des YopO/YpkA ausgeschaltet waren, konnte ein synergistischer Effekt zwischen der Kinase- und der Rho-Bindungsfunktion beobachtet werden (Prehna et al. 2006; Trasak et al. 2007). In humanen Endothelzellen zeigte sich die Kinasefunktion des YopO für das Abrunden der Zellen und die Arborisierung verantwortlich, wogegen die Zerstörung der Stressfasern eher auf die Aktivität der GDI-ähnlichen Domäne zurückgeführt werden kann (Trasak et al. 2007).

Der Mechanismus der antiphagozytären Wirkung von YopO bei Yersinien ist noch nicht vollständig verstanden (Grosdent et al. 2002; Wiley et al. 2006). Es wird jedoch vermutet, dass eher der Phagozytoseweg inhibiert wird, der durch die Bindung von YadA und nicht durch den Fc γ - bzw. den Komplementrezeptor aktiviert wird (Trasak et al. 2007). Eine aktuelle Studie belegt allerdings, dass YopO die Fc γ -Rezeptor vermittelte Phagozytose inhibiert und keinen Effekt auf die CR3 (Komplement-Rezeptor 3) abhängige Bakterienaufnahme hat (Groves et al. 2009). Hierbei sind sowohl die N-Terminale Membranlokalisationsdomäne als auch die GDI-ähnliche Domäne für den Effekt verantwortlich, wobei die Kinase-Domäne höchstens einen regulatorischen Einfluss zu haben scheint.

Die Rolle von YopO/YpkA bei der Infektion ist ebenfalls noch nicht ganz klar. Infektionsversuche in Mäusen erzielten bei der Klärung dieser Fragestellung widersprüchliche Daten, was auch durch die Verwendung unterschiedlichster Stämme, Herangehensweisen und Auswerteverfahren zu erklären ist. So konnte eine sehr viel geringere Virulenz von *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen nachgewiesen werden, die eine Kinase-inaktive Mutante des YpkA exprimieren (Galyov et al. 1993; Wiley et al. 2006). Im Gegensatz dazu zeigten *yopO* Mutanten in *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 keine nennenswerte Verminderung der Virulenz (Trulzsch et al. 2004). Auch eine Deletion von YpkA in *Y. pseudotuberculosis* hatte keinen Effekt auf die Lethalitätsrate von infizierten Mäusen (Prehna et al. 2006). In der gleichen Studie zeigte sich allerdings ein großer Effekt, wenn nur die GDI-ähnliche Domäne mutiert war, das Protein mit seinen anderen Funktionen jedoch erhalten blieb. Dies bedeutet, dass diese Domäne eine *in vivo* Relevanz besitzt, allerdings nur, wenn die anderen Funktionen des YpkA aktiv sind

(Aepfelbacher et al. 2007). Gleichzeitig wird deutlich, dass man eher durch das Ausschalten einzelner Funktionen im Protein und nicht durch die Deletion des ganzen Proteins neue Erkenntnisse über die Funktion gewinnen kann (Aepfelbacher et al. 2007).

5.3 Die Kinase-Aktivität von YopO

Die Kinase-Aktivität von YopO ist abhängig von der Interaktion mit bestimmten Faktoren aus der Wirtszelle, wobei einer dieser Faktoren als Aktin identifiziert wurde (Barz et al. 2000; Dukuzumuremyi et al. 2000; Juris et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Autophosphorylierung des Proteins an den Serineresten 90 und 95, die einem Autoaktivierungsprozess entspricht, durch die Interaktion mit monomeren Aktin (G-Aktin) und nicht mit filamentösen Aktin (F-Aktin) induziert wird. Es wird angenommen, dass YopO das monomere Aktin mit seinen N- und C-terminalen Aktinbindungsstellen bindet, es somit umschließt und die Autophosphorylierung induziert. Diese ist für die Aktivität der Kinase und damit für die Phosphorylierung anderer Substrate unabdingbar (Trasak et al. 2007).

Als Substrate für die Kinase-Domäne von YopO konnten Aktin und Otubain-1 (*ovarian tumor domain ubiquitin aldehyde binding 1*) *in vitro* identifiziert werden, allerdings konnte die physiologische Relevanz dieser Ergebnisse bisher nicht geklärt werden (Juris et al. 2006). Die Studie von Navarro *et al.* konnte G α q, eine Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins, als Substrat der YpkA-Kinase identifizieren. Die spezifische Inhibition des GPCR-Signalweges (G-Protein gekoppelter Rezeptor), der mit Carbachol stimuliert werden konnte, wurde nur mit dem voll funktionsfähigen YpkA erreicht, nicht aber mit einer Kinase-inaktiven (YpkA-D267A) Mutante. Dieser Signalweg führt über die Aktivierung von G α q zu einer Aktivierung von RhoA, wobei RhoA ein entscheidender Faktor für die Aktinpolymerisation bzw. die Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen darstellt (Jaffe and Hall 2005). Die Kinase-Domäne des YpkA bindet und phosphoryliert G α q am Serinrest 47, wobei diese Aminosäure in einer Region lokalisiert ist, die für die Bindung von GTP eine entscheidende Rolle spielt (Sprang 1997). Die Phosphorylierung dieses Restes macht die Bindung von GTP unmöglich und verhindert somit die Aktivierung von G α q (Navarro et al. 2007). Auch konnte ein Effekt dieser Aktivierungsinhibition sowohl auf den Transkriptionsfaktor *tubby* als auch auf das Aktinzytoskelett gezeigt werden. Die Translokation von *tubby* in den Zellkern, die einer Aktivierung von G α q folgt, konnte durch die Expression von YpkA inhibiert werden, nicht aber durch die Expression der Kinase-inaktiven

Mutante. Die Ausbildung von Stressfasern wurde auch nur durch die Expression des vollständigen YpkA-Proteins inhibiert und nicht durch die Kinase-inaktive Mutante. Somit wird die These weiter unterstützt, dass die Zerstörung des Aktinzytoskeletts während einer Infektion mit Yersinien auf der Inhibierung des G α q-Signalweges beruht (Navarro et al. 2007). Weitere Effekte, die auf die Inhibition von G α q zurückzuführen sind, wurden noch nicht beschrieben. Allerdings könnte auch die Aktivierung der NADPH Oxidase betroffen sein, die in den G α q-Signalweg eingebunden ist. Damit wäre die Produktion von Superoxid-Radikalen gestört, die für die Abtötung von Bakterien in Lysosomen von entscheidender Bedeutung sind (Laskowski-Arce and Orth 2007).

6. Das Calcium- und Integrin-bindende Protein CIB1

CIB1 wurde erstmals in der Studie von (Naik et al. 1997) identifiziert. Das 22 kDa große Protein interagiert mit dem zytoplasmatischen Teil der Untereinheit α des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ und gehört zu einer neuen Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine, zu der auch CIB2-4 gehören, die sich deutlich von ihren nächsten Verwandten, dem Calcineurin B und Chp1 (*Calcineurin-homologous protein*), unterscheiden (Naik et al. 1997; Gentry et al. 2005). Genau wie Calcineurin B ist es an einem Glycinrest des N-Terminus myristyliert und so Membran-assoziiert lokalisiert (Stabler et al. 1999; Barry et al. 2002), wobei die Myristylierung für die Interaktion mit $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ keine Rolle spielt (Shock et al. 1999; Barry et al. 2002; Yamniuk and Vogel 2005). Es ist auch noch nicht geklärt, ob CIB1 als sogenannter Ca²⁺-Myristoyl-Schalter fungiert, ähnlich wie das Protein Recoverin, dessen Sequenz Ähnlichkeiten mit CIB1 aufweist (Barry et al. 2002; Gentry et al. 2005). CIB1 beinhaltet 4 EF-Bindungsmotive (EF1-4), von denen zwei (EF3 und EF4) Ca²⁺ mit einer Affinität von 1,9 bzw 0,54 μ M binden (Yamniuk et al. 2004; Gentry et al. 2005). NMR-Studien konnten auch die Bedeutung der Bindung von Ca²⁺ und Mg⁺ an CIB1 für die Konformation und damit für die Stabilisierung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins verdeutlichen (Yamniuk et al. 2004). Zwei verschiedene Ansätze zur Kristallisation von CIB1 konnten weitere Einsichten in die Struktur des Proteins geben. So zeigte (Gentry et al. 2005), dass CIB1 als Monomer vorliegt, wobei diese Ergebnisse noch durch Diffusions-NMR-Spektroskopie und Gelfiltrations-Studien bestätigt wurden. Im Gegensatz dazu konnte CIB1 auch

als Homodimer kristallisiert werden, zusätzlich gebunden an Glutathion, was eine eventuelle Redox-Regulation des Proteins andeutet (Blamey et al. 2005).

Neben dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und Kalzium konnten noch einige andere Bindungspartner für CIB1 identifiziert werden, wie zum Beispiel PAK1 (*p21-activated kinase*), WASp (*Wiskott-Adrich syndrome protein*), Presenilin2, Snk (*serum inducible kinase*) und Rac3 (Stabler et al. 1999; Haataja et al. 2002; Ma et al. 2003; Leisner et al. 2005; Tsuboi et al. 2006). Dabei ist die Bedeutung all dieser Interaktionen auf zellulärer Ebene noch nicht verstanden.

6.1 CIB1 bindende Proteine

Es wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Interaktionspartnern von CIB1, abgesehen vom Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, identifiziert. Dabei ist es möglich, dass einige davon zusammen mit CIB1 und $\alpha_{IIb}\beta_3$ die Funktion der Thrombozyten regulieren. Die ubiquitäre Expression von CIB1 deutet aber auch auf eine zelluläre Bedeutung von CIB1 und seinen Interaktionspartnern hin, die unabhängig von der Regulation der Thrombozyten und dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist (Leisner et al. 2007).

Die starke Expression von CIB1 im Gehirn hat einige Gruppen veranlasst, die Interaktion von CIB1 mit Presenilin-2 und die damit verbundene Rolle bei der Alzheimer Krankheit näher zu untersuchen (Zhu et al. 2004; Bernstein et al. 2005; Blazejczyk et al. 2006). CIB1 bindet und reguliert auch verschiedene Serin/Threonin-Kinasen. So stimuliert CIB1 die Aktivität von PAK1 unabhängig jeglicher Rho-GTPasen, inhibiert PAK1-abhängig die Zellmigration (Leisner et al. 2005) und inhibiert gleichzeitig die Aktivität der SNK (Ma et al. 2003).

Die Interaktion mit aktivem Rac3, nicht aber Rac1 oder Rac2, ist abhängig von den C-terminalen 47 Aminosäuren und stimuliert die $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermittelte Adhäsion und somit die Ausbreitung von $\alpha_{IIb}\beta_3$ exprimierenden CHO-Zellen (Haataja et al. 2002). CIB1 bindet auch an WASp, wobei die Bindungsdomäne grob auf die N-terminalen 113 Aminosäuren des CIB1 eingegrenzt werden konnte (Tsuboi 2006). Die Interaktion von CIB1 mit WASp spielt auch eine große Rolle bei der $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermittelten Zelladhäsion, wobei jedoch noch nicht klar ist, ob dabei der CIB1-WASp-Komplex das Integrin direkt aktiviert, oder WASp CIB1 als Inhibitor vom Integrin entfernt und damit die Aktivierung induziert (Tsuboi 2006). Auch als Ligand des Inositol-1,4,5-triphosphat

Rezeptors (InsP₃R) wurde CIB1 beschrieben, wobei der Kalziumkanal positiv bzw. negativ reguliert werden kann, abhängig vom Kalziumgehalt in der Zelle (White et al. 2006).

Um die Rolle von CIB *in vivo* aufzuzeigen, wurden Mäuse generiert, bei denen das *cib*-Gen deletiert war. Bei diesen *Cib*^{-/-} Mäusen konnte kein Phänotyp aufgezeigt werden, mit Ausnahme der männliche Mäuse, die aufgrund einer defekten Spermatogenese steril waren. Eine stark verminderte Wachstumsrate und eine vermehrte Expression des Zellzyklus Regulators Cdc2/Cdk1 wurde außerdem in den Fibroblasten beobachtet, die aus diesen Mäusen gewonnen wurden (Yuan 2006). Diese Daten zeigen, dass CIB1 neben der gut charakterisierten Interaktion mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowohl mit Regulatoren des Zytoskeletts als auch des Zellzyklus interagiert.

Tabelle II-1 Liste der CIB1 Bindungspartner (modifiziert aus (Leisner et al. 2007)

CIB1 bindende Proteine	mögliche CIB1-Funktion
Integrin α_{IIb}	inhibiert die $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung (Yuan et al. 2006)
PAK1	aktiviert PAK1, inhibiert die Migration (Leisner et al. 2005)
Rac	interagiert mit Rac3 und stimuliert Adhäsion und Zellausbreitung (Haataja et al. 2002)
FNK/ SNK	Inhibiert die SNK-Aktivität (47)
FAK	reguliert die FAK-Aktivität rauf und induziert Migration (Naik and Naik 2003)
Presinilin-2	induziert Apoptose (Zhu et al. 2004; Bernstein et al. 2005; Blazejczyk et al. 2006)
Caspase-2S	inhibiert die Caspase-Aktivität
DNA-PKcs	stimuliert die Telomerase-Aktivität (Wu and Lieber 1997)
PAX3	inhibiert die transkriptionale Aktivität von PAX3 (Hollenbach et al. 2002)
Wasp	aktiviert $\alpha_{IIb}\beta_3$ und fördert die Adhäsion (Tsuboi et al. 2006)
InsP ₃ -Rezeptor	aktiviert und inhibiert den InsP ₃ -Kanal

PAK (*p21-activated kinase*), FAK (*focal adhesion kinase*), FNK (*FGF-inducible kinase*), SNK (*serum-inducible kinase*), PAX3 (*paired box gene 3*), WASp (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein), InsP₃R (Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor)

6.2 CIB1 und das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist nur auf der Oberfläche von Thrombozyten zu finden und seine Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix und angrenzende Endothelzellen ist für eine normale

Wundheilung unabdingbar (Ni and Freedman 2003). Die Aggregation von Thrombozyten im Wundheilungsprozess wird durch das Integrin vermittelt, das nach seiner Aktivierung multiple Faktoren der extrazellulären Matrix, wie Fibrinogen bzw. den von Willebrand-Faktor, binden kann. In nicht-aktivierten Thrombozyten wird $\alpha_{IIb}\beta_3$ konstitutiv auf der Oberfläche in einem wenig affinen Zustand exprimiert. Intrazelluläre Signalwege, stimuliert durch die Interaktion mit Agonisten (z.B. ADP, Thrombin oder Kollagen), führen zu einer Konformationsänderung des Integrins und damit zu dessen Aktivierung. Dies bedeutet, dass $\alpha_{IIb}\beta_3$ aus seinem wenig affinen Zustand in einen Zustand überführt wird, der ihm die Bindung seiner Liganden mit großer Affinität erlaubt. Dieser Prozess wird auch als „*inside-out signalling*“ bezeichnet. Die Bindung der Liganden wiederum vermittelt nun Signale aus der extrazellulären Umgebung der Thrombozyten in die Zelle durch das sogenannte „*outside-in signalling*“ (Ruoslahti and Engvall 1997; Shattil et al. 1998; Shattil 1999). Diese bidirektionalen Signalwege unterliegen in den Thrombozyten einer strengen Kontrolle und die Zerstörung der Regulationsmechanismen kann schwerwiegende Folgen, wie Thrombose bzw. eine gestörte Gerinnung, haben (Leisner et al. 2007).

$\alpha_{IIb}\beta_3$ ist ein transmembranes, heterodimeres Protein, bestehend aus einer α - und einer β -Einheit, wobei der zytoplasmatische Teil für die Bindung von Regulatoren während des *inside-out signalling*s verantwortlich ist (Ginsberg et al. 2005). CIB wurde 1997 erstmals als Bindungspartner für den zytoplasmatischen Teil von α_{IIb} beschrieben (Naik et al. 1997). Die Bindung erfolgt über die Aminosäuren 983-995 von α_{IIb} (Barry et al. 2002) und, wie bei den anderen Interaktionspartnern des CIB1, über die hydrophobe Bindungstasche des CIB1 (Barry et al. 2002; Gentry et al. 2005; Yamniuk et al. 2006). NMR-Studien haben gezeigt, dass während der Bindung von CIB1 an α_{IIb} die Konformation des C-Terminus von CIB1 stark verändert wird. Dieser ist mit einer geringen Affinität an die hydrophobe Bindungstasche vom CIB1 gebunden und scheint so eine regulatorische Rolle bei der spezifischen Bindung von Interaktionspartnern des CIB1 einzunehmen. Die C-terminalen Aminosäuren scheinen auf die Aktivierung des Integrins durch Agonisten folgend von der hydrophoben Bindungstasche verdrängt zu werden und damit diese für die Bindung an das Integrin freizulegen (Yamniuk et al. 2006).

Die Funktion von CIB1 in Bezug auf die Interaktion mit $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist noch nicht vollständig geklärt. Je nach verwendetem Zellmodell, dem Grad der Überexpression des Proteins und der verwendeten Methode zur Aktivitätsbestimmung von $\alpha_{IIb}\beta_3$ konnte ein inhibitorischer bzw. ein

aktivierender Effekt von CIB1 auf das Integrin festgestellt werden (Haataja et al. 2002; Tsuboi 2002; Yuan et al. 2006). Für diese Studien konnten keine Thrombozyten verwendet werden, da diese keinen Zellkern besitzen und sich so einer genetischen Manipulation entziehen. So wurden die verschiedenen Fragestellungen mit Hilfe von CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*), die ektopisch das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ exprimieren, dieses aber nach Agonist-Stimulation nicht aktivieren können, beantwortet. Neuere Studien haben Megakaryozyten eingesetzt. Diese exprimieren das Integrin, können es im Prozess des *inside-out signalling*s auch aktivieren und sind zudem noch genetisch manipulierbar (Shiraga et al. 1999; Shattil and Leavitt 2001).

Es konnte auch ein Einfluss von CIB1 auf die Ausbreitung von Thrombozyten ausgemacht werden. So ist die Interaktion von CIB1 mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ für die Ausbreitung von Thrombozyten auf immobilisiertem Fibrinogen im Prozess des *outside-in signalling*s unabdingbar. Dabei ist die Regulation der Aktivität von FAK (*focal adhesion kinase*) durch CIB1 für diesen Prozess von entscheidender Bedeutung (Naik and Naik 2003; Naik and Naik 2003).

Im Gegensatz dazu wurde in Thrombozyten bzw. Megakaryozyten, die aus Mäusen isoliert wurden, in denen CIB1 ausgeschaltet war (*CIB1^{-/-}*), kein Effekt auf die Aktivierung von $\alpha_{IIb}\beta_3$ beobachtet (Denofrio et al. 2008). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass andere Mitglieder der CIB-Familie (CIB1-4) kompensatorisch die Funktionen des CIB1 während der Embryonalentwicklung der Maus übernommen haben. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass parallel zum Ausschalten von CIB1 die mRNA von CIB3 hochreguliert wird (Denofrio et al. 2008). CIB3 ist dabei im Gegensatz zu CIB2 als Protein noch nicht beschrieben (Mayhew et al. 2006), aber CIB1 in der Sequenz sehr ähnlich (62 % Homologie) (Gentry et al. 2005). Es weist zudem die konservierte hydrophobe Bindungstasche von CIB1 auf und könnte somit das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binden und hypothetisch die Aufgaben von CIB1 übernehmen (Denofrio et al. 2008).

Um die Bedeutung von CIB1 in den $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermittelten Signalwegen und für die Funktion der Thrombozyten vollständig zu verstehen, sind weiterführende Studien notwendig. Auch die Rolle der anderen Mitglieder der CIB-Familie ist von großem Interesse.

7. Die Rolle von Calcium in Infektionen

Das zweiwertige Calciumion (Ca^{2+}) spielt eine herausragende Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Vorgänge. Die durch Calcium gesteuerten Vorgänge reichen von Skelett- und

Herzmuskelkontraktion, Blutgerinnung und Sekretion bis hin zu Genexpression, Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (Berridge et al. 2000). Die strikte Regulation der intrazellulären Konzentration des als sekundären Botenstoff agierenden Calciumions ist Voraussetzung für seine vielfältigen Wirkungsweisen. So liegt die intrazelluläre Calciumkonzentration in Vertebratenzellen mit 100 nM etwa 10^5 -mal niedriger als außerhalb der Zelle und kann durch extrazelluläre Signale transient um das 10-100-fache erhöht werden (Carafoli and Penniston 1985). Zur Generierung dieser Calciumsignale verwenden die Zellen zum Einen Calciumionen, die aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden und zum anderen extrazelluläres Ca^{2+} , welches über die Plasmamembran in die Zellen gelangt. In den meisten Zellen fungieren dabei das endoplasmatische bzw. das sarcoplasmatische Retikulum (ER/SR) als intrazelluläre Calciumspeicher. Ein Mechanismus, der zu einem Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER führt und damit zu einem zytosolischen Calciumanstieg, involviert den klassischen Phosphatidylinositol-Signaltransduktionsweg. Extrazelluläre Signale aktivieren dabei G-Proteingekoppelte Rezeptoren und führen über die Untereinheit $G\alpha_q$ des heterotrimeren G-Proteins zur Aktivierung des Enzyms Phospholipase C. Dieses katalysiert die Hydrolyse des Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Das IP₃-Molekül ist ein wasserlöslicher sekundärer Botenstoff, der durch das Zytoplasma zum endoplasmatischen Retikulum diffundiert und dort den IP₃-gesteuerten Ca^{2+} -Kanal bindet. Die Bindung führt zu einer Konformationsänderung des Kanals, der daraufhin durch seine Öffnung den Ausstrom von Calciumionen in das Zytosol erlaubt. Zugleich wird die Öffnung des Ca^{2+} -Kanals auch durch die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration reguliert. Dies ermöglicht die schnelle Amplifikation kleiner Signale. (Berridge et al. 2000).

Das Calciumion an sich kann als sekundärer Botenstoff eine Reihe von Prozessen bei der Immunantwort in der Zelle regulieren. So reguliert es die Proliferation von Lymphozyten (Berridge et al. 2000) und kann Apoptose induzieren (Kass and Orrenius 1999). In mit Viren oder Bakterien infizierten Zellen wird durch Apoptose die intrazelluläre Vermehrung und Freisetzung der Erreger verhindert (Navarre and Zychlinsky 2000; Muller and Rudel 2001; DeLeo 2004). Calcium beeinflusst auch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie NF-AT, CREB und NF κ B (Chawla et al. 1998; Crabtree 1999; Hardingham et al. 1999) und reguliert so vielfältig die Expression von Genen, die während der unspezifischen Immunantwort von Bedeutung sind. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B erfolgt über den IKK-Komplex, der aus den drei

Untereinheiten IKK α , IKK β und IKK γ /Nemo (*NF κ B essential modulator*) aufgebaut ist. NF κ B ist ein Dimer, bestehend aus den Proteinen p50 und p65, und befindet sich im Zytoplasma gebunden an seinen Inhibitor I κ B (*inhibitor of κ B*). Eine Aktivierung von IKK β führt zu einer Phosphorylierung von I κ B, dessen Ubiquitinierung und anschließenden Abbau durch das 26S-Proteasom (Zhang and Ghosh 2000; Yamamoto and Gaynor 2004; Kawai and Akira 2006). Eine Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration führt auch zur Proteolyse der inhibitorischen I κ B-Einheit und zur Translokation der aktiven NF κ B-Einheit in den Nukleus (Frantz et al. 1994). Damit können Calciumionen auch indirekt die unspezifische Immunantwort durch die Transkription proinflammatorischer Mediatoren induzieren.

Die Aufnahme und Zerstörung von bakteriellen Pathogenen durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten sind weitere wichtige Mechanismen der angeborenen Immunantwort. Alle phagozytische Prozesse sind von der Reorganisation des Aktinzytoskelettes abhängig und werden letztendlich dadurch reguliert. Calcium spielt dabei über die Interaktion mit verschiedensten kontraktilen Proteinen eine entscheidende Rolle (Melendez and Tay 2008).

Auch sind Calciumionen teilweise an der Aktivierung des *respiratory burst* und der Degranulation von Phagozyten beteiligt und übernehmen damit eine weitere wichtige Funktion bei der unspezifischen Immunantwort (Brumell et al. 1995; Tapper 1996).

III. FRAGESTELLUNG

YopO ist eines von sechs Effektorproteinen, das über das Typ-III-Sekretionssystem von *Y. enterocolitica* in infizierte Wirtszellen transloziert wird, wo es zur Überwindung antibakterieller Abwehrmechanismen beiträgt. Es gehört dabei, neben YopE, YopT und YopH, zu den Effektorproteinen, die die Phagozytose von *Yersinia* inhibieren. Neben seiner Kinase-Domäne (Aminosäuren 89-440) beinhaltet das Protein noch eine Membran-Lokalisations-Domäne (MLD) im N-Terminus (Aminosäuren 1-89) und eine C-terminale GDI-ähnliche Region (Aminosäuren 440-729). Die Translokation von YopO führt zu einer Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts und zur Abrundung der Zellen und beeinträchtigt damit den Phagozytoseapparat der Wirtszellen stark (Hakansson et al. 1996; Grosdent et al. 2002). Dabei sind die verursachenden Mechanismen und die Beteiligung der verschiedenen Domänen mit ihren unterschiedlichen biochemischen Aktivitäten allerdings noch unklar.

Ziel dieser Arbeit war es, nach der Identifikation des Calcium- und Integrin- bindenden Proteins (CIB1) als Interaktionspartner der Kinase YopO, diese Interaktion näher zu charakterisieren. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf der Identifizierung der Phosphorylierungsstellen innerhalb des CIB1-Moleküls und der CIB1-YopO-Interaktionsbereiche. Weiterhin sollte die Rolle der CIB1-Phosphorylierung für die Zellmorphologie genauer analysiert werden.

Ein weiterer Gesichtspunkt dieser Arbeit war die Ermittlung weiterer zellulärer Effekte des translozierten Effektorproteins YopO, die zu einer Modulation der angeborenen Immunantwort führen. So sollten die Auswirkungen der YopO-Translokation auf wichtige Mediatoren der unspezifischen Immunantwort, wie die die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B bzw. der zytosolische Einstrom des sekundären Botenstoffs Calcium aus intrazellulären Speichern, näher charakterisiert werden.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Verwendete Materialien und Geräte

1.1 Geräte

Tabelle IV-1 Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Anbieter
Eletrophorese-/Agarosegelkammer	Roth
Elektrophorese-/ SDS-PAGE	Bio-Rad, Hoefer
Fluorometer / Luminometer	Infinite M200, Multidetektionsgerät, TECAN
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr comfort
Gefrierschrank -80 °C	Hera freeze, Thermo electron cooperation
Gel Trockner	BioRad
Deckgläschen, rund (Ø 12 mm)	Hartenstein GmbH
Inkubatoren	Heraeus, BBD 6220; Heraeus, B5090E; Certomat BS-1, Sartorius
Kassette für Filmexposition	Hartenstein GmbH
Kippschüttler	EB WS-10, Hartenstein GmbH
Kühlschränke	Liebherr premium; Kryotec
Mikroskop (binocular)	Carl Zeiss, Axiovert 25
Mikroskop (konfokal)	Carl Zeiss, Axiovert 200M, Software Volocity 4.3, Improvion
Objektträger	Marienfeld GmbH
Mikrowelle	Panasonic Dimension4
Netzgeräte	Bio-Rad, Power Pac 1000; BluePower 500, Serva
PCR-Cycler	Mastercycler epgradient, Eppendorf
pH-Meter	Mettler, Toledo 320 pH Meter
Phosphoimager	FLA 7000 mit Software FLA-7000IR, Bildauswertung mit Multi Gauge V3.0, Fujifilm
Photometer	Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000
Pipetten	Eppendorf (2, 10, 20, 100, 200 und 1000 µl); accu-jet pro, Brand
Pinzette	Hartenstein GmbH
Rotationsschüttler	Hartenstein GmbH
Scanner	ScanJet 4c/ScanJet 5470c, Hewlett Packard
Sterile Werkbänke	Hera safe, Thermo Scientific
Thermoschüttler	Thermomixer comp., Eppendorf; TS-100, Hartenstein GmbH
Thermostat	Thermo Block TDB-120, Hartenstein GmbH
UV-Transilluminator	ETX-20.M, Vilber Lourmat, Hartenstein GmbH
UV-Dokumentationsstation	Bio-Rad Universal Hood II, Software Quantity One 4.5.0.
Vortexer	Heidolph
Waagen	Kern 440-47N, Hartenstein GmbH

Wasserbad	GFL Typ 1013, GFL
Western-Blot-Kammer	Hartenstein GmbH
Zentrifugen	Sigma 3-18K ; Eppendorf Tisch-zentrifuge 5417 R; Sorvall RC-5B bzw. RC 28S Du Pont Instruments

1.2 Chemikalien und Enzyme

1.2.1 Kits und Enzyme

Tabelle IV-2 verwendete Kits und Enzyme

Kits	
Name	Anbieter
BioRad Protein Assay	BioRad
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH
ExGen 500 <i>in vivo</i> Transfection Reagent	Fermentas
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH
QuikChangeII Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
SuperSignal West Femto detection reagents	Thermo Scientific
Enzyme	
Name	Anbieter
PCR-Extender System 200U	5'-Prime
T4-DNA-Ligase	Roche
Go-Taq-DNA Polymerase	Promega

1.2.2 Chemikalien und Antibiotika

Alle Chemikalien und Antibiotika wurden von Amersham/GE-Healthcare, AppliChem, Biomol, Biozym, Dianova, Fermentas, Fluka, Invitrogen, Merck, PAA, Perkin Elmer, Roche, Roth bzw. Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle IV-3 Antibiotika

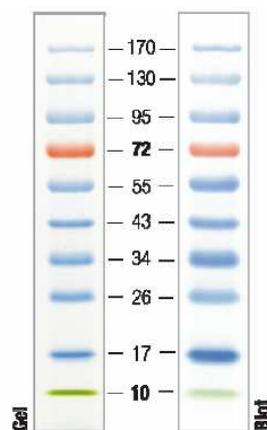
Antibiotikum	Abkürzung	gelöst in	Endkonzentration (mg/mL)
Ampicillin	Amp	H ₂ O	100
Kanamycin	Kan	H ₂ O	100
Nalidixinsäure	Nal	0,5 M NaOH	35
Chloramphenicol	Cm	70 % EtOH	20

IV. MATERIAL UND METHODEN

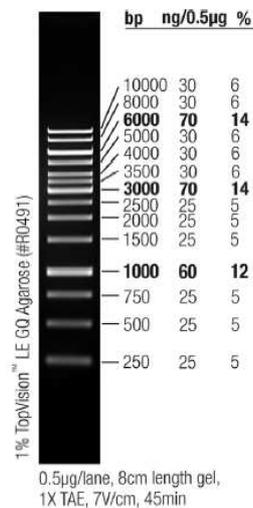
Spectomycin	Spec	H ₂ Odd	100
Tetracyclin	Tet	70 % EtOH	15
Gentamicin	Gen	H ₂ Odd	100
Penicillin	Pen	H ₂ Odd	100

1.2.4 Protein- und DNA-Standard

PageRuler (Fermentas)-Proteinstandard



O'Gene Ruler 1Kb-Standard (Fermentas)



1.3 Bakterienstämme und Plasmide

1.3.1 Bakterienstämme

Tabelle IV-5 verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i>		
BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ	(Moffatt and Studier 1987)
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ 80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74 nupG recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697	(Grant et al. 1990)
XL1 Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ΔM15, Tn10(<i>tet</i> ')]	Stratagene

Yersinia enterocolitica

WA-P	WA-314 O:8, pYVO8-Virulenzplasmid, Biogruppe 1B, intrinsische Nal-Resistenz	(Heesemann and Laufs 1983)
WA-C	pYVO8-defizienter WA-314	(Heesemann and Laufs 1983)
WA- $\Delta yopO$	WA-P, <i>yopO</i> -Gen durch Kan-Kassette ersetzt	(Trulzsch et al. 2004)
WA-C-pTTSS-pYopO	WA-C mit Plasmiden pTTSS (kodiert für den Sekretions-/Translokationsapparat und YadA von WA-314) und pYopO; Cm/Spec-Resistenz	(Trulzsch et al. 2003)

1.3.2 Vektoren

Tabelle IV-6 verwendete Vektoren

Plasmid-	Beschreibung	Referenz
prokaryotische Expression		
pGex-4T-1	Proteinexpression, Leervektor	Amersham
pGex-4T-2	Proteinexpression, Leervektor	Amersham
pGex-1 λ -T	Proteinexpression, Leervektor	Amersham
pcR2.1 Topo	Klonierungsvektor	Invitrogen
Säugerexpression		
pEGFP-N1	Expressionsvektor; <i>enhanced green fluorescent protein</i> , MCS N-terminal von EGFP	BD Clontech
pEGFP-C1	Expressionsvektor; <i>enhanced green fluorescent protein</i> , MCS C-terminal von EGFP	BD Clontech
pCDNA3.1	Expressionsvektor	Invitrogen
pmCherry	EGFP wurde gegen mCherry ausgetauscht in pEGFP-C1	in dieser Arbeit
pCDNA/FRT/TO	exprimiert TET-Operon und FRT-Sequenz	Invitrogen
pOG44	exprimiert FLP-Rekombinase	Invitrogen

1.3.3 Konstrukte

Tabelle IV-7 verwendete Konstrukte

Plasmid-	Beschreibung	Referenz
prokaryotische Expression		
GST-CIB	pGex-1 λ -T, mit CIB wt	C. Barz
GST-CIB-S180A	pGex-1 λ -T, mit CIB S180A	diese Arbeit
GST-CIB-S185A	pGex-1 λ -T, mit CIB S185A	diese Arbeit
GST-CIB-S186A	pGex-1 λ -T, mit CIB S186A	diese Arbeit
GST-CIB-S185/186A	pGex-1 λ -T, mit CIB S185/186A	diese Arbeit

IV. MATERIAL UND METHODEN

GST-PAK-CRIB	pGex-4T-2 ; mit PAK-CRIB	(Sander et al. 1998)
GST-Rothekin	pGex-4T-2 ; mit Rothekin	(Sander et al. 1998)
GST-YopO wt	pGex-4T-1; mit wildtyp YopO (1-729)	G. Zenner
GST-YopO D267/K269A	pGex-4T-1; mit YopO D267/K269A	G. Zenner
Säugerexpression		
Flag-YopO	pCDNA3.1 Flag-YopO (8-729)	(Juris et al. 2000)
CIB-HA	pCDNA3; mit CIB; C-terminaler HA-Tag	C. Trasak
GFP-YopO wt	pEGFP-C1; mit YopO (1-729)	G. Zenner
GFP-YopO 89-440	pEGFP-C1; mit YopO (89-440) ; C- und N-terminale Deletion	G. Zenner
GFP-YopO 89-729	pEGFP-C1; mit YopO (89-729); N-terminale Deletion	G. Zenner
GFP-YopO 151-729	pEGFP-C1; mit YopO (151-729); N-terminale Deletion	G. Zenner
GFP-YopO 1-440	pEGFP-C1; mit YopO (1-440); C-terminale Deletion	G. Zenner
GFP-YopO 1-710	pEGFP-C1; mit YopO (1-710); C-terminale Deletion	G. Zenner
GFP-YopO Y589/N593/E597A	pEGFP-C1; mit YopO Y589/N593/E597A; Bindungsmotiv für RhoA/Rac1 mutiert	diese Arbeit
pCDNA/FRT/TO-YopO	pCDNA/FRT/TO; mit YopO; stabile Expression von YopO in Flp in-Zellen	diese Arbeit
pELAM-luc	AMP ^R , <i>endothelial leukocyte adhesion molecule</i> (ELAM)-1-NFκB-Luciferase, synthetische <i>Firefly</i> -Luciferase mit NFκB-Promotor im pGL2-Vektor	Promega, (Madison, USA)
pNFκB-luc	AMP ^R , synthetische <i>Firefly</i> -Luciferase mit NFκB-Promotor	Stratagene
pRL-0	Renilla <i>Luc</i> Gen, Amp ^R	Promega

1.4 Oligonukleotide

Tabelle IV-8 verwendete Primer

Name	Primersequenz
CIB S180A se	5'-GTC ATC TCC CGT <u>GCT</u> CCA GAC TTT GCC AGC TCC-3' (vorwärts)
CIB S180A as	5'-GGA GCT GGC AAA GTC TGG <u>AGC</u> ACG GGA GAT GAC-3' (rückwärts)
CIB S185A se	5'-CCA GAC TTT GCC <u>GCC</u> TCC TTT AAG ATT GTC CTG-3' (vorwärts)
CIB S185A as	5'-CAG GAC AAT CTT AAA GGA <u>GGC</u> GGC AAA GTC TGG-3' (rückwärts)
CIB S186A se	5'-CCA GAC TTT GCC AGC <u>GCC</u> TTT AAG ATT GTC CTG-3' (vorwärts)
CIB S186A as	5'-CAG GAC AAT CTT AAA <u>GGC</u> GCT GGC AAA GTC TGG-3' (rückwärts)
CIB S185/186A se	5'-CCA GAC TTT GCC <u>GCC</u> <u>GCC</u> TTT AAG ATT GTC CTG-3' (vorwärts)
CIB S185/186A as	5'-CAG GAC AAT CTT AAA <u>GGC</u> <u>GGC</u> GGC AAA GTC TGG-3' (rückwärts)
YopO Y589A se	5'-CAG CCC GTG TCC TCT GAA ACC <u>GCC</u> AGC TTC CTG-3' (vorwärts)
YopO Y589A as	5'-CAG GAA GCT <u>GGC</u> GGT TTC AGA GGA CAC GGG CTG-3' (rückwärts)
YopO N593/E597A se	5'-GC TTC CTG <u>GCT</u> CGA TTA GCT <u>GCG</u> GCT AAG GTC ACC-3' (vorwärts)
YopO N593/E597A as	5'-GGT GAC CTT AGC <u>CGC</u> AGC TAA TCG <u>AGC</u> CAG GAA GC-3' (rückwärts)
Flp-YopO-Kpn-for	5'-AGAGGTACCGGCATGAAAATC-3' (vorwärts)
Flp-YopO-Xho-rev	5'-GCACTCGAGTCACATCCA-3' (rückwärts)

1.5 Antikörper

Tabelle IV-9 verwendete Antikörper

anti-	Spezies	Anbieter
primäre Antikörper		
CIB	IgG Kaninchen (1:5000)	in dieser Arbeit
FLAG	IgG Maus (1:200)	SIGMA (F3165)
HA	IgG Ratte (1:200)	Roche
Integrin Beta 3	IgG Maus (1:200)	Chemicon (AB1932)
Rac 1	IgG Maus (1 :2000)	BD Biosciences
RhoA	IgG Maus (1:1000)	Santa Cruz
Vinculin	IgG Maus (1:200)	SIGMA (V4505)
YopO	IgG Kaninchen (1:10.000)	Barz et al. (2000)
Sekundäre Antikörper		
Kaninchen	AlexaFluor®488 IgG Ziege (1:200)	Invitrogen
Kaninchen	AlexaFluor®568 IgG Ziege (1:200)	Invitrogen
Kaninchen	IgG Meerrettichperoxidase-gekoppelt Esel (1:100.000)	GE Healthcare
Maus	AlexaFluor®488 IgG Ziege	Invitrogen
Maus	AlexaFluor®568 IgG Ziege	Invitrogen
Maus	IgG Meerrettichperoxidase-gekoppelt Ziege (1:50.000)	GE Healthcare
Ratte	AlexaFluor®488 IgG Ziege (1:200)	Invitrogen
Ratte	AlexaFluor®568 IgG Ziege (1:200)	Invitrogen

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.1.1 PCR zur Amplifikation von DNS-Abschnitten

Die PCR ist eine Methode, um spezifische DNS-Abschnitte exponentiell zu vervielfältigen. Die Sequenz wird dabei vom 3'-OH-Ende ausgehend zwischen 2 Oligonukleotiden (Primer) amplifiziert. Alle PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (TreffLab), auf Eis und in 20 µl bzw. 50 µl durchgeführt. Die Polymerasen wurden dem Anbieter entsprechend eingesetzt. Ein typischer Ansatz sah wie folgt aus:

2 ng/µl	Plasmid
10 %	Taq-Puffer (10x)
0,2 mM	dNTP-Mix
1 µM	5' Oligonukleotid
1 µM	3' Oligonukleotid
0,05 U/µl	Polymerase

Die vollständigen Ansätze wurden bei 95 °C im PCR-Cycler platziert und die Reaktion erfolgte nach folgendem Programm. Dabei war die Temperatur zur Oligonukleotid-Anlagerung abhängig vom Oligonukleotidpaar selbst.

initiales Doppelstrangschmelzen	5 min	95 °C (1x)
Doppelstrangschmelzen	60 s	95 °C
Oligonukleotid-Anlagerung	30 s	50-65 °C
Oligonukleotid-Verlängerung	60 s/1 kb PCR-Produkt	72 °C

Der Zyklus wurde dreißigmal wiederholt und anschließend noch um 7 min bei 72 °C verlängert, um möglichst vollständig synthetisierte Stränge zu erhalten. Die PCR-Produkte wurden bis zur Analyse mittels Agarosegelelektrophorese (s. Kapitel IV-2.3) bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.2 mutagene PCR

Alle Mutationen wurden mit dem *QuickChangeII Site Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach Herstellerprotokoll erreicht. Die eingefügten Mutationen wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, DNA ihrer molekularen Masse nach aufzutrennen. Dabei wandert negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld zur Anode. Die negative Ladung erhält sie durch Phosphatgruppen. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird dabei durch ein Agarosenetzwerk unterschiedlich stark beeinträchtigt und ist damit bei linearer, doppelsträngiger DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge in Basenpaaren.

Für das Gießen von Agarosegelen wurde eine entsprechende Menge an Agarose eingewogen und durch Aufkochen in der Mikrowelle in TAE-Puffer (40 mM Tris/Azetat pH 8,3, 10 mM EDTA) gelöst, so dass eine 0,7-2 %-ige Agaroselösung erhalten wurde. Die Agarosekonzentration wurde dabei abhängig von der Größe des zu untersuchenden DNA-Fragments gewählt. Die DNA-Proben wurden mit einem Ladepuffer (30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau und 0,25 % (w/v) Xylenblau versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte dann durch das Anlegen einer Spannung, die je nach Gelgröße zwischen 80-150 V gewählt wurde, wobei der TAE-Puffer als Laufpuffer verwendet wurde. Zum Sichtbarmachen der DNA wurde das Gel nach dem Lauf in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) gefärbt und konnte anschließend unter UV-Licht beobachtet werden. Dabei interkaliert Ethidiumbromid mit der DNA und wird durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Die Fragmentgröße wurde durch das Mitführen eines Größenstandards (s. Kapitel IV-1.5) bestimmt.

2.3 Nukleinsäure-Analytik

2.3.1 Plasmidpräparation

Alle Präparationen zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden nach Herstellerprotokoll entweder mit dem *Plasmid Mini Kit* oder dem *Endofree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) zur endotoxinfreien Aufreinigung durchgeführt.

2.3.2 Gelextraktion

DNA-Fragmente wurden mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aus Agarosegelen isoliert. Dazu wurden die gewünschten DNA-Fragmente ausgeschnitten, gewogen und die DNA entsprechend der Herstellerangaben extrahiert.

2.3.3 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme binden spezifisch an palindromische Erkennungssequenzen in der DNA und spalten sie dort durch Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung. Die Aufgabe dieser Enzyme in ihrem Ursprungsorganismus ist die Inaktivierung von fremder DNA durch deren Spaltung. Bakterieneigene DNA wird durch ein individuelles Methylierungsmuster als eigen erkannt und nicht gespalten. Je nach Enzym entstehen bei der Spaltung entweder doppelsträngige Enden (*blunt ends*) bzw. Enden mit einem 5'- oder 3'-Überhang (*sticky ends*).

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden mit ihren zugehörigen 10x Reaktionspuffern von Fermentas bezogen. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben meist bei 37 °C in einem Heizblock für 90-120 min in Anwesenheit des entsprechenden 10x Puffers, eventuell 10 mg/ml BSA und ddH₂O durchgeführt. Für die Spaltung von 1 µg DNA wurden 5U Enzym eingesetzt. Die Spaltung mit zwei Enzymen gleichzeitig konnte in dem entsprechenden Puffer durchgeführt werden. Nach der Beendigung der Restriktionsspaltung wurden die Enzyme nach Herstellerangaben entweder bei 65 °C bzw. bei 85 °C für 20 min hitzeinaktiviert.

2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Vektor-DNA mit der gewünschten Zielsequenz erfolgt nach der Restriktionsspaltung beider DNA-Sequenzen mit dem gleichen Restriktionsenzym. Die T4-DNA-Ligase (Roche) ist dann in der Lage, die passenden Enden zu verbinden, indem sie die Formation einer Phosphodiesterbindung zwischen den 3'-OH- und 5'-Phosphatgruppe katalysiert.

2.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration und –Reinheit

Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die isolierte DNA wurde mit ddH₂O entsprechend verdünnt und die Absorption in einem Photometer (Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000) gegen ddH₂O bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA wurde der Koeffizient $A_{260/280}$ photometrisch bestimmt. Ein Wert < 1,8 deutet dabei auf eine Verunreinigung während der DNA-Präparation mit Protein hin, während ein Wert > 2,0 auf eine Verunreinigung mit RNA hinweist.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzen sind mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft worden. Dazu wurden 1-2 µg Plasmid mit den entsprechenden Primern an AGOWA bzw. MWG (Sequenzierungslabore) geschickt. Die von dort erhaltenen Sequenzen wurden dann mit den Programmen BLAST (NCBI) bzw. mit Vector-NTI (Invitrogen) analysiert.

2.4 CaCl₂-kompetente Bakterien

2.4.1 Herstellung

Die verwendeten Bakterien (*E. coli*: BL21, Top10) für Hitzeschock-Transformationen wurden mit Hilfe von CaCl₂ nach folgender Methode kompetent gemacht:

2ml einer Übernacht-Vorkultur wurden in 100 ml LB-Medium verdünnt und anschließend bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden dann bei 4 °C für 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Sie wurden anschließend mit 50 ml kaltem MgCl₂ (100 mM)

gewaschen, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend unter denselben Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Bakterien in 50 ml kaltem CaCl_2 (100 mM) gewaschen und erneut für 30 min auf Eis inkubiert bzw. danach zentrifugiert. Sie wurden dann in 2 ml kaltem CaCl_2 aufgenommen und über Nacht auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 2,5 ml kaltes CaCl_2 und 0,5 ml steriles Glycerin (Endkonzentration von 10 %) hinzugefügt. Die 50-100 μl großen Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

2.4.2 Transformation

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 50 μl der Zellen wurden mit Plasmid-DNA (0,5-50 ng) bzw. mit einem Ligations-Ansatz (1-10 μl) versetzt und dann in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 30 min auf Eis inkubiert. Den Bakterien wurde anschließend ein Hitzeschock für 50 s bei $42\text{ }^\circ\text{C}$ zugeführt, der den Bakterien die Aufnahme der DNA ermöglicht. Bei gekauften kompetenten Bakterien (Invitrogen) wurde der Hitzeschock wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Nach diesem Schritt wurden die Zellen noch für 2 min auf Eis inkubiert und dann mit 200-1000 μl SOC-Medium versetzt und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ für 60 min geschüttelt. Anschließend wurden sie auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert, um die transformierten Bakterien zu selektionieren.

3. Zellbiologische Methoden

3.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

3.1.1 verwendete Zelllinien, Medien und Medienzusätze

Tabelle IV-10 verwendete Zelllinien/Medien und Zusätze

Name	Beschreibung	Kulturbedingungen
HEK293T	<i>Human embryonic kidney</i> Zellen (ATCC: CRL 1573) immortalisierte humane embryonale Nierenzelllinie	DMEM, 10 % FBS; optional 100 µg/ml Pen/Strep
Flp-In TM T-Rex TM -293 Zelllinie (Flp-in-Zellen)	HEK293T-Zelllinie (Invitrogen); exprimiert stabil <i>lacZ-ZeocinTM</i> -Fusionsgen und den Tet-Repressor; enthält eine FRT-Sequenz	DMEM, 10 % FBS; 100 µg/ml Pen/Strep, 100 µg/ml Zeocin, 15 µg/ml Blasticidin
Flp-GFP	Flp-In TM T-Rex TM -293 Zelllinie; exprimiert GFP unter der Kontrolle des Tet-Operon	DMEM, 10 % FBS; 100 µg/ml Pen/Strep, 100 µg/ml Hygromycin, 15 µg/ml Blasticidin
Flp-YO	Flp-In TM T-Rex TM -293 Zelllinie; exprimiert YopO unter der Kontrolle des Tet-Operon	DMEM, 10 % FBS; 100 µg/ml Pen/Strep, 100 µg/ml Hygromycin, 15 µg/ml Blasticidin
CHO-K1	<i>Chinese Hamster Ovarien</i> Zellen (ATCC CCL-61)	DMEM; 10 % FBS; optional 100 µg/ml Pen/Strep; 1xNEAA
A5-CHO	CHO-Zellen ; exprimieren stabil Integrin α 11b β 3 (O'Toole et al. 1990)	DMEM; 10 % FBS; optional 100 µg/ml Pen/Strep; NEAA (Vielreicher et al. 2007)
J774A.1	Immortalisierte murine Makrophagen Zelllinie (ATCC: TIB-67)	RPMI1640; 10 % FBS; 5 mM L-Glutamin; optional 100 µg/ml Pen/Strep

Zellkulturmedien

Name	Beschreibung	Anbieter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> mit Glutamax	GIBCO
RPMI	RPMI1640 mit L-Glutamin	GIBCO

Zusätze/Zellkulturlösungen

Blasticidin	Blasticidin S HCl	Invitrogen
FBS	fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)	GIBCO
Hygromycin	Hygromycin B	Roche
NEAA	<i>Non-Essential-Aminoacids</i>	GIBCO
PBS	PBS ohne Mg ⁺ und Ca ²⁺	GIBCO
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin	GIBCO
Zeocin	Zeocin	Invitrogen

3.1.2 Passagieren adhärenter Zellen

Die Zellen wurden nach dem Entfernen des Mediums einmal mit sterilem PBS gewaschen. Sie wurden dann mittels Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA, GIBCO) abgelöst, wobei die Reaktion durch die Zugabe von Wachstumsmedium mit Serum gestoppt wurde. Das Medium wurde per Zentrifugation (200 g, 5 min) abgetrennt, die Zellen in neuem Medium aufgenommen und in das entsprechende Zellkulturgefäß überführt.

3.1.3 Beschichtung von Deckgläsern

Deckgläser aus Glas (Durchmesser 12 mm, Hartenstein) wurden in 100 %-igem Ethanol eingetaucht, durch eine Flamme geführt, um sie zu sterilisieren und im Anschluss in eine Vertiefung einer 6-well- oder 12-well-Platte überführt (Nunc).

Für die Beschichtung mit Fibrinogen (Sigma) wurden die Deckgläser bei 4 °C über Nacht mit einer Fibrinogenlösung (100 µg/ml in sterilem PBS) inkubiert, anschließend wurde diese entfernt und die Zellen konnten direkt ausgesät werden.

Deckgläser wurden auch mit Poly-L-Lysin beschichtet, um die Adhäsion der Flp-YopO Zellen an diese zu verbessern. Dazu erfolgte eine Inkubation der Deckgläser mit Poly-L-Lysin (Sigma) in ddH₂O (0,1 mg/ml) für 3 h bei 37 °C, anschließend wurden noch 3 Waschschriffe mit

sterilem PBS durchgeführt, nach denen die Zellen auf die beschichteten Deckgläschen ausgesät werden konnten.

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren

Die Zellen wurden von der Zellkulturoberfläche mittels Trypsin abgelöst und bei 1000 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 1 ml steril filtriertem Einfriermedium (10 % DMSO, Sigma in FBS) aufgenommen und anschließend in 1,5 ml Cryogefäße überführt. Die Zellen sind dann in einem Gefrierbehälter (Nalgene) bei -80 °C schonend mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 °C/min eingefroren worden.

Auftauen

Die Zellen in den Cryogefäßen wurden sehr schnell in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, sofort in warmes Wachstumsmedium überführt und in den entsprechenden Zellkulturschalen ausgesät.

3.2 Beschichtung von *Latex-Beads*

Fluoreszierende polystyrol Mikrokügelchen (Durchmesser $4\text{ }\mu\text{m}$, blau, Ex./Em.=350/440 nm) mit aktivierten Sulfat-Gruppen, die eine Bindung von Proteinen erlauben, wurden bei Molecular Probes (Invitrogen) erworben. $200\text{ }\mu\text{l}$ der *Bead*-Lösung wurden bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Diese wurden dann in 1 ml Proteinlösung (1 mg/ml) resuspendiert und über Nacht auf dem Rotationsschüttler bei 4 °C inkubiert. Die *Beads* wurden dann pelletiert und in $500\text{ }\mu\text{l}$ 1% BSA in PBS resuspendiert. Bis zum Gebrauch wurden sie bei 4 °C aufbewahrt und direkt vor der Zugabe zu den Zellen im Ultraschallbad für $3 \times 10\text{ s}$ sonifiziert, um ein Verklumpen der *Beads* zu vermeiden.

3.3 Transfektion von Zellen

3.3.1 Transfektion mit ExGen 500, Turbofect und Fugene

Für eine Überexpression von Proteinen in Zellen wurden 3×10^6 Hek293T-Zellen pro 10 cm-Schale, 6×10^6 Zellen pro 15 cm Schale bzw. $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 12-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie dann entweder mit *Turbofect*, *Fugene* bzw. *ExGen500* nach Herstellerangaben transfiziert. 12-24 h nach Transfektion wurden die Zellen dann entweder lysiert, infiziert oder mit Stimulatoren (s. Kapitel IV-1.4) behandelt.

3.3.2 Transfektion mit Amaxa

Dieses Transfektionssystem kombiniert Elektroporation und Lipofektion, um Plasmide in Zellen zu transfizieren, womit sich eine höhere Transfektionseffizienz bei bestimmten Zelllinien erreichen ließ. Diese Methode wurde angewandt, um CHO Zellen für bspw. den *Spreading-Assay* zu transfizieren, da andere Methoden wie Fugene nur unzureichende Transfektionseffizienzen ergaben.

Für die Transfektion der CHO-Zellen wurde der *Nucleofector* Kit T nach Herstellerangaben verwendet, wobei die empfohlene Menge an Zellen (1 Mio) mit 2 µg Plasmid transfiziert wurde.

3.4 Infektion von Zellen

Bei Infektionsversuchen wurde am Vorabend eine 4 ml Übernacht-Vorkultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum angesetzt und bei 27 °C geschüttelt. Diese wurde dann nach einer 1:10 Verdünnung mit LB-Medium weitere 90 min geschüttelt, allerdings bei 37 °C, um die Expression des TypIII-Sekretionssystems zu aktivieren und damit die Translokation der Effektor-Yops in die Zielzelle zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 4 °C und 6000 g für 15 min sedimentiert, dann in kaltem PBS resuspendiert und eine OD_{600} von 0,36 bei einer 1:10 Verdünnung eingestellt. Sofern nicht anders angegeben wurden die Bakterien mit einer MOI von 10 zu den Zellen gegeben, denen zuvor antibiotikafreies Medium zugesetzt wurde. Fluoreszierende *Latex-Beads* wurden mit Fibrinogen beschichtet und

zu den Zellen ins Medium gegeben. Nach der entsprechenden Infektionsdauer wurden die Zellen entweder fixiert und mikroskopisch ausgewertet oder für proteinchemische Methoden lysiert.

3.5 Immunfluoreszenzfärbung bei Zellen

Die Zellen wurden zu Beginn des Versuchs mit einer Dichte von 2×10^4 -Zellen auf ein mit Gelatine bzw. Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen ausgesät. Nach Beendigung des Versuches wurden die Zellen mit 3,7 % Formaldehyd fixiert, mit 0,01 % Triton-X-100 permeabilisiert und im Anschluss 30 min mit Blockpuffer (1 % BSA, 5 % NGS, 5% NHS in PBS) inkubiert. Durch die Inkubation mit BSA, NGS (*normal goat serum*) und NHS (*normal human serum*) wurden unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper abgesättigt. Nach dem Blocken wurden die Deckgläschen in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper für 45 min inkubiert, im Anschluss mit PBS gewaschen und für weitere 30 min mit einem Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen getrocknet, die Zellen in Mowiol auf Objektträgern eingebettet und anschließend mit Nagellack versiegelt.

3.6 Radioaktive Markierung von Zellen

Damit Phosphorylierungsreaktionen in lebenden Zellen nachvollzogen werden können, werden die Zellen radioaktiv markiert, um die zu untersuchenden Proteine anschließend per Immunpräzipitation zu isolieren und sie über SDS-PAGE und *Western Blot* zu analysieren.

Dazu wurden HEK 293T-Zellen nach Transfektion mit Cib-GFP mit phosphat-, serum- und antibiotika-freiem Medium (Invitrogen) gewaschen und in diesem mit zusätzlich $32[P]$ Na-orthophosphat für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei werden radioaktive Phosphatreste von den Kinasen für die Phosphorylierungen mit verwendet und so in die entsprechenden Substrate eingelagert. Anschließend wurden die Zellen noch einmal mit Medium gewaschen, um sie dann mit den *Yersinia* Stämmen WA-314 und WA-314 Δ yopO zu infizieren. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 90 min wurden die Zellen lysiert, CIB-GFP präzipitiert (s.Kapitel IV-4.7) und der Phosphorylierungszustand wurde nach SDS-PAGE und *Western Blot* über eine Autoradiografie (s.Kapitel IV-4.9) detektiert.

3.7 *Spreading-Assay*

Um die Interaktion von CIB bzw. CIB-Mutanten mit dem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und seinem Substrat Fibrinogen in Abhängigkeit von YopO zu untersuchen, wurde die Fähigkeit von A5-CHO-Zellen (exprimieren stabil $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) zur Ausbreitung (engl.= *spreading*) auf Fibrinogen beschichteten Oberflächen beobachtet.

Dazu wurden die Zellen mit dem GFP-YopO-Fusionsprotein und den entsprechenden Mutanten bzw. mit CIB-GFP und der pseudophosphorylierten Mutante mit Amara (Nucleofector Kit T) transfiziert. Nach einer Expressionszeit der Plasmide von 6-24 h wurden die transfizierten Zellen mittels Trypsin abgelöst und 150.000 Zellen sind jeweils auf ein mit Fibrinogen beschichtetes Deckglaschen ausgesät worden. Nach 30-45 min wurden die Zellen mit Formaldehyd (3,7 %) fixiert und die Zellen sind nach entsprechenden Waschschrinen und dem Einbetten in Mowiol mikroskopisch auf ihre Ausbreitung auf der Fibrinogenoberfläche hin untersucht worden.

4. Proteinbiochemische Methoden

4.1 GST-Fusionsproteine

4.1.1 Expression und Aufreinigung

Die Gluthathion-S-Transferase (GST) besitzt eine hohe Affinität zu seinem Substrat Gluthathion (GSH), weshalb es sich für die Aufreinigung rekombinanter Proteine eignet. Das gewünschte Protein wird an seinem N-Terminus mit GST fusioniert und mittels eines bakteriellen Expressionsvektors (pGex4T-1) in einem Protease-defizienten *E. coli* Stamm (BL21) nach Induktion exprimiert. Das GST-Fusionsprotein kann dann über eine Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden. Dabei bindet es spezifisch an diese, während andere Proteine nur unspezifisch binden. Über verschiedene Waschschrte werden die unspezifisch gebundenen Proteine entfernt werden und das aufgereinigte Protein kann eluiert werden.

Die Plasmide, die für die jeweiligen GST-Fusionsplasmide kodieren, wurden mittels Hitzeschock in *E. coli* BL21 transformiert. Eine Übernacht-Vorkultur hiervon wurde 1:20 mit frischem LB-Medium mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum verdünnt und konnte bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 bei 37 °C im Schüttelinkubator wachsen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expression durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) induziert und die Kulturen wurden je nach zu exprimierendem Protein bei 23-37 °C für weitere 3-4 h unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakteien bei 4 °C und 6000 g für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde dann auf Eis in 5 ml Lysepuffer (PBS, 0,1 mM PMSF und bei der Expression von GST-YopO zusätzlich 0,1 % Triton-X-100) aufgenommen und sonifiziert.

Die Lysate wurden durch Zentrifugation bei 4 °C (10.000 g; 30 min) von den Zelltrümmern abgetrennt und über eine mit Glutathion-Sepharose 4B (Amersham) gepackte Säule aufgereinigt. Nach mehreren Waschschrten mit dem Lysepuffer konnte das an die Sepharose gebundene GST-Fusionsprotein (Rothekin) entweder direkt für Pulldown-Versuche eingesetzt werden bzw. von der Sepharose abgetrennt werden. Dabei war es möglich, je nach folgendem Versuch die Proteine entweder mit einem Elutionspuffer (30 mM Glutathion, 50mM Tris pH 7,5) als GST-Fusionsprotein zu eluieren bzw. mit Thrombin (50 U/ml GSH-Sepharose in Lysepuffer) über Nacht vom GST-Tag abzuspalten. Bei Bedarf wurden die GST-Fusionsproteine noch gegen PBS dialysiert.

4.1.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration gelöster Proteine wurde basierend auf der Methode nach Bradford mit dem BioRad *Protein-Assay-Kit* bestimmt. Dabei wurden als Standard verschiedene BSA (Sigma-Aldrich) Konzentrationen von 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml mitgeführt, daraus eine Eichgerade erstellt, an der dann die Proteinkonzentration der entsprechenden Proben abgelesen werden konnte. 800 µl der Proteinlösung bzw. einer entsprechenden Verdünnung wurden mit 200 µl des Bradford-Reagenz vermischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den entsprechenden Leerwert gemessen.

4.2 SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis*)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt, während sie ein Polyacrylamid-Gel durchlaufen. SDS ist ein anionisches Detergenz, das Proteine denaturiert und gleichzeitig durch seine starke negative Ladung die ursprüngliche Ladung des Proteins maskiert. Dadurch weisen alle Proteine nach der Behandlung mit SDS ein gleiches Ladung-zu-Masse Verhältnis und eine gleiche äußere Form auf und können demnach bei der Filtration durch ein Polymer in einer Gelelektrophorese nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden.

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mit 5-fach Probenpuffer (5xSB mit 5 % β-Mercaptoethanol) versetzt, der SDS enthält und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Danach wurden sie auf ein Gel aufgetragen und die Migration der Proteine bei einer Stromstärke von 25 mA im Sammelgel und 35 mA im Trenngel induziert. Das Sammelgel hat dabei eine geringere Acrylamidkonzentration (4 %) und einen anderen pH-Wert, weshalb die Proteine an der Sammelgel-Trenngelfront „gesammelt“ werden und einheitlich in das Trenngel einlaufen können. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes der applizierten Proteine wurde ein angefärbter Proteinstandard (s. Kapitel IV-1.5) mit auf das Gel geladen.

SDS-Ladepuffer (5xSB)

0,5 M Tris/HCL pH 6,8	5 ml
Glyzerin	2 ml
SDS	0,8 g
0,05 % Bromphenolblau	1 ml
ddH ₂ O	2 ml

SDS-Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

SDS-Sammelgel

SDS	0,1 % (w/v)
Tris/HCL pH 6,8	125 mM
Acrylamid	4 % (w/v)
APS	0,1 %
TEMED	0,01 %

Trenngel

SDS	0,1 % (w/v)
Tris/HCL pH 6,8	375 mM
Acrylamid	8-15 % (w/v)
APS	0,1 %
TEMED	0,01 %

4.2.1 Coomassie-Färbung

Um Proteine direkt nach der SDS/PAGE anzufärben, wurde das Gel für ca. 10 min in einer *Coomassie*-Färbelösung (0,1 % *Coomassie Brilliant Blue* R250, 25 % Methanol und 10 % Essigsäure) inkubiert. Die enthaltene Essigsäure fixiert dabei die Proteine. Der unspezifisch angefärbte Hintergrund wurde mittels einer Inkubation in einer Lösung aus 25 % Methanol und 10 % Essigsäure entfärbt.

4.2.2 Western Blot

Der *semi-dry* Western Blot (Immunoblot) ist eine Technik, bei der bereits aufgetrennte Proteine (über SDS-PAGE) aus dem Gel elektrophoretisch auf eine Trägermembran Membran (PVDF, Imibilion-P, Millipore) übertragen (engl. *blotting*) werden. Dazu wurden drei Filterpapiere in der Größe des Trenngels luftblasenfrei auf die Anode der Blotkammer aufgelegt, wobei zwei davon zuvor in Puffer A und eines in Puffer B getränkt wurde. Darauf sind eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran, das zuvor in Puffer C äquilibrierte Trenngel, 3 in Puffer C getränkte

Filterpapiere und zum Schluss die Kathode aufgebracht worden. Der Transfer der Proteine wurde dann bei 1,2 mA/cm² für eine Stunde durchgeführt.

Puffer A (Anode I)

Tris/HCl	0,3 M (7,26 g)
Methanol	10 % (20 ml)
ddH ₂ O	200 ml, pH 10,4

Puffer B (Anode II)

Tris/HCl	0,25 mM (0,605 g)
Methanol	10 % (20 ml)
ddH ₂ O	200 ml, pH 10,4

Puffer C (Kathode)

Tris/HCl	0,25 mM (0,605 g)
ε-Aminocapronsäure	40 mM (1,049 g)
Methanol	10 % (20 ml)
ddH ₂ O	200 ml, pH 9,4

Nach der Übertragung der Proteine konnten diese über Autoradiografie (s.Kapitel IV-) oder immunchemisch detektiert werden. Zur Detektion mit Hilfe von Antikörper-gekoppelter Chemilumineszenz wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4 °C in einer Blocklösung (PBS-T/ 2 % BSA oder 5 % Milchpulver) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken.

PBS-T (10x)

NaCl	1,37 M (80 g)
KCl	26,5 mM (2 g)
Na ₂ HPO ₄	0,1 M (17,8 g)
KH ₂ PO ₄	17,6 mM (2,4 g)
Tween 20	0,05 %
ddH ₂ O	1l, pH 7,7

Nach dem Blocken wurde die Membran für 1 h mit dem jeweiligen Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung inkubiert, anschließend dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen, bevor sie für eine weitere Stunde mit einem Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP) gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert wurde. Die Detektion des Enzyms und damit der gewünschten Proteine erfolgte dann nach drei erneuten Waschschritten durch die 5-minütige Inkubation der Membran mit dem Substrat (SuperSignal WestFemto, Pierce). Dabei wird das im Substrat enthaltene Luminol durch die Abspaltung von reaktivem Sauerstoff (O²) des ebenfalls im Substrat enthaltenen H₂O₂ mittels der HRP oxidiert. Das Luminol zerfällt dabei unter Emission von Strahlung, welche mit Hilfe eines Röntgenfilms (Fuji) detektiert und anschließend entwickelt (Entwickler Curix 60, Agfa) werden konnte.

4.3 Immunpräzipitation und Koimmunpräzipitation von Proteinen

Diese Methode wird angewandt, um Antigene aus Zellen mittels der entsprechenden Antikörper zu isolieren. Diese können dann mit anderen Methoden hinsichtlich ihrer Quantität, posttranslationaler Modifikationen bzw. ihrer Enzymaktivität charakterisiert werden. Bei der Koimmunpräzipitation wird das gleiche Prinzip angewandt, nur werden hier physiologischere Pufferkonditionen gewählt, um eventuelle Bindungspartner des präzipitierten Antigens zu identifizieren.

Die Antikörper wurden an kolloidale, paramagnetische Mikrokügelchen (engl.=*beads*, µMacs, Miltenyi) immobilisiert, an die Protein A gekoppelt ist. Dabei bindet Protein A, ein 42 kDa großer Zellwandbestandteil aus *Staphylococcus aureus*, hoch spezifisch an den Fc-Teil von IgG., wobei die Fab-Region des Antikörpers unverändert bleibt und mit dem entsprechenden Antigen

interagieren kann. Für die Präzipitation von CIB wurden dabei 100 μ l der Protein A-*Beads* mit 1 μ l anti-CIB-Serum inkubiert. Zum Teil wurden auch bereits Antikörper-gekoppelte *Beads* (μ Macs GFP/HA *Isolation Kit*) der gleichen Firma nach Herstellerprotokoll verwendet. Diese wurden dann mit Zelllysaten inkubiert, die entsprechend transfiziert oder infiziert wurden bzw. unbehandelt blieben. Die Lyse der Zellen erfolgte dabei mit dem mitgelieferten Lysepuffer, dem zusätzlich noch der Protease Inhibitor Cocktail hinzugefügt wurde. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler wurde der Reaktionsansatz über die mitgelieferten Mikrosäulen gegeben und mehreren Waschschrinen mit dem Waschpuffer 1 unterzogen. Zur Analyse der präzipitierten Proteine wurden sie direkt von der Säule mit dem Elutionspuffer eluiert und konnten direkt mittels der SDS-PAGE und Immunoblot aufgetrennt und detektiert werden.

4.4 Kinase-Assay

Ein Kinase-Assay dient dazu, *in-vitro* Phosphorylierungen von Kinasen zu verfolgen. Dabei kann einmal der Phosphorylierungszustand passender Substrate untersucht werden bzw. der Aktivierungszustand oder der Autophosphorylierungsgrad der Kinase selbst.

4.4.1 Kinase-Assay mit rekombinant exprimierten Proteinen

Die Kinasereaktion wurde mit 5 μ g rekombinant exprimiertem GST-YopO Protein bzw. der Mutante GST-YopO D267K, 2 μ g G-Aktin (Thrombozyten-Aktin, Cytoskeleton) und 5 μ g des GST-CIB Proteins bzw. der entsprechenden Mutanten in 20 μ l Kinasepuffer mit 5 μ Ci [γ -³²P] Adenosintriphosphat (Amersham) durchgeführt. Dabei fand die Reaktion für 30 min bei 30 °C statt und wurde durch die Zugabe von SDS-Ladepuffer (s.Kapitel IV-4.3) und eine Inkubation für 5 min bei 95 °C gestoppt. Die Proteine wurden dann per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Von dieser ist dann eine Autoradiografie angefertigt worden und zur Kontrolle gleicher Proteinmengen wurden die darauf befindlichen Proteine mit *Coomassie*-Blau gefärbt.

Kinasepuffer:

HEPES	20 mM
ATP	1 mM
DTT	1 mM
MgCl ₂	10 mM
MnCl ₂	2 mM

4.4.2 Kinase-Assay nach Koimmunpräzipitation

Hierbei sind die Proteine zunächst wie in Kapitel IV-4.7 beschrieben präzipitiert, anschließend jedoch nicht von der Mikrosäule eluiert worden. Nach dem letzten Waschschrift mit Waschpuffer 1 wurde zunächst noch zweimal mit dem Kinasepuffer (s. oben) gewaschen. Im Anschluss wurden die auf der Säule befindlichen Proteine einer Kinase-reaktion unterzogen, indem 20 µl Kinasepuffer mit 5 µCi [γ -³²P] Adenosintriphosphat auf die Säule gegeben wurden, was ihrem Totvolumen entspricht. Die Reaktion fand wiederum bei 30 °C für 30 min statt und wurde dann durch die Zugabe von SDS-Laufpuffer und die Inkubation für 5 min bei 95 °C gestoppt. Darauffolgend konnten die phosphorylierten Proteine über eine Autoradiografie detektiert werden und die Proteinmengen wurden über einen anschließend durchgeführten Immunoblot kontrolliert.

4.4.3 Anfertigen einer Autoradiografie

Zur Anfertigung von Autoradiogrammen wurden *Western Blot* Membranen einer radiosensitiven Folie (*Phosphoimager Screen*) exponiert. Der *Screen* besteht aus einer PSP (*Phospho-stimulable phospholayer*)-Schicht BaFBr (mit Europium dotiert). Die Expositionszeit hing dabei von der Aktivität der Probe und dem verwendeten Nuklid ab. Durch die radioaktive Strahlung wurden die Moleküle in der PSP-Schicht angeregt und in einen höheren, metastabilen Energiezustand versetzt. Der *Screen* wurde schließlich im *Phosphoimager* (FLA 3000, Fuji) ausgewertet, wo er unter Lichtausschluss von einem Laser abgetastet wurde. Dadurch werden die angeregten

Moleküle wieder in den stabilen Grundzustand versetzt, wobei Energie in Form von Photonen ausgesendet wird. Das Signal wird über einen *Photomultiplier* durch Erzeugen von Sekundärelektronen verstärkt, deren Ladung schließlich durch eine Anode detektiert wird. Die erhaltenen Daten können über einen angeschlossenen Rechner mit Hilfe der geeigneten Software als Autoradiogramm dargestellt werden.

4.5 Dual-Luciferase-Assay

In diesen Versuchen wird mit Hilfe der *Firefly*-Luciferase als Reporterenzym die Aktivierung zellulärer Transkriptionsfaktoren (NFκB und SRE) nachgewiesen. Die Expression der *Firefly*-Luciferase ist dabei abhängig von der Aktivierung der Transkription, so dass die Quantifizierung des Reporterenzym Rückschlüsse auf die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren zulässt.

In diesem Fall wurde der Dual-Luciferase Assay von Promega nach Herstellerangaben verwendet. Hier wird eine zweite Luciferase (*Renilla*-Luciferase) als interner Standard eingesetzt, d.h. diese wird konstant von den transfizierten Zellen exprimiert und minimiert experimentelle Unterschiede, die auf unterschiedliche Transfektionseffizienzen bzw. unterschiedliche Zellviabilitäten zurückgehen.

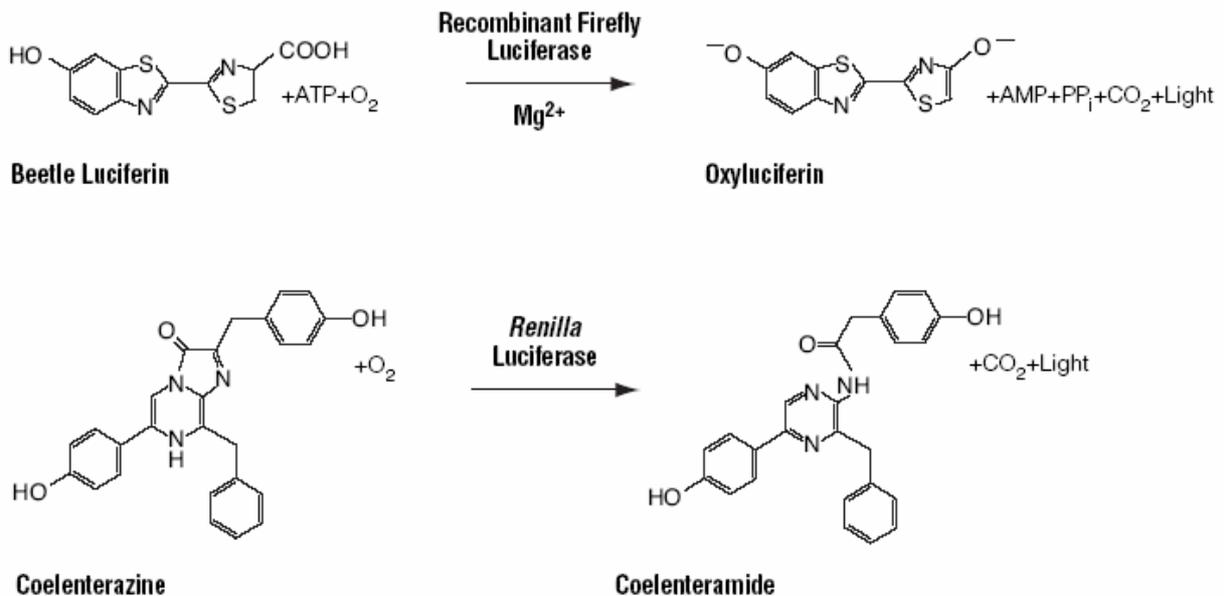


Abbildung IV- aus *Technical Manual 040*, Dual® Reporter Assay System, Promega, zeigt die Reaktionsgleichungen der von den Luciferase katalysierten Substratumsetzungen

Zunächst wurden die Zellen mit der entsprechenden Vektor-DNA für das *Firefly*-Luciferase-Reporterplasmid und das *Renilla*-Luciferase-Konstrukt transfiziert. Je nach verwendeter Zelllinie (HEK293T) wurde zusätzlich die Vektor-DNA für das GFP-YopO-Fusionsprotein bzw. entsprechende Mutanten mit Fugene transfiziert. Bei den Flp-YopO-Zellen wurde die Expression von YopO durch die Zugabe von Doxycyclin induziert.

Nach erfolgter Transfektion wurde serumfreies Medium zu den Zellen gegeben und für 24 h inkubiert. Die evtl. Induktion der YopO-Expression mit Doxycyclin bzw. die Stimulation der Signalwege, die zu einer Aktivierung der untersuchten Transkriptionsfaktoren führte, fand im Anschluss statt. Dabei wurden die entsprechenden Substanzen (PMA 60 ng/ml; FBS 10 %) ebenfalls in serumfreiem Medium zu den Zellen gegeben und für weitere 16 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann erfolgte die Zellyse und Aufarbeitung der Proben nach Herstellerprotokoll.

Bei den J774A.1 Zellen wurde nach Infektion mit den entsprechenden *Yersinia*-Stämmen die Luciferase quantifiziert. Dazu wurden sie wie die Flp-YopO-Zellen transfiziert, nach 6 h wurde frisches Wachstumsmedium hinzugegeben und die Zellen am nächsten Tag infiziert. Nach verschiedenen langen Infektionszeiten wurden die Zellen wiederum nach Herstellerangaben lysiert und die Proben aufgearbeitet.

Die Messung erfolgte im 96-well Format am Luminometer (Infinite M200, Tecan). Dabei wurde zunächst die Lumineszenz gemessen, die bei der Substratumsetzung von *Beetle* Luciferin durch die *Firefly*-Luciferase entsteht. Im Anschluss wurde durch die Zugabe des *Stop&Glo*®-Reagenz das Signal unterdrückt und gleichzeitig Substrat für die *Renilla*-Luciferase bereitgestellt, so dass sofort die Substratumsetzung dieser als interner Standard detektiert werden konnte.

4.6 Fluorimetrische Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration

Veränderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen in Flp-InTMT-RexTM-293-Zellen bzw. in HEK293T-Zellen wurden in Anlehnung an die von (Zhu et al. 1998) beschriebene Methode, mit dem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff Fura-2AM (Molecular Probes) verfolgt. Fura-2AM liegt zunächst als Acyetoxy-methylester vor und ist in dieser Form lipophil und damit membranpermeabel. Bei der Inkubation der Zellen mit Fura-2AM diffundiert der Farbstoff durch die Zellmembran und wird intrazellulär durch unspezifische Esterasen gespalten. Es entsteht eine hydrophile Form des Farbstoffes, die nicht mehr membrangängig ist und sich im Zytosol der Zelle anreichert. Fura-2 ist ein sehr selektiver Ca²⁺-Chelator, dessen Maximum im Absorptionsspektrum abhängig von

der Bindung der Calciumionen ist. In beiden Fällen wird Licht einer Wellenlänge $\lambda = 510$ nm emittiert. Durch die Anregung von Fura-2 bei verschiedenen Wellenlängen und Bildung des Verhältnisses der gemessenen Emissionsintensitäten (Ratio) erhält man ein Maß für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, die unabhängig von potentiellen Störfaktoren, wie Zelldicke, das Ausbleichen und der Verlust des Farbstoffes durch Diffusion ist. Vor allem ist die Ratio aber unabhängig von der unterschiedlichen Farbstoffbeladung der jeweiligen Zelle. Als Anregungswellenlängen werden idealerweise diejenigen Wellenlängen gewählt, bei denen der Unterschied in den Absorptionsspektren zwischen Calcium-beladenem ($\lambda = 340$ nm) und Calcium-freiem Fura-2 ($\lambda = 380$ nm) am maximalsten ist. Es wird also in möglichst kurzer zeitlicher Abfolge mit $\lambda = 340$ nm und $\lambda = 380$ nm angeregt und aus den erhaltenen Emissionsintensitäten das Verhältnis $R_{340/380}$ gebildet. Aus diesem Verhältnis lässt sich dann nach der Formel von Grynkiewicz direkt die zugehörige absolute Ca^{2+} -Konzentration berechnen (Grynkiewicz et al. 1985).

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \times \frac{F_{\min \lambda 2}}{F_{\max \lambda 2}} \times \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}$$

- K_D - Dissoziationskonstante für Fura-2 (135 nMol/l)
- $F_{\min \lambda 2}$ - Emmissionsintensität bei Anregung mit $\lambda 2=380$ nm bei minimaler Calcium-Konzentration
- $F_{\max \lambda 2}$ - Emmissionsintensität bei Anregung mit $\lambda 2=380$ nm bei maximaler Calcium-Konzentration
- R_{\min} - Ratio340/340 bei minimaler Calcium-Konzentration
- R_{\max} - Ratio340/340 bei maximaler Calcium-Konzentration
- R - Ratio340/380 der zu ermittelnden Calcium-Konzentration
- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - intrazelluläre Calcium-Konzentration

Die Werte für $F_{\min \lambda 2}$, $F_{\max \lambda 2}$, R_{\min} und R_{\max} mussten anschließend an jede Messung durch eine Kalibrierung bestimmt werden.

Für eine Messung wurden Zellen einer konfluent gewachsenen 10cm Schale verwendet, denen je nach Ansatz 15h-17 h zuvor 100 ng/ml Doxycyclin ins Medium gegeben wurde. Die Zellen

wurden mit Trypsin abgelöst und mit Ca-Messpuffer (ECL+Ca²⁺) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1ml ECL+Ca²⁺ mit 4µM Fura-2/AM aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert, erneut in ECL+Ca²⁺ gewaschen und in einer Dichte von 2x10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Aliquots der Zellsuspension wurden bis zur Messung im Dunkeln (max. 3 h) bei Raumtemperatur aufbewahrt. Vor jeder Messung wurden die Zellen noch einmal mit ECL+Ca²⁺ gewaschen. Veränderungen der Fluoreszenz von Fura-2 wurden mit einem Hitachi 2000 Spektralfluorimeter verfolgt, wobei die Zellsuspension in einer Quarzküvette kontinuierlich gerührt wurde. Die Emissionswerte wurden dabei bei 495 nm nach wechselnder Anregung bei 340 nm und 380 nm gemessen. Zu einem gegebenem Zeitpunkt wurden die Zellen durch die Zugabe von 100 µM ATP/Carbachol bzw. 1 µM Ionomycin stimuliert und das Ca²⁺-Signal aufgezeichnet. Im Anschluss konnte die Ca-Konzentration durch Kalibrierung mit 0,1 % Triton X-100 für die maximale Ratio und 8 mM EGTA/ 60 mM Tris für die minimale Ratio errechnet werden.

ECL+Ca²⁺

HEPES pH 7,4 (mit NaOH)	15 mM
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	1 mM
Glukose	10 mM
BSA	0,1 % (w/v)
CaCl ₂	1,8 mM

V. ERGEBNISSE

1. Charakterisierung der Interaktion zwischen YopO und CIB

1.1 Die Kinase YopO phosphoryliert CIB1

1.1.1 Phosphorylierung von CIB1 *in vitro*

Auf der Suche nach Substraten für die Kinase YopO wurden verschiedene Proteine, unter anderem CIB1 und Otubain-1, einem *in vitro* Kinaseexperiment unterzogen. Beide Proteine wurden bereits als Interaktionspartner für YopO/YpkA beschrieben. CIB1 interagiert mit YopO/YpkA in Yeast Two Hybrid Experimenten (Dukuzumuremyi 2003) und Otubain-1 konnte mit einem *in vitro* Kinase-Assay als Substrat von YpkA/YopO identifiziert werden (Juris et al. 2006).

Die rekombinant exprimierten Substratproteine bzw. das allgemeine Substrat Myelin Basisches Protein (MBP) wurden zusammen mit Aktin, GST-YopO und [³²P]-ATP inkubiert, die Proteine anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Autoradiografie der Membran (Abbildung V-1) zeigt eine deutliche Inkorporation von [³²P] in CIB1 und MBP, was eine Phosphorylierung *in vitro* durch die Kinase YopO anzeigt. In diesem Ansatz konnte die von Juris et al. beschriebene Phosphorylierung von Otubain-1 dagegen nicht nachgewiesen werden.

Um die Phosphorylierung von CIB1 weiter zu charakterisieren und die Phosphorylierungsstellen im CIB1-Molekül zu lokalisieren, wurde *in vitro* phosphoryliertes CIB1 aus SDS-PAGE-Gelen extrahiert und mit Trypsin verdaut (in Kooperation mit Lars Israel und Axel Imhof, Zentrum für Proteinanalytik, Institut für Biochemie, LMU München). Die erhaltenen Peptide wurden über HPLC mit einer hydrophoben C18-Säule aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen der MALDI-TOF Massenspektrometrie bzw. des Vorläuferionen-Scans zugeführt. Die identifizierten Phospho-Peptide der verschiedenen Experimente sind in der Tabelle V-1 dargestellt.

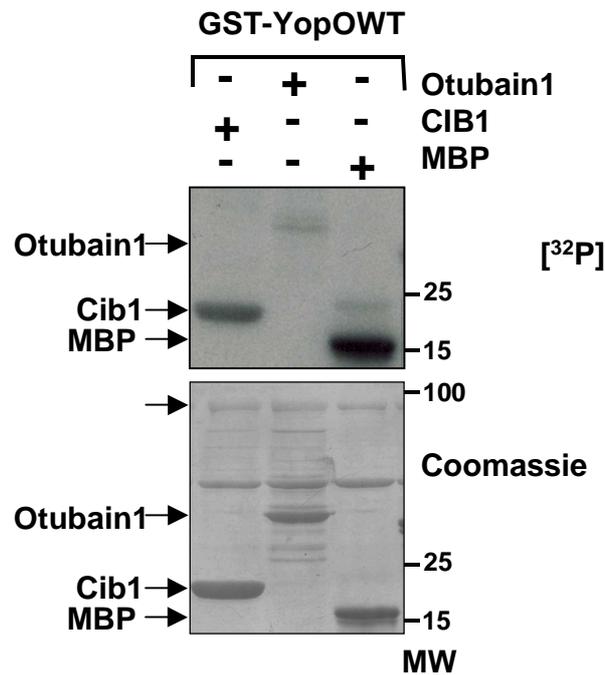


Abbildung V-1 **Die Kinase YopO phosphoryliert CIB1 *in vitro***. Die rekombinant als GST-Fusionsprotein exprimierte Kinase YopO wurde in einem Kinaseansatz (s. Kap. IV-4.5) auf ihre Aktivität hinsichtlich der rekombinant exprimierten, potentiell physiologischen Substrate CIB1 und Otubain1, sowie des allgemeinen Substrates MBP untersucht. Die Proben wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und autoradiografisch analysiert (oberes Feld). Die Präsenz und das SDS-PAGE Mobilitätsverhalten der einzelnen Proteine wurde mittels Coomassie-Färbung der Membran kontrolliert (unteres Feld).

Es wurden C-terminale Peptide identifiziert, die die Aminosäuren 180-188 bzw. 180-189 umfassen. Das Peptid 180-189 wies dabei immer zwei Phosphatreste auf, wobei es beim Peptid 180-188 Ergebnisse mit einem oder zwei nachgewiesenen Phosphatresten gab. Innerhalb der identifizierten Peptide gibt es durch die Serine-180, -185 und -186 drei potentielle Phosphorylierungsstellen für die Serin/Threoninkinase YopO.

Zur exakten Identifizierung der Phosphorylierungsstelle im CIB1-Molekül wurden CIB-Mutanten generiert, bei denen die drei in Frage kommenden Serine (180, 185 und 186) gegen Alanin ausgetauscht wurden, was eine Phosphorylierung an dieser Stelle unmöglich macht. Zunächst wurden die Mutanten CIBS180A, CIBS185A, CIBS186A und später die Doppelmutante CIBS185/186A als GST-Fusionsprotein rekombinant exprimiert und in einem Kinase-Ansatz auf ihre Phosphorylierbarkeit durch die Kinase YopO untersucht.

Tabelle V-1 **Zusammenfassung der Ergebnisse der Massenspektrometrie**

GST-CIB wurde durch GST-YopO *in vitro* phosphoryliert, mit Trypsin verdaut und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht.

Anzahl der Experimente	Konstrukt	m/z [M-zH]z-	korrespondierendes Peptid	CIB1-Sequenz	Anzahl der Phosphatreste
2	GST-CIB	1063,07; 1063,08 [M-1H]1-	SPDFASSFK	180-188	1
2	GST-CIB	694,12; 694,14 [M-2H]2-	SPDFASSFKI	180-189	2
2	GST-CIB	1061,95;1061,98 [M-1H]1-	SPDFASSFK	180-188	1
2	GST-CIB	530,47; 530,46 [M-2H]2-	SPDFASSFK	180-188	2
1	GST-CIB	734,23 [M-2H]2	SPDFASSFKI	180-189	2

Die Autophosphorylierung des YopO an den Serinen 90- und -95 wird im unteren Teil der Abbildung durch die Inkorporation von [³²P] deutlich und kontrolliert die Kinaseaktivität des rekombinant exprimierten YopO. CIBS180A zeigt hinsichtlich der Bandenintensität keinen Unterschied zum CIB1 (Bande 4), womit deutlich wird, dass der Phosphatrest von der Kinase YopO nicht auf den Serinrest 180 übertragen wird.

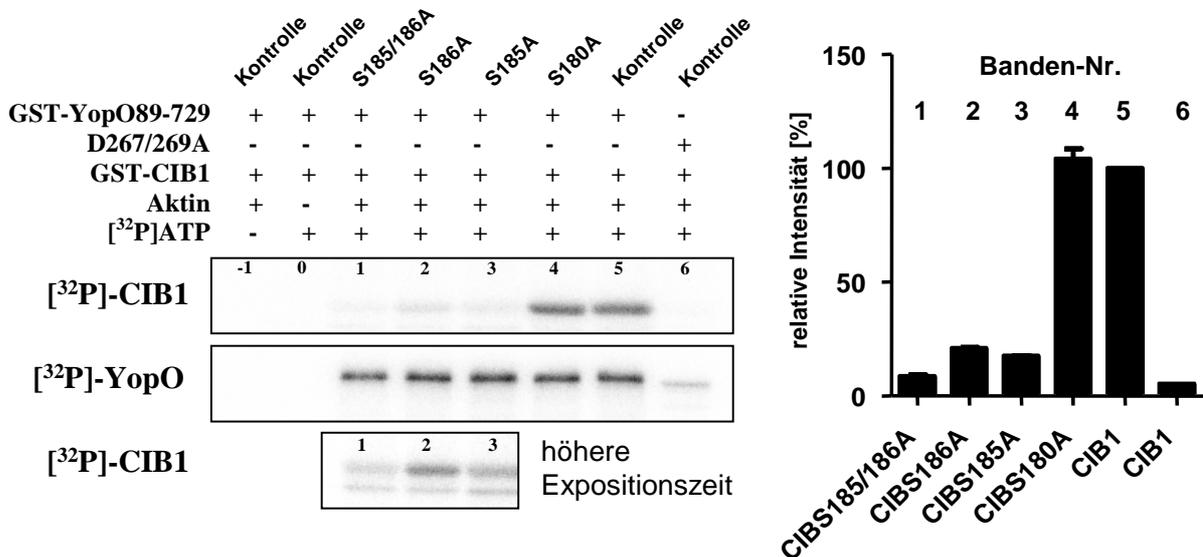


Abbildung V-2 **YopO phosphoryliert die Serine 185 und 186 *in vitro***

GST-CIB1 (Bande 5) bzw. die erwähnten Mutanten CIBS185A/186A (Bande 1), CIBS186A (Bande2), CIBS185A (Bande3) oder CIBS180A (Bande 4) wurden zusammen mit Aktin, YopO und 32P-ATP in einem Kinaseexperiment inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und autoradiografisch ausgewertet. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch bestimmt, wobei hier die relativen Prozentsätze, bezogen auf die Phosphorylierung des CIB1 durch YopO (Bande 5=100 %), angegeben sind. Die Negativkontrollen ohne den Zusatz von Aktin bzw. [³²P]-ATP zeigen keine Banden. Die Kinase-inaktive Mutante des YopO (YopOD267/K269A) führt zu einer sehr geringen Inkorporation von [³²P] und markiert den Hintergrund (Bande 6). Die Inkorporation von [³²P] durch YopO kontrolliert die Kinaseaktivität des YopO.

Die Einzelmutanten CIBS185A (Bande 3) und CIBS186A (Bande 2) und auch die Doppelmutante CIBS185/186A (Bande 1) zeigen allerdings eine deutlich verminderte Inkorporation von [³²P]. Verglichen mit der Intensität der Bande des CIB1-Wildtyps zeigen die Einzelmutanten CIBS185A und CIBS186A noch eine relative Bandenintensität von ca. 20 % und die Doppelmutante CIBS185/186 sogar nur noch eine Intensität von ca. 5 %. Letztere ist vergleichbar mit der Bandenintensität des Ansatzes mit der Kinase-inaktiven Mutante des YopO (YopOD267/K269A) und entspricht damit dem Hintergrund. Die Serine –185 und –186 sind damit die von YopO verwendeten Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von CIB1. Allerdings lässt sich nicht eindeutig sagen, ob immer beide Serine phosphoryliert werden, oder die Mutation des einen Serinrestes bei Mutation lediglich die Phosphorylierung des anderen behindert. Die Massenspektrometrie-Daten sprechen allerdings für die Phosphorylierung von Serin –185 und Serin –186 durch YopO in CIB1.

1.1.2 Phosphorylierung von CIB1 *in vivo*

Um die Phosphorylierung von CIB1 durch die Kinase YopO auch *in vivo* zeigen zu können, wurde überexprimiertes Flag-YopO aus HEK293T-Zellen mit CIB-GFP koprizipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden dabei nicht eluiert, sondern verblieben gebunden an die Antikörper-gekoppelten Sepharose-*Beads* auf der Säule. Dort wurden sie einem Kinaseexperiment unterzogen, anschließend eluiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte die autoradiografische Auswertung und im Anschluss wurden die präzipitierten Proteine hinsichtlich ihrer Lokalisation auf der Membran mittels *Western Blot* kontrolliert.

Die Autoradiografie in Abbildung V-3A zeigt, dass überexprimiertes und koprizipitiertes Flag-YopO keinen Einfluss auf die Inkorporation von [³²P] durch präzipitiertes CIB1-GFP zu haben scheint. Die Intensität der [³²P] CIB1-GFP-Banden nach der Präzipitation und des sich anschließenden Kinaseexperimentes ist annähernd gleich, unabhängig von der Koprizipitation der Kinase YopO. Dies bedeutet, dass entgegen der vorangegangenen Ergebnisse (s. Abbildung V-1) CIB1 unter diesen Versuchsbedingungen nicht durch YopO phosphoryliert wird. Allerdings scheint CIB1 unabhängig von YopO durch andere Kinasen phosphoryliert zu werden, die mit CIB1 koprizipitiert werden, da eine geringe Inkorporation von [³²P] sichtbar ist. Die Kinaseaktivität von YopO während des Experimentes wurde durch die Präzipitation und

Autophosphorylierung von GFP-YopO bestätigt. Dabei wird in Abbildung V-3B deutlich, dass im Gegensatz zum kopräzipitierten Flag-YopO eine wesentlich größere Menge an GFP-YopO präzipitiert wurde. Dadurch erklärt sich auch die deutlich intensivere Autophosphorylierungsbande im oberen Teil der Abbildung V-3A. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden vor der Präzipitation Lysatproben entnommen und mittels Western Blot hinsichtlich der transfizierten Fusionsproteine überprüft. (Abbildung V-3C). Die erfolgte Präzipitation von CIB1-GFP und GFP-YopO bzw. die Koimmunpräzipitation von Flag-YopO wurden mittels *Western Blot* in Abbildung V-3B überprüft.

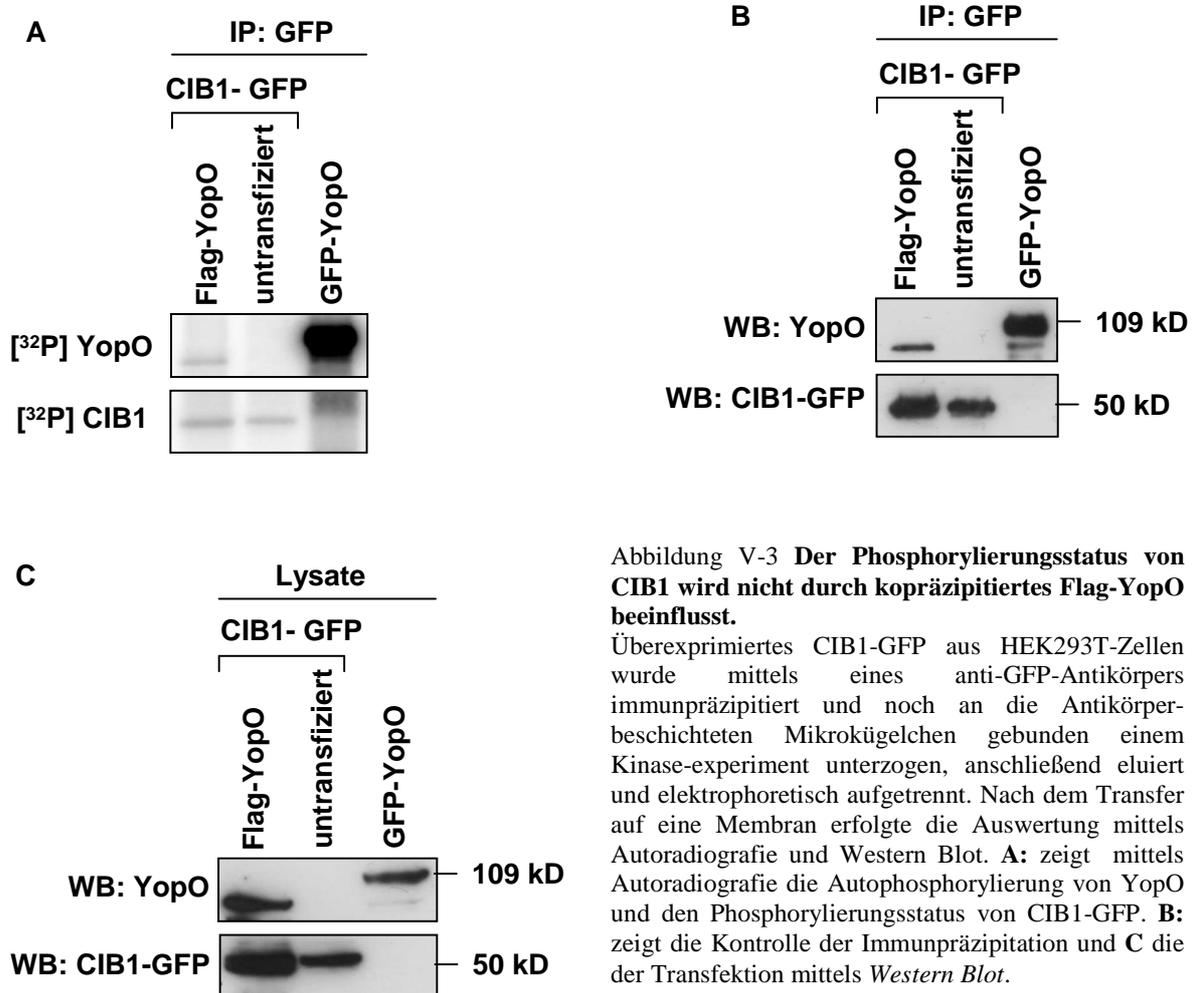


Abbildung V-3 **Der Phosphorylierungsstatus von CIB1 wird nicht durch kopräzipitiertes Flag-YopO beeinflusst.**

Überexprimiertes CIB1-GFP aus HEK293T-Zellen wurde mittels eines anti-GFP-Antikörpers immunpräzipitiert und noch an die Antikörperbeschichteten Mikrokügelchen gebunden einem Kinase-experiment unterzogen, anschließend eluiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte die Auswertung mittels Autoradiografie und Western Blot. **A:** zeigt mittels Autoradiografie die Autophosphorylierung von YopO und den Phosphorylierungsstatus von CIB1-GFP. **B:** zeigt die Kontrolle der Immunpräzipitation und **C** die der Transfektion mittels *Western Blot*.

Um sicher zu gehen, dass alle essentiellen endogenen Faktoren der Kinasereaktion vorhanden sind, wurden HEK293T-Zellen mit [³²P] Natrium-ortho-phosphat behandelt, nachdem sie mit

CIB1-GFP transfiziert wurden. Damit sollte [^{32}P] bei den *in vivo* ablaufenden Kinasereaktionen auf die jeweiligen Substrate übertragen werden und sollte so nach anschließender Immunpräzipitation des Substrates, elektrophoretischer Auftrennung und dem Transfer auf eine Membran autoradiografisch ausgewertet werden. In diesem Experiment wurden die Zellen nach ihrer Behandlung mit [^{32}P] Natrium-ortho-phosphat mit dem *Y. enterocolitica* Wildtypstamm WA-P oder der YopO-defizienten Mutante WA- $\Delta yopO$ infiziert, um den Einfluss von YopO auf den Phosphorylierungsstatus des überexprimierten CIB1-GFP zu beobachten. Nach Infektion und anschließender Immunpräzipitation von CIB1-GFP zeigte die Autoradiografie (Abbildung V-4) jedoch keinen Unterschied hinsichtlich der Intensität der CIB1-GFP-Banden. Damit zeigt sich hier, dass CIB1-GFP phosphoryliert wird, allerdings anders als erwartet unabhängig von transloziertem YopO.

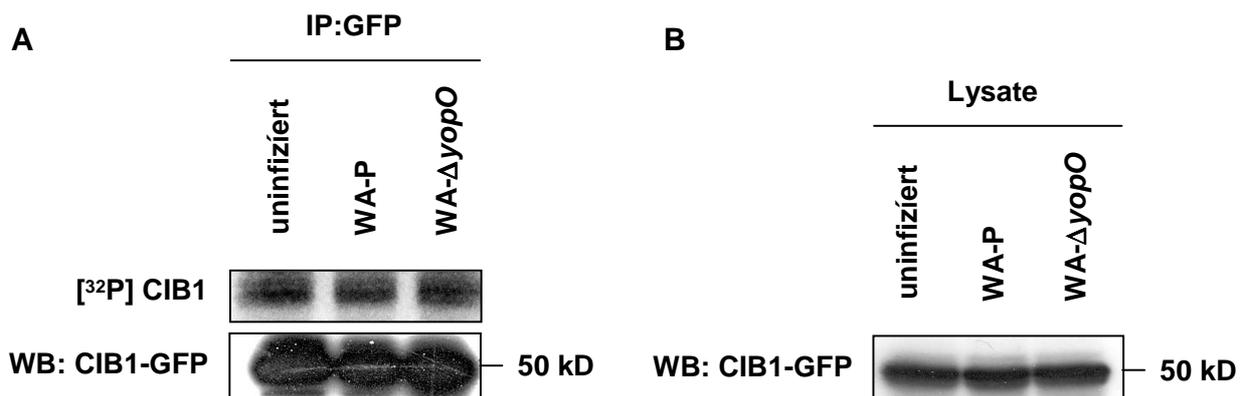


Abbildung V-4 **Transloziertes YopO hat keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von CIB1.** Mit CIB1-GFP transfizierte HEK293T-Zellen wurden mit [^{32}P] Natrium-ortho-phosphat behandelt und mit den Stämmen WA-P und WA- $\Delta yopO$ infiziert bzw. uninferiert belassen. CIB1-GFP wurde mittels eines anti-GFP-Antikörpers immunpräzipitiert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mittels Autoradiografie bzw. *Western Blot* ausgewertet. A: zeigt die Autoradiografie des präzipitierten CIB1-GFP und die Kontrolle der Immunpräzipitation mittels *Western Blot*. B: zeigt die Kontrolle der Transfektion von CIB1-GFP in den HEK 293T-Lysaten mittels *Western Blot*.

1.2 YopO wird im Komplex mit endogenem CIB präzipitiert

Bisher wurde Interaktion von CIB1 mit der Kinase YopO in einem Yeast Two Hybrid-Ansatz (Dukuzumuremyi 2003) und über die spezifische Phosphorylierung des rekombinanten CIB1 an

den Serinen –185 und/oder –186 durch das rekombinante YopO gezeigt. Diese Phosphorylierung konnte *in vivo* nicht bestätigt werden. Allerdings war in diesen Experimenten die Koimmunpräzipitation der beiden Proteine nach Überexpression als Fusionsproteine in HEK293T-Zellen erfolgreich. Die Koimmunpräzipitation von endogenem CIB1 würde die Interaktion weiterhin bestätigen. So wurden HEK293T-Zellen mit Flag-YopO transfiziert. Die Immunpräzipitation von YopO und eventuelle Kopräzipitation von endogenem CIB1 erfolgte mittels der entsprechenden anti-Flag- bzw. anti-CIB1-Antikörper woran sich die elektrophoretische Auftrennung der präzipitierten Proteine und der Transfer auf eine Membran anschloss.

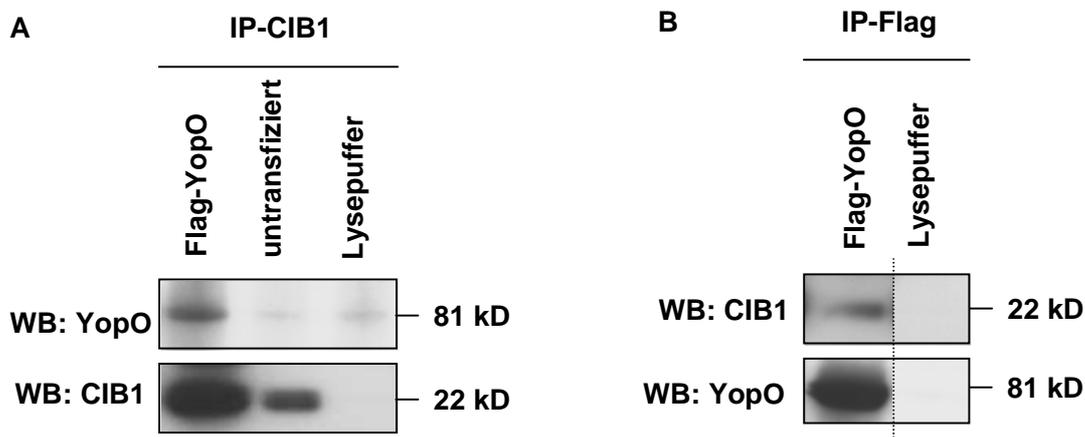


Abbildung V-5 **Endogenes CIB1 kopräzipitiert mit YopO.**

Überexprimiertes Flag-YopO (B) bzw. endogenes CIB1 (A) aus HEK293T-Zellen wurden mit den entsprechenden Antikörpern (anti-Flag, anti-CIB1) präzipitiert, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Mittels *Western Blot* erfolgte die Detektion der immunpräzipitierten und koimmunpräzipitierten Proteine.

Dabei zeigt sich im *Western Blot*, dass endogenes CIB1 im Komplex mit Flag-YopO kopräzipitiert wird (Abbildung V-5B). In der entgegengesetzten Richtung konnte auch Flag-YopO im Komplex mit endogenem CIB1 kopräzipitiert werden (Abbildung V-5A). Dies deutet auf eine spezifische Interaktion der beiden Proteine hin, wobei die Beteiligung anderer Proteine, an dieser Komplexbildung unter Verwendung dieser Methoden nicht ausgeschlossen werden kann.

1.3 YopO bindet an den CIB1-enhaltenden Komplex über die MLD-Domäne

YopO weist an seinem N-Terminus eine Domäne auf (*Membrane-Lokalisation-Domain*; MLD), die für die Lokalisation von YopO an die Zellmembran der Wirtszelle verantwortlich ist. Da auch CIB1 über eine Myristylierung teilweise membranassoziiert vorliegt, scheint eine Interaktion abhängig von der MLD-Domäne des YopO wahrscheinlich. Zur Identifizierung der CIB1-YopO-Interaktionsbereiche innerhalb des YopO-Moleküls wurden verschiedene C-terminal und N-terminal trunkeerte GFP-YopO-Fragmente in HEK293T-Zellen transfiziert und mit einem entsprechenden anti-GFP-Antikörper immunpräzipitiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und dem Transfer der Proteine auf eine Membran konnten mittels *Western Blot* die YopO-Fragmente identifiziert werden, denen die Koimmunpräzipitation von überexprimierten CIB1-HA und damit eine wie auch immer geartete Interaktion möglich war.

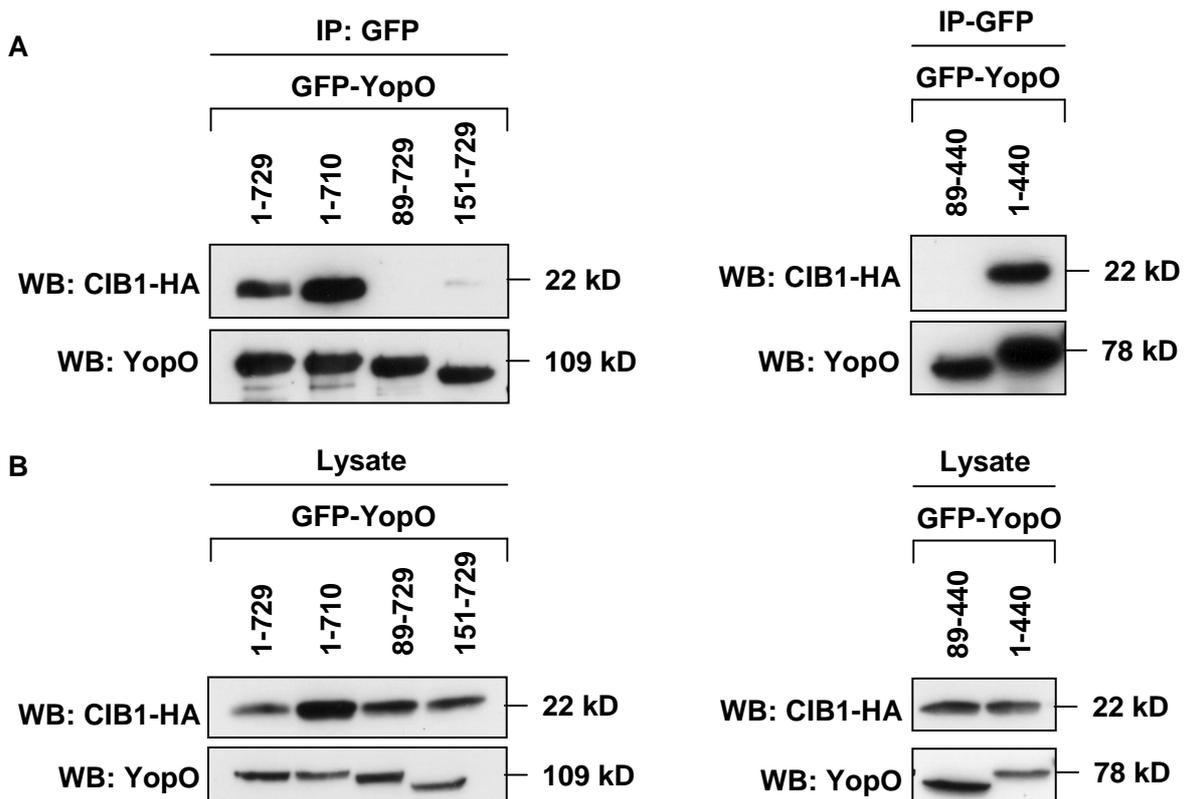


Abbildung V-6 YopO koimmunpräzipitiert CIB1 über die MLD-Domäne

A: Überexprimierte GFP-YopO-Fragmente wurden aus HEK293T-Zellen mittels eines anti-GFP-Antikörpers präzipitiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die Detektion von koimmunpräzipitiertem CIB1-HA erfolgte im *Western Blot*; **B:** Überexprimierte GFP-YopO-Fragmente und überexprimiertes CIB-HA aus HEK293T-Lysaten wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mittels *Western Blot* detektiert.

Dabei konnte festgestellt werden, dass nur YopO-Fragmente, die noch die ersten 89 Aminosäuren besitzen, zu einer Koimmunpräzipitation von CIB1-HA in der Lage waren (Abbildung V-6A). Im Gegensatz dazu wirkten sich Trunkierungen des C-Terminus indifferent auf das Kopräzipitationsverhalten von GFP-YopO aus. Die Interaktion mit CIB1 erfolgt also über die MLD-Domäne von YopO. Parallel zu den Präzipitaten wurden auch Lysatproben elektrophoretisch aufgetrennt und die Fusionsproteine im *Western Blot* detektiert, um die erfolgte Transfektion und die Beteiligung in etwa gleicher Proteinmengen zu überprüfen (Abbildung V-6B). Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass sowohl die *in vitro* Phosphorylierungsdaten als auch die Präzipitationsversuche eine Interaktion von CIB1 und YopO anzeigen, wobei die MLD-Domäne von YopO essentiell dafür ist. Dass CIB1 als Substrat für die Kinase YopO fungiert und dabei die Serine -185 und -186 eine wichtige Rolle spielen, konnte mit rekombinant exprimierten Proteinen in *in vitro* Kinaseansätzen gezeigt werden. Allerdings konnte diese Phosphorylierungsreaktion *in vivo* nicht nachgewiesen werden.

2. Zelluläre Funktionen des *Yersinia Outer Proteins YopO*

2.1 Das *spreading* der Zellen auf Fibrinogen wird durch YopO beeinflusst

CIB1 wurde zunächst als Interaktionspartner des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Thrombozyten identifiziert (Naik et al. 1997) und hat einen Einfluss auf dessen Aktivität. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ fungiert in Thrombozyten als Fibrinogenrezeptor und vermittelt dadurch zum einen die Aggregation und zum anderen die Ausbreitung (*Spreading*) der Thrombozyten auf der extrazellulären Matrix während der Wundheilung (Shattil et al. 1998; Parise 1999). In nicht-aktivierten Thrombozyten wird das Integrin in einem wenig affinen Zustand auf der Oberfläche exprimiert und erst durch die Interaktion der Thrombozyten mit Agonisten (z.B. Thrombin oder Kollagen) wird eine Konformationsänderung des Integrins in einen hoch affinen Zustand stimuliert und damit die Möglichkeit zur Bindung von löslichen Liganden gegeben. Immobilisiertes Fibrinogen dahingegen kann auch im wenig affinen Zustand des Integrins gebunden werden. Diese Interaktion führt dann zu einer Reihe von Prozessen, die eine Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes beinhalten. So kommt es zum Beispiel nach der Bindung von immobilisiertem Fibrinogen zur Extension von Filopodien und dem *Spreading* der Thrombozyten. CIB1 reguliert

dieses *Spreading*, wenn es an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ gebunden ist, mittels der Modulation der Aktivität der FAK (*focal adhesion kinase*) (Naik and Naik 2003). Es ergab sich die Frage, ob sich YopO auf diese Regulation des *Spreadings* durch CIB1 auswirken würde und ob ein eventueller Effekt auf die Kinase-Funktion bzw. auf andere Funktionen des YopO zurückzuführen wäre. Da das Integrin ausschließlich in Thrombozyten exprimiert wird, diese sich aber durch den fehlenden Zellkern einer genetischen Manipulationen entziehen, wurden für diese Experimente CHO-A5-Zellen (*chinese hamster ovary*) verwendet, die ektopisch das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ exprimieren. Diese Zellen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Expression des Integrins im Vergleich zu Kontrollzellen (CHO-K1-Zellen) mittels einer Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Dabei konnte nur in den CHO-A5-Zellen das Integrin mit dem anti- β_3 -Antikörpers detektiert werden (Abbildung V-7).

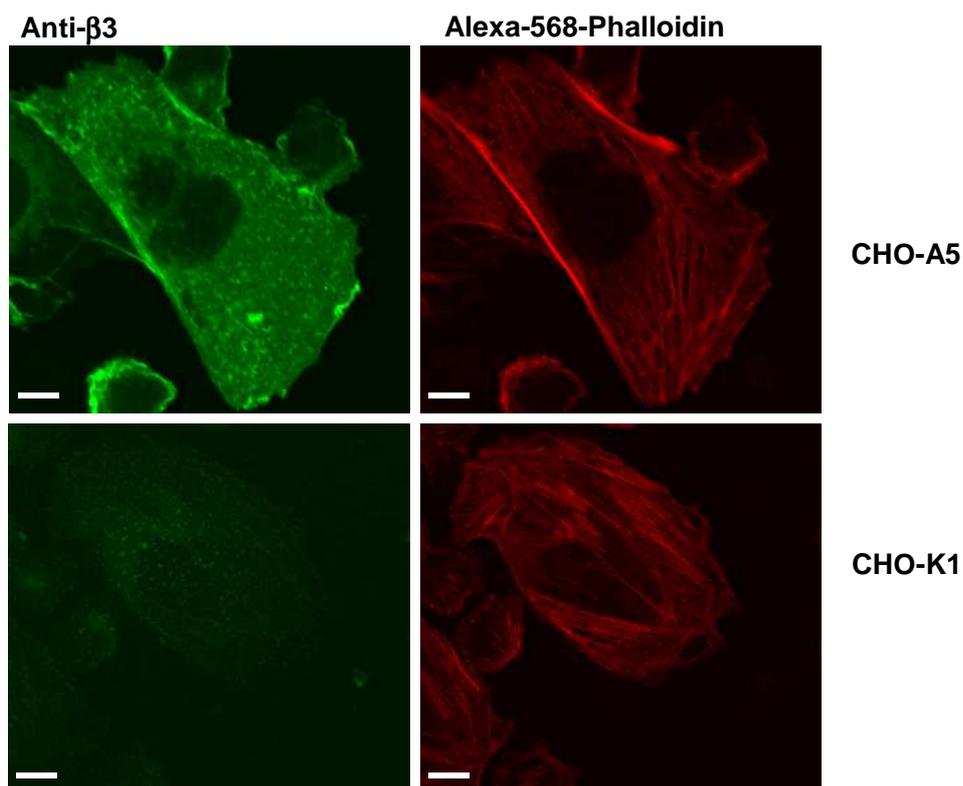


Abbildung V-7 **CHO-A5 Zellen exprimieren das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$**
CHO-A5- und CHO-K1-Zellen wurden auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen ausgesät, 24 h später fixiert und mit einem anti- β_3 -Antikörper bzw. mit Alexa-568-Phalloidin angefärbt. Die Länge des Referenzbalken entspricht 6 μm .

Diese Zellen wurden dann mit GFP-YopO-Konstrukten bzw. CIB1-GFP-Konstrukten mit Hilfe des Amaxa Nucleofector-Systems transfiziert und 12 Stunden nach der Transfektion für 30 min bzw. 45 min auf Fibrinogen-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, eingedeckelt und mikroskopisch analysiert. Dabei wurden für jedes Konstrukt jeweils dreimal 40 Zellen hinsichtlich ihrer Ausbreitung auf den Fibrinogen beschichteten Deckgläschen beurteilt.

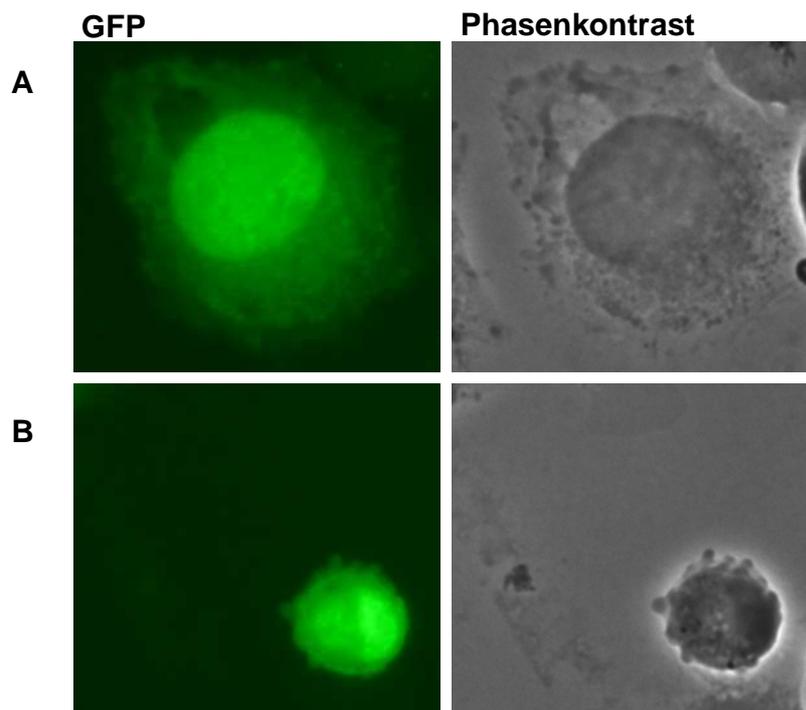


Abbildung V-8 **Abgerundete und ausgebreitete CHO-A5-Zellen**

CHO-A5-Zellen wurden mit GFP-Leervektor transfiziert und 12 h danach auf Fibrinogen beschichtete Deckgläschen für 45 min ausgesät. Die Zellen wurden dann fixiert, permeabilisiert und mikroskopisch hinsichtlich ihrer Ausbreitung ausgewertet. Im oberen Teil ist eine ausgebreitete Zelle und im unteren Teil eine abgerundete Zelle abgebildet.

Die Abbildung V-8A zeigt dabei eine transfizierte Zelle, die als ausgebreitet bewertet worden ist und Abbildung V-8B eine, die zur Gruppe der abgerundeten Zellen gezählt wurde. In Abbildung V-9 sind dann dann die Prozentsätze der abgerundeten Zellen nach Transfektion mit verschiedenen GFP-YopO-Konstrukten im Vergleich zum GFP-Leervektor dargestellt. Dabei sollte die Überexpression der Kinase-inaktiven GFP-YopO-Mutante (GFP-YopO D267/K269A)

bzw. die Überexpression der GFP-YopO-Mutante, deren Rho-Bindungsmotiv so mutiert wurde, dass eine Bindung von Rho-GTPasen nicht mehr möglich ist (GFP-YopO Y589/N593/E597A), aufzeigen, ob eventuelle Effekte eher auf die Kinase-Aktivität bzw. auf die Interaktion mit Rho-GTPasen zurückzuführen sind. Hierbei wurde deutlich, dass das *Spreading* der Zellen auf Fibrinogen nach 30 min (Abbildung V-9A) bzw. nach 45 min (Abbildung V-9B) deutlich inhibiert ist, da der Prozentsatz der abgerundeten Zellen im Vergleich zu den GFP-exprimierenden Zellen um ca. 60 % erhöht ist. Dabei konnten allerdings keine relevanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp-YopO und den Mutanten ausgemacht werden, so dass weder die putative Phosphorylierung von CIB1 noch die Interaktion von YopO mit Rho-GTPasen für die Inhibierung des *Spreadings* verantwortlich gemacht werden konnte.

Um Sekundäreffekte auszuschließen, die auf unterschiedlichen Mengen der Fusionsproteine beruhen, aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen, wurden die transfizierten CHO-A5-Zellen lysiert. Gleiche Proteinmengen der Zelllysate wurden auf ein SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Im *Western Blot* konnten dann annähernd gleiche Mengen der transfizierten Fusionsproteine detektiert werden (Abbildung V-9C), womit Sekundäreffekte, die das *Spreading* der Zellen beeinflussen könnten, durch unterschiedlich stark transfizierte Proteine ausgeschlossen werden konnten.

Um noch deutlicher zu machen, dass eine mögliche Phosphorylierung von CIB1 durch die YopO-Kinase keinen Einfluss auf das *Spreading* der Zellen hat, wurden in den CHO-A5-Zellen die CIB1-GFP-Mutante überexprimiert, deren Serine -185 und -186 durch Alaninreste ersetzt wurden (S185/186A) und so keine Phosphorylierung mehr möglich ist. In Abbildung V-10 wurde sichtbar, dass die Überexpression von CIB1-GFP aber auch der S185/186A-Mutante im Vergleich zur Überexpression von GFP auch einen leichten inhibitorischen Effekt auf die Ausbreitung der Zellen zu haben scheint. 30 min nach der Interaktion mit immobilisiertem Fibrinogen (Abbildung V-10A) wurden etwa 20 % mehr abgerundete Zellen gezählt und 45 min nach der Interaktion noch etwa 10 % (Abbildung V-10B). Dies könnte bedeuten, dass die Überexpression von CIB1 die Interaktion mit dem Integrin-Fibrinogen-Komplex negativ beeinflusst und dies zu einem verminderten *Spreading* der Zellen auf der Oberfläche führt.

Verglichen mit dem Wildtyp-CIB1 ist bei der CIB1-GFP-Mutante (S185/186A) jedoch auch kein Unterschied bezüglich des *Spreadings* zu erkennen, so dass die Phosphorylierung des CIB1 an den putativen Phosphorylierungsstellen des YopO als Ursache für eine Inhibition des *Spreadings* ausgeschlossen werden kann. Dies bedeutet, dass die Phosphorylierung von CIB1 an

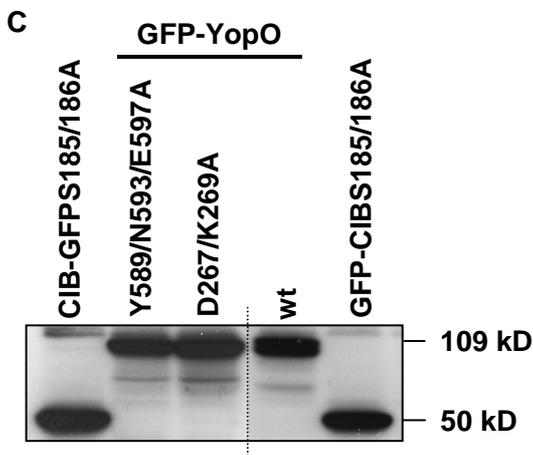
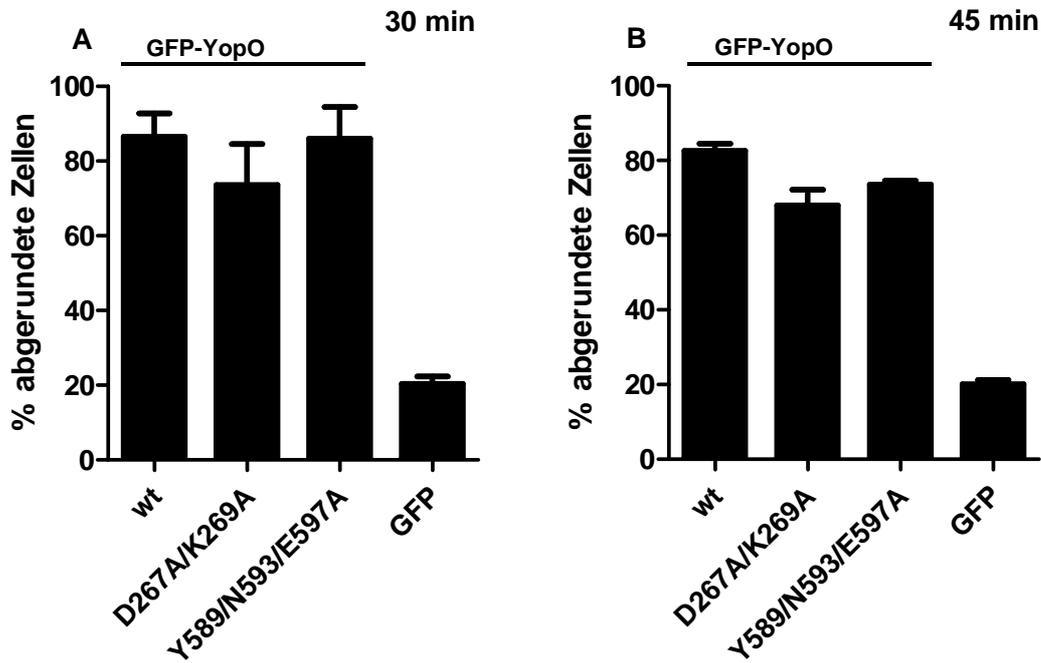


Abbildung V-9 Die Kinaseaktivität und Rho-Bindung von YopO hat keinen Einfluss auf die Reduzierung des *Spreading* von CHO-A5-Zellen auf immobilisiertem Fibrinogen.

(A) CHO-A5-Zellen wurden mit GFP-YopO-Konstrukten bzw. dem GFP-Leervektor transfiziert und 12 h danach auf Fibrinogen beschichtete Deckgläschen für 30 min bzw. 45 min (B) ausgesät. Die Zellen wurden dann fixiert, permeabilisiert und mikroskopisch ausgewertet, wobei jeweils die Prozentsätze der abgerundeten Zellen für 3x40 Zellen angegeben wurden. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert \pm SD von 2 Versuchen. (C) Die mit den GFP-YopO-Konstrukten bzw. den CIB-GFP-Konstrukten transfizierten CHO-A5-Zellen wurden lysiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die GFP-Fusionsproteine wurden mit Hilfe eines anti-GFP-Antikörpers im *Western Blot* detektiert.

den Serinen –185 und –186 keinen Einfluss auf den CIB1-Integrin-Komplex hat, der sich negativ auf das *Spreading* der Zellen auswirkt. Verglichen mit dem Wildtyp-CIB1 ist bei der CIB1-GFP-Mutante (S185/186A) jedoch auch kein Unterschied bezüglich des Spreadings zu erkennen, so dass die Phosphorylierung des CIB1 an den putativen Phosphorylierungsstellen des YopO als Ursache für eine Inhibition des *Spreadings* ausgeschlossen werden kann. Dies bedeutet, dass die Phosphorylierung von CIB1 an den Serinen –185 und –186 keinen Einfluss auf den CIB1-Integrin-Komplex hat, der sich negativ auf das *Spreading* der Zellen auswirkt. Auch für die transfizierten CIB1-GFP-Konstrukte konnten in etwa gleiche Proteinmengen detektiert werden (Abbildung V-9C) und somit konnten Sekundäreffekte hinsichtlich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen ausgeschlossen werden.

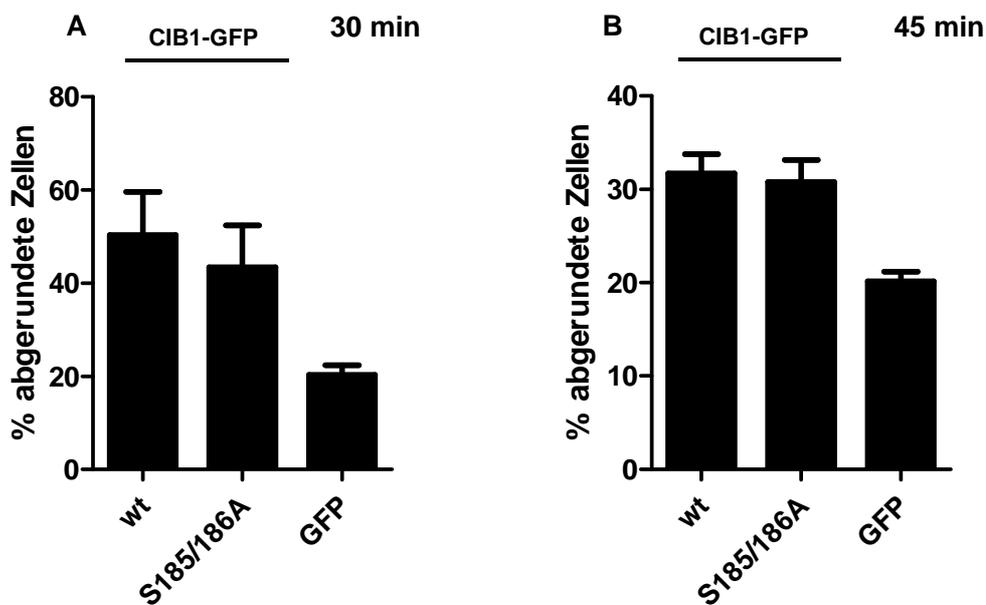


Abbildung V-10 Die Phosphorylierung von CIB1 an den Serinen -185 und -186 keinen Einfluss auf das Spreading von CHO-A5-Zellen auf immobilisiertem Fibrinogen.

CHO-A5-Zellen wurden mit CIB-GFP-Konstrukten bzw. dem GFP-Leervektor transfiziert und 12 h danach auf Fibrinogen beschichtete Deckgläschen für 30 min (A) bzw. 45 min (B) ausgesät. Die Zellen wurden dann fixiert, permeabilisiert und mikroskopisch ausgewertet, wobei jeweils die Prozentsätze der abgerundeten Zellen für 3x40 Zellen angegeben wurden. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert \pm SD von 2 Versuchen.

2.2 Etablierung einer stabil YopO exprimierenden Zelllinie

Für weitere Untersuchungen bezüglich zellulärer Effekte von YopO in den Wirtszellen wurde eine stabile, induzierbare Säugerzelllinie etabliert, die unter der Kontrolle eines mit Tetracyclin induzierbaren Promotors YopO exprimiert. Dazu wurden Flp-InTMT-RexTM-293 Zellen der Firma Invitrogen verwendet, die auf der Basis der DNA-Rekombination von *Saccharomyces cerevisiae* das Gen des zu exprimierenden Proteins in das Genom der Zelle integrieren. Dies geschieht mit Hilfe der Flp-Rekombinase und der homologen Rekombination. Die Flp-InTMT-RexTM-293 Zellen beinhalten bereits zwei stabil und unabhängig integrierte Plasmide. Zum einen das pcDNA6/TR Plasmid, welches stabil das Gen für den Tetracyclin-Repressor exprimiert und für eine Blasticidin-Resistenz kodiert (Abbildung V-11C) und zum anderen das pFRT/lacZeo Plasmid (Abbildung V-11D). Dieses integriert die Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase (FRT-Sequenz) stabil in die genomische Sequenz der Zelllinie. Diese Erkennungssequenz befindet sich direkt 3' nach dem Start-Codon innerhalb der kodierenden Sequenz für ein Fusionsprotein aus β -Galactosidase und einem Protein, das die Zeocin-Resistenz bewirkt. Zellen des Flp-InTMT-RexTM-Systems zeigen mit diesem Konstrukt β -Galactosidase-Aktivität und sind resistent gegenüber dem Antibiotikum Zeocin. Die gewünschte Sequenz, hier YopO, kann nun in den pcDNA5/FRT/TO-Vektor (Abbildung V-11A) kloniert werden, der eine FRT-Sequenz enthält. Gemeinsam mit dem Plasmid, das für die Rekombinase kodiert (pOG44, Abbildung V-11B), werden die Flp-InTMT-RexTM-293 Zellen mittels Turbofect transfiziert.

In den Zellen, die mit beiden Plasmiden transfiziert wurden, erkennt die Flp-Rekombinase die FRT-Sequenzen im Genom und auf dem Plasmid und katalysiert zwischen diesen Stellen den DNA-Doppelstrangaustausch (Abbildung V-11E). Dadurch befindet sich die auf dem pcDNA5/FRT/TO kodierte Hygromycin-Resistenz nun stromabwärts vom SV40-Promotor. Das Start-Codon, das sich dort vorher befand, bildet nun den Beginn des Leserahmens der Hygromycin-Resistenz. Die aus CMV-Promotor mit zwei Tetracyclin-Operons und YopO bestehende Expressionskassette ist nun stromaufwärts des Fusionskonstruktes aus *lacZ* und Zeocin im Genom integriert. Dieses Gen kann jetzt jedoch nicht mehr transkribiert werden, da durch die Integration SV40-Promotor und Translationsbeginn entfernt wurden. Diese Rekombination bewirkt, dass die Flp-InTMT-RexTM-293 Zellen resistent gegen Hygromycin und nun empfindlich gegenüber Zeocin sind und das gewünschte Protein tetracyclinabhängig exprimieren (Abbildung V-11F).

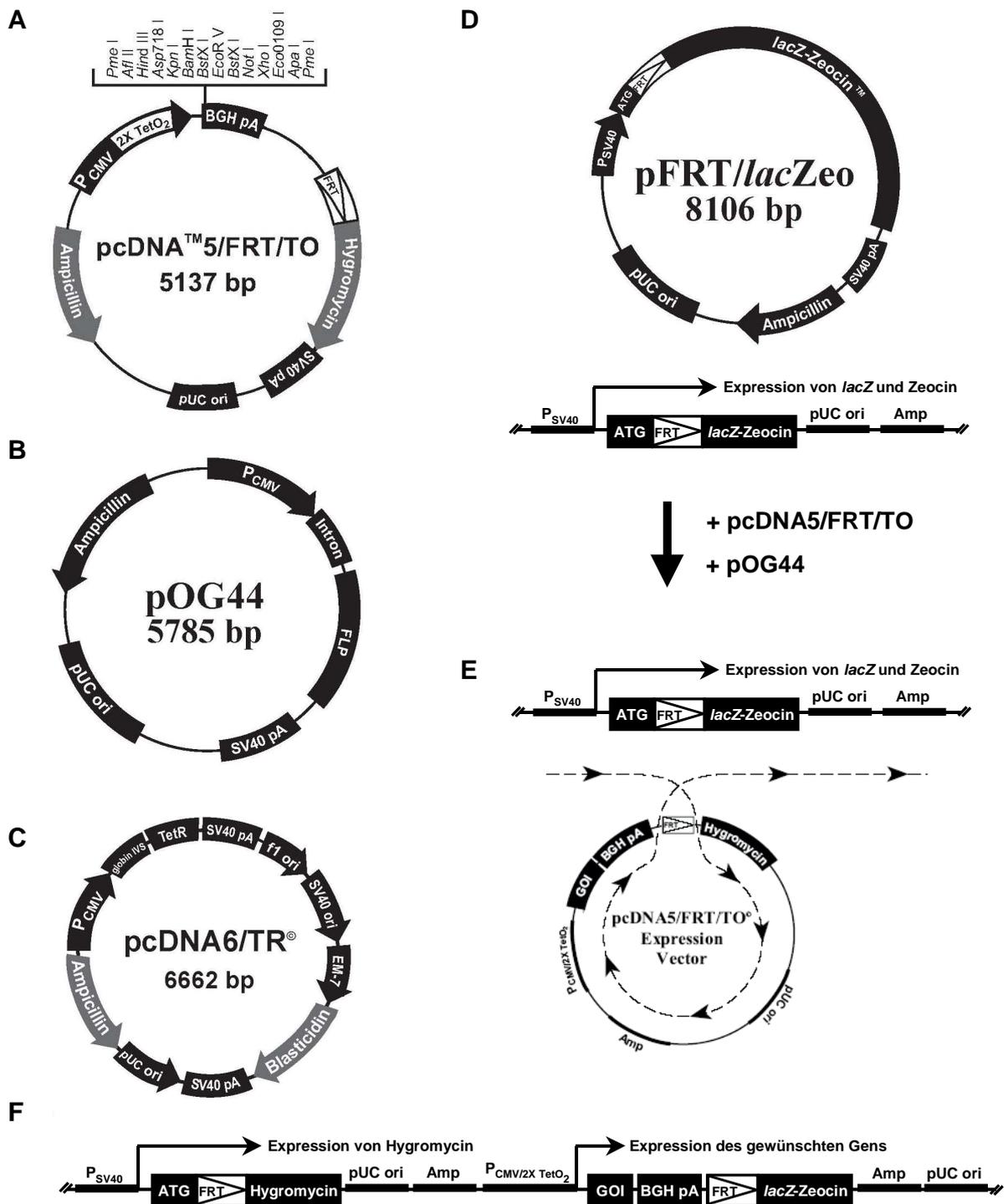


Abbildung V-11 Das FLP-In™T-Rex™-System

A: Karte des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA5/FRT/TO; **B:** Vektorkarte des die FLP-Rekombinase kodierenden Plasmids, **C:** Karte des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA6/TR, **D:** in eine FLP-In™T-Rex™-Zelllinie ist das Plasmid pFRT-lacZeo mit der FRT-Sequenz stabil ins Genom integriert; **E:** schematische Darstellung des durch die FLP-Rekombinase katalysierten DNA-Doppelstrang-Austausches; **F:** das stabil ins Genom integrierte Konstrukt nach erfolgreicher homologer Rekombination; FRT: *Flp Recombination Target* (Flp-Erkennungssequenz); GOI: gewünschtes Insert, hier YopO; Die Abbildungen sind mit Modifikationen dem Handbuch des FLP-In™T-Rex™-Systems entnommen.

Dabei bildet, wie in Abbildung V-12 schematisch dargestellt, der auf dem pCDNA6/TR exprimierte Tetracyclin-Repressor in Abwesenheit von Tetracyclin ein Homodimer, das mit einer extrem hohen Affinität an die Tetracyclin-Operons im CMV-Promotor des pCDNA5/FRT/TO Vektors bindet. Dadurch wird die Transkription der gewünschten Sequenz unterdrückt und das Protein nicht exprimiert. Die Zugabe von Tetracyclin bewirkt nun die Bindung von Tetracyclin mit einer hohen Affinität an die Homodimere des Tetracyclin-Repressors und damit eine Konformationsänderung im Repressor. Aufgrund dieser Konformationsänderung ist es dem Tetracyclin-Repressor nicht mehr möglich, das Tetracyclin-Operon zu binden und die Transkription der gewünschten Sequenz wird induziert.

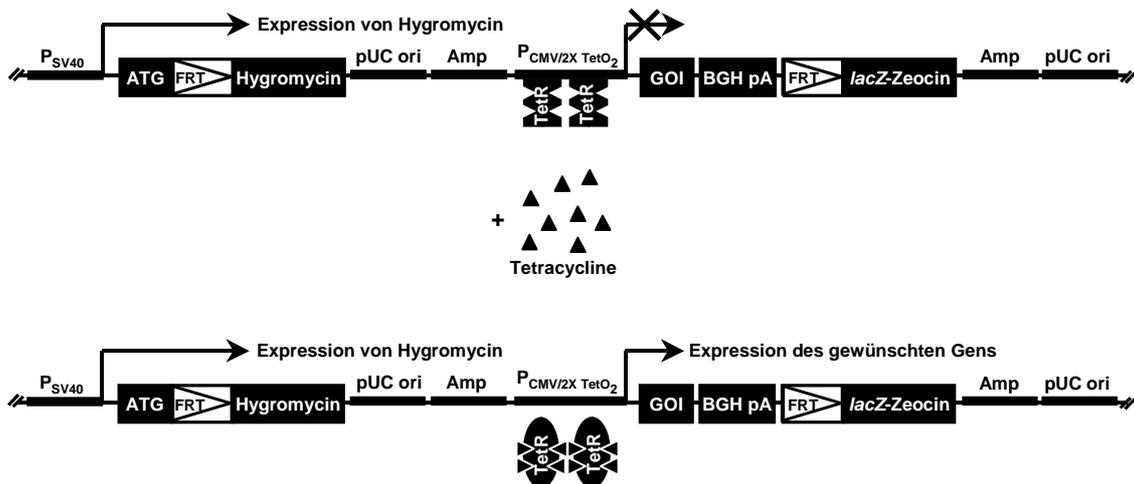


Abbildung V-12 **Mechanismus der Repression und Derepression im Flp-In™ T-REx™ System**

Das Konstrukt wird nach erfolgreicher homologer Rekombination stabil im Genom integriert, wobei die Expression des gewünschten Gens (GOI), hier YopO, nur nach Zugabe von Tetracyclin erfolgt. TetR, Tetracyclin-Repressor, Die Abbildungen sind mit Modifikationen dem Handbuch des Flp-In™ T-REx™ Systems entnommen.

Nach Transfektion und Selektion der Flp-In™ T-Rex™-293 Zellen wurden mehrere resistente Klone identifiziert, isoliert und hinsichtlich ihrer tetracyclinabhängigen Expression von YopO untersucht. Dazu wurden die Zellen für 24 Stunden mit Doxycyclin, welches Tetracyclin sehr ähnlich ist, aber eine längere Halbwertszeit besitzt, behandelt. Die erhaltenen Zelllysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und YopO konnte im *Western Blot* detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass alle Zellklone YopO nach Zugabe von Tetracyclin in etwa gleicher Menge exprimieren

(Abbildung V-13). Aber auch ohne Zugabe von Tetracyclin konnte die Expression geringer Mengen an YopO festgestellt werden.

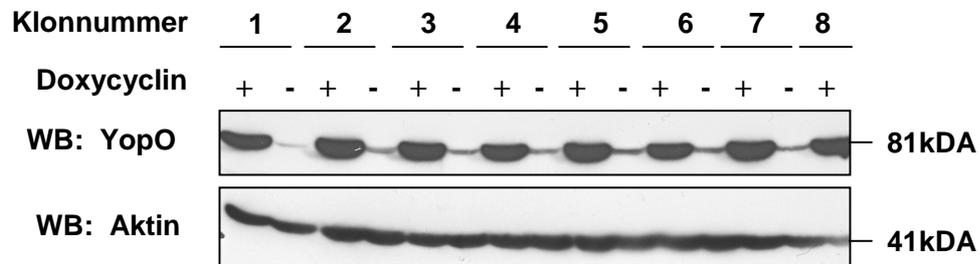


Abbildung V-13 **YopO-Expression in verschiedenen Klonen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Doxycyclin**

Verschiedene Klone von Flp-InTMT-RexTM-293-YopO-Zellen wurde 24 h mit 1 µg/ml Doxycyclin behandelt, anschließend lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von YopO erfolgte mittels *Western Blot*.

Eine Ursache dafür könnte im Serum, das für das Wachstumsmedium benötigt wird, enthaltenes Tetracyclin sein, das für die Induktion der YopO-Expression ausreichend ist. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Zellen des Klons 2, der für alle folgenden Versuche verwendet wurde, einmal in Medium mit normalem Serum bzw. mit Tetracyclin-reduziertem Serum kultiviert. Diese wurden dann mit verschiedenen Konzentrationen an Doxycyclin für 24 Stunden behandelt und anschließend lysiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Im *Western Blot* wurde sichtbar, dass auch die Zellen, die in Tetracyclin-reduziertem Medium kultiviert wurden, eine basale Expression von YopO aufweisen (Abbildung V-14). Dabei konnte kein quantitativer Unterschied zu den Zellen, die in Medium mit nicht-reduziertem Serum kultiviert wurden, festgestellt werden, so dass im Serum vorhandenes Tetracyclin als Ursache für die basale YopO-Expression ausgeschlossen werden konnte. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass die Expression von YopO bei einer Doxycyclin-Konzentration zwischen 1 µg/ml und 10 ng/ml am größten ist und ab einer Konzentration von 1 ng/ml sehr viel geringer ausfällt. Für die folgenden Versuche wurde daher immer eine Doxycyclin-Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt, um eine gleichbleibende maximale Expression von YopO zu gewährleisten.

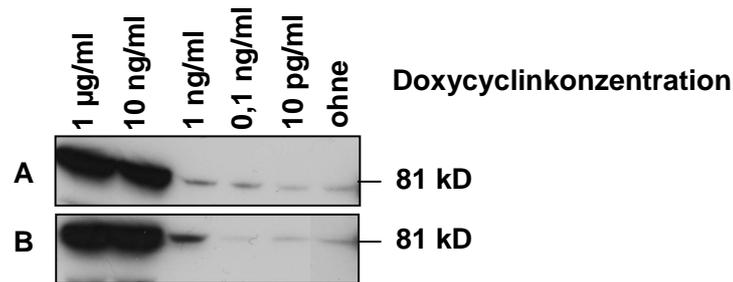


Abbildung V-14 **Die Expression von YopO in Abhängigkeit verschiedener Doxycyclinkonzentration**

Die Zellen wurden einmal in DMEM mit 10 % Tetracyclin-reduziertem FBS (A) bzw. in DMEM mit 10 % FBS Medium (B) kultiviert und für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an Doxycyclin behandelt. Anschließend wurden sie lysiert, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und YopO im Western Blot detektiert.

Zur Bestimmung der Stimulationsdauer mit Doxycyclin, die für eine maximale YopO-Expression nötig ist, wurden die Zellen für verschieden Zeiträume mit 100 ng/ml Doxycyclin behandelt, anschließend lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die im *Western Blot* detektierte YopO-Expression (Abbildung V-15) zeigt, neben der basalen YopO-Expression bei 0 h, bereits nach 2 h eine stärkere YopO-Bande, deren Intensität mit wachsender Stimulationsdauer anstieg und zwischen 10 und 14 Stunden Doxycyclin-Stimulation ihr Maximum erreichte. Eine längere Stimulation der Zellen mit Doxycyclin hatte keinen Einfluss mehr auf die quantitative Ausbeute der YopO-Expression. So wurde für alle weiteren Versuche eine Stimulationsdauer von mindestens 14 h eingehalten.

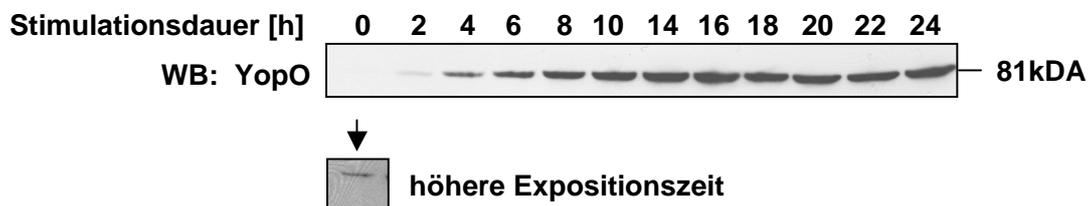


Abbildung V-15 **YopO-Expression in Abhängigkeit der Stimulationsdauer mit Doxycyclin**
Flp-InTMT-RexTM-293-YopO-Zellen wurde für verschiedene Zeiträume mit 100 ng/ml Doxycyclin behandelt, anschließend lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von YopO erfolgte mittels *Western Blot*.

Die YopO-Expression unter den oben getesteten Bedingungen wurde auch mittels der Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Dazu wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät und nach 24 h mit 100 ng/ml Doxycyclin für eine Mindestdauer von 14 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und YopO mittels eines anti-YopO-Antikörpers detektiert. Die mikroskopischen Bilder (Abbildung V-16) zeigen, dass nach der Induktion der YopO-Expression mittels Doxycyclin YopO in diesen Zellen in variierender Quantität detektierbar ist. Demnach exprimieren nicht alle Zellen YopO in gleichen Mengen und bei manchen Zellen ist gar kein YopO detektierbar. Die Zellen, die nicht mit Doxycyclin behandelt wurden, zeigten keine detektierbare YopO-Expression.

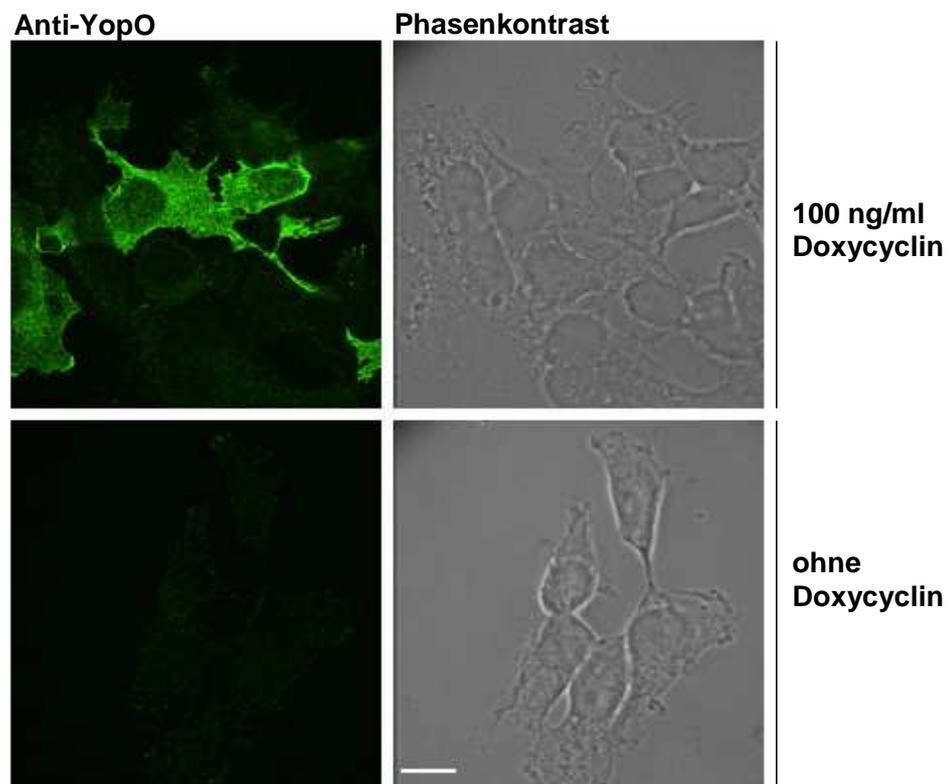


Abbildung V-16 YopO-Expression detektiert mittels Immunfluoreszenzfärbung
Flp-InTMT-RexTM-293-YopO-Zellen wurden für 14 h mit 100 ng/ml Doxycyclin behandelt und anschließend fixiert. Die Detektion von YopO exprimierenden Zellen erfolgte mit Hilfe eines anti-YopO-Antikörpers in der Immunfluoreszenzfärbung. Der Referenzbalken entspricht 2,5 μ m.

2.3 Der zytosolische Ca^{2+} -Einstrom aus dem ER ist durch YopO vermindert

In den folgenden Versuchen sollte der Einfluss von YopO auf intrazelluläre Ca^{2+} -Signale untersucht werden. Es ist bereits beschrieben, dass YpkA (das YopO-Pendant in *Yersinia pseudotuberculosis*) durch die Phosphorylierung von $\text{G}\alpha\text{q}$ in die damit verbundenen Signalwege eingreift (Navarro et al. 2007). Die Phosphorylierung am Ser47 des $\text{G}\alpha\text{q}$ verhindert die Bindung von GTP und damit die Aktivierung der $\text{G}\alpha\text{q}$ -vermittelten Signaltransduktionswege. Davon ist auch die Aktivierung der Phospholipase C betroffen. Diese katalysiert die Hydrolyse von PIP_2 zu IP_3 und DAG, wobei IP_3 als sekundärer Botenstoff wirkt, den IP_3 -gesteuerten Ca^{2+} -Kanal am endoplasmatischen Retikulum (ER) bindet und damit den Ausstrom von Ca^{2+} in das Zytosol ermöglicht. Ein Einfluss von YopO auf den zytosolischen Ca^{2+} -Einstrom scheint damit möglich und sollte hier untersucht werden.

Flp-InTMT-RexTM-293-YopO-Zellen wurden mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff Fura-2/AM beladen und die Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration erfolgte ratiometrisch über die Messung der Emissionsintensitäten bei einer Wellenlänge von 495 nm nach wechselnder Anregung bei einer Wellenlänge von 340 nm und 380 nm. Zu einem gegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen durch die Zugabe von ATP stimuliert und das Ca^{2+} -Signal aufgezeichnet. Im Anschluss konnte die Ca^{2+} -Konzentration durch Kalibrierung mit Triton X-100 und EGTA/Tris errechnet werden.

Für die Untersuchungen wurde die Flp-InTMT-REXTM-293 Zelllinie von Invitrogen herangezogen, die tetracyclinabhängig YopO exprimiert (Flp-InTMT-REXTM-293-YopO). Zunächst sind diese Zellen nach Inkubation mit bzw. ohne Doxycyclin hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -Signale nach ATP-Stimulation untersucht worden. ATP ist dabei ein Agonist für den G-Protein gekoppelten Purinrezeptor P2Y. Dieser aktiviert nach der ATP-Bindung $\text{G}\alpha\text{q}$ -vermittelt die Phospholipase C. Somit kann nach ATP-Stimulation der Einfluss von YopO auf die $\text{G}\alpha\text{q}$ -vermittelten Ca^{2+} -Signale beobachtet werden.

Die Abbildung V-17 zeigt einen Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration nach ATP-Applikation. Die Größe des Anstiegs war dabei unabhängig von der Inkubation der Zellen mit Doxycyclin und damit unabhängig von der Induktion der YopO-Expression. Allerdings konnte in Vorarbeiten zur Charakterisierung der Flp-InTMT-REXTM-293-YopO-Zellen gezeigt werden, dass auch ohne Tetracyclin in diesen Zellen kleine Mengen an YopO exprimiert werden (Abbildung

V-13/14). Diese Mengen an YopO könnten durchaus ausreichend sein, um einen Effekt auf die intrazellulären Ca^{2+} -Signale auszuüben, der auch durch eine größere Expression von YopO nach Zugabe von Tetracyclin nicht mehr zu steigern ist.

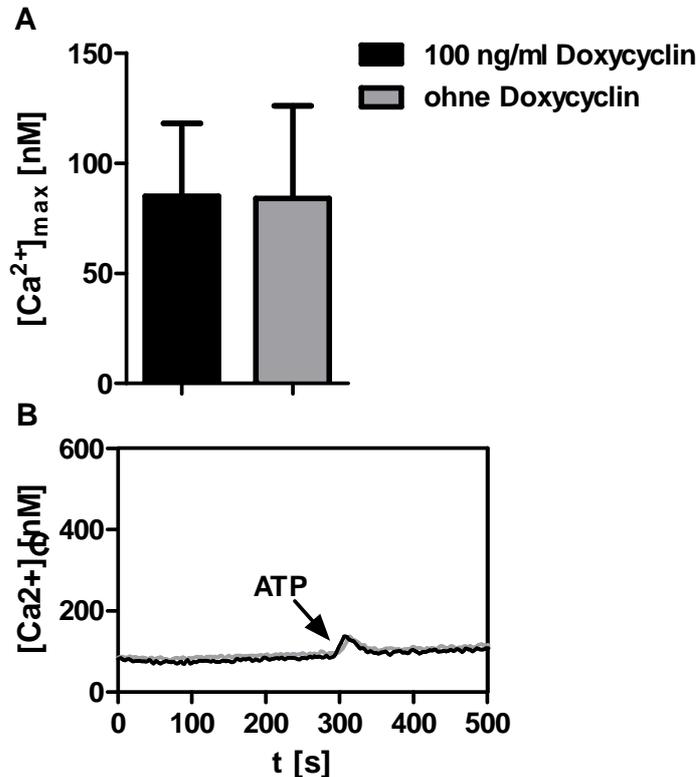


Abbildung V-17 Die Induktion der YopO-Expression hat keinen Effekt auf den zytosolischen Ca^{2+} -Einstrom.

A zeigt die Maximalwerte der Ca^{2+} -Konzentrationen nach Abzug der Basislinie mit und ohne Doxycyclinzugabe nach Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ ATP. Dabei ist kein Unterschied in der Größe des Ca^{2+} -Signals sichtbar. B: Exemplarisch wird der Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration von Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Zellen mit (schwarz) und ohne (grau) Doxycyclinzugabe (100 ng/ml) über die Zeit gezeigt. Nach 300 s wurden $100 \mu\text{M}$ ATP appliziert, was zu einem gleich großen Anstieg des Ca^{2+} -Signals bei beiden Ansätzen geführt hat.

Die Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Zellen sind unter Bedingungen mit Doxycyclin-Stimulation auch im Vergleich zu ihren Ausgangszellen (Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen) bzw. im Vergleich zu Zellen, die tetracyclinabhängig GFP exprimieren (Flp-InTMT-RExTM-293-GFP-Zellen), hinsichtlich zytosolischer Ca^{2+} -Änderungen nach ATP-Stimulation untersucht worden. Im Vergleich zu den GFP-exprimierenden Zellen (Abbildung V-18) zeigen die YopO-exprimierenden Zellen nach Doxycyclingabe ein um ca. 80 nM geringeres Ca^{2+} -Signal.

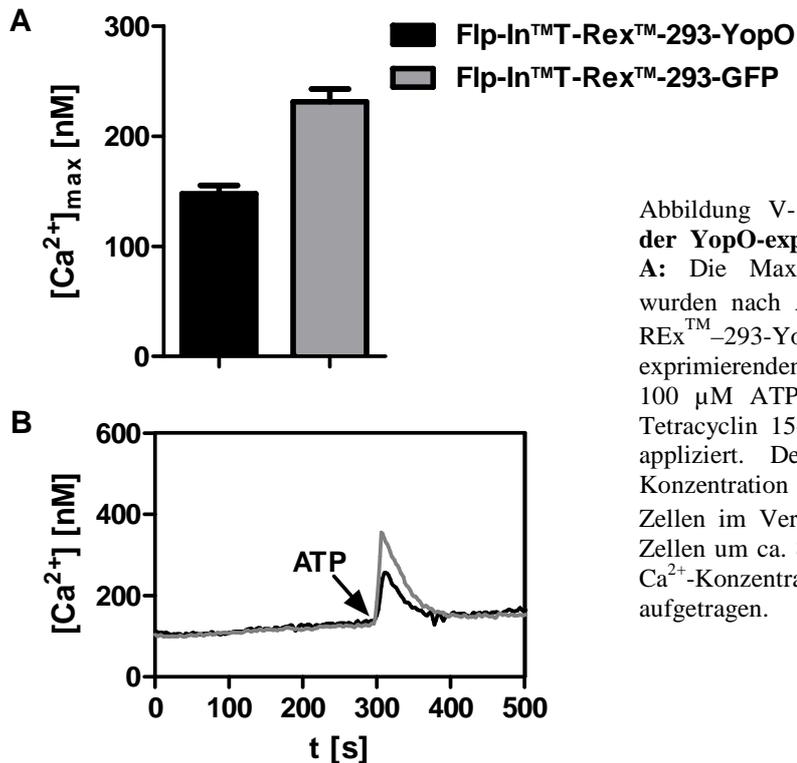


Abbildung V-18 **Der zytosolische Ca²⁺-Einstrom der YopO-exprimierenden Zellen ist vermindert.** **A:** Die Maximalwerte der Ca²⁺-Konzentrationen wurden nach Abzug der Basislinie von Flp-InTM-T-RexTM-293-YopO-Zellen (schwarz) und GFP-exprimierenden Zellen (grau) nach Stimulation mit 100 μ M ATP bestimmt. Beiden Zelllinien wurde Tetracyclin 15-17h vor dem Experiment (100ng/ml) appliziert. Der zytosolische Anstieg der Ca²⁺-Konzentration ist bei den YopO-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Flp-InTM-T-RexTM-293-Zellen um ca. 80 nM vermindert. **B:** Der Verlauf der Ca²⁺-Konzentrationen über die Zeit wurde aufgetragen.

Auch im Vergleich zu den Flp-InTM-T-RexTM-293-Zellen fällt der intrazelluläre Ca²⁺-Einstrom der YopO-exprimierenden Zellen weniger stark aus (Abbildung V-19).

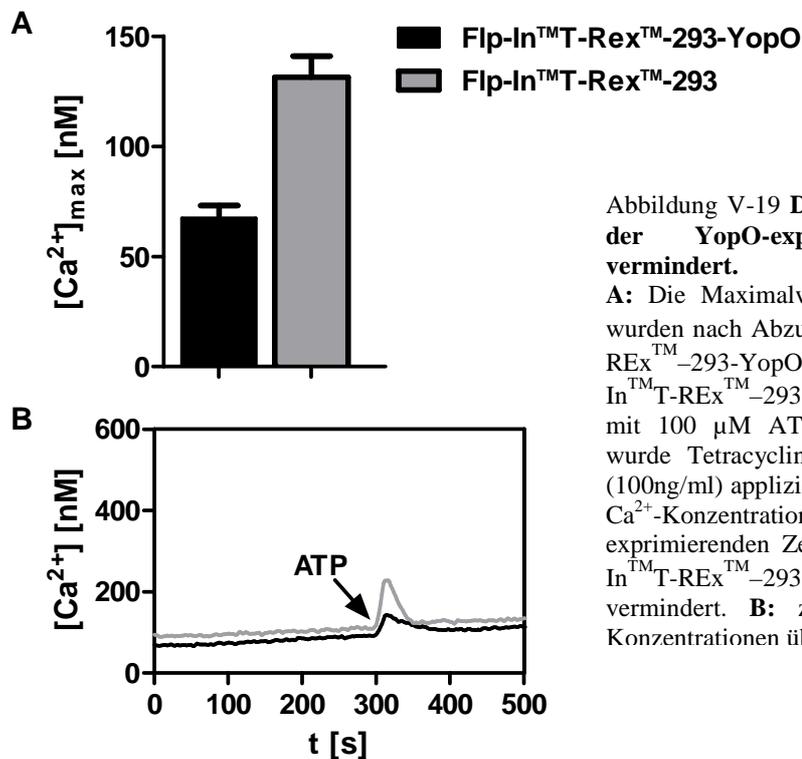


Abbildung V-19 **Der zytosolische Ca²⁺-Einstrom der YopO-exprimierenden Zellen ist vermindert.**

A: Die Maximalwerte der Ca²⁺-Konzentrationen wurden nach Abzug der Basislinie von Flp-InTM-T-RexTM-293-YopO-Zellen (schwarz) und Flp-InTM-T-RexTM-293-Zellen (grau) nach Stimulation mit 100 μ M ATP bestimmt. Beiden Zelllinien wurde Tetracyclin 15-17h vor dem Experiment (100ng/ml) appliziert. Der zytosolische Anstieg der Ca²⁺-Konzentration ist bei den YopO-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Flp-InTM-T-RexTM-293-Zellen um ca. 65 nM vermindert. **B:** zeigt den Verlauf der Ca²⁺-Konzentrationen über die Zeit.

Die Unterschiede in der Größe der Ca^{2+} -Signale nach ATP-Stimulation sind in Abbildung V-20 noch einmal zusammenfassend dargestellt. Dabei ist erkennbar, dass der Einstrom des Ca^{2+} aus dem ER ins Cytosol nach ATP-Stimulation bei den YopO-exprimierenden Zellen gleich groß ist, unabhängig von der Zugabe von Doxycyclin. Im Vergleich zu den GFP-exprimierenden Kontrollzellen bzw. den Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen ist er jedoch deutlich vermindert.

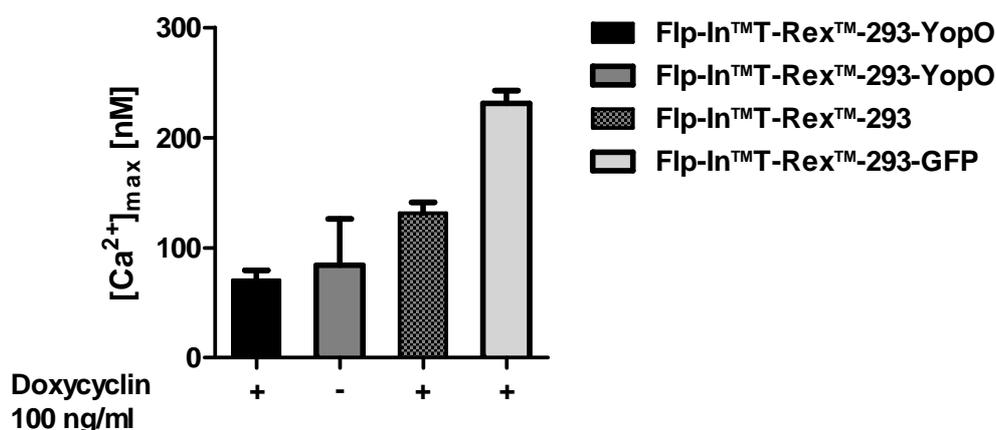


Abbildung V-20 Der zytosolische Ca^{2+} -Einstrom wird durch YopO inhibiert.

Es sind die Maximalwerte der Ca^{2+} -Konzentrationen nach Abzug der Basislinie von Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Zellen, Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen und Flp-InTMT-RExTM-293-GFP-Zellen nach Stimulation mit 100 μM ATP aufgezeigt. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ist bei den Flp-YO-Zellen mit oder ohne Doxycyclin, annähernd gleich. Im Vergleich zu den Flp-in-Zellen und den Flp-GFP-Zellen ist der Anstieg des Ca^{2+} -Signals jedoch deutlich vermindert.

Um klonale Unterschiede bei den Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Zellen auszuschließen, wurden auch andere isolierte Klone (Nr. 7,5,9,13,16) auf ihren zytosolischen Ca^{2+} -Einstrom nach ATP-Stimulation hin untersucht. Hier musste festgestellt werden, dass diese gar nicht auf ATP reagieren (Abbildung V-21/22).

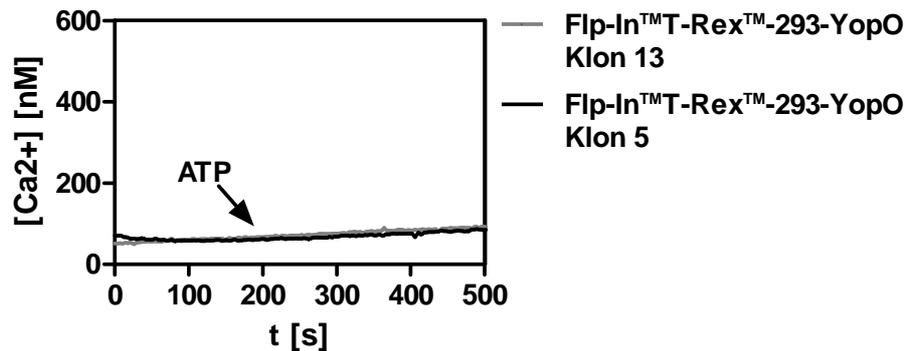


Abbildung V-21 Die Klone 5 und 13 der Flp-InTM-T-RExTM-293-YopO-Zellen reagieren nicht auf ATP-Stimulation.

Der Verlauf der Ca²⁺-Konzentrationen der Klone 5 und 13 der Flp-InTM-T-RExTM-293-YopO-Zellen über die Zeit wurde bestimmt, wobei nach 200 s die Applikation von 100 μ M ATP erfolgte.

Die Reaktion der Klone 7,9 und 16 auf Ionomycin als Ionophor (Abbildung V-22), welches die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration unspezifisch erhöht, zeigt Signale intakter Zellen, so dass eine Schädigung der Zellen während des Versuchablaufes weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

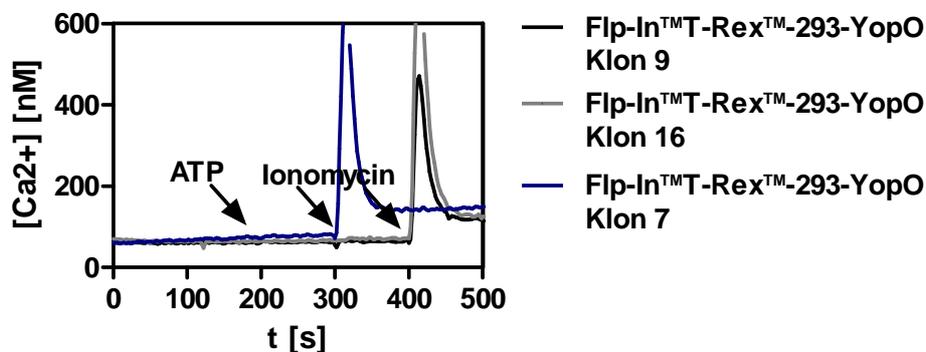


Abbildung V-22 Die Klone 7, 9 und 16 der Flp-InTM-T-RExTM-293-YopO-Zellen reagieren nicht auf ATP-, aber auf Ionomycin-Stimulation.

Der Verlauf der Ca²⁺-Konzentrationen der Klone 7, 9 und 16 der Flp-InTM-T-RExTM-293-YopO-Zellen über die Zeit wurde bestimmt, wobei nach 200 s die Applikation von 100 μ M ATP und nach 300 s bzw. 400 s die Zugabe von 1 μ M Ionomycin erfolgte.

Gleichzeitig wurden auch die äußeren Versuchsbedingungen noch einmal mit bereits getesteten Zellen (Flp-InTM-T-RExTM-293-YopO und Flp-InTM-T-RExTM-293) und Referenzzellen (HEK293-Zellen aus der Arbeitsgruppe Prof. Guse) kontrolliert (Abbildung V-23). Diese Zellen zeigen zytosolische Ca²⁺-Konzentrationen nach ATP-Stimulation, die denen aus vorangegangenen

Versuchen ähneln (Abbildung V-17/19), so dass methodische Fehler weitestgehend ausgeschlossen werden können.

Eine Erklärung für die fehlende Reaktion auf ATP ist das Fehlen des P2Y-Rezeptors auf der Zelloberfläche. Dies deutet auf Unterschiede zwischen den isolierten Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Klonen bezüglich ihrer Zelloberfläche hin. Der Vergleich zwischen den YopO-exprimierenden Zellen und den GFP-exprimierenden Zellen bzw. den Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen ist aufgrund dieser klonalen Unterschiede kritisch zu betrachten. Im Gegenzug zeigen die HEK293-Zellen und die Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen jedoch fast gleiche Ca²⁺-Signale nach ATP-Stimulation, obwohl hier auch gravierende Unterschiede in der Zelloberfläche bestehen müssen.

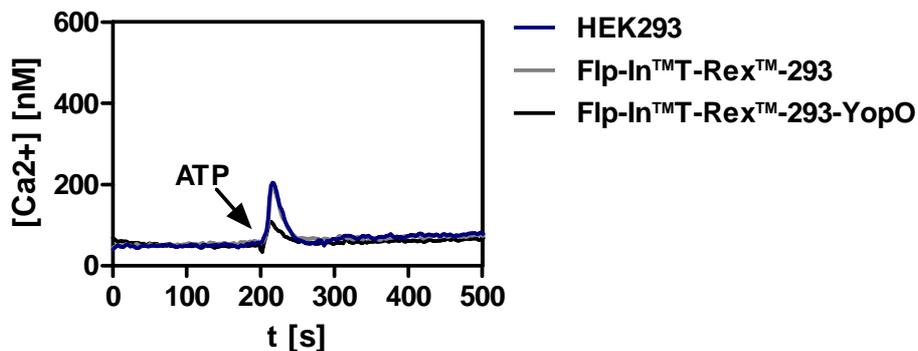


Abbildung V-23 **Inhibitorischer Einfluss von YopO auf den zytosolischen Ca²⁺-Einstrom**

Der Verlauf der Ca²⁺-Konzentrationen der HEK293-Zellen als Referenzzellen, Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen und YopO-exprimierender Zellen über die Zeit wurde bestimmt, wobei nach 200 s die Applikation von 100 µM ATP erfolgte.

Diese Unterschiede werden in Abbildung V-24 durch die Stimulation dieser Zelltypen mit Carbachol deutlich. Das Struktur analogon des Neurotransmitters Acetylcholin und Agonist des muskarinergischen Acetylcholinrezeptors M3 aktiviert auch das Enzym Phospholipase C über Gαq und führt damit zu einem vermehrten Ca²⁺-Einstrom ins Cytosol. Dabei reagieren die Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen und die YopO-exprimierenden Zellen im Gegensatz zu den HEK293-Zellen gar nicht auf Carbachol, was auf ein Fehlen des Rezeptors auf der Oberfläche hindeutet.

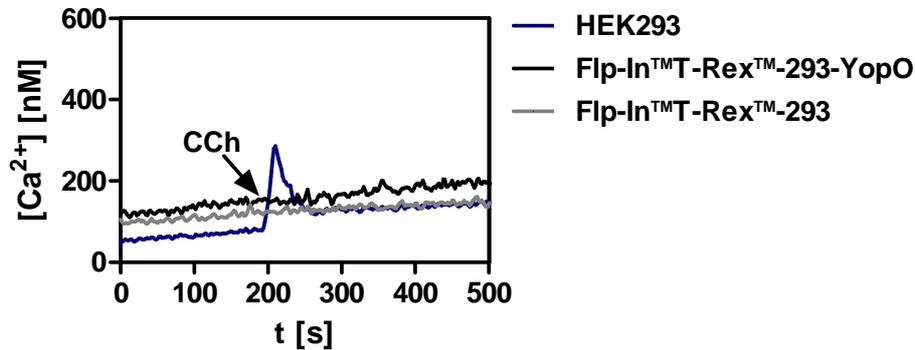


Abbildung V-24 **Der zytosolische Ca²⁺-Einstrom kann in den Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen nicht durch Carbachol induziert werden.**

Der Verlauf der Ca²⁺-Konzentrationen der Klone 7, 9 und 16 der Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Zellen über die Zeit wurde bestimmt, wobei nach 200 s die Applikation von 100 µM ATP und nach 300 s bzw. 400 s die Zugabe von 1 µM Ionomycin erfolgte.

Trotz dieser offensichtlichen, die Zelloberfläche betreffenden Unterschiede zeigen die HEK293-Zellen und die Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen jedoch einen ähnlich großen zytosolischen Anstieg der Ca²⁺-Konzentration nach der Stimulation mit ATP. Im Vergleich zu diesen Zellen weisen die YopO-exprimierenden Zellen ein um ca. 100 nM vermindertes Ca²⁺-Signal auf. Damit ist ein weiterer Hinweis auf die inhibierende Wirkung von YopO auf den zytosolischen Ca²⁺-Einstrom gegeben.

Zusammenfassend lässt sich ein inhibitorischer Einfluss des Effektorproteins YopO auf den Ausstrom von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol feststellen, der mit der bereits publizierten Inaktivierung des Gαq begründbar ist. Allerdings müssen diese Beobachtungen mit weiterführenden Experimenten bestätigt werden, da Sekundäreffekte nicht ausgeschlossen werden können.

2.4 YopO vermindert die NFκB-Aktivierung

Der Transkriptionsfaktor NFκB ist die Voraussetzung für die Expression einer großen Anzahl an Genen, die für die Induktion der angeborenen Immunantwort essentiell sind. Die Inhibition der NFκB-Aktivierung, die in einer supprimierten Zytokinproduktion und in der Induktion von Apoptose in Makrophagen resultiert, konnte bereits für die Acetyltransferase YopP aus *Y. enterocolitica* gezeigt werden (Mills et al. 1997; Monack et al. 1997; Ruckdeschel et al. 1997;

Ruckdeschel et al. 1998; Denecker et al. 2002). Mit Hilfe eines Luciferase-Reporter-Systems sollte geklärt werden, ob auch YopO einen Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors hat und damit die Wirtszelle in ihrer Reaktion auf eine Yersinien-Infektion beeinträchtigt.

Dazu wurden zunächst Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Zellen mit dem NFκB-Luciferase-Reporterplasmid (NFκB-LUC) und dem Renilla-Luciferase-kodierenden Plasmid transfiziert und in serumfreiem Medium für 24 h kultiviert. Dann erfolgte zum einen je nach Ansatz die Induktion der YopO-Expression durch die Zugabe von Doxycyclin und zum anderen die Stimulation der NFκB-Aktivierung durch die Zugabe von TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate). Dieser Phorbolster induziert durch seine strukturelle Ähnlichkeit zum sekundären Botenstoff (*second messenger*) Diacylglycerol (DAG) die Aktivierung die Proteinkinase C (PKC) und führt zu einer Transaktivierung des EGFR (*endothelial growth factor receptor*) (Prenzel et al. 1999). Die Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors wiederum resultiert in der NFκB-Aktivierung (Obata et al. 1996; Sun and Carpenter 1998; Biswas et al. 2000).

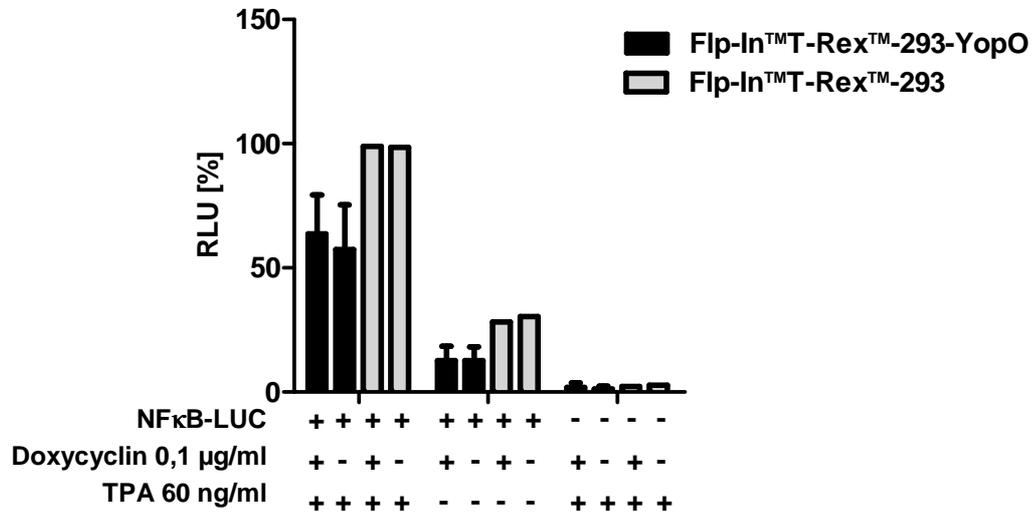


Abbildung V-25 **Die NFκB-Aktivierung wird durch die Expression von YopO vermindert.** Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Zellen und Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen wurden je nach Ansatz mit dem NFκB-Luciferase-Reporterplasmid und dem Renilla-Luciferase-kodierenden Plasmid transfiziert und nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium für 16 h mit TPA (60 ng/ml) und Doxycyclin (0,1 µg/ml) behandelt. Die Lumineszenz der *Firefly*-Luciferase in Abhängigkeit der NFκB-Aktivierung wurde detektiert mittels der *Renilla*-Luciferase normalisiert. Die RLU (*relative light units*) wurden dabei als Prozentsatz der für die Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen nach Doxycyclin- und TPA-Behandlung detektierten und normalisierten Luciferase-Lumineszenz angegeben.

Die Lumineszenz der *Firefly*-Luciferase wurde detektiert und auf die der *Renilla*-Luciferase, die hierbei als interner Standard dient, bezogen. Hier konnte kein Unterschied hinsichtlich der NFκB-Aktivierung zwischen Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Zellen, bei denen die YopO-Expression mit Doxycyclin induziert wurde und denen die nicht mit Doxycyclin behandelt wurden, festgestellt werden (Abbildung V-25).

Da geringe Mengen an YopO sicher ausreichend für einen Effekt auf die NFκB-Aktivierung sind, ist auch hier die Basalexpression von YopO, unabhängig von der Doxycyclin-Zugabe, als Ursache in Betracht zu ziehen. Verglichen mit der NFκB-Aktivierung durch die Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen ist die der YopO-exprimierenden Zellen um ca. 40 % vermindert. Diese Inhibition der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB scheint dabei unabhängig von der vorherigen Aktivierung durch TPA zu sein. Die Signalintensität ohne die TPA-induzierte NFκB-Aktivierung ist zwar wie erwartet geringer (ca. 30%), aber der relative Unterschied zwischen den YopO-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen blieb mit -40 % ungefähr gleich.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden auch HEK293T-Zellen, die mit GFP-YopO-Konstrukten transfiziert wurden, hinsichtlich ihrer Aktivierung von NFκB untersucht.

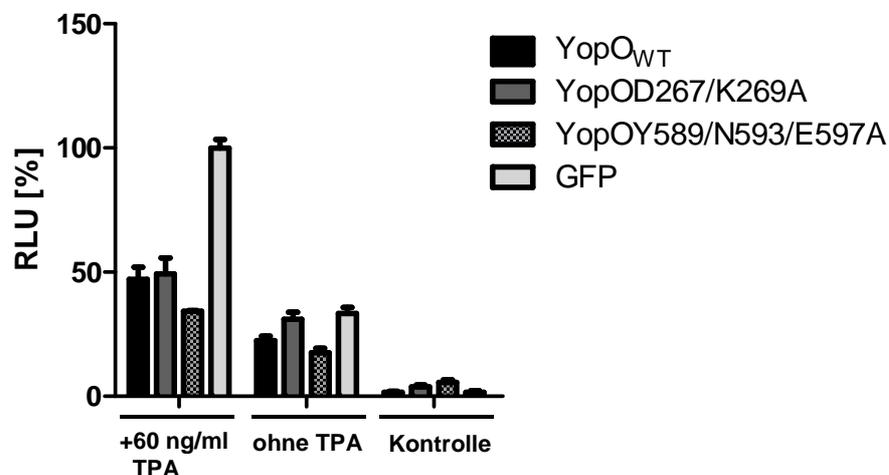


Abbildung V-26 **Die NFκB-Aktivierung wird durch die Expression von YopO vermindert.** HEK293T-Zellen wurden je nach Ansatz mit verschiedenen GFP-YopO-Konstrukten bzw. dem GFP-Leervektor, dem NFκB-Luciferase-Reporterplasmid und dem Renilla-Luciferase-kodierenden Plasmid transfiziert und nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium für 16 h mit TPA (60 ng/ml) in (0,1 µg/ml) behandelt. Die Zellen der Kontrolle wurden nicht mit dem Luciferase-Reporter-Plasmid transfiziert. Die Lumineszenz der *Firefly*-Luciferase in Abhängigkeit der NFκB-Aktivierung wurde detektiert und mittels der *Renilla*-Luciferase normalisiert. Die RLU (*relative light units*) wurden dabei als Prozentsatz der für die GFP-exprimierenden Zellen nach TPA-Behandlung detektierten und normalisierten Luciferase-Lumineszenz angegeben.

Zusätzlich zum Wildtyp-YopO wurden auch eine Mutante, deren Fähigkeit zur Bindung von Rho-GTPasen zerstört worden war (GFP-YopOY589/N593/E597A), und eine Kinase-inaktive Mutante (GFP-YopOD267/K269A) im Luciferase-Experiment analysiert. Auch in diesem Versuch konnte eine um ca. 50 % verminderte NFκB-Aktivierung der YopO-exprimierenden Zellen nach TPA-Behandlung beobachtet werden (Abbildung V-26). Dabei wurde allerdings kein Unterschied zwischen dem Wildtyp-YopO und der Kinase-inaktiven Mutante festgestellt. GFP-YopOY589/N593/E597A zeigte eine leicht verminderte Aktivierung von NFκB. Ohne die vorherige Zugabe von TPA fällt die Inhibition der NFκB-Aktivierung der YopO-exprimierenden Zellen nicht ganz so stark aus. Das Wildtyp-YopO und GFP-YopOY589/N593/E597A vermindern die NFκB-Aktivierung im Vergleich zu den GFP-exprimierenden Zellen um etwa 10 bzw. 15 %. Die Kinase-inaktive YopO-Mutante (YopOD267/K269A) zeigt verglichen mit den GFP-exprimierenden Zellen keinen Unterschied.

Zusammenfassend lässt sich ein inhibitorischer Effekt des YopO auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB feststellen. Dabei scheint weder die Kinase-Aktivität noch die Bindung an Rho-GTPasen für diesen Effekt verantwortlich zu sein. Inwiefern die vorherige Stimulation der Zellen mit TPA eine Rolle spielt, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

VI. DISKUSSION

1. Die Interaktion der Kinase YopO mit CIB1

Yersinien sind in der Lage der Phagozytose durch Makrophagen zu entgehen, indem sie Effektorproteine in die Zellen injizieren, die aktiv die Phagozytose und damit die Immunantwort des Wirtes blockieren. YopO gehört neben YopH, YopE und YopT zu der Gruppe von Effektorproteinen, die das Aktinzytoskelett der Wirtszellen manipulieren und so die Aufnahme der Bakterien verhindern (Grosdent et al. 2002; Wiley et al. 2006; Trasak et al. 2007). Die Manipulation des Aktinzytoskeletts kann dabei auf die synergistische Zusammenarbeit mehrerer Domänen des YopO zurückgeführt werden. Sowohl die Kinase-Domäne als auch die GDI-ähnliche Domäne sind für diese Prozesse notwendig (Hakansson et al. 1996; Dukuzumuremyi et al. 2000; Juris et al. 2000). Inwiefern diese Domänen im Einzelnen zur Manipulation des Aktinzytoskeletts beitragen ist noch nicht verstanden. Die bisher identifizierten *in vitro* Substrate der Kinase-Domäne, wie Otubain-1 (Juris et al. 2006), konnten keinen hinreichenden Zusammenhang zu den beobachteten Effekten herstellen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass CIB1 durch die Kinase YopO *in vitro* an den Serinen -185 und -186 phosphoryliert wird (vgl. Kapitel V-1.1, Abb. V-1, V-2). Diese Phosphorylierung ließ sich *in vivo* nicht zeigen. Ein Grund dafür könnte sein, dass CIB1 von anderen Kinasen phosphoryliert wird, wie in den Abbildungen V-3 und V-4 in Kapitel V-1.2 gezeigt wird. So wurden Konsensus-Sequenzen für die Phosphorylierung durch die Protein-Kinase C (PKC) und die Kasein-Kinase II in der Sequenz des CIB1-Proteins gefunden (Naik et al. 1997). Eine der möglichen Phosphorylierungsstellen der Protein-Kinase C ist das Serin -185, welches *in vitro* auch von YopO phosphoryliert wird. So könnte die Phosphorylierung von CIB1 durch YopO an diesem Serin die sonst stattfindende Phosphorylierung durch die Protein-Kinase C verhindern und CIB1 so einer möglichen Regulation durch die Protein-Kinase C entziehen. Da es dabei zu keiner Veränderung in der Anzahl der Phosphatreste im CIB-Molekül kommt, ist dies in den durchgeführten Experimenten so nicht sichtbar und müsste durch den Einsatz von PKC-Inhibitoren bestätigt werden.

Die Interaktion der beiden Proteine konnte in Koimmunpräzipitationsversuchen bestätigt werden (vgl. Kapitel V-1.2, Abb. V-3). Dabei zeigte sich auch, dass diese Interaktion an der

Plasmamembran der Zelle und damit in einem Kompartiment der Zelle stattfindet, welches bei der Yersinien-Infektion und speziell bei der Aufnahme der Bakterien durch Makrophagen eine wichtige Rolle spielt (vgl. Kapitel V-1.3, Abb.V-6,7). Hier adhären die Bakterien an die Wirtszelle und injizieren die Effektorproteine, die unter anderem die Reorganisation des Aktinzytoskeletts behindern und damit Bedingungen schaffen, unter denen keine Phagozytose stattfinden kann.

CIB1 interagiert mit einer Reihe von bekannten Regulatoren des Aktinzytoskeletts, wie Rac3, PAK1 (p21-aktivierte Kinase 1) und WASp (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein), und moduliert deren Aktivität (Haataja et al. 2002; Leisner et al. 2005; Tsuboi et al. 2006). Damit scheint CIB1 neben der Regulierung der Integrinaktivität in Thrombozyten auch eine wichtige Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts und den damit verbundenen Prozessen wie Phagozytose und Migration zu spielen. YopO erhält über die Interaktion mit CIB1 eine Möglichkeit zur Modulation dieser Prozesse. Dazu müsste die Interaktion mit YopO auch einen funktionellen Einfluss auf CIB1 haben. Eine wichtige Aufgabe von CIB1 ist die Regulierung der Aktivität des Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ in Thrombozyten, welches als Fibrinogenrezeptor fungiert und damit für die Migration und die Ausbreitung der Thrombozyten auf extrazellulärer Matrix verantwortlich ist (Shattil et al. 1998; Parise 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression von CIB1 in CHO-Zellen die Ausbildung von fokalen Adhäsionen und damit das *Spreading* der Zellen auf einer Matrix aus Fibronectin positiv beeinflusst und zur Induktion von Migration führt. Verantwortlich dafür ist die Assoziation von CIB1 mit der FAK (*focal adhesion kinase*) und der damit verbundenen Aktivierung dieser (Naik and Naik 2003). Dabei ist die Interaktion von CIB1 und der FAK in Thrombozyten zum einen abhängig von der gleichzeitigen Assoziation von CIB1 mit dem Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ und zum anderen von der Bindung des Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Liganden Fibrinogen und dem damit aktivierten *outside-in*-Signalweg (Naik and Naik 2003). Zur Untersuchung eines Effektes von YopO auf CIB1 und damit möglicherweise auf das *Spreading* und die Migration von Zellen wurden CHO-A5-Zellen, die ektopisch das Thrombozyten Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ exprimieren und sich gleichzeitig im Gegensatz zu Thrombozyten vergleichsweise einfach genetisch manipulieren lassen, herangezogen. Der positive Einfluss von überexprimiertem CIB1 auf das *Spreading* der Zellen konnte in dem hier verwendetem Zellsystem auf einer Fibrinogen-Matrix allerdings nicht beobachtet werden (vgl. Kapitel 2.1, Abb. V-12). Die Überexpression sowohl von CIB1 als auch von der nicht mehr phosphorylierbaren CIB1-Mutante (CIBS185/186A) inhibierte die Ausbreitung der Zellen auf immobilisiertem Fibrinogen leicht.

Die Überexpression von YopO bzw. der Kinase-inaktiven YopO-Mutante (YopOD267/K269A) führte zu einer gleichstarken, fast vollständigen Inhibition des Spreading, was die Modulation von CIB1 durch die Kinase-Aktivität des YopO als Ursache dafür ausschließt. Auch die Bindung von Rho-GTPasen an die GDI-ähnliche Domäne und die damit verbundene Inaktivierung dieser kann als Grund für die Inhibition des *Spreading*s ausgeschlossen werden (vgl. Kapitel 2.1, Abb. V-11).

Für die Aktivierung der FAK ist eine Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes essentiell und eine Behandlung von Zellen mit Cytochalasin D, einem Toxin, das die Aktin-Polymerisation blockiert, verhindert die Interaktion von CIB1 und FAK (Naik and Naik 2003). Damit könnte YopO auch einen sekundären Effekt auf das *Spreading* der Zellen haben, indem es die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts über andere bisher noch nicht bekannte Mechanismen unmöglich macht. Dies hätte eine Inhibition der Interaktion von CIB1 und FAK zur Folge, was sich wahrscheinlich negativ auf das *Spreading* der Zellen auswirken würde. Weitergehende Untersuchungen in Bezug auf andere Funktionen des CIB1 müssten angestrebt werden, um eine funktionelle Modulation des Proteins durch YopO nachzuweisen. So ist die Interaktion von CIB1 mit dem Aktin-Regulator WASp (Tsuboi et al. 2006) sicher auch ein guter Angriffspunkt für YopO, um die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zu inhibieren.

Die Interaktion des Effektorproteins YopO aus *Y. enterocolitica* auf der Basis einer Phosphorylierung an den Serinen -185/186 durch die Kinase-Domäne des Proteins konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion konnte allerdings nicht aufgeklärt werden.

2. Zelluläre Funktionen des YopO

Calcium ist ein ubiquitäres intrazelluläres Signalmolekül, das eine ganze Bandbreite von Prozessen reguliert. Besonders bei Infektionen übernimmt Calcium die Rolle eines sekundären Botenstoffs und steuert die angeborene Immunantwort.

So ist es an der Proliferation von Lymphozyten (Berridge et al. 2000) und der Induktion von Apoptose beteiligt (Kass and Orrenius 1999), die wiederum die intrazelluläre Vermehrung und die Freisetzung der Erreger verhindert (Navarre and Zychlinsky 2000; Muller and Rudel 2001; DeLeo 2004). Eine Inhibition der Ausschüttung von Calcium aus intrazellulären Speichern würde eine ganze Reihe von Prozessen der angeborenen Immunantwort modulieren. Die Fähigkeit von YopO G α q zu phosphorylieren und damit zu inhibieren (Navarro et al. 2007), macht eine negative Regulation der Ca²⁺-Ausschüttung wahrscheinlich. G α q ist ein wichtiger molekularer Bestandteil innerhalb des Phosphatidyl-Inositolweges, der letztlich zum zytosolischen Ca²⁺-Einstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum führt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von YopO in der Zelle den zytosolischen Ca²⁺-Einstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum inhibiert (vgl. Kapitel 2.3, Abb. V-20-22). Diese Inhibition zeigte sich allerdings nur im Vergleich der YopO-exprimierenden Flp-InTMT-RexTM-293-YopO-Zellen mit den GFP-exprimierenden Flp-InTMT-RexTM-293-GFP-Zellen bzw. den Ausgangszellen (Flp-InTMT-RexTM-293-Zellen) nach Doxycyclingabe. Zwischen den Flp-InTMT-RexTM-293-YopO-Zellen, bei denen mittels Doxycyclin-Applikation die Expression von YopO „angeschaltet“ wurde und denen, die keiner Doxycyclin-Applikation unterzogen wurden, zeigte sich kein Unterschied im zytosolischen Ca²⁺-Einstrom (vgl. Kapitel 2.3, Abb. V-19). Allerdings konnte in Vorarbeiten zur Charakterisierung der Flp-InTMT-RExTM-293-YopO -Zellen gezeigt werden, dass auch ohne Doxycyclin in diesen Zellen kleine Mengen an YopO exprimiert werden (vgl. Kapitel 2.2, Abb. V-15/16). Diese Mengen an YopO könnten durchaus ausreichend sein, um einen Effekt auf die intrazellulären Ca²⁺-Signale auszuüben, der auch durch eine größere Expression von YopO nach Zugabe von Doxycyclin nicht mehr zu steigern ist.

Ob der beobachtete Effekt auf den zytosolischen Ca²⁺-Einstrom nur auf die Phosphorylierung von G α q und damit auf die Kinase-Aktivität von YopO zurückzuführen ist, oder ob auch andere Domänen wie die GDI-ähnliche Domäne eine Rolle spielen, lässt sich anhand der hier gezeigten

Daten nicht darstellen. Mittels der Etablierung weiterer stabiler Zelllinien, die die Kinase-inaktive YopO-Mutante bzw. die YopO-Mutante, deren Bindungsmotiv für Rho-GTPasen zerstört ist, exprimieren, ließen sich genauere Aussagen zur Vermittlung dieses Effektes treffen. Eine weitere Möglichkeit zur Bestätigung der hier gefundenen Ergebnisse wäre die mikroskopische Untersuchung des zytosolischen Ca^{2+} -Einstromes mittels FURA auf Einzelzellebene. Hier könnten ganz gezielt Zellen hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -Signale untersucht werden, die mit YopO bzw. den oben bereits erwähnten Mutanten transfiziert wurden.

Die Inhibition der Ca^{2+} -Ausschüttung aus den intrazellulären Speichern kann die Phagozytosefähigkeit von Zellen beeinflussen. Dies würde mit der beobachteten antiphagozytären Wirkung von YopO einhergehen (Grosdent et al. 2002; Wiley et al. 2006). Alle phagozytotischen Prozesse werden letztlich durch die Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes vorangetrieben und reguliert (Kaplan 1977). Dabei übt Calcium durch die Modulation der Aktivität einer Reihe von kontraktilen Proteinen einen entscheidenden Einfluss auf diese für die Phagozytose essentielle Reorganisation aus. So hat Calcium einen Effekt auf das Zytoskelett, indem es beispielsweise die Myosin-Kontraktilität stimuliert (Tan and Boss 1992) und die Vernetzung von Aktin durch α -Actinin inhibiert (Witke et al. 1993) bzw. an Calpain bindet (Huttenlocher et al. 1997). Des Weiteren übernimmt es auch als Kofaktor von Signalmolekülen, die essentiell für den Phagozytoseprozess sind, eine wichtige Rolle.

Eines der ersten Signale, die als Antwort auf eine Aktivierung phagozytotischer Rezeptoren beobachtet wurden, ist ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Young et al. 1984). In neutrophilen Granulozyten konnte außerdem gezeigt werden, dass dieser zytosolische Ca^{2+} -Anstieg essentiell für die Fc γ R-vermittelte Phagozytose ist (Kobayashi et al. 1995). Genau dieser Fc γ R-vermittelten Phagozytoseweg wird durch YopO inhibiert (Groves et al. 2009), so dass hier durchaus ein Zusammenhang abgeleitet werden könnte.

Weiterhin vermittelt Calcium teilweise auch die Bildung von Sauerstoffradikalen (*respiratory burst*) und die Sekretion antimikrobieller Substanzen aus den Granula von Leukozyten (Brumell et al. 1995; Tapper 1996). Außerdem scheint auch die Reifung von Phagosomen und die letzte Fusion von Phagosomen und Lysosomen durch Calcium reguliert zu sein (Jaconi et al. 1990; Bengtsson et al. 1993). Damit ist YopO durch die Inhibition des zytosolischen Ca^{2+} -Einstromes nicht nur die Möglichkeit zur Verhinderung der eigentlichen Aufnahme der Bakterien durch Makrophagen gegeben, sondern auch zur Unterbindung des Abbaus aufgenommener Bakterien in Phagosomen.

Bei bakteriellen und viralen Infektionen spielt die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren eine große Rolle. Diese führt dann zur Initialisierung der Transkription von Zytokinen, Chemokinen, Zelladhäsionsmolekülen und Akute-Phase-Proteinen und trägt damit zur Eliminierung pathogener Erreger bei, indem sie die Einwanderung von Phagozyten in infizierte Gewebe bewirken und Zellen des Immunsystems aktivieren. Eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF κ B im Zytosol und CREB im Nukleus (Chawla et al. 1998; Crabtree 1999; Hardingham et al. 1999). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, der als Dimer (Proteine p50 und p65) und an seinen Inhibitor (I κ B) gebunden im Zytosol vorliegt, erfolgt über den aus drei Untereinheiten bestehenden IKK-Komplex (IKK α , IKK β , IKK γ /NEMO). Die Aktivierung von IKK β führt zu einer Phosphorylierung des Inhibitors, dessen Ubiquitinierung und anschließendem Abbau durch das 26S Proteasom (Zhang and Ghosh 2000; Yamamoto and Gaynor 2004; Kawai and Akira 2006). Die aktive NF κ B-Einheit transloziert anschließend in den Zellkern und initialisiert die Gentranskription. Ein verminderter zytosolischer Ca^{2+} -Anstieg hervorgerufen, durch die Anwesenheit des Yersinia-Effektors YopO, der im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde, sollte auch zu einer verminderten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führen.

In einigen ersten Luciferase-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NF κ B durch die Anwesenheit von YopO tatsächlich vermindert ist (vgl. Kapitel 2.4, Abb. V-27). Dabei wird deutlich, dass sich die Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Zellen mit und ohne Doxycyclingabe und damit mit initialisierter YopO-Expression und ohne diese hinsichtlich ihrer NF κ B-Aktivität nicht unterscheiden. Der Grund dafür ist die bereits oben diskutierte basale YopO-Expression in der Flp-InTMT-RExTM-293-YopO-Zelllinie. Verglichen mit den Ausgangszellen (Flp-InTMT-RExTM-293-Zellen) zeigten die YopO-exprimierenden Zellen nach Doxycyclingabe jedoch eine um ca. 40 %-verminderte NF κ B-Aktivierung. Diese Inhibition zeigte sich unabhängig von der Voraktivierung des Transkriptionsfaktors mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA). Damit scheint NF κ B in dieser Zelllinie und unter den gegebenen Versuchsbedingungen bereits zu einem gewissen Grad voraktiviert vorzuliegen, was durch die Behandlung mit TPA nur noch verstärkt wird. Die Verminderung der NF κ B-Aktivierung scheint nicht durch eine spezifische Domäne des YopO verursacht zu werden, da zwischen YopO und dessen Mutanten nach Transfektion keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der NF κ B-Aktivität bestanden (vgl. Kapitel 2.4, Abb. V-28). Sie zeigten alle eine um

ca. 50 % verminderte NFκB-Aktivität verglichen mit Zellen, denen nur der Leervektor transfiziert wurde. Die hier verwendeten Zellen (HEK293T) scheinen im Gegensatz zu den Flp-InTM-T-RExTM-293-Zellen keine so große Voraktivierung des Transkriptionsfaktors aufzuweisen, da ohne die zusätzliche Voraktivierung mit TPA der Unterschied in der NFκB-Aktivität der YopO-exprimierenden Zellen verglichen mit den GFP-exprimierenden Zellen wesentlich geringer (10 %) ausfällt. Es wäre sicher interessant und würde die hier erhaltenen Daten bestätigen die NFκB-Aktivität nach Infektion mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen zu beobachten. Da auch das Effektorprotein YopP die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors vermindert wären Stämme geeignet, in denen YopP und YopO bzw. nur YopO durch die Insertion einer Kanamycin-Kassette deletiert wurden, um eine gesicherte Aussage über den Effekt zu treffen den nur das Effektorprotein YopO unter Infektionsbedingungen auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB hat. Ein weiterer Gesichtspunkt wäre der Einfluss dieser, durch die Anwesenheit von YopO verursachten, verminderten NFκB-Aktivierung auf die eigentliche Zytokinproduktion. Mittels eines ELISA-Versuches ließe sich feststellen, ob und welche Zytokine auf der Proteinebene durch den Einfluss von YopO deutlich vermindert produziert werden.

VII. LITERATUR

- 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. and J. Heesemann (2001). "Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by *Yersinia* outer proteins (Yops)." Int J Med Microbiol **291**(4): 269-76.
- Aepfelbacher, M., C. Trasak, et al. (2007). "Effector functions of pathogenic *Yersinia* species." Thromb Haemost **98**(3): 521-9.
- Aepfelbacher, M., C. Trasak, et al. (2003). "Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells." J Biol Chem **278**(35): 33217-23.
- Aepfelbacher, M., R. Zumbihl, et al. (1999). "The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defense." Biol Chem **380**(7-8): 795-802.
- Aili, M., E. L. Isaksson, et al. (2006). "Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*." Cell Microbiol **8**(6): 1020-33.
- Aizawa, S. I. (2001). "Bacterial flagella and type III secretion systems." FEMS Microbiol Lett **202**(2): 157-64.
- Aleksic, S. and J. Bockemuhl (1990). "[Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections]." Infect Immun **18**(6): 178-85.
- Alrutz, M. A., A. Srivastava, et al. (2001). "Efficient uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function." Mol Microbiol **42**(3): 689-703.
- Andor, A., K. Trulzsch, et al. (2001). "YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells." Cell Microbiol **3**(5): 301-10.
- Arvastson, B., K. Damgaard, et al. (1971). "Clinical symptoms of infection with *Yersinia enterocolitica*." Scand J Infect Dis **3**(1): 37-40.
- Balligand, G., Y. Laroche, et al. (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**(3): 782-6.
- Barry, W. T., C. Boudignon-Proudhon, et al. (2002). "Molecular basis of CIB binding to the integrin alpha IIb cytoplasmic domain." J Biol Chem **277**(32): 28877-83.
- Barz, C., T. N. Abahji, et al. (2000). "The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1." FEBS Lett **482**(1-2): 139-43.
- Benabdillah, R., L. J. Mota, et al. (2004). "Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp." Microb Pathog **36**(5): 247-61.
- Bengtsson, T., M. E. Jaconi, et al. (1993). "Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium." Eur J Cell Biol **62**(1): 49-58.
- Benner, G. E., G. P. Andrews, et al. (1999). "Immune response to *Yersinia* outer proteins and other *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice." Infect Immun **67**(4): 1922-8.
- Bernstein, H. G., M. Blazejczyk, et al. (2005). "The Alzheimer disease-related calcium-binding protein Calmyrin is present in human forebrain with an altered distribution in Alzheimer's as compared to normal ageing brains." Neuropathol Appl Neurobiol **31**(3): 314-24.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.

- Biot, T. and G. R. Cornelis (1988). "The replication, partition and yop regulation of the pYV plasmids are highly conserved in *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*." J Gen Microbiol **134**(6): 1525-34.
- Biswas, D. K., A. P. Cruz, et al. (2000). "Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8542-7.
- Black, D. S. and J. B. Bliska (1997). "Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions." Embo J **16**(10): 2730-44.
- Black, D. S. and J. B. Bliska (2000). "The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence." Mol Microbiol **37**(3): 515-27.
- Blamey, C. J., C. Ceccarelli, et al. (2005). "The crystal structure of calcium- and integrin-binding protein 1: insights into redox regulated functions." Protein Sci **14**(5): 1214-21.
- Blazejczyk, M., U. Wojda, et al. (2006). "Ca²⁺-independent binding and cellular expression profiles question a significant role of calmyrin in transduction of Ca²⁺-signals to Alzheimer's disease-related presenilin 2 in forebrain." Biochim Biophys Acta **1762**(1): 66-72.
- Bliska, J. B., M. C. Copass, et al. (1993). "The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEP-2 cells." Infect Immun **61**(9): 3914-21.
- Boland, A. and G. R. Cornelis (1998). "Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection." Infect Immun **66**(5): 1878-84.
- Bolin, I., L. Norlander, et al. (1982). "Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid." Infect Immun **37**(2): 506-12.
- Bolin, I. and H. Wolf-Watz (1984). "Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of *Yersinia pseudotuberculosis*." Infect Immun **43**(1): 72-8.
- Bottone, E. J. (1997). "*Yersinia enterocolitica*: the charisma continues." Clin Microbiol Rev **10**(2): 257-76.
- Brakebusch, C. and R. Fassler (2003). "The integrin-actin connection, an eternal love affair." Embo J **22**(10): 2324-33.
- Brenner, D. J. (1979). "Speciation in *Yersinia*." Contrib Microbiol Immunol **5**: 33-43.
- Brubaker, R. R. (1972). "The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence." Curr Top Microbiol Immunol **57**: 111-58.
- Brubaker, R. R. (2004). "The recent emergence of plague: a process of felonious evolution." Microb Ecol **47**(3): 293-9.
- Brumell, J. H., A. Volchuk, et al. (1995). "Subcellular distribution of docking/fusion proteins in neutrophils, secretory cells with multiple exocytic compartments." J Immunol **155**(12): 5750-9.
- Carafoli, E. and J. T. Penniston (1985). "The calcium signal." Sci Am **253**(5): 70-8.
- Carniel, E. (2002). "Plasmids and pathogenicity islands of *Yersinia*." Curr Top Microbiol Immunol **264**(1): 89-108.
- Carniel, E., I. Guilvout, et al. (1996). "Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*." J Bacteriol **178**(23): 6743-51.
- Carter, P. B., R. J. Zahorchak, et al. (1980). "Plague virulence antigens from *Yersinia enterocolitica*." Infect Immun **28**(2): 638-40.

- Cathelyn, J. S., S. D. Crosby, et al. (2006). "RovA, a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(36): 13514-9.
- Chain, P. S., E. Carniel, et al. (2004). "Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13826-31.
- Chawla, S., G. E. Hardingham, et al. (1998). "CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV." Science **281**(5382): 1505-9.
- China, B., M. P. Sory, et al. (1993). "Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules." Infect Immun **61**(8): 3129-36.
- Clark, M. A., B. H. Hirst, et al. (1998). "M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells." Infection & Immunity **66**(3): 1237-43.
- Cornelis, G., Y. Laroche, et al. (1987). "*Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness." Rev Infect Dis **9**(1): 64-87.
- Cornelis, G., J. C. Vanootegem, et al. (1987). "Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes." Microb Pathog **2**(5): 367-79.
- Cornelis, G. R. (2002). "*Yersinia* type III secretion: send in the effectors." J Cell Biol **158**(3): 401-8.
- Cornelis, G. R. (2002). "The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10): 742-52.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." Nat Rev Microbiol **4**(11): 811-25.
- Cornelis, G. R., A. Boland, et al. (1998). "The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1315-52.
- Cornelis, G. R. and G. Denecker (2001). "*Yersinia* lead SUMO attack." Nat Med **7**(1): 21-3.
- Cornelis, G. R. and H. Wolf-Watz (1997). "The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells." Mol Microbiol **23**(5): 861-7.
- Cover, T. L. and R. C. Aber (1989). "*Yersinia enterocolitica*." N Engl J Med **321**(1): 16-24.
- Crabtree, G. R. (1999). "Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT." Cell **96**(5): 611-4.
- DeLeo, F. R. (2004). "Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens." Apoptosis **9**(4): 399-413.
- Denecker, G., S. Totemeyer, et al. (2002). "Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells." Infect Immun **70**(7): 3510-20.
- Denofrio, J. C., W. Yuan, et al. (2008). "Characterization of calcium- and integrin-binding protein 1 (CIB1) knockout platelets: potential compensation by CIB family members." Thromb Haemost **100**(5): 847-56.
- Dersch, P. and R. R. Isberg (1999). "A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association." Embo J **18**(5): 1199-213.
- Dube, P. H., S. A. Handley, et al. (2003). "The rovA mutant of *Yersinia enterocolitica* displays differential degrees of virulence depending on the route of infection." Infect Immun **71**(6): 3512-20.
- Dukuzumuremyi, J. M. (2003). Studies of two *Yersinia* proteins: YopJ, an inhibitor of inflammatory responses, and YpkA, a RhoA/Rac-binding kinase. Thesis, Lund University.

- Dukuzumuremyi, J. M., R. Rosqvist, et al. (2000). "The Yersinia protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor." *J Biol Chem* **275**(45): 35281-90.
- Eitel, J. and P. Dersch (2002). "The YadA protein of Yersinia pseudotuberculosis mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasins is repressed." *Infect Immun* **70**(9): 4880-91.
- El Tahir, Y. and M. Skurnik (2001). "YadA, the multifaceted Yersinia adhesin." *Int J Med Microbiol* **291**(3): 209-18.
- Emody, L., J. Heesemann, et al. (1989). "Binding to collagen by Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms." *J Bacteriol* **171**(12): 6674-9.
- Fallman, M., K. Andersson, et al. (1995). "Yersinia pseudotuberculosis inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells." *Infect Immun* **63**(8): 3117-24.
- Fincham, V. J., M. James, et al. (2000). "Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src." *Embo J* **19**(12): 2911-23.
- Flugel, A., H. Schulze-Koops, et al. (1994). "Interaction of enteropathogenic Yersinia enterocolitica with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin." *J Biol Chem* **269**(47): 29732-8.
- Forsberg, A., A. M. Viitanen, et al. (1991). "The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in Yersinia pseudotuberculosis." *Mol Microbiol* **5**(4): 977-86.
- Frantz, B., E. C. Nordby, et al. (1994). "Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B." *Embo J* **13**(4): 861-70.
- 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., A. Stolle, et al. (2006). "Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica infections." *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**(3): 315-29.
- Galyov, E. E., S. Hakansson, et al. (1993). "A secreted protein kinase of Yersinia pseudotuberculosis is an indispensable virulence determinant." *Nature* **361**(6414): 730-2.
- Gentry, H. R., A. U. Singer, et al. (2005). "Structural and biochemical characterization of CIB1 delineates a new family of EF-hand-containing proteins." *J Biol Chem* **280**(9): 8407-15.
- Gerlach, R. G. and M. Hensel (2007). "Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens." *Int J Med Microbiol* **297**(6): 401-15.
- Ginsberg, M. H., A. Partridge, et al. (2005). "Integrin regulation." *Curr Opin Cell Biol* **17**(5): 509-16.
- Grant, S. G., J. Jessee, et al. (1990). "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12): 4645-9.
- Grassl, G. A., E. Bohn, et al. (2003). "Interaction of Yersinia enterocolitica with epithelial cells: invasins beyond invasion." *Int J Med Microbiol* **293**(1): 41-54.
- Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, et al. (2002). "Role of Yops and adhesins in resistance of Yersinia enterocolitica to phagocytosis." *Infect Immun* **70**(8): 4165-76.
- Groves, E., K. Rittinger, et al. (2009). "Sequestering of Rac by the Yersinia effector YopO blocks Fc{gamma} receptor-mediated phagocytosis." *J Biol Chem*.
- Gryniewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* **260**(6): 3440-50.
- Guan, K. L., R. S. Haun, et al. (1990). "Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(4): 1501-5.

- Haataja, L., V. Kaartinen, et al. (2002). "The small GTPase Rac3 interacts with the integrin-binding protein CIB and promotes integrin alpha(IIB)beta(3)-mediated adhesion and spreading." *J Biol Chem* **277**(10): 8321-8.
- Hakansson, S., E. E. Galyov, et al. (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**(3): 593-603.
- Hakansson, S., K. Schesser, et al. (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**(21): 5812-23.
- Hamburger, Z. A., M. S. Brown, et al. (1999). "Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein." *Science* **286**(5438): 291-5.
- Hamid, N., A. Gustavsson, et al. (1999). "YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages." *Microb Pathog* **27**(4): 231-42.
- Han, Y. W. and V. L. Miller (1997). "Reevaluation of the virulence phenotype of the inv yadA double mutants of Yersinia pseudotuberculosis." *Infect Immun* **65**(1): 327-30.
- Hardingham, G. E., S. Chawla, et al. (1999). "Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels." *Neuron* **22**(4): 789-98.
- Hayward, R. D., J. M. Leong, et al. (2006). "Exploiting pathogenic Escherichia coli to model transmembrane receptor signalling." *Nat Rev Microbiol* **4**(5): 358-70.
- Heesemann, J. (1990). "[Enteropathogenic yersinias: pathogenicity factors and new diagnostic methods]." *Infect Immun* **18**(6): 186-91.
- Heesemann, J., U. Gross, et al. (1987). "Genetic manipulation of virulence of Yersinia enterocolitica." *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 312-6.
- Heesemann, J., U. Gross, et al. (1986). "Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic Yersinia sp. grown in calcium-deficient media." *Infect Immun* **54**(2): 561-7.
- Heesemann, J., K. Hantke, et al. (1993). "Virulence of Yersinia enterocolitica is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity." *Mol Microbiol* **8**(2): 397-408.
- Heesemann, J. and R. Laufs (1983). "Construction of a mobilizable Yersinia enterocolitica virulence plasmid." *J Bacteriol* **155**(2): 761-7.
- Heroven, A. K., G. Nagel, et al. (2004). "RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and rovA expression in Yersinia pseudotuberculosis." *Mol Microbiol* **53**(3): 871-88.
- Hinnebusch, B. J., A. E. Rudolph, et al. (2002). "Role of Yersinia murine toxin in survival of Yersinia pestis in the midgut of the flea vector." *Science* **296**(5568): 733-5.
- Hoiczky, E. and G. Blobel (2001). "Polymerization of a single protein of the pathogen Yersinia enterocolitica into needles punctures eukaryotic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4669-74.
- Hoiczky, E., A. Roggenkamp, et al. (2000). "Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins." *EMBO Journal* **19**(22): 5989-99.
- Hollenbach, A. D., C. J. McPherson, et al. (2002). "The EF-hand calcium-binding protein calmyrin inhibits the transcriptional and DNA-binding activity of Pax3." *Biochim Biophys Acta* **1574**(3): 321-8.
- Huttenlocher, A., S. P. Palecek, et al. (1997). "Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain." *J Biol Chem* **272**(52): 32719-22.

- Iriarte, M. and G. R. Cornelis (1998). "YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells." Mol Microbiol **29**(3): 915-29.
- Isberg, R. R. and P. Barnes (2001). "Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*." J Cell Sci **114**(Pt 1): 21-28.
- Isberg, R. R. and J. M. Leong (1990). "Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells." Cell **60**(5): 861-71.
- Isberg, R. R., D. L. Voorhis, et al. (1987). "Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells." Cell **50**(5): 769-78.
- Jaconi, M. E., D. P. Lew, et al. (1990). "Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils." J Cell Biol **110**(5): 1555-64.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-69.
- Josko, D. (2004). "*Yersinia pestis*: still a plague in the 21st century." Clin Lab Sci **17**(1): 25-9.
- Juris, S. J., A. E. Rudolph, et al. (2000). "A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9431-6.
- Juris, S. J., K. Shah, et al. (2006). "Identification of otubain 1 as a novel substrate for the *Yersinia* protein kinase using chemical genetics and mass spectrometry." FEBS Letters **580**(1): 179-83.
- Juris, S. J., F. Shao, et al. (2002). "*Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways." Cell Microbiol **4**(4): 201-11.
- Kampik, D., R. Schulte, et al. (2000). "*Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections." Infect Immun **68**(5): 2484-92.
- Kaplan, G. (1977). "Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages." Scand J Immunol **6**(8): 797-807.
- Kapperud, G., E. Namork, et al. (1985). "Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*." Infect Immun **47**(2): 561-6.
- Kapperud, G., E. Namork, et al. (1987). "Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis." Infect Immun **55**(9): 2247-54.
- Kass, G. E. and S. Orrenius (1999). "Calcium signaling and cytotoxicity." Environ Health Perspect **107 Suppl 1**: 25-35.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." Cell Death Differ **13**(5): 816-25.
- Keeling, M. J. and C. A. Gilligan (2000). "Metapopulation dynamics of bubonic plague." Nature **407**(6806): 903-6.
- Knapp, W. (1988). Die Gattung *Yersinia* - Yersiniosen. Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. H.Brandis und G.Pulverer (ed.): 348-358.
- Kobayashi, K., K. Takahashi, et al. (1995). "The role of tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ accumulation in Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis of human neutrophils." J Biochem **117**(6): 1156-61.
- Lambert de Rouvroit, C., C. Sluiter, et al. (1992). "Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*." Mol Microbiol **6**(3): 395-409.

- Laskowski-Arce, M. A. and K. Orth (2007). "The elusive activity of the Yersinia protein kinase A kinase domain is revealed." Trends Microbiol **15**(10): 437-40.
- Leahy, D. J., I. Aukhil, et al. (1996). "2.0 Å crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region." Cell **84**(1): 155-64.
- Leisner, T. M., M. Liu, et al. (2005). "Essential role of CIB1 in regulating PAK1 activation and cell migration." J Cell Biol **170**(3): 465-76.
- Leisner, T. M., W. Yuan, et al. (2007). "Tickling the tails: cytoplasmic domain proteins that regulate integrin α IIb β 3 activation." Curr Opin Hematol **14**(3): 255-61.
- Leong, J. M., R. S. Fournier, et al. (1990). "Identification of the integrin binding domain of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein." Embo J **9**(6): 1979-89.
- Letzelter, M., I. Sorg, et al. (2006). "The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones." Embo J **25**(13): 3223-33.
- Leung, K. Y., B. S. Reisner, et al. (1990). "YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of Yersinia pestis in mice." Infect Immun **58**(10): 3262-71.
- Ma, S., M. A. Liu, et al. (2003). "The serum-inducible protein kinase Snk is a G1 phase polo-like kinase that is inhibited by the calcium- and integrin-binding protein CIB." Mol Cancer Res **1**(5): 376-84.
- Mack, D., J. Heesemann, et al. (1994). "Characterization of different oligomeric species of the Yersinia enterocolitica outer membrane protein YadA." Med Microbiol Immunol (Berl) **183**(4): 217-27.
- Macnab, R. M. (2004). "Type III flagellar protein export and flagellar assembly." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 207-17.
- Mayhew, M. W., D. J. Webb, et al. (2006). "Identification of protein networks associated with the PAK1-betaPIX-GIT1-paxillin signaling complex by mass spectrometry." J Proteome Res **5**(9): 2417-23.
- McDonald, C., P. O. Vacratsis, et al. (2003). "The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases." J Biol Chem **278**(20): 18514-23.
- McGee, K., M. Zettl, et al. (2001). "A role for N-WASP in invasin-promoted internalisation." FEBS Lett **509**(1): 59-65.
- Meccas, J., B. Raupach, et al. (1998). "The Yersinia Yops inhibit invasion of Listeria, Shigella and Edwardsiella but not Salmonella into epithelial cells." Mol Microbiol **28**(6): 1269-81.
- Melendez, A. J. and H. K. Tay (2008). "Phagocytosis: a repertoire of receptors and Ca(2+) as a key second messenger." Biosci Rep **28**(5): 287-98.
- Miller, V. L. and S. Falkow (1988). "Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells." Infect Immun **56**(5): 1242-8.
- Miller, V. L., B. B. Finlay, et al. (1988). "Factors essential for the penetration of mammalian cells by Yersinia." Curr Top Microbiol Immunol **138**: 15-39.
- Mills, S. D., A. Boland, et al. (1997). "Yersinia enterocolitica induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12638-43.
- Mittal, R., S. Y. Peak-Chew, et al. (2006). "Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(49): 18574-9.
- Moffatt, B. A. and F. W. Studier (1987). "T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase." Cell **49**(2): 221-7.
- Monack, D. M., J. Meccas, et al. (1998). "Yersinia-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice." J Exp Med **188**(11): 2127-37.

- Monack, D. M., J. Meccas, et al. (1997). "Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19): 10385-90.
- Mukherjee, S., G. Keitany, et al. (2006). "Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation." *Science* **312**(5777): 1211-4.
- Muller, A. and T. Rudel (2001). "Modification of host cell apoptosis by viral and bacterial pathogens." *Int J Med Microbiol* **291**(3): 197-207.
- Nagel, G., A. K. Heroven, et al. (2003). "Function and regulation of the transcriptional activator RovA of Yersinia pseudotuberculosis." *Adv Exp Med Biol* **529**: 285-7.
- Nagel, G., A. Lahrz, et al. (2001). "Environmental control of invasin expression in Yersinia pseudotuberculosis is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family." *Mol Microbiol* **41**(6): 1249-69.
- Naik, M. U. and U. P. Naik (2003). "Calcium-and integrin-binding protein regulates focal adhesion kinase activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen." *Blood* **102**(10): 3629-36.
- Naik, U. P. and M. U. Naik (2003). "Association of CIB with GPIIb/IIIa during outside-in signaling is required for platelet spreading on fibrinogen." *Blood* **102**(4): 1355-62.
- Naik, U. P., P. M. Patel, et al. (1997). "Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin alphaIIb cytoplasmic domain." *J Biol Chem* **272**(8): 4651-4.
- Navarre, W. W. and A. Zychlinsky (2000). "Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies." *Cell Microbiol* **2**(4): 265-73.
- Navarro, L., A. Koller, et al. (2007). "Identification of a molecular target for the Yersinia protein kinase A." *Mol Cell* **26**(4): 465-77.
- Ni, H. and J. Freedman (2003). "Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands." *Transfus Apher Sci* **28**(3): 257-64.
- O'Toole, T. E., J. C. Loftus, et al. (1990). "Affinity modulation of the alpha IIb beta 3 integrin (platelet GPIIb-IIIa) is an intrinsic property of the receptor." *Cell Regul* **1**(12): 883-93.
- Obata, H., S. Biro, et al. (1996). "NF-kappa B is induced in the nuclei of cultured rat aortic smooth muscle cells by stimulation of various growth factors." *Biochem Biophys Res Commun* **224**(1): 27-32.
- Orth, K., L. E. Palmer, et al. (1999). "Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector." *Science* **285**(5435): 1920-3.
- Orth, K., Z. Xu, et al. (2000). "Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease." *Science* **290**(5496): 1594-7.
- Palmer, L. E., S. Hobbie, et al. (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**(5): 953-65.
- Parise, L. V. (1999). "Integrin alpha(IIb)beta(3) signaling in platelet adhesion and aggregation." *Curr Opin Cell Biol* **11**(5): 597-601.
- Pepe, J. C. and V. L. Miller (1993). "Yersinia enterocolitica invasin: a primary role in the initiation of infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14): 6473-7.
- Pepe, J. C., M. R. Wachtel, et al. (1995). "Pathogenesis of defined invasion mutants of Yersinia enterocolitica in a BALB/c mouse model of infection." *Infect Immun* **63**(12): 4837-48.
- Perry, R. D. and J. D. Fetherston (1997). "Yersinia pestis--etiologic agent of plague." *Clin Microbiol Rev* **10**(1): 35-66.
- Persson, C., N. Carballeira, et al. (1997). "The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions." *Embo J* **16**(9): 2307-18.

- Pierson, D. E. and S. Falkow (1993). "The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing." Infect Immun **61**(5): 1846-52.
- Pilz, D., T. Vocke, et al. (1992). "Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3." Infect Immun **60**(1): 189-95.
- Prehna, G., M. I. Ivanov, et al. (2006). "Yersinia virulence depends on mimicry of host rho-family nucleotide dissociation inhibitors." Cell **126**(5): 869-80.
- Prenzel, N., E. Zwick, et al. (1999). "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." Nature **402**(6764): 884-8.
- Putzker, M., H. Sauer, et al. (2001). "Plague and other human infections caused by *Yersinia* species." Clin Lab **47**(9-10): 453-66.
- Revell, P. A. and V. L. Miller (2000). "A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* inv gene and for virulence." Mol Microbiol **35**(3): 677-85.
- Revell, P. A. and V. L. Miller (2001). "Yersinia virulence: more than a plasmid." FEMS Microbiol Lett **205**(2): 159-64.
- Roggenkamp, A., K. Ruckdeschel, et al. (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**(7): 2506-14.
- Roppenser, B., A. Roder, et al. (2009). "Yersinia enterocolitica differentially modulates RhoG activity in host cells." J Cell Sci **122**(Pt 5): 696-705.
- Rosqvist, R., A. Forsberg, et al. (1990). "The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence." Mol Microbiol **4**(4): 657-67.
- Rosqvist, R., A. Forsberg, et al. (1991). "Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption." Infect Immun **59**(12): 4562-9.
- Rosqvist, R., K. E. Magnusson, et al. (1994). "Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells." Embo J **13**(4): 964-72.
- Rosqvist, R., M. Skurnik, et al. (1988). "Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations." Nature **334**(6182): 522-4.
- Ruckdeschel, K., S. Harb, et al. (1998). "Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production." J Exp Med **187**(7): 1069-79.
- Ruckdeschel, K., J. Machold, et al. (1997). "Yersinia enterocolitica promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production." J Biol Chem **272**(25): 15920-7.
- Ruckdeschel, K., G. Pfaffinger, et al. (2006). "The proteasome pathway destabilizes *Yersinia* outer protein E and represses its antihost cell activities." J Immunol **176**(10): 6093-102.
- Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, et al. (1996). "Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils." Infect Immun **64**(3): 724-33.
- Ruoslahti, E. and E. Engvall (1997). "Integrins and vascular extracellular matrix assembly." J Clin Invest **99**(6): 1149-52.
- Sander, E. E., S. van Delft, et al. (1998). "Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase." J Cell Biol **143**(5): 1385-98.

- Sauvonnet, N., B. Pradet-Balade, et al. (2002). "Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors." J Biol Chem **277**(28): 25133-42.
- Schesser, K., A. K. Spiik, et al. (1998). "The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity." Mol Microbiol **28**(6): 1067-79.
- Schleifstein, J. I. and M. B. Coleman (1939). "An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis*, and pathogenic for man." N Y State J Med **39**: 1749-1753.
- Schotte, P., G. Denecker, et al. (2004). "Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta." J Biol Chem **279**(24): 25134-42.
- Schubert, S., J. Bockemuhl, et al. (2003). "First isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* O8, biotype 1B in Germany." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **22**(1): 66-8.
- Schubert, S., A. Rakin, et al. (2004). "The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects." Int J Med Microbiol **294**(2-3): 83-94.
- Schulte, R. and I. B. Autenrieth (1998). "*Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation." Infect Immun **66**(3): 1216-24.
- Schulte, R., G. A. Grassl, et al. (2000). "*Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers." Faseb J **14**(11): 1471-84.
- Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, et al. (1992). "Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen." Infect Immun **60**(6): 2153-9.
- Shao, F., P. M. Merritt, et al. (2002). "A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis." Cell **109**(5): 575-88.
- Shao, F., P. O. Vacratsis, et al. (2003). "Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 904-9.
- Shattil, S. J. (1999). "Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways." Thromb Haemost **82**(2): 318-25.
- Shattil, S. J., H. Kashiwagi, et al. (1998). "Integrin signaling: the platelet paradigm." Blood **91**(8): 2645-57.
- Shattil, S. J. and A. D. Leavitt (2001). "All in the family: primary megakaryocytes for studies of platelet alphaIIbbeta3 signaling." Thromb Haemost **86**(1): 259-65.
- Shiraga, M., A. Ritchie, et al. (1999). "Primary megakaryocytes reveal a role for transcription factor NF-E2 in integrin alpha IIb beta 3 signaling." J Cell Biol **147**(7): 1419-30.
- Shock, D. D., U. P. Naik, et al. (1999). "Calcium-dependent properties of CIB binding to the integrin alphaIIb cytoplasmic domain and translocation to the platelet cytoskeleton." Biochem J **342 Pt 3**: 729-35.
- Simonet, M., S. Richard, et al. (1990). "Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid." Infect Immun **58**(3): 841-5.
- Simonet, M., B. Riot, et al. (1996). "Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the inv gene." Infect Immun **64**(1): 375-9.

- Skrzypek, E., C. Cowan, et al. (1998). "Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus." Mol Microbiol **30**(5): 1051-65.
- Skurnik, M. (1985). "Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions." Infect Immun **47**(1): 183-90.
- Skurnik, M., I. Bolin, et al. (1984). "Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp." J Bacteriol **158**(3): 1033-6.
- Skurnik, M. and P. Toivanen (1992). "LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*." J Bacteriol **174**(6): 2047-51.
- Snellings, N. J., M. Popek, et al. (2001). "Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon." Infect Immun **69**(7): 4627-38.
- Sprang, S. R. (1997). "G protein mechanisms: insights from structural analysis." Annu Rev Biochem **66**: 639-78.
- Stabler, S. M., L. L. Ostrowski, et al. (1999). "A myristoylated calcium-binding protein that preferentially interacts with the Alzheimer's disease presenilin 2 protein." J Cell Biol **145**(6): 1277-92.
- Straley, S. C. and W. S. Bowmer (1986). "Virulence genes regulated at the transcriptional level by Ca²⁺ in *Yersinia pestis* include structural genes for outer membrane proteins." Infect Immun **51**(2): 445-54.
- Straley, S. C. and R. D. Perry (1995). "Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*." Trends in Microbiology **3**(8): 310-7.
- Sun, L. and G. Carpenter (1998). "Epidermal growth factor activation of NF-kappaB is mediated through IkappaBalpha degradation and intracellular free calcium." Oncogene **16**(16): 2095-102.
- Tamm, A., A. M. Tarkkanen, et al. (1993). "Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the *YadA* protein of *Yersinia enterocolitica*." Mol Microbiol **10**(5): 995-1011.
- Tan, Z. and W. F. Boss (1992). "Association of Phosphatidylinositol Kinase, Phosphatidylinositol Monophosphate Kinase, and Diacylglycerol Kinase with the Cytoskeleton and F-Actin Fractions of Carrot (*Daucus carota* L.) Cells Grown in Suspension Culture : Response to Cell Wall-Degrading Enzymes." Plant Physiol **100**(4): 2116-2120.
- Tapper, H. (1996). "The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils." J Leukoc Biol **59**(5): 613-22.
- Tardy, F., F. Hombly, et al. (1999). "*Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops." Embo J **18**(23): 6793-9.
- Terti, R., M. Skurnik, et al. (1992). "Adhesion protein *YadA* of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin." Infect Immun **60**(7): 3021-4.
- Trasak, C., G. Zenner, et al. (2007). "*Yersinia* Protein Kinase *YopO* Is Activated by A Novel G-actin Binding Process." J Biol Chem **282**(4): 2268-2277.
- Trulzsch, K., A. Roggenkamp, et al. (2003). "Analysis of chaperone-dependent *Yop* secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*." Int J Med Microbiol **293**(2-3): 167-77.
- Trulzsch, K., T. Sporleder, et al. (2004). "Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model." Infect Immun **72**(9): 5227-34.
- Tsuboi, S. (2002). "Calcium integrin-binding protein activates platelet integrin alpha IIb beta 3." J Biol Chem **277**(3): 1919-23.

- Tsuboi, S., S. Nonoyama, et al. (2006). "Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in alphaIIb beta3-mediated cell adhesion." EMBO Rep **7**(5): 506-11.
- Van Nhieu, G. T. and R. R. Isberg (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**(36): 24367-75.
- Vantrappen, G., E. Ponette, et al. (1977). "Yersinia enteritis and enterocolitis: gastroenterological aspects." Gastroenterology **72**(2): 220-7.
- Viboud, G. I. and J. B. Bliska (2001). "A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes." Embo J **20**(19): 5373-82.
- Viboud, G. I. and J. B. Bliska (2005). "Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis." Annu Rev Microbiol **59**: 69-89.
- Viboud, G. I., E. Mejia, et al. (2006). "Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to Yersinia pseudotuberculosis infection." Cell Microbiol **8**(9): 1504-15.
- Vielreicher, M., G. Harms, et al. (2007). "Dynamic interaction between Src and C-terminal Src kinase in integrin alphaIIbbeta3-mediated signaling to the cytoskeleton." J Biol Chem **282**(46): 33623-31.
- Von Pawel-Rammingen, U., M. V. Telepnev, et al. (2000). "GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure." Mol Microbiol **36**(3): 737-48.
- Wattiau, P., B. Bernier, et al. (1994). "Individual chaperones required for Yop secretion by Yersinia." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10493-7.
- Wauters, G., K. Kandolo, et al. (1987). "Revised biogrouping scheme of Yersinia enterocolitica." Contrib Microbiol Immunol **9**: 14-21.
- White, C., J. Yang, et al. (2006). "CIB1, a ubiquitously expressed Ca²⁺-binding protein ligand of the InsP3 receptor Ca²⁺ release channel." J Biol Chem **281**(30): 20825-33.
- Wiedemann, A., S. Linder, et al. (2001). "Yersinia enterocolitica invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages." Cell Microbiol **3**(10): 693-702.
- Wiley, D. J., R. Nordfeldth, et al. (2006). "The Ser/Thr kinase activity of the Yersinia protein kinase A (YpkA) is necessary for full virulence in the mouse, mollifying phagocytes, and disrupting the eukaryotic cytoskeleton." Microb Pathog **40**(5): 234-43.
- Witke, W., A. Hofmann, et al. (1993). "The Ca(2+)-binding domains in non-muscle type alpha-actinin: biochemical and genetic analysis." J Cell Biol **121**(3): 599-606.
- Woestyn, S., A. Allaoui, et al. (1994). "YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery." J Bacteriol **176**(6): 1561-9.
- Wong, K. W. and R. R. Isberg (2005). "Yersinia pseudotuberculosis spatially controls activation and misregulation of host cell Rac1." PLoS Pathog **1**(2): e16.
- Wren, B. W. (2003). "The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens." Nat Rev Microbiol **1**(1): 55-64.
- Wu, X. and M. R. Lieber (1997). "Interaction between DNA-dependent protein kinase and a novel protein, KIP." Mutat Res **385**(1): 13-20.
- Yamamoto, Y. and R. B. Gaynor (2004). "IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway." Trends Biochem Sci **29**(2): 72-9.
- Yamniuk, A. P., H. Ishida, et al. (2006). "The interaction between calcium- and integrin-binding protein 1 and the alphaIIb integrin cytoplasmic domain involves a novel C-terminal displacement mechanism." J Biol Chem **281**(36): 26455-64.

-
- Yamniuk, A. P., L. T. Nguyen, et al. (2004). "Metal ion binding properties and conformational states of calcium- and integrin-binding protein." *Biochemistry* **43**(9): 2558-68.
- Yamniuk, A. P. and H. J. Vogel (2005). "Calcium- and magnesium-dependent interactions between calcium- and integrin-binding protein and the integrin alphaIIb cytoplasmic domain." *Protein Sci* **14**(6): 1429-37.
- Yang, Y. and R. R. Isberg (1993). "Cellular internalization in the absence of invasins is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis* yadA product." *Infect Immun* **61**(9): 3907-13.
- Yao, T., J. Meccas, et al. (1999). "Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH." *J Exp Med* **190**(9): 1343-50.
- Young, J. D., S. S. Ko, et al. (1984). "The increase in intracellular free calcium associated with IgG gamma 2b/gamma 1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(17): 5430-4.
- Yuan, W., T. M. Leisner, et al. (2006). "CIB1 is an endogenous inhibitor of agonist-induced integrin alphaIIb beta3 activation." *J Cell Biol* **172**(2): 169-75.
- Zhang, G. and S. Ghosh (2000). "Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors." *J Endotoxin Res* **6**(6): 453-7.
- Zhu, J., S. M. Stabler, et al. (2004). "Calcium binding sequences in calmyrin regulates interaction with presenilin-2." *Exp Cell Res* **300**(2): 440-54.
- Zhu, X., M. Jiang, et al. (1998). "Receptor-activated Ca²⁺ influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca²⁺ entry." *J Biol Chem* **273**(1): 133-42.

VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin, Alanin, Ampère
Ail	<i>attachment invasion locus</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CIB1	Calcium- und Integrin- bindendes Protein 1
DAG	Diacylglycerin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FBS	Fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FNK	FGF-inducible kinase
G	Guanosin
G α q	α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>GDP-dissociation inhibitory protein</i>
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>guaninnucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSH	Glutathion (reduziert)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPI	<i>high-pathogenicity island</i>
I κ B	<i>inhibitor of κB</i>

IKK	<i>IκB kinase</i>
InsP ₃ R	Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor
Inv	Invasin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MLD	<i>Membrane Lokalisation Domain</i>
MyfA	<i>mucoid Yersinia factor A</i>
Nemo/IKKγ	<i>NF-κB essential modulator</i>
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
NGS	Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)
NHS	humanes Serum (<i>normal human serum</i>)
OD ₆₀₀	Extinktion einer Lösung bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	<i>p21 activated kinase</i>
PAX3	<i>paired box gene 3</i>
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Pla	<i>plasminogen activator protease</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
PsaA	<i>pH6 antigen</i>
pYV	<i>Yersinia</i> -Virulenzplasmid
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNK	<i>serum inducible kinase</i>
SR	Sarcoplasmatisches Retikulum
Syc	<i>specific Yop chaperone</i>
T	Thymin, Threonin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	TNF-Rezeptor
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TTSS	Typ-III-Sekretionssystem
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome proteins</i>
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsın A
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
Ysc-Proteine	<i>Yersinia</i> -Sekretionsproteine

IX. DANKSAGUNG

Besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Martin Aepfelbacher für die Überlassung des interessanten Themas und für die jederzeit freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit sowohl bei wissenschaftlichen Fragen als auch bei der praktischen Durchführung der Versuche. Außerdem danke ich ihm für die konstruktiven Diskussionen bei allen aufgetretenen Problemen sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Streit für die Übernahme des Gutachtens meiner Dissertation an der biologischen Fakultät.

Herrn Prof. Dr. Andreas Guse und Dr. Ralf Fliegert danke ich herzlich für die Einführung in das experimentelle Arbeiten auf dem Gebiet der Calcium-Messung und für die Möglichkeit diese Arbeiten am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I des UKE durchführen zu können.

Ich möchte mich vor allem bei allen derzeitigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Aepfelbacher bedanken: Anja Roeder, Andreas Rumm, Bernd Zobiak, Bernhard Roppenser, Betty Schwamb, Claudia Trasak, Erin Boyle, Franziska Peters, Gerhard Zenner, Kirsten Egg, Manuel Wolters und Martin Kuhns. Ich danke ihnen und auch allen anderen Kollegen am Institut für die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Darüber hinaus bedanke ich mich für das angenehme und harmonische Arbeitsklima und die schöne gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors, die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Andrea und Karl-Heinz Albrecht, meiner Oma Gertraude Seibt sowie meiner Schwester Julia, Dirk, Carina, Tini, Peti, Ines, Michi, Conni, Anja, Willi, Mone, Anna, Annka, Bine und Bianca bedanken. Ich danke ihnen für ihre immerwährende Unterstützung in jeder Lebenslage, ihre unendliche Geduld und ihre ermutigende Ratschläge. Ohne sie wäre dieser Weg um so vieles schwieriger gewesen.

Meine letzten Worte des Dankes sollen meinem Opa Heinz Seibt gehören, der seit Beginn meines Studiums immerwährendes Interesse gezeigt hat, immer an mich geglaubt hat und dies so gern noch lesen wollte.