

Visualisierung des Typ III Translokator-Komplexes von *Yersinia enterocolitica* während der Wirtszellinfektion

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Franziska Huschka, geb. Krawack
aus Wismar

Hamburg, 2017

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2012 bis März 2017 unter Anleitung von Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erstellt. Die Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Exzellenzclusters *The Hamburg Center For Ultrafast Imaging* (CUI) unterstützt.

Prüfungskommission: Prof. Dr. Julia Kehr (Vorsitz)
Prof. Dr. Martin Aepfelbacher
Prof. Dr. Wolfgang Streit

Tag der Disputation: 09. August 2017

Diese Arbeit widme ich meiner Mama und meinen beiden Omas, die immer an mich geglaubt und mich unterstützt haben, aber leider nicht mehr warten konnten.

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
I.1	Die Gattung <i>Yersinia</i>	1
I.2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2
I.2.1	Klassifizierung	2
I.2.2	Pathogenese und Infektionsroute	3
I.3	Virulenzfaktoren	4
I.3.1	Chromosomale Faktoren	4
I.3.2	Das Virulenzplasmid	5
I.4	Typ III Sekretionssystem	6
I.4.1	Der Basalkörper.....	9
I.4.2	Das Nadel-Filament.....	10
I.4.3	Das Translokon	11
I.4.4	Die Effektoren.....	19
I.5	Regulation der Translokation.....	24
I.5.1	Ein-Schritt Modell	25
I.5.2	Zwei-Schritt Modell	25
I.6	Zielstellung	27
II	Ergebnisse	29
II.1	Polyklonale Kaninchen-Antikörper binden spezifisch die Translokatoren YopB und YopD	29
II.1.1	Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen ausgewählte Proteine des Typ III Sekretionssystems aus <i>Y. enterocolitica</i> WA-314	29
II.1.2	Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter <i>Yersinia outer proteins</i> (Yops)	29
II.1.3	Aufreinigung und Spezifitätsprüfung gewonnener Kaninchen- und Ratten-Antiseren	31
II.2	YopB und YopD dekorieren die Bakterienoberfläche unter Sekretionsbedingungen	32
II.3	YopD und YopE beeinflussen die Sekretion bzw. das Erscheinungsbild von YopB auf der Bakterienoberfläche	35
II.4	Superauflösende Mikroskopie bestätigt gleichmäßige Verteilung der Translokator-Yops auf der Bakterienoberfläche unter Sekretionsbedingungen	37
II.5	Während der Zellinfektion zeigen sich YopB und YopD bakterienassoziiert an einer Subpopulation der infizierenden Bakterien	38
II.6	Bakterielle und zelluläre Faktoren beeinflussen den Anteil YopB/D-exprimierender Bakterien während der Infektion	40

II.7	YopB Cluster können mit STED Mikroskopie aufgelöst werden.....	44
II.8	Kolokalisation der Translokatoren	46
II.8.1	YopB und YopD kolokalisieren in hochaufgelösten Clustern.....	46
II.8.2	YopB und <i>tip</i> -Komplex LcrV zeigen partielle Kolokalisation	48
II.9	YopB und YscD lokalisieren in definierten Bereichen mit einem Abstand von ca. 100 nm.....	49
III	Diskussion.....	52
III.1	Unter Sekretionsbedingungen dekorieren YopB und YopD die Oberfläche der Bakterien.....	53
III.2	Während der Infektion bilden YopB und YopD definierte bakterienassoziierte punktförmige Strukturen, die nur an einem kleinen prozentualen Anteil adhärenter Bakterien detektierbar sind.....	55
III.3	Die Anzahl der YopB/D-präsentierenden Bakterien wird von bakteriellen und zellulären Faktoren beeinflusst.....	56
III.4	Konfokale YopB-Fluoreszenzkerne lassen sich mittels STED in drei Spots auflösen.	58
III.5	Die Translokationspore steht in engen Kontakt mit den Injektisomen entsprechend des Ein-Schritt-Modells.	60
IV	Zusammenfassung.....	64
IV.1	Abstract.....	65
V	Material und Methoden	67
V.1	Materialien	67
V.1.1	Geräte	67
V.1.2	Mikroskopie	68
V.1.3	Verbrauchsmittel.....	69
V.1.4	Kits, Enzyme und Reagenzien.....	70
V.1.5	Protein- und DNS-Leitern	71
V.1.6	Puffer und Lösungen	71
V.1.7	Wachstumsmedien und Zusätze.....	74
V.1.8	Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	75
V.1.9	Plasmide	76
V.1.10	Oligonukleotide.....	76
V.1.11	Antikörper.....	77
V.1.12	Elektronische Datenverarbeitung.....	78
V.2	Methoden	79
V.2.1	Mikrobiologische Methoden	79
V.2.2	Molekularbiologische Methoden	80

V.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	83
V.2.4	Zellkultur und zellbiologische Methoden	88
V.2.5	Tierversuche.....	91
V.2.6	Mikroskopische Methoden	92
VI	Literaturverzeichnis	96
VII	Tabellenverzeichnis	116
VIII	Abbildungsverzeichnis	117
IX	Abkürzungsverzeichnis	118
X	Danksagung.....	120
XI	Vorveröffentlichungen	122
XII	Eidesstattliche Erklärung	123

I Einleitung

I.1 Die Gattung *Yersinia*

Die zu der Familie der *Enterobacteriaceae* zählende Gattung *Yersinia* spp. umfasst Gram-negative pleomorphe Stäbchen, die sich durch eine fakultativ anaerobe Lebensweise auszeichnen und ubiquitär vorkommen. Sie sind Katalase-positiv, Oxidase-negativ, bilden keine Endosporen und sind in der Lage auch bei Temperaturen von 0-4 °C zu wachsen [Fredriksson-Ahomaa, 2007]. In unabhängigen Studien gelang es dem Schweizer Pestforscher und Namensgeber Alexandre Yersin sowie dem japanischen Bakteriologen Shibasaburo Kitasato erstmals 1894 in Hongkong den Erreger der Pest *Yersinia pestis* aus menschlichen Geweben zu isolieren und zu charakterisieren [Treille & Yersin, 1894; Kitasato, 1894; Bibel & Chen, 1976]. Von den bislang beschriebenen 18 Arten sind nur drei von humanmedizinischer Bedeutung [McNally *et al.*, 2016]: der Pesterreger *Y. pestis* sowie die enteropathogenen Spezies *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, die lokal begrenzte Darminfektionen auslösen. Während diese unter dem Begriff Yersiniose zusammengefassten Erkrankungen häufig selbstlimitierend sind und die Symptome von akuter Enteritis bis mesenterialer Lymphadenitis rangieren [Cover & Aber, 1989], enden die von *Y. pestis* verursachten systemischen Infektionen unbehandelt in 50-60 % der Beulenpestfälle, bei der Lungenpest sogar in 100 % der Fälle, tödlich [Groß 2006: 202f., 364].

Als eine der historisch bedeutsamsten Seuchen zählt die Pest mit rund 200 Millionen Todesopfern zu den gefürchtetsten Infektionskrankheiten [Brubaker, 1991] und auch wenn sie derzeit kein akutes Gesundheitsproblem darstellt, gibt es dennoch jährlich Berichte von Pestfällen beim Menschen [Cornelis, 2002a]. Es handelt sich dabei um eine zoonotische Infektion mit Nagetieren als primärem Reservoir und Flöhen als Vektoren, die den Erreger auf den akzidentiellen Wirt Mensch übertragen [Madigan & Martinko 2009: 1030f.]. Nach dem Biss des Rattenflohs (*Xenospsylla cheopis*) gelangen die Bakterien in angrenzendes Lymphgewebe, wo sie proliferieren und so das Anschwellen der Lymphknoten zu sogenannten Bubonen oder Beulen (Beulenpest) verursachen [Cornelis, 2002b]. Fortschreitendes Wachstum der Keime in Blut, Leber und Milz kann zur Bakteriämie und zum Befall weiterer innerer Organe führen [Perry & Fetherston, 1997]. Wird die Lunge kolonisiert, kann es zur Manifestation der Lungenpest kommen, wobei die Erreger nun mittels Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen werden können, was in 1-3 Tagen nach der Infektion zum Tod führt [Cornelis, 2002b].

Im Gegensatz zu *Y. pestis* erfolgt die Übertragung der beiden enteropathogenen Spezies lebensmittelassoziiert. Trotz unterschiedlicher Infektionsrouten ist allen ein Tropismus für

Lymphgewebe sowie die Resistenz gegenüber der unspezifischen Immunantwort gemein [Cornelis *et al.*, 1998]. Obwohl *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* ähnliche klinische Symptome verursachen können, legen vergleichende Genomstudien nahe, dass *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* phylogenetisch näher verwandt sind. Demnach habe sich *Y. pestis* durch Zugewinn, Verlust oder Umstrukturierung verschiedener Gene vor 1.500-20.000 Jahren aus *Y. pseudotuberculosis* entwickelt [Achtman *et al.*, 1999]. Bevor sich eine Aufspaltung in die distinkten Linien vollzog, hatten alle drei pathogenen *Yersinia*-Spezies einen gemeinsamen, entfernten Vorfahren, der schon Schlüsselfaktoren für die Pathogenität besaß [Wren, 2003; Thomson *et al.*, 2006]. Trotz ihrer engen Verwandtschaft unterscheiden sich *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* drastisch in ihrer Pathogenese und Infektionsroute. Im Gegensatz zum Pesterreger kann der auch in natürlichen Habitaten vorkommende *Y. pseudotuberculosis* verschiedene Haus- und Wildtiere infizieren. Durch Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln oder Wasser gelangen die Bakterien über fäkal-orale Aufnahme in den Menschen, wo sie die gastrointestinale Mukosa überqueren und die darunter liegenden Gewebe infizieren [Fredriksson-Ahomaa, 2007]. Dies kann zu Abszess-bildender mesenterialer Lymphadenitis und Diarrhoe führen [Galindo *et al.*, 2011]. Häufig sind *Y. pseudotuberculosis*-Infektionen selbstlimitierend, in seltenen Fällen kann es jedoch zur Sepsis mit hoher Mortalität kommen [Deacon *et al.*, 2003].

I.2 *Yersinia enterocolitica*

Erstmals unter der Bezeichnung *Bacterium enterocoliticum* beschrieben [Schleifenstein & Coleman, 1939], erhielt der Erreger kurz darauf seinen heutigen Namen *Yersinia enterocolitica* [Frederiksen, 1964]. *Y. enterocolitica* ist der weitaus häufigere Erreger der Yersiniose und gelangt ebenfalls durch Aufnahme kontaminierter Lebensmittel in den Gastrointestinaltrakt des Menschen. Als Reservoir dienen vorrangig Schweine und Schweinefleischerzeugnisse sowie kontaminierte Milch, Tofu und Wasser [Jones *et al.*, 2003; Fredriksson-Ahomaa, Stolle, Siitonen, *et al.*, 2006; Lynch *et al.*, 2006; Bonardi *et al.*, 2010], aber auch domestizierte Farmhunde in China konnten als Quelle identifiziert werden [Wang *et al.*, 2010].

I.2.1 Klassifizierung

Y. enterocolitica ist als heterogene Spezies beschrieben, die aufgrund von verschiedenen biochemischen Reaktionen in 6 Biovare (1A, 1B, 2-5) untergliedert wird [Wauters *et al.*, 1987]. Weiterhin können zahlreiche Serotypen unterschieden werden, die spezifische Antigene auf der Zellwand präsentieren. Aleksić und Bockemühl haben ein vereinfachtes System zur Differenzierung von 18 Serotypen anhand von 20 O-Faktoren eingeführt [Aleksić & Bockemühl,

1984]. Dabei sind die Serotypen O:3, O:8 und O:9 die häufigsten Isolate aus Menschen [Fredriksson-Ahomaa, 2007; Galindo *et al.*, 2011]. Generell können verschiedene geographische Verbreitung, ökologische Nischen und pathogene Eigenschaften beobachtet werden. So wurden die Serotypen O:4/32, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 des hochpathogenen Biovars 1B häufig mit Erkrankungen beim Menschen in den USA und in Kanada in Verbindung gebracht [Bottone, 1999], aber auch in Europa und Japan wurde 1B/O:8 *Y. enterocolitica* nachgewiesen [Hoogkamp-Korstanje *et al.*, 1986; Maruyama, 1987]. Der häufigste Yersiniose-Erreger in Europa, Japan, Kanada und den USA gehört jedoch zum Biovar/Serotyp 4/O:3 [Bottone, 1999]. Stämme des Biovars 1A sind in der Regel apathogen und weltweit verbreitet, häufig isoliert aus der Umwelt, Lebensmitteln, Wasser und Kot [Bottone, 1999].

Y. enterocolitica kann zusätzlich auch nach Phagentypen untergliedert werden. Dafür wurde ein französisches und ein schwedisches Schema etabliert [Schiemann, 1989], jedoch erbrachten diese nur eine kleine Zahl epidemiologischer Typen, da viele Stämme in den selben Phagentypen auftraten [Fredriksson-Ahomaa, 2007].

I.2.2 Pathogenese und Infektionsroute

Y. enterocolitica-Infektionen wurden auf allen Kontinenten beobachtet, am häufigsten jedoch in Europa [Bottone, 1999], und erfolgen generell über die Aufnahme von kontaminiertem Wasser und dem Verzehr befallener Lebensmittel, selten direkt über Bluttransfusionen. Im Darm adhären die Bakterien an Epithelzellen und durchqueren das Darmepithel über sogenannte M-Zellen, um schließlich das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe der Peyer Plaques zu besiedeln [Grützka *et al.*, 1990]. Adhärenz an und Invasion in das Epithel werden durch zwei chromosomale Gene, *inv* (Invasin) und *ail* (*Attachment invasion locus*), vermittelt [Pepe & Miller, 1993; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2006]. In den Peyer Plaques erfolgt die extrazelluläre Proliferation, was zur Rekrutierung von neutrophilen Leukozyten sowie zur Bildung von Mikroabszessen führt und schließlich in der vollständigen Zerstörung der Zellstruktur in den Peyer Plaques resultiert [Cornelis *et al.*, 1998]. Über abfließende lymphatische Gefäße breiten sich die Bakterien in entferntere Lymphgewebe wie mesenteriale Lymphknoten aus [Grützka *et al.*, 1990; Pepe & Miller, 1993], können aber auch in die Leber und Milz disseminieren [Trülzsch *et al.*, 2007]. Gastroenteritis ist die häufigste Form der Yersiniose und tritt meist bei Kindern auf [Bottone, 1997; Galindo *et al.*, 2011]. Mögliche Folgeerkrankungen sind reaktive Arthritis, Erythema nodosum, Uveitis, Glomerulonephritis und Myocarditis [Fredriksson-Ahomaa, Stolle, & Korkeala, 2006]. In sehr seltenen Fällen kann es zu einer Sepsis kommen, besonders bei immunsupprimierten

Patienten oder Individuen mit Eisenüberschuss, aber auch während einer Bluttransfusion [Bottone, 1999].

Die verschiedenen Infektionsrouten und die Schwere der Erkrankungen beim Menschen werden bei allen drei pathogenen *Yersinia*-Spezies durch ein Arsenal gemeinsamer und einzigartiger Virulenzfaktoren bestimmt. Sowohl chromosomale als auch Plasmid-kodierte Faktoren sind an der Pathogenese und der Etablierung der Yersiniose bzw. der Pest beteiligt [Galindo *et al.*, 2011].

I.3 Virulenzfaktoren

Pathogene *Yersinia* spp. teilen eine Infektionsstrategie, die auf Virulenzfaktoren beruht, die das Eindringen, Adhärenz und Kolonisieren des Wirtes bei gleichzeitigem Entkommen der Immunabwehr ermöglichen [Atkinson & Williams, 2016]. Die Virulenz aller pathogenen Yersinien-Stämme wird hauptsächlich über ein ca. 70 kb großes Virulenzplasmid (pYV), vermittelt [Portnoy & Martinez, 1985; Brubaker, 1991]. Aber auch chromosomale Faktoren sind von entscheidender Bedeutung, da virulente Eigenschaften nur durch pYV-Transfer auf Plasmid-befreite Abkömmlinge der Elternstämme übertragen werden können [Heesemann & Laufs, 1983].

I.3.1 Chromosomale Faktoren

In den letzten 30 Jahren wurden verschiedene chromosomal- oder Plasmid-kodierte *Yersinia*-Virulenzfaktoren identifiziert, die eine große Rolle in der Wirtszell-Anhaftung spielen [Atkinson & Williams, 2016]. So wird vor allem den beiden chromosomalen Genen *inv* und *ail* die Invasion ins Darmepithel zugeschrieben [Miller & Falkow, 1988].

Über Bindung an β 1-Integrine fördert Invasin die Internalisierung in Epithelzellen des Dünndarms [Clark *et al.*, 1998]. Durch Invasin-Bindung an Integrine erfolgt die Umstrukturierung des Wirtszell-Zytoskeletts, was in der Phagozytose und Internalisierung der Bakterien in die Epithelzellen resultiert [Atkinson & Williams, 2016]. Dabei bindet Invasin mit einer ~100-fach höheren Affinität an Integrine als der natürliche Ligand Fibronectin, was maßgeblich zur Effizienz der Internalisierung beiträgt [Van Nhieu & Isberg, 1991; Hamburger *et al.*, 1999; Atkinson & Williams, 2016]. Während beide enteropathogenen *Yersinia*-Spezies Invasin exprimieren [Isberg *et al.*, 1987], handelt es sich bei *Y. pestis* um ein inaktives Pseudogen [Parkhill *et al.*, 2001]. In *Y. enterocolitica* wird die Invasin-Expression über die Temperatur und den pH-Wert reguliert [Isberg *et al.*, 1988; Pepe *et al.*, 1994]. Obwohl die maximale Expression von *inv* bei 26 °C erfolgt, wird das Protein im vergleichbaren Maße auch bei 37 °C unter sauren Bedingungen gebildet [Pepe *et al.*, 1995]. Die Invasin-Expression bei Umgebungstemperaturen könnte die Keime auf

die Infektion vorbereiten sowie eine schnelle Transzytose durch das Epithel fördern [Grassl *et al.*, 2003] und so vor allem in der frühen Phase der Infektion von Bedeutung sein.

Im Gegensatz zu Invasin wird das Oberflächenprotein Ail bei 37 °C maximal exprimiert [Miller & Falkow, 1988]. Für *Y. enterocolitica* und *Y. pestis* wurde die Ail-vermittelte Bindung an verschiedene Epithelzelllinien und Bestandteile der extrazellulären Matrix, darunter Fibronectin und Laminin, beschrieben [Chauhan *et al.*, 2016]. Neben den Adhärenz-vermittelnden Eigenschaften ist Ail an der Serum-Resistenz aller drei humanpathogener *Yersinia* spp. beteiligt [Miller *et al.*, 1989; Pierson & Falkow, 1993] und liefert Schutz vor der Komplement-Vernichtung [Biedzka-Sarek *et al.*, 2005; Kirjavainen *et al.*, 2008].

I.3.2 Das Virulenzplasmid

Ein weiterer Faktor, der Serum-Resistenz vermittelt [Balligand *et al.*, 1985] und ebenfalls die Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix von eukaryonten Wirtszellen ermöglicht [Emödy *et al.*, 1989; Tertti *et al.*, 1992] sowie an der Phagozytose-Resistenz und Invasion beteiligt ist [Heesemann *et al.*, 1987], wird als *Yersinia* Adhäsins A (YadA) bezeichnet [Mühlenkamp *et al.*, 2015]. Als nicht-fimbrien-ähnliches Adhäsins zählt es zu der Familie der trimeren Autotransporter-Adhäsine [Mikula *et al.*, 2013]. YadA hat die Form eines Lollipop mit einer N-terminalen Kopfdomäne, einer superspiralisierten (*coiled-coil*) Stiel-Region und einer C-terminalen Anker-Domäne, mit der das Protein in die äußere Membran eingebettet ist [Hoiczky *et al.*, 2000]. Die Expression von YadA unterliegt der Regulation durch LcrF und wird bei 37 °C induziert [Zaleska *et al.*, 1985; Skurnik & Toivanen, 1992], unmittelbar nach dem Überwinden der intestinalen Mukosa [Mikula *et al.*, 2013]. Dabei wird es in solch großen Mengen produziert, dass es praktisch die gesamte Bakterienoberfläche ummantelt [Hoiczky *et al.*, 2000]. YadA ist essentiell für die Virulenz von *Y. enterocolitica* [Roggenkamp *et al.*, 1995], aber nicht für jene von *Y. pseudotuberculosis* [Han & Miller, 1997]. In *Y. pestis* ist *yadA* allerdings ein inaktives Pseudogen, da eine einzelne Nukleotid-Deletion zu einer *frame-shift* Mutation führte [Skurnik & Wolf-Watz, 1989].

Das *yadA*-Gen lokalisiert auf einem 70 kb großen Plasmid, das vorrangig die *Yersinia*-Virulenz bestimmt, welches daher auch als „pYV“, *plasmid of Yersinia virulence*, bezeichnet wird. Alle pathogenen *Yersinia*-Spezies verfügen über dieses Virulenz-Plasmid, wobei *Y. pestis* zusätzlich noch zwei weitere besitzt, das 10 kb große Pesticin- oder Pst-Plasmid und das 100 kb große Exotoxin- oder Tox-Plasmid [Brubaker, 1991].

Neben YadA kodiert pYV für ein Arsenal toxischer Effektor-Proteine, den sogenannten *Yersinia outer proteins* (Yops), die über einen raffinierten Exportapparat sekretiert und direkt in humane

Zielzellen injiziert werden. Diese heute als Typ III Sekretionssystem (T3SS) bekannte Maschinerie wird ebenfalls vom pYV-Plasmid kodiert und sowohl ihre Expression als auch die der *yop*-Gene unterliegen der Kontrolle des globalen Regulators LcrF (auch VirF in *Y. enterocolitica*) [Cornelis *et al.*, 1998]. *lcrF* wird temperaturabhängig transkribiert, was wiederum die temperaturregulierte Expression der *yop*-Gene bedeutet [Cornelis *et al.*, 1989]. Schon seit den 50er Jahren ist bekannt, dass *Y. pestis* nicht mehr in der Lage ist, bei 37 °C und Ca²⁺-Mangel zu wachsen [Higuchi & Smith, 1961] und, dass diese Bedingungen zur Synthese des T3SS und der Yops führen [Cornelis *et al.*, 1998]. Heute ist klar, dass Virulenz und Ca²⁺-Abhängigkeit auf dem pYV-Plasmid kodiert sind [Zink *et al.*, 1980; Gemski *et al.*, 1980] und Bedingungen der Wachstumsunterdrückung die Expression von pYV aktivieren [Cornelis *et al.*, 1998]. Unter den verschiedensten Funktionen von YadA besteht seine Hauptaufgabe als Adhäsion vermutlich in einer Art Kopplungs- oder „Andock“-Reaktion, die es dem T3SS erlaubt, in engen Kontakt mit der Zielzellmembran zu gelangen und die Effektor-Yops zu translozieren [Visser *et al.*, 1995].

I.4 Typ III Sekretionssystem

Viele Bakterien leben in enger Gemeinschaft mit anderen Organismen, z.B. als Teil eines Biofilms oder in symbiontischer oder pathogener Beziehung zu einem Wirt, wobei sie die jeweilige Interaktion durch Proteinsekretion beeinflussen [Tseng *et al.*, 2009]. Mittlerweile sind sieben verschiedene Sekretionssysteme in Gram-negativen und -positiven Bakterien beschrieben [Tseng *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015]. Zu den komplexesten und am besten untersuchten Systemen zählt das Typ III Sekretionssystem (T3SS) [C J Hueck, 1998; Büttner, 2012; Abby *et al.*, 2012; Notti & Erec Stebbins, 2016; Portaliou *et al.*, 2016], das vor allem von Gram-negativen Tier- und Pflanzen-Pathogenen, aber auch von einigen Endosymbionten gebildet wird [Mota, Sorg, *et al.*, 2005; Cornelis, 2006; Grant *et al.*, 2006]. Das T3SS, häufig auch als Injektisom bezeichnet [Cornelis, 2006; Dewoody *et al.*, 2013], erlaubt adhären Pathogenen bakterielle Proteine, sogenannte Effektoren, direkt in das Zytosol der Wirtszelle zu injizieren [Rosqvist *et al.*, 1991; Sory & Cornelis, 1994; Rosqvist *et al.*, 1995; Cornelis & Wolf-Watz, 1997; Galán & Collmer, 1999; Cornelis & Van Gijsegem, 2000], wo sie die zellulären Funktionen manipulieren und so das bakterielle Überleben und die Kolonisation des Wirtes sichern [Deng *et al.*, 2017]. Dieser als Translokation bezeichnete Mechanismus ermöglicht den Eintritt der Effektoren in die Zellen und setzt sich aus den beiden Prozessen der Sekretion, also des gerichteten Transports über die bakterielle Zellwand, und des Überwindens der Plasmamembran von Zielzellen zusammen. Bislang sind insgesamt über 100 verschiedene Effektor-Proteine bekannt [Cornelis, 2006], wobei Anzahl und Funktion der artspezifischen Effektoren zwischen den Bakterien variieren, was die

Anpassung an die einzigartigen Bedingungen einer jeden pathogenen oder symbiontischen Interaktion zum jeweiligen Wirt widerspiegelt [Tampakaki *et al.*, 2004; Mota, Sorg, *et al.*, 2005; Galán, 2009; van der Heijden & Finlay, 2012; Deng *et al.*, 2017]. Im Gegensatz zur hohen Diversität der Effektoren sind T3S-Maschinerie und Sekretionsmechanismus stark konserviert [Cornelis, 2006; Galán & Wolf-Watz, 2006; Deng *et al.*, 2017]. Zunächst beschrieben in *Yersinia* spp. [Rosqvist *et al.*, 1994], wurden homologe T3SS in vielen Gram-negativen Pathogenen gefunden, darunter *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), *Bordetella pertussis* und *Chlamydia* spp. (zusammengefasst in [Troisfontaines & Cornelis, 2005]). Obwohl für alle diese Keime das T3SS essentiell für die Virulenz ist, unterscheiden sich ihre Strategien zur Vermehrung in spezieseigenen Nischen und Etablierung der Infektion deutlich [Raymond *et al.*, 2013]. Während *Salmonella*, *Shigella* und *Chlamydia* Spezies mit Hilfe des T3SS ihre eigene Aufnahme in nicht-phagozytierende Wirtszellen fördern, um einen intrazellulären Lebenszyklus zu etablieren [Beeckman & Vanrompay, 2010; van der Heijden & Finlay, 2012; Raymond *et al.*, 2013; Nans *et al.*, 2014], nutzen extrazelluläre Pathogene wie EHEC, EPEC, *Pseudomonas* und *Yersinia* spp. das T3SS, um durch Modulierung des Zytoskeletts und Unterdrückung der Immunantwort schließlich die Phagozytose zu verhindern [Miyata *et al.*, 2003; Bliska *et al.*, 2013; Santos & Finlay, 2015]. Durch phylogenetische Analysen lassen sich die T3SS in sieben Subfamilien klassifizieren, die interessanterweise stark von der auf 16 S rRNA basierenden Zuordnung evolutionärer Abstammung abweichen [Gupta, 2000; Troisfontaines & Cornelis, 2005], was darauf hindeutet, dass die Injektisomen-kodierenden Gene über lateralen Gentransfer verbreitet wurden [Cornelis, 2006]. Das Ysc-Injektisom (*Yersinia secretion*) der *Yersinia* spp. bildet die Urform einer dieser Familien und ist auf dem pYV-Plasmid kodiert. Zur selben Familie zählen u.a. auch das Psc-System von *Pseudomonas aeruginosa* und das Asc-System von *Aeromonas* spp. [Troisfontaines & Cornelis, 2005; Cornelis, 2006].

Die Injektisomen teilen einen gemeinsamen evolutionären Vorfahren mit dem bakteriellen Flagellum [Gophna *et al.*, 2003; Troisfontaines & Cornelis, 2005], welches die Motilität von Bakterien ermöglicht. Beide Systeme besitzen einen Basalkörper, der die beiden bakteriellen Membranen durchspannt [Blocker *et al.*, 2003; Macnab, 2004; Erhardt *et al.*, 2010], eine ATPase, die die Energie für die Rotation bzw. die Sekretion liefert und ein Hohlfilament, das in beiden Fällen ein Polymer aus einem einzigen Protein darstellt und in den extrazellulären Raum ragt. Während beim Flagellum das Filament seine Rotation in eine Antriebskraft übersetzt, überbrückt die Hohnadel der Injektisomen die Lücke zwischen Bakterium und Wirtszelle und erlaubt die direkte Effektortranslokation [Diepold & Wagner, 2014]. An Zusammenbau und Funktion dieser komplexen multi-Megadalton Maschinerie sind mehr als 20 Proteine beteiligt [Christoph J Hueck,

1998; Macnab, 2003; Cornelis, 2006; Schraidt & Marlovits, 2011; Büttner, 2012; Burkinshaw & Strynadka, 2014; Diepold & Wagner, 2014; Gaytán *et al.*, 2016; Notti & Erec Stebbins, 2016; Portaliou *et al.*, 2016], die in den verschiedenen Bakterien spezifisch benannt wurden, was speziesübergreifende Vergleiche erschwert [Deng *et al.*, 2017]. Als einheitliche Nomenklatur für konservierte Komponenten wurde das Präfix Sct (*secretion and translocation*) vorgeschlagen (Hueck 1998), was zunehmend angenommen und kürzlich weiter ergänzt wurde [Diepold & Wagner, 2014; Gaytán *et al.*, 2016; Portaliou *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2017]. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird dennoch die *Yersinia* Ysc-Nomenklatur im Folgenden verwendet. In Abb. 1 sind Struktur und Aufbau des T3SS zusammengefasst (Abb. 1 links). Für viele T3SS gibt es bereits hochaufgelöste kryo-elektronenmikroskopische Modelle. Beispielhaft sind 3D-Rekonstruktionen von *Salmonella*-Injektisomen gezeigt (Abb. 1 rechts). Vollständig assemblierte Injektisomen lokalisieren in Gruppen auf der Bakterienoberfläche und neu geformte Nadeln scheinen eher in diese Cluster integriert zu werden, als willkürlich zu arrangieren [Kudryashev *et al.*, 2015]

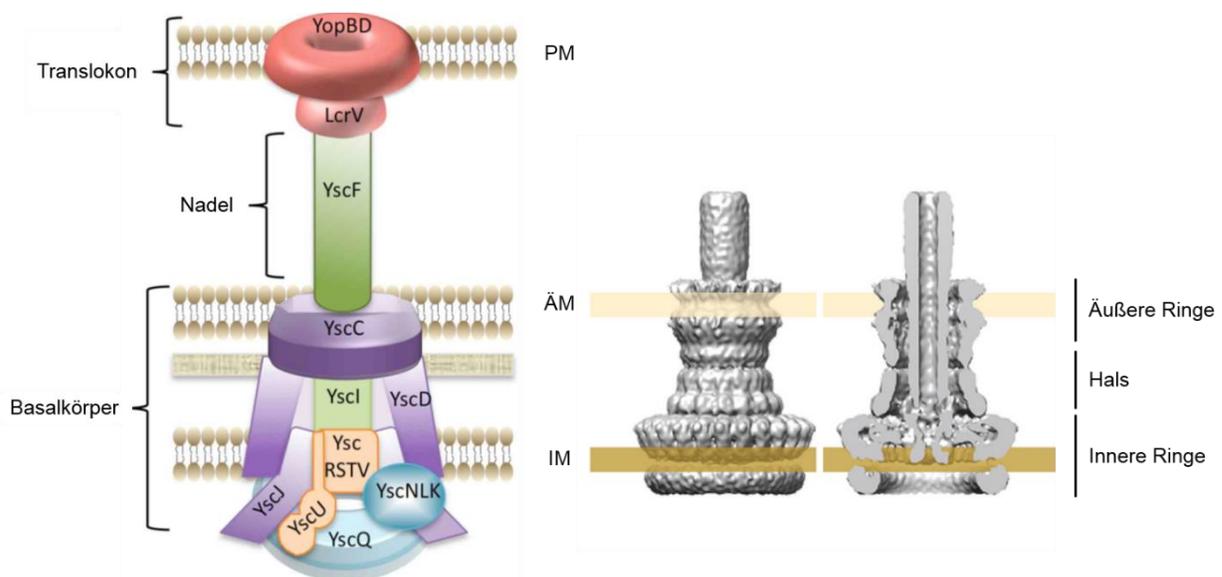


Abb. 1: Aufbau des Injektisoms.

Links: Das Schema veranschaulicht das T3SS mit gekennzeichneten strukturellen Komponenten. Der Basalkörper durchspannt die innere und äußere Bakterienmembran (IM, ÄM). Das Translokon wird bei Zellkontakt in die Plasmamembran (PM) der Wirtszelle inseriert. Gerüstproteine (lila): YscC, YscD, YscJ; Proteine des Exportapparates (orange): YscR, YscS, YscT, YscU, YscV; zytosolische Komponenten (blau): YscQ (C-Ring), YscN, YscL, YscK (ATPase-Komplex); Nadelkomplex (grün): YscI (Rohr), YscF (Nadel); Porenkomplex (rot): LcrV (Nadelspitzenkomplex), YopB/YopD (Translokationspore). Modifiziert nach [Dewoody *et al.*, 2013]. **Rechts:** Gezeigt sind Oberflächenrepräsentationen von 3D-Rekonstruktionen der Injektisomen von *Salmonella* sp. basierend auf cryo-elektronenmikroskopischen Daten (Seitenansicht und Querschnitt, Daten im Original von Thomas Marlovits, mod. nach [Diepold & Wagner, 2014]).

I.4.1 Der Basalkörper

Das *Yersinia*-Injektisom wird von rund 25 Proteinen aufgebaut [Cornelis, 2006], die durch *ysc*-Gene (*Yersinia secretion proteins*) kodiert sind, und lässt sich grob in einzelne Substrukturen einteilen. Dazu zählen neben zytosolischen Komponenten ein innerer und äußerer Membranexportapparat, ein Grundgerüst, die Nadel und die Translokationspore in der Wirtszellmembran [Deng *et al.*, 2017]. Das Grundgerüst besteht aus einer Reihe von konzentrischen Ringen, die in die innere und äußere Bakterienmembran eingebaut sind [Schraidt *et al.*, 2010; Schraidt & Marlovits, 2011; Burkinshaw & Strynadka, 2014; Portaliou *et al.*, 2016]. Der Zusammenbau des Basalkörpers beginnt mit der Oligomerisierung von YscC (SctC), das den äußeren Membran (ÄM) -Ring bildet und bis ins Periplasma reicht [Koster *et al.*, 1997; Diepold *et al.*, 2010], wobei ein in der ÄM verankertes Lipoprotein (Pilotin, YscW) die korrekte Insertion lenkt [Daefler & Russel, 1998; Crago & Koronakis, 1998; Burghout *et al.*, 2004]. Anschließend bildet YscD (SctD) einen Ring in der inneren Membran (IM), welcher vermutlich die inneren und äußeren Membranringe verbindet [Spreter *et al.*, 2009; Diepold *et al.*, 2010; Ross & Plano, 2011] und durch die Rekrutierung von YscJ (SctJ) komplettiert wird [Yip *et al.*, 2005; Hodgkinson *et al.*, 2009; Diepold *et al.*, 2010].

An der zytosolischen Seite des Basalkörpers befindet sich der ATPase-Komplex, aufgebaut aus YscN, YscO, YscK und YscL (SctN, SctO, SctK und SctL). Als ATPase sorgt YscN für das Abtrennen der Chaperone und das Entfalten der Substrate [Akedo & Galán, 2005], wobei die protonenmotorische Kraft den tatsächlichen Export antreibt [Wilharm *et al.*, 2004]. YscO hingegen ragt wie eine Art Stiel vom ATPase-Zentrum heraus und stellt die Verbindung zum Exportapparat her [Ibuki *et al.*, 2011; Ibuki *et al.*, 2013]. Während YscL die ATPase-Aktivität negativ reguliert, ist die Funktion von YscK bisher unbekannt [Blaylock *et al.*, 2006]. Als weitere zytoplasmatische Komponente wird YscQ (SctQ) als Baustein des C-Rings angenommen, basierend auf Homologien zur Flagellen-Komponente [Driks & DeRosier, 1990; Khan *et al.*, 1992; Kubori *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2003] und Kollokalisierung mit YscC in der Membran [Diepold *et al.*, 2010] sowie mit dem ATPase-Komplex [Jackson & Plano, 2000].

Fünf integrale Membranproteine, YscRSTUV (SctRSTUV), assemblieren zum Exportapparat [Fields *et al.*, 1994; Allaoui *et al.*, 1994; Ghosh, 2004; Spreter *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2010] unabhängig von den Gerüstproteinen in der Membran [Diepold *et al.*, 2011]. Der Exportapparat wird an dieser Stelle zu YscJ in der IM rekrutiert [Diepold *et al.*, 2011]. Durch das Zusammenfügen von Grundgerüst, ATPase-Komplex und Exportapparat wird der Basalkörper vervollständigt und ist nun bereit, die Sekretionssubstrate zu exportieren [Dewoody *et al.*, 2013].

I.4.2 Das Nadel-Filament

Nach der Fertigstellung des Basalkörpers können die zur Nadelassemblierung benötigten Proteine exportiert werden. Dieser Zeitpunkt wird auch als „frühe“ Phase bezeichnet [Dewoody *et al.*, 2013]. Zu diesen „frühen“ Substraten zählt u.a. YscI (SctI), von dem angenommen wird, dass es eine Art Rohr bildet, welches den Substrat-Transport über die innere Membran erlaubt [Allaoui *et al.*, 1995; Sukhan *et al.*, 2003; Marlovits *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2008; Sal-Man *et al.*, 2012]. Das Nadelprotein YscF (SctF) wird durch das YscI-Rohr sekretiert [Diepold *et al.*, 2012] und formt durch helikale Polymerisation die extrazelluläre Hohnadel [Cordes *et al.*, 2003; Deane *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2012; Loquet *et al.*, 2012], die bei *Y. enterocolitica* eine Länge von ~58 nm erzielt und einen Durchmesser von ~6-7 nm außen bzw. ~2-3 nm innen erreicht [Kubori *et al.*, 1998; Blocker *et al.*, 2001; Hoiczky & Blobel, 2001; Journet *et al.*, 2003; Sorg *et al.*, 2007]. Da der innere Durchmesser relativ klein ist, durchwandern die T3S-Substrate die Nadel in einem voll- oder halbentfalteten Zustand [Blocker *et al.*, 2001; Radics *et al.*, 2014; Dohlich *et al.*, 2014]. Die Länge der Nadel wird maßgeblich durch YscP kontrolliert, das vermutlich wie ein molekulares Lineal arbeitet, da seine Länge mit der der Nadel korreliert und ein *knock out* zu unkontrolliert langen Nadeln führt [Journet *et al.*, 2003; Mota, Journet, *et al.*, 2005; Cornelis, 2006]. Ist die korrekte Nadellänge erreicht, kommt es zu einem Substratwechsel, was zur Sekretion und abschließenden Anlagerung des hydrophilen Translokator-Proteins LcrV am distalen Ende der Nadelspitze führt [Mueller *et al.*, 2005; Broz *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2008] und so eine weitere Verlängerung der Nadel blockiert [Poyraz *et al.*, 2010]. Sobald der Zusammenbau des T3SS abgeschlossen ist, ruht das Injektisom in einer Art „Standby“-Zustand und ist bereit für die Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle [Enninga & Rosenshine, 2009]. Eine vorzeitige Sekretion der „späten“ Substrate (der Effektor-Yops) in Abwesenheit eukaryonter Zellen oder *in vitro* in Ca^{2+} -haltiges Medium wird durch den sogenannten Ca^{2+} -Stopfen, bestehend aus YopN, TyeA, YscB und SycN, verhindert [Yother & Goguen, 1985; Forsberg *et al.*, 1991]. Erst durch Aktivierung des T3SS, entweder durch Zellkontakt oder durch Ca^{2+} -Chelatierung, wird die TyeA-Interaktion mit dem Exportapparat gestört und YopN durch das Injektisom exportiert, was die Blockade aufhebt [Dewoody *et al.*, 2013; Plano & Schesser, 2013]. Die YopN-vermittelte Kontrolle der Yop-Sekretion erfolgt durch seine intrabakterielle Lokalisation [Ferracci *et al.*, 2005], jedoch sind es extrazelluläre Stimuli, die den Effektortransport initiieren. Gegenwärtige Erkenntnisse lassen vermuten, dass das Nadel-Filament selbst an der Detektion und Transmission dieser externen Signale beteiligt ist [Torruellas *et al.*, 2005; Kenjale *et al.*, 2005]. Ein aktuelles Modell (Abb. 2) beschreibt zusätzlich die Beteiligung der Translokationspore an der Detektion des Zellkontaktes, wobei die Wahrnehmung des Wirtszellkontaktes eine Konformationsänderung in der Pore initiiert, die sukzessive über die

Verbindung mit der Nadelspitze zur Basis des Injektisoms übertragen wird [Armentrout & Rietsch, 2016].

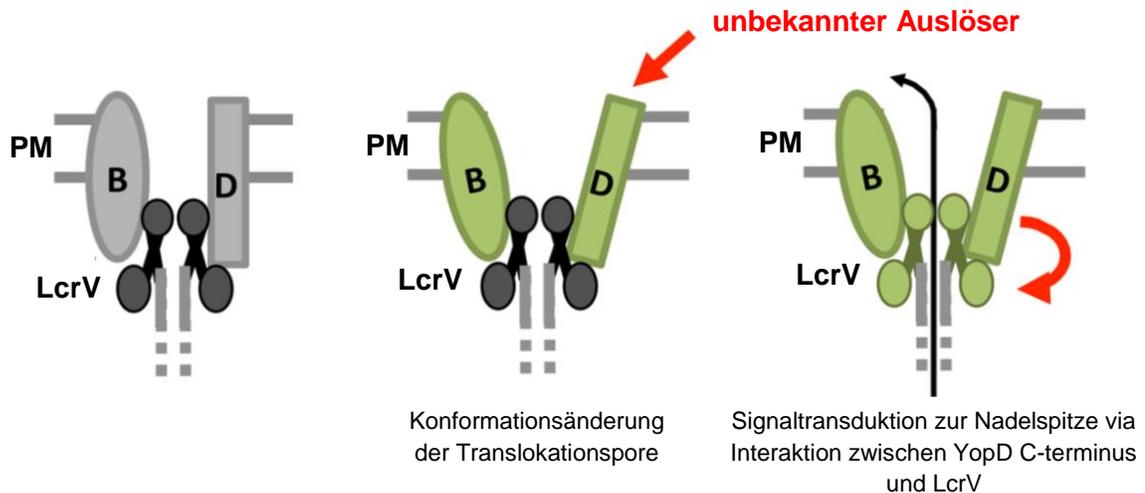


Abb. 2: Modell der Translokation-Funktion

Sobald die Translokatoren YopB (B) und YopD (D) in die Plasmamembran (PM) inserieren (links), wird über einen bislang unbekanntem Auslöser eine Konformationsänderung in der Translokationspore bewirkt (Mitte). Über die Interaktion des C-Terminus von YopD und LcrV wird das Signal zur Nadelspitze und von dort weiter zur Basis des T3SS übertragen (rechts). (mod. nach Armentrout & Rietsch 2016).

I.4.3 Das Translokation

Ein aktives Injektisom endet mit der Translokationspore, die bei Zellkontakt in die Plasmamembran der Wirtszelle inseriert [Håkansson, Galyov, *et al.*, 1996; Blocker *et al.*, 1999; Neyt & Cornelis, 1999a]. Der auch als Translokation bezeichnete Komplex besteht im Allgemeinen aus drei Proteinen, die Typ III (T3)-abhängig durch die Nadel exportiert werden und als Pore in der Wirtszellmembran den Eintritt toxischer Effektoren erlauben [Matteï *et al.*, 2011]. Dazu zählen die beiden hydrophoben Membranproteine YopB und YopD sowie das hydrophile Nadelspitzen-Protein LcrV [Cornelis, 2006; Dewoody *et al.*, 2013]. Diese drei Translokation-Yops werden in den extrazellulären Raum während der Infektion kultivierter Zellen oder *in vitro* in Ca^{2+} -depletiertes Medium sezerniert [Heesemann *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1998; Cheng & Schneewind, 2000; DeBord *et al.*, 2001; Houppert *et al.*, 2012]. Dies deutet an, dass sie bereits vor Zellkontakt exportiert werden [Pettersson *et al.*, 1999], weshalb sie auch als „mittlere Substrate“ bezeichnet werden [Dewoody *et al.*, 2013]. Die Gene, die für die Translokation kodieren, sind im gemeinsamen *lcrGVsycDyopBD*-Operon arrangiert [Mulder *et al.*, 1989; Price *et al.*, 1989; Bergman *et al.*, 1991; Håkansson *et al.*, 1993], welches zusätzlich zwei Elemente für die Chaperone LcrG und SycD (LcrH in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) beinhaltet [Matteï *et al.*, 2011].

SycD (*specific Yop chaperone*, [Cornelis, 1998]) besitzt regulatorische Eigenschaften [Price & Straley, 1989; Bergman *et al.*, 1991; Francis *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2002] und ist ein bivalentes Chaperon, das an YopB und YopD bindet („Klasse II Chaperon“) [Neyt & Cornelis, 1999b; Tengel *et al.*, 2002]. Durch Bindung der Klasse II Chaperone lässt sich die sonst toxische Wirkung der hydrophoben Translokatoren in der Bakterienzelle neutralisieren [Wattiau *et al.*, 1994; Ménard *et al.*, 1994; Neyt & Cornelis, 1999b]. Generell verhindern T3S-Chaperone die vorzeitige Aggregation der Substrate und bewahren sie in einem teilentfalteten Zustand, damit sie den engen Exportkanal des Injektisomens passieren können. Die ATPase an der zytosolischen Seite des T3-Exportapparates liefert die erforderliche Energie für die Chaperon-Freisetzung und weitere Entfaltung der Substrate [Akeda & Galán, 2005; Galán, 2008]. Weiterhin ist auch LcrG essentiell für die Translokation (Skrzypek & Straley 1993; Sarker *et al.* 1998) und besitzt ebenfalls eine regulatorische Funktion [Price *et al.*, 1989; Bergman *et al.*, 1991; Nilles *et al.*, 1997; Nilles *et al.*, 1998; Matson & Nilles, 2002; Hamad & Nilles, 2007]. Als zytosolisches Protein und Teil des Ca²⁺-abhängigen regulatorischen Netzwerks [Skrzypek & Straley, 1993] reprimiert LcrG die Yop-Sekretion, indem es zusätzlich zu YopN die Ysc-Maschinerie blockiert [Marenne *et al.*, 2003], bis durch Zellkontakt oder Ca²⁺-Depletion die intrabakterielle Konzentration von LcrV steigt. Als Chaperon für LcrV [DeBord *et al.*, 2001; Matson & Nilles, 2001; Matteï *et al.*, 2011; Chaudhury *et al.*, 2015] wird LcrG durch Bildung stabiler LcrV-LcrG-Komplexe titriert, was die Blockade entfernt und die Yop-Sekretion erlaubt [Nilles *et al.*, 1997; Matson & Nilles, 2001].

Im Gegensatz zu SycD und LcrG, die die Sekretion regulieren [Wattiau *et al.*, 1994; Matson & Nilles, 2001], sind die Translokon-Komponenten für den Effektorexport entbehrlich, aber unverzichtbar für die Translokation [Hartland *et al.*, 1994; Rosqvist *et al.*, 1994; Sory & Cornelis, 1994; Håkansson, Schesser, *et al.*, 1996; Nilles *et al.*, 1997; Francis & Wolf-Watz, 1998; Sarker, Neyt, *et al.*, 1998; Matteï *et al.*, 2011]. Dafür ist die Interaktion von LcrV mit den beiden hydrophoben Translokatoren YopB und YopD von entscheidender Bedeutung [Marenne *et al.*, 2003]. YopB und YopD sind in der Lage miteinander zu interagieren [Neyt & Cornelis, 1999b] und bilden eine Membranpore in kernhaltige Zellen, Erythrozyten und sogar in Liposomen [Håkansson, Schesser, *et al.*, 1996; Neyt & Cornelis, 1999a; Tardy *et al.*, 1999; Goure *et al.*, 2004; Faudry *et al.*, 2006]. Durch Osmoprotektions- und Farbstofffreisetzungsexperimente lässt sich der innere Durchmesser der Translokationspore ermitteln, der in *Yersinia* spp., *Shigella* spp. und *Pseudomonas* spp. 1,2-3,5 nm umfasst [Håkansson, Schesser, *et al.*, 1996; Holmström *et al.*, 1997; Blocker *et al.*, 1999; Neyt & Cornelis, 1999a; Dacheux *et al.*, 2001]. Dies wurde mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen Liposomen-assoziiierter PopBD-Strukturen (*Pseudomonas*-Homologe zu YopBD) und *atomic force*-Mikroskopie von EPEC-induzierten Poren in Erythrozyten bestätigt [Ide *et al.*, 2001; Schoehn *et al.*, 2003] und korreliert mit dem inneren

Durchmesser der T3S-Nadel [Cordes *et al.*, 2003]. Durch Isolation des nativen YopB/D-Porenkomplexes aus Erythrozytenmembranen konnte die Größe des multimeren Komplexes auf 500-700 Kilodalton (kDa) bestimmt werden, was in etwa einer Stöchiometrie von 15-20 Untereinheiten beider Translokatoren entspricht [Montagner *et al.*, 2011]. Der hydrophile Translokator LcrV lässt sich jedoch nicht aus Wirtszellmembranen isolieren [Blocker *et al.*, 1999; Goure *et al.*, 2004; Goure *et al.*, 2005]. Stattdessen bildet LcrV einen pentameren Komplex am distalen Ende der Injektisomennadel und unterstützt als eine Art Assemblierungsplattform die korrekte Faltung und Insertion der YopB/D-Translokationspore in die Wirtszellmembran [Mueller *et al.*, 2005; Broz *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2008].

Obwohl Membranporen durch biochemische Verfahren nachweisbar sind, ist es bisher nicht gelungen, native, von Injektisomen natürlicherweise inserierte Translokationsporen direkt mittels Elektronenmikroskopie zu visualisieren [Cornelis, 2006]. Daher bleiben Struktur und Stöchiometrie physiologischer Translokons weiterhin unbekannt. Vor Kurzem zeigten Romano und Kollegen, dass die rekombinanten YopB- und YopD-Homologe aus *P. aeruginosa*, PopB und PopD, als Homo- oder Heterokomplexe in künstliche Membranen inserieren und ermittelten mittels *single molecule fluorescence photobleaching* eine hexadekamere Stöchiometrie dieser Heterokomplexe mit je acht Molekülen PopB und PopD [Romano *et al.*, 2016].

Gegenwärtig gibt es sehr wenig hochaufgelöste Strukturinformationen von den Translokatoren, vor allem im Kontext einer assemblierten Pore. Die Kristallstruktur von LcrV konnte bereits vor einiger Zeit entschlüsselt werden [Derewenda *et al.*, 2004]. Kürzlich gelang auch erstmals die Strukturauflösung des großen Translokators und YopB-Homologen AopB von *Aeromonas hydrophila* im Komplex mit seinem Chaperon AcrH [Nguyen *et al.*, 2015]. Abb. 3 zeigt die gelöste Struktur des Komplexes, wobei die N-Termini beider Moleküle ineinander greifen (Abb. 3). Allerdings sei hier zu beachten, dass sich die Struktur eines Translokators im Komplex mit seinem Chaperon deutlich von der in der physiologischen Transmembranpore unterscheiden kann und keinen Aufschluss über die Faltung des Translokators oder die Interaktion mit weiteren Untereinheiten der Pore innerhalb der Plasmamembran gibt.

Kürzlich durchgeführte genomweite Screens zeigten, dass Assemblierung und Funktion der Translokationsporen den CC-Chemokin-Rezeptor 5 (CCR5; für *Y. pestis* [Sheahan & Isberg, 2015]), Sulfatierung und Fucosylierung der Wirtszelloberfläche (für *Vibrio parahaemolyticus* [Blondel *et al.*, 2016]) oder das intermediäre Filament Vimentin (für *Yersia* spp., *Shigella* spp. und *Salmonella* spp. [Russo *et al.*, 2016]) benötigen. Verschiedene Proteine des Wirtes scheinen daher als Rezeptor für den Zusammenbau der Translokationspore zu fungieren und bei der korrekten Kontaktaufnahme des T3SS zu helfen [Deng *et al.*, 2017].

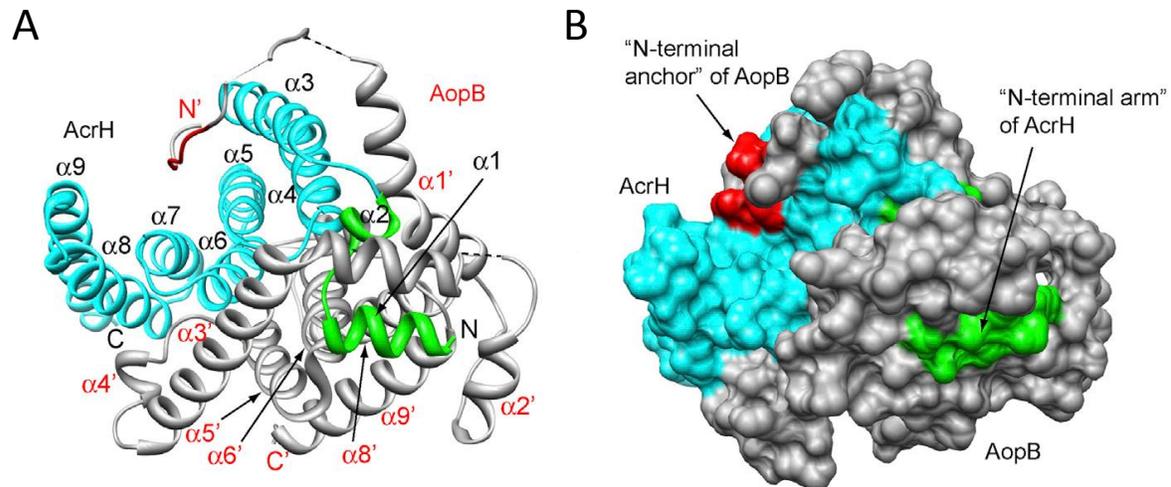


Abb. 3: Struktur des AcrH-AopB₄₀₋₂₆₄-Komplexes

Dargestellt ist die Kristallstruktur von AcrH-AopB₄₀₋₂₆₄ und zeigt als Strukturmerkmal von AcrH (cyan) den „N-terminalen Arm“ (grün) und von AopB (grau) den „N-terminalen Anker“ (rot). **A:** *Ribbon*-Diagramm mit angezeigten α -Helices und Termini von AcrH (schwarz) und AopB (rot). **B:** Oberflächendiagramm in gleicher Orientierung und Farbschattierung wie A. [Nguyen *et al.*, 2015]

I.4.3.1 LcrV – der *tip*-Komplex

Das hydrophile Protein LcrV wurde schon vor mehr als 60 Jahren als lösliches, protektives Antigen entdeckt und erhielt daher den Namen „V-Antigen“ [Bacon & Burrows, 1956]. Tatsächlich führt die Immunisierung gegen LcrV oder PcrV zur Bildung von Antikörpern, die vor einer *Yersinia*- bzw. *Pseudomonas*-Infektion in Tiermodellen schützen [Une & Brubaker, 1984; Anderson *et al.*, 1996; Sawa *et al.*, 1999], weshalb LcrV in die Entwicklung von Pest-impfstoffen einbezogen wurde [Wang *et al.*, 2004; DeBord *et al.*, 2006].

Während der Infektion vollführen die hydrophilen Translokatoren verschiedene Aufgaben und sind z.B. beteiligt an der Regulation der Sekretion, an der Ausnutzung von Prozessen in der Wirtszelle oder an der Translokation von Toxinen [Mattei *et al.*, 2011]. So führt die Aktivierung des T3SS in *Yersinia* zur vermehrten Synthese von LcrV, welches LcrG in Form von 1:1 Komplexen bindet und damit die LcrG-vermittelte Sekretionsblockade aufhebt [Matson & Nilles, 2001; Matson & Nilles, 2002]. Die Interaktion von LcrV mit Makrophagen induziert die Bildung von antiinflammatorischen Zytokinen (Interleukin 10 [IL10]) und vermindert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Tumornekrosefaktor α [TNF α], Interferon γ [IFN γ]) [Nakajima & Brubaker, 1993; Nedialkov *et al.*, 1997; Sing *et al.*, 2002; Gendrin *et al.*, 2010]. Zusätzlich kann LcrV über seinen N-Terminus an Rezeptoren von Immunzellen binden (TLR2, CD14) [Sing *et al.*, 2002] und die chemotaktische Migration von Neutrophilen verhindern [Welkos *et al.*, 1998]. LcrV und das *Shigella*-Homolog IpaD wurden vor Zellkontakt auf der Bakterienoberfläche nachgewiesen [Ménard *et al.*, 1994; Watarai *et al.*, 1995; Pettersson *et al.*, 1999], wobei sie eine geordnete

Struktur an der Spitze der Sekretionsnadel bilden [Mueller *et al.*, 2005; Espina *et al.*, 2006; Sani *et al.*, 2007]. Strukturell weisen die hydrophilen Translokatoren eine hantelförmige Faltung auf [Derewenda *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2007] und bilden einen pentameren Komplex am distalen Ende der Nadel [Derewenda *et al.*, 2004; Deane *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von LcrV und ein Modell der pentameren Nadelspitze sind in Abb. 4 zusammengefasst. *In vitro* können LcrV und PcrV zu einem ringförmigen Hohlkörper multimerisieren, dessen Dimensionen denen von PopB/PopD-membranassoziierten Ringen ähneln [Schoehn *et al.*, 2003; Gébus *et al.*, 2008]. In Shigellen können die hydrophoben Translokatoren an das Nadelspitzenprotein IpaD binden, vermutlich den Kontakt zur Wirtszelle wahrnehmen und diese Information sukzessive über die Nadel ins bakterielle Zytoplasma übertragen [West *et al.*, 2005; Veenendaal *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007; Olive *et al.*, 2007; Roehrich *et al.*, 2010]. Ähnliches wurde kürzlich auch für PcrV in *Pseudomonas* spp. beschrieben [Armentrout & Rietsch, 2016].

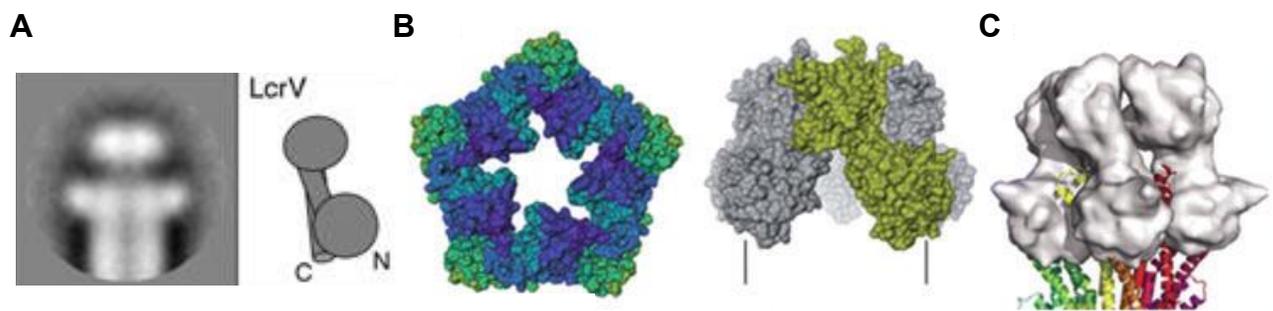


Abb. 4: Der Nadel-*tip*-Komplex LcrV.

A: Gemittelte Projektion von STEM-Bildern (*scanning transmission electron microscopy*) des LcrV-*tip*-Komplexes. Die schematische Darstellung veranschaulicht Kopf-, Stiel- und Basisdomäne (von oben nach unten). [Broz *et al.*, 2007] **B:** Model des LcrV-Pentamers in Draufsicht und Profilansicht. Ein LcrV-Monomer ist in gelb hervorgehoben, die Linien veranschaulichen den Nadeldurchmesser [Broz *et al.*, 2007]. **C:** Oberflächenrepräsentation des LcrV-*tip*-Komplexes (grau) assembliert auf der MxiH-Nadel von *Shigella* sp, MxiH-Monomere sind in verschiedenen Farben dargestellt [Deane *et al.*, 2006].

Die Hauptfunktion der hydrophilen Translokatoren besteht in seiner Beteiligung an der Effektor-Translokation. Mutanten, in denen das *tip*-Protein deletiert ist, verhindern die Injektion der Effektoren ohne dabei ihre Sekretion zu beeinflussen [Chen *et al.*, 1996; Blocker *et al.*, 1999; Pettersson *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Holmström *et al.*, 2001]. Während die hydrophilen Translokatoren für die Porenbildung *in vitro* verzichtbar sind [De Geyter *et al.*, 2000; Kuelzto *et al.*, 2003; Faudry *et al.*, 2006], kann die korrekte Insertion der hydrophoben Translokatoren in Wirtszellmembranen nicht ohne sie erfolgen [Goure *et al.*, 2004; Goure *et al.*, 2005; Picking *et al.*, 2005; Broz *et al.*, 2007]. Dies wurde u.a. dadurch deutlich, dass spezifische Antikörper gegen LcrV oder PcrV die Bildung und Funktionalität von Translokationsporen beeinträchtigen [Goure *et*

al., 2005]. Wegen der Lokalisation des hydrophilen Translokators am distalen Ende der Nadel und seiner Beteiligung an der Bildung des Translokons wird seine Funktionsweise als Assemblierungsplattform für die Translokationspore angesehen [Mueller *et al.*, 2008]. Mattei *et al.* schlugen zwei Modelle für die Translokon-Assemblierung vor: (i) Beide hydrophoben Translokatoren können einen oligomeren Zustand annehmen, wobei der große Translokator stabil in der Membran inseriert ist und der kleine Translokator als Brückenmolekül zur LcrV-Nadelspitze fungiert. Dies geht einher mit der Beobachtung, dass der kleine hydrophobe Translokator nur oberflächlich an die Membran anlagert. (ii) Das zweite Modell, das ein Heterooligomer beider hydrophoben Translokatoren beschreibt, die beide mit dem V-Antigen Kontakt aufnehmen, wird von den Autoren als weniger wahrscheinlich angesehen [Mattei *et al.*, 2011].

I.4.3.2 YopB – der große hydrophobe Translokator

Der finale Schritt in der T3SS-vermittelten Virulenz besteht in der Übertragung der toxischen Effektorproteine in die Wirtszelle und der dazu erforderlichen Überwindung der Plasmamembran. Realisiert wird dieser Prozess mit Hilfe der beiden hydrophoben Translokatoren, die nach Sekretion durch das T3SS in die Membran der Zielzelle inserieren und vermutlich eine Art Kanal für die Proteintranslokation bilden [Blocker *et al.*, 1999; Neyt & Cornelis, 1999a]. YopB und seine Homologen in *P. aeruginosa* (PopB), *Shigella* (IpaB), *Salmonella* (SipB) und pathogenen *E.coli* spp. (EspD) zählen zu den großen hydrophoben Translokatoren und verfügen über zwei vorhergesagte Transmembran-Domänen (TM), eine N-terminale *coiled coil*-Region und in einigen Fällen auch eine C-terminale amphipathische Helix [Mattei *et al.*, 2011]. Obwohl die großen Translokatoren strukturell nicht sehr stark konserviert sind (primäre Aminosäuresequenz), verfügen sie alle über die beiden TM-Regionen, was deren funktionale Relevanz in der Membran-Assoziation unterstreicht [McGhie *et al.*, 2002; Hume *et al.*, 2003; Galán *et al.*, 2014]. Tatsächlich wurde die Membraninsertion von YopB und seinen Homologen IpaB, PopB und EspD mittels Kontakthämolyse nachgewiesen [Håkansson, Schesser, *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 2001; Hume *et al.*, 2003; Goure *et al.*, 2004]. Für PopB wurden außerdem auch porenbildende Eigenschaften an künstlichen und Wirtszellmembranen in Abwesenheit des kleinen Translokators PopD gezeigt, jedoch waren die PopD-defizienten Stämme unfähig, die Effektoren in die Zielzellen zu translozieren [Goure *et al.*, 2004; Faudry *et al.*, 2006]. Für die Bildung funktionaler Membranporen sind daher beide hydrophoben Translokatoren essentiell.

Untereinander lassen sich die Translokatoren austauschen und ein *yopB-knock out* kann z.B. durch die Expression des Homologen PopB und *vice versa* rekomplementiert werden. Die Komplementierung ist jedoch nur dann erfolgreich, wenn das gesamte Operon vollständig exprimiert wird [Bröms *et al.*, 2003]. Interessanterweise sind aber nur die Translokatoren innerhalb

derselben T3SS-Familien komplementär (Bröms et al., 2003, Hermant et al., 1995), sodass sich YopB aus dem Ysc-System und IpaB aus der Inv-Mxi-Spa-Familie (von *Shigella*, *Salmonella* und *Burkholderia* spp.) nicht gegeneinander austauschen lassen. Gleiches gilt auch für YopB und YopD [Hartland et al., 1996].

YopB ist ein 42 kDa großes Protein mit zwei hydrophoben Regionen bei den Aminosäuren (AS) 165-208 und 224-258 und weist Homologien zu Proteinen der RTX-Familie von α -Hämolytinen und Leukotoxinen auf [Håkansson et al., 1993]. *Yersinia*-Stämme, die kein YopB exprimieren, können die Phagozytose in J774-Mausmakrophagen nicht mehr verhindern und sind avirulent im Mausmodell [Håkansson, Schesser, et al., 1996]. Rekombinantes YopB zeigt eine membranzerstörende Wirkung *in vitro* [Håkansson, Schesser, et al., 1996] und induziert dosisabhängig die TNF α -Produktion [Beuscher et al., 1995]. Als Interaktionspartner wurden das bivalente Chaperon SycD sowie die anderen beiden Translokatoren YopD und LcrV bestätigt [Sarker, Neyt, et al., 1998; Neyt & Cornelis, 1999b; Tengel et al., 2002; Broz et al., 2007; Montagner et al., 2011].

I.4.3.3 YopD – der kleine hydrophobe Translokator

YopD und seine Homologen PopD (*Pseudomonas*), IpaC (*Shigella*) und SipC (*Salmonella*) zählen zu der Klasse der kleinen hydrophoben Translokatoren und besitzen nur eine Transmembran-Domäne. Sie verfügen über ein gewisses Maß an Sequenzidentität und lassen sich abschnittsweise gegeneinander austauschen ohne die Sekretion zu beeinträchtigen [Osiecki et al., 2001; Harrington et al., 2003]. Im Fall von YopD und PopD ist dies jedoch nur möglich, wenn ebenfalls das korrespondierende Chaperon und sein jeweiliger Translokator-Partner exprimiert werden [Bröms et al., 2003]. Wie auch die großen Translokatoren können die kleinen oligomerisieren, was nicht nur für die Porenbildung essentiell ist, sondern ebenso bei Prozessen innerhalb des Wirtszellzytoplasmas eine Rolle spielt [Picking et al., 2001; Schoehn et al., 2003; Chang et al., 2007]. In Bezug auf die Membrananlagerung weisen die hydrophoben Translokatoren gewisse Differenzen auf. So bindet PopD zwar an Liposomenmembranen, kann aber weniger Fluoreszenzmoleküle freisetzen, d.h. Poren bilden, als PopB [Faudry et al., 2006]. Strukturell gibt es nur limitierte Informationen zu den kleinen hydrophoben Translokatoren. YopD ist ein rund 33 kDa großes Protein [Håkansson, Schesser, et al., 1996], für das zwei Chaperon-Bindestellen bei AS 53-149 und AS 278-292 [Francis et al., 2000] beschrieben wurden. Eine C-terminale *coiled coil* amphipathische Domäne, dessen Struktur durch NMR (*nuclear magnetic resonance*) gelöst wurde [Tengel et al., 2002], ist maßgebend für die Interaktion mit LcrV und die Oligomerisierung, nicht jedoch für die Erkennung von YopB [Costa et al., 2010]. Eine aktuelle Studie nutzte einen genetischen Ansatz, um die Interaktionsbereiche der Translokatoren aus

Pseudomonas während der Infektion näher zu charakterisieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 zusammengefasst: Von PopD interagieren sowohl die AS 228-245 mit den AS 274-297 von PopB als auch sein C-Terminus (PopD AS 269-295) mit der N-terminalen globulären Domäne von PcrV. Dabei ragt der C-Terminus von PopD in das extrazelluläre Milieu und der N-Terminus ins Zytoplasma der Wirtszelle, während beide Termini von PopB extrazellulär verbleiben [Armentrout & Rietsch, 2016].

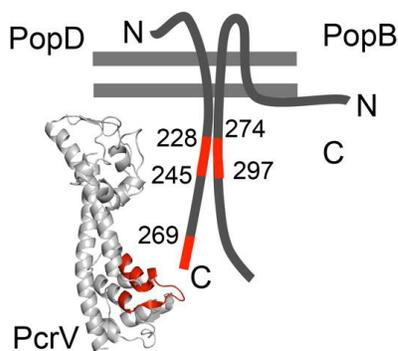


Abb. 5: Modell der Translokatorinteraktionen.

Die Interaktionsbereiche von PopD (AS 228-245) und PopB (AS 274-297) sowie von PopD (AS 269-295) und PcrV sind rot hervorgehoben. Das Modell von PcrV beruht auf der Struktur von LcrV [Chaudhury *et al.*, 2013]. Die Region, die an PopD bindet, ist ebenfalls rot markiert. Die Plasmamembran wird durch eine graue Doppellinie symbolisiert. [Armentrout & Rietsch, 2016]

In vielen Pathogenen wurde für die kleinen Translokatoren eine Beteiligung an der Umstrukturierung des Zytoskeletts in Folge der T3SS-Aktivierung beschrieben. SipC agiert zusätzlich zu der Bildung von Membranporen als Aktin-Nukleationsinitiator, indem es seine eigene Multimerisierung vorantreibt [Chang *et al.*, 2007]. Außerdem rekrutiert SipC die Exozyst-Komponente Exo70 und fördert dadurch die Fusion von exozytotischen Vesikeln mit der Plasmamembran und erhöht so die Invasionseffizienz von Salmonellen [Nichols & Casanova, 2010]. IpaC und SipC sind essentiell für die Aufnahme von Shigellen bzw. Salmonellen in Makrophagen während der frühen Phase der Invasion und können Membranausstülpungen wie Filopodien und Lamellipodien induzieren [Kuwae *et al.*, 2001; Osiecki *et al.*, 2001]. Für YopD aus *Y. enterocolitica* gibt es bislang keine solchen Beobachtungen.

Neben seiner porenbildenden Funktion wurde YopD als Regulator in der *low calcium response* beschrieben [Williams & Straley, 1998; Anderson *et al.*, 2002]. Zusammen mit seinem Chaperon SycD bindet YopD an die 5' untranslatierte Region der *yop*-mRNAs [Francis *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2002] und fördert vermutlich die Degradation der Transkripte, was die Mengen synthetisierter Yops reduziert [Chen & Anderson, 2011]. Erst vor Kurzem zeigten Kopaskie *et al.*, dass dabei eine SycD-abhängige Interaktion von YopD mit der 30 S Untereinheit der Ribosomen eine wichtige Rolle spielt und die Translation der *yop*-mRNA durch YopD blockiert wird [Kopaskie *et al.*, 2013]. Zwei kurze AU-reiche Sequenzen um das Startcodon der Zielgene sind dabei von entscheidender Bedeutung [Cambronne & Schneewind, 2002; Chen & Anderson, 2011]. Die

Distanz dieser AU-reichen Regionen zum Translationsstart beeinflusst die Affinität von YopD für das jeweilige Transkript und impliziert einen Mechanismus für eine Hierarchie bei der Translokation [Chen & Anderson, 2011]. Obwohl YopD-Homologe in nahezu allen anderen T3SS-exprimierenden Pathogenen existieren, wurde die RNA-bindende, post-transkriptionelle Kontrolle von YopD bei keinem seiner Gegenstücke beschrieben [Schiano & Lathem, 2012].

I.4.4 Die Effektoren

Als „späte“ Substrate [Dewoody *et al.*, 2013] des T3SS werden die Effektoren in einer polaren Transportreaktion durch die Nadel über die Translokationspore direkt in das Zytoplasma befallener Wirtszellen injiziert [Rosqvist *et al.*, 1994]. Dort ahmen sie in ihrer Funktion Wirtsproteine nach, wobei sie effektiver in der Modulation des Wirtszellzytoskeletts und Aktivierung der zelleigenen Selbstzerstörung sind als ihre nativen Gegenstücke [Atkinson & Williams, 2016]. Auf diese Weise sichern Yersinien ihren Fortbestand und die erfolgreiche Besiedlung des Wirtes, trotz seiner Anstrengung, der Infektion entgegenzuwirken [Atkinson & Williams, 2016]. *Y. enterocolitica* transloziert sechs Effektor-Yops mit katalytischer Aktivität in Wirtszellen. Dazu zählen YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopP/YopJ und YopT [Sory & Cornelis, 1994; Persson *et al.*, 1995; Sory *et al.*, 1995; Håkansson, Galyov, *et al.*, 1996; Boland *et al.*, 1996; Iriarte & Cornelis, 1998]. Während YopE, YopH, YopT und YopO/YpkA das Aktin-Zytoskelett manipulieren und zur Phagozytose-Resistenz von *Yersinia* spp. beitragen [Cornelis, 2002a], sind YopM und YopP/YopJ an der Regulation von Elementen des Immunsystems wie Inflammation und Leukozyten-Rekrutierung beteiligt [Cornelis, 2002a; Cornelis, 2002b; Grosdent *et al.*, 2002; Shao, 2008; Matsumoto & Young, 2009]. Zusätzlich scheinen auch YopN [Lee *et al.*, 1998] und YopQ/YopK [Garcia *et al.*, 2006; Thorslund *et al.*, 2011] in Wirtszellen transloziert zu werden, wirken dort aber nicht auf zelluläre Faktoren, sondern arbeiten als Regulatoren der Sekretion bzw. Translokation [Forsberg *et al.*, 1991; Holmström *et al.*, 1997]. Im Folgenden sind die Effektoren näher beschrieben.

I.4.4.1 YopE – ein GTPase-aktivierendes Protein

YopE ist einer der am besten erforschten Effektoren und essentiell für die Virulenz (Straley & Cibull 1989). Es besitzt eine Molekülgröße von 23 kDa und verfügt über eine N-terminale Sekretionsdomäne von 15 AS sowie eine Translokationsregion von 50 AS [Sory *et al.*, 1995]. Seine zelltoxische Wirkung auf Epithelzellen, erkennbar an der charakteristischen Abrundung infizierter Zellen, beruht auf der Zerstörung der Aktin-Mikrofilamente, was maßgeblich zur Phagozytoseresistenz der Yersinien beiträgt [Rosqvist *et al.*, 1990; Rosqvist *et al.*, 1991].

Allerdings wirkt YopE nicht direkt auf Aktin, sondern auf kleine GTP-bindende Proteine der Rho-Familie, die die Aktinpolymerisation regulieren [Takai *et al.*, 2001; Aspenström *et al.*, 2004]. GTPasen sind molekulare Schalter, die zwischen einer aktiven GTP-gebundenen Form und dem inaktiven GDP-gebundenen Zustand rotieren. Ihre Aktivität wird durch drei Proteingruppen kontrolliert: (i) *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs), die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren, (ii) *GTPase-aktivierende Proteine* (GAPs), welche die intrinsische GTPase-Aktivität stimulieren und den Schalter inaktiveren, und (iii) *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs), die die inaktive GDP-gebundene Form von der Membranverankerung lösen und zytosolisch halten [Jaffe & Hall, 2005; Heasman & Ridley, 2008]. YopE besitzt eine GAP-Aktivität und behält einige GTPasen in der inaktiven Form, wobei es ein für solche Domänen konserviertes Arginin-Finger-Motiv nutzt [Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Black & Bliska, 2000]. Die GTPasen RhoA, RhoG, Rac1 und Cdc42 werden durch YopE *in vitro* inaktiviert [Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Black & Bliska, 2000; Aili *et al.*, 2002; Roppenser *et al.*, 2009], wobei in Infektionsstudien eine Präferenz für Rac1 und RhoG gezeigt werden konnte [Andor *et al.*, 2001; Ruckdeschel *et al.*, 2006; Aili *et al.*, 2006; Roppenser *et al.*, 2009; Mohammadi & Isberg, 2009; Aepfelbacher *et al.*, 2011; Aepfelbacher & Wolters, 2016]. Dabei kann YopE sowohl direkt auf Rac1 wirken, als auch dessen vorgeschalteten Aktivator RhoG inhibieren [Roppenser *et al.*, 2009; Mohammadi & Isberg, 2009].

Als multifunktionales Effektorprotein verfügt YopE neben seiner Rolle in der Anti-Phagozytose über die Fähigkeit, die Bildung lytischer Poren zu verhindern [Viboud & Bliska, 2001; Aili *et al.*, 2006; Viboud *et al.*, 2006; Aili *et al.*, 2007; Mejía *et al.*, 2008] und die Translokation negativ zu regulieren [Aili *et al.*, 2006; Aili *et al.*, 2007; Isaksson *et al.*, 2009; Aepfelbacher *et al.*, 2011; Dewoody *et al.*, 2011; Gaus *et al.*, 2011]. Letzteres wurde deutlich, nachdem bei Infektion mit *yopE*-Mutanten eine Hypertranslokation verbleibender Yops beobachtet wurde [Aili *et al.*, 2007; Gaus *et al.*, 2011; Wolters *et al.*, 2013]. Bemerkenswert ist dabei, dass YopE seine regulatorische Funktion erst nach Translokation und aus dem Inneren der Wirtszelle ausübt [Aili *et al.*, 2007]. Eine direkte Interaktion von YopE und der Translokationspore wurde bisher nicht bestätigt, daher sind die weiteren Funktionen von YopE wahrscheinlich auf einen indirekten Mechanismus durch Manipulation des Zytoskeletts zurückzuführen [Dewoody *et al.*, 2013]. Alle YopE-Wirkmechanismen involvieren die Deaktivierung kleiner Rho GTPasen und damit einhergehend die Inhibierung der Aktin-Polymerisation [Dewoody *et al.*, 2011; Dewoody *et al.*, 2013].

I.4.4.2 YopT – eine Cystein-Protease

Zuletzt wurde der 35,5 kDa große Effektor YopT in *Y. enterocolitica* identifiziert, der in der Wirtszelle Aktin-Stressfasern zerstört und Zytotoxizität verursacht [Iriarte & Cornelis, 1998]. YopT

ist eine Cystein-Protease und unterbindet RhoA-vermittelte Signaltransduktion durch die Spaltung der posttranskriptionell-modifizierten Rho GTPasen nahe ihres C-Terminus [Shao *et al.*, 2002]. Dies löst die Membranverankerung der GTPasen und verhindert unmittelbar die Bildung des phagozytischen *cups* für die bakterielle Internalisierung sowie die Assemblierung fokaler Adhäsionskomplexe, die für die Ausbildung von Pseudopodien und Makrophagen-Migration benötigt werden [Aepfelbacher *et al.*, 2003; Schmidt, 2011].

I.4.4.3 YopO/YpkA – eine Serin/Threonin-Proteinkinase

YopO (YpkA in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) verfügt über verschiedene Aktivitäten und Proteindomänen. Das 81,7 kDa große Protein enthält eine N-terminale Serin/Threonin-Kinase-Domäne, mit der YopO nach der Translokation an der inneren Seite der Plasmamembran lokalisiert [Håkansson, Galyov, *et al.*, 1996]. Die Bindung von globulärem (G)-Aktin führt zur Autophosphorylierung von YopO in der katalytischen Domäne [Trasak *et al.*, 2007] und stimuliert die Phosphokinase-Aktivität [Galyov *et al.*, 1993; Juris *et al.*, 2000; Pha *et al.*, 2014]. Die C-terminale Region von YopO ähnelt GDIs von Rho GTPasen [Prehna *et al.*, 2006] und interagiert mit Rho und Rac [Barz *et al.*, 2000; Groves *et al.*, 2010]. YopO verhindert die Phagozytose [Juris *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2007] durch Bindung an und Phosphorylierung von Aktin, das von *Y. enterocolitica* als Köder genutzt wird, um Wirtszellregulatoren der Aktinpolymerisation zu titrieren [Lee *et al.*, 2015].

Die drei Effektoren YopE, YopT und YopO/YpkA wirken der Phagozytose entgegen, indem sie monomere Rho GTPasen inaktivieren, die die Dynamik des Zytoskeletts kontrollieren [Cornelis, 2002a]. Ihre Wirkmechanismen sind in Abb. 6 zusammengefasst.

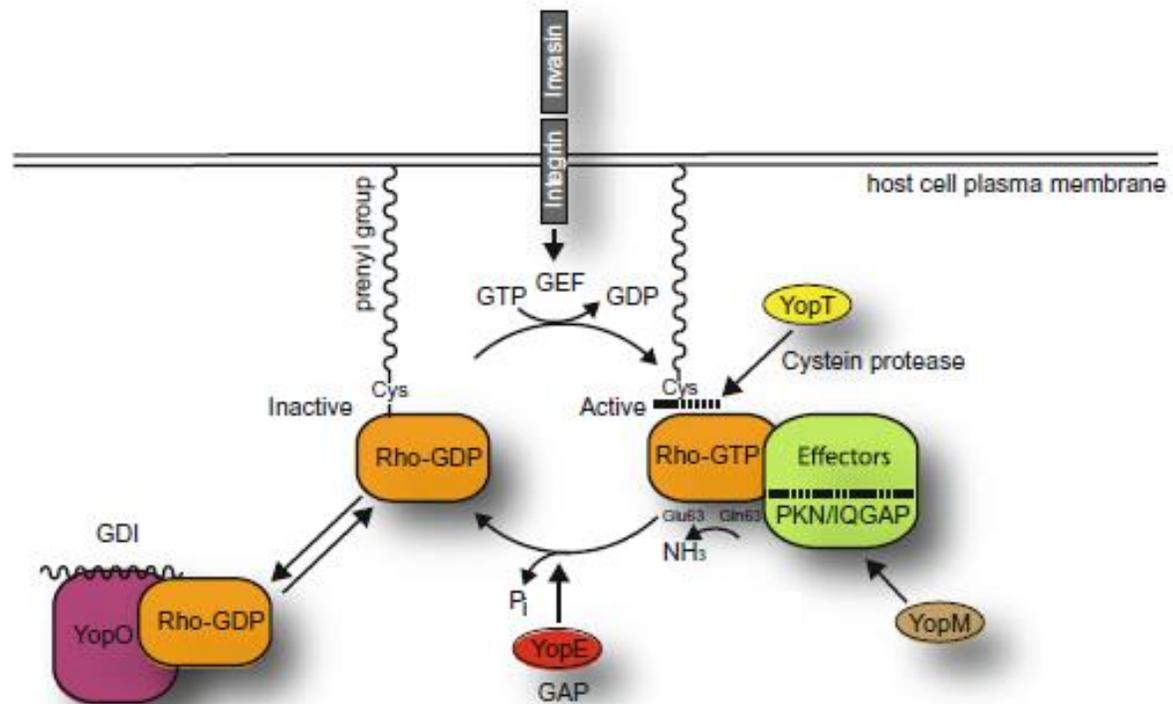


Abb. 6: Manipulation der Rho GTP-Bindeproteine durch *Yersinia* Virulenzfaktoren.

Die hochaffine Bindung vom *Yersinia*-Membranprotein Invasin an β 1-Integrine initiiert die Signaltransduktion (z.B. über Rho-GEFs) und führt zur Aktivierung von Rho-Proteinen durch GTP-Bindung. YopE und YopO inaktivieren die Rho GTPasen durch ihre GAP- bzw. GDI-Eigenschaften. Die Cystein-Protease YopT löst Rho von der Plasmamembran durch das Entfernen seiner Prenylgruppe. Bislang unbekannt sind hingegen die zellulären Auswirkungen der YopM-Bindung an die Rho-Effektoren PKN und IQGAP. (mod. nach Aepfelbacher & Wolters 2016)

I.4.4.4 YopH – eine Protein-Tyrosinphosphatase

Das 51 kDa große YopH ist eine der aktivsten Tyrosinphosphatasen überhaupt [Zhang *et al.*, 1992; Zhang, 1995]. Als multifunktionales Effektorprotein unterbricht YopH die Signalwege in der angeborenen und adaptierten Immunantwort und ist essentiell für die Virulenz im Mausmodell [Logsdon & Meccas, 2003; Trülzsch *et al.*, 2004; Cantwell *et al.*, 2010]. Außerdem hemmt YopH die Ca^{2+} -vermittelte Signaltransduktion in Neutrophilen [Andersson *et al.*, 1999] und die Aktivierung von T- und B-Lymphozyten [Yao *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2003]. YopH blockiert die auf die β 1-Integrin-Bindung von Invasin oder YadA folgende Autophagie [Deuretzbacher *et al.*, 2009] und inhibiert die Phagozytose [Bölin & Wolf-Watz, 1988; Rosqvist *et al.*, 1988] in Makrophagen durch Dephosphorylierung von Proteinen der fokalen Adhäsionskomplexe, was die Verbindung zum Aktinzytoskelett löst [Bliska *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 2005].

I.4.4.5 YopM – ein Gerüstprotein

Im Gegensatz zu den anderen Effektoren ist YopM zwischen den einzelnen *Yersinia*-Spezies weniger stark konserviert [Cornelis *et al.*, 1998]. In *Y. pestis* beträgt die Größe von YopM 41,6 kDa, in *Y. enterocolitica* hingegen 56,9 kDa. Dies ist vermutlich auf die Duplikation von Genfragmenten zurückzuführen, die von den repetitiven Elementen des Gens resultieren [Boland *et al.*, 1998]. Daher verfügen die einzelnen YopM-Isoformen über eine variierende Anzahl von *leucine-rich-repeat* (LRR)-Motiven. YopM wird in Makrophagen transloziert [Boland *et al.*, 1996], kann möglicherweise aber auch eigenständig in humane Zellen eindringen [Bertrand *et al.*, 2010]. Selbst besitzt YopM keine bekannte enzymatische Aktivität [Höfling *et al.*, 2015], verfügt jedoch über immunsuppressive Eigenschaften, indem es als Gerüstprotein zahlreiche Signalmoleküle des Wirtes bindet [Chung *et al.*, 2014; Höfling *et al.*, 2015; Berneking *et al.*, 2016]. Obwohl für YopM bisher kein Effekt auf Rho GTPasen beschrieben wurde, deutet seine Interaktion mit den Rho-Effektoren N/PRK und IQGAP einen potentiellen Einfluss YopMs auf die Aktin-Reorganisation an [Hentschke *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2014; Aepfelbacher & Wolters, 2016]. YopM ist der einzige Effektor, der auch im Nukleus lokalisiert [Skrzypek *et al.*, 1998] und dort möglicherweise die Gentranskription beeinflusst [Sauvonnet *et al.*, 2002].

I.4.4.6 YopP/YopJ – eine Acetyltransferase

YopP (YopJ in den anderen beiden pathogenen *Yersinia* spp.) ist eine 32,5 kDa große Serin/Threonin/Lysin-Acetyltransferase, die die Acetylierung von Signal-Kinasen (MKKs und Ikk) katalysiert und die Freisetzung von NF- κ B hemmt, was andernfalls zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führen würde [Ruckdeschel *et al.*, 1998; Boland & Cornelis, 1998; Orth *et al.*, 2000; Mukherjee *et al.*, 2006; Mittal *et al.*, 2006]. YopP induziert Apoptose in Makrophagen, indem es über die Hemmung des MAP-Kinase-Weges pro-inflammatorische Zytokine supprimiert [Palmer *et al.*, 1998; Schesser *et al.*, 1998; Orth *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005]. Kürzlich wurde YopP als Caspase-1-Inhibitor in aktivierten Makrophagen beschrieben [Schoberle *et al.*, 2016].

I.4.4.7 YopQ/YopK – ein Translokationsregulator

YopQ (YopK in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) ist das siebte Effektor-Protein, das in Wirtszellen transloziert wird [Garcia *et al.*, 2006; Thorslund *et al.*, 2011]. Im Gegensatz zu den anderen Effektoren wird das rund 21 kDa große YopQ nur in geringen Mengen exprimiert und besitzt keine bekannte katalytische Funktion [A Holmström *et al.*, 1995; Anna Holmström *et al.*, 1995]. Während ein *yopQ knock out* zur Hypertranslokation von YopE und YopH und damit einhergehend zu zytotoxischen Effekten führt, verhindert die Überexpression von YopQ die

Effektor-Translokation [Holmström *et al.*, 1997]. Da YopQ nicht an der Transkription oder Expression der Effektoren beteiligt ist, ließ sich seine primäre Funktion als Regulator der Translokation vermuten, was mittels Kontakthämolyse nachgewiesen werden konnte [Holmström *et al.*, 1997]. Dabei zeigte YopQ einen negativen Einfluss auf die Porengröße, was wiederum die Translokationsrate kontrolliert [Holmström *et al.*, 1997]. Streng genommen ist YopQ also kein Virulenzfaktor, sondern als Regulator an der Feinabstimmung der Translokation beteiligt bzw. schirmt es die Translokationspore ab, um eine Induktion der inflammatorischen Reaktion zu verhindern, die sonst die Infektion bekämpft [Holmström *et al.*, 1997]. Dabei wird YopQ selbst in die Wirtszelle injiziert und übermittelt das Signal zur Reduktion der Translokation zurück in die Bakterienzelle [Dewoody *et al.*, 2011]. In Immunoprecipitations- und *pull down*-Experimenten konnte die direkte Interaktion von YopQ mit YopB und YopD nachgewiesen werden [Brodsky *et al.*, 2010; Thorslund *et al.*, 2011; Dewoody *et al.*, 2012], was darauf hindeutet, dass YopQ unmittelbar mit der dem Wirtszellzytosol zugewandten Seite der Translokationspore interagiert und dadurch die Funktion des T3SS beeinflusst. In einer Art negativer Rückkopplung könnte YopQ also den weiteren Effektortransport reduzieren, um möglicherweise eine Überinjektion der Zelltoxine zu verhindern, was andernfalls eine Stimulation der Immunreaktion verursacht, die wiederum einem Fortschreiten der Erkrankung entgegenwirkt [Dewoody *et al.*, 2013]. Zusätzlich schützt YopQ die Substratgenauigkeit, sodass nur späte Effektor-Yops in die Zielzellen transloziert werden [Dewoody *et al.*, 2012; Dewoody *et al.*, 2013].

I.5 Regulation der Translokation

Die Translokation beschreibt den gerichteten Transport toxischer Effektoren über drei Membranen aus dem bakteriellen Zytoplasma in das Zytosol der Wirtszelle. Dieser Prozess ist streng reguliert, um den Fortschritt der Infektion zu gewährleisten.

Sobald die Nadel die korrekte Länge erreicht, wird der Wechsel von den frühen zu den mittleren Substraten eingeleitet. Eine membrandurchspannende Region verankert YscU in der inneren Bakterienmembran und eine große zytosolische Domäne ist essentiell für die Substratspezifität [Allaoui *et al.*, 1994; Edqvist *et al.*, 2003; Sorg *et al.*, 2007]. Vermutlich interagiert der C-Terminus von YscP mit der zytosolischen Domäne von YscU und induziert die Selbstspaltung von YscU [Lavander *et al.*, 2003; Agrain *et al.*, 2005; Sorg *et al.*, 2007], die den entscheidenden Schritt für den Wechsel von der frühen zur mittleren Phase darstellt.

Vor dem Zellkontakt verhindert YopN (Ca^{2+} -Stopfen) die vorzeitige Freisetzung der späten Substrate in das umgebende Medium [Yother & Goguen, 1985; Forsberg *et al.*, 1991]. TyeA bindet an die C-terminale Hälfte von YopN und wirkt als negativer Regulator auf die YopN-Sekretion in

Anwesenheit von Ca^{2+} [Iriarte *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001; Ferracci *et al.*, 2004; Schubot *et al.*, 2005; Ferracci *et al.*, 2005]. Im bakteriellen Zytosol binden YscB und SycN einander und anschließend an den N-Terminus von YopN [Day & Plano, 1998; Cheng *et al.*, 2001]. Sobald Zellkontakt besteht, agieren YscB und SycN als Chaperone und vermitteln den Export von YopN durch das Injektisom.

Zusätzlich scheint YopQ an der Genauigkeit des Substrattransports beteiligt zu sein, indem es den Export der mittleren Substrate hemmt [Dewoody *et al.*, 2013]. Es bleibt unklar, wie genau YopN und YopQ diese regulatorischen Aktivitäten koordinieren. Außerdem sind YopQ und YopE die Hauptkomponenten in der Translokationsregulation, die vom Zellinneren heraus wirken und die weitere Injektion der späten Substrate (Effektoren) reduzieren. Während YopE dies über die Manipulation des Aktinzytoskeletts vermittelt, assoziiert YopQ mit der Translokationspore. Die genaue Hierarchie und die Mechanismen der Translokationskontrolle sind weiterhin Gegenstand der T3SS-Forschung.

I.5.1 Ein-Schritt Modell

Dewoody und Kollegen fassten die bisherigen Erkenntnisse zur T3-abhängigen Effektorinjektion zusammen und postulierten zwei mögliche Varianten, wie die Translokation erfolgen kann [Dewoody *et al.*, 2013]. Das sogenannte Ein-Schritt- oder Injektionsmodell beschreibt die Bildung der Translokationspore unmittelbar am distalen Ende der Nadel, wodurch ein kontinuierlicher Verbindungskanal zwischen Bakterium und Wirtszelle entsteht, der das „Zellkontaktsignal“ auslöst und die regulatorische YopN-Blockade aufhebt. Dadurch erfolgt ein Substratwechsel und die Effektoren (späte Substrate) können direkt durch die Nadel in das Wirtszellzytosol injiziert werden. Viele Jahre galt die Bildung der Translokationspore als finaler Schritt in der Vervollendung des Kanals zwischen Pathogen und Wirt [Dewoody *et al.*, 2013].

I.5.2 Zwei-Schritt Modell

Ein weiteres Translokationsmodell, das Zwei-Schritt-Modell, welches ein intermediäres Zwischenstadium beinhaltet, wurde erst kürzlich vorgestellt [Akopyan *et al.*, 2011; Edgren *et al.*, 2012]. Zunächst erfolgt die Sekretion der mittleren und späten Substrate über das T3SS und ihre anschließende Akkumulation auf der Bakterienoberfläche, wo sie zu Komplexen von Translokatoren und Effektoren aggregieren. Diese Komplexe diffundieren dann durch den extrazellulären Raum und interagieren schließlich mit der Plasmamembran der Zielzelle, wo YopB und YopD den Transfer der Effektoren in die Wirtszelle vermitteln [Dewoody *et al.*, 2013]. Unterstützt wird dieses Modell durch die Beobachtung, dass sekretierte Yops *in vitro* auf der

Bakterienoberfläche aggregieren [Darveau *et al.*, 1980; Straley & Brubaker, 1981; Bölin *et al.*, 1982; Yother & Goguen, 1985]. Außerdem gelang es, extrazellulär zugefügte Effektoren mit Hilfe des T3SS der korrespondierenden Deletionsmutante in die Zielzelle zu translokieren [Akopyan *et al.*, 2011]. Unklar bleibt, ob beide Modelle der Yop-Translokation in einer Bakterienzelle auftreten und, ob eines der beiden *in vivo* favorisiert wird. Die Autoren schließen eine Koexistenz nicht aus. Allerdings bleibt zu klären, wie die Bakterien im Falle des Zwei-Schritt-Modells den Zellkontakt wahrnehmen und die Effektoren YopE und YopQ ihre regulatorische Rückkopplung realisieren, wenn die Nadel keinen kontinuierlichen Kontakt mit der Wirtszelle aufbaut. Damit die Effektoren ein *feedback*-Signal zu der Bakterienzelle zurücksenden können, wäre ein Verbindungskanal nötig, dessen Enden miteinander kommunizieren können, um die präzise Kontrolle über Ablauf, Spezifität und Höhe der Yop-Translokation auszuführen, was wiederum eher ein einstufiges Modell impliziert [Dewoody *et al.*, 2013]. Beide Modelle sind in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** schematisch dargestellt.

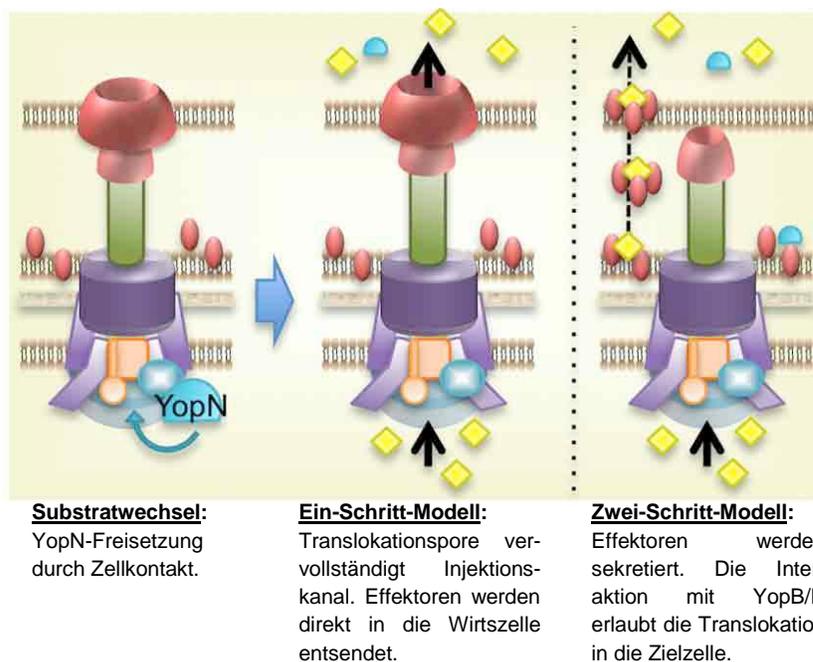


Abb. 7: Das Translokationsmodell.

Im Zuge der Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle wird die YopN-vermittelte Blockade aufgehoben und die Sekretion der späten Substrate initiiert. Im Ein-Schritt-Modell assembliert der Porenkomplex an der Spitze der Nadel und bildet dabei einen kontinuierlichen Kanal durch den die Effektoren (gelb) injiziert werden. Im Zwei-Schritt-Modell werden die Effektoren in den extrazellulären Raum sekretiert und interagieren dort mit den Porenproteinen. Die entstehenden Komplexe diffundieren durch den Zwischenraum zur Wirtszelle, wo sie mit der Plasmamembran interagieren und die Effektoren ins Zellinnere entlassen [Dewoody *et al.*, 2013].

I.6 Zielstellung

Während das Typ III Sekretionssystem und die Effektor-Yops teilweise sehr gut erforscht und verstanden sind, gibt es bislang wenige Daten hinsichtlich der Translokationspore, ihrer Morphologie und Regulation. Bislang wurde die verbreitete Ansicht vertreten, dass bei Zellkontakt die Translokationspore direkt am distalen Ende der Injektionsnadel in die Zielmembran assembliert und dabei einen kontinuierlichen Kanal zwischen bakteriellem Zytoplasma und eukaryontem Zytosol schafft. Dieses als Injektions- oder Ein-Schritt-Modell (Dewoody et al. 2013) bezeichnete Konzept wurde jedoch in Frage gestellt, nachdem es gelang, die Translokation von extrazellulär zugeführtem rekombinatem YopH durch Koinfektion mit einer YopH-negativen *Yersinia* Wildtyp-Mutante nachzuweisen (Akopyan et al. 2011). Als Alternative wurde deshalb ein Zwei-Schritt-Modell vorgeschlagen, das die gleichzeitige Sekretion von Effektoren und Translokatoren bei Zellkontakt und deren Komplexbildung als intermediären Schritt beschreibt, bevor dieser Komplex die Zellmembran penetriert und die Effektoren ins Innere der Zelle gelangen, ähnlich der Wirkweise von AB-Toxinen (Edgren et al. 2012). Es gelang die Extraktion eines YopB/D-Komplexes aus Erythrozyten-Membranen, wobei ein heteromultimerer Komplex von 500-700 MDa (Montagner et al. 2011) beschrieben wurde. In Liposomen wurden angeblich Translokationsporen von *Pseudomonas aeruginosa* mit elektrophysiologischen Methoden und elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen (Tardy et al. 1999; Schoehn et al. 2003). Bei den dabei identifizierten zirkulären Strukturen konnte die Funktionalität und Identität der vermeintlichen Poren jedoch nicht zweifelsfrei gezeigt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit verschiedenen mikroskopischen und molekularbiologischen Verfahren die Translokationspore von *Y. enterocolitica* während der Wirtszellinfektion zu visualisieren. Vor allem hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie sollte für diese Fragestellung etabliert werden. Dabei sollten folgende spezifische Kernpunkte adressiert werden:

- 1) In welchem räumlichen Bezug zum Nadelkomplex des T3SS lokalisiert der YopB/D-Porenkomplex?
- 2) Wie viele Porenkomplexe werden durch eine Bakterienzelle während der Infektion exprimiert?
- 3) Können Porenkomplexe auch unter Sekretionsbedingungen gefunden werden und unterscheidet sich deren Lokalisation von funktionalen Poren in der Wirtszellmembran?
- 4) Finden sich die YopB/D-Poren immer assoziiert mit der Injektionsnadel?
- 5) Welche bakteriellen und zellulären Faktoren regulieren die Expression des YopB/D-Porenkomplexes?

Die gewonnenen Erkenntnisse werden zu einem besseren Verständnis des Translokationsprozesses beitragen und einen möglichen Ansatz für neue Therapien bei Infektionen liefern, welche von Gram-negativen Keimen, die das Typ III Sekretionssystem besitzen, hervorgerufen werden.

II Ergebnisse

II.1 Polyklonale Kaninchen-Antikörper binden spezifisch die Translokatoren YopB und YopD

II.1.1 Gewinnung polyklonaler Antisera gegen ausgewählte Proteine des Typ III Sekretionssystems aus *Y. enterocolitica* WA-314

Zur Untersuchung der Translokationspore von *Y. enterocolitica* sollte zunächst die klassische Immunfluoreszenzmikroskopie genutzt werden. Hierfür waren spezifische Antikörper von Nöten, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden (Tierversuchsanzeige A10a 675). Mit Hilfe aufgereinigter rekombinanter Antigene sollten Versuchstiere, im Speziellen Kaninchen, im Injektionsverfahren mit subkutaner Verabreichung immunisiert werden [SOP: Immunisierung von Kaninchen (Forschungstierhaltung UKE), 2013]). Anschließend wären die Antisera aus den entnommenen Blutproben zu gewinnen und auf Spezifität zu testen. Pro Antigen sollten zwei Tiere immunisiert werden.

Um auch Immun-Co-Färbungen durchführen zu können, wurden in einem separaten Tierversuch Ratten ebenfalls mit GST-YopB₁₋₁₆₈ immunisiert (A8a/794).

II.1.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung rekombinanter *Yersinia outer proteins* (Yops)

Um für die Immunisierung von Kaninchen möglichst reine rekombinante Proteine zu gewinnen, wurden zunächst die annotierten offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) der Gene *yopB* und *yopD* von dem Virulenzplasmid pYV-WA-314 (*Accession number*: NC_019234) aus *Y. enterocolitica* mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert (siehe V.2.2.4.1) und in verschiedene Expressionsplasmide kloniert (V.2.2.4.2, V.2.2.4.3). In parallelen Strategien wurden die Vektoren pET302 mit N-terminalem 6x Polyhistidin-*tag* und pGEX-4T1 mit N-terminalem Glutathion-S-Transferase (GST)-*tag* zur Überexpression in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21AI gewählt. Die entstandenen Fusionsproteine konnten mit Hilfe der immobilisierten Affinitätschromatographie (V.2.3.2) isoliert und gereinigt werden. In Vorversuchen zeigte sich, dass Vollängen-YopB nicht stabil exprimiert werden konnte und die Bakterien in der Kultur bei Induzieren der Genexpression lysierten. Auch Vollängen-YopD erwies sich als unbrauchbar, da es zwar von den Bakterien gebildet wurde, jedoch in der unlöslichen Fraktion zurück blieb. Daher wurden kürzere Fragmente dieser Proteine für die Antigenproduktion verwendet. Für YopB konnte

der N-terminale Bereich stromaufwärts der beiden transmembranen Regionen von Aminosäure (AS) 1-168 erfolgreich gereinigt werden, während für YopD ein Peptid von AS 150-287, fast der vollständige, lösliche C-Terminus einschließlich des Bereichs um die vorhergesagte amphipathische α -Helix [Raab & Swietnicki, 2008], gewählt wurde. Die höchsten Ausbeuten lieferten in beiden Fällen GST-Fusionen, deren Expression mit 0,4 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert wurde und bei 37 °C erfolgte. Daher wurden für die Kaninchenimmunisierungen die GST-Fusionsproteine gewählt.

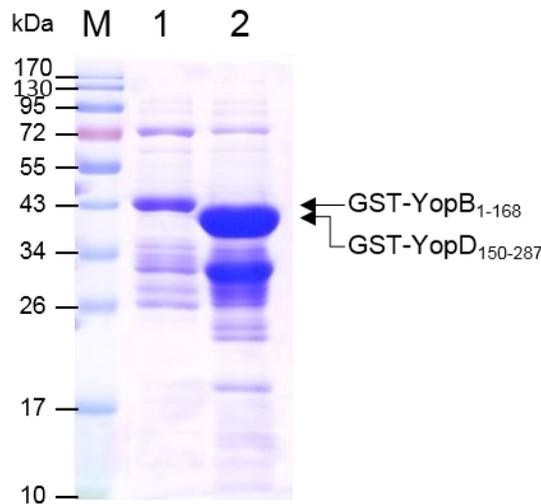


Abb. 8: Aufreinigung von GST-gebundenem YopB₁₋₁₆₈ und YopD₁₅₀₋₂₈₇
 SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach Dialyse in PBS. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. M: Standardproteine, 1: GST-YopB₁₋₁₆₈, 2: GST-YopD₁₅₀₋₂₈₇.

Abb. 8 zeigt beispielhaft die gewonnenen rekombinanten GST-Fusionsproteine nach Dialyse gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) (siehe V.2.3.3). Die erwarteten Molekülgrößen lagen für GST-Yop B₁₋₁₆₈ bei 45 Kilodalton (kDa) und für GST-YopD₁₅₀₋₂₈₇ bei 42 kDa. Letzteres erschien in einer Doppelbande, wovon die obere der kalkulierten Molekülgröße des GST-YopD-Fragments entsprach. Das Gelbild veranschaulicht die verbliebenen Verunreinigungen mit anderen Proteinen, die jedoch für die Kaninchenimmunisierung vernachlässigt werden konnten. Während für die GST-Fusion von YopB₁₋₁₆₈ vor und nach der Dialyse gegen PBS keine Unterschiede im Gelbild detektiert wurden, zeigte GST-YopD₁₅₀₋₂₈₇ einige Degradationsbanden. Da eine beginnende Degradation eines Immunogens für die Induzierung spezifischer polyklonaler Antikörper nicht zwingend von Nachteil ist, wurde diese nicht weiter berücksichtigt.

Auf das Abtrennen des GST-*tags* von den Proteinen mit Hilfe der eingebauten Thrombin-Schnittstelle wurde für die Immunisierung ebenfalls verzichtet, da bei Vorversuchen nach Thrombin-Spaltung und Reinigung mit Benzamidin-*beads* die verbliebenen Proteine zu stark

degradierten oder schlicht nicht mehr nachweisbar waren. Außerdem ist es gängige Praxis, GST-Fusionsproteine mit *tag* zur Immunisierung zu verwenden, da die mitgebildeten GST-Antikörper häufig nicht stören oder bei Bedarf aus dem Antiserum über Absorption an rekombinantes GST entfernt werden können (persönliche Kommunikation mit der Forschungstierhaltung des UKE). Für die Grund- und Boost-Immunisierungen wurde jeweils Protein aus 500 ml Bakterienkultur isoliert und Ausbeuten von 5,6 mg und 40,8 mg für GST- YopB₁₋₁₆₈ und -YopD₁₅₀₋₂₈₇ erzielt.

II.1.3 Aufreinigung und Spezifitätsprüfung gewonnener Kaninchen- und Ratten-Antiseren

Bevor die Versuchstiere die Erstimmunisierung erhielten, wurde eine Blutprobe aus der Ohrvene der Kaninchen bzw. der Wangenvene der Ratten entnommen und daraus Prä-Immunsrum gewonnen (V.2.5.2). Dieses sollte mit den erhaltenen Antiseren aus der finalen Blutentnahme verglichen und auf spezifische Immunreaktion mittels Western Blot Analyse geprüft werden. In beiden Fällen war eine spezifische Immunreaktion erst in den Test- bzw. finalen Antiseren zu detektieren (V.2.5.3). Abb. 9 zeigt beispielhaft die Western Blot Signale der YopB- und YopD-Antiseren jeweils eines der Tiere.

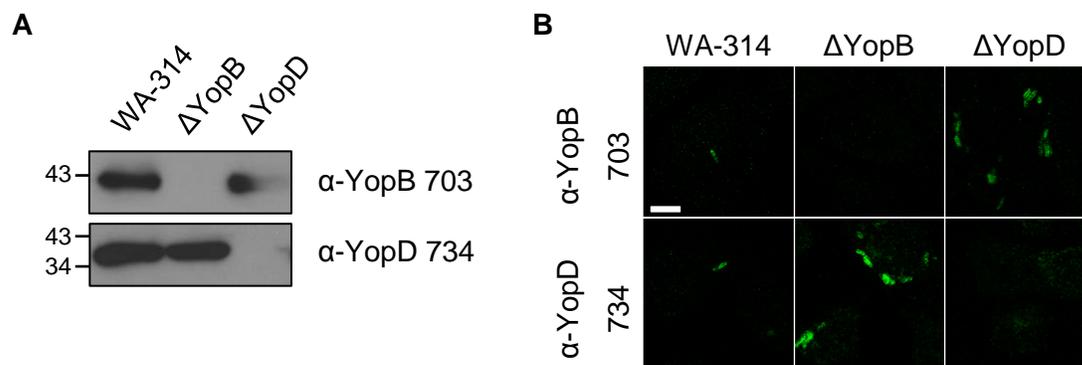


Abb. 9: Spezifität polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen YopB, YopD und YopQ.

A: Getestet wurden die Antiseren gegen sekretierte Yops, die aus dem Kulturüberstand präzipitiert wurden. Verglichen wurden die *released proteins* des *Y. enterocolitica* Wildtyps WA-314 mit denen der jeweiligen *knock out* Mutanten auf die spezifischen Bindungseigenschaften der Antiseren. **B:** Test der affinitätsgereinigten anti (α)-YopB- und -YopD-Antikörper in der Immunfluoreszenz an *Yersinia*-infizierten HeLa-Zellen. Die Nummern verweisen auf die jeweiligen Identifikationsnummern der Tiere, aus denen die Antiseren gewonnen wurden.

Die Kaninchen-Antiseren wurden in der Immunoblot-Analyse auf *released proteins* des Wildtyps WA-314 und den jeweiligen Negativ-Kontrollen getestet (siehe V.2.1.4). Wie die Abb. 9 A verdeutlicht, wurden YopB und YopD bei WA-314 gefunden, nicht jedoch in den entsprechenden *knock out* Stämmen. Die spezifische Bindung der im Serum enthaltenen Antikörper war somit

bestätigt. Ein ähnliches Verhalten war auch bei den Ratten-anti-YopB-Antisera zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Für Immunfluoreszenzfärbungen war die weitere Aufreinigung der Antisera erforderlich. Dazu erfolgte, wie unter V.2.3.9 beschrieben, die Affinitätsreinigung gegen die nativen rekombinanten Antigene in Form einer Säulen-Chromatographie. Für YopB-Antikörper war die zusätzliche Reinigung gegen das denaturierte Protein aus dem *released proteins assay*, gebunden an eine PVDF-Membran, notwendig. Abb. 9 B zeigt die Signale der YopB- und YopD-Antikörper in der Immunfluoreszenzfärbung. Die spezifische Bindung konnte anhand der Negativkontrollen verifiziert werden.

II.2 YopB und YopD dekorieren die Bakterienoberfläche unter Sekretionsbedingungen

Wie aus der Literatur bekannt, ist die Expression von Genen des Virulenzplasmids strikt reguliert, in der Art, dass erst bei einer Temperaturerhöhung auf 37 °C die Transkription der Virulenzgene aktiviert wird [Cornelis *et al.*, 1987; Rouvroit *et al.*, 1992]. Durch zusätzliche Chelatierung/Depletierung des im Kulturmedium enthaltenen Calciums durch z.B. Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA) wird das Bakterienwachstum inhibiert und die Yop-Sekretion *in vitro* induziert [Heesemann *et al.*, 1986]. Dabei wird die Expression des Virulenzplasmides maximal aktiviert. Dies konnte auch für YopB und YopD bestätigt werden. Abb. 10 A zeigt die Immunoblot Analyse von WA-314-Gesamtzell-Lysaten bei 27 °C, 37 °C und Sekretionsbedingungen (37 °C + 5 mM EGTA, siehe V.2.1.4). Hier wurden Lysate von Bakterien (aus Kulturen gleicher optischer Dichte) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Während bei 27 °C keine Translokator-Yops nachgewiesen werden konnten, wurden diese bei 37 °C und Sekretionsbedingungen detektiert, wobei nach Zugabe von EGTA deutlich höhere Mengen an YopB und YopD exprimiert wurden.

Weiter galt es zu prüfen, wie sich die Lokalisation der Translokatoren YopB und YopD in den Bakterien unter Sekretionsbedingungen ändert. In der Immunfluoreszenz konnte mit Hilfe verschiedener Detergenzien zur Permeabilisierung der chemisch fixierten Bakterien die intra- und extrazelluläre Fraktion der Translokator Yops unterschieden werden. Dazu wurden die Bakterien, wie unter V.2.6.1 beschrieben, entweder mit 0,1 % Triton X100- oder 2 % Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-haltigem Puffer behandelt, wobei 0,1 % Triton als nicht-permeabilisierende Bedingung diente, bei der nur extrazelluläre Proteine immungefärbt wurden. Nach Behandlung mit 2 % SDS konnte auch die intrazelluläre Fraktion der Translokator Yops sichtbar gemacht werden (Abb. 11). Wie Abb. 10 B-C zeigt, konnten YopB und YopD unter nicht-

permeabilisierenden Bedingungen nur nach Zugabe von EGTA zum Medium detektiert werden. Dabei erschienen beide Translokator-Yops gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Die Intensitätsprofile verdeutlichen eine Akkumulation der Antikörper an der Zellperipherie mit zwei Intensitäts-Maxima, die einen Abstand zwischen 0,865 μm aufwiesen. Dass es sich hierbei um die extrazelluläre, Zellwand-gebundene Fraktion von YopB und YopD handelt, konnte außerdem durch Protease-Behandlung demonstriert werden. Wenn die Calcium-depletierten Bakterien zusätzlich mit Proteinase K inkubiert wurden (siehe V.2.6.2) und YopB und YopD der Degradation zugänglich waren, konnten diese in der Immunfluoreszenz nicht mehr detektiert werden. Dies deutete darauf hin, dass die Translokator-Yops unter Sekretionsbedingungen die Oberfläche der Bakterien dekorierten und nur die extrazelluläre Fraktion gefärbt wurde.

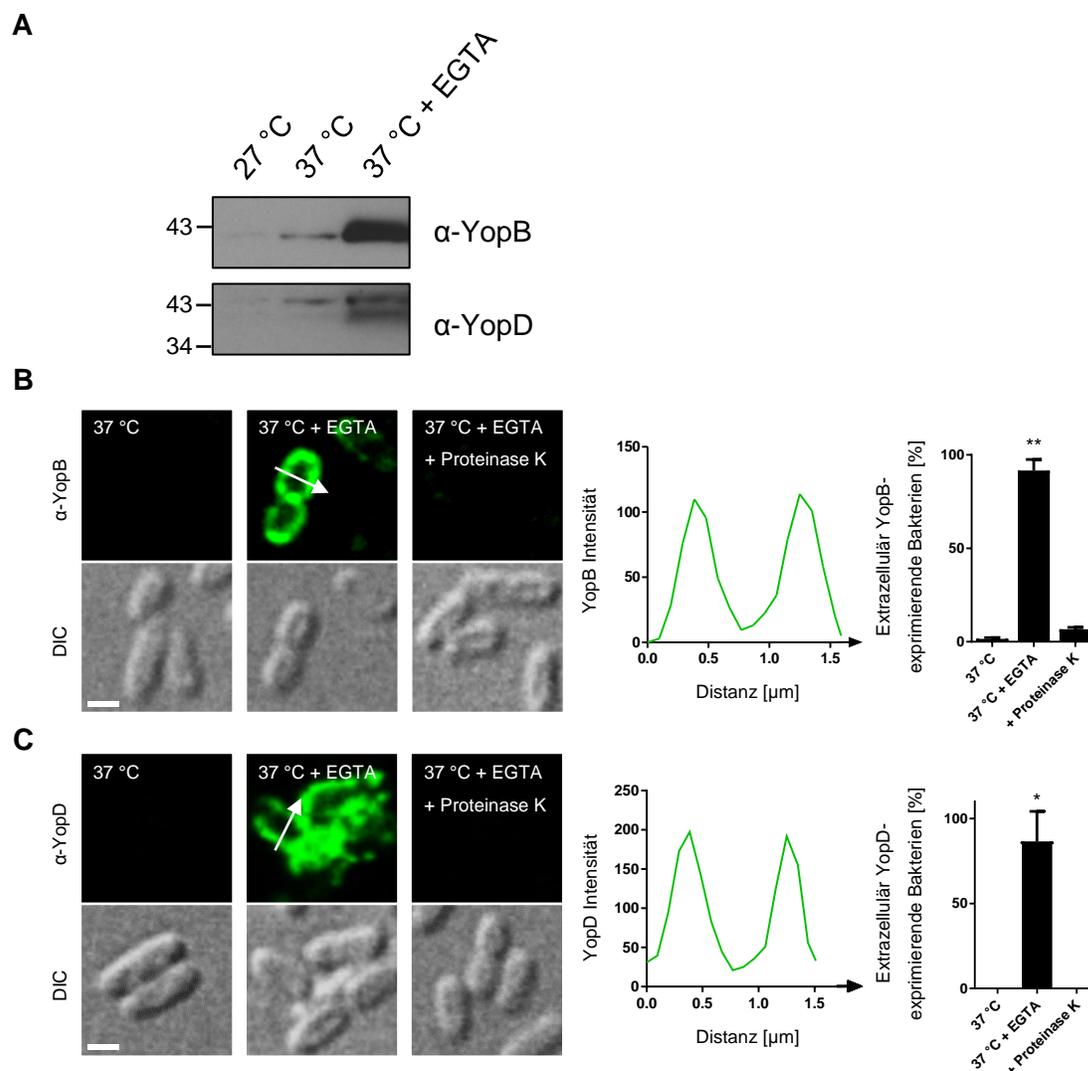


Abb. 10: Translokator-Yops dekorieren die Oberfläche der Bakterien unter Sekretionsbedingungen (+EGTA)
A: Gesamtzelllysate von WA-314 kultiviert unter den angegebenen Wachstumsbedingungen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf totale Proteinmengen von YopB und YopD analysiert. Pro Spur wurden Lysate gleicher Mengen von Bakterien aufgetragen. **B:** Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder von YopB in WA-314 kultiviert unter

den angegebenen Bedingungen. In der oberen Reihe extrazelluläres YopB, in der unteren Reihe die entsprechenden Differentialinterferenzkontrast (*differential interference contrast*, DIC)-Bilder. Der Graph zeigt das Intensitätsprofil entlang des Pfeils. Das Balkendiagramm repräsentiert den prozentualen Anteil der untersuchten Bakterien mit YopB-Intensitäten über dem Hintergrund der Negativkontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 700 Bakterien aus 2 unabhängigen Experimenten. $**p < 0,005$ (t-Test) C: Extrazelluläres YopD analog zu B. Es wurden 200 Bakterien aus 2 unabhängigen Experimenten evaluiert $*p < 0,05$ (t-Test). Maßstab: 1 μm .

Während bei 37 °C nur 1,5 % der Wildtyp-Bakterien extrazelluläres YopB zeigten, waren es rund 92 % unter Sekretionsbedingungen und nach Proteinase K-Behandlung nur noch 6,7 %. YopD wiederum wurde bei 37 °C bei 0 %, unter Sekretionsbedingungen bei 86,5 % und nach Protease-Spaltung bei 0 % auf der Oberfläche der Bakterien nachgewiesen.

Bei der mikroskopischen Analyse der totalen YopB- und YopD-Fractionen, d.h. der extra- und intrazellulären Anteile, konnte in allen untersuchten Bedingungen das jeweilige Protein detektiert werden (Abb. 11). Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Immunoblot-Analyse (Abb. 10 A), nach der die Translokatoren bereits bei 37 °C nachweisbar sind. Zusätzlich konnte die unter Sekretionsbedingungen gebildete intrazelluläre Fraktion nicht durch Proteasen eliminiert werden. Im Gegensatz zur Außenfärbung zeigten sich die Translokatoren hier vorwiegend homogen im bakteriellen Zytoplasma verteilt (Abb. 11). Die Intensitätsprofile von YopB und YopD wiesen nur je ein Maximum auf. Bei Zugabe von EGTA und sukzessive Proteinase K zeigte das Intensitätsprofil von YopB zwei Maxima, deren Abstand mit 0,579 μm etwas kürzer war, als bei der Außenfärbung und deren lokales Minimum noch rund 77 % der maximalen Intensität erreichte. Dies könnte auf eine Rekrutierung der Translokator-Yops zu der dem Zytoplasma zugewandten Bakterienmembran (d.h. der Zytoplasmamembran) und damit zu den dort befindlichen Sekretionsmaschinen hindeuten. Die Quantifizierung der prozentualen Anteile YopB-gefärbter Bakterien ergab zu jeder Bedingung 100 %. Für YopD-gefärbte Bakterien schwankten die Anteile zwischen 42 % bei Proteinase K-Behandlung und 98,5 % unter Sekretionsbedingungen.

Wie schon im Western Blot wurden unter Sekretionsbedingungen höhere Mengen von YopB und YopD beobachtet, als bei 37 °C, was durch die maximale Aktivierung der Virulenzgen-Expression verursacht wurde.

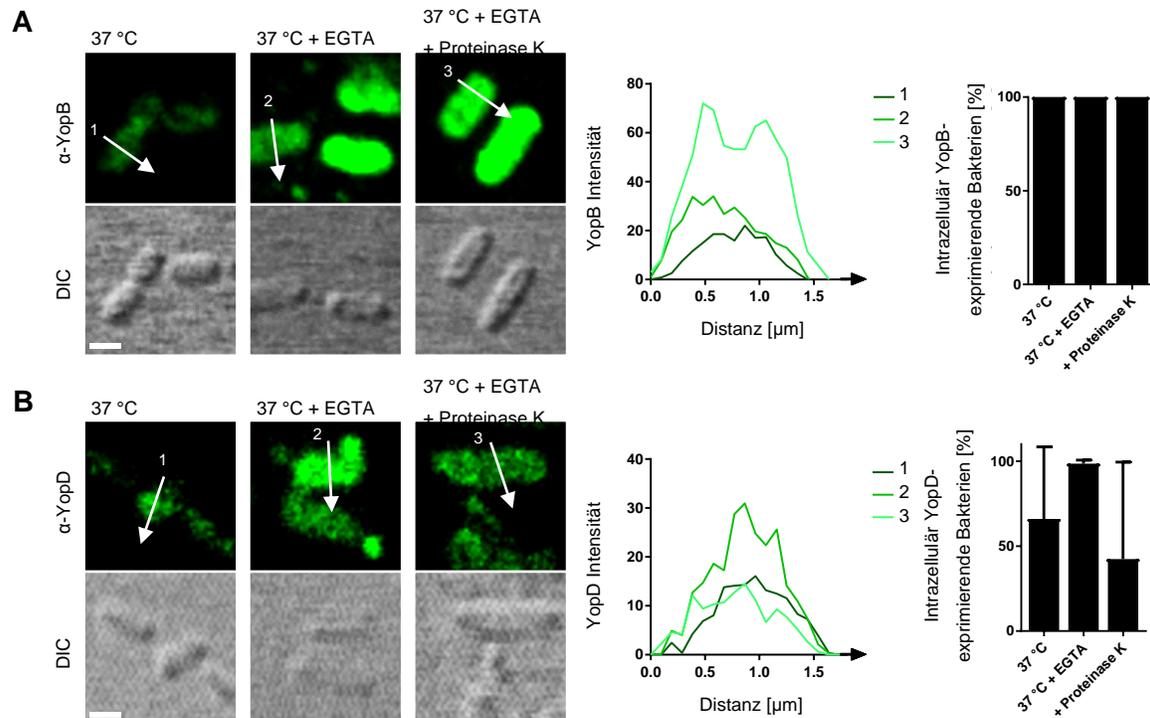


Abb. 11: Intrazelluläre Translokatoren weisen cytosolische Verteilung auf, deren Intensität unter Sekretionsbedingungen zunimmt.

A: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der Totalfärbung von YopB des Stammes WA-314 zu den angegebenen Bedingungen. In der oberen Reihe intrazelluläres YopB, in der unteren Reihe die entsprechenden DIC-Bilder. Der Graph repräsentiert die Intensitätsprofile entlang der Pfeile. Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der untersuchten Bakterien mit YopB-Intensitäten über dem Hintergrund der Negativkontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 150 Bakterien aus 2 unabhängigen Experimenten. **B:** Intrazelluläres YopD analog zu A. Hier wurden 200 Bakterien aus 2 unabhängigen Experimenten evaluiert. Maßstab: 1 μ m

II.3 YopD und YopE beeinflussen die Sekretion bzw. das Erscheinungsbild von YopB auf der Bakterienoberfläche

Seit fast 20 Jahren ist YopD als Regulator der Virulenzgen-Expression und Translokation bekannt (Williams & Straley 1998). Dies bestätigend konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant höhere zellassoziierte Menge von YopB in der *yopD*-Mutante (Δ YopD) mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Dazu wurden verschiedene Stämme unter Bedingungen der Ca^{2+} -Depletion untersucht (siehe V.2.6.2) und die mittlere YopB-Fluoreszenzintensität (MFI) einzelner Bakterien bestimmt. Während die Deletion von YopE keinen Einfluss auf die YopB-Menge hatte, wurden im Stamm WA-314 Δ YopD 5 x höhere MFIs als bei WA-314 gemessen (Abb. 12 A-B). Zusätzlich konnte auch bei der Analyse von Gesamtzelllysaten eine erhöhte Proteinmenge in WA-314 Δ YopD gefunden werden (Abb. 12 C), vor allem bei 37 °C, aber auch bei 27 °C, eine Bedingung bei der die Expression der Virulenzgene typischerweise reprimiert ist. Dieses Ergebnis zeigt auch die Deregulation in Bezug auf die Temperatur-Kontrolle,

was mit der beschriebenen negativen regulatorischen Funktion von YopD korreliert (Williams & Straley 1998; Olsson et al. 2004).

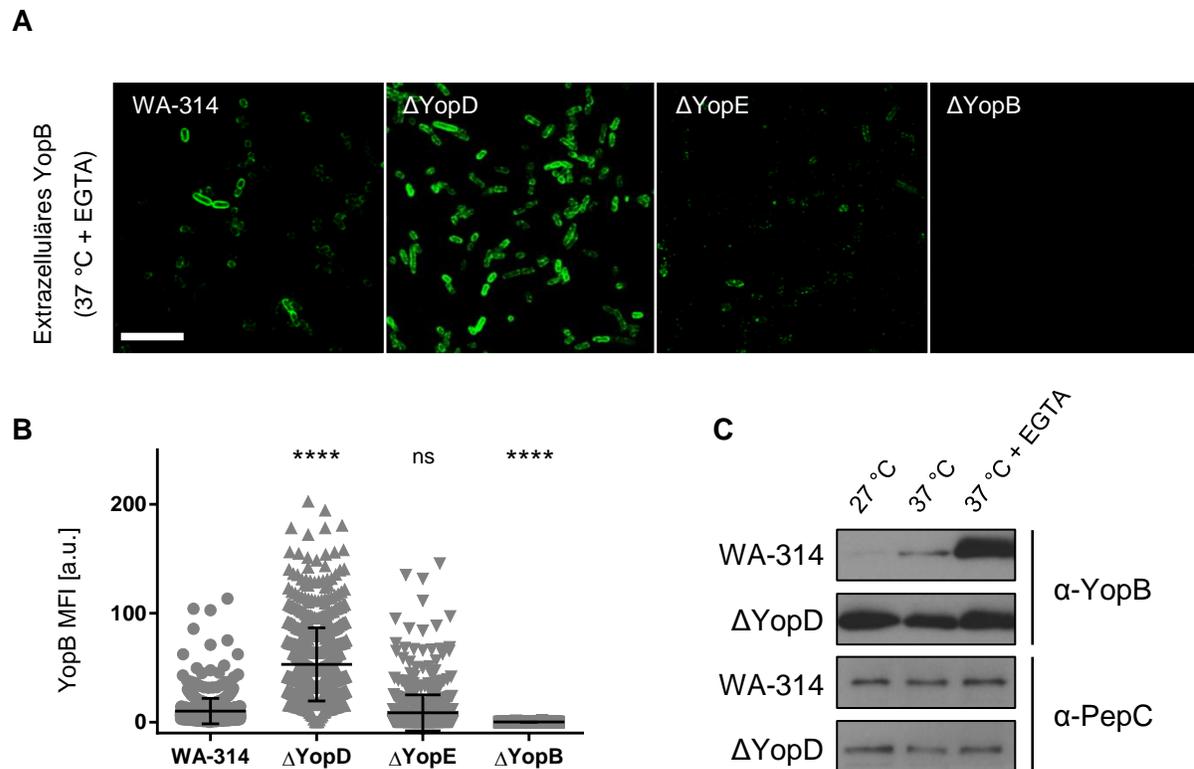


Abb. 12: YopD ist ein negativer Regulator der YopB Expression und Sekretion.

Der Wildtyp-Stamm WA-314 sowie die Einzel-*knock out*-Mutanten WA-314 Δ YopD, - Δ YopE und - Δ YopB wurden nach Inkubation bei 37 °C unter Zugabe von EGTA mit anti-YopB immungefärbt und die mittleren Fluoreszenzintensitäten analysiert. **A:** Repräsentative konfokale Aufnahmen von Wildtyp WA-314, sowie *knockout* Mutanten von *yopD*, *yopE* und *yopB*. Maßstab: 10 μ m. **B:** Quantifizierung zu A. Ein Punkt repräsentiert ein Bakterium. Horizontale Linien kennzeichnen Mittelwerte \pm Standardabweichung von 700 Bakterien aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Stämme wurden mit WA-314 verglichen. **** p < 0,0001. **C:** Lysate von gleichen Bakterienmengen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Immunoblot-Analyse auf YopB-Expression untersucht. Als Ladekontrolle diente das *housekeeping* Protein PepC.

Weiterhin wurde ein Stamm untersucht (Wa-314 Δ YopE), der nachweislich mit einer Hypertranslokation von Yops bei Wirtszellinfektion verbunden ist [Aili et al., 2007; Wolters et al., 2013]. Die *yopE*-Mutante kann im Gegensatz zur *yopD*-Mutante funktionale Translokationssporen bilden. Ursache für die vermehrte Translokation könnte eine gesteigerte Sekretion sein, was für YopB überprüft werden sollte. Im Vergleich zu der gleichmäßigen Verteilung von YopB auf der Bakterienoberfläche von WA-314 oder WA-314 Δ YopD zeigte der YopE-defiziente Stamm teilweise punktförmige Strukturen. Die YopB-MFI unterschied sich jedoch nicht nennenswert von der des Wildtyps. Hier war nur das Erscheinungsbild der YopB-Außenfärbung beeinflusst, was

auf eine Beteiligung YopEs bei der Oberflächenverteilung von YopB hindeutet, eine Rolle bei der Regulation der Sekretion jedoch nicht bekräftigt.

II.4 Superauflösende Mikroskopie bestätigt gleichmäßige Verteilung der Translokator-Yops auf der Bakterienoberfläche unter Sekretionsbedingungen

Da die Lichtmikroskopie nach Ernst Abbe einer limitierten Auflösung von etwa der halben Wellenlänge des Lichtes [Abbe, 1873], also rund 200 nm unterliegt, konnten mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie keine hochauflösenderen strukturellen Informationen gewonnen werden. Die Erkenntnisse von Kudryashev und Kollegen, die mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Komponenten des Typ III Sekretionsapparates von *Y. enterocolitica* in der Lage waren, die Injektisomen unter Sekretionsbedingungen zu untersuchen und einzelne distinkte Fluoreszenz-Zentren fanden [Kudryashev *et al.*, 2015], konnten für YopB und YopD auf der Bakterienoberfläche unter Sekretionsbedingungen nicht bestätigt werden. Hier lag eine eher gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz-Signale auf der Bakterienoberfläche vor (Abb. 10). Dass die vermeintlich porenbildenden Translokatoren unter Sekretionsbedingungen an die Nadelspitze der Injektisomen binden, konnte mit Hilfe klassischer Konfokal Laser Scanning Mikroskopie weder verifiziert noch indiziert werden, da dies unter die Auflösungsgrenze fiel. Um die Oberflächenverteilung von YopB hochaufgelöst zu untersuchen, wurde die STED-Mikroskopie (*stimulated emission depletion*) angewendet, die vom Nobelpreisträger Stefan Hell entwickelt wurde [Hell & Wichmann, 1994]. Diese Technik nutzt einen zweiten ringförmigen Laser mit hohen Intensitäten im energiearmen Wellenlängenbereich, um zuvor angeregte Fluorophore in den Grundzustand „abzuregen“ (englisch *depletion*), sodass nur die Moleküle im Zentrum dieses Lasers Licht emittieren. Dabei kann eine Auflösung von bis zu 30 - 80 nm erreicht werden [Schermelleh *et al.*, 2010].

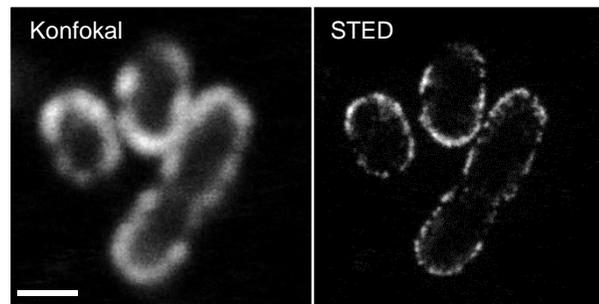


Abb. 13: STED-Mikroskopie bestätigt homogene Oberflächen-Lokalisation von YopB unter Sekretionsbedingungen

WA-314 wurde unter Sekretionsbedingungen kultiviert und anschließend mit anti-YopB immungefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen im Konfokalen und 2D STED-Modus mit einer lateralen Auflösung von 40 nm
Maßstab: 1 μ m.

Für die STED-Aufnahmen wurde das Abberior 4 *channel easy* 3D STED *superresolution* Mikroskop verwendet (Abberior Instruments GmbH, Göttingen) und Z-Stapel im 80 % 3D STED-Modus mit einer lateralen und axialen Auflösung von 80 nm, als auch im 100 % 2D STED-Modus mit 40 nm lateraler und 150 nm axialer Auflösung akquiriert. Mit Hilfe dieser hochauflösenden Technik konnten deutlich schärfere Bilder aufgenommen werden. Wie in Abb. 13 beispielhaft dargestellt, war in den STED-Aufnahmen die Oberflächenfärbung mit den YopB-Antikörpern ersichtlich. Mit einer Dicke von 118 ± 4 nm waren YopB-Strukturen auf der Bakterienoberfläche gebunden. Einzelne definierte zentrische Strukturen oder Cluster, wie sie für Injektisomen unter Sekretionsbedingungen beobachtet wurden [Kudryashev *et al.*, 2015], konnten hier nicht detektiert werden.

II.5 Während der Zellinfektion zeigen sich YopB und YopD bakterienassoziiert an einer Subpopulation der infizierenden Bakterien

Hauptziel dieser Arbeit war die Visualisierung der Translokationspore während der Zellinfektion. Dafür wurden HeLa-Zellen mit *Y. enterocolitica* WA-314 infiziert und immungefärbt. Im Vorfeld wurde die Spezifität der Antikörper in der Zellinfektion geprüft (siehe II.1.3) und die Kinetik der YopB/D-immunfärbung untersucht. Dabei erwies sich eine Stunde Infektionszeit als am besten geeigneter Zeitpunkt. Bei kürzeren Inkubationszeiten konnte fast kein YopB oder YopD nachgewiesen werden und bei längerer Inkubation war der zytotoxische Effekt so groß, dass nicht genügend Zellen nach den Färbe- und Waschschritten am Deckgläschen haften blieben und evaluiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Daher wurden alle weiteren Experimente mit

einem Bakterien-Zell-Verhältnis (*multiplicity of infection*, MOI) von 100:1 und 1 h Inkubationszeit durchgeführt. Für die Zeitverläufe wurde jedoch die MOI verringert, da nach 120 min sonst die Quantifizierung in Folge der starken Bakterienvermehrung nicht mehr möglich war.

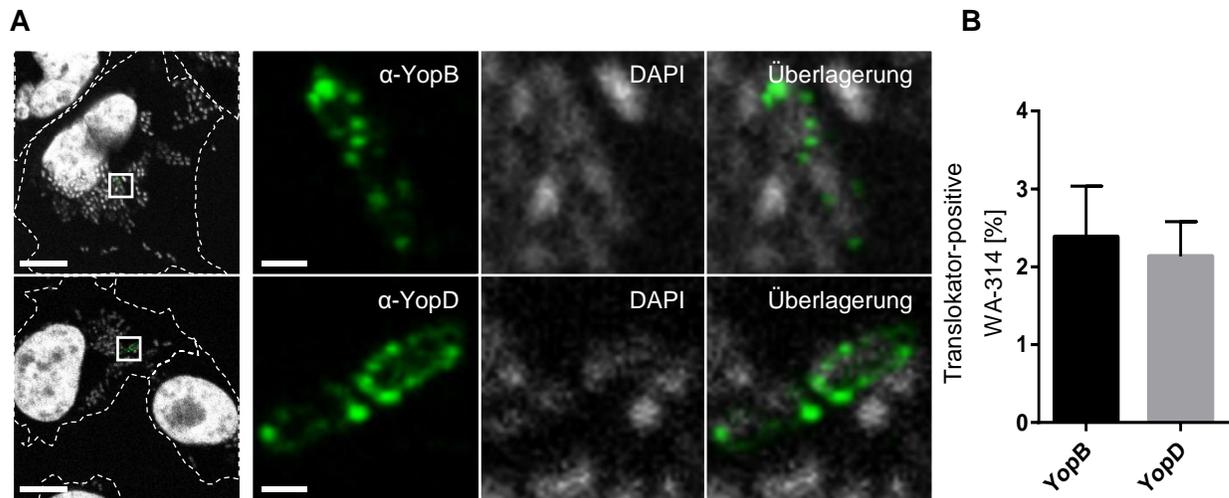


Abb. 14: Bestimmung der YopB- und YopD-Oberflächen-Expression während der Zellinfektion.

A: Repräsentative konfokale Aufnahmen von WA-314-infizierten HeLa-Zellen 60 min nach Infektion mit MOI 100. Die Zellen wurden fixiert und unter nicht Bakterien-permeabilisierenden Bedingungen mit anti-YopB (obere Reihe) und anti-YopD (untere Reihe) immun-gefärbt. Die Bakterien und Zellkerne wurden mit dem DNS-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht. Nahaufnahmen zeigen 10-fache Vergrößerungen der weißen Quadrate. Die gestrichelten Linien in den Übersichtsaufnahmen markieren die Zellbegrenzungen. Maßstäbe: 10 µm in Großaufnahmen, 1 µm in Vergrößerungen. **B:** Quantifizierung der Translokator-positiven, zell-assoziierten Bakterien nach 60 min Infektion mit MOI 100. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardfehler von je 27 individuellen Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten.

Für die mikroskopische Analyse wurden die fixierten Proben mit 0,1 % Triton X100 behandelt, was wie unter II.2 beschrieben keine Permeabilisierung der Bakterien bewirkt, jedoch in der Immunfluoreszenzfärbung standardmäßig zur Permeabilisierung von eukaryotischen Zellen verwendet wird. Somit konnten spezifisch die extrabakteriellen Translokatoren untersucht werden. Von den immungefärbten Zellen wurden Z-Stapel am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop angefertigt, um die durch die zytotoxischen Effekte sehr stark abgerundeten Zellen vollständig aufnehmen zu können. Dabei fiel zunächst auf, dass nur ein kleiner prozentualer Anteil der zellassozierten Bakterien überhaupt YopB und YopD exprimierten und die gefärbten Strukturen bakterienassoziiert erschienen. Bei der Quantifizierung konnten sowohl für YopB als auch für YopD nur rund 2 % der zellassozierten Bakterien mit entsprechender Immunfärbung ermittelt werden (Abb. 14 B). Dies war überraschend, da unter Sekretionsbedingungen und gleicher Färbemethode 92 % YopB-positive und 86,5 % YopD-positive Bakterien beobachtet wurden. Abb. 14 A zeigt repräsentative konfokale Bilder *Yersinia*-infizierter HeLa-Zellen 1 h nach Infektionsbeginn. Bei genauerer Betrachtung waren punktförmige Strukturen zu erkennen, die

stark an das Erscheinungsbild der GFP-markierten Injektisomen aus der Arbeit von Kudryashev und Diepold und der ermittelten Injektisomen-Cluster erinnerten [Kudryashev *et al.*, 2015].

II.6 Bakterielle und zelluläre Faktoren beeinflussen den Anteil YopB/D-exprimierender Bakterien während der Infektion

Wie schon für die Sekretionsbedingung gezeigt, wurde auch während der Zellinfektion der Einfluss bakterieller Faktoren bei der Expression der Translokatoren während der Zellinfektion untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen *Yersinia*-Mutanten mit einer MOI von 100 infiziert und nach 1 h Inkubation mit YopB- und YopD-Antikörpern immungefärbt. Während der Verifizierung der Antikörper-Spezifität auch bei Zellinfektion (siehe Abb. 9 B) wurde deutlich, dass in den Stämmen, in denen jeweils eines der putativen Porenproteine deletiert wurde, der jeweils verbliebene Translokator an signifikant mehr Bakterien detektiert werden konnte. Abb. 15 A zeigt die Quantifizierung WA-314 Δ YopB- und WA-314 Δ YopD-infizierter HeLa-Zellen. Dass diese *knock out* Mutanten keine funktionalen Poren mehr bilden und somit auch keine Effektor-Translokation vornehmen können, ist bereits bekannt und wurde mit Hilfe eines Zelltod-Experiments überprüft. Dazu wurden J774 Mausemakrophagen infiziert und mit dem DNS-Farbstoff Sytox Green behandelt. Dieser Farbstoff ist nicht zellpermeabel und dringt nur in die Zellen ein, die auf Grund der apoptotischen Wirkung von transloziertem YopP teilweise durchlässig werden. Die gemessene Absorption bei 523 nm galt als Maß für tote Zellen (Abb. 15 B). Im Vergleich zum Wildtyp führte die WA-314 Δ YopB- und WA-314 Δ YopD-Infektion zu einer ähnlich geringen Letalität wie die WA-314 Δ YopP-Infektion als Negativkontrolle. Translokations-kompetente Eigenschaften für die Translokator-Deletionsmutanten konnten somit ausgeschlossen werden.

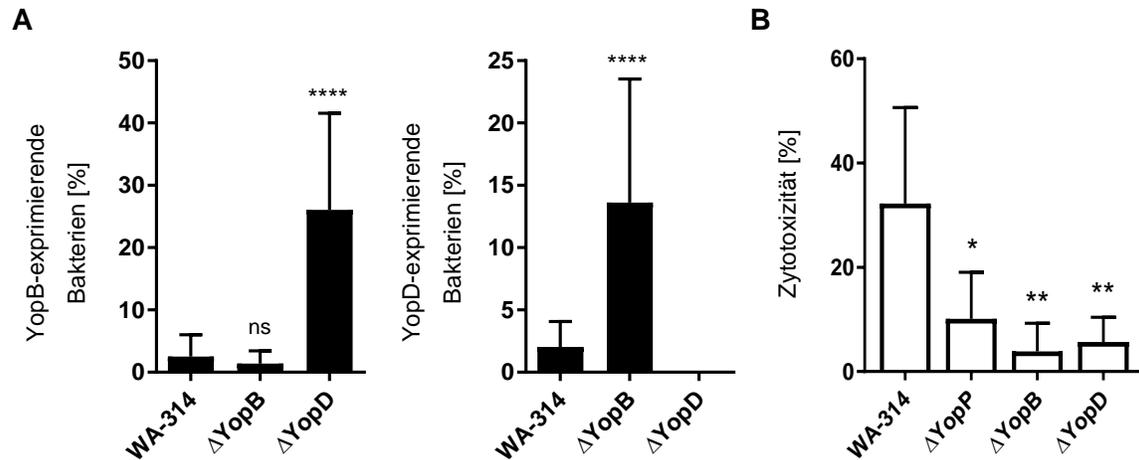


Abb. 15: YopB und YopD regulieren sich gegenseitig.

HeLa-Zellen wurden mit WA-314 und den Einzel-*knock out*-Stämmen WA-314 Δ YopB und WA-314 Δ YopD für 1 h mit einer MOI von 100 infiziert und anschließend mit anti-YopB bzw. anti-YopD immun-gefärbt. **A:** Quantifizierung der immungefärbten Bakterien bezogen auf die Gesamtzahl zellassoziierter Bakterien. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 27 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten für YopB und von 16 Zellen aus 2 unabhängigen Versuchen für YopD. **** $p < 0,0001$ (*one-way* ANOVA). **B:** Zur Analyse der Translokationsfähigkeit der *yopB*- und *yopD*-Mutanten wurde in einem Zelltod-Experiment mit Hilfe des nicht-permeablen DNS-Farbstoffes Sytox Green der Anteil toter J774 Mausemakrophagen untersucht. Dazu wurden die Makrophagen für 2 h mit MOI 100 inkubiert und die Infektion mit Gentamicin abgestoppt. Nach Zugabe des Farbstoffes wurde die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 523 nm über die Zeit verfolgt. Der Graph zeigt beispielhaft die Zytotoxizität als Prozentwert gemessener Intensitäten in toten Zellen bezogen auf vollständig lysierte Kontrollzellen 6 h nach Infektionsstopp. Die Balken entsprechen Mittelwerten \pm Standardabweichung aus 7 unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,05$, * $p < 0,005$ (*one-way* ANOVA).

Um YopB und YopD unabhängig von den Effektoren zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit einem Stamm infiziert, der nur die Typ III Sekretionsmaschinerie inklusive Translokatoren, aber keine Effektor-Yops bilden kann. Dieser als WAC-pYLCR bezeichnete Stamm (nachfolgend nur pYLCR) besitzt keine Leserahmen für Effektor-Proteine, aber die Gene, die als Reaktion auf geringe Ca^{2+} -Konzentrationen exprimiert werden (*low calcium response*, LCR) sowie zusätzlich das Adhäsins YadA, um den Zellkontakt zu gewährleisten. In diesem Stamm ist die Expression der Translokatoren stark dereguliert, was dazu führt, dass diese Bakterien bei Zellkontakt unaufhörlich Poren in die Zellmembran inserieren, diese jedoch nicht wie sonst mit Effektoren gefüllt werden. Daher kann vermutlich unkontrolliert Zellplasma aus den Poren austreten, was zu massiven zytotoxischen Effekten führt (Daten nicht gezeigt). Dies wird auch durch die unter V.2.4.3.3 beschriebene Analyse der toxischen bzw. letalen Wirkung auf J774-Mausemakrophagen unterstützt (siehe Abb. 16 C). Bei der Untersuchung von pYLCR-infizierten HeLa-Zellen konnten signifikant höhere Anteile an YopB- und YopD-positiven Bakterien beobachtet werden (Abb. 16 A, rechte Spalte, sowie Abb. 16 B).

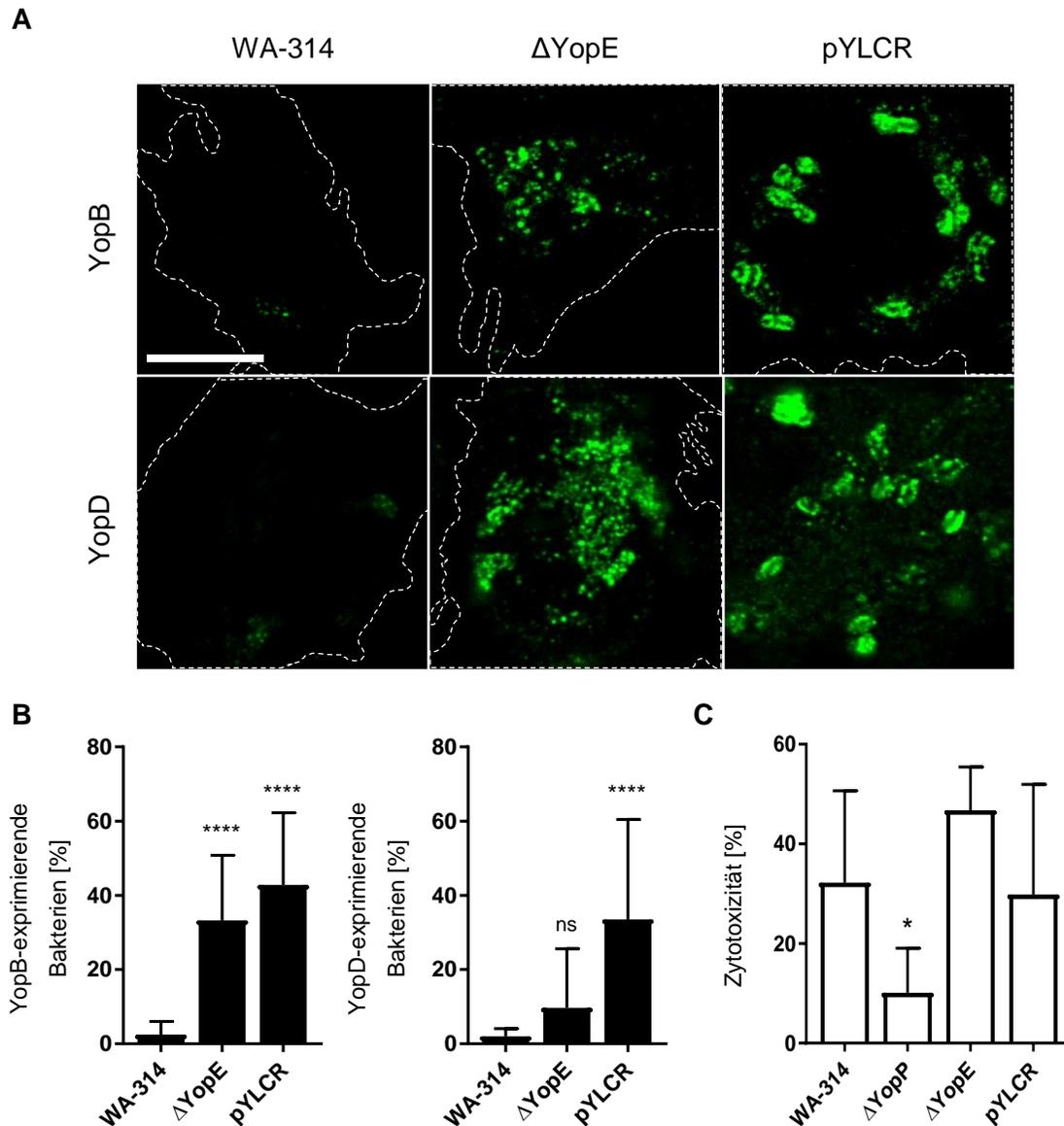


Abb. 16: Einzel-Effektor-Mutante Δ YopE und pYLCR-Stamm zeigen erhöhte Mengen Translokator-exprimierender Bakterien während der Zellinfektion.

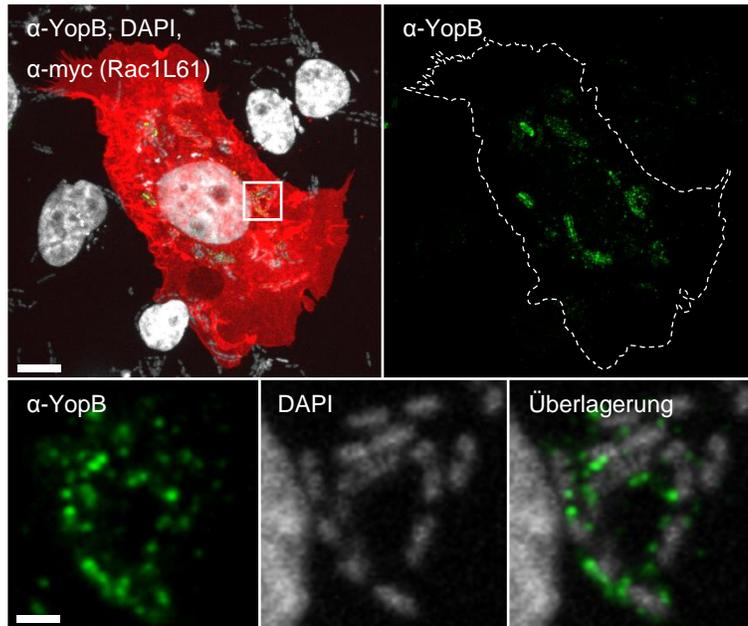
HeLa-Zellen wurden mit WA-314, WA-314 Δ YopE und pYLCR mit einer MOI von 100 für 1 h infiziert und mit anti-YopB und -YopD immungefärbt. **A:** Repräsentative konfokale Aufnahmen sind dargestellt. Zellbegrenzungen sind durch gestrichelte weiße Linien gekennzeichnet. Maßstab: 10 μ m. **B:** Quantitative Analyse der zellassoziierten Bakterien mit YopB- bzw. YopD-Färbung. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 25 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten für YopB und 16 Zellen aus 2 unabhängigen Versuchen für YopD. **** $p < 0,0001$ (t-Test). **C:** Das Diagramm zeigt die Analyse der Translokationsfähigkeit der Einzel- und Multi-Effektor-Mutanten in einem Zelltod-Experiment bei Infektion von J774 Mausemakrophagen. Dazu wurden die Makrophagen für 2 h mit MOI 100 inkubiert und die Infektion mit Gentamicin abgestoppt. Nach Zugabe des DNS-Farbstoffes Sytox Green wurde die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 523 nm über die Zeit verfolgt. Gezeigt ist die Zytotoxizität als Prozentwert gemessener Intensitäten in toten Zellen bezogen auf vollständig lysierte Kontrollzellen 6 h nach Infektionsstopp. Die Balken entsprechen Mittelwerten \pm Standardabweichung aus 7 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,005$ (one-way ANOVA).

Im Gegensatz zu pYLCR, für den annähernd gleiche zytotoxische Effekte wie bei Wildtyp-Infektion ermittelt wurden, konnten bei WA-314 Δ YopE-Infektion erhöhte Mengen toter Makrophagen

beobachtet werden. Dies korrelierte mit der beschriebenen Hypertranslokation der *yopE*-Mutante und war durch vermehrte Injektion des zur Apoptose führenden Effektors YopP zu erklären (Abb. 16 C). Für diese Hypertranslokation konnte gesteigerte Sekretion der Translokatoren nicht als Ursache bestätigt werden (Vergleich II.3). Daraus ergab sich die Frage, ob dies durch eine größere Fraktion YopB- und YopD-exprimierender Bakterien bei Zellkontakt verursacht wird. Wie die Abb. 16 B zeigt, war ein signifikant größerer Anteil anti-YopB-gefärbter Bakterien zu finden. Für YopD konnte keine signifikant höhere Fraktion immungefärbter Bakterien beobachtet werden, jedoch ist die Tendenz deutlich ($p=0,067$). Die beobachtete Hypertranslokation könnte demnach aus der größeren Anzahl translokationsaktiver Bakterien resultieren.

YopE ist als GTPase aktivierendes Protein (GAP) bekannt, das vorrangig die Rho GTPase Rac1 inaktiviert [Andor *et al.*, 2001]. Um zu prüfen, ob die erhöhten Anteile Translokator-exprimierender Bakterien auf den zellulären Wirkmechanismus von YopE zurück zu führen sind, wurden HeLa-Zellen mit einer konstitutiv aktiven Form von Rac1 transfiziert (myc-Rac1L61) und mit WA-314 infiziert. Wolters und Kollegen zeigten, dass dies ebenfalls zur Hypertranslokation der Effektor-Yops führte [Wolters *et al.*, 2013]. Unklar war jedoch, ob dies mit einer vermehrten Porenbildung bzw. erhöhten YopB/D-Expression einherging. Wie Abb. 17 zeigt, konnten ähnlich der WA-314 Δ YopE-Infektion signifikant erhöhte Mengen an YopB-exprimierenden Bakterien auf Rac1L61-transfizierten Zellen im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen ermittelt werden. YopB-gefärbte Bakterien sind in diesem Ausschnitt ausschließlich auf der myc-Rac1L61-transfizierten Zelle zu finden. Die umliegenden, nicht-transfizierten Zellen besitzen auch Bakterien, diese sind jedoch nicht immungefärbt. Die vergrößerten Ausschnitte in Abb. 17 A zeigen weiterhin, dass YopB auch nach Rac-Aktivierung noch bakterienassoziiert und in runden Strukturen erschien, wie dies auch für unbehandelte Zellen zutrifft (Vergleich Abb. 14 C). Dies verdeutlicht, dass unter physiologischen Bedingungen die Inaktivierung von Rac1 durch YopE in der Zelle einen negativen Einfluss auf die Menge an translozierenden Bakterien hat.

A



B

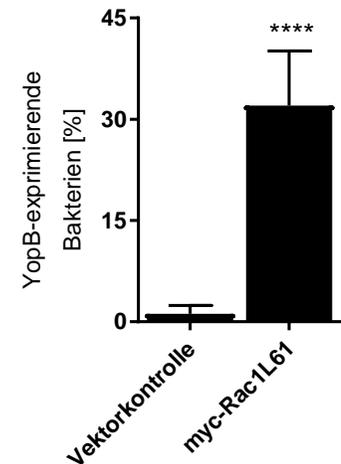


Abb. 17: Rac1-Aktivierung erhöht die Zahl YopB-gefärbter, zellassoziierter Bakterien.

HeLa-Zellen wurden mit myc-Rac1L61, der konstitutiv-aktiven Rac-Mutante, oder mit der Leervektor-Kontrolle für 8 h transfiziert und mit WA-314 für 1 h mit MOI 20 infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-YopB und anti-myc immungefärbt und mikroskopisch untersucht. **A:** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen Rac1L61-transfizierter Zellen. Die Übersichtsbilder stellen Maximum-Projektionen dar (obere Reihe), während die Vergrößerungen konfokalen Einzelbildern entsprechen (untere Reihe). Die Großaufnahmen zeigen 6,8-fache Vergrößerungen des weißen Quadrats der Übersichtsaufnahme. Die Zellbegrenzung der Rac1L61-exprimierenden Zelle ist im YopB-Einzelkanalbild durch eine gestrichelte Linie veranschaulicht. Maßstab: 10 μ m (Übersicht), 1 μ m (Großaufnahme). **B:** Der Graph zeigt die Quantifizierung der zellassozierten Bakterien mit YopB-Färbung. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von je 10 evaluierten Z-Stapeln aus 3 unabhängigen Experimenten. **** $p < 0,0001$ (t-Test). Diese Experimente wurden von Theresa Nauth durchgeführt und analysiert.

II.7 YopB Cluster können mit STED Mikroskopie aufgelöst werden

Analog zu den Sekretionsbedingungen (II.4) wurden auch die *Yersinia*-infizierten Zellen mit hochauflösender Mikroskopie analysiert. Dabei stand die Frage, ob durch STED-Mikroskopie weiter auflösbare Strukturen in einem konfokalen Fluoreszenz-Punkt zu detektieren sind und ob diese einzelnen Translokationsporen entsprechen könnten, im Zentrum. Da aus II.5 bekannt war, dass sehr wenig WA-314 Wildtyp-Bakterien YopB-Färbungen aufwiesen, wurden myc-Rac1L61- und kontroll-transfizierte HeLa-Zellen mit WA-314 sowie unbehandelte Zellen mit den Stämmen WA-314 Δ YopD und WA-314 Δ YopE infiziert und mit anti-YopB immungefärbt. Parallel wurden konfokal- und STED-Aufnahmen mit jeweils 80 nm lateraler und axialer Auflösung angefertigt und nach den gleichen Parametern analysiert. Für die Untersuchung wurde als Kompromiss im 80 % 3D-STED-Modus gearbeitet. Dies führt zwar generell zu etwas schlechterer Auflösung in XY, verbessert aber erheblich die Z-Auflösung und erlaubte so die Quantifizierung im Dreidimensionalen. Zu Präsentationszwecken wurden beispielhaft auch 100 % 2D-STED-Bilder

aufgenommen (Abb. 18 A). Während unter Sekretionsbedingungen auch mit STED keine spezifische oder organisierte Verteilung der YopB-Fluoreszenzsignale auf der Bakterienoberfläche detektiert werden konnte, war unter Infektionsbedingungen bereits konfokal ein punktförmiges Erscheinungsbild auffällig. Diese Fluoreszenz-Spots konnten mit STED weiter aufgelöst werden. In den konfokalen Aufnahmen konnten für WA-314 $6,7 \pm 2,9$ separate Fluoreszenzsignale pro Bakterienzelle ermittelt werden, für WA-314 Δ YopE waren es mit $10,6 \pm 2,5$ etwas mehr. Statistisch relevant wurde der Unterschied jedoch erst bei der Quantifizierung STED-aufgelöster Cluster. Hier waren für WA-314 $18,1 \pm 7,6$ und für WA-314 Δ YopE $33 \pm 11,9$ YopB-Signale pro Bakterium differenzierbar ($p=0,0254$, t-Test; Abb. 18 B). Bei beiden Stämmen war jedoch das Verhältnis von STED-Clustern zu Konfokal-Clustern mit rund 1:3 gleichgroß (Abb. 18 C). Funktionale Translokationsporen lassen sich also mittels STED dreifach besser auflösen. Dies korrelierte mit den Erkenntnissen von Kudryashev und Kollegen, die unter Sekretionsbedingungen 2,5 Injektisomen pro simuliertem, konfokalem Fluoreszenzkern ermittelten [Kudryashev *et al.*, 2015].

Im Gegensatz dazu konnten bei WA-314 Δ YopD sechsmal mehr STED-Cluster pro konfokalem Fluoreszenzsignal bestimmt werden. Hier schienen als Folge der gestörten Porenbildung und der vermehrten YopB-Sekretion (siehe II.3) mehr bzw. kleinere Cluster zu einem konfokalen Signal zu verschmelzen.

Die Aktivierung von Rac1 führte zu einer Hypertranslokation von Effektoren bei Wildtyp-Infektion [Wolters *et al.*, 2013]. Dies kam jedoch nicht dadurch zustande, weil einzelne Bakterien mehr YopB-Cluster produzierten. Die STED-Analyse erbrachte keine Unterschiede in der Anzahl der differenzierbaren Fluoreszenzsignale auf Rac-aktivierten Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Demnach beeinflusst konstitutiv-aktives Rac1 nicht die Anzahl der Translokationsporen pro Bakterium, sondern nur den Anteil zellassoziierter Bakterien mit Translokationsporen.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass durch Deletion von YopE mehr YopB-Cluster gebildet werden als beim Wildtyp. Pro konfokalem Signal konnten drei STED-Cluster aufgelöst werden, was bedeuten könnte, dass ein STED-Cluster einer Translokationspore entspricht, wenn man in Betracht zieht, dass 2,5 Injektisomen pro konfokalem Fluoreszenzsignal bestimmt wurden [Kudryashev *et al.*, 2015] und davon ausgeht, dass die YopB/D-Pore an der Nadelspitze dieser Injektisomen lokalisiert.

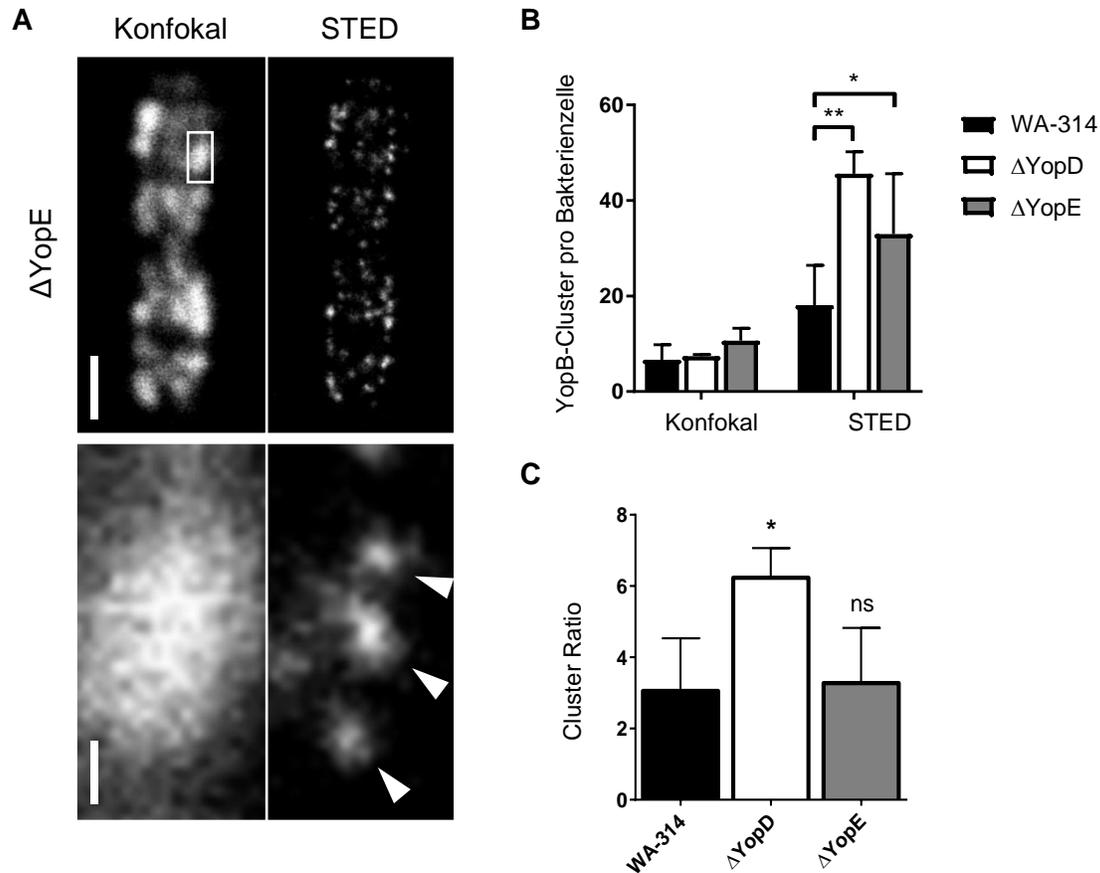


Abb. 18: Ein YopB-Fluoreszenzcluster in konfokaler Mikroskopie lässt sich in drei YopB-Cluster mit STED-Mikroskopie auflösen.

Zur Detektion von hochaufgelöstem YopB unter Infektionsbedingungen wurden HeLa-Zellen mit Yersinien infiziert und mit anti-YopB immungefärbt. **A:** Gezeigt sind repräsentative Konfokal- und 2D-STED-Aufnahmen von zellassoziierten WA-314ΔYopE während der Infektion. Die Großaufnahmen in der unteren Reihe entsprechen einer 7,5-fachen Vergrößerung des weißen Rechtecks in der Übersichtsansicht (obere Reihe). Ein konfokales Fluoreszenzsignal kann in drei STED-Signale (weiße Pfeilspitzen) aufgelöst werden. Maßstab: 1 μ m (Übersicht), 100 nm (Großaufnahme) **B:** Für die Quantifizierung wurden Z-Stapel im 80 % 3D STED-Modus mit 80 nm axialer und lateraler Auflösung aufgenommen und die Anzahl differenzierbarer YopB-Cluster verglichen. Cluster-Anzahl pro Bakterien-Zelle wird als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (t-Test). **C:** Der Graph repräsentiert die Verhältnisse von STED- zu konfokalen Signalen. Die Balken entsprechen Mittelwerten \pm Standardabweichung von 6, 3 und 9 Z-Stapeln von WA-314, WA-314ΔYopD respektive WA-314ΔYopE aus 2 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ (t-Test).

II.8 Kolokalisation der Translokatoren

II.8.1 YopB und YopD kolokalisieren in hochaufgelösten Clustern

Um Kolokalisationsstudien durchführen zu können, wurden für YopB polyklonale Ratten-Antiseren generiert, die analog zu den Kaninchen-Immunsereen gereinigt und auf Spezifität geprüft wurden (Vergleich Abb. 9, V.2.5.1.2). Bei der Ko-Immunfärbung von *Yersinia*-infizierten HeLa-Zellen konnten mittels klassischer Konfokal Laser Scanning Mikroskopie YopB und YopD an denselben Bakterien gleichzeitig nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Untersuchung der

Strukturen in der hochaufgelösten STED-Mikroskopie wurde eine starke Kolokalisation von YopB und YopD ermittelt (Abb. 19). Dazu wurde der Pearsons Koeffizient bestimmt, der die Wechselwirkung von Intensitätsverteilungen zweier Fluoreszenzkanäle beschreibt. Dieser betrachtet nur die Form-Ähnlichkeiten und vernachlässigt Signalintensitäten. So können Werte zwischen 1 und -1 ermittelt werden, wobei 1 vollständig positive, 0 keine und -1 vollständig negative Korrelation beschreibt [Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2014]. Abb. 19 A zeigt beispielhaft die Kolokalisation der STED-aufgelösten Translokatoren YopB und YopD während der WA-314 Δ YopE-Infektion von HeLa-Zellen. Die in der Überlagerung gelb erscheinenden Cluster zeigen die eindeutige Korrelation von YopB und YopD an. Zusätzlich konnte eine signifikante Kolokalisation von YopB und YopD auch für WA-314-infizierte HeLa-Zellen nach Rac1L61- bzw. Leervektor-Transfektion bestätigt werden (Abb. 19 B). Diese Ergebnisse sind klares Indiz für eine enge Interaktion der beiden putativen Porenproteine unter Infektionsbedingungen in räumlich distinkten Komplexen.

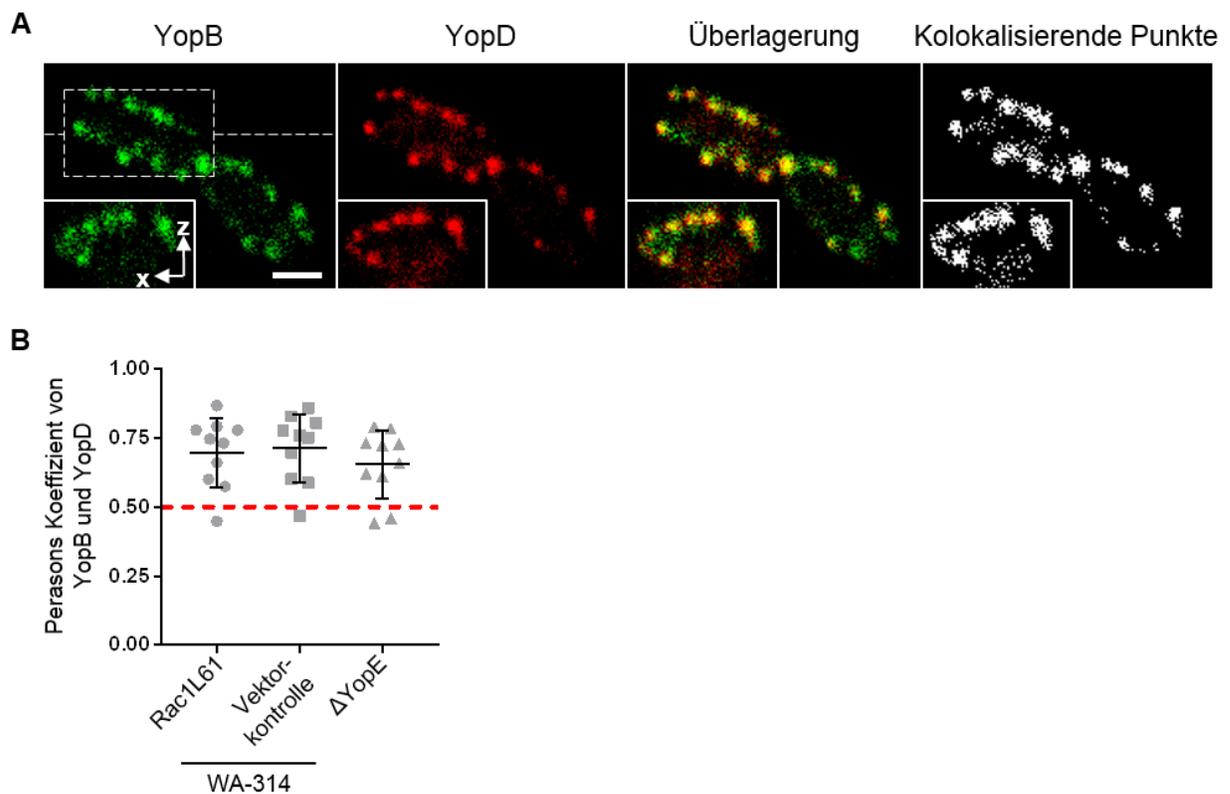


Abb. 19: YopB und YopD kolokalisieren in STED-aufgelösten Fluoreszenzpunkten

HeLa-Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* WA-314 bzw. der *yopE*-Mutante infiziert und mit polyklonalen Ratten-anti-YopB und Kaninchen-anti-YopD ko-immungefärbt. Für die Aufnahmen wurden 80 % 3D-STED-Einstellungen gewählt und Z-Stapel akquiriert. **A:** Gezeigt sind repräsentative Bilder einer fokalen Ebene von WA-314 Δ YopE während der Infektion. YopB ist in grün, YopD in rot dargestellt. Durch die Überlagerung beider Kanäle erscheinen kolokalisierende Strukturen in gelb. Zusätzlich sind die mit dem ImageJ *plug in* „Colocalization“ ermittelten kolokalisierenden Punkte in weiß dargestellt. Die Einsätze entsprechen der XZ-Projektion des gestrichelten Rechtecks entlang der durch die gestrichelte weiße Linie gekennzeichneten Ebene. Maßstab: 1 μ m. **B:** Die Z-Spapel wurden, wie unter V.2.6.3 beschrieben, quantifiziert und der Pearson-Koeffizient ermittelt. Jeder Punkt entspricht dem Koeffizienten eines

Z-Stapels. Die horizontalen Linien veranschaulichen Mittelwerte \pm Standardabweichung von 10 Aufnahmen aus 2 unabhängigen Experimenten. Werte größer als 0,5 (rote gestrichelte Linie) zeigen signifikante Kollokalisierung an [Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2014].

II.8.2 YopB und *tip*-Komplex LcrV zeigen partielle Kollokalisierung

Dass YopB und YopD Interaktionspartner sind und als Heteromultimere die Translokationspore des *Yersinia* T3SS bilden, ist schon seit einiger Zeit bekannt [Costa *et al.*, 2010] und auch die hochaufgelösten STED-Mikroskopie-Daten aus der vorliegenden Arbeit unterstützen die Idee eines heteromeren Komplexes. Zur Prüfung, ob die YopB/D-Fluoreszenzpunkte in engem räumlichen Kontakt mit der Injektionsnadel stehen, wurde die Lokalisation von YopB zusammen mit dem Nadel-*tip*-Komplex LcrV untersucht. Dazu wurden analog zur YopB und YopD Kollokalisierung sowohl Rac1L61- und kontroll-transfizierte HeLa-Zellen mit Wa-314 als auch unbehandelte HeLa-Zellen mit WA-314 Δ YopE infiziert und mit polyklonalen Ratten-anti-YopB und Kaninchen-anti-LcrV immungefärbt. Zur Analyse wurden 80 % 3D STED-Z-Stapel aufgenommen und, wie unter V.2.6.2 beschrieben, quantifiziert. Die ermittelten Pearson-Koeffizienten ließen keine eindeutige Aussage zu, da eine signifikante Kollokalisierung für Werte von 0,5 bis 1 angenommen wird [Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2014] und die ermittelten Koeffizienten für YopB und LcrV dicht am Schwellenwert 0,5 lagen (Abb. 20 B). Daher wurden zusätzlich die Manders-Koeffizienten M1 und M2 genutzt, die die Menge korrelierender Strukturen beschreiben, also die Fraktion des einen Proteins, die mit einem zweiten Protein kollokalisiert und umgekehrt [Dunn *et al.*, 2011]. Sie können Werte von 0 bis 1 annehmen, wobei beispielsweise ein Wert von 0,5 bedeutet, dass 50 % der Pixel kollokalisieren [Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2014]. Laut dieser Analyse standen für Aufnahmen von WA-314 Δ YopE-infizierten HeLa-Zellen 79 % der YopB-Signale in Korrelation zu LcrV-Signalen und 77 % *vice versa* (Abb. 20 C). Der ermittelte Pearson Koeffizient von 0,47 deutete jedoch nicht auf signifikante Kollokalisierung hin. Hier schien daher eine partielle Kollokalisierung vorzuliegen, was auch durch die repräsentativen Aufnahmen in Abb. 20 A deutlich wurde. Es fanden sich sowohl Cluster mit starker Kollokalisierung (weiße, ausgefüllte Pfeilspitzen), als auch Bereiche in denen die beiden Proteine eher nebeneinander detektiert wurden (weiße, nicht-ausgefüllte Pfeilspitzen). Spots, die nur LcrV enthielten wurden ebenfalls beobachtet (weiße Pfeile). In den Clustern, in denen YopB und LcrV nicht perfekt überlagerten (weiße, nicht-ausgefüllte Pfeilspitzen), handelte es sich vermutlich um Bereiche, die durch den generell schwächeren anti-LcrV-Antikörper nicht genauso gut immungefärbt wurden, wie die Spots mit perfekter Kollokalisierung (weiße, ausgefüllte Pfeilspitzen). Dies kann die Analyse der Korrelations-Koeffizienten nachteilig beeinflusst haben, obwohl in der Darstellung der kollokalisierenden Punkte eine Korrelation deutlich wurde. Da auch YopB-freie LcrV-Spots

identifiziert werden konnten, die möglichen inaktiven Injektisomen ohne Zellkontakt entsprechen könnten, ist insgesamt eine partielle Kolokalisation anzunehmen. Zusammengenommen sind dies starke Indizien dafür, dass das YopBD-Translocon in räumlicher Nähe der T3S-Maschinerie lokalisiert und mit den Injektisomennadeln interagiert.

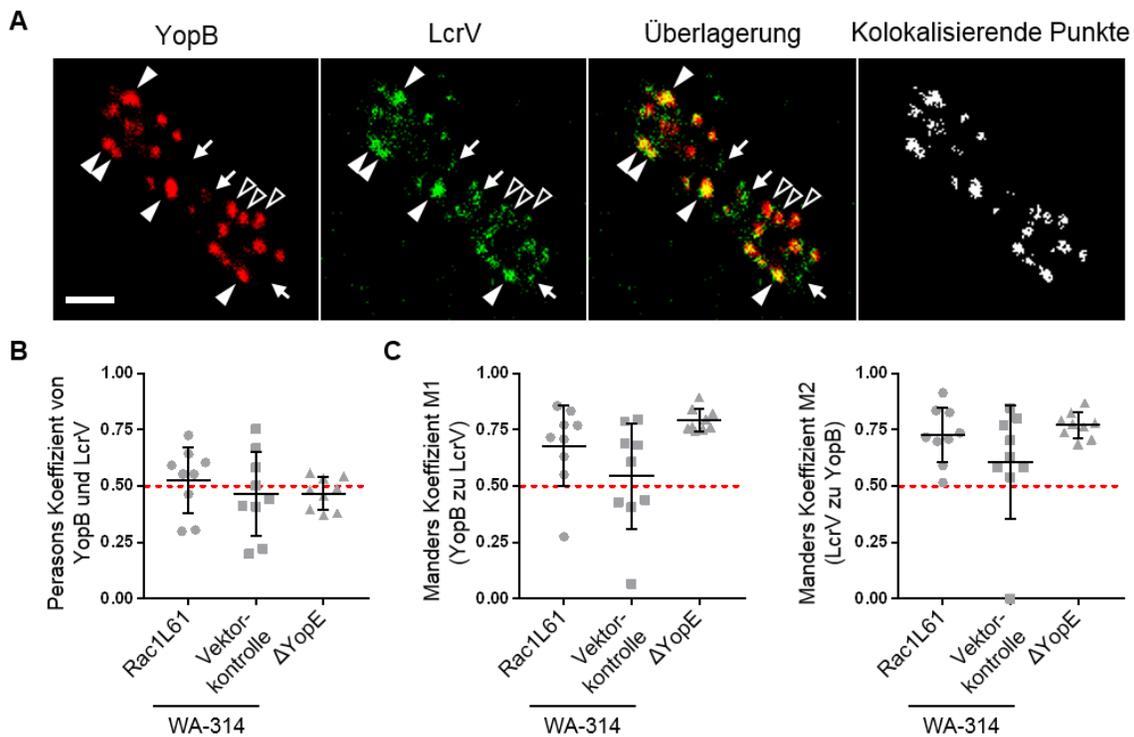


Abb. 20: Kolokalisation von YopB und LcrV in STED-aufgelösten Punkten

HeLa-Zellen wurden mit *Yersinia* infiziert und mit polyklonalen Ratten-anti-YopB und Kaninchen-anti-LcrV kommungefärbt. Für die Aufnahmen wurden 80 % 3D-STED-Einstellungen gewählt und Z-Stapel akquiriert. **A:** Gezeigt sind repräsentative Bilder einer fokalen Ebene von WA-314 Δ YopE während der Infektion. YopB ist in rot, LcrV in grün dargestellt. Durch die Überlagerung beider Kanäle erscheinen kolokalisierende Strukturen in gelb. Zusätzlich sind die mit dem ImageJ *plug in* „Colocalization“ ermittelten kolokalisierenden Punkte in weiß dargestellt. Cluster mit starker Kolokalisation sind mit weißen, ausgefüllten Pfeilspitzen gekennzeichnet, während weiße, nichtausgefüllte Pfeilspitzen Strukturen markieren, die beide Proteine mit partieller Kolokalisation enthalten. Weiße Pfeile zeigen reine LcrV-Spots an. Maßstab: 1 μ m. **B:** Die Z-Stapel wurden, wie unter V.2.6.3 beschrieben, quantifiziert und der Pearson-Koeffizient ermittelt. Jeder Punkt entspricht dem Koeffizienten eines Z-Stapels. Die horizontalen Linien veranschaulichen Mittelwerte \pm Standardabweichung von 9 Aufnahmen aus 2 unabhängigen Experimenten. Werte größer als 0,5 (rote gestrichelte Linie) zeigen signifikante Kolokalisation an [Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2014]. **C:** Analog zu B wurden die Manders Koeffizienten ermittelt, wobei M1 die Korrelation von YopB zu LcrV angibt und M2 die Korrelation von LcrV zu YopB. Einzelne Datenpunkte entsprechen den Koeffizienten einzelner Z-Stapel. Mittelwerte \pm Standardabweichung von 9 Aufnahmen aus 2 unabhängigen Experimenten sind durch horizontale Linien gekennzeichnet. Signifikante Kolokalisation wird für Werte von größer als 0,5 (rote gestrichelte Linie) angenommen [Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2014].

II.9 YopB und YscD lokalisieren in definierten Bereichen mit einem Abstand von ca. 100 nm

Um die Hypothese zu erhärten, dass die Translokationspore unter Infektionsbedingungen mit den Injektisomen in Verbindung bleibt, wurde eine weitere hochauflösende Mikroskopie-Technik

genutzt. Mit Hilfe strukturierter Illumination (*structured illumination microscopy*, SIM) kann die Auflösung in einem Weitfeld-Mikroskop verdoppelt werden. Dabei wird ein Streifenmuster genutzt, das dadurch entsteht, dass das Licht ein mobiles optisches Gitter passiert, bevor es die Probe illuminiert [Heintzmann & Cremer, 1999; Gustafsson, 2000]. Durch verschiedene Orientierungen und Phasenverschiebungen des Gitters werden mehrere Einzelbilder generiert, die durch Anwendung eines mathematischen Algorithmus zu einem hochaufgelösten Bild der zugrunde liegenden Struktur prozessiert werden [Schermelleh *et al.*, 2010]. Für die Untersuchungen wurde ein Yersinien-Stamm genutzt, der keine Effektoren, aber GFP-YscD exprimiert (AD4306, Diepold *et al.* 2015), was als Marker für Injektisomen genutzt werden konnte. YscD ist eine Komponente im Basalkörper der Sekretionsmaschinerie und in der inneren Bakterienmembran lokalisiert [Michiels *et al.*, 1991; Plano & Straley, 1995]. HeLa-Zellen wurden mit dem Stamm AD4306 infiziert, mit anti-YopB immungefärbt und im 3D-SIM-Verfahren mikroskopiert. Laut Herstellerangaben können im 3D-SIM-Modus ~115 nm laterale und 269 nm axiale Auflösung erreicht werden (Nikon). Die Aufnahmen wurden, wie unter V.2.6.4 beschrieben, analysiert und die Abstände zwischen den distinkten Fluoreszenzkernen im grünen und roten Kanal berechnet.

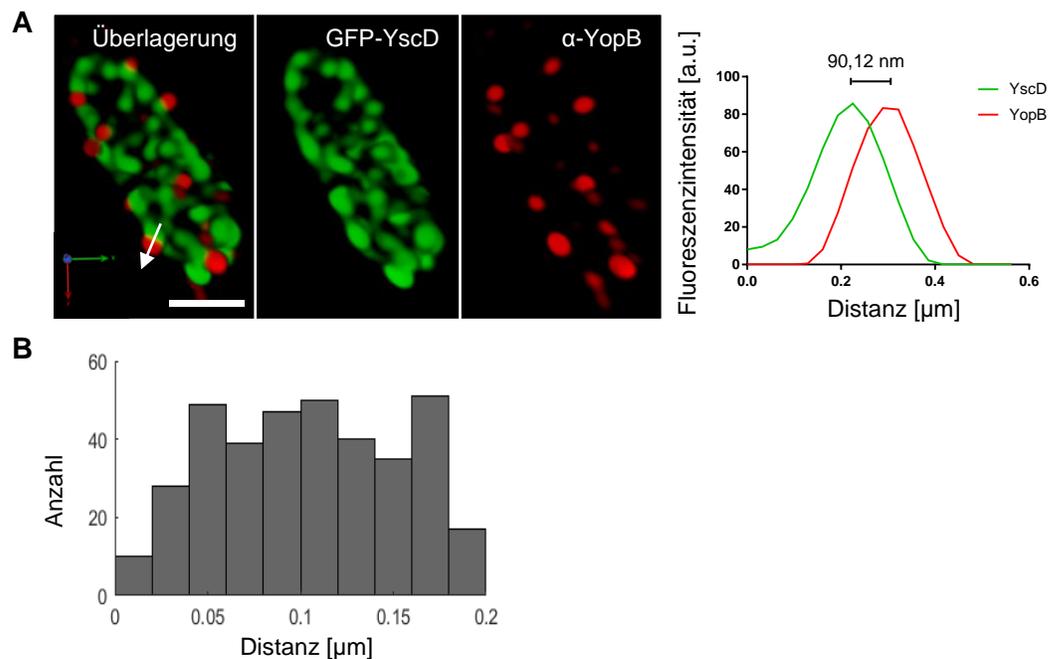


Abb. 21: Lokalisation von YopB und YscD in einem Abstand von 100 nm

HeLa-Zellen wurden für 60 min mit dem GFP-YscD-exprimierenden *Yersinia*-Stamm AD4306 infiziert und mit anti-YopB immungefärbt. Hochauflösende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden am N-SIM (Nikon, Tokio, Japan) angefertigt. **A:** Die 3D-Rekonstruktion einer einzelnen Bakterienzelle wurde mit Volocity 6 generiert. GFP-YscD markiert das basale Ende der Injektisomen in der Bakterienzelle, während die extrabakterielle Fraktion von YopB in der Immunfärbung räumlich verschoben direkt neben grünen Fluoreszenzclustern erscheint. Maßstab: 1 μ m. Die Intensitätsprofile beider Fluorophore entlang des weißen Pfeils in der Überlagerungsansicht sind im Diagramm rechts dargestellt. Der berechnete Abstand der Intensitätsmaxima ist gekennzeichnet. **B:** In Imaris wurden die Koordinaten der Massezentren der Fluoreszenzcluster ermittelt und in Matlab mit einer *Nearest Neighbour* Analyse die Koordinatenpaare mit dem geringsten Abstand bestimmt. Die Anzahl der berechneten Abstände ist im Histogramm

dargestellt, wobei Distanzen größer 0,2 in diesem Graphen nicht gezeigt sind. Es wurden 677 Koordinatenpaare ermittelt (n=1), wobei Distanzen von rund 100 nm am häufigsten bestimmt wurden.

Für diese Studien musste auf die SIM-Technologie ausgewichen werden, da die Ausstattung des zur Verfügung stehenden STED-Mikroskops derzeit keine gleichzeitige Depletion von grün- und rot-markierten Strukturen erlaubt, ohne dass enorme *photobleaching* Effekte auftreten würden (persönliche Kommunikation mit dem Abberior Instruments Team). Die Möglichkeit mit einem anti-GFP-Antikörper und beliebigem Sekundärantikörper gegen zu färben bestand nicht, da das markierte Protein innerhalb der Bakterien lokalisiert und sich diese nur mit harschen Detergenzien permeabilisieren lassen und infizierte Zellen eine solche Behandlung nicht überstehen (Daten nicht gezeigt).

Abb. 21 A zeigt beispielhaft, dass mit Hilfe von 3D-SIM für GFP-YscD definierte Fluoreszenzcluster ermittelt werden konnten, die über die ganze Bakterienzelle verteilt waren. Die detektierten YopB-Cluster erschienen räumlich verschoben meist neben den YscD-Strukturen. Fast immer ließ sich schon optisch ein YopB-Cluster zu einem YscD-Fluoreszenzkern zuordnen. Wurde ein Linienprofil durch ein solches YopB-YscD-Paar erstellt, wie in der repräsentativen Überlagerungsansicht durch den Pfeil gekennzeichnet, konnten die Intensitätsmaxima veranschaulicht und die Distanz berechnet werden. Der hier ermittelte Abstand von rund 90 nm korrelierte mit dem Ergebnis aus der *Nearest Neighbour* Analyse (V.2.6.4), bei der sich die Distanzen um 100 nm häuften (Abb. 21 B).

III Diskussion

Trotz unterschiedlicher Infektionsrouten und Schweregrade der Yersinien-Infektionen, teilen alle drei humanpathogenen Spezies einen gemeinsamen Tropismus für lymphatische Gewebe und verfügen über viele konservierte Mechanismen der primären Immunabwehr des Wirtes zu entgehen [Cornelis *et al.*, 1989]. Die Ausprägung der pathogenen Eigenschaften ist mit der Expression verschiedener Virulenzfaktoren assoziiert, deren Regulation genau auf die wahrgenommenen Umweltsignale, wie Temperatur, Ionenkonzentration oder Wirtszellkontakt abgestimmt ist. Wie viele andere Gram-negative Pathogene verfügen *Yersinia* spp. über ein Typ III Sekretionssystem (T3SS), das sie befähigt, Spezies-spezifische Effektor-Proteine direkt aus dem bakteriellen Zytoplasma in das Wirtszell-Zytosol zu translozieren [Cornelis & Wolf-Watz, 1997]. Dort erlaubt die Aktivität der Effektoren den Bakterien z.B., (i) in nicht-phagozytierende Zellen zu invadieren, (ii) Phagozytose von professionellen Phagozyten zu inhibieren, (iii) pro-inflammatorische Antworten zu reduzieren, (iv) Apoptose zu induzieren, (v) Autophagy zu verhindern und (vi) intrazelluläres *trafficking* zu modulieren [Cornelis, 2006]. Während Zusammensetzung und Aufbau dieses Sekretionsapparates und auch die Funktionsweise der einzelnen Effektor-Yops bereits recht gut verstanden sind, ist der genaue Mechanismus, der es den Effektoren ermöglicht, die eukaryote Plasmamembran zu überwinden, noch nicht vollständig aufgeklärt.

Seit den 90er Jahren wird angenommen, dass die Bakterien hydrophobe Proteine sezernieren, die porenbildende Eigenschaften besitzen und durch Insertion in die Plasmamembran der Wirtszelle eine Eintrittspforte für die Effektor-Yops schaffen [Håkansson *et al.*, 1993; Hartland *et al.*, 1994; Håkansson, Schesser, *et al.*, 1996; Hartland *et al.*, 1996]. Diese als YopB und YopD identifizierten Proteine sind absolut essentiell für die Translokation, und das in einem Zellkontakt-abhängigen Mechanismus [Rosqvist *et al.*, 1991; Håkansson, Schesser, *et al.*, 1996]. Zusammen mit dem hydrophilen LcrV (V-Antigen), zählen YopB und YopD zu der Gruppe der Translokator-Yops und bilden das sogenannte Translokon, wobei LcrV als pentamerer Komplex am distalen Ende der Injektisomennadel assembliert [Mueller *et al.*, 2005], der vermutlich als Plattform für den Aufbau des YopBD-Porenkomplexes dient [Goure *et al.*, 2004; Goure *et al.*, 2005; Broz *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2008].

Ein kontinuierlicher Kanal zwischen Nadel und Wirtszelle wurde bislang nicht beobachtet, jedoch gibt es Hinweise aus verschiedenen Studien, die ein Modell unterstützen, das eine durch einen Translokator-Komplex verbundene Nadel und Wirtszellmembran beschreibt („Ein-Schritt-Modell“ [Dewoody *et al.*, 2013]). So wurde mittels Hämolyse-Assay eine LcrV-abhängige Porenbildung in

Erythrozyten und mittels Western Blot Analyse die Insertion von YopB und YopD in Erythrozyten-Membranen nachgewiesen [Goure *et al.*, 2005; Broz *et al.*, 2007]. In *Shigella spp.* konnte das YopB-Homolog IpaB, als Teil des *tip*-Komplexes an der Nadelspitze mittels Immunfluoreszenz- und Transmissions-Elektronenmikroskopie beobachtet werden [Veenendaal *et al.*, 2007; Olive *et al.*, 2007] und kürzlich auch YopD in Nadelpräparationen in LcrV-abhängiger Weise detektiert werden [Ligtenberg *et al.*, 2013]. Zusätzlich wurde die Interaktion des Nadel-*tip*-Proteins PcrV mit PopD, den *Pseudomonas*-Homologen von LcrV und YopD, für das Wahrnehmen des Zellkontaktes verantwortlich gemacht, was ausgelöst durch den Kontakt in einer Konformationsänderung in der Translokationspore resultiert und über eine Signaltransduktions-Kaskade über die Nadel zurück im Bakterium den Effektor-Export initiiert [Armentrout & Rietsch, 2016]. Außerdem gibt es eine direkte Korrelation zwischen der Länge der Injektisomennadel und der Distanz zwischen Bakterium und Zielzelle, sodass verkürzte Nadeln zu einem Defekt in der Yop-Injektion führen [Mota, Journet, *et al.*, 2005].

Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass extrazellulär zugeführte Effektor-Yops in Assoziation mit dem Translokator-Komplex in Wirtszellen transloziert wurden und somit die Möglichkeit eines Zwei-Schritt-Modells, ähnlich der Wirkweise von AB-Toxinen, in Betracht zu ziehen ist [Akopyan *et al.*, 2011; Edgren *et al.*, 2012; Tejeda-Dominguez *et al.*, 2017].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die YopBD-Translokationspore von *Y. enterocolitica* während der Wirtzellinfektion zu visualisieren und dabei die Frage zu klären, in welchem räumlichen Bezug zum Injektisomen der Porenkomplex lokalisiert und in wie weit sich das Erscheinungsbild unter Sekretions- und Infektionsbedingungen unterscheidet. Da das T3SS in so vielen pathogenen Organismen konserviert ist, macht es das zu einem attraktiven Ziel für neue Therapeutika. Wenn wir ein besseres Verständnis darüber erlangen, wie die Bakterien den Zellkontakt wahrnehmen und die Translokation über die Pore koordinieren, wäre es möglich den Effektortransport zu verhindern, was substantielle Konsequenzen für die pathogenen Keime hätte [Dewoody *et al.*, 2013]. Aber auch Labor-Applikationen machen dieses System so interessant, da Yersinien, die den Translokationsapparat exprimieren, aber keine Effektoren, dazu genutzt werden könnten, eine Vielzahl von Proteinen in eukaryotische Zellen einzubringen [Cornelis & Wolf-Watz, 1997].

III.1 Unter Sekretionsbedingungen dekorieren YopB und YopD die Oberfläche der Bakterien.

Für die Untersuchung der beiden putativen Porenproteine YopB und YopD waren zunächst spezifische Antikörper nötig, die für Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blot Analysen eingesetzt werden sollten. Aus Vorversuchen war bekannt, dass sich beide Translokator-Yops

nicht stabil in eukaryoten Zelllinien überexprimieren ließen (Daten nicht gezeigt). Die Transfektion von GFP- bzw. mCherry-Konstrukten mit fusioniertem Vollängen-YopB oder -YopD, führte zur Akkumulation der vermutlich toxischen Proteine in Einschlusskörpern und zum raschen Absterben der HeLa-Zellen. Auch die Fusion von endogenem YopB oder YopD mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern schien wenig Erfolg-versprechend, nachdem demonstriert werden konnte, dass Effektor-fusioniertes GFP in seiner globulären, gefalteten Struktur wie eine Art Stöpsel den Sekretionsweg über das Injektisom blockiert und nicht wie die T3S-Substrate ungefaltet durch die Nadel transportiert werden kann, sodass die Substrate in der Nadel stecken bleiben und eine vollständige Sekretion verhindert wird [Radics *et al.*, 2014]. Daher waren Fluoreszenzmarkierte Translokator-Yops und damit auch Live Mikroskopie nicht möglich, sodass die Untersuchung der endogenen YopB und YopD-Fraktion mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IF) anvisiert wurde. Dies erforderte die Gewinnung polyklonaler Antisera, deren Spezifität sowohl im Western Blot als auch in der IF verifiziert werden konnte (II.1, Abb. 9).

In der vorliegenden Arbeit konnten beide Translokatoren in homogener Verteilung auf der Bakterienoberfläche detektiert werden, wenn die Bakterien zuvor in Ca^{2+} -depletierten Medium kultiviert und anschließend mit den gereinigten, polyklonalen Antikörpern immungefärbt wurden (Abb. 10). Dies war überraschend, da neben den Effektoren auch alle drei Translokator-Yops bei geringen Ca^{2+} -Konzentrationen ins Kulturmedium sekretiert werden und aus dem Überstand präzipitiert werden können [Heesemann *et al.*, 1984; Heesemann *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1998]. Allerdings zeigten schon Michiels und Kollegen, dass einige Yops (YopH, YopE, YopO, YopB, YopD, YopP und YopN) schwer löslich sind und dazu neigen zu sichtbaren Filamenten zu aggregieren und vermutlich mit Membranen ko-gereinigt in der äußeren Membran-Fraktion nachweisbar sind [Michiels *et al.*, 1990]. Dabei sind die Mengen sekretierter Yops so hoch (10-20 % der gesamten bakteriellen Proteinmenge), dass ein Teil zurück auf die Bakterienoberfläche fällt [Michiels *et al.*, 1990]. Im Fall von YopB und YopD werden die sekretierten Proteine vermutlich, auf Grund ihrer Proteinstruktur, durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Bakterienoberfläche adsorbiert, was auf der gesamten Bakterienoberfläche gleichermaßen möglich ist und so für eine homogene Verteilung der Translokatoren sorgt. Auch die hochauflösende STED-Mikroskopie bestätigte die extrabakterielle Lokalisation und eine gleichmäßige Verteilung von YopB unter Sekretionsbedingungen (Abb. 13). Es bleibt zu prüfen, ob ein ähnliches Verhalten auch für LcrV oder die Effektor-Yops beobachtet werden kann. Für LcrV wäre denkbar, dass es wegen des hydrophilen Charakters dieses Proteins zu keiner Akkumulation auf der äußeren Bakterienmembran kommt, oder dass sich distinkte Bereiche mit anti-LcrV-Antikörpern anfärben lassen, die assemblierten *tip*-Komplexen an den Injektisomennadeln entsprechen könnten, da bereits vor Zellkontakt in Nadelpreparationen LcrV

an der Spitze nachgewiesen werden konnte [Mueller *et al.*, 2005; Broz *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2008].

Die Erkenntnisse aus der Arbeit von Kudryashev *et al.* legen nahe, dass Injektisomen in Clustern gruppieren und unter Sekretionsbedingungen neue Injektisomen eher in bereits bestehende Cluster integriert werden, als neue zu bilden [Kudryashev *et al.*, 2015], was sich stark von unserer Beobachtung bezüglich der homogenen Verteilung der Translokatoren unterscheidet. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass in ihrer Studie nur Bestandteile des Sekretionsapparates und keine Effektor- oder Translokator-Yops untersucht wurden. Es ist daher denkbar, dass YopB und YopD *in vitro* nicht mit den Nadelspitzen interagieren bzw. keine Komplexe auf der LcrV-Plattform formen, wenn keine Zielmembran vorhanden ist, oder dass die an der Nadelspitze-gebundenen YopB/D-Komplexe wegen der massiv unspezifisch auf der Bakterienoberfläche akkumulierten YopB/D-Fraktion nicht zu identifizieren sind.

III.2 Während der Infektion bilden YopB und YopD definierte bakterienassoziierte punktförmige Strukturen, die nur an einem kleinen prozentualen Anteil adhärenter Bakterien detektierbar sind.

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen YopB und YopD während der Zellinfektion durch Wildtyp-Yersinien mittels IF darzustellen. Wir konnten YopB und YopD bei der WA-314-Infektion jeweils an nur rund 2 % aller zellgebundenen Bakterien nachweisen und fanden ausschließlich bakterien-assoziierte Fluoreszenzsignale (Abb. 14). Interessanterweise unterschied sich das Fluoreszenzmuster von YopB und YopD in den Infektionsproben deutlich von dem unter Sekretionsbedingungen (Abb. 14). Während sekretierte Translokatoren die Bakterienoberfläche relativ gleichmäßig umhüllten (Abb. 10), waren in der Zellinfektion unregelmäßige punktförmige Strukturen zu beobachten. Erste Untersuchungen von Håkansson *et al.* zeigten bereits, dass YopB nicht in HeLa-Zellen transloziert wurde und nur an zellassoziierten Bakterien detektierbar war, wobei weniger als 1 % in der Wildtyp-Infektion eine YopB-Färbung zeigte, weshalb für weitere Analysen ein YopB-überexprimierender Stamm verwendet wurde [Håkansson, Schesser, *et al.*, 1996]. Diese ersten Fluoreszenzaufnahmen von YopB zeigten wiederum eine homogene zytosolische Verteilung in den Bakterien [Håkansson, Schesser, *et al.*, 1996] die eher an eine intrazelluläre Färbung (Vergleich Abb. 11) der Bakterien erinnerte. Dies könnte zum einen darauf zurück zu führen sein, das im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit ein *Y. pseudotuberculosis*-Stamm verwendet wurde, der zusätzlich YopB überexprimierte. Zum anderen wurden während der Immunfärbung höhere Triton-Konzentrationen zur Permeabilisierung verwendet, als in der vorliegenden Arbeit, die eventuell

ausreichten um auch die Bakterien zu permeabilisieren. Daher sind die damaligen Abbildungen von YopB kritisch zu bewerten. Nicht nur wurde eine andere *Yersinia*-Spezies untersucht, die unnatürlich hohe Mengen von YopB exprimiert, sondern dies wurde bei damals vermutlich schlechterer Auflösung interpretiert und es blieb unklar, ob auch intrabakterielle YopB-Fractionen detektiert wurden. Als eine mögliche Erklärung für die niedrige Zahl YopB-gefärbter Wildtyp-Bakterien wurde in der Arbeit von Håkansson *et al.* eine für die Detektion zu geringe YopB-Expression während der Zellinfektion diskutiert [Håkansson, Schesser, *et al.*, 1996]. Verschiedene Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen aber eher darauf schließen, dass nicht die Expression sondern die T3SS-abhängige Freisetzung die Erklärung für diese Beobachtung war. Wir konnten durch verschiedene Färbemethoden die Fraktion der extra- und intrabakteriellen YopB- und YopD-Populationen unterscheiden (Abb. 10, Abb. 11). Dabei ließen sich unter Sekretionsbedingungen die extrabakteriellen/sekretierten Translokatoren an rund 90 % aller Bakterien, die intrabakteriellen Translokator-Yops in allen Bakterien nachweisen und auch die Western Blot Analyse von totalen Bakterienlysaten ließ hohe totale Protein-Mengen vermuten (Abb. 10). Zusätzlich ließ sich der Anteil YopB-immungefärbter Yersinien während der HeLa-Zellinfektion durch Deletion des Effektors YopE oder durch Aktivierung der Rho-GTPase Rac1 in der Zielzelle signifikant erhöhen (Abb. 16, Abb. 17). Außerdem wurden in Digitonin-Lysaten, d.h. bei selektiver Lysierung der infizierten Zellen, nicht jedoch der Bakterien und damit der Analyse von translozierten Yops, signifikante Mengen von YopB und YopD aus den Membranen extrahiert und dazu noch deutlich mehr YopB und YopD in den nicht-lysierten Bakterienpellets nachgewiesen (Daten aus der Arbeitsgruppe). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass bei der Infektion nur ein kleiner Teil der Zell-assoziierten Wildtyp-Yersinien die Translokator-Yops auf Ihrer Oberfläche präsentiert, obwohl vermutlich ein sehr viel höherer Anteil der Bakterien diese Proteine exprimiert.

III.3 Die Anzahl der YopB/D-präsentierenden Bakterien wird von bakteriellen und zellulären Faktoren beeinflusst.

Um mögliche bakterielle Regulatoren für die YopB/D-Oberflächenexpression während der Infektion zu finden, wurden ebenfalls HeLa-Zellen für 1 h mit verschiedenen *knock out*-Mutanten des WA-314 infiziert und anschließend immungefärbt. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass sich während der Zell-Infektion die Anzahl der Bakterien, die YopB bzw. YopD auf die Oberfläche freisetzen, durch die Deletion des jeweils anderen Translokators erhöht (Abb. 15). Dieses Ergebnis war für die WA-314 Δ YopD-Mutante zu erwarten, da YopD als globaler, negativer Regulator in der Expression des T3SS gilt [Williams & Straley, 1998]. Dies bezieht sich auch auf

die Expression und Sekretion von YopB, was sich in erhöhten YopB-Fluoreszenzintensitäten unter Ca^{2+} -Depletion und deregulierten Proteinnengen in der Western Blot Analyse (Abb. 12), sowie in einer größeren Anzahl immungefärbter zell-assoziiierter Bakterien während der Infektion zeigte (Abb. 15). YopB ist bislang nicht als Regulator von T3SS-Komponenten beschrieben. Es ist daher denkbar, dass nicht die YopB-Deletion direkt für die vermehrte YopD-Expression unter Infektionsbedingungen verantwortlich ist, sondern dass ein anderer Mechanismus eine Rolle spielt, wie z.B. ein Nicht-Abfließen und damit verbundenes Anhäufen der Effektoren trotz Zellkontakt, was das vermehrte Ablesen des gesamten *lcrVGYopBDsycD*-Operons nach sich ziehen könnte. Wie genau die Bakterien eine intrabakterielle Akkumulation der Effektoren wahrnehmen und entsprechend die Transkription der beteiligten Gene hochregulieren, ist bisher nicht beschrieben.

Fehlten die Effektoren vollständig, wie im Stamm WACpYLCR, der keine Effektoren und nur die Sekretionsmaschinerie exprimiert, konnte ein ähnlicher Phänotyp beobachtet werden. Beide Translokator-Yops konnten an einer höheren Anzahl zellgebundener Bakterien detektiert werden (Abb. 16). Dies könnte beispielsweise durch den Umstand begründet sein, dass zum Generieren dieses Stamms ein verkleinertes Virulenzplasmid in den Plasmid-befreiten Elternstamm WAC transformiert wurde [Andor *et al.*, 2001]. Dies ermöglichte eine potentiell erhöhte Plasmid-Kopienzahl pro Bakterienzelle im Vergleich zum Wildtyp, was kürzlich in direkten Zusammenhang mit der Expression und Funktion des T3SS in Verbindung gebracht wurde [Wang *et al.*, 2016]. Zusätzlich könnten ein oder mehrere Effektor-Yops eine regulatorische Funktion auf die Porenbildung besitzen, wie es für YopE [Viboud & Bliska, 2001; Aili *et al.*, 2006; Viboud *et al.*, 2006; Aili *et al.*, 2007; Mejía *et al.*, 2008] und YopQ [Holmström *et al.*, 1997; Brodsky *et al.*, 2010; Dewoody *et al.*, 2011; Thorslund *et al.*, 2011; Dewoody *et al.*, 2012] bereits diskutiert wurde, deren Fehlen eine reprimierende Funktion aufheben würde.

Als weiterer bakterieller Faktor, der die Anzahl Translokator-positiver Bakterien in der IF negativ beeinflusst, konnte der Effektor YopE identifiziert werden (Abb. 16). Durch Deletion von *yopE* zeigten etwa zehnmal so viele Bakterien eine YopB-Immundefärbung wie der Wildtyp. Interessanterweise wurde für YopE-Mutanten in verschiedenen Arbeiten eine gesteigerte Translokation der Effektor Yops beobachtet [Aili *et al.*, 2006; Aili *et al.*, 2007; Gaus *et al.*, 2011; Wolters *et al.*, 2013]. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die gesteigerte Effektor-Translokation der YopE-defizienten Stämme weniger auf einem vermehrten Yop-Export jedes einzelnen Bakteriums, sondern vielmehr auf einem höheren Anteil translokations-aktiver bzw. YopB/D-präsentierender Bakterien beruht. YopE ist als multifunktionales Effektor-Protein beschrieben, welches durch seine Aktivität als GAP (i) eine antiphagozytische Wirkung auf Makrophagen und HeLa-Zellen ausübt [Rosqvist *et al.*, 1990; Black & Bliska, 2000], (ii) die Bildung

lytischer Poren verhindert [Viboud & Bliska, 2001; Aili *et al.*, 2006; Viboud *et al.*, 2006; Aili *et al.*, 2007; Mejía *et al.*, 2008] und (iii) die Translokation negativ reguliert [Aili *et al.*, 2006; Aili *et al.*, 2007; Isaksson *et al.*, 2009; Aepfelbacher *et al.*, 2011; Dewoody *et al.*, 2011; Gaus *et al.*, 2011]. Alle diese Prozesse involvieren die Deaktivierung kleiner Rho GTPasen und damit einhergehend die Inhibierung der Aktin-Polymerisation [Dewoody *et al.*, 2013]. YopE wirkt als GAP auf RhoA und G, Rac1 und Cdc42 *in vitro* [Von Pawel-Rammigen *et al.*, 2000; Black & Bliska, 2000; Aili *et al.*, 2002; Roppenser *et al.*, 2009], wobei in Infektionsstudien eine Präferenz für Rac gezeigt werden konnte [Aili *et al.*, 2006; Aepfelbacher *et al.*, 2011]. Daher wurde der Effekt der Rac1-Aktivierung bei *Y. enterocolitica* Wildtyp-Infektion auf die YopB-exprimierenden Bakterien untersucht. Für HeLa-Zellen, die konstitutiv-aktives Rac1 exprimierten, wurde ebenfalls eine signifikant erhöhte Anzahl an Bakterien mit YopB-Immungfärbung im Vergleich zu Kontroll-Zellen ermittelt (Abb. 17), sodass die Rho GTPase Rac1 als zellulärer Regulator für die YopB-Oberflächenexpression während der Infektion identifiziert werden konnte. Zusammengefasst ist es also das Zusammenspiel von transloziertem YopE und dessen inaktivierender Effekt auf Rac1, das sich negativ auf die Anzahl YopB-präsentierender Wildtyp-Bakterien während der Zell-Infektion auswirkt. Unsere Daten unterstützen außerdem die Beobachtung, dass YopE seine regulatorische Funktion erst nach Translokation und von innerhalb der Wirtszelle ausübt [Aili *et al.*, 2007], da eine veränderte Menge YopB/D-immunggefärbter Bakterien im Vergleich zum Wildtyp nur unter Infektions-, nicht aber unter Sekretionsbedingungen ermittelt werden konnte (Vergleich Abb. 12 und Abb. 16) und die Inaktivierung von Rac1 maßgeblich beteiligt ist.

Wie im Einzelnen die YopE-vermittelte Rac1-Inaktivierung zurück zur Bakterienzelle signalisiert wird, bleibt Spekulation. Jedoch führt die daraus resultierende Aktin-Depolymerisation zur Hemmung *Yersinia*-induzierter Porenbildung [Viboud & Bliska, 2001], was weitere Effektor-Translokation reduziert. Dies zeigt einen Mechanismus auf, wie *Yersinien* den Balanceakt zwischen Paralyse der Zielzelle und überschießender Injektion der zelltoxischen Effektoren meistern, was sonst vermutlich eine verfrühte Immunantwort auslöst, was wiederum nachteilig für das Fortschreiten der Krankheit sein kann [Aili, 2005; Dewoody *et al.*, 2013]

III.4 Konfokale YopB-Fluoreszenzkerne lassen sich mittels STED in drei Spots auflösen.

Bislang gibt es wenig Einblick in Aufbau und Stöchiometrie der Translokationspore, geschweige denn in Anzahl und Verteilung der Poren pro Bakterienzelle während der Infektion. Da aufgrund der Auflösungsgrenze mit klassischer Lichtmikroskopie keine weiteren Erkenntnisse diesbezüglich gewonnen werden konnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Applikation

hochauflösender STED-Mikroskopie auf das *Yersinia*-Infektionsmodell getestet und etabliert. Dabei konnten einzelne konfokale YopB-Fluoreszenzkerne mittels STED durchschnittlich in ca. drei Spots weiter aufgelöst werden (Abb. 18). Eine gerichtete Verteilung der YopB-Spots, beispielsweise auf die der Zelle zugewandten Bakterien-Seite, konnte nicht beobachtet werden. Erst seit Kurzem wurde die super-auflösende Kryo-Elektronentomographie (Kryo-ET) mit Sub-Tomogramm-*averaging* genutzt, um die T3SS von *Y. enterocolitica*, *S. enterica*, *S. flexneri* und *C. trachomatis* bei Aktivierung *in situ* zu studieren und neue strukturelle Einblicke zu gewinnen [Kudryashev *et al.*, 2013; Kawamoto *et al.*, 2013; Radics *et al.*, 2014; Nans *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015; Kudryashev *et al.*, 2015; Nans *et al.*, 2015; Gold & Kudryashev, 2016; Cascales, 2017; Hu *et al.*, 2017]. Für *Yersinia* konnten Kudryashev und Kollegen zeigen, dass Injektisomen regelmäßige Cluster formten, die bei Aktivierung durch Ca^{2+} -Depletion neue Maschinen in bestehende Cluster integrierten [Kudryashev *et al.*, 2015]. Zusätzlich nutzten sie GFP-markierte Komponenten des Basalkörpers als Sensor für Injektisomen in klassischer Fluoreszenz-Mikroskopie, wobei die durchschnittliche Anzahl fluoreszenter Spots pro 1 μ m Bakterienlänge unter Sekretionsbedingungen auf 4,9 bestimmt wurde [Kudryashev *et al.*, 2015]. Dazu passen unsere unter Infektionsbedingungen ermittelten $6,7 \pm 2,9$ konfokalen YopB-Fluoreszenzkerne beim WA-314 Wildtyp-Stamm. Mittels Kryo-ET wurde außerdem beobachtet, dass die Injektisomen häufig in Paaren oder größeren Gruppen auftraten, was dazu führte, dass bei Anwendung einer simulierten Auflösung von ca. 300 nm, entsprechend der Fluoreszenz-Mikroskopie, benachbarte Injektisomen verschmolzen [Kudryashev *et al.*, 2015]. Daraus wurde eine durchschnittliche Zahl von 2,5 Injektisomen pro Fluoreszenz-Spot berechnet [Kudryashev *et al.*, 2015], was gut mit den von uns ermittelten 3 STED-Spots pro konfokalem YopB-Cluster korreliert (Abb. 18 C). Dies könnte darauf hindeuten, dass die mittels STED auflösbaren YopB-Spots tatsächlich einzelnen Translokationssporen entsprechen, unter der Voraussetzung, dass YopB in engem Kontakt mit der Injektisomennadel steht.

Interessanterweise konnten mittels Kryo-ET nur 6,2 Injektisomen pro Tomogramm identifiziert werden, wobei die Autoren den realen Wert für eine Bakterienzelle für um Faktor 2 unterschätzt hielten [Kudryashev *et al.*, 2015]. Dies sei auf *missing-wedge*-Artefakte in ET zurückzuführen [Lučić *et al.*, 2005], die die Visualisierung von Injektisomen an basalen und apikalen Membranen erschwert. Trotz Korrektur um Faktor 2 liegt die Injektisomenzahl pro Bakterienzelle/Tomogramm (12,4) noch deutlich unter den mittels STED ermittelten rund 18 YopB-Strukturen. Dies wäre in entgegengesetzter Weise zu erwarten, da davon auszugehen ist, dass bei Zellinfektion nicht alle Nadeln Kontakt mit der Plasmamembran aufnehmen und somit YopB-freie Injektisomen existieren müssten. Dies könnte also einerseits andeuten, dass es freie Translokationssporen gibt, die nicht mit den Nadeln in Kontakt stehen und daher in größerer Zahl vorliegen. Andererseits könnte aber

auch durch die Bedingungen bei der Proben-Präparation und Daten-Akquise ein Teil der Nadeln verloren gegangen bzw. nicht abbildbar sein, wodurch die ermittelte Anzahl als unterer Grenzwert der Schätzung einzustufen ist [Kudryashev *et al.*, 2015]. Schließlich besteht außerdem die Möglichkeit, dass die unter Infektionsbedingungen ausgebildete Zahl an Injektisomen pro Bakterienzelle von der Nadel-Anzahl unter Sekretionsbedingungen abweicht. Daher ist nicht auszuschließen, dass die tatsächliche Zahl der assemblierten Injektisomen bei Zellkontakt noch höher ist, als unter den von Kudryashev *et al.* untersuchten Bedingungen und gebildete Poren mit den Nadeln in verbunden bleiben. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind jedoch keine Kryo-Daten von *Y. enterocolitica* während der Zell-Infektion verfügbar, die diese Hypothese bekräftigen könnten. Einzig Nans *et al.* untersuchten das *Chlamydia trachomatis* T3SS in An- und Abwesenheit von Wirtszellkontakt und beschrieben dabei eine beachtliche Konformationsänderung des Nadelkomplexes bei Kontaktaufnahme mit der Zelle [Nans *et al.*, 2015]. Sie beobachteten außerdem eine Struktur distal der Nadelspitze in der Wirtszellmembran, bei der es sich möglicherweise um die Translokationspore handeln könnte. Diese Konstellation könnte als eine kontinuierliche Verbindung von bakteriellem Zytoplasma, T3SS-Komplex und Wirtszellzytosol interpretiert werden. Dass es sich bei der beobachteten Struktur tatsächlich um die Translokationspore handelte, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht verifiziert werden, da entsprechende Mutanten in *C. trachomatis* nicht verfügbar waren [Nans *et al.*, 2015].

In Anbetracht dessen, dass sich die ermittelte Anzahl an Injektisomen [Kudryashev *et al.*, 2015] und YopB-Fluoreszenzspots (diese Arbeit) in einem vergleichbaren Bereich befindet und, dass die verbesserte Auflösung beim Verhältnis von Kryo-ET zu Fluoreszenzmikroskopie von 2,5 (für Injektisomen) und die STED:konfokal-Ratio von 3 (für YopB) fast identisch sind, deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass wir in der Lage sind, mittels STED-Mikroskopie einzelne Translokationsporen aufzulösen.

III.5 Die Translokationspore steht in engen Kontakt mit den Injektisomen entsprechend des Ein-Schritt-Modells.

Um die räumliche Lokalisation der YopB/D-Translokationspore näher zu charakterisieren, wurden zunächst Kollokalisationsstudien von YopB mit den beiden anderen Translokator-Yops durchgeführt und deren Korrelation in hochaufgelösten mikroskopischen Aufnahmen geprüft (II.8.1, II.8.2). Um möglichst einfach immungefärbte Strukturen auswählen zu können, die für die STED-Mikroskopie geeignet waren, wurden Bedingungen der Effektor-Hypertranslokation, im Speziellen WA-314 Δ YopE-infizierte, unbehandelte sowie Wildtyp-infizierte Rac1L61-transfizierte HeLa-Zellen verglichen mit Kontroll-Zellen, ausgewählt. In allen betrachteten Proben konnte eine

signifikante Kolo­kalisierung von YopB und YopD nachgewiesen werden (Abb. 19). Dies bestätigte die bereits beschriebene enge Interaktion der beiden Translokatoren [Neyt & Cornelis, 1999b; Montagner *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2016], auch unter Infektionsbedingungen.

Dass YopB und YopD gemeinsam die Translokationspore formen, gilt als allgemein anerkannt [Costa *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013] und wird durch unsere Daten unterstützt. Aber für die direkte Interaktion von YopB und LcrV gibt es bisher nur biochemische Anhaltspunkte [Sarker, Neyt, *et al.*, 1998; Broz *et al.*, 2007]. Die Analyse hochaufgelöster STED-Bilder von *Yersinia*-infizierten HeLa-Zellen ergab eine partielle Kolo­kalisierung dieser beiden Translokatoren (Abb. 20). Dies ließ sich damit begründen, dass die ermittelten Pearson Koeffizienten bei jeder getesteten Bedingung um den für signifikante Korrelation angenommenen Schwellenwerten rangierten (Abb. 20 B). Berechnete Manders Koeffizienten waren jedoch mit Werten von über 72 % bei Rac1-aktivierten, WA-314-infizierten bzw. unbehandelten, WA-314ΔYopE-infizierten HeLa-Zellen deutlich über dem Schwellenwert und als signifikant anzusehen (Abb. 20 C). Einzig bei unbehandelten, Wildtyp-infizierten Zellen waren Manders Koeffizienten von knapp über 0,5 zu beobachten, die vermutlich auf eine generell schwierigere Daten-Akquise zurückzuführen waren. Auch wenn es keine Unterschiede in der Anzahl konfokaler und STED-aufgelöster YopB-Spots bei Rac1-aktivierten und kontroll-transfizierten Zellen bei der Wildtyp-Infektion gab (Daten nicht gezeigt), so erschwerte die generell niedrige Anzahl YopB-immungefärbter Bakterien bei unbehandelten, WA-314-infizierten Zellen (Abb. 14) die Auswahl geeigneter Sichtfelder, was dazu führte, dass auch Bakterien mit zufällig geringerer Immunfärbefeffizienz in die Betrachtung mit eingingen. Das bedeutet, dass durch eine eventuell etwas schlechtere Fluoreszenzfärbung die detektierbaren Intensitäten nach Applikation des STED-Laserstrahls sehr niedrig und potentiell unzureichend waren, um eine Kolo­kalisierung korrekt zu bewerten. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden dennoch solche Aufnahmen berücksichtigt und bei allen erhobenen mikroskopischen Daten gleiche Bedingungen und Einstellungen bei der Bildaufnahme angewendet.

Weiterhin wurde die partielle Kolo­kalisierung in den repräsentativen Bildern deutlich (Abb. 20 A). Gekennzeichnet durch weiße, ausgefüllte Pfeilspitzen konnten Strukturen mit perfekter Kolo­kalisierung identifiziert werden. Allerdings zeigten sich auch Bereiche, in denen YopB deutlich stärker immungefärbt wurde, als LcrV, angezeigt durch weiße, nicht-ausgefüllte Pfeilspitzen. In der Überlagerungsansicht wird deutlich, dass zwar beide Proteine in diesen Clustern lokalisieren, jedoch scheinen sie eher dicht nebeneinander zu liegen (Abb. 20 A). Dies ist einerseits damit erklärbar, dass diese beiden Translokatoren nicht zwangsweise perfekt kolo­kalisieren müssen, da LcrV als Assemblierungsplattform und YopB als Porenprotein, selbst bei kontinuierlicher Verbindung wie im Ein-Schritt-Modell, eher nebeneinander, als im selben Komplex auftreten

würden und dies eventuell schon bei einer Auflösung von rund 80 nm im STED-Modus erkennbar wäre. Andererseits war die Immunfärbung für LcrV generell schwächer und könnte an diesen Positionen so unzureichend gewesen sein, dass nach der Depletion durch den STED-Laser zu geringe Mengen Photonen detektiert wurden, was das reale Bild verzerrt haben könnte. Dies führte dann zu niedrigeren Werten für die Koeffizienten bei der Analyse der Kolo-kalisation. Dass tatsächlich YopB-Spots ohne LcrV-Kofärbung existieren, wäre nur damit erklärbar, wenn Translokationsporen losgelöst von der Injektisomennadel und somit auch von der LcrV-Plattform existieren. Dies würde ein Zwei-Schritt-Modell, in dem die Translokatoren und Effektoren zunächst in den extrazellulären Zwischenraum sekretiert werden, bevor die Membraninsertion von YopB und YopD unabhängig von LcrV erfolgt, bekräftigen. Auf diese Weise könnten allerdings auch mehr Poren pro Injektisom gebildet werden, was in einer deutlich höheren Zahl LcrV-freier YopB-Spots resultieren müsste, was jedoch in keiner der STED-Aufnahmen beobachtet wurde. Freie LcrV-Spots, wie sie sich in der Abb. 13 A durch weiße Pfeile gekennzeichnet andeuten, wären mit beiden Modellen vereinbar, da im Zwei-Schritt-Modell keine kontinuierliche Verbindung zur Translokationspore vorausgesetzt wird und beim Ein-Schritt-Modell nicht zwangsläufig alle Injektisomen Zellkontakt aufnehmen und einige daher inaktiv bleiben. Die beiden Modelle schließen sich jedoch nicht gegenseitig aus und könnten auch parallel existieren [Akopyan *et al.*, 2011; Edgren *et al.*, 2012; Dewoody *et al.*, 2013]. Zusammenfassend lassen unsere Daten auf eine enge, starke Korrelation von YopB mit dem Nadelspitzenprotein LcrV schließen und unterstützen eher die Hypothese eines kontinuierlichen Systems.

Alternativ zum Nadelspitzen-Protein LcrV wurde eine GFP-markierte Komponente des Basalkörpers (GFP-YscD) als Marker für Injektisomen genutzt um die Relation des Porenkomplexes zur Sekretionsmaschinerie besser zu charakterisieren. Auch hierfür wurde eine hochauflösende Mikroskopie-Technik angewendet, jedoch erforderten technische Gründe einen Wechsel zur strukturierten Illumination (3D-SIM). Mit Hilfe dieses Verfahrens war es möglich, die Auflösung der GFP-markierten Strukturen und der YopB-immungefärbten Spots so weit zu verbessern, dass sich distinkte Bereiche in beiden Kanälen differenzieren ließen, die eine Zuordnung von YscD- und YopB-Paaren erlaubten. Auf diese Weise konnten Koordinaten in 3D ermittelt werden, die zu Paaren sortiert und deren minimale Abstände über einen Algorithmus bestimmt wurden (Abb. 21). Dabei häuften sich die berechneten Abstände um 100 nm. Unter Berücksichtigung der Längen und Ausdehnungen der einzelnen T3SS-Bestandteile, mit rund 33 nm für den Basalkörper [Kudryashev *et al.*, 2013], 60 nm Länge der Nadel [Journet *et al.*, 2003; Sorg *et al.*, 2007] und der zusätzlichen minimalen Ausdehnung von einer Membrandurchspannenden Pore (Plasmamembran ~6,6-9,8 nm, [Sun *et al.*, 2008]) plus Antikörper von der

Immunfärbung ($2 \times \sim 10\text{-}15$ nm, [Ries *et al.*, 2012; Schauen *et al.*, 2013]), wäre dies ein starkes Indiz für eine kontinuierliche Verbindung und damit für das Ein-Schritt-Modell. Die Summe der einzelnen Längen mag mehr als 100 nm ergeben, jedoch ist dabei zu bedenken, dass das GFP-gelabelte YscD nicht direkt an der basalsten Stelle des Basalkörpers in die Maschine inkorporiert wird und dass bei der Immunfärbung von YopB nicht klar ist, von welcher Seite die Antikörper binden.

Um die von unseren Daten gestützte Hypothese einer kontinuierlichen Injektionsmaschine, die entsprechend des Ein-Schritt-Modells direkten Kontakt zum Wirtszellplasma aufnimmt, zweifelsfrei zu belegen, würden weitere Ko-Färbungen von Basalkörper, Nadel und Translokationspore nötig sein, die mit der Auflösung eines STED-Mikroskops im 2D-STED-Modus (≤ 40 nm) voneinander differenzierbar sein müssten, jedoch in enger chronologischer Abfolge zu erwarten sind. Die dafür erforderlichen anti-YscF (Nadel)-Antikörper wurden bereits hergestellt und befinden sich aktuell in der Testphase für IF. Alternativ würden korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie-Experimente (*correlative light and electron microscopy*, CLEM) Klarheit bringen. Dabei würden z.B. unter kryo-Bedingungen Dünnschnitte von fixierten, infizierten Zellen angefertigt, die mit anti-GFP- (für YscD) und anti-YopB-Antikörpern immungefärbt werden könnten, um im Fluoreszenzmikroskop Bereiche mit exprimierter Pore zu identifizieren und anschließend elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Sollte sich dann zwischen den Fluoreszenzspots eine Nadel im EM identifizieren lassen, wären dies eindeutige Beweise für das Ein-Schritt-Modell. Entsprechende Experimente sind in der Planung, konnten jedoch nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit fertiggestellt werden.

IV Zusammenfassung

Viele Gram-negative Pathogene haben eine beeindruckende Strategie entwickelt, den infizierten Wirt zu manipulieren und der Immunantwort zu entkommen, um sich in ihren speziesspezifischen Nischen zu vermehren und die Erkrankung zu etablieren. Maßgeblich daran beteiligt ist die heute als Typ III Sekretionssystem (T3SS) oder Injektisom bekannte Virulenzdeterminante, deren grundsätzlicher Aufbau bei den verschiedenen Keimen stark konserviert ist. Die T3SS-exprimierenden Organismen verfügen über ein Arsenal artspezifischer, toxischer Effektor-Proteine, die durch T3-abhängige Translokation direkt in die Zielzellen injiziert werden und dort ihre zelldestruktive Funktion entfalten. Während Aufbau und Funktionsweise des Injektisoms und der Effektoren recht gut verstanden sind, gibt es wenig hochaufgelöste Informationen zur Struktur der Translokationspore und ihrer Regulation. Die beiden hydrophoben Translokator-Proteine YopB und YopD sowie das hydrophile Nadelspitzen-Protein LcrV sind essentiell für die Translokation von Effektor-Proteinen und bauen den Poren-Komplex in der Wirtszellmembran auf. Dabei nimmt LcrV vermutlich eine unterstützende Rolle als Assemblierungsplattform ein, während YopB und YopD in die Membran inserieren und die Effektor-Injektion ermöglichen.

Ziel der Arbeit war es, den Translokator-Komplex von *Yersinia enterocolitica* während der Wirtszell-Infektion zu visualisieren und einerseits phenotypische Unterschiede zwischen Infektions- und Sekretionsbedingungen aufzuzeigen und andererseits die Frage zu klären, welchen räumlichen Bezug die Translokationspore zum Injektisom einnimmt. In der Literatur wird ein ununterbrochenes Injektions- oder Ein-Schritt-Modell gegenüber einer zweistufigen Reaktion mit intermediärer Komplexbildung aus Porenproteinen und Effektoren im extrazellulären Raum diskutiert.

Zusammenfassend erfolgte im Rahmen dieser Arbeit erstmals die hochaufgelöste immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des Translokator-Komplexes während der *Yersinia*-Infektion von Epithelzellen mittels STED-Mikroskopie, wobei eine signifikante Kollokalisierung von YopB und YopD sowie von YopB und LcrV beobachtet wurde. Dabei konnten während der WA-314-Wildtyp-Infektion von HeLa-Zellen unter Kontrollbedingungen $18,1 \pm 7,6$ YopB-Fluoreszenzkerne pro Bakterium differenziert werden, was einem konfokal-zu-STED-Verhältnis von 1:3 entspricht. Verglichen mit publizierten cryo-elektronenmikroskopischen Daten von Injektisomen lässt sich schlussfolgern, dass hier die verbesserte Auflösung die Differenzierung einzelner Porenkomplexe erlaubte. Interessanterweise präsentierte nur ein geringer Anteil von 2 % des zellassozierten Wildtyp-Stamms YopB oder YopD auf der Bakterienoberfläche, wohingegen bei 92 % respektive 86,5 % aller Bakterien unter

Sekretionsbedingungen diese Translokator-Proteine auf der Oberfläche nachweisbar waren. Im Gegensatz zur Zellinfektion wurde nach Ca^{2+} -Depletion eine homogene Verteilung von YopB und YopD mittels STED bestätigt, was auf eine unspezifische Akkumulation auf der gesamten äußeren Bakterienmembran während der Sekretion *in vitro* hindeutete. Als Faktoren, die die Zahl Translokator-immungefärbter, zellgebundener Bakterien negativ beeinflussten, wurden die bakteriellen Proteine YopE sowie YopB und YopD selbst und die eukaryote Rho GTPase Rac1 identifiziert. Mit Hilfe der GFP-fusionierten Injektisom-Komponente YscD, die in der inneren Bakterienmembran als Teil des Basalkörpers assembliert, konnte mittels hochauflösender SIM-Technik der Abstand von YopB zur Injektisomenbasis bestimmt werden. Dabei wurde eine Distanz von rund 100 nm ermittelt, was in etwa der Gesamtlänge des vollständig assemblierten T3S-Apparates einschließlich Translokon entspricht. Zusammengenommen deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass während der Wirtszellinfektion die YopB/D-Translokationspore mit dem Injektisom verbunden bleibt und bei *Y. enterocolitica* unter den gewählten experimentellen Bedingungen das einstufige Injektionsmodell vorlag, was die kontinuierliche Verbindung von bakteriellem und Wirtszell-Zytoplasma annimmt und die direkte Injektion der Effektoren erlaubt.

IV.1 Abstract

Many Gram-negative bacteria have developed a sophisticated strategy to manipulate the infected host and evade the host immune response in order to propagate in their species specific niches and establish infection. This requires a key virulence determinant which is now known as the type III secretion system (T3SS) or injectisome. While the basic architecture of the T3SS is strongly conserved, each pathogen expresses a unique set of toxic effector proteins which are directly injected into the target cell cytoplasm - via a type III dependent manner - where they act on their specific targets. Whereas assembly and function of the injectisome and effectors are quite well understood, the translocation pore lacks high resolution structural information and regulatory insight. The two hydrophobic translocators YopB and YopD together with the hydrophilic needle tip protein LcrV are essential for translocation of the effectors and hence believed to build up a pore complex in the host cell membrane. LcrV plays a supporting role as it acts as an assembly platform at the distal end of the needle for YopB and YopD which are believed to self-insert into the plasmamembrane and allow effector delivery.

The aim of this study was to visualize the *Yersinia enterocolitica* translocator complex during host cell infection and thereby pointing out potential differences to secretion permissive conditions, as well as to answer the question, if there is a spatial connection of the translocation pore to the injectisome. Currently there are two competing models discussed: the continuous injection- or

one-step-model vs. the two-step reaction with the formation of an intermediate complex of translocators and effectors in the extracellular space.

To summarize, we here show the first high resolution immunofluorescence images of the translocon during *Yersinia*-infection of epithelial cells using STED microscopy while observing a significant colocalization of YopB and YopD as well as YopB and LcrV, respectively. We identified 18.1 ± 7.6 YopB-spots per bacterial cell during WA-314 wildtype infection of control-treated HeLa-cells which corresponds to a confocal-STED-ratio of 1:3. Compared to published cryo-electrontomography data of *Yersinia* injectisomes our findings suggest that the improved resolution of STED allowed the differentiation of single pore complexes. Interestingly, only a small proportion of 2 % of cell-associated wildtype bacteria showed YopB or YopD-immunostaining on the bacterial surface during infection, although 92 % and 86.5 %, respectively, of all bacteria grown under secretion permissive conditions were homogeneously coated with these translocators. This was in contrast to the spot-like or clustered fluorescence signals during infection and indicates the unspecific accumulation of YopB and YopD on the outer bacterial membrane during secretion. Factors that negatively regulated the number of translocator-immunostained cellbound bacteria were identified as the bacterial proteins YopE as well as YopB and YopD themselves and the eukaryotic Rho GTPase Rac1. With the use of the GFP-labeled injectisome component YscD, which assembles as part of the basal body in the inner membrane of the bacteria, we could determine the distance of YopB to the base of the injectisome using structured illumination microscopy. Measured distances gathered at around 100 nm which corresponds to the total length of the fully assembled injectisome including translocon. To conclude, our data indicate that the YopB/D translocation pore stays connected to the injectisome during host cell infection and that the one-step injection-model is favored in *Y. enterocolitica* which assumes a continuous channel between bacterial and host cell cytoplasm and allows direct effector injection, at least under the used laboratory conditions.

V Material und Methoden

V.1 Materialien

V.1.1 Geräte

Tabelle V.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Accu-Jet	Accu-jet pro, Brand, Wertheim, D
Elektrophorese	Agarose-Gel: Roth, Karlsruhe, D SDS-PAGE: Mini-Protean II, Biorad, München, D
Entwickler für Röntgenfilme	Curix 60, Agfa, Morsel, D
Entwicklerkassette	Hartenstein, Würzburg, D
Filmkassette	Hartenstein, Würzburg, D
Gefrierbehälter	Kryogefrierbehälter, Nalgene Scientific, Rockford, USA
Gefrierschränke	-80 °C: HERA freeze, Heraeus, Heraeus, Kendro Laboratory, Hanau, D -20 °C: comfort, Liebherr-International AG, Bulle, CH
Geltrockner	Gel dryer 543, BioRad, München, D
Magnetrührer	RCT-Basic, IKA-Labortechnik, Staufen, D
<i>Microplate Reader</i>	Infinite M200, TECAN, Männedorf, CH
Mikrowelle	900W, Panasonic, Kadoma/Osaka, J
NanoDrop® ND-1000	PegLab, Erlangen, D
pH-Meter	Seven easy, Mettler-Toledo, Giessen, D
Photometer	Ultrospec 3000 pro, Amersham/GE Healthcare Europe, München, D
Pipetten	2, 10, 100, 200, 1000 µl, Research Plus, Eppendorf, Hamburg, D
<i>Power Supply</i>	Power Pac 2000, BioRad, München, D
Scanner	CanoScan 4400F, Canon, Amsterdam, NL
Schüttelinkubator	Certomat BS-1, Sartorius, Göttingen, D
Sonifizierer	Digital Sonifier 250-D, Branson, Danbury USA
Sterilbank	Hera Safe, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler	Primus-96, MWG-Biotech, Ebersberg, D Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, D
UV-Transilluminator + Detektor	ChemiDoc XRS, BioRad, München, D
Vortex	REAX Topo, Heidolph Instruments, Schwabach, D
Waage	440-47N, Kern, Balingen-Frommern, D
Wasserbad	GFL Typ 1013, GFL, Burgwedel, D
Western Blot-Apparatur	OWL HEP-1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellinkubator	CB Series, Binder, Tuttlingen,, D

Gerät	Hersteller
Zellzählkammer	Neubauer-Zählkammer, Hartenstein, Würzburg, D
Zentrifugen	Sorvall RC-5B, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA 5417R und 5810R, Eppendorf, Hamburg, D Sigma Zentrifuge 3-18K, Sigma, Osterode, D Ultrazentrifuge Optima L100, Beckmann, Krefeld, D

V.1.2 Mikroskopie

Tabelle V.2 Technische Details des Laser scanning Mikroskops

Laser scanning Mikroskop	Produktbezeichnung, Hersteller
Hersteller	Leica, Wetzlar, D
Stativ	Leica DMI 6000
Objektiv	63x HCX Plan Apochromat CS Ölimmersion, NA 1.40-0.60
Detektor	2x HyD, 2x PMT, 1x Trans-PMT
Laser	Diode 405 nm/ Multi-Ar 458 nm/ 476 nm/ 488/ 514 nm, DPSS 561 nm, HeNe 633 nm
Emissionsfilter	L5 ET: BP 480/40 (grün), N3 ET: BP546/12 (rot)
UV Lampe	EL 6000 120W (LQHXP 120 LEJ)
Halogenlampe	100 W, 12 V
Weitere Ausstattung	<i>Piezo Focus drive</i> : SuperZ Galvo type H
Software	Leica LAS AF

Tabelle V.3 Technische Details des STED Mikroskops

Stimulated Emission Depletion	Produktbezeichnung, Hersteller
Hersteller	Abberior Instruments GmbH, Göttingen, D
Stativ	Nikon Ti-E mit Perfect Fokus System, Tokio, J
Objektiv	60 x P-Apo Ölimmersion, NA 1,40, WD 0,13 mm
Detektor	4 x APD
Kamera	1 x CCD Kamera (Imaging Quelle DMK 33G274)
Anregungslaser	518 nm, 640 nm (gepulst & <i>continuous wave</i>), 470 nm, 561 nm (gepulst)
STED Laser	595 nm, 775 nm
UV-VIS Illumination	LED
Inkubationskammer	Temperatur/ Feuchtigkeit/ CO2-Kontrolle, Okolab, Pozzuoli, I
Weitere Ausstattung	<i>Piezo Focus drive</i> : P-736 PInano, Motorisierte XY-stage: M-687 (PILine, Physik Instrumente, Karlsruhe, D)
Software	Abberior Inspector

Tabelle V.4 Technische Details des *structured illumination* Mikroskop (SIM)

3D-SIM¹	Produktbezeichnung, Hersteller
Hersteller	Nikon, Tokio, J
Objektiv	100 x CFI SR Apochromat TIRF Ölimmersion, NA 1,49; 100 x CFI Apochromat TIRF Ölimmersion NA 1,49
Kamera	EM CCD Kamera iXon3 DU-897E (Andor Technology Ltd., Belfast, UK)
Laser	405 nm, 488 nm, 514 nm, 561 nm, 640 nm
<i>Imaging mode</i>	TIRF-SIM, 2D-SIM, <i>Slice</i> 3D-SIM, <i>Stack</i> 3D-SIM
Weitere Ausstattung	<i>Perfect Focus</i> System, Motorisierte XY-stage, <i>Piezo Z-stage</i>
Software	NIS-Elements Ar/ NIS-Elements C

¹ Das Gerät wurde im Rahmen einer Geräte-Demo von Nikon am Heinrich-Pette-Institut (Hamburg, D) verwendet.

Zur Bearbeitung der mikroskopischen Aufnahmen wurden Volocity (Perkin Elmer, Waltham, USA), ImageJ (Bethesda, USA) und Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems GmbH, München, D) genutzt.

V.1.3 Verbrauchsmittel

Tabelle V.5 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
Deckgläser	Rund, 12 mm Durchmesser, No 1 und 1,5, Hartenstein, Würzburg, D
Dialysekassetten	Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmalspritzen	Steril, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, B. Braun, Melsungen, D
Elektroporationsküvetten	2 mm-Gap, peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Gewebekulturschale	10 cm, Sarstedt, Nümbrecht, D
Glaspasteurpipette	230 mm, Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburg, D
Glasperlen	2,85-3,3 mm, Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe, D
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare, Uppsala, S
Flaschenfilter	Steritop™ Filter Units 0,22 µm, Merck Millipore, Darmstadt, D
Impföse	10 µl, Sarstedt, Nümbrecht, D
Kryogefriergefäß	1,6 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Küvette	1,5 ml, Semi-Micro, Brand, Wertheim, D
Multi-Well-Platte	6-, 12- und 24-Well, Sarstedt, Nümbrecht, D 96-Well, Flachboden, schwarz, Polyesterol, Thermo Fisher Scientific/Nunc, Waltham, USA
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden, D
Objekträger	76 x 26 mm, Karl Hecht, Sondheim, D

Name	Firma
Parafilm M	Bemis®, Pechiney Plastic Packaging, Neenah, D
Polypropylensäulen	1 ml, 5 ml, Qiagen, Hilden, D
PVDF Membran	Immobilion-P, 0,45 µm Porengröße, Millipore, Billerica, D
Reaktionsgefäße	Sterile 15 ml/50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße	0,2 ml, Biozym Scientific, Hessisch Odendorf, D
Reaktionsgefäße	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Röntgenfilm	Super RX, Fuji Medizinische Röntgenfilme, Fujifilm, Tokyo, J
Serologische Pipetten	Sterile 2, 5, 10, 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Skalpell	Steril, B. Braun, Melsungen, D
Spritzenfilter	SFCA 0,2 µm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Whatman Papier	190 g/m ² , BioRad, Herkules, USA
Zentrifugationsröhrchen	Ultra Clear Centrifuge Tubes, $\frac{9}{16} \times 3 \frac{3}{4}$ (14 x 95 mm), Beckmann Coulter Inc, Krefeld, D
Zentrifugenfilter	Vivaspin® 6, 15, 20 MWCOs von 3000 bis 10000, GE Healthcare Europe, München, D Ultrafree-MC, VV 0.1 µm, Millipore, Billerica, USA

V.1.4 Kits, Enzyme und Reagenzien

Tabelle V.6 Kits

Kit	Hersteller
AminoLink® Coupling Resin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BioRad Protein Assay	BioRad, München, D
Nucleospin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, D
NucleoBond® PC 100 Midiprep Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
peqGold Miniprep Kit I	VWR, Darmstadt, D
SuperSignal West Femto/ Pico detection	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ZR Plasmid Miniprep – Classic Kit	Zymo Research, Irvine, USA

Tabelle V.7 Enzyme und Reagenzien

Enzyme, Reagenzien	Hersteller
AminoLink™ Reductant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Benzonase	Merck Millipore, Darmstadt, D
Complete Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Digitonin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
GoTaq® Hot Start DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
FastAP™ (Alkalische Phosphatase)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
FastDigest® Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot, D

Lysozym	Roche, Mannheim, D
O'Generuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR Extender System	5 Prime, Hamburg, D
Phenylmethylsulfonylfluid (PMSF)	Roth, Karlsruhe, D
Phusion Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ProLong™ Diamand	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim, D
RedSafe Nucleic Acid Staining Solution	HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg, D
Sytox® Green Nucleic Acid Stain	Molecular Probes/Invitrogen Europe, Paisley, UK
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim, D
Thrombin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin 0.05 %, 0,53 mM EDTA	Invitrogen/ Life Technologies/ Carlsbad, USA
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

V.1.5 Protein- und DNS-Leitern

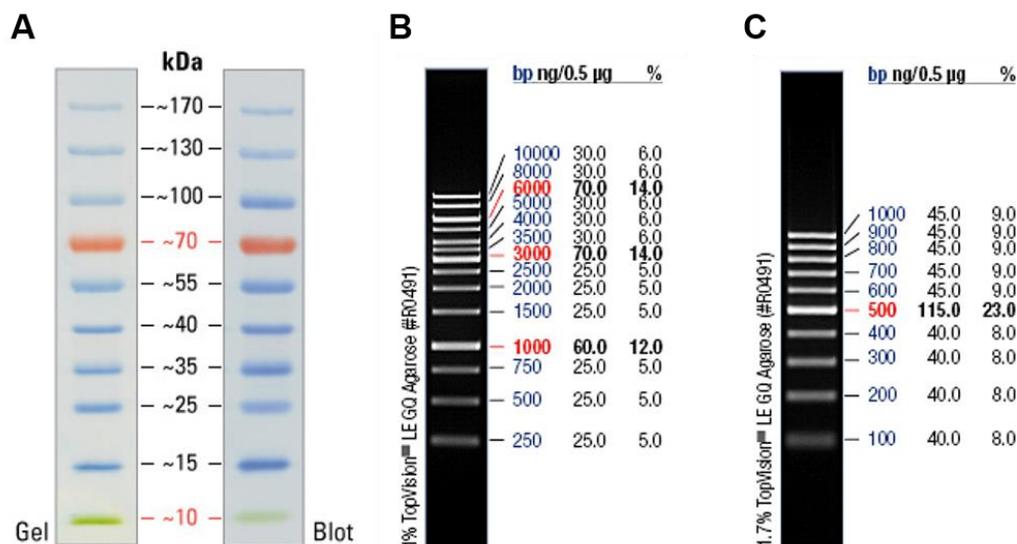


Abb. 22: Protein- und DNS-Leitern

A PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). **B** O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). **C** O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

V.1.6 Puffer und Lösungen

Chemikalien und Puffer wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham/GE Healthcare (München, D), BD Biosciences (Heidelberg, D), Biozym (Oldendorf, D), Merck (Darmstadt, D), PAA (Pasching, A), PromoCell (Heidelberg, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D),

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) sowie Invitrogen/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Puffer wurden entweder autoklaviert (20 min, 121 °C, 1,4 bar) oder bei hitzeempfindlichen Inhaltsstoffen mittels 0,22 µm Filtereinheiten steril filtriert.

Tabelle V.8 Pufferzusammensetzung

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
Zelllysispuffer	1 % (v/v) 50 mM 100 mM	Triton X-100 Tris pH 7,4 NaCl
Digitoninlysepuffer	0,5 % (w/v) 2 mM	Digitonin PMSF
<u>SDS-PAGE</u>		
Trenngelpuffer	1,5 M 0,1 % (w/v)	Tris-HCl pH 8,8 SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,1 % (w/v)	Tris-HCl pH 6,8 SDS
Ladepuffer SDS-PAGE (4x)	240 mM 8 % (w/v) 40 % (w/v) 5 % (v/v) 0,04 % (w/v)	Tris pH 6,8 SDS Glycerol β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM 190 mM 0,1 % (w/v)	Tris Glycin SDS
Coomassie Färbelösung	0,1 % (w/v) 40 % (w/v) 7 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R-250 Methanol Essigsäure
Entfärbelösung	40 % (w/v) 7 % (w/v)	Methanol Essigsäure
<u>Western Blot</u>		
Transferpuffer	150 mM 25 mM 20 % (v/v)	Tris Glycin Methanol
PBS (10x)	137 mM 2,7 mM	NaCl KCl

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
	14,4 g 2,3 mM	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaOH pH 7,4
PBS-T	1x 0,1 %(v/v)	PBS Tween20
TBS (10x)	150 mM 20 mM	NaCl Tris pH 7,4
TBS-T	1x 0,1 %(v/v)	TBS Tween20
<u>Elektrophorese</u>		
TAE (50x)	40 mM 10 mM	Tris-Acetat pH 8,3 EDTA ddH ₂ O, pH 7,4
<u>Kompetente Bakterien</u>		
TfB1 (4°C)	30 mM 50 mM 100 mM 10 mM 15 % (w/v)	KAc MnCl ₂ RbCl CaCl ₂ Glycerin ddH ₂ O, pH 5,8
TfB2 (4°C)	10 mM 10 mM 75 mM 15 % (w/v)	MOPS, pH 7,0 RbCl CaCl ₂ Glycerin ddH ₂ O, pH 8,0
<u>Proteinaufreinigung</u>		
Lysepuffer (Bakterien)	1x 1x 1 % (w/v) 1 U	PBS Complete Protease Inhibitor Lysozym Benzonase
GST-Elutionspuffer	20 mM 50 mM	Glutathion Tris pH 8,8

V.1.7 Wachstumsmedien und Zusätze

Die nachfolgend aufgeführten Komplexmedien zur Anzucht von *Y. enterocolitica* bzw. *E. coli* wurden vor Gebrauch für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden steril filtriert und zu den autoklavierten Medien zugefügt. Die Angaben beziehen sich jeweils auf einen Liter Gesamtvolumen.

Tabelle V.9 Wachstumsmedien für Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium (Luria/Miller), pH 7,5	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl
LB-Agar (Luria/Miller), pH 7,0	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl
	15 g/l Agar

Tabelle V.10 Wachstumsmedien und Zusätze für Zellkulturen

Produkt	Zusätze	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + Glutamax	10 (v/v) Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Carlsbad, USA
	1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Carlsbad, USA
		Gibco, Carlsbad, USA

Tabelle V.11 Antibiotikakonzentrationen zur Selektion

Antibiotika	Finale Konzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml in ddH ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloramphenicol	20 µg/ml in 10 % EtOH	Roth, Karlsruhe, D
Kanamycin	50 µg/ml in ddH ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nalidixinsäure	50 µg/ml in 0,5 M NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Spectinomycin	50 µg/ml in ddH ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetracyclin	20 µg/ml in 70 % EtOH	Roth, Karlsruhe, D

Tabelle V.12 weitere Zusätze

Supplement	Finale Konzentration	Hersteller
Arsen	65 ng/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Diaminopimelinsäure (DAP)	80 ng/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

V.1.8 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Tabelle V.13 *E. coli*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> λ^- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	[Taylor <i>et al.</i> , 1993]
<i>E. coli</i> Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ^- <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	[Grant <i>et al.</i> , 1990]
<i>E. coli</i> BL21-AI	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	[Moffatt & Studier, 1987]

Tabelle V.14 *Yersinia*-Stämme

Bakterienstamm	Merkmale	Referenz
WA-314	<i>Y. enterocolitica</i> Wildtyp, Serotyp O:8, klinisches Isolat, pYVO:8	[Heesemann & Laufs, 1983]
WA-C	Plasmid-befreite Mutante	[Heesemann & Laufs, 1983]
WA-314 Δ YopB	Wildtyp mit Insertionsmutation in <i>yopB</i> , Kanamycin-Resistenz (Kan ^R)	Konrad Trülsch, unpubliziert
WA-314 Δ YopD	Wildtyp mit Insertionsmutation in <i>yopD</i> , Kan ^R	Konrad Trülsch, unpubliziert
WA-314 Δ YopE	Wildtyp mit Insertionsmutation in <i>yopE</i> , Kan ^R	[Trülsch <i>et al.</i> , 2004]
WA-314 Δ YopP	WA-314 mit Inaktivierung von <i>yopP</i> durch Insertion	[Ruckdeschel <i>et al.</i> , 2001]
WA-CpYLCR	Enthält die <i>lcr</i> -Region und <i>yadA</i> auf dem pSUP102-Vektor, keine Effektor-Yop-Produktion	[Andor <i>et al.</i> , 2001]
AD4306	E40 (pYVe40 <i>yopQ</i> Δ 2-427 <i>yopE</i> ₂₁ <i>yopH</i> Δ 1-352 <i>yopM</i> ₂₃ <i>yopP</i> ₂₃ <i>yopT</i> ₁₃₅) Δ <i>asd</i> Δ 292-610 <i>egfp-yscD</i>	[Diepold <i>et al.</i> , 2015]

Tabelle V.15 Eukaryotische Zelllinien

Name	Merkmale	Herkunft
HeLa	Humane Zervixkarzinom Zelllinie	ACC# 57, DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D
IMM	J2 immortalisierte fötale Lebermakrophagen aus der Maus, RIP1 ^{+/+}	[Weng <i>et al.</i> , 2014]

V.1.9 Plasmide

Tabelle V.16 Plasmide zur prokaryotischen Proteinexpression

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pGEX-4T-1	Vektor zur prokaryotischen Expression eines GST-Fusionsproteins; MCS stromabwärts des GST- <i>tag</i>	GE Healthcare, München, D
pET302	Vektor zur prokaryotischen Expression eines 6xHis-Fusionsproteins; MCS stromabwärts des His- <i>tag</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle V.17 eukaryotische Plasmide

Plasmid	Vektorgerüst	Herkunft
pRKmyc	Leervektor, myc- <i>tag</i> , humaner Expressionsvektor	BD Clontech
myc-Rac1L61	pRK-myc, konstitutiv aktives Rac1	Pontus Aspenström, Uppsala

Tabelle V.18 Expressionskonstrukte

Konstrukt	Vektor; Insert	Herkunft
GST-YopB	pGEX-4T-1; YopB-Volllänge, Thrombinschnittstelle	diese Arbeit
GST-YopB ₁₋₁₆₈	pGEX-4T-1; YopB N-Terminus (AS 1-168), Thrombinschnittstelle	diese Arbeit
GST-YopD	pGEX-4T-1; YopD-Volllänge, Thrombinschnittstelle	diese Arbeit
GST-YopD ₁₅₀₋₂₈₇	pGEX-4T-1; YopD C-terminales Peptid (AS150-287), Thrombinschnittstelle	diese Arbeit
6x NT His-TEV-YopB	pET302, YopB-Volllänge, TEV-Erkennungssequenz	diese Arbeit
6x NT His-TEV-YopD	pET302, YopD-Volllänge, TEV-Erkennungssequenz	diese Arbeit

V.1.10 Oligonukleotide

Tabelle V.19 Primersequenzen

Name	Sequenz (5' → 3') ²
YBforBam	CAGGATCCTGGAACATGAGTTCGTTG
YBrevXho	GTCTCGAGCTCCTTAAACTTAAACAGTATGG
YBrevSal	GTAGTCGACCTCCTTAAACTTAAACAGTATGG
YBrevNTEco	CCGAATTCCTAGCCAAAAATCTTTGATGCC
YDforBam	CAGGATCCGGAGGAATAACAATGACAAT
YD150forBam	CGCGTGGATCCTCTATAGCGAAAGAGGTG
YDrevXho	GACTCGAGGTCATAAATGGTCAGACAAC
YDrevSal	GAAGTCGACGTCATAAATGGTCAGACAAC
YD287revXho	CGAAGCTCGAGTTACAAGCGCAGGACATCTTTC

pET02YBforEcoTEV	CAGAATTCT GAGAACCTGTACTTCCAAGGC ATGAGTTCGTTGATAACC
pET02YBrevBam	CTGGATCCTTAAACAGTATGGGGTCTGCCGGCC
pET02YDforEcoTEV	CAGAATTCT GAGAACCTGTACTTCCAAGGC ATGACAATAAATATCAAG
pET02YDforXhoTEV	CACTCGAGT GAGAACCTGTACTTCCAAGGC ATGACAATAAATATCAAG
pET02YDforXhoTEV2	CACT CGAGAACCTGTACTTCCAAGGC ATGACAATAAATATCAAG
pET02YBrevBam	CTGGATCCTTAAACAGTATGGGGTCTGCCGGCC
pET02YDrevBam	CTGGATCCTCAGACAACACCAAAGCGGC

² Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, TEV-Protease-Erkennungssequenz ist fett markiert.

V.1.11 Antikörper

Tabelle V.20 Primär-Antikörper

Antigen	Spezies	Verd. IF	Verd. WB	Herkunft
Aktin	Maus	-	1:10000	Millipore
GST	Kaninchen	-	1:2000	Invitrogen
LcrV	Kaninchen	1:50	n.d.	Serum
PepC	Kaninchen	-	1:1000	Serum
<i>Y. enterocolitica</i> O:8	Kaninchen	1:50	n.d.	Sifin, Berlin, D
<i>Y. enterocolitica</i> O:9	Kaninchen	1:50	n.d.	Sifin, Berlin, D
YopB	Kaninchen	1:100	1:1000-5000	Serum, diese Arbeit
YopB	Ratte	1:100	1:1000	Serum, diese Arbeit
YopD	Kaninchen	1:100	1:1000-100000	Serum, diese Arbeit

n.d.: nicht definiert

Zur Visualisierung von F-Aktin wurde Alexa-488-, 568-, oder 647-gekoppeltes Phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, USA) in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Zellkerne wurden mittels 300 nM DAPI (Invitrogen, Carlsbad, USA) gefärbt

Tabelle V.21 Sekundäntikörper

Sekundäntikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa-568 Esel anti-Maus	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA
Alexa-488 Huhn anti-Kaninchen	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA
Alexa-594 Huhn anti-Ratte	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA
Alexa-568 Ziege anti-Kaninchen	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA
Alexa-647 Ziege anti-Kaninchen	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA
Alexa-488 Ziege anti-Maus	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa-568 Ziege anti-Maus	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA
Alexa-647 Ziege anti-Maus	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA
Alexa-488 Ziege anti-Ratte	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA
Alexa-568 Ziege anti-Ratte	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA
Alexa-647 Ziege anti-Ratte	Invitrogen	1:200 in 3 % BSA
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	GE Healthcare	1:5000 od. 1:100000 in TBS-T
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	GE Healthcare	1:5000 od. 1:100000 in TBS-T
Anti-Ratte IgG, HRP-konjugiert	GE Healthcare	1:5000 od. 1:100000 in TBS-T
STAR 580 Esel anti-Kaninchen	Abberior	1:200 in 3 % BSA
STAR RED Esel anti-Kaninchen	Abberior	1:200 in 3 % BSA
STAR RED Esel anti-Ratte	Abberior	1:200 in 3 % BSA

V.1.12 Elektronische Datenverarbeitung

Tabelle V.22 Software und Datenbanken

Software	Hersteller
Abberior Inspector	Abberior Instruments GmbH, Göttingen, D
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems GmbH, München, D
CLC-Main Workbench	CLC bio, Aarhus, DK
Graphpad Prism 6	La Jolla, CA, USA
ImageJ	Bethesda USA
Imaris	Bitplane, Zürich, CH
Matlab	The MathWorks Inc., Natick, USA
Office Software Paket 2010/2013	Microsoft, Redmond, USA
Volocity 6	PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA
Volocity DEMO	PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA
NCBI Datenbank	www.ncbi.nlm.nih.gov

V.2 Methoden

V.2.1 Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden in den Laboren der gentechnischen Sicherheitsstufe 2 (S2) durchgeführt.

V.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

Y. enterocolitica-Stämme wurden für 24-48 h auf LB-Agar-Platten bei 27 °C kultiviert und anschließend für max. 4 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Für die Anzucht in Flüssigkultur wurden die *Y. enterocolitica*-Stämme aus Glycerinkultur oder von LB-Agar mit einer sterilen Impföse in 3 ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 27 °C schüttelnd inkubiert.

E. coli-Stämme wurden über Nacht auf LB-Agar-Platten bei 37 °C inkubiert und ebenfalls für max. 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Bei Plasmid-tragenden Stämmen war den LB-Platten das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Für Übernachtkulturen (ÜNKs) wurden einzelne Kolonien von der Agar-Platte mit sterilen Impfösen in LB-Medium überimpft. Die Inkubation erfolgte für mind. 16 h schüttelnd bei 37 °C.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden 0,8 ml einer ÜNK mit 0,8 ml 40 % Glycerin/LB-Medium (v/v) in Kryoröhrchen (Sarstedt) vermischt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

V.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Präparation chemisch kompetenter Zellen wurden 300 ml LB-Medium mit 1/100 Volumen einer Vorkultur des gewünschten *E. coli*-Stamms inokuliert und bis in die exponentielle Wachstumsphase (optische Dichte bei 600 nm, OD₆₀₀ = 0,5) schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt und das nach Zentrifugation (10 min, 3000 rpm, 4 °C) entstandene Bakterienpellet in 20 ml kaltem TFB 1 Puffer (siehe V.1.6) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 90 min. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1,5 ml kaltem TFB 2 Puffer aufgenommen und zügig zu je 100 µl in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt) aliquotiert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

V.2.1.3 Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Transformation chemisch kompetenter Bakterien erfolgte mit ca. 5 ng Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz (V.2.2.4.3). Dazu wurden entsprechende Aliquots der vorbereiteten kompetenten Zellen schonend auf Eis aufgetaut, mit der DNA versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Wasserbad bei 42 °C für 90 sec. Anschließend wurden die Bakterien

erneut kurz auf Eis überführt und in 900 µl steriles LB-Medium eingebracht. Um die auf der transformierten DNA kodierte Antibiotikaresistenz zu exprimieren, wurden die Bakteriensuspensionen für 60-90 min bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte durch Ausplattieren von je 100 µl Suspension auf antibiotikahaltigen Agar-Platten und der Übernachtinkubation bei 37 °C.

V.2.1.4 Released proteins assay

Die *in vitro*-Sekretion der *Yersinia outer proteins* kann durch die Kultivierung der Bakterien bei 37 °C und niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen induziert werden [Heesemann *et al.*, 1986]. Zunächst wird eine bei 27 °C inkubierte *Yersinia*-Vorkultur 1:20 in frisches LB-Medium verdünnt und durch Inkubation bei 37 °C und 180 rpm für 1,5 h die Yop-Genexpression aktiviert. Die Zugabe von 15 mM MgCl₂, 5 mM EGTA und 0,2 % Glucose führt zur Sekretion der Yops in den Kulturüberstand. Die Bakterien wurden weitere 2 h bei 37 °C bebrütet und nach Zentrifugation (10 min, 6800 rpm, 4 °C) verworfen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei Bedarf steril filtriert. Die sezernierten Effektorproteine ließen sich durch Zugabe von 10 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA) aus dem Bakterienüberstand präzipitieren. Die TCA-Fällung erfolgte auf Eis für 1 h oder über Nacht bei -20 °C. Danach wurde der Überstand für 30 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Präzipitat anschließend mit eiskaltem Aceton gewaschen (erneute Zentrifugation: 10 min, 14000 rpm, 4 °C). Bei Bedarf war ein weiterer Waschschrift zu wiederholen. Das Proteinpellet wurde kurz unterm Abzug abgedampft und schließlich in reduzierendem SDS-PAGE-Ladepuffer (V.1.6) resuspendiert und aufgekocht (5-10 min, 95 °C). Eine eventuell durch Acetonrückstände verursachte pH-Änderung im Ladepuffer (gelber Farbumschlag) konnte durch Zugabe von kristallinem Tris-Base rückgeführt werden.

V.2.2 Molekularbiologische Methoden

V.2.2.1 Isolation von Plasmid-DNS

Die Plasmid-Isolierung aus *E. coli* DH5α erfolgte aus einer 5 ml Vorkultur mit dem *ZR Plasmid Miniprep-Classical Kit* (Zymo Research, Irvine, USA) oder das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* (VWR, Darmstadt, D) nach Herstellerangaben. Die Präparation beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse [Birnboim & Doly, 1979]. Zur Gewinnung größerer Mengen reiner Plasmid-DNS wurde das *NucleoBind PC 100 Kit* (Macherey-Nagel, Düren, D) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Isolierte Plasmide wurden mittels Agarosegelelektrophorese auf Reinheit und Quantität geprüft (V.2.2.3) und bei -20 °C aufbewahrt.

V.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNS

Um den Gehalt an doppelsträngiger Nukleinsäure (dsDNS) in Lösung zu ermitteln, wurde das Absorptionsmaximum bei 260 nm photometrisch im NanoDrop bestimmt. Aus der Extinktion kann nachfolgend die Konzentration bestimmt werden, wobei ein Verhältnis von $A_{260} = 1$ 50 µg/ml dsDNS entspricht. Zur Kontrolle der Reinheit wurde das Extinktionsverhältnis bei 260/280 nm verfolgt. Dabei galt eine Ratio von 1,8-2,0 als erstrebenswert, da in diesem Bereich die Verunreinigungen durch Proteine oder Salze möglichst niedrig sind [Sambrook *et al.*, 1989].

V.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die quantitative und qualitative Analyse von DNS erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung in horizontalen, nativen Agarosegelen. Dabei bewegen sich die DNS-Fragmente im elektrischen Feld entsprechend ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von Anzahl der Nukleotide, der angelegten Spannung (8 V/cm) sowie der Konzentration der eingesetzten Agarose. Für Fragmentgrößen von 1-12 kb wurden 0,8-1 %ige Agarosegele ([w/v] in 1x TAE-Puffer) verwendet, die mit RedSAFE (HISS Diagnostics, Freiburg, D) versetzt waren. Durch mitgeführte Längenstandards (O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) konnte die Größe der DNS-Fragmente bestimmt werden. Den Proben wurden vor dem Gelauftrag 0,2 Vol. 6x *Loading Dye* zugesetzt, um sie zu beschweren und die Lauffront zu visualisieren. Die Elektrophorese wurde für 45 bis 60 min bei konstant 100 V in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Die dsDNS-Fragmente wurden mit Hilfe des interkalierenden RedSAFE-Farbstoffes unter Nutzung von UV-Licht (302 nm) und einem Transilluminator sichtbar gemacht. Die verwendeten Puffer sind Tabelle V.8 Pufferzusammensetzung zu entnehmen.

V.2.2.4 Arbeiten mit DNS

V.2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion [Mullis *et al.*, 1986] dient der *in vitro* Amplifikation von definierten DNS-Bereichen. Dabei sind reine Matrizen-DNS (Template) und genspezifische Oligonukleotide (Primer) die Grundvoraussetzung für das Gelingen der PCR. Zur Klonierung wurden die Phusion® Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), oder für besonders lange Fragmente das 5' PCR Extender System (5 Prime GmbH, Hamburg, D) mit Korrekturlese-Funktion (*proof reading*) verwendet. Für die Überprüfung positiver Klone mittels Kolonie-PCR wurde die GoTaq®-Polymerase (Promega, Madison, USA) eingesetzt. Alle Primer wurden von der Firma Eurofins (München, D) bezogen. Die einzelnen Primer-Sequenzen sind in Tabelle V.19 aufgelistet. Als

eingesetzte Template-DNS dienten 1:10-verdünnte pYVO:8 Plasmid-DNS aus *Y. enterocolitica* WA-314.

Der Reaktionsansatz für die Phusion-PCR setzt sich folgendermaßen zusammen:

4 µl	Phusion HF Puffer (5x)
1 µl	Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)
1 µl	Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
0,4 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	Phusion-Polymerase
1 µl	DNA-Template (20-100 ng/µl)
ad 20 µl	ddH ₂ O

Das Reaktionsgemisch wurde im Thermocycler nach folgendem Schema inkubiert (Tabelle V.23).

Tabelle V.23: Programm für die Phusion-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Programm	Zyklen
1	98 C	30 s	Initiale Denaturierung	1 x
2	98°C	10 s	Denaturierung	35
	T _m + 3°C	30 s	Annealing	
	72°C	1 min/1 kb DNS	Elongation	
3	72°C	5 min	Finale Elongation	1 x
4	4°C	∞	Pause	1 x

Die PCR-Produkte wurden nach der Reaktion mittels Agarosegelelektrophorese (V.2.2.3) analysiert und bei Bedarf mit dem NucleoSpin PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) nach Herstellangaben von Salzen und überschüssigen Nukleotiden gereinigt.

Zur schnellen Überprüfung von positiven Klonen nach der Transformation wurde eine Kolonie-PCR mit Hilfe der GoTaq®-Polymerase durchgeführt, die sich folgendermaßen zusammensetzt:

2 µl	GoTaq Green Buffer (5x)
0,5 µl	Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)
0,5 µl	Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
0,2 µl	dNTPs (10 mM)
0,05 µl	GoTaq-Polymerase
	Material einer Kolonie
ad 10 µl	ddH ₂ O

Das Reaktionsgemisch wurde im Thermocycler nach folgendem Schema inkubiert (Tabelle V.24).

Tabelle V.24: Programm für die GoTaq-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Programm	Zyklen
1	95 C	5 min	Initiale Denaturierung	1 x
2	95°C	30 s	Denaturierung	25
	T _m - 5°C	30 s	Annealing	
	72°C	1 min/1 kb DNS	Elongation	
3	72°C	5 min	Finale Elongation	1 x
4	4°C	∞	Pause	1 x

V.2.2.4.2 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Nachdem die PCR-Produkte durch Aufreinigung von überschüssigen Salzen, Nukleotiden, Primern und Enzymen befreit waren, wurde eine sequenzspezifische Hydrolyse mit Hilfe von FastDigest® Restriktionsendonucleasen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) vorgenommen. Dazu wurden 0,1 bis 0,5 µg PCR-Produkt bzw. 0,5-1 µg Plasmid-DNS nach Herstellerangaben geschnitten. Die Ansätze wurden für 20 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei z.B. 80 °C für 5 min abgestoppt. Die vollständige Hydrolyse der Plasmid-DNA wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (V.2.2.3) überprüft.

V.2.2.4.3 Ligation

Die durch Restriktion hergestellten zueinander kompatiblen überhängenden Enden von Plasmid und *insert* wurden in der Ligationsreaktion durch die T4-DNA-Ligase (1 U/µl; Roche, Mannheim, D) unter ATP-Verbrauch zusammengefügt. Dabei wurden Vektor-DNS und PCR-Produkt in einem molekularen Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt:

1 µl	Linearisierter Vektor
3 µl	Restringiertes PCR-Produkt
2 µl	T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)
1 µl	T4-DNA-Ligase (1 U/µl)
ad 20 µl	ddH ₂ O

Die Ligationsansätze besaßen ein Gesamtvolumen von 20 µl und wurden für max. 16 h bei 15 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung der T4-Ligase für 15 min bei 65 °C. Die Ligationsansätze konnten direkt für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (V.2.1.3) eingesetzt werden.

V.2.2.4.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab (Göttingen, D) entsprechend ihrer Standardprotokolle durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden dem Programm CLC Workbench (CLC bio, Aarhus, DK) analysiert oder mit den Sequenzen der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) verglichen und ausgewertet.

V.2.3 Proteinbiochemische Methoden

V.2.3.1 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Für die heterologe Expression von Fusionsproteinen wurde der *E. coli*-Stamm BL21-AI (Tabelle V.13) verwendet. Für die Vorkultur des jeweiligen Stammes wurden je 25 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) mit einer einzelnen Kolonie von der LB-Agarplatte beimpft und bei 37 °C

und 180 rpm über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Hauptkultur mit einer 1:40-Verdünnung der Vorkultur in 500 ml LB-Bouillon mit Ampicillin (100 µg/ml) inokuliert und weiter bei 37 °C schüttelnd (180 rpm) bebrütet, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,5-0,8 erreicht war. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,4 mM IPTG (Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid) induziert und die Bakterien nach 4 h Inkubation bei 37 °C durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4 °C; Sorvall RC 5B, Rotor GS-3) geerntet. Das Pellet wurde in 10 ml PBS versetzt mit Complete Protease-Inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

V.2.3.2 Proteinaufreinigung

Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein eukaryotisches Protein mit einer Molekülgröße von 26 kDa. Mit einer hohen Affinität bindet GST an sein Substrat Glutathion (GSH), welches zusätzlich an eine Sepharosematrix immobilisiert werden kann. Die Bindung zwischen GST und GSH ist reversibel und lässt sich unter nicht-reduzierenden Bedingungen wieder aufheben. Daher eignet sich dieses System gut für die Aufreinigung von Proteinen. Mit Hilfe bakterieller Expressionsvektoren (pGEX-4T-1) lassen sich Zielproteine an GST fusionieren und in einem Protease-defizienten *E. coli* Stamm (BL21-AI) nach Induktion exprimieren. Das Fusionsprotein kann anschließend über eine Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden.

Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis. Das Bakterienpellet der Expressionskultur wurde auf Eis aufgetaut und mit einer Spatelspitze Lysozym (Roche, Mannheim, D) sowie 2,5 µl Benzonase (Merck Millipore, Darmstadt, D) versetzt und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Durch Ultraschallbehandlung (Digital Sonifier 250-D, Branson, Danbury, USA) von 5 x 20 s bei einer Amplitude von 20 % wurden die Bakterien aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation bei 20.000 x g für 30 min bei 4°C (Sigma Zentrifuge 3-18K, Sigma, Osterode, D) abgetrennt. Das Bakterienlysat wurde für 1 h bei 4°C mit einer Glutathion-Sepharose 4B Matrix (GE Healthcare, München, D) in einer Einweg-Polypropylensäule (1 ml, Quiagen, Hilden, D) rotierend inkubiert. Die Matrix wurde anschließend dreimal mit 5 ml PBS gespült, um ungebundenes Protein zu entfernen. Die Elution des GST-Fusionsproteins erfolgte durch Inkubation der Matrix mit 0,5 ml Glutathion-Elutionspuffer für 2 x 30 min und 1 x über Nacht bei 4 °C und rotierend. Die Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins wurde mittels SDS-PAGE (siehe V.2.3.5) und Coomassie-Färbung (siehe V.2.3.6) überprüft. Die Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen ist in Tabelle V.8 zu finden.

V.2.3.3 Dialyse

Um überschüssiges GSH aus den eluierten Fusionsproteinen zu entfernen, erfolgte die Dialyse gegen PBS. Dazu wurde entweder die Dialysekassette Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben verwendet oder ein mehrmaliges Waschen unter Verwendung der Zentrifugenfilter Vivaspin 20 (GE Healthcare, München, D) genutzt. Dazu wurden die Elutionsfraktionen zusammengeführt, mit PBS verdünnt und durch den Zentrifugenfilter im Festwinkelrotor zentrifugiert (8.000 x g, 4 °C, ca. 1 h). Das eingeeengte Volumen der Proteinlösung wurde weitere 2 x mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 20 ml verdünnt und wie zuvor zentrifugiert.

V.2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinquantifizierung wurde nach Herstellerangaben mit dem BioRad Protein-Assay Kit (Biorad, München, D) durchgeführt. Die Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffs *Coomassie Brilliant blue G-250* an Proteine und der daraus folgenden Verschiebung des Absorptionsmaximas von 465 nm zu 595 nm [Bradford, 1976].

V.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein elektrophoretisches Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen entsprechend ihrer Molekulargewichte unter denaturierten Bedingungen [Laemmli, 1970].

Für die Elektrophorese wurden chemisch inerte Acrylamid-Bisacrylamidgele (Biorad, München, D) selbst hergestellt. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tabelle V.25 aufgeführt. Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinproben mit 4 x SDS-PAGE Ladebuffer (Tabelle V.8) für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend in die Geltaschen gegeben. Die Proben wurden für 30 min mit 80 V im 4 %igen Sammelgel unter Verwendung des SDS-Tris-Glycin-Laufpuffers fokussiert. Nach Übertritt in das Trenngel wurden die Proteine bei einer Spannung von 150 V, ihrer Größe entsprechend, aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mitgeführt.

Tabelle V.25: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Verbindung	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
ddH ₂ O	4,2 ml	1,55 ml
Puffer pH 8,8	2,5 ml	-
Puffer pH 6.8	-	625 µl
Acrylamid 30 %	3,3 ml	325 µl
APS (10 mg/ml)	50 µl	12,5 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl

V.2.3.6 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die Visualisierung und Fixierung von Proteinbanden nach elektrophoretischer Auftrennung in der SDS-PAGE erfolgte durch die irreversible Einlagerung von *Coomassie Brilliant Blue-G250* in die Proteine. Die Nachweisgrenze von Proteinen liegt dabei bei 500 ng Protein. Dazu wurde zunächst das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 1 h mit der Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte durch mehrstündige, schüttelnde Inkubation in Coomassie-Entfärbelösung. Diese wurde mehrfach ausgetauscht, bis ein klarer Hintergrund sichtbar war. Anschließend wurde das Trenngel mit ddH₂O über Nacht gewaschen. Zur Dokumentation wurde das Gel gescannt und mithilfe des Gel dryer 543 (BioRad, München, D) getrocknet. Die Zusammensetzung der Puffer sind Tabelle V.8 zu entnehmen.

V.2.3.7 Westen Blot Analysen

Mit Hilfe des Western Blot werden Proteine aus Polyacrylamidgelen elektrophoretisch auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF, Immobilion, Millipore, Darmstadt, D) transferiert. Dazu wurden drei Lagen Filterpapier (90 g/m², Hartenstein, Würzburg, D) in Transferpuffer getränkt und auf der Kathode platziert. Das SDS-Gel wurde vom Sammelgel befreit, in Transferpuffer equilibriert und auf die Filterpapiere gelegt. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol inkubiert und luftblasenfrei auf das Gel gebettet. Abgedeckt wurde das System mit drei weiteren, in Transferpuffer getränkten Filterpapieren. Je nach Molekulargewicht wurden die Proteine bei konstanter Stromstärke (1,2 mA/cm²) für 70 min auf das Trägermaterial übertragen. Anschließend erfolgte die Immundetektion der Proteinbanden mittels epitopspezifischen Primärantikörpern. Zunächst wurden freie, unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran durch Inkubation mit 5 % (w/v) fettarmen Milchpulver in TBS-T oder PBS-T für 1 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht abgesättigt. Anschließend wurde der Blot mit spezifischen Primärantikörpern rotierend für 1-2 h bei RT oder über nacht bei 4 °C inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper und Verdünnungen sind Tabelle V.20 aufgelistet. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T bzw. PBS-T (je 5 min) wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase-(HRP)-konjugierten

speziesspezifischen Sekundärantikörper (siehe Tabelle V.21) für 0,5-1h bei RT rotierend inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBS-T/PBS-T erfolgte die Immundetektion mittels Chemolumineszenz. Dazu wurde die PVDF-Membran in einer 1:1-Mischung aus Peroxid- und Luminolverstärkerlösung des *SuperSignal West Femto* bzw. *Pico* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 5 min inkubiert. Die Detektion des emittierten Lichts erfolgte mittels Röntgenfilmen (Super RX, Fuji medical X-ray Film, Fujifilm, Tokyo, J), die in einem Curix 60 (Agfa, Morsel, B) entwickelt wurden.

V.2.3.8 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Die Extraktion von eukaryotischen Proteinen erfolgte durch Zugabe von 100 µl kaltem Lysispuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle V.8), versetzt mit Protease-Inhibitor (Complete Protease Inhibitor, Roche, Mannheim, D) zu $1,2 \times 10^6$ HeLa-Zellen. Nach zügigem Abstreichen der Zellen mit einem Zellkulturspatel wurde das Lysat in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 20 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei $14.000 \times g$ und 4°C wurden nichtlysierte Zellen und unlösliche Bestandteile pelletiert und das Proteinlysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Proteingehalt (V.2.3.4) bestimmt, die Volumina gleicher Proteinmengen mit 4 x SDS-Ladepuffer versetzt, bei 95°C inkubiert und bei -20°C gelagert.

V.2.3.9 Affinitätsreinigung von Antisera

Um spezifische Antikörper aus dem Gemisch von Serumbestandteilen zu präparieren, wurden verschiedene Affinitätsreinigungen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Aufreinigung der Antikörper gegen das native, immobilisierte Antigen mit Hilfe des AminoLink Coupling Resin Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) entsprechend der Herstellerangaben. Dazu wurden die aufgereinigten Fusionsproteine GST-YopB₁₋₁₆₈ und GST-YopD₁₅₀₋₂₈₇ (V.2.3.2) in Polypropylensäulen durch reduktive Aminierung kovalent an eine Trägermatrix aus aktivierten Agarose-Kügelchen gebunden. Die dadurch erhaltenen Affinitätssäulen ließen sich wiederverwenden und bei 4°C aufbewahren. Die spezifischen Antisera wurden mittels Gravitationsfluss über die nativen Affinitätssäulen gereinigt. Die Elution gebundener Antikörper erfolgte durch Applikation von einer 100 mM Glycin-HCl-Lösung (pH 2,5), die im Anschluss sofort durch Zugabe von 1 M Tris-Base (pH 9) neutralisiert wurde. Im Fall von anti-YopD-Antikörpern reichte diese Form der Affinitätsreinigung aus, um spezifisch die Antigene in der Immunfluoreszenz (V.2.6.1) zu markieren.

Für Detektion von YopB in immungefärbten mikroskopischen Proben war eine zusätzliche Reinigung der anti-YopB-Antikörper nötig, die mit Hilfe des danaturierten, immobilisierten

Antigens erfolgte. Hierfür wurden die sekretierten Proteine von WA-314 aus dem *released proteins assay* (V.2.1.4) mittels Western Blot (V.2.3.7) auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Nach kurzer Inkubation (ca. 1 min) mit Coomassie-Färbelösung wurde die Membran mit 100 % Methanol entfärbt, bis einzelne Proteinbanden gerade noch zu erkennen waren. Auf Höhe von 43 kDa wurde eine YopB entsprechende Proteinbande ausgeschnitten und vollständig entfärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für je 5 min wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5 % (w/v) fettarmen Milchpulver in PBS-T angesättigt. Der PVDF-Membranstreifen wurde erneut 3 x für 5 min mit PBS-T gewaschen und in kleinere Fragmente geschnitten. Diese wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht, D) überführt und entweder mit dem Eluat aus der ersten Affinitätsreinigung oder direkt mit verdünntem Antiserum (1:3 mit PBS) inkubiert. Die Membranfragmente wurden für 4 h bei RT oder alternativ über Nacht bei 4 °C in der Antikörperhaltigen Lösung rotiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und aufbewahrt und die Membranfragmente 3 x für 5 min mit PBS-T gewaschen. Durch Zugabe von 200 µl 100 mM Glycin-HCl (pH 2,5) und einminütiges Schütteln auf einem Vortexmischer (Heidolf Instruments, Schwabach, D) bei max. Drehzahl wurden die gebundenen Antikörper eluiert und mit 9,3 µl 1 M Tris-Base neutralisiert. Die Proteinkonzentration der Antikörperlösung wurde durch Absorption bei 280 nm am NanoDrop (Peglab, Erlangen, D) überprüft. Abschließend erfolgte die Zugabe von 40 µl BSA (1 mg/ml) und 0,1 % Natriumazid um die Proteinkonzentration zu erhöhen bzw. das Wachstum von kontaminierenden Organismen zu unterdrücken. Die gereinigten Antikörper wurden bei 4 °C gelagert.

V.2.4 Zellkultur und zellbiologische Methoden

V.2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten eukaryotischen Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Partialdruck im Inkubator kultiviert. Für die HeLa-Zelllinie wurde DMEM (nach Dulbecco modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium), versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) verwendet. Für die immortalisierten Mausmakrophagen (IMMs) wurde dasselbe Medium (DMEM + 10 % FKS) zusätzlich mit 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (alles von Gibco, Carlsbad, USA) genutzt. Die Zellen wurden alle 48 h passagiert, indem diese mit PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen und anschließend für 5 min bei 37°C mit 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA (Gibco, Carlsbad, USA) inkubiert wurden. Nach Zentrifugation bei 200 x g für 5 min wurde das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine neue Gewebekulturschale überführt.

V.2.4.2 Kryokonservierung und Reaktivierung von Kryokulturen

Die Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C . Dazu wurden 4×10^6 Zellen, trypsinisiert, in 1.5 ml FKS mit 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Kryogefrierbehälter transferiert und bei -80 °C eingefroren. Das Isopropanol sorgt für eine schonende Temperaturreduktion von ca. -1 °C pro Minute. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Reaktivieren der kryokonservierten Zellen wurde das Kryoröhrchen rasch im 37 °C temperierten Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in 10 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium aufgenommen. Durch Zentrifugation bei $200 \times g$ für 5 min wurde das DMSO-haltige Einfriermedium entfernt. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in ein steriles Zellkulturgefäß überführt. Der erste Mediumwechsel erfolgte 24 h nach dem Auftauen.

V.2.4.3 Zellbehandlungen

V.2.4.3.1 Transfektion

Das Einbringen von Plasmid-DNS in eukaryote Zellen erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagens Turbofect (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) entsprechend der Herstellerangaben. Für die Expression von konstitutiv aktivem Rac1 wurden die Zellen mit 250 ng Plasmid-DNS für 8-16 h transfiziert.

V.2.4.3.2 Translokationsexperimente

Um die Fraktion translozierter Effektor-Yops zu analysieren, wurden spezifisch nur die Proteine aus den infizierten Zellen isoliert und mittels SDS-PAGE (V.2.3.5) und Western Blot (V.2.3.7) auf die Mengen injizierter Yops untersucht. Dazu wurden zunächst HeLa-Zellen mit dem zu untersuchenden *Y. enterocolitica*-Stamm mit einem Bakterien:Zell-Verhältnis von 100:1 (MOI 100) für 60-90 min infiziert.

Am Vortag wurden pro Bedingung 3×10^5 HeLa-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und ÜNKs mit den gewünschten Bakterien angeimpft und bei 27 °C und 180 rpm bebrütet. Am Versuchstag wurden die Vorkulturen 1:20 verdünnt und für 90 min bei 37 °C , 180 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden zentrifugiert (10 min, $4.000 \times g$, 4 °C) und in eiskaltem PBS aufgenommen. Anschließend wurde die OD_{600} der Bakteriensuspension photometrisch (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare, München, D) bestimmt und auf $OD_{600}=0,36$ eingestellt. Die Infektion wurde durch Zugabe der Bakterien zu den Zellen gestartet, wobei 100 μl der eingestellten Suspension einer MOI

(*multiplicity of infection*) von 100 entsprachen. Nach 1-2 h Inkubation bei 37 °C unter CO₂-gesättigter Atmosphäre wurde die Infektion durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS beendet.

Mit Hilfe einer Proteasebehandlung wurden extrazelluläre Proteine gespalten, um eine Verunreinigung durch sekretierte Yops zu verhindern. Dazu erfolgte die Zugabe von 60 µl Proteinase K-Lösung (500 µg/ml PBS), die nach 30 s wieder abgenommen wurde. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurde die Proteinspaltung mittels 60 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Roth, Karlsruhe, D; 4 mM in PBS) abgestoppt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 50 µl Digitonin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 1 % in PBS), welches spezifisch nur eukaryotische Zellen lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von dem Kulturgefäß gelöst und in 1,5 ml reaktionsgefäße überführt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden die Zelltrümmer und Bakterien durch Zentrifugation (10 min, 10.000 x g, 4 °C) abgetrennt und verworfen. Die Überstände wurden auf ihren Proteingehalt untersucht (V.2.3.4) und die translozierten Effektor-Yops mittels Immunoblot nachgewiesen (V.2.3.7).

V.2.4.3.3 Zytotoxizitätsbestimmung

Die Messung der Emission des DNS-Farbstoffs Sytox Green (Invitrogen, Paisley, UK) diente der Bestimmung des *Yersinia*-infektionsbedingten Zelltots von immortalisierten Mausmakrophagen (IMMs). Dazu wurden am Versuchstag 7 x 10⁴ Zellen pro 96-Well (Flachboden, schwarz, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in Triplikaten ausgesät und nach mind. 1 h Ruhezeit mit einer MOI100 einer Bakteriensuspension des gewünschten Stamms infiziert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C, 5 %CO₂ wurde die Infektion mittels Gentamycin (100 mg/ml) abgestoppt. Der nichtpermeabilisierende DNS-Farbstoff, der nur in tote Zellen eindringt, wurde 90 min vor der ersten Messung zu einer finalen Konzentration von 0,5 µM appliziert. Die Intensität von Sytox Green in toten Zellen wurde in *Microplate Reader* (Tecan, Männedorf, CH) durch Messung der Absorption bei 523 nm über die Zeit verfolgt (1 x pro Std.). Durch Zugabe von Triton X-100 (TX-100, finale Konzentration 0,5 %) wurde die maximale Sytox Green Intensität in jedem Well bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Prozentwerte der Zytotoxizität in Bezug auf das Hintergrundsignal nicht-infizierter Zellen und maximaler Zelltot-Rate angegeben und mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{induzierter Zelltot} - \text{Hintergrundsignal}}{\text{Maximalzelltot} - \text{Hintergrundsignal}} * 100$$

V.2.5 Tierversuche

V.2.5.1 Immunisierung von Versuchstieren im Injektionsverfahren

Die Immunisierung von Versuchstieren zur Herstellung spezifischer Antisera erfolgte entsprechend des Standardprotokolls der Versuchstierhaltung (VTH) des UKE [SOP: Immunisierung von Kaninchen (Forschungstierhaltung UKE), 2013]. Durch wiederholtes Injizieren gereinigter Proteine werden in den behandelten Versuchstieren Antikörper gebildet, die sich aus dem Blut der Tiere isolieren lassen.

V.2.5.1.1 Kaninchenimmunisierung

Für die Gewinnung von spezifischen Antikörpern gegen YopB und YopD wurden je zwei *New Zealand White* Kaninchen mit den gereinigten und in PBS umgepufferten Fusionsproteinen GST-YopB₁₋₁₆₈ und GST-YopD₁₅₀₋₂₈₇ (V.2.3.2) in der VTH immunisiert. Dazu wurde jungen adulten Tieren ein 1:1 Gemisch aus Protein und Adjuvans subkutan verabreicht. Die Immunisierung wurde von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen gemäß § 10 a des Tierschutzgesetzes unter der Projektnummer A10a 675 genehmigt.

Je Tier wurden 400 µg Protein in 250 µl PBS (zuvor sterilisiert mittels Zentrifugenfiltern mit 0,1 µm Porengröße, Millipore, Billerica, USA) und 250 µl komplettes Freund'sches Adjuvans (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) gemischt. Eine stabile Emulsion konnte durch Ultraschallbehandlungen (5 x 10 s, 70 % Amplitude) hergestellt werden. Nach 4, 8 und 12 Wochen erhielten die Kaninchen *Boost-immunisierungen* mit ebenfalls 400 µg Protein gemischt mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). Die Injektionen und Blutentnahmen wurden von Mitarbeitern der VTH durchgeführt. Vor der Erstimmunisierung wurde zur Gewinnung des Präimmunserums (siehe V.2.5.2) 2 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Die finale Blutentnahme erfolgte unter Narkose durch transthorakale Herzpunktion und Aspiration des gesamten Blutvolumens. Die Tiere sterben in Narkose durch den Blutenzug.

V.2.5.1.2 Rattenimmunisierung

Für die Gewinnung von spezifischen Antikörpern gegen YopB wurden zwei *Wistar* Ratten mit dem gereinigten und in PBS umgepufferten Fusionsprotein GST-YopB₁₋₁₆₈ (V.2.3.2) in der VTH immunisiert. Ein 1:1 Gemisch aus Protein und Freund'schem Adjuvans wurde weiblichen Tieren mit mind. 250 g Ausgangsgewicht subkutan verabreicht. Die Tierversuchsanzeige wurde von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittelsicherheit und

Veterinärwesen gemäß § 8 a Abs. 1 Nr. 3 a des Tierschutzgesetzes unter der Projektnummer A8a/794 genehmigt.

Die Immunisierung erfolgte analog zu V.2.5.1.1 mit je 50 µg Protein in max. 400 µl Gesamtvolumen. Zur Gewinnung des Präimmunserums wurde vor der Erstimmunisierung ca. 100 µl Blut aus der Wangenvene oder aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Die finale Blutentnahme erfolgte unter Ketamin/Xylazin Narkose durch retrobulbäre Blutentnahme.

V.2.5.2 Gewinnung von Antiseren aus Vollblut

Präimmunserum und spezifische Antisera wurden nach Übernachtinkubation bei 4 °C gewonnen, indem das entstandene Koagulum aus den entnommenen Blutproben mit Hilfe einer sterilen Pipette entfernt wurde. Um verbliebene Erythrozyten abzutrennen, wurden die Seren mehrfach für je 15 min bei 3.500 x g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände jeweils in frische Reaktionsgefäße überführt. Dies wurde solange wiederholt, bis sich kein Pellet aus Blutzellen mehr absetzte. Die so erhaltenen Präimmun- bzw. Antiseren wurden nach Kontrolle der Antigenspezifität (V.2.5.3) aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

V.2.5.3 Antikörper-Spezifitätskontrollen

Die präparierten Seren wurden auf enthaltene spezifische YopB- bzw. YopD- Antikörper getestet. Dazu wurden *released proteins* des *Y. enterocolitica* WA-314-Wildtyps und der *yopB*- bzw. *yopD*- Deletionsmutanten entsprechend Sektion V.2.1.4 isoliert und mittels SDS-PAGE (V.2.3.5) aufgetrennt. In der Western Blot Analyse (V.2.3.7) wurden verschiedene Verdünnungen des Antiserums gegen das Präimmunserum geprüft. Dabei konnte eine spezifische Immunreaktion gegen das jeweilige Antigen bei einer Serumverdünnung von 1:10.000 nachgewiesen werden, wohingegen das entsprechende Präimmunserum in einer 1:1.000 Verdünnung keine Reaktion zeigte.

V.2.6 Mikroskopische Methoden

V.2.6.1 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden HeLa-Zellen auf Deckgläser (Hartenstein) in 24-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, D) ausgesät und analog zu V.2.4.3.2 mit Yersinien-Stämmen infiziert. Die Zellen wurden nach entsprechender Inkubation bei 37°C dreimal mit PBS gewaschen und mit 3,7 % (v/v) Formaldehyd/PBS für 10 min fixiert und mit 0,1 % (v/v) TX-100 in PBS für 5 min permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden durch 30-minütige Inkubation mit 3 % (w/v) BSA blockiert. Die Proben wurden anschließend für 1 h mit dem Primärantikörper und nach

dreimaligem Waschen für 45 min mit dem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Verwendete Antikörper und deren Verdünnungen in 3 % BSA sind unter V.1.11 zu finden. Zur Färbung von DNS oder Aktin wurden DAPI bzw. Phalloidin zur Sekundärantikörper-Lösung hinzugefügt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser in MOWIOL oder ProLong Diamond (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Aufnahmen wurden an einem kofokalen *laser scanning* Mikroskop (Leica TCS SP5/SP8) mit 63-fachen Öl-Immersionsobjektiv oder einem hochauflösenden Mikroskop angefertigt. Für 3D-STED-Aufnahmen wurden die Proben in *Liquid Antifade* (Abberior GmbH, Göttingen, D) eingebettet und die Deckgläser mit Nagellack versiegelt. Da sich eine DAPI-Färbung nicht für diese Art von Mikroskopie eignet, wurde auf die Verwendung dieses Farbstoffs verzichtet.

3D-Analysen erfolgten mit Hilfe von Stapelaufnahmen im Konfokal- und 80 % 3D-STED-Modus. Dazu wurde eine Voxelgröße von 40 x 40 x 40 nm verwendet. Für die maximale Auflösungsverbesserung in der XY-Ebene wurde im 100 % 2D-STED-Modus bei einer Voxelgröße von 20 x 20 x 150 nm gearbeitet. Bei Kofärbungen wurden beide Fluoreszenzfarbstoffe mit der 775 nm-STED-Laserlinie depletiert. Weitere technische Details der Mikroskope sind im Kapitel V.1.2 beschrieben.

V.2.6.2 Innen- und Außenfärbung bakterieller Proteine

Zur Bestimmung der Lokalisation von YopB und YopD während der Sekretion wurde folgendes Färbeprotokoll etabliert.

Zur Untersuchung der extrazellulären Fraktion der Translokator-Yops wurden die Bakterien-Subkulturen für 1,5 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Yop-Sekretion wurde wie unter V.2.1.4 beschrieben induziert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C und 180 rpm, wurden die Bakterien pelletiert (10 min, 4000 x g, 4 °C) und 2x mit PBS gewaschen. 50-100 µl dieser Bakteriensuspension wurden auf beschichtete Deckgläschen (0,2 % [v/v] Gelatine, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) pipettiert und für mind. 10 min bei RT inkubiert. Die Bakterien-tragenden Deckgläschen wurden vorsichtig mit PBS gespült und anschließend fixiert. Die Immunfärbung erfolgte analog zu V.2.6.1, wobei 0,1 % TX-100 keine permeabilisierende Wirkung auf die Bakterien zeigte. Wahlweise wurden die Bakterien vor der Applikation auf die Deckgläser mit Proteinase K behandelt um alle auf der Bakterienoberfläche akkumulierten Proteine zu eliminieren. Dazu wurden die Bakterien nach dem 2. Waschschrift in 500 µg/ml Proteinase K resuspendiert, 10 min bei RT inkubiert und nach anschließender Zentrifugation (5 min, 4000 x g, 4 °C) in 4 mM PMSF aufgenommen.

Die Färbung der totalen Fraktion von YopB bzw. YopD erfolgte analog zur nicht-permeabilisierenden Methode (siehe oben und V.2.6.1), wobei die fixierten Bakterien mit 2 % SDS (w/v in PBS) anstelle der 0,1 % TX-100-Lösung inkubiert wurden.

V.2.6.3 Kolokalisationsstudien

Zur Prüfung der gleichzeitigen Lokalisation von YopB und YopD bzw. YopB und LcrV in hochaufgelösten Fluoreszenzkernen, wurden Kolokalisationsstudien durchgeführt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Proteine mit spezifischen Primärantikörpern, wie unter V.2.6.1 beschrieben, gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Für die Auswertung wurde das ImageJ *Plug-In* JACoP zur Bestimmung des Pearson Korrelationskoeffizienten und der Manders Koeffizienten benutzt [Manders *et al.*, 1993]. Der Pearson Korrelationskoeffizient kann einen Wert von -1 bis +1 einnehmen, wobei ein Wert von null eine zufällige Verteilung und ein Wert von +1 eine vollständige Kolokalisierung impliziert. Bezugnehmend auf publizierte Daten für den Pearson Koeffizienten wird ein Wert zwischen 0,5 und 1,0 als signifikant angesehen. Der Manders Koeffizient kann Werte von 0 bis 1 annehmen, wobei ein Wert größer als 0,5 (ausgewählte Kanäle überlappen in >50 %) als signifikant kolokalisierend betrachtet wird [Zinchuk & Zinchuk, 2008]. Vor der Auswertung wurde eine Hintergrundkorrektur für jeden Kanal durchgeführt.

V.2.6.4 *Nearest Neighbour* Analyse zur Distanzbestimmung fluoreszenzmarkierter Proteine

Die Bestimmung der Distanz zwischen GFP-markiertem YscD und immungefärbtem YopB erfolgte durch die Analyse der „nächsten Nachbarn“ mit Hilfe eines Matlab-Algorithmus. Zunächst wurden die Koordinaten der Fluoreszenzkerne von YcsD und YopB in Imaris bestimmt. mit Hilfe des nachfolgend aufgeführten Matlab-Scripts (verfasst von Dr. Jens Bosse, HPI) wurden die ermittelten Koordinaten eingelesen, zugeordnet und die berechneten Kleinstabstände in einem Diagramm ausgegeben.

```
%% import data

Folder=uigetdir;
DirList = dir(fullfile(Folder, '*.xlsx'));
Data = cell(1, length(DirList));
for k = 1:length(DirList)
    Data{k} = readtable(fullfile(Folder, DirList(k).name));
end

%% nearest neighbor search and plot distances

allmatchedpoints=[];
```

```

k=1;
for i=1:(size(Data,2)/2)%data for red and green channels comes in pairs of two
excel tables

    YopBpos=[];
    YscDpos=[];
    YopBpos=table2array(Data{k}(:,1:3));
    YscDpos=table2array(Data{k+1}(:,1:3));

    [IDX,D] = rangesearch(YopBpos,YscDpos,0.15);

    matchedpoints=zeros(size(D,1),7);
    matchedpoints(:,4:6)=YscDpos(:,1:3);
    matchedpoints(:,1:3)=YopBpos(IDX(:,1), 1:3);
    matchedpoints(:,7)=D(:,1);

    allmatchedpoints=[allmatchedpoints;matchedpoints];
    k=k+2;
end

figure
nbins=[0:0.02:max(allmatchedpoints(:,7))];
histogram(allmatchedpoints(:,7),nbins)

%% filter for points closer than cutoff and make histogram

filteredpoints=[];

for i=1:size(allmatchedpoints,1)

    if allmatchedpoints(i,7)<0.15
        filteredpoints=[filteredpoints; allmatchedpoints(i,1:7)];

    end

end

figure
nbins=[0:0.02:0.15];
histogram(filteredpoints(:,7),nbins)

% % plot closest points
figure
scatter3(filteredpoints(:,1),filteredpoints(:,2),filteredpoints(:,3), 'g')
hold on
scatter3(filteredpoints(:,4),filteredpoints(:,5),filteredpoints(:,6), 'r')

```

VI Literaturverzeichnis

- Abbe, E. (1873) *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. Springer-Verlag, .
- Abby, S.S., Rocha, E.P.C., Mead, D., Hackstadt, T., and Rey, S. (2012) The Non-Flagellar Type III Secretion System Evolved from the Bacterial Flagellum and Diversified into Host-Cell Adapted Systems. *PLoS Genet* **8**: e1002983.
- Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., and Carniel, E. (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14043–8.
- Aepfelbacher, M., Roppenser, B., Hentschke, M., and Ruckdeschel, K. (2011) Activity modulation of the bacterial Rho GAP YopE: An inspiration for the investigation of mammalian Rho GAPs. *Eur J Cell Biol* **90**: 951–954.
- Aepfelbacher, M., Trasak, C., Wiedemann, A., and Andor, A. (2003) Rho-GTP Binding Proteins in *Yersinia* Target Cell Interaction. In *The Genus Yersinia*. Kluwer Academic Publishers, Boston. pp. 65–72.
- Aepfelbacher, M., and Wolters, M. (2016) Acting on Actin: Rac and Rho Played by *Yersinia*. *Curr Top Microbiol Immunol* **399**: 201–220.
- Agrain, C., Callebaut, I., Journet, L., Sorg, I., Paroz, C., Mota, L.J., and Cornelis, G.R. (2005) Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **56**: 54–67.
- Aili, M. (2005) Role of YopE and LcrH in effector translocation, HeLa cell cytotoxicity and virulence. .
- Aili, M., Hallberg, B., Wolf-Watz, H., and Rosqvist, R. (2002) GAP activity of *Yersinia* YopE. pp. 359–370.
- Aili, M., Isaksson, E.L., Carlsson, S.E., Wolf-Watz, H., Rosqvist, R., and Francis, M.S. (2007) Regulation of *Yersinia* Yop-effector delivery by translocated YopE. *Int J Med Microbiol* **298**: 183–192.
- Aili, M., Isaksson, E.L., Hallberg, B., Wolf-Watz, H., and Rosqvist, R. (2006) Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Cell Microbiol* **8**: 1020–1033.
- Akeda, Y., and Galán, J.E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911–915.
- Akopyan, K., Edgren, T., Wang-Edgren, H., Rosqvist, R., Fahlgren, A., Wolf-Watz, H., and Fallman, M. (2011) Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 1639–1644.
- Aleksić, S., and Bockemühl, J. (1984) Proposed revision of the Wauters et al. antigenic scheme for serotyping of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* **20**: 99–102.
- Allaoui, A., Schulte, R., and Cornelis, G.R. (1995) Mutational analysis of the *Yersinia enterocolitica* virC operon: characterization of yscE, F, G, I, J, K required for Yop secretion and yscH encoding YopR. *Mol Microbiol* **18**: 343–55.
- Allaoui, A., Woestyn, S., Sluiter, C., and Cornelis, G.R. (1994) YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol* **176**: 4534–42.
- Alonso, A., Bottini, N., Bruckner, S., Rahmouni, S., Williams, S., Schoenberger, S.P., and Mustelin, T. (2003) Lck Dephosphorylation at Tyr-394 and Inhibition of T Cell Antigen Receptor Signaling by *Yersinia* Phosphatase YopH. *J Biol Chem* **279**: 4922–4928.
- Anderson, D.M., Ramamurthi, K.S., Tam, C., and Schneewind, O. (2002) YopD and LcrH regulate expression of *Yersinia enterocolitica* YopQ by a posttranscriptional mechanism and bind to yopQ RNA. *J Bacteriol* **184**: 1287–1295.
- Anderson, G.W., Leary, S.E., Williamson, E.D., Titball, R.W., Welkos, S.L., Worsham, P.L., and Friedlander, A.M. (1996) Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **64**: 4580–5.
- Andersson, K., Magnusson, K.-E., Majeed, M., Stendahl, O., and Llanan, M.F. (1999) *Yersinia pseudotuberculosis*-Induced Calcium Signaling in Neutrophils Is Blocked by the Virulence Effector YopH. *Infect*

Immun **67**: 2567–2574.

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

Armentrout, E.I., and Rietsch, A. (2016) The Type III Secretion Translocation Pore Senses Host Cell Contact. *PLoS Pathog* **12**: 1–20.

Aspenström, P., Fransson, A., and Saras, J. (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* **377**: 327–37.

Atkinson, S., and Williams, P. (2016) *Yersinia* virulence factors - a sophisticated arsenal for combating host defences. *F1000Research* **5**.

Bacon, G.A., and Burrows, T.W. (1956) The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence. *Br J Exp Pathol* **37**: 481–93.

Balligand, G., Laroche, Y., and Cornelis, G. (1985) Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect Immun* **48**: 782–6.

Barz, C., Abahji, T.N., Trülsch, K., and Heesemann, J. (2000) The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett* **482**: 139–43.

Beeckman, D.S.A., and Vanrompay, D.C.G. (2010) Bacterial secretion systems with an emphasis on the chlamydial Type III secretion system. *Curr Issues Mol Biol* **12**: 17–41.

Berger, C., Robin, G.P., Bonas, U., and Koebnik, R. (2010) Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Microbiology* **156**: 1963–1974.

Bergman, T., Håkansson, S., Forsberg, A., Norlander, L., Macellaro, A., Bäckman, A., ... Wolf-Watz, H. (1991) Analysis of the V antigen *lcrGVH-yopBD* operon of *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for a regulatory role of *LcrH* and *LcrV*. *J Bacteriol* **173**: 1607–16.

Berneking, L., Schnapp, M., Rumm, A., Trasak, C., Ruckdeschel, K., Alawi, M., ... Aepfelbacher, M. (2016) Immunosuppressive *Yersinia* Effector YopM Binds DEAD Box Helicase DDX3 to Control Ribosomal S6 Kinase in the Nucleus of Host Cells. *PLoS Pathog* **12**: e1005660.

Bertrand, J., Ruther, C., Scharnert, J., Niedermeier, M., Schmidt, A., and Pap, T. (2010) The bacterial effector protein YopM is a selfdelivering immune therapeutic agent that reduces inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **69**: A47–A47.

Beuscher, H.U., Rödel, F., Forsberg, A., and Röllinghoff, M. (1995) Bacterial evasion of host immune defense: *Yersinia enterocolitica* encodes a suppressor for tumor necrosis factor alpha expression. *Infect Immun* **63**: 1270–7.

Bibel, D.J., and Chen, T.H. (1976) Diagnosis of plaque: an analysis of the Yersin-Kitasato controversy. *Bacteriol Rev* **40**: 633–51.

Biedzka-Sarek, M., Venho, R., and Skurnik, M. (2005) Role of *YadA*, *Ail*, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect Immun* **73**: 2232–44.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–23.

Black, D.S., and Bliska, J.B. (2000) The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* **37**: 515–27.

Blaylock, B., Riordan, K.E., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2006) Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase *YscN* and its regulator, *YscL*. *J Bacteriol* **188**: 3525–34.

Bliska, J.B., Guan, K.L., Dixon, J.E., and Falkow, S. (1991) Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1187–91.

Bliska, J.B., Wang, X., Viboud, G.I., and Brodsky, I.E. (2013) Modulation of innate immune responses by *Yersinia*

- type III secretion system translocators and effectors. *Cell Microbiol* **15**: 1622–1631.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiliaux, V., Parsot, C., and Sansonetti, P. (1999) The Tripartite Type III Secretion of *Shigella flexneri* Inserts IpaB and IpaC into Host Membranes. *J Cell Biol* **147**: 683–693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., ... Allaoui, A. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* “needle complex”, a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* **39**: 652–663.
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S.-I. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3027–30.
- Blondel, C.J., Park, J.S., Hubbard, T.P., Pacheco, A.R., Kuehl, C.J., Walsh, M.J., ... Waldor, M.K. (2016) CRISPR/Cas9 Screens Reveal Requirements for Host Cell Sulfation and Fucosylation in Bacterial Type III Secretion System-Mediated Cytotoxicity. *Cell Host Microbe* **20**: 226–237.
- Boland, A., and Cornelis, G.R. (1998) Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect Immun* **66**: 1878–84.
- Boland, A., Havaux, S., and Cornelis, G.R. (1998) Heterogeneity of the *Yersinia* YopM protein. *Microb Pathog* **25**: 343–348.
- Boland, A., Sory, M.P., Iriarte, M., Kerbouch, C., Wattiau, P., and Cornelis, G.R. (1996) Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J* **15**: 5191–201.
- Bölin, I., Norlander, L., and Wolf-Watz, H. (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* **37**: 506–12.
- Bölin, I., and Wolf-Watz, H. (1988) The plasmid-encoded Yop2b protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is a virulence determinant regulated by calcium and temperature at the level of transcription. *Mol Microbiol* **2**: 237–45.
- Bonardi, S., Paris, A., Bassi, L., Salmi, F., Bacci, C., Riboldi, E., ... Brindani, F. (2010) Detection, semiquantitative enumeration, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in pork and chicken meats in Italy. *J Food Prot* **73**: 1785–92.
- Bottone, E.J. (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* **10**: 257–76.
- Bottone, E.J. (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect* **1**: 323–333.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–54.
- Brodsky, I.E., Palm, N.W., Sadanand, S., Ryndak, M.B., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., ... Medzhitov, R. (2010) A *Yersinia* effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host Microbe* **7**: 376–387.
- Bröms, J.E., Sundin, C., Francis, M.S., and Forsberg, A. (2003) Comparative analysis of type III effector translocation by *Yersinia pseudotuberculosis* expressing native LcrV or PcrV from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **188**: 239–249.
- Broz, P., Mueller, C.A., Müller, S.A., Philippsen, A., Sorg, I., Engel, A., and Cornelis, G.R. (2007) Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Mol Microbiol* **65**: 1311–1320.
- Brubaker, R.R. (1991) Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clin Microbiol Rev* **4**: 309–324.
- Burghout, P., Beckers, F., Wit, E. de, Boxtel, R. van, Cornelis, G.R., Tommassen, J., and Koster, M. (2004) Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **186**: 5366–75.
- Burkinshaw, B.J., and Strynadka, N.C.J. (2014) Assembly and structure of the T3SS. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1843**: 1648–1693.
- Büttner, D. (2012) Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 262–310.

- Cambronne, E.D., and Schneewind, O. (2002) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: yscM1 and yscM2 regulate yop gene expression by a posttranscriptional mechanism that targets the 5' untranslated region of yop mRNA. *J Bacteriol* **184**: 5880–5893.
- Cantwell, A.M., Bubeck, S.S., and Dube, P.H. (2010) YopH inhibits early pro-inflammatory cytokine responses during plague pneumonia. *BMC Immunol* **11**: 29.
- Cascales, E. (2017) Inside the Chamber of Secrets of the Type III Secretion System. *Cell* **168**: 949–951.
- Chang, J., Myeni, S.K., Lin, T.L., Wu, C.C., Staiger, C.J., and Zhou, D. (2007) SipC multimerization promotes actin nucleation and contributes to Salmonella-induced inflammation. *Mol Microbiol* **0**: 071115150710001–???
- Chaudhury, S., Azevedo Souza, C. de, Plano, G. V, and Guzman, R.N. De (2015) The LcrG Tip Chaperone Protein of the *Yersinia pestis* Type III Secretion System Is Partially Folded. *J Mol Biol* **427**: 3096–109.
- Chaudhury, S., Battaile, K.P., Lovell, S., Plano, G. V., and Guzman, R.N. De (2013) Structure of the *Yersinia pestis* tip protein LcrV refined to 1.65 Å resolution. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **69**: 477–481.
- Chauhan, N., Wrobel, A., Skurnik, M., and Leo, J.C. (2016) *Yersinia* adhesins: An arsenal for infection. *PROTEOMICS - Clin Appl* **10**: 949–963.
- Chen, L.M., Kaniga, K., and Galan, J.E. (1996) *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* **21**: 1101–1115.
- Chen, Y., and Anderson, D.M. (2011) Expression hierarchy in the *Yersinia* type III secretion system established through YopD recognition of RNA. *Mol Microbiol* **80**: 966–980.
- Cheng, L.W., Kay, O., and Schneewind, O. (2001) Regulated secretion of YopN by the type III machinery of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **183**: 5293–301.
- Cheng, L.W., and Schneewind, O. (2000) *Yersinia enterocolitica* TyeA, an intracellular regulator of the type III machinery, is required for specific targeting of YopE, YopH, YopM, and YopN into the cytosol of eukaryotic cells. *J Bacteriol* **182**: 3183–90.
- Chung, L.K., Philip, N.H., Schmidt, V.A., Koller, A., Strowig, T., Flavell, R.A., ... Bliska, J.B. (2014) IQGAP1 Is Important for Activation of Caspase-1 in Macrophages and Is Targeted by *Yersinia pestis* Type III Effector YopM. *MBio* **5**: e01402-14-e01402-14.
- Clark, M.A., Hirst, B.H., and Jepson, M.A. (1998) M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**: 1237–43.
- Cordes, F.S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E.H., Blocker, A., and Lea, S.M. (2003) Helical Structure of the Needle of the Type III Secretion System of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* **278**: 17103–17107.
- Cornelis, G. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811–825.
- Cornelis, G., Vanootegem, J.C., and Sluiter, C. (1987) Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* **2**: 367–379.
- Cornelis, G.R. (1998) The *Yersinia* deadly kiss. *J Bacteriol* **180**: 5495–504.
- Cornelis, G.R. (2002a) *Yersinia* type III secretion: Send in the effectors. *J Cell Biol* **158**: 401–408.
- Cornelis, G.R. (2002b) The *Yersinia* Ysc-Yop “type III” weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 742–752.
- Cornelis, G.R., Biot, T., Rouvroit, C.L., Michiels, T., Mulder, B., Sluiter, C., ... Vanooteghem, J.-C. (1989) The *Yersinia* yop regulon. *Mol Microbiol* **3**: 1455–1459.
- Cornelis, G.R., Boland, a, Boyd, a P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., ... Stainier, I. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1315–1352.
- Cornelis, G.R., and Gijsegem, F. Van (2000) Assembly and Function of Type III Secretory Systems. *Annu Rev Microbiol* **54**: 735–774.
- Cornelis, G.R., and Wolf-Watz, H. (1997) The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**: 861–7.

- Costa, T.R.D., Amer, A.A.A., Farag, S.I., Wolf-Watz, H., Fällman, M., Fahlgren, A., ... Francis, M.S. (2013) Type III secretion translocon assemblies that attenuate *Yersinia* virulence. *Cell Microbiol* **15**: 1088–1110.
- Costa, T.R.D., Edqvist, P.J., Bröms, J.E., Åhlund, M.K., Forsberg, Å., and Francis, M.S. (2010) *YopD* self-assembly and binding to *LcrV* facilitate type III secretion activity by *Yersinia pseudotuberculosis*. .
- Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* **13**: 343–359.
- Cover, T.L., and Aber, R.C. (1989) *Yersinia Enterocolitica*. *N Engl J Med* **321**: 16–24.
- Crago, A.M., and Koronakis, V. (1998) *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol Microbiol* **30**: 47–56.
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., and Attree, I. (2001) Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* **40**: 76–85.
- Daefler, S., and Russel, M. (1998) The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Mol Microbiol* **28**: 1367–80.
- Darveau, R.P., Charnetzky, W.T., and Hurlbert, R.E. (1980) Outer membrane protein composition of *Yersinia pestis* at different growth stages and incubation temperatures. *J Bacteriol* **143**: 942–9.
- Day, J.B., and Plano, G. V (1998) A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* **30**: 777–88.
- Deacon, A.G., Hay, A., and Duncan, J. (2003) Septicemia due to *Yersinia pseudotuberculosis*--a case report. *Clin Microbiol Infect* **9**: 1118–9.
- Deane, J.E., Roversi, P., Cordes, F.S., Johnson, S., Kenjale, R., Daniell, S., ... Lea, S.M. (2006) Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 12529–12533.
- DeBord, K.L., Anderson, D.M., Marketon, M.M., Overheim, K.A., DePaolo, R.W., Ciletti, N.A., ... Schneewind, O. (2006) Immunogenicity and protective immunity against bubonic plague and pneumonic plague by immunization of mice with the recombinant V10 antigen, a variant of *LcrV*. *Infect Immun* **74**: 4910–4.
- DeBord, K.L., Lee, V.T., and Schneewind, O. (2001) Roles of *LcrG* and *LcrV* during type III targeting of effector Yops by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **183**: 4588–98.
- Deng, W., Marshall, N.C., Rowland, J.L., McCoy, J.M., Worrall, L.J., Santos, A.S., ... Finlay, B.B. (2017) Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **15**: 323–337.
- Derewenda, U., Mateja, A., Devedjiev, Y., Routzahn, K.M., Evdokimov, A.G., Derewenda, Z.S., and Waugh, D.S. (2004) The Structure of *Yersinia pestis* V-Antigen, an Essential Virulence Factor and Mediator of Immunity against Plague. *Structure* **12**: 301–306.
- Deuretzbacher, A., Czymmeck, N., Reimer, R., Trülzsch, K., Gaus, K., Hohenberg, H., ... Ruckdeschel, K. (2009) Beta1 integrin-dependent engulfment of *Yersinia enterocolitica* by macrophages is coupled to the activation of autophagy and suppressed by type III protein secretion. *J Immunol* **183**: 5847–60.
- Dewoody, R., Merritt, P.M., Houppert, A.S., and Marketon, M.M. (2011) *YopK* regulates the *Yersinia pestis* type III secretion system from within host cells. *Mol Microbiol* **79**: 1445–1461.
- Dewoody, R., Merritt, P.M., and Marketon, M.M. (2012) *YopK* controls both rate and fidelity of Yop translocation. *Mol Microbiol* **87**: 301–317.
- Dewoody, R.S., Merritt, P.M., and Marketon, M.M. (2013) Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 4.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., and Cornelis, G.R. (2010) Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J* **29**: 1928–1940.
- Diepold, A., Kudryashev, M., Delalez, N.J., Berry, R.M., and Armitage, J.P. (2015) Composition, Formation, and Regulation of the Cytosolic C-ring, a Dynamic Component of the Type III Secretion Injectisome. *PLoS Biol* **13**: 1–21.

- Diepold, A., and Wagner, S. (2014) Assembly of the bacterial type III secretion machinery. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 802–822.
- Diepold, A., Wiesand, U., Amstutz, M., and Cornelis, G.R. (2012) Assembly of the *Yersinia* injectisome: the missing pieces. *Mol Microbiol* **85**: 878–892.
- Diepold, A., Wiesand, U., and Cornelis, G.R. (2011) The assembly of the export apparatus (YscR,S,T,U,V) of the *Yersinia* type III secretion apparatus occurs independently of other structural components and involves the formation of an YscV oligomer. *Mol Microbiol* **82**: 502–514.
- Dohlich, K., Zumsteg, A.B., Goosmann, C., Kolbe, M., and Dettling, M. (2014) A Substrate-Fusion Protein Is Trapped inside the Type III Secretion System Channel in *Shigella flexneri*. *PLoS Pathog* **10**: e1003881.
- Driks, A., and DeRosier, D.J. (1990) Additional structures associated with bacterial flagellar basal body. *J Mol Biol* **211**: 669–672.
- Dunn, K.W., Kamocka, M.M., and McDonald, J.H. (2011) A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**: C723-42.
- Edgren, T., Forsberg, Å., Rosqvist, R., Wolf-Watz, H., and Fahlgren, A. (2012) Type III Secretion in *Yersinia*: Injectisome or Not? *PLoS Pathog* **8**: e1002669.
- Edqvist, P.J., Olsson, J., Lavander, M., Sundberg, L., Forsberg, A., Wolf-Watz, H., and Lloyd, S.A. (2003) YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J Bacteriol* **185**: 2259–66.
- Emödy, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skurnik, M., Kapperud, G., O'Toole, P., and Wadström, T. (1989) Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol* **171**: 6674–9.
- Enninga, J., and Rosenshine, I. (2009) Imaging the assembly, structure and activity of type III secretion systems. *Cell Microbiol* **11**: 1462–1470.
- Erhardt, M., Namba, K., and Hughes, K.T. (2010) Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000299.
- Espina, M., Olive, A.J., Kenjale, R., Moore, D.S., Ausar, S.F., Kaminski, R.W., ... Picking, W.L. (2006) IpaD Localizes to the Tip of the Type III Secretion System Needle of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **74**: 4391–4400.
- Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V., and Attree, I. (2006) Synergistic Pore Formation by Type III Toxin Translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **45**: 8117–8123.
- Ferracci, F., Day, J.B., Ezelle, H.J., and Plano, G. V. (2004) Expression of a Functional Secreted YopN-TyeA Hybrid Protein in *Yersinia pestis* Is the Result of a +1 Translational Frameshift Event. *J Bacteriol* **186**: 5160–5166.
- Ferracci, F., Schubot, F.D., Waugh, D.S., and Plano, G. V. (2005) Selection and characterization of *Yersinia pestis* YopN mutants that constitutively block Yop secretion. *Mol Microbiol* **57**: 970–987.
- Fields, K.A., Plano, G. V., and Straley, S.C. (1994) A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the lcrB region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **176**: 569–79.
- Forsberg, Viitanen, A. -M, Skurnik, M., and Wolf-Watz, H. (1991) The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **5**: 977–986.
- Francis, M.S., Aili, M., Wiklund, M.L., and Wolf-Watz, H. (2000) A study of the YopD-LcrH interaction from *Yersinia pseudotuberculosis* reveals a role for hydrophobic residues within the amphipathic domain of YopD. *Mol Microbiol* **38**: 85–102.
- Francis, M.S., Lloyd, S.A., and Wolf-Watz, H. (2001) The type III secretion chaperone LcrH co-operates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **42**: 1075–93.
- Francis, M.S., and Wolf-Watz, H. (1998) YopD of *Yersinia pseudotuberculosis* is translocated into the cytosol of HeLa epithelial cells: Evidence of a structural domain necessary for translocation. *Mol Microbiol* **29**: 799–813.
- Frederiksen, W. (1964) A study of *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria. (*Bacterium enterocoliticum* and "Pasteurella X"). *Stand Congr Pathol Microbiol* **14**: 103–104.

- Fredriksson-Ahomaa, M. (2007) *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In *Foodborne Diseases*. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 79–113.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., and Korkeala, H. (2006) Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**: 315–329.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., Siitonen, A., and Korkeala, H. (2006) Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O : 3 originate mainly from pigs. *J Med Microbiol* **55**: 747–749.
- Fujii, T., Cheung, M., Blanco, A., Kato, T., Blocker, A.J., and Namba, K. (2012) Structure of a type III secretion needle at 7-Å resolution provides insights into its assembly and signaling mechanisms. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 4461–4466.
- Galán, J.E. (2008) Energizing type III secretion machines: what is the fuel? *Nat Struct Mol Biol* **15**: 127–128.
- Galán, J.E. (2009) Common Themes in the Design and Function of Bacterial Effectors. *Cell Host Microbe* **5**: 571–579.
- Galán, J.E., and Collmer, A. (1999) Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. *Science (80-)* **284**.
- Galán, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C., and Wagner, S. (2014) Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol* **68**: 415–38.
- Galán, J.E., and Wolf-Watz, H. (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567–573.
- Galindo, C.L., Rosenzweig, J.A., Kirtley, M.L., and Chopra, A.K. (2011) Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *J Pathog* **2011**: 182051.
- Galyov, E.E., Håkansson, S., Forsberg, Å., and Wolf-Watz, H. (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730–732.
- García, J.T., Ferracci, F., Jackson, M.W., Joseph, S.S., Pattis, I., Plano, L.R.W., ... Plano, G. V. (2006) Measurement of Effector Protein Injection by Type III and Type IV Secretion Systems by Using a 13-Residue Phosphorylatable Glycogen Synthase Kinase Tag. *Infect Immun* **74**: 5645–5657.
- Gaus, K., Hentschke, M., Czymmek, N., Novikova, L., Trülsch, K., Valentin-Weigand, P., ... Ruckdeschel, K. (2011) Destabilization of YopE by the ubiquitin-proteasome pathway fine-tunes yop delivery into host cells and facilitates systemic spread of *Yersinia enterocolitica* in host lymphoid tissue. *Infect Immun* **79**: 1166–1175.
- Gaytán, M.O., Martínez-Santos, V.I., Soto, E., and González-Pedrajo, B. (2016) Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* **6**: 129.
- Gébus, C., Caroline, G., Faudry, E., Eric, F., Bohn, Y.-S.T., Elsen, S., ... Attree, I. (2008) Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis*. *J Biol Chem* **283**: 23940–9.
- Gemski, P., Lazere, J.R., Casey, T., and Wohlhieter, J.A. (1980) Presence of a virulence-associated plasmid in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **28**: 1044–7.
- Gendrin, C., Sarrazin, S., Bonnaffé, D., Jault, J.-M., Lortat-Jacob, H., and Dessen, A. (2010) Hijacking of the Pleiotropic Cytokine Interferon- γ by the Type III Secretion System of *Yersinia pestis*. *PLoS One* **5**: e15242.
- Geyter, C. De, Wattiez, R., Sansonetti, P., Falmagne, P., Ruyschaert, J.-M., Parsot, C., and Cabiiaux, V. (2000) Characterization of the interaction of IpaB and IpaD, proteins required for entry of *S. higella flexneri* into epithelial cells, with a lipid membrane. *Eur J Biochem* **267**: 5769–5776.
- Ghosh, P. (2004) Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 771–795.
- Gold, V., and Kudryashev, M. (2016) Recent progress in structure and dynamics of dual-membrane-spanning bacterial nanomachines. *Curr Opin Struct Biol* **39**: 1–7.
- Gophna, U., Ron, E.Z., and Graur, D. (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**: 151–163.
- Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G.R., and Attree, I. (2005) Protective anti-V antibodies inhibit

- Pseudomonas and Yersinia translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis* **192**: 218–225.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Dessen, A., Attree, I., and Chabert, J. (2004) The V Antigen of Pseudomonas aeruginosa Is Required for Assembly of the Functional PopB / PopD Translocation Pore in Host Cell Membranes The V Antigen of Pseudomonas aeruginosa Is Required for Assembly of the Functional PopB / PopD Translocation Pore in H. *Society* .
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4645–9.
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., and Dangl, J.L. (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 425–49.
- Grassl, G.A., Bohn, E., Müller, Y., Bühler, O.T., and Autenrieth, I.B. (2003) Interaction of Yersinia enterocolitica with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol* **293**: 41–54.
- Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M.-P., and Cornelis, G.R. (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of Yersinia enterocolitica to phagocytosis. *Infect Immun* **70**: 4165–76.
- Groß, U. (2006) *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie : [nach neuer AO mit den Fächern: Mikrobiologie, Virologie, Hygiene sowie Infektiologie und Immunologie]* : 129 Tabellen. Thieme, .
- Groves, E., Rittinger, K., Amstutz, M., Berry, S., Holden, D.W., Cornelis, G.R., and Caron, E. (2010) Sequestering of Rac by the Yersinia Effector YopO Blocks Fc Receptor-mediated Phagocytosis. *J Biol Chem* **285**: 4087–4098.
- Grützkau, A., Hanski, C., Hahn, H., and Riecken, E.O. (1990) Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by Yersinia enterocolitica and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**: 1011–5.
- Gupta, R.S. (2000) The Natural Evolutionary Relationships among Prokaryotes. *Crit Rev Microbiol* **26**: 111–131.
- Gustafsson, M.G.L. (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. SHORT COMMUNICATION. *J Microsc* **198**: 82–87.
- Håkansson, S., Bergman, T., Vanooteghem, J.C., Cornelis, G., and Wolf-Watz, H. (1993) YopB and YopD constitute a novel class of Yersinia Yop proteins. *Infect Immun* **61**: 71–80.
- Håkansson, S., Galyov, E.E., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (1996) The Yersinia YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol* **20**: 593–603.
- Håkansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E.E., Rosqvist, R., Homblé, F., and Wolf-Watz, H. (1996) The YopB protein of Yersinia pseudotuberculosis is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J* **15**: 5812–23.
- Hamad, M.A., and Nilles, M.L. (2007) Roles of YopN, LcrG and LcrV in Controlling Yops Secretion by Yersinia pestis. In *Advances in experimental medicine and biology*. pp. 225–234.
- Hamburger, Z.A., Brown, M.S., Isberg, R.R., and Bjorkman, P.J. (1999) Crystal Structure of Invasin: A Bacterial Integrin-Binding Protein. *Science (80-)* **286**.
- Han, Y.W., and Miller, V.L. (1997) Reevaluation of the virulence phenotype of the inv yadA double mutants of Yersinia pseudotuberculosis. *Infect Immun* **65**: 327–30.
- Harrington, A.T., Hearn, P.D., Picking, W.L., Barker, J.R., Wessel, A., and Picking, W.D. (2003) Structural characterization of the N terminus of IpaC from Shigella flexneri. *Infect Immun* **71**: 1255–64.
- Hartland, E.L., Bordun, A.M., and Robins-Browne, R.M. (1996) Contribution of YopB to virulence of Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* **64**: 2308–2314.
- Hartland, E.L., Green, S.P., Phillips, W.A., and Robins, R.M. (1994) Essential role of YopD in inhibition of the respiratory burst of macrophages by Yersinia Essential Role of YopD in Inhibition of the Respiratory Burst of Macrophages by Yersinia enterocolitica. *Microbiology* **62**: 4445–4453.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 690–701.

- Heesemann, J., Algermissen, B., and Laufs, R. (1984) Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **46**: 105–10.
- Heesemann, J., Gross, U., and Grüter, L. (1987) Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 312–6.
- Heesemann, J., Gross, U., Schmidt, N., and Laufs, R. (1986) Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect Immun* **54**: 561–567.
- Heesemann, J., and Laufs, R. (1983) Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J Bacteriol* **155**: 761–767.
- Heijden, J. van der, and Finlay, B.B. (2012) Type III effector-mediated processes in *Salmonella* infection. *Future Microbiol* **7**: 685–703.
- Heintzmann, R., and Cremer, C.G. (1999) Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. In Bigio, I.J., Schneckenburger, H., Slavik, J., Svanberg, K., and Viallet, P.M. (eds). International Society for Optics and Photonics, pp. 185–196.
- Hell, S.W., and Wichmann, J. (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* **19**: 780.
- Hentschke, M., Berneking, L., Belmar Campos, C., Buck, F., Ruckdeschel, K., Aepfelbacher, M., ... Aepfelbacher, M. (2010) *Yersinia* virulence factor YopM induces sustained RSK activation by interfering with dephosphorylation. *PLoS One* **5**: e13165.
- Higuchi, K., and Smith, J.L. (1961) Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence. *J Bacteriol* **81**: 605–8.
- Hodgkinson, J.L., Horsley, A., Stabat, D., Simon, M., Johnson, S., Fonseca, P.C.A. da, ... Blocker, A.J. (2009) Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 477–85.
- Höfling, S., Grabowski, B., Norkowski, S., Schmidt, M.A., and Rüter, C. (2015) Current activities of the *Yersinia* effector protein YopM. *Int J Med Microbiol* **305**: 424–432.
- Hoiczuk, E., and Blobel, G. (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 4669–4674.
- Hoiczuk, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., and Heesemann, J. (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**: 5989–5999.
- Holmström, A., Olsson, J., Cherepanov, P., Maier, E., Nordfelth, R., Pettersson, J., ... Forsberg, A. (2001) LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* **39**: 620–32.
- Holmström, A., Rosqvist, R., Wolf-Watz, H., and Forsberg, A. (1995) YopK, a novel virulence determinant of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Contrib Microbiol Immunol* **13**: 239–43.
- Holmström, A., Rosqvist, R., Wolf-Watz, H., and Forsberg, Å. (1995) Virulence Plasmid-Encoded YopK Is Essential for *Yersinia pseudotuberculosis* To Cause Systemic Infection in Mice. *Infect Immun* **63**: 2269–2276.
- Holmström, a, Pettersson, J., Rosqvist, R., Håkansson, S., Tafazoli, F., Fällman, M., ... Forsberg, a (1997) YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol Microbiol* **24**: 73–91.
- Hoogkamp-Korstanje, J.A.A., Koning, J. de, and Samsom J. P. (1986) Incidence of Human Infection with *Yersinia enterocolitica* Serotypes O3, O8, and O9 and the Use of Indirect Immunofluorescence in Diagnosis. *J Infect Dis* **153**: 138–141.
- Houppert, A.S., Kwiatkowski, E., Glass, E.M., DeBord, K.L., Merritt, P.M., Schneewind, O., and Marketon, M.M. (2012) Identification of chromosomal genes in *Yersinia pestis* that influence type III secretion and delivery of Yops into target cells. *PLoS One* **7**: e34039.
- Hu, B., Lara-Tejero, M., Kong, Q., Galán, J.E., and Liu, J. (2017) In Situ Molecular Architecture of the *Salmonella* Type III Secretion Machine. *Cell* **168**: 1065–1074.e10.
- Hu, B., Morado, D.R., Margolin, W., Rohde, J.R., Arizmendi, O., Picking, W.L., ... Liu, J. (2015) Visualization of

- the type III secretion sorting platform of *Shigella flexneri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 1047–52.
- Hueck, C.J. (1998) Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. **62**: 379–433.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379–433.
- Hume, P.J., McGhie, E.J., Hayward, R.D., and Koronakis, V. (2003) The purified *Shigella* IpaB and *Salmonella* SipB translocators share biochemical properties and membrane topology. *Mol Microbiol* **49**: 425–39.
- Ibuki, T., Imada, K., Minamino, T., Kato, T., Miyata, T., and Namba, K. (2011) Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 277–282.
- Ibuki, T., Uchida, Y., Hironaka, Y., Namba, K., Imada, K., and Minamino, T. (2013) Interaction between FliJ and FlhA, components of the bacterial flagellar type III export apparatus. *J Bacteriol* **195**: 466–73.
- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberethner, H., and Schmidt, M.A. (2001) Characterisation of translocation pores inserted into plasma membranes by type-III secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: 669–679.
- Iriarte, M., and Cornelis, G.R. (1998) YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* **29**: 915–29.
- Iriarte, M., Sory, M.-P., Boland, A., Boyd, A.P., Mills, S.D., Lambermont, I., and Cornelis, G.R. (1998) TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J* **17**: 1907–1918.
- Isaksson, E.L., Aili, M., Fahlgren, A., Carlsson, S.E., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (2009) The membrane localization domain is required for intracellular localization and autoregulation of YopE in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **77**: 4740–9.
- Isberg, R.R., Swain, A., and Falkow, S. (1988) Analysis of expression and thermoregulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* *inv* gene with hybrid proteins. *Infect Immun* **56**: 2133–8.
- Isberg, R.R., Voorhis, D.L., and Falkow, S. (1987) Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**: 769–78.
- Jackson, M.W., and Plano, G. V (2000) Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 85–90.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005) RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247–269.
- Johnson, S., Roversi, P., Espina, M., Olive, A., Deane, J.E., Birket, S., ... Lea, S.M. (2007) Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *J Biol Chem* **282**: 4035–44.
- Jones, T.F., Buckingham, S.C., Bopp, C.A., Ribot, E., and Schaffner, W. (2003) From Pig to Pacifier: Chitterling-Associated *Yersiniosis* Outbreak among Black Infants. *Emerg Infect Dis* **9**: 1007–1009.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G.R. (2003) The Needle Length of Bacterial Injectisomes Is Determined by a Molecular Ruler. *Science (80-)* **302**.
- Juris, S.J., Rudolph, A.E., Huddler, D., Orth, K., and Dixon, J.E. (2000) A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: Actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 9431–9436.
- Kawamoto, A., Morimoto, Y. V., Miyata, T., Minamino, T., Hughes, K.T., Kato, T., and Namba, K. (2013) Common and distinct structural features of *Salmonella* injectisome and flagellar basal body. *Sci Rep* **3**: 3369.
- Kenjale, R., Wilson, J., Zenk, S.F., Saurya, S., Picking, W.L., Picking, W.D., and Blocker, A. (2005) The needle component of the type III secretion of *Shigella* regulates the activity of the secretion apparatus. *J Biol Chem* **280**: 42929–37.
- Khan, I.H., Reese, T.S., and Khan, S. (1992) The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5956–60.
- Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A.M., Skurnik, M., and Meri, S. (2008) *Yersinia enterocolitica* Serum Resistance Proteins YadA and Ail Bind the Complement Regulator C4b-Binding Protein. *PLoS Pathog* **4**: e1000140.

- Kitasato, S. (1894) THE BACILLUS OF BUBONIC PLAGUE. *Lancet* **144**: 428–430.
- Kopaskie, K.S., Ligtenberg, K.G., and Schneewind, O. (2013) Translational regulation of *Yersinia enterocolitica* mRNA encoding a type III secretion substrate. *J Biol Chem* **288**: 35478–88.
- Koster, M., Bitter, W., Cock, H. de, Allaoui, A., Cornelis, G.R., and Tommassen, J. (1997) The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* **26**: 789–797.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., ... Aizawa, S.-I. (1998) Supramolecular Structure of the Salmonella typhimurium Type III Protein Secretion System. *Science (80-)* **280**.
- Kubori, T., Yamaguchi, S., and Aizawa, S. (1997) Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of Salmonella typhimurium does not require any other flagellar proteins. *J Bacteriol* **179**: 813–7.
- Kudryashev, M., Diepold, A., Amstutz, M., Armitage, J.P., Stahlberg, H., and Cornelis, G.R. (2015) *Yersinia enterocolitica* type III secretion injectisomes form regularly spaced clusters, which incorporate new machines upon activation. *Mol Microbiol* **95**: 875–884.
- Kudryashev, M., Stenta, M., Schmelz, S., Amstutz, M., Wiesand, U., Castaño-Díez, D., ... Stahlberg, H. (2013) In situ structural analysis of the *Yersinia enterocolitica* injectisome. *Elife* **2**: e00792.
- Kueltzo, L.A., Osiecki, J., Barker, J., Picking, W.L., Ersoy, B., Picking, W.D., and Middaugh, C.R. (2003) Structure-function analysis of invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* **278**: 2792–8.
- Kuwae, A., Yoshida, S., Tamano, K., Mimuro, H., Suzuki, T., and Sasakawa, C. (2001) *Shigella* invasion of macrophage requires the insertion of IpaC into the host plasma membrane. Functional analysis of IpaC. *J Biol Chem* **276**: 32230–9.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–5.
- Lavander, M., Sundberg, L., Edqvist, P.J., Lloyd, S.A., Wolf-Watz, H., and Forsberg, Å. (2003) Characterisation of the Type III Secretion Protein YscU in *Yersinia pseudotuberculosis*. In *The Genus Yersinia*. Kluwer Academic Publishers, Boston. pp. 109–112.
- Lee, V.T., Anderson, D.M., and Schneewind, O. (1998) Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol Microbiol* **28**: 593–601.
- Lee, V.T., Tam, C., and Schneewind, O. (2000) LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J Biol Chem* **275**: 36869–75.
- Lee, W.L., Grimes, J.M., and Robinson, R.C. (2015) *Yersinia* effector YopO uses actin as bait to phosphorylate proteins that regulate actin polymerization. *Nat Struct Mol Biol* **22**: 248–255.
- Ligtenberg, K.G., Miller, N.C., Mitchell, A., Plano, G. V., and Schneewinda, O. (2013) LcrV mutants that abolish *Yersinia* type III injectisome function. *J Bacteriol* **195**: 777–787.
- Logsdon, L.K., and Meccas, J. (2003) Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. *Infect Immun* **71**: 4595–607.
- Loquet, A., Sgourakis, N.G., Gupta, R., Giller, K., Riedel, D., Goosmann, C., ... Lange, A. (2012) Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature* .
- Lučić, V., Förster, F., and Baumeister, W. (2005) STRUCTURAL STUDIES BY ELECTRON TOMOGRAPHY: From Cells to Molecules. *Annu Rev Biochem* **74**: 833–865.
- Lynch, M., Painter, J., Woodruff, R., Braden, C., and Centers for Disease Control and Prevention (2006) Surveillance for foodborne-disease outbreaks--United States, 1998-2002. *MMWR Surveill Summ* **55**: 1–42.
- Macnab, R.M. (2003) How Bacteria Assemble Flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**: 77–100.
- Macnab, R.M. (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1694**: 207–217.
- Madigan, M.T., and Martinko, J.M. (2009) *Brock - Mikrobiologie*. Pearson Studium, .

- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., and Aten, J.A. (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc* **169**: 375–382.
- Marenne, M.N., Journet, L., Mota, L.J., and Cornelis, G.R. (2003) Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: Role of LcrV, YscF and YopN. *Microb Pathog* **35**: 243–258.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D.R., Galán, J.E., and Unger, V.M. (2004) Structural Insights into the Assembly of the Type III Secretion Needle Complex. *Science (80-)* **306**: 1040–1042.
- Maruyama, T. (1987) *Yersinia enterocolitica* infection in humans and isolation of the microorganism from pigs in Japan. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 48–55.
- Matson, J.S., and Nilles, M.L. (2001) LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **183**: 5082–91.
- Matson, J.S., and Nilles, M.L. (2002) Interaction of the *Yersinia pestis* type III regulatory proteins LcrG and LcrV occurs at a hydrophobic interface. *BMC Microbiol* **2**: 16.
- Matsumoto, H., and Young, G.M. (2009) Translocated effectors of *Yersinia*. *Curr Opin Microbiol* **12**: 94–100.
- Matteï, P.-J., Faudry, E., Job, V., Izoré, T., Attree, I., and Dessen, A. (2011) Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J* **278**: 414–426.
- McGhie, E.J., Hume, P.J., Hayward, R.D., Torres, J., and Koronakis, V. (2002) Topology of the *Salmonella* invasion protein SipB in a model bilayer. *Mol Microbiol* **44**: 1309–1321.
- McNally, A., Thomson, N.R., Reuter, S., and Wren, B.W. (2016) “Add, stir and reduce”: *Yersinia* spp. as model bacteria for pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol* **14**: 177–190.
- Mejía, E., Bliska, J.B., Viboud, G.I., Bar-Sagi, D., and Tidhar, A. (2008) *Yersinia* Controls Type III Effector Delivery into Host Cells by Modulating Rho Activity. *PLoS Pathog* **4**: e3.
- Ménard, R., Sansonetti, P., Parsot, C., and Vasselon, T. (1994) Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* **79**: 515–25.
- Michiels, T., Vanooteghem, J.C., Lambert de Rouvroit, C., China, B., Gustin, A., Boudry, P., and Cornelis, G.R. (1991) Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **173**: 4994–5009.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M., and Cornelis, G. (1990) Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. *Infect Immun* **58**: 2840–9.
- Mikula, K.M., Kolodziejczyk, R., and Goldman, A. (2013) *Yersinia* infection tools—characterization of structure and function of adhesins. *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 169.
- Miller, V.L., and Falkow, S. (1988) Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **56**: 1242–8.
- Miller, V.L., Farmer, J.J., Hill, W.E., and Falkow, S. (1989) The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun* **57**: 121–31.
- Mittal, R., Peak-Chew, S.-Y., and McMahon, H.T. (2006) Acetylation of MEK2 and I B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 18574–18579.
- Miyata, S., Casey, M., Frank, D.W., Ausubel, F.M., and Drenkard, E. (2003) Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* **71**: 2404–13.
- Moffatt, B.A., and Studier, F.W. (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* **49**: 221–227.
- Mohammadi, S., and Isberg, R.R. (2009) *Yersinia pseudotuberculosis* virulence determinants invasin, YopE, and YopT modulate RhoG activity and localization. *Infect Immun* **77**: 4771–82.
- Montagner, C., Arquint, C., and Cornelis, G.R. (2011) Translocators YopB and YopD from *Yersinia enterocolitica* form a multimeric integral membrane complex in eukaryotic cell membranes. *J Bacteriol* **193**: 6923–6928.

- Mota, L.J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C., and Cornelis, G.R. (2005) Bacterial Injectisomes: Needle Length Does Matter. *Science (80-)* **307**.
- Mota, L.J., Sorg, I., and Cornelis, G.R. (2005) Type III secretion: The bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiol Lett* **252**: 1–10.
- Mueller, C.A., Broz, P., and Cornelis, G.R. (2008) The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* **68**: 1085–1095.
- Mueller, C.A., Broz, P., Muller, S.A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., ... Cornelis, G.R. (2005) The V-Antigen of Yersinia Forms a Distinct Structure at the Tip of Injectisome Needles. *Science (80-)* **310**: 674–676.
- Mühlenkamp, M., Oberhettinger, P., Leo, J.C., Linke, D., and Schütz, M.S. (2015) Yersinia adhesin A (YadA) – Beauty & beast. *Int J Med Microbiol* **305**: 252–258.
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H.L., Goldsmith, E.J., and Orth, K. (2006) Yersinia YopJ Acetylates and Inhibits Kinase Activation by Blocking Phosphorylation. *Science (80-)* **312**: 1211–1214.
- Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M.P., and Cornelis, G. (1989) Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of Yersinia enterocolitica W227. *Infect Immun* **57**: 2534–41.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263–73.
- Nakajima, R., and Brubaker, R.R. (1993) Association between virulence of Yersinia pestis and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* **61**: 23–31.
- Nans, A., Kudryashev, M., Saibil, H.R., and Hayward, R.D. (2015) Structure of a bacterial type III secretion system in contact with a host membrane in situ. *Nat Commun* **6**: 10114.
- Nans, A., Saibil, H.R., and Hayward, R.D. (2014) Pathogen-host reorganization during *C. trachomatis* invasion revealed by cryo-electron tomography. *Cell Microbiol* **16**: 1457–1472.
- Navarro, L., Alto, N.M., and Dixon, J.E. (2005) Functions of the Yersinia effector proteins in inhibiting host immune responses. *Curr Opin Microbiol* **8**: 21–27.
- Navarro, L., Koller, A., Nordfelth, R., Wolf-Watz, H., Taylor, S., and Dixon, J.E. (2007) Identification of a Molecular Target for the Yersinia Protein Kinase A. *Mol Cell* **26**: 465–477.
- Nedialkov, Y.A., Motin, V.L., and Brubaker, R.R. (1997) Resistance to lipopolysaccharide mediated by the Yersinia pestis V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10. *Infect Immun* **65**: 1196–203.
- Neyt, C., and Cornelis, G.R. (1999a) Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by Yersinia enterocolitica: Requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* **33**: 971–981.
- Neyt, C., and Cornelis, G.R. (1999b) Role of SycD, the chaperone of the Yersinia Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol* **31**: 143–156.
- Nguyen, V.S., Jobichen, C., Tan, K.W., Tan, Y.W., Chan, S.L., Ramesh, K., ... Mok, Y.K. (2015) Structure of AcrH-AopB Chaperone-Translocator Complex Reveals a Role for Membrane Hairpins in Type III Secretion System Translocon Assembly. *Structure* **23**: 2022–2031.
- Nhieu, G.T. Van, and Isberg, R.R. (1991) The Yersinia pseudotuberculosis invasin protein and human fibronectin bind to mutually exclusive sites on the alpha 5 beta 1 integrin receptor. *J Biol Chem* **266**: 24367–75.
- Nichols, C.D., and Casanova, J.E. (2010) Salmonella-Directed Recruitment of New Membrane to Invasion Foci via the Host Exocyst Complex. .
- Nilles, M.L., Fields, K.A., and Straley, S.C. (1998) The V antigen of Yersinia pestis regulates Yop vectorial targeting as well as Yop secretion through effects on YopB and LcrG. *J Bacteriol* **180**: 3410–20.
- Nilles, M.L., Williams, A.W., Skrzypek, E., and Straley, S.C. (1997) Yersinia pestis LcrV forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low-Ca²⁺ response. *J Bacteriol* **179**: 1307–16.
- Notti, R.Q., and Erec Stebbins, C. (2016) The Structure and Function of Type III Secretion Systems. *Microbiol Spectr* **4**: 1–30.

- Olive, A.J., Kenjale, R., Espina, M., Moore, D.S., Picking, W.L., and Picking, W.D. (2007) Bile salts stimulate recruitment of IpaB to the *Shigella flexneri* surface, where it colocalizes with IpaD at the tip of the type III secretion needle. *Infect Immun* **75**: 2626–9.
- Olsson, J., Wolf-watz, H., and Francis, M.S. (2004) The YopD Translocator of. *Society* **186**: 4110–4123.
- Orth, K., Palmer, L.E., Bao, Z.Q., Stewart, S., Rudolph, A.E., Bliska, J.B., and Dixon, J.E. (1999) Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* **285**: 1920–3.
- Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M.B., Bao, Z.Q., Palmer, L.E., Bliska, J.B., ... Dixon, J.E. (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* **290**: 1594–7.
- Osiecki, J.C., Barker, J., Picking, W.L., Serfis, A.B., Berring, E., Shah, S., ... Picking, W.D. (2001) IpaC from *Shigella* and SipC from *Salmonella* possess similar biochemical properties but are functionally distinct. *Mol Microbiol* **42**: 469–481.
- Palmer, L.E., Hobbie, S., Galán, J.E., and Bliska, J.B. (1998) YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* **27**: 953–65.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T.G., Prentice, M.B., ... Barrell, B.G. (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**: 523–527.
- Pawel-Rammingen, U. Von, Telepnev, M. V., Schmidt, G., Aktories, K., Wolf-Watz, H., and Rosqvist, R. (2000) GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* **36**: 737–748.
- Pepe, J.C., Badger, J.L., and Miller, V.L. (1994) Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* inv gene. *Mol Microbiol* **11**: 123–35.
- Pepe, J.C., and Miller, V.L. (1993) *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6473–7.
- Pepe, J.C., Wachtel, M.R., Wagar, E., and Miller, V.L. (1995) Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun* **63**: 4837–48.
- Perry, R.D., and Fetherston, J.D. (1997) *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**: 35–66.
- Persson, C., Nordfelth, R., Holmström, A., Håkansson, S., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (1995) Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. *Mol Microbiol* **18**: 135–50.
- Pettersson, J., Holmström, A., Hill, J., Leary, S., Frithz-Lindsten, E., Euler-Matell, A. von, ... Wolf-Watz, H. (1999) The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* **32**: 961–76.
- Pha, K., Wright, M.E., Barr, T.M., Eigenheer, R.A., and Navarro, L. (2014) Regulation of *Yersinia* protein kinase A (YpkA) kinase activity by multisite autophosphorylation and identification of an N-terminal substrate-binding domain in YpkA. *J Biol Chem* **289**: 26167–77.
- Picking, W.L., Coye, L., Osiecki, J.C., Serfis, A.B., Schaper, E., and Picking, W.D. (2001) Identification of functional regions within invasion plasmid antigen C (IpaC) of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **39**: 100–111.
- Picking, W.L., Nishioka, H., Hearn, P.D., Baxter, M.A., Harrington, A.T., Blocker, A., and Picking, W.D. (2005) IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect Immun* **73**: 1432–40.
- Pierson, D.E., and Falkow, S. (1993) The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect Immun* **61**: 1846–52.
- Plano, G. V., and Schesser, K. (2013) The *Yersinia pestis* type III secretion system: expression, assembly and role in the evasion of host defenses. *Immunol Res* **57**: 237–245.
- Plano, G. V., and Straley, S.C. (1995) Mutations in yscC, yscD, and yscG prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **177**: 3843–54.
- Portaliou, A.G., Tsoilis, K.C., Loos, M.S., Zorzini, V., and Economou, A. (2016) Type III Secretion: Building and

Operating a Remarkable Nanomachine From Essential to Specialized Bacterial Protein Secretion Systems. .

Portnoy, D.A., and Martinez, R.J. (1985) Role of a Plasmid in the Pathogenicity of *Yersinia* Species. Springer Berlin Heidelberg, pp. 29–51.

Poyraz, Ö., Schmidt, H., Seidel, K., Delissen, F., Ader, C., Tenenboim, H., ... Kolbe, M. (2010) Protein refolding is required for assembly of the type three secretion needle. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 788–792.

Prehna, G., Ivanov, M.I., Bliska, J.B., and Stebbins, C.E. (2006) *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* **126**: 869–80.

Price, S.B., Leung, K.Y., Barve, S.S., and Straley, S.C. (1989) Molecular analysis of *lcrGVH*, the V antigen operon of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **171**: 5646–53.

Price, S.B., and Straley, S.C. (1989) *lcrH*, a gene necessary for virulence of *Yersinia pestis* and for the normal response of *Y. pestis* to ATP and calcium. *Infect Immun* **57**: 1491–8.

Raab, R., and Swietnicki, W. (2008) *Yersinia pestis* YopD 150-287 fragment is partially unfolded in the native state. *Protein Expr Purif* **58**: 53–60.

Radics, J., Königsmaier, L., and Marlovits, T.C. (2014) Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 82–87.

Raymond, B., Young, J.C., Pallett, M., Endres, R.G., Clements, A., and Frankel, G. (2013) Subversion of trafficking, apoptosis, and innate immunity by type III secretion system effectors. *Trends Microbiol* **21**: 430–441.

Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H., and Ewers, H. (2012) A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat Methods* **9**: 582–584.

Roehrich, A.D., Martinez-Argudo, I., Johnson, S., Blocker, A.J., and Veenendaal, A.K.J. (2010) The extreme C terminus of *Shigella flexneri* IpaB is required for regulation of type III secretion, needle tip composition, and binding. *Infect Immun* **78**: 1682–1691.

Roggenkamp, A., Neuberger, H.R., Flügel, A., Schmolli, T., and Heesemann, J. (1995) Substitution of two histidine residues in *YadA* protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**: 1207–1219.

Romano, F.B., Rossi, K.C., Savva, C.G., Holzenburg, A., Clerico, E.M., and Heuck, A.P. (2011) Efficient isolation of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion translocators and assembly of heteromeric transmembrane pores in model membranes. *Biochemistry* **50**: 7117–7131.

Romano, F.B., Tang, Y., Rossi, K.C., Monopoli, K.R., Ross, J.L., and Heuck, A.P. (2016) Type 3 secretion translocators spontaneously assemble a hexadecameric transmembrane complex. *J Biol Chem* **291**: 6304–6315.

Roppenser, B., Röder, A., Hentschke, M., Ruckdeschel, K., and Aepfelbacher, M. (2009) *Yersinia enterocolitica* Differentially Modulates RhoG Activity in Host Cells. *J Cell Sci* **122**: 696–705.

Rosqvist, R., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1991) Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* **59**: 4562–4569.

Rosqvist, R., Forsberg, Rimpiläinen, M., Bergman, T., and Wolf-Watz, H. (1990) The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol Microbiol* **4**: 657–667.

Rosqvist, R., Håkansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1995) Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of *Yersinia*, *Salmonella* and *Shigella*. *EMBO J* **14**: 4187–95.

Rosqvist, R., Magnusson, K.E., and Wolf-Watz, H. (1994) Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* **13**: 964–72.

Rosqvist, R., Skurnik, M., and Wolf-Watz, H. (1988) Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature* **334**: 522–525.

Ross, J.A., and Plano, G. V. (2011) A C-Terminal Region of *Yersinia pestis* YscD Binds the Outer Membrane Secretin YscC. *J Bacteriol* **193**: 2276–2289.

Rouvroit, C.L., Sluiters, C., and Cornelis, G.R. (1992) Role of the transcriptional activator, *VirF*, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **6**: 395–409.

- Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Köhler, S., ... Rouot, B. (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**: 1069–79.
- Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C.A., Trülsch, K., Rouot, B., and Heesemann, J. (2001) Yersinia outer protein P of Yersinia enterocolitica simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* **166**: 1823–31.
- Ruckdeschel, K., Pfaffinger, G., Tru, K., Zenner, G., Richter, K., and Aepfelbacher, M. (2006) The Proteasome Pathway Destabilizes Yersinia Outer Protein E and Represses Its Antihost Cell Activities. *J Immunol* **1**.
- Russo, B.C., Stamm, L.M., Raaben, M., Kim, C.M., Kahoud, E., Robinson, L.R., ... Goldberg, M.B. (2016) Intermediate filaments enable pathogen docking to trigger type 3 effector translocation. *Nat Microbiol* **1**: 16025.
- Sal-Man, N., Deng, W., and Finlay, B.B. (2012) EscI: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Biochem J* **442**: 119–125.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed., Cold Springs Harbor, N. Y.
- Sani, M., Botteaux, A., Parsot, C., Sansonetti, P., Boekema, E.J., and Allaoui, A. (2007) IpaD is localized at the tip of the Shigella flexneri type III secretion apparatus. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1770**: 307–311.
- Santos, A.S., and Finlay, B.B. (2015) Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector-mediated subversion of host innate immune pathways. *Cell Microbiol* **17**: 318–332.
- Sarker, M.R., Neyt, C., Stainier, I., and Cornelis, G.R. (1998) The Yersinia Yop virulon: Lcr V is required to extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* **180**: 1207–1214.
- Sarker, M.R., Sory, M.P., Boyd, A.P., Iriarte, M., and Cornelis, G.R. (1998) LcrG is required for efficient translocation of Yersinia Yop effector proteins into eukaryotic cells. *Infect Immun* **66**: 2976–9.
- Sauvonnet, N., Pradet-Balade, B., Garcia-Sanz, J.A., and Cornelis, G.R. (2002) Regulation of mRNA Expression in Macrophages after Yersinia enterocolitica Infection. ROLE OF DIFFERENT Yop EFFECTORS. *J Biol Chem* **277**: 25133–25142.
- Sawa, T., Yahr, T.L., Ohara, M., Kurahashi, K., Gropper, M.A., Wiener-Kronish, J.P., and Frank, D.W. (1999) Active and passive immunization with the Pseudomonas V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat Med* **5**: 392–398.
- Schauen, M., Opazo, F., and Rizzoli, S. (2013) New Labeling Tools Can Help to Realize the Full Potential of Super-Resolution Microscopy - Aptamers Enable Sensitive and Accurate Labeling of Small Subcellular Structures. <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/new-labeling-tools-can-help-to-realize-the-full-potential-of-super-resolution-microscopy/>.
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010) A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **190**: 165–175.
- Schesser, K., Spiik, A.-K., Dukuzumuremyi, J.-M., Neurath, M.F., Pettersson, S., and Wolf-Watz, H. (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**: 1067–1079.
- Schiano, C.A., and Lathem, W.W. (2012) Post-transcriptional regulation of gene expression in Yersinia species. *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 129.
- Schiemann, D.A. (1989) Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. *Foodborne Bact Pathog* 601–672.
- Schleifstein, J., and Coleman, M.B. (1939) An Unidentified Microorganism Resembling B. lignieri and Past, pseudotuberculosis, and Pathogenic for Man. *N Y State J Med* **39**: 1749–53.
- Schmidt, G. (2011) Yersinia enterocolitica outer protein T (YopT). *Eur J Cell Biol* **90**: 955–958.
- Schoberle, T.J., Chung, L.K., McPhee, J.B., Bogin, B., and Bliska, J.B. (2016) Uncovering an Important Role for YopJ in the Inhibition of Caspase-1 in Activated Macrophages and Promoting Yersinia pseudotuberculosis Virulence. *Infect Immun* **84**: 1062–1072.

- Schoehn, G., Guilmi, A.M. Di, Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W., and Dessen, A. (2003) Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J* **22**: 4957–4967.
- Schraidt, O., Lefebvre, M.D., Brunner, M.J., Schmied, W.H., Schmidt, A., Radics, J., ... Marlovits, T.C. (2010) Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog* **6**: e1000824.
- Schraidt, O., and Marlovits, T.C. (2011) Three-Dimensional Model of *Salmonella*'s Needle Complex at Subnanometer Resolution. *Science (80-)* **331**.
- Schubot, F.D., Jackson, M.W., Penrose, K.J., Cherry, S., Tropea, J.E., Plano, G. V., and Waugh, D.S. (2005) Three-dimensional Structure of a Macromolecular Assembly that Regulates Type III Secretion in *Yersinia pestis*. *J Mol Biol* **346**: 1147–1161.
- Shao, F. (2008) Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Curr Opin Microbiol* **11**: 21–29.
- Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W., and Dixon, J.E. (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**: 575–88.
- Shaw, R.K., Daniell, S., Ebel, F., Frankel, G., and Knutton, S. (2001) EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell Microbiol* **3**: 213–222.
- Sheahan, K.-L., and Isberg, R.R. (2015) Identification of mammalian proteins that collaborate with type III secretion system function: involvement of a chemokine receptor in supporting translocon activity. *MBio* **6**: e02023-14.
- Sing, A., Rost, D., Tvardovskaia, N., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Kirschning, C.J., ... Heesemann, J. (2002) *Yersinia V*–Antigen Exploits Toll-like Receptor 2 and CD14 for Interleukin 10–mediated Immunosuppression. *J Exp Med* **10800**: 1017–1024.
- Skrzypek, E., Cowan, C., and Straley, S.C. (1998) Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* **30**: 1051–65.
- Skrzypek, E., and Straley, S.C. (1993) LcrG, a Secreted Protein Involved in Negative Regulation of the Low-Calcium Response in *Yersinia pestis*. *J BACrERIOLOGY* **175**: 3520–3528.
- Skurnik, M., and Toivanen, P. (1992) LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **174**: 2047–51.
- Skurnik, M., and Wolf-Watz, H. (1989) Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* **3**: 517–29.
- SOP: Immunisierung von Kaninchen (Forschungstierhaltung UKE) (2013) Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung diagnostischer Antikörper (Injektionsverfahren). 2–4.
- Sorg, I., Wagner, S., Amstutz, M., Müller, S.A., Broz, P., Lussi, Y., ... Cornelis, G.R. (2007) YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J* **26**: 3015–24.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I., and Cornelis, G.R. (1995) Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11998–2002.
- Sory, M.P., and Cornelis, G.R. (1994) Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* **14**: 583–94.
- Spreter, T., Yip, C.K., Sanowar, S., André, I., Kimbrough, T.G., Vuckovic, M., ... Strynadka, N.C.J. (2009) A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 468–76.
- Straley, S.C., and Brubaker, R.R. (1981) Cytoplasmic and membrane proteins of *yersiniae* cultivated under conditions simulating mammalian intracellular environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 1224–8.
- Straley1, S.C., and Cibull2, M.L. (1989) Differential Clearance and Host-Pathogen Interactions of YopE-and YopK-YopL-*Yersinia pestis* in BALB/c Mice. *Infect Immun* **1200**–1210.
- Sukhan, A., Kubori, T., and Galán, J.E. (2003) Synthesis and localization of the *Salmonella* SPI-1 type III secretion needle complex proteins PrgI and PrgJ. *J Bacteriol* **185**: 3480–3.

- Sun, D., Chen, J., Song, Y., Zhu, C., Pan, G., and Wan, L. (2008) Topography and functional information of plasma membrane. *Sci China Ser C Life Sci* **51**: 95–103.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**: 153–208.
- Tampakaki, A.P., Fadouloglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J., and Kokkinidis, M. (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**: 805–816.
- Tardy, F., Homblé, F., Neyt, C., Wattiez, R., Cornelis, G.R., Ruyschaert, J.M., and Cabaux, V. (1999) Yersinia enterocolitica type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J* **18**: 6793–9.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., and McInnes, R.R. (1993) E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* **21**: 1677–8.
- Tejeda-Dominguez, F., Huerta-Cantillo, J., Chavez-Dueñas, L., and Navarro-Garcia, F. (2017) A Novel Mechanism for Protein Delivery by the Type 3 Secretion System for Extracellularly Secreted Proteins. *MBio* **8**: e00184-17.
- Tengel, T., Sethson, I., and Francis, M.S. (2002) Conformational analysis by CD and NMR spectroscopy of a peptide encompassing the amphipathic domain of YopD from Yersinia. *Eur J Biochem* **269**: 3659–3668.
- Terti, R., Skurnik, M., Vartio, T., and Kuusela, P. (1992) Adhesion protein YadA of Yersinia species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun* **60**: 3021–4.
- Thomson, N.R., Howard, S., Wren, B.W., Holden, M.T.G., Crossman, L., Challis, G.L., ... Prentice, M.B. (2006) The Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of the High Pathogenicity Yersinia enterocolitica Strain 8081. *PLoS Genet* **2**: e206.
- Thorslund, S.E., Edgren, T., Pettersson, J., Nordfelth, R., Sellin, M.E., Ivanova, E., ... Fällman, M. (2011) The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with Yersinia pseudotuberculosis virulence function. *PLoS One* **6**.
- Torruellas, J., Jackson, M.W., Pennock, J.W., and Plano, G. V. (2005) The Yersinia pestis type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion. *Mol Microbiol* **57**: 1719–1733.
- Trasak, C., Zenner, G., Vogel, A., Y??ksekdag, G., Rost, R., Haase, I., ... Aepfelbacher, M. (2007) Yersinia protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process. *J Biol Chem* **282**: 2268–2277.
- Treille, G.-F., and Yersin, A. (1894) La peste bubonique à Hong Kong. 310–311.
- Troisfontaines, P., and Cornelis, G.R. (2005) Type III Secretion: More Systems Than You Think. *Physiology* **20**: 326–339.
- Trülsch, K., Heesemann, J., and Oellerich, M.F. (2007) Invasion and Dissemination of Yersinia enterocolitica in the Mouse Infection Model. In *Advances in experimental medicine and biology*. pp. 279–285.
- Trülsch, K., Sporleder, T., Igwe, E.I., Russmann, H., and Heesemann, J. (2004) Contribution of the Major Secreted Yops of Yersinia enterocolitica O : 8 to Pathogenicity in the Mouse Infection Model Contribution of the Major Secreted Yops of Yersinia enterocolitica O : 8 to Pathogenicity in the Mouse Infection Model. *Infect Immun* **72**: 5227–5234.
- Tseng, T.-T., Tyler, B.M., and Setubal, J.C. (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* **9**: S2.
- Une, T., and Brubaker, R.R. (1984) Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in yersiniae. *J Immunol* **133**: 2226–30.
- Veenendaal, A.K.J., Hodgkinson, J.L., Schwarzer, L., Stabat, D., Zenk, S.F., and Blocker, A.J. (2007) The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Mol Microbiol* **63**: 1719–1730.
- Viboud, G.I., and Bliska, J.B. (2001) A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *EMBO J* **20**: 5373–5382.
- Viboud, G.I., Mejía, E., Bliska, J.B., Mejia, E., and Bliska, J.B. (2006) Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to Yersinia pseudotuberculosis infection. *Cell Microbiol* **8**: 1504–1515.

- Visser, L.G., Annema, A., and Furth, R. van (1995) Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect Immun* **63**: 2570–5.
- Wang, H., Avican, K., Fahlgren, A., Ertmann, S.F., Nuss, A.M., Dersch, P., ... Wolf-Watz, H. (2016) Increased plasmid copy number is essential for *Yersinia T3SS* function and virulence. *Science (80-)* **353**: 492–495.
- Wang, S., Heilman, D., Liu, F., Giehl, T., Joshi, S., Huang, X., ... Lu, S. (2004) A DNA vaccine producing LcrV antigen in oligomers is effective in protecting mice from lethal mucosal challenge of plague. *Vaccine* **22**: 3348–3357.
- Wang, X., Cui, Z., Wang, H., Tang, L., Yang, J., Gu, L., ... Jing, H. (2010) Pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* isolated from domestic dogs (*Canis familiaris*) belonging to farmers are of the same subtype as pathogenic *Y. enterocolitica* strains isolated from humans and may be a source of human infection in Jiangsu Province, China. *J Clin Microbiol* **48**: 1604–10.
- Watarai, M., Tobe, T., Yoshikawa, M., and Sasakawa, C. (1995) Disulfide oxidoreductase activity of *Shigella flexneri* is required for release of Ipa proteins and invasion of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4927–31.
- Wattiau, P., Bernier, B., Deslée, P., Michiels, T., and Cornelis, G.R. (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10493–10497.
- Wauters, G., Kandolo, K., and Janssens, M. (1987) Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 14–21.
- Welkos, S., Friedlander, A., McDowell, D., Weeks, J., and Tobery, S. (1998) V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. *Microb Pathog* **24**: 185–196.
- Weng, D., Marty-Roix, R., Ganesan, S., Proulx, M.K., Vladimer, G.I., Kaiser, W.J., ... Lien, E. (2014) Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 7391–6.
- West, N.P., Sansonetti, P., Mounier, J., Exley, R.M., Parsot, C., Guadagnini, S., ... Tang, C.M. (2005) Optimization of Virulence Functions Through Glucosylation of *Shigella* LPS. *Science (80-)* **307**.
- Wilharm, G., Lehmann, V., Krauss, K., Lehnert, B., Richter, S., Ruckdeschel, K., ... Trulzsch, K. (2004) *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion Depends on the Proton Motive Force but Not on the Flagellar Motor Components MotA and MotB. *Infect Immun* **72**: 4004–4009.
- Williams, A.W., and Straley, S.C. (1998) YopD of *Yersinia pestis* Plays a Role in Negative Regulation of the Low-Calcium Response in Addition to Its Role in Translocation of Yops YopD of *Yersinia pestis* Plays a Role in Negative Regulation of the Low-Calcium Response in Addition to Its Role in Tra. **180**: 350–358.
- Wolters, M., Boyle, E.C., Lardong, K., Trülzsch, K., Steffen, A., Rottner, K., ... Aepfelbacher, M. (2013) Cytotoxic necrotizing factor-Y boosts yersinia effector translocation by activating Rac protein. *J Biol Chem* **288**: 23543–23553.
- Wood, S.E., Jin, J., and Lloyd, S.A. (2008) YscP and YscU Switch the Substrate Specificity of the *Yersinia* Type III Secretion System by Regulating Export of the Inner Rod Protein YscI. *J Bacteriol* **190**: 4252–4262.
- Wren, B.W. (2003) The *Yersiniae* — a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **1**: 55–64.
- Yao, T., Meccas, J., Healy, J.I., Falkow, S., and Chien, Y. (1999) Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J Exp Med* **190**: 1343–50.
- Yip, C.K., Kimbrough, T.G., Felise, H.B., Vuckovic, M., Thomas, N.A., Pfuetzner, R.A., ... Strynadka, N.C.J. (2005) Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**: 702–707.
- Yother, J., and Goguen, J.D. (1985) Isolation and characterization of Ca²⁺-blind mutants of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **164**: 704–11.
- Young, H.S., Dang, H., Lai, Y., DeRosier, D.J., and Khan, S. (2003) Variable symmetry in *Salmonella typhimurium* flagellar motors. *Biophys J* **84**: 571–7.
- Zaleska, M., Lounatmaa, K., Nurminen, M., Wahlström, E., and Mäkelä, P.H. (1985) A novel virulence-associated

cell surface structure composed of 47-kd protein subunits in *Yersinia enterocolitica*. *EMBO J* **4**: 1013–8.

Zhang, Y., Ting, A.T., Marcu, K.B., and Bliska, J.B. (2005) Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with *Yersinia*. *J Immunol* **174**: 7939–49.

Zhang, Z.Y. (1995) Kinetic and mechanistic characterization of a mammalian protein-tyrosine phosphatase, PTP1. *J Biol Chem* **270**: 11199–204.

Zhang, Z.Y., Clemens, J.C., Schubert, H.L., Stuckey, J.A., Fischer, M.W., Hume, D.M., ... Dixon, J.E. (1992) Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **267**: 23759–66.

Zinchuk, V., and Grossenbacher-Zinchuk, O. (2014) Quantitative Colocalization Analysis of Fluorescence Microscopy Images. *Curr Protoc Cell Biol* **62**: Unit 4.19.1-14.

Zinchuk, V., and Zinchuk, O. (2008) Quantitative Colocalization Analysis of Confocal Fluorescence Microscopy Images. In *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. p. Unit 4.19.

Zink, D.L., Feeley, J.C., Wells, J.G., Vanderzant, C., Vickery, J.C., Roof, W.D., and O'Donovan, G.A. (1980) Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*. *Nature* **283**: 224–226.

VII Tabellenverzeichnis

Tabelle V.1	Geräte	67
Tabelle V.2	Technische Details des <i>Laser scanning</i> Mikroskops	68
Tabelle V.3	Technische Details des STED Mikroskops	68
Tabelle V.4	Technische Details des <i>structured illumination</i> Mikroskop (SIM).....	69
Tabelle V.5	Verbrauchsmaterialien.....	69
Tabelle V.6	Kits	70
Tabelle V.7	Enzyme und Reagenzien.....	70
Tabelle V.8	Pufferzusammensetzung	72
Tabelle V.9	Wachstumsmedien für Bakterien	74
Tabelle V.10	Wachstumsmedien und Zusätze für Zellkulturen	74
Tabelle V.11	Antibiotikakonzentrationen zur Selektion	74
Tabelle V.12	weitere Zusätze	74
Tabelle V.13	<i>E. coli</i> -Stämme	75
Tabelle V.14	<i>Yersinia</i> -Stämme	75
Tabelle V.15	Eukaryotische Zelllinien	75
Tabelle V.16	Plasmide zur prokaryotischen Proteinexpression.....	76
Tabelle V.17	eukaryotische Plasmide.....	76
Tabelle V.18	Expressionskonstrukte.....	76
Tabelle V.19	Primersequenzen	76
Tabelle V.20	Primär-Antikörper	77
Tabelle V.21	Sekundärantikörper	77
Tabelle V.22	Software und Datenbanken	78
Tabelle V.23:	Programm für die Phusion-PCR	82
Tabelle V.24:	Programm für die GoTaq-PCR	82
Tabelle V.25:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.....	86

VIII Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des Injektisoms.....	8
Abb. 2: Modell der Translokon-Funktion.....	11
Abb. 3: Struktur des AcrH-AopB ₄₀₋₂₆₄ -Komplexes.....	14
Abb. 4: Der Nadel- <i>tip</i> -Komplex LcrV.....	15
Abb. 5: Modell der Translokatorinteraktionen.....	18
Abb. 6: Manipulation der Rho GTP-Bindeproteine durch <i>Yersinia</i> Virulenzfaktoren.....	22
Abb. 7: Das Translokationsmodell.....	26
Abb. 8: Aufreinigung von GST-gebundenem YopB ₁₋₁₆₈ und YopD ₁₅₀₋₂₈₇	30
Abb. 9: Spezifität polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen YopB, YopD und YopQ.....	31
Abb. 10: Translokator-Yops dekorieren die Oberfläche der Bakterien unter Sekretionsbedingungen (+EGTA).....	33
Abb. 11: Intrazelluläre Translokatoren weisen cytosolische Verteilung auf, deren Intensität unter Sekretionsbedingungen zunimmt.....	35
Abb. 12: YopD ist ein negativer Regulator der YopB Expression und Sekretion.....	36
Abb. 13: STED-Mikroskopie bestätigt homogene Oberflächen-Lokalisation von YopB unter Sekretionsbedingungen.....	38
Abb. 14: Bestimmung der YopB- und YopD-Oberflächen-Expression während der Zellinfektion.....	39
Abb. 15: YopB und YopD regulieren sich gegenseitig.....	41
Abb. 16: Einzel-Effektor-Mutante Δ YopE und pYLCR-Stamm zeigen erhöhte Mengen Translokator-exprimierender Bakterien während der Zellinfektion.....	42
Abb. 17: Rac1-Aktivierung erhöht die Zahl YopB-gefärbter, zellassoziierter Bakterien.....	44
Abb. 18: Ein YopB-Fluoreszenzcluster in konfokaler Mikroskopie lässt sich in drei YopB-Cluster mit STED-Mikroskopie auflösen.....	46
Abb. 19: YopB und YopD kolokalisieren in STED-aufgelösten Fluoreszenzpunkten.....	47
Abb. 20: Kolokalisation von YopB und LcrV in STED-aufgelösten Punkten.....	49
Abb. 21: Lokalisation von YopB und YscD in einem Abstand von 100 nm.....	50
Abb. 22: Protein- und DNS-Leitern.....	71

IX Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	EtOH	Ethanol
µg	Mikrogramm	Ex	Extinktion
µl	Mikroliter	FA	Formaldehyd
µM	Mikromolar	F-Aktin	Filamentöses Aktin
ÄM	Äußere Membran	FKS	Fetales Kälberserum
Abb.	Abbildung	g	Gramm
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)	<i>g</i>	Relative Zentrifugalkraft
APS	Ammoniumperoxodisulfat	GAP	GTPase-aktivierendes Protein
AS	Aminosäure	GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	GEF	<i>guanine nucleotide exchange faktor</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	GFP	Grünfluoreszierendes Protein
Ca ²⁺	Calcium	GST	Glutathion-S-Transferase
CH	Schweiz	h	Stunde(n)
CUI	<i>The Hamburg Center for Ultrafast Imaging</i>	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
cm	Zentimeter	IF	Immunfluoreszenz
D	Deutschland	Ig	Immunglobulin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	IM	Innere Membran
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser	IMM	Immortalisierte Mausmakrophagen
d.h.	das heißt	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
DIC	<i>differential interference contrast</i>	kb	Kilobasenpaare
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>	kDa	Kilodalton
DMSO	Dimethylsulfoxid	l	Liter
DNS	Desoxyribonukleinsäure	LB	<i>Lysogeny broth</i>
dNTP	Desoxynucleosid	M	Molar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	mA	Milliampere
EDTA	<i>Ethylendiamin Tetraacetic acid</i>	MCS	<i>Multiple cloning site</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure	MDa	Megadalton
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>	MeOH	Methanol
Em	Emission	MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
EM-CCD	<i>Electron multiplier charge coupled device</i>	mg	Milligramm
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>	min	Minute
ET	Elektronentomographie	ml	Milliliter
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)	mM	Millimolar
		MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
		mRNA	<i>Messenger RNA</i>
		n.d.	nicht definiert

ng	Nanogramm	T3SS	Typ III Sekretionssystem
nm	Nanometer	TAE	Tris-Acetat-EDTA
OD	Optische Dichte	TCA	Trichloressigsäure
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TEMED	N,N'-N'-Tetramethylethylendiamin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	TfB	<i>Transformation Buffer</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
PCR	Polymerase Kettenreaktion	TX-100	Triton X-100
PFA	Paraformaldehyd	ÜNK	Übernachtkultur
rpm	<i>rounds per minute</i>	U	Unit
PVDF	Polyvinylidendifluorid	UK	United Kingdom
pYV	<i>Plasmid of Yersinia virulence</i>	UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
RNA	Ribnonukleinsäure	USA	United States of America
RT	Raumtemperatur	V	Volt
s	Sekunde	VTH	Versuchstierhaltung
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)	v/v	<i>Volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
SDS	Natriumdodecylsulfat	w/v	<i>Weight per volume</i> (Masse pro Volumen)
SIM	<i>structured illumination microscopy</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
sp.	Spezies	Yops	<i>Yersinia outer proteins</i>
spp.	Spezies (Plural)	Y.	<i>Yersinia</i>
STED	<i>stimulated emission depletion</i>	<i>pseudotuberculosis</i>	<i>pseudotuberculosis</i>
T3	Typ III	s	
		<i>Y. pestis</i>	<i>Yersinia pestis</i>
		Ysc	<i>Yersinia secretion</i>

X Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Beteiligten bedanken, die mich stets unterstützt und motiviert haben und ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Im Besonderen bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Aepfelbacher, für die Bereitstellung des Themas, für die Betreuung, Unterstützung und Hilfestellung zu jeder Zeit und für das große Interesse am Fortschritt dieses Projekts. Danke für dein Vertrauen in mich.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Streit danke ich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation.

Prof. Dr. Julia Kehr danke ich für die Bereitschaft, den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

PD Dr. Markus Perbandt möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit, für die Hilfe bei allen Fragen zu Proteinen und deren Aufreinigung, die aufmunternden Worte und nicht zuletzt auch für alles Organisatorische im Rahmen von CUI danken.

Mein besonderer Dank gilt den „Translozierern“ Dr. Manuel Wolters und Theresa Nauth. Danke für eure fachliche und moralische Unterstützung, für die angeregten Diskussionen und die geduldige Beantwortung meiner zahlreichen Fragen. Ich fühlte mich stets wohl in unserem kleinen Team und danke euch für die schöne Zeit!

Ein riesiges Dankeschön gilt dem gesamten Institut für Medizinische Mikrobiologie, allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern. Danke für das herzliche Willkommen zu Beginn meiner Arbeit, für die freundschaftliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft, für die gern willkommene Abwechslung während der Mittagspause oder nach der Arbeit, einfach für alles, was das Laborleben angenehm macht. Besonders bedanken möchte ich mich bei der AG Aepfelbacher: bei unserem Sonnenschein Theresa für die immerwährende gute Laune, bei Marie für ihr stets offenes Ohr bei allen wissenschaftlichen und privaten Problemen, bei meiner CUI-Zimmerpartnerin Aileen für unser „geteiltes Leid“ und ihre ganz besondere Sicht auf die Dinge, bei den „TripAdvisern“ Indra und Maren für die vielen Anregungen und Ideen vor unserer Australienreise, bei Laura, mit der ich mich auf ganz besondere Weise verbunden fühle, bei Claudia für ihr technisches Know-how und dafür, dass sie auch „dreiviertel fünf“ versteht und bei unserem Maskottchen Manuel für die fachkundige Beratung bei allen medizinischen Fragen und für die männliche Unterstützung im Labor. Unseren Ehemaligen Liane, Kiki und Andi danke ich für die tolle gemeinsame Zeit und für die entgegengebrachte Freundschaft. Ihr habt mich herzlich in eurer Mitte aufgenommen und dafür danke ich euch sehr.

Ich danke Manuel, Aileen, Theresa und Marie für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die hilfreichen Verbesserungsvorschläge.

Für die tolle Unterstützung im Umgang mit den Mikroskopen und bei der Auswertung mikroskopischer Aufnahmen danke ich dem Team der Umif, Antonio Virgilio Failla und Bernd Zobiak.

Danken möchte ich der CUI Graduiertenschule für die finanzielle Unterstützung sowie ihren Mitgliedern für den regen Austausch und spannende Diskussionen bei den alljährlichen Winterschulen oder Jahrestreffen.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für die tatkräftige Unterstützung und den rückhaltlosen Zuspruch, die das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglichten. Vor allem danke ich meiner Mutti, die immer an mich geglaubt hat und jetzt hoffentlich sehr stolz ist, wo immer sie auch sein mag.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Freunden für die motivierenden Worte und die gelegentlich notwendige Ablenkung. Martin, Josi, Arcel, Martini, Phil, ihr seid die Besten und nun habt ihr mich wieder.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Christopher. Danke für deine Liebe und deine grenzenlose Geduld, deine aufopferungsvolle Unterstützung und dein unerschütterliches Verständnis. Danke für deine tröstenden und aufbauenden Worte und den manchmal nötigen Anpiff. Dies ist auch ein bisschen deine Arbeit.

.

XI Vorveröffentlichungen

Vorträge mit Teilen des Inhalts dieser Arbeit:

Huschka, F; Aepfelbacher, M. (Dezember 2014) Visualization of the translocation pore of *Yersinia enterocolitica*, CUI Winterschool, Weissenhäuser Strand, Deutschland

Huschka, F; Aepfelbacher, M. (Mai 2016) Regulation and high resolution visualization of *Yersinia* translocator proteins YopB and YopD during cell infection, 5th National Yersinia Meeting, Münster, Deutschland

Poster mit Teilen des Inhalts dieser Arbeit:

- 1) Krawack, F; Perbandt, M; Aepfelbacher, M. (März 2013) Investigation of the translocation pore in *Y. enterocolitica*, CUI Annual Meeting, Hamburg, Deutschland
- 2) Krawack, F; Nuguid, T; Perbandt, M; Betzel, C; Aepfelbacher, M. (Dezember 2013) Visualization of the *Yersinia* translocation pore in artificial & cellular membranes, CUI Winterschool, Obergurgl, Österreich
- 3) Krawack, F; Nuguid, T; Rumm, A; Perbandt, M; Betzel, C; Perbandt, M; Aepfelbacher, M. (März 2014) Structural investigation of *Yersinia* virulon components, CUI Annual Meeting, Hamburg, Deutschland
- 4) Krawack, F; Nuguid, T; Rumm, A; Perbandt, M; Betzel, C; Perbandt, M; Aepfelbacher, M. (November 2014) Structural investigation of *Yersinia* virulon components, CUI Symposium, Hamburg, Deutschland
- 5) Huschka, F; Wolters, M; Nauth, T; Perbandt, M; Wurm, C; Aepfelbacher, M. (April 2016) Regulation and high resolution visualization of *Yersinia* translocator proteins YopB and YopD during cell infection, Type III Secretion Systems 2016, Tübingen, Deutschland
- 6) Huschka, F; Nauth, T; Wolters, M; Aepfelbacher, M. (September 2016) Regulation and imaging of *Yersinia* translocator Yop release and effector Yop translocation during cell infection, 68. Jahrestag der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM), Ulm, Deutschland
- 7) Huschka, F; Wolters, M; Nauth, T; Perbandt, M; Wurm, C; Aepfelbacher, M. (Oktober 2016) Regulation and high resolution visualization of *Yersinia* translocator proteins YopB and YopD during cell infection, CUI Annual Meeting, Hohwacht, Deutschland

XII Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, Juni 2017

Franziska Huschka