

# Visualisierung des *Yersinia* Typ-III-Sekretionssystems während der Zellinfektion und der Einfluss von Wirtszellfaktoren auf das Translokon

Dissertation zur Erlangung der Würde des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Theresa Nauth

Hamburg, 2018

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2014 bis Dezember 2018 unter Anleitung von Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erstellt.

Tag der Disputation: 22.03.2019

Dissertationsgutachter:

Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Streit

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung und Abstract.....</b>	<b>6</b>
1.1	Zusammenfassung.....	6
1.2	Abstract .....	7
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
2.1	Pathogene Yersinien.....	8
2.2	Charakteristika enteropathogener Yersinien.....	9
2.2.1	Klassifizierung.....	9
2.2.2	Das klinische Bild der Yersiniose .....	10
2.2.3	Pathogenese.....	11
2.3	Pathogen-Wirtszell-Interaktion.....	11
2.4	Phagozytose und die Ausbildung Yersinia-spezifischer Zellkompartimente.....	13
2.5	Virulenzstrategien pathogener Yersinien.....	16
2.5.1	Adhäsion und Invasion .....	17
2.5.2	Das Typ-III-Sekretionssystem .....	18
2.6	Komponenten des Injektisoms.....	20
2.6.1	Der Basalkörper.....	22
2.6.2	Die Injektisomnadel.....	23
2.6.3	Die Translokatoren .....	24
2.6.4	Die Translokationspore .....	26
2.6.5	Regulation der Translokation .....	28
2.6.6	Die Effektoren .....	29
<b>3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>Für das Verständnis der Ergebnisse relevante Vorarbeiten der Arbeitsgruppe .....</b>	<b>35</b>
4.1	Die Translokatoren YopB und YopD lokalisieren unter Sekretionsbedingungen auf der Bakterienoberfläche.....	35
4.2	YopB, YopD und LcrV kolokalisieren bei der Wirtszellinfektion.....	37
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>

5.1	YopB und YopD kolokalisieren nur partiell auf Bakterien unter Sekretionsbedingungen	39
5.2	LcrV wird für die Assemblierung des Translokons bei der Wirtszellinfektion benötigt...	42
5.3	Visualisierung von YopB und YopD bei der Infektion von primären humanen Makrophagen .....	43
5.4	Bakterielle und zelluläre Faktoren beeinflussen die Ausbildung des Translokons und die Translokation bei der Zellinfektion .....	45
5.4.1	Die YopE-Deletionsmutante WA-314 $\Delta$ yopE hat keinen Einfluss auf die Ausbildung des Translokons in Makrophagen .....	49
5.4.2	STED-Mikroskopie zeigt unterschiedliche Anzahl von Translokons pro Bakterium.	50
5.4.3	Translokons zeigen gruppierte Anordnung während der Wirtszellinfektion.....	52
5.5	Visualisierung des assemblierten Typ-III-Sekretionssystems bei der Wirtszellinfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	56
5.6	Immungold-Elektronenmikroskopie zeigt assembliertes Typ-III-Sekretionssystem im subzellulären Kontext.....	58
5.7	Charakterisierung und Dynamik des zur Ausbildung des Translokons nötigen Wirtszellkompartiments.....	64
5.7.1	Dynamik der bakteriellen Aufnahme in primäre humane Makrophagen.....	69
5.7.2	Lokalisation der Translokon-bildenden Yersinien in humanen Makrophagen .....	71
5.7.3	Die Prävakuole zeigt eine Anreicherung in Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat .	72
5.7.4	3D-STED-Aufnahmen zeigen die Insertion von YopB in die Prävakuole .....	74
5.7.5	Rac1 moduliert die Internalisierung von Yersinien .....	75
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
6.1	Das Translokon wird in der Prävakuole ausgebildet .....	80
6.2	Wirtszellfaktoren beeinflussen die Ausbildung der Translokationspore .....	83
6.2.1	Der Wirtszelltyp bestimmt den Anteil der Translokon-bildenden Yersinien .....	83
6.2.2	Rac1 moduliert die Internalisierung der Yersinien in die Prävakuole .....	85
6.3	STED-Mikroskopie gibt neuen Einblick in die Translokon-Bildung während der Wirtszellinfektion .....	87
6.4	Das Translokon steht in direkter Verbindung mit der Injektionsnadel.....	90
6.5	LcrV assistiert in der Ausbildung des Tranlokons.....	91
6.6	Die Translokatoren YopB und YopD zeigen kein strukturiertes Muster unter Sekretionsbedingungen.....	92

---

7	Material und Methoden .....	95
7.1	Materialien .....	95
7.1.1	Geräte.....	95
7.1.2	Mikroskope.....	96
7.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	97
7.1.4	Puffer und Reagenzien .....	99
7.1.5	Plasmide .....	100
7.1.6	Antikörper .....	101
7.1.7	Wachstumsmedien und Zusätze .....	103
7.1.8	Yersinienstämme und eukaryotische Zellen .....	104
7.1.9	Elektronische Datenverarbeitung .....	105
7.2	Methoden.....	106
7.2.1	Mikrobiologische Methoden .....	106
7.2.2	Zellkulturtechniken .....	107
7.2.3	Mikroskopische Methoden .....	110
7.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	110
7.2.5	Mikroskopie und hochauflösende Mikroskopie.....	114
7.2.6	<i>Structured Illumination</i> -Mikroskopie (SIM).....	115
7.2.7	Immungold-Elektronenmikroskopie .....	117
8	Literaturverzeichnis .....	119
9	Abbildungsverzeichnis .....	161
10	Tabellenverzeichnis .....	163
11	Abkürzungsverzeichnis.....	164
12	Veröffentlichungen .....	168
12.1	Publikationen .....	168
12.2	Vorträge .....	168
12.3	Poster .....	168
13	Danksagung.....	169
	Eidesstattliche Erklärung .....	171

# 1 Zusammenfassung und Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

Pathogene Yersinien verfügen über das in bakteriellen Krankheitserregern weit verbreitete und hoch konservierte Typ-III-Sekretionssystem (T3SS oder Injektisom). Diese bakterielle Nanomaschine setzt sich aus den Komponenten Basalkörper, Nadel und Translokation/Porenkomplex (aufgebaut aus den Translokatoren YopB und YopD) zusammen und dient dem direkten Transport bakterieller Effektorproteine in die Wirtszelle. Bei Zellkontakt inseriert das Translokation in die Wirtszellmembran und bildet damit eine für die Effektor-Translokation essentielle Struktur. Dennoch sind viele Aspekte zur Translokationsspore nicht ausreichend verstanden; so ist bislang unklar, ob das Translokation in direkter Verbindung mit der Injektisomnadel steht. Auch die Wirtszellfaktoren, welche die Ausbildung der Pore beeinflussen, sind noch nicht eingehend untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte das Translokation in *Yersinia enterocolitica* während der Wirtszellinfektion mithilfe hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie (SIM, STED) und Immungold-Elektronenmikroskopie visualisiert werden. Hierbei konnten Translokationssporen in Verbindung mit Nadel und Basalkörper innerhalb der gleichen Injektisome dargestellt werden, was auf einen einstufigen Prozess der Effektortranslokation hinweist. Die Translokatoren konnten inseriert in die Wirtszellmembran visualisiert werden und zeigten eine gruppierte räumliche Verteilung in Verbindung mit den infizierenden Bakterien. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Bildung der Translokationssporen in einem spezifischen Plasmamembran-assoziierten Wirtszellkompartiment initiiert wird, das die Bakterien von großen extrazellulären Proteinen wie Antikörpern abschirmt, aber zugänglich für kleinere Moleküle bleibt. Dieses als Prävakuoole bezeichnete Kompartiment zeigte eine starke Anreicherung des Phosphoinositids PI(4,5)P<sub>2</sub>. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die aktive Rho-GTPase Rac1 als zellulärer Faktor die Bildung der Prävakuoole und damit verbunden die Ausbildung von Translokation stimulieren kann. Bei Infektionsversuchen wurde deutlich, dass auch der Wirtszelltyp einen großen Einfluss auf die Ausbildung des Translokation hat. So zeigte sich, dass bei Infektion von primären humanen Makrophagen deutlich mehr Bakterien bereits zu früheren Zeitpunkten Translokation ausbilden als bei Infektion von HeLa-Zellen. Darüber hinaus zeigte die STED-Mikroskopie eine erhöhte Anzahl von Translokation pro Bakterium bei der Infektion von Makrophagen.

Zusammenfassend konnten im Rahmen in dieser Arbeit Translokation als Teil vollständig assemblierter Injektisome in einem intrazellulären Kompartiment humaner Makrophagen visualisiert werden. Diese Ergebnisse geben neue Einblicke in die Ausbildung der Translokationsspore und ihre Regulation durch Wirtszellfaktoren.

## 1.2 Abstract

Pathogenic *Yersinia* spp. employ a type III secretion system (T3SS or injectisome) to inject effector proteins into host cells. This bacterial nanomachine consists of basal body, needle and translocon/pore complex (consisting of the translocators YopB and YopD) and is highly conserved in numerous bacterial pathogens. The formation of the translocon, which is triggered by bacteria-host cell contact, and its integration into host cell membranes is a highly critical step for effector protein translocation. Yet, it remains unclear whether and how the translocon is physically connected to the injectisome needle. Also, the host cell factors affecting the formation of the translocon are poorly understood. In this work, the translocon of *Yersinia enterocolitica* could be visualized during host cell infection by using super-resolution fluorescence microscopy (SIM, STED) and immunogold electron microscopy. Super resolution microscopy showed the translocators in conjunction with the needle and the basal body within the same injectisome, suggesting a one-step process for effector translocation from the bacterial- directly into the host cell cytoplasm. It was demonstrated that the formation of the translocon is initiated in a specific plasma membrane-associated host cell compartment, which shields the bacteria from large extracellular molecules like antibodies but remains accessible to low-molecular substances. This compartment, called prevacuole, was characterized by a strong accumulation of the phosphoinositide PI(4,5)P<sub>2</sub>. Moreover, it was demonstrated that cellular factors such as the active Rho-GTPase Rac1 can stimulate the formation of the prevacuole and thereby increase the proportion of cell-associated bacteria forming translocons. Furthermore, infection experiments revealed that also the host cell type has a huge impact on the formation of translocons. Primary human macrophages could trigger the formation of translocons much more effectively than HeLa cells leading to a higher proportion of translocon forming bacteria already at earlier timepoints during infection. In addition, STED microscopy revealed higher numbers of translocons per individual bacterium during infection of macrophages.

In summary, in this study translocons were visualized as part of fully assembled injectisomes in *Y. enterocolitica* residing in a unique host cell compartment under physiological conditions. With these results novel insights into translocon formation and its regulation by host cell factors could be provided.

## 2 Einleitung

### 2.1 Pathogene Yersinien

Die Gattung *Yersinia*, benannt nach dem Schweizer Bakteriologen Alexandre Yersin, gehört zur Familie der Yersiniaceae (Adeolu et al. 2016). Im Jahr 1894 gelang es neben A. Yersin dem japanischen Bakteriologen Shibasaburo Kitasato erstmals den Erreger der Beulen- und Lungenpest aus menschlichen Geweben zu isolieren (Treille und Yersin; Kitasato 1894; Bibel und Chen 1976). Zum heutigen Stand der Forschung umfasst die Gattung 18 Spezies, wovon drei eine Pathogenität gegenüber Mensch und Tier zeigen (McNally et al. 2016). Neben dem Erreger der Beulen- und Lungenpest *Yersinia pestis* sind die enteropathogenen Spezies *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* von medizinischer Bedeutung. Nach *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. sind Yersinien die dritthäufigste Ursache bakterieller Gastroenteritis in Deutschland und Europa (Rosner et al. 2010; van Pelt et al. 2003; McNally et al. 2016). *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* sind durch ein ubiquitäres Vorkommen in Boden, Wasser und Tieren gekennzeichnet und werden vorwiegend durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel übertragen. Die enteropathogenen Yersinien lösen eine oft selbst-limitierende Infektion aus, die sich auf den Gastrointestinaltrakt und das intestinale Lymphsystem beschränkt (Carniel 2002). *Y. pestis* hingegen wird über Aerosole oder durch den Biss des Rattenfloh von Nagetieren auf den Menschen übertragen und verursacht systemische Infektionen, die unbehandelt zum Tod führen können (Brubaker 2003). Genomsequenzierungen zeigten, dass *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* trotz der unterschiedlichen Pathogenese und Infektionswege phylogenetisch näher verwandt sind als die beiden enteropathogenen Spezies. Vor etwa 200 Millionen Jahren trennten sich zunächst *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, der Pesterreger *Y. pestis* entwickelte sich vor 1.500 – 20.000 Jahren aus *Y. pseudotuberculosis* (Achtman et al. 1999). Dabei spielten besonders Gengewinne, Genverluste und Rearrangements des Genoms eine wichtige Rolle (Wren 2003; Achtman et al. 1999).

Unabhängig von Infektionsweg und Pathogenese haben alle drei pathogenen Yersinien gemeinsam, dass sie bevorzugt lymphatisches Gewebe besiedeln, extrazellulär in Mikroabszessen replizieren und die unspezifische Immunantwort abwenden können (Cornelis 1997). Die Virulenz der Yersinien wird durch mehrere chromosomale und Plasmid-assoziierte Faktoren vermittelt. Das Virulenzplasmid pYV (Plasmid *Yersinia Virulence*) ist in allen drei pathogenen Yersinien vorhanden und kodiert u.a. für das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS, siehe 2.5.2) und bakterielle Effektorproteine (2.6.6). Die Effektoren werden über die Sekretionsmaschinerie in die Wirtszellen transloziert, inhibieren die Phagozytose der Bakterien und unterdrücken die Immunantwort des

Wirts (Viboud und Bliska 2005; Pha und Navarro 2016). *Y. pestis* hat zwei weitere Virulenzplasmide erworben, die das Überdauern im Vektor, die Übertragung und die schnelle Besiedlung des Wirts ermöglichen. Der Plasminogenaktivator Pla wird durch das 9,5 kDa große pPst/pPCP1-Plasmid kodiert und dient vermutlich der Verbreitung der Yersinien nach subkutaner Infektion durch den Flohbiss. Das zweite Plasmid, pFra/pMT1 genannt (100 - 110 kDa), kodiert für das F1-Kapselprotein und Phospholipase D (Maustoxin Ymt), welche beide wichtig sind für das Überdauern und Kolonisieren des Flohs (Hu et al. 1998; Brubaker 1991).

## 2.2 Charakteristika enteropathogener Yersinien

### 2.2.1 Klassifizierung

Yersinien sind Gram-negative Stäbchen, die eine fakultativ-anaerobe Lebensweise mit einem optimalen Wachstum bei 24 - 27°C aufzeigen. Ursache vieler Infektionen ist durch die Fähigkeit der Yersinien begründet innerhalb eines großen Temperaturspektrums (4 - 40°C) zu wachsen. So replizieren die psychrotrophen Yersinien bei 4°C und überdauern auch in gefrorenem Essen (Yehualaeshet et al. 2013; Bursová et al. 2017; Fredriksson-Ahomaa et al. 2007; Sabina et al. 2011). Die Erreger sind Katalase-positiv, Oxidase-negativ, fermentieren Glukose und können anhand der Bunten Reihe, serologisch oder mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie differenziert werden. Im Gegensatz zum Pesterreger *Y. pestis* zeigen die enteropathogenen Yersinien eine peritriche Begeißelung bei 22 - 30°C (Kapatral und Minnich 1995; Bleves et al. 2002; Freund et al. 2008; Dhar und Virdi 2014).

Die Spezies *Y. enterocolitica* ist sehr heterogen und lässt sich anhand biochemischer Charakteristika in sechs Biovare (1A, 1B, 2-5) und anhand von Oberflächenantigenen in mehr als 50 Serotypen unterteilen (Wauters et al. 1987; Aleksić und Bockemühl 1984; Sabina et al. 2011). Gegenstand der Forschung sind hauptsächlich die medizinisch relevanten, in Nordamerika verbreiteten Biovare 1B mit den Serotypen O:4, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21, sowie die in Europa vertretenen Biovare 2 und 4 mit den Serotypen O:3, O:5 und O:9. Die Serotypen können anhand der spezifischen O-Antigene auf der Bakterienoberfläche charakterisiert werden (Aleksić und Bockemühl 1984). Die bakterienspezifischen Polysaccharidketten sind in der Infektion essentiell für die Interaktion mit Proteinen und Phospholipiden und dienen als Schutz vor dem Immunsystem des Wirts. Die Serotypen O:3, O:8 und O:9 wurden am häufigsten in klinischen Isolaten gefunden (Fredriksson-Ahomaa et al. 2007; Galindo et al. 2011). Stämme des Biovars 1A besitzen kein Virulenzplasmid und werden als apathogen angesehen (Bottone 1999).

Der in dieser Studie verwendete Stamm *Y. enterocolitica* WA-314 (Tabelle 7-14) wird dem Biovar 1B mit dem Serotyp O:8 zugeordnet (Heesemann et al. 1983; Heesemann und Laufs 1983). Yersinien des Biovars 1B zeigten in zahlreichen Studien die höchste Pathogenität, gefolgt von Yersinien der Biovars 2-5 mit mäßiger Pathogenität gegenüber dem Menschen (Wren 2003). *Y. enterocolitica* des Biotyps 1B/O:8 zeigte in der Infektion des Ileums eine besonders starke Bindung an den Mucus und Besiedlung der Peyer Plaques (Mantle und Husar 1993; Grützkau et al. 1990). Zudem besitzen Yersinien dieses Biotyps das Yersiniabactin, ein Siderophor welches auf dem Virulenzplasmid durch die zusätzliche *High-Pathogenecity Island* (HPI) codiert wird. Dieses Eisen-Aufnahmesystem erlaubt auch unter Eisen-restriktiven Bedingungen das *Yersinia*-Wachstum und ist dadurch ein wichtiger Pathogenitätsfaktor (Sabina et al. 2011).

### 2.2.2 Das klinische Bild der Yersiniose

Yersiniose durch *Y. enterocolitica* ist eine der wichtigsten durch Nahrungsmittel übertragene zoonotische Erkrankung in Europa (EFSA 2016). Die Vertreter der Gattung *Yersinia* sind durch ein ubiquitäres Vorkommen gekennzeichnet. Die häufigsten Infektionsquellen sind kontaminierte Lebensmittel wie rohe oder halbgare Schweinefleischprodukte, unpasteurisierte Milch und verunreinigtes Wasser (Shayegani et al. 1981; Carniel et al. 2006). Eine direkte Übertragung durch Bluttransfusionen und eine damit verbundene Sepsis ist äußerst selten, jedoch fatal (Tipple et al. 1990). Die infektiöse Dosis ist bisher nicht bekannt, wird jedoch auf  $10^4$  bis  $10^6$  geschätzt (Food and Drug Administration (FDA) 2012). Infektionen treten für gewöhnlich ganzjährig mit Ausbrüchen vorwiegend im Herbst und im Winter auf. Kinder sind öfter von Infektionen betroffen als Erwachsene (Food and Drug Administration (FDA) 2012).

Die enteropathogenen Yersinien verursachen eine Enterokolitis mit Bauchschmerzen, Diarrhöe und mäßigem Fieber, die vorwiegend selbstlimitierend ist (Bottone 1997; Drummond et al. 2012). Die Diarrhöe wird durch das Enterotoxin Yst ausgelöst (Pai und Mors 1978; Takao et al. 1984). In seltenen Fällen kann es zu post-infektiösen, immunpathologischen Komplikationen wie eine angeschlossene, reaktive Arthritis oder ein Erythema nodosum kommen (Fredriksson-Ahomaa et al. 2006; Koornhof et al. 1999). Typisch für eine Yersinien-Infektion bei Jugendlichen ist eine Pseudoappendizits, die sich als mesenteriale Lymphadenitis mit Bauchschmerzen äußert (Lee et al. 1990; Gupta et al.). In histologischen Untersuchungen des Follikel-assoziierten Epithels (FAE) wurde festgestellt, dass sich Geschwüre und Nekrosen ausbilden. Die mesenterialen Lymphknoten vergrößerten sich und zeigten ebenfalls Nekrosen und vermehrt Leukozyten (Viboud und Bliska 2005). *Y. pseudotuberculosis* zeigt in der Infektion Tuberkulose-ähnliche Symptome mit mesenterialer Adenitis und Entzündungen des terminalen Ileums und Caecums (Viboud und Bliska 2005).

### 2.2.3 Pathogenese

Die Infektion mit *Y. enterocolitica* erfolgt vorwiegend peroral. Zu Beginn der Infektion vermittelt die Expression von Urease Schutz vor dem sauren Milieu des Magens (Bhagat und Virdi 2009; Koning-Ward et al. 1995; Autenrieth und Firsching 1996; Agrain et al. 2005; Gu et al. 2012; Dhar und Virdi 2014). Die entscheidende Pathogen-Wirtszell-Interaktion findet im Follikel-assoziierten Epithel des Ileums statt (Autenrieth und Firsching 1996). Yersinien müssen hier zunächst den gastrointestinalen Mukus passieren und nutzen dann das Oberflächenprotein Invasin zur Aufnahme in die M (*microfold*)-Zellen. Invasin aktiviert Integrine auf der apikalen Seite der M-Zellen und sorgt durch Umstrukturierung des Zytoskelettes für die Internalisierung der Yersinien (Wong und Isberg 2005). Nach ihrer Freisetzung aus den M-Zellen besiedeln Yersinien die Peyer Plaques und treten erstmals in Kontakt mit Zellen des Immunsystems wie Makrophagen oder Neutrophilen (Jepson und Clark 1998). In vivo Mausstudien zeigten, dass *Y. enterocolitica* das FAE und die Peyer Plaques fünf bis sieben Tage nach Infektion zerstört (Autenrieth und Firsching 1996). Durch Ausbildung des Typ-III-Sekretionssystem (2.5.2) und die Translokation von anti-phagozytischen Effektorproteinen (2.6.6) sind Yersinien in der Lage extrazellulär im lymphatischen Gewebe zu replizieren und Mikrokolonien zu bilden (Cornelis et al. 1998; Viboud und Bliska 2005; Aepfelbacher et al. 2007). Ausgehend von den Peyer Plaques verbreiten sich die Yersinien in die mesenterialen Lymphknoten und bilden Abszesse, um schließlich weitere innere Organe wie Leber und Milz zu besiedeln (Pepe und Miller 1993; Pepe et al. 1995; Cornelis und Wolf-Watz 1997).

### 2.3 Pathogen-Wirtszell-Interaktion

Das angeborene Immunsystem ist die erste Barriere, die pathogene Erreger während einer Infektion überwinden müssen. Nach Passage mechanischer und physiologischer Barrieren wie Haut und Magen, treffen Erreger auf Zellen der angeborenen Immunantwort, die in Blutgefäßen und Geweben zirkulieren. Die zellulären und humoralen Bestandteile der angeborenen Immunantwort sind Makrophagen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und das Komplementsystem (Akira et al. 2006; Pha und Navarro 2016). Pathogene haben verschiedene Strategien entwickelt diese Barrieren zu umgehen oder zu manipulieren. Die Erkennung von körperfremden Partikeln erfolgt durch die Erkennung sogenannter Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren von Immunzellen. Diese Gruppe von Rezeptoren, die *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRR), erkennen für Mikroorganismen typische Charakteristika wie Lipopolysaccharide, Peptidoglykan oder Lipoteichonsäuren (Akira et al. 2006; Medzhitov 2007). Die wichtigsten und bestuntersuchte Klasse der Erkennungsrezeptoren bilden die *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) (Medzhitov

2007; Akira et al. 2006). Um genau diesen PRRs zu entkommen und sich im Wirt zu disseminieren, vermindern bakterielle Erreger ihre immunogenen Oberflächenproteine. So verändert *Yersinia* bei 37°C die Lipopolysaccharide. Das hypoacylierte LipidA wird als schwacher Agonist vom Erkennungsrezeptor TLR-4 nicht mehr erkannt und die Bakterien entziehen sich den Rezeptoren der angeborenen Immunantwort (Montminy et al. 2006; Bengoechea et al. 2004; Rebeil et al. 2004). Gleichermaßen verhindert der Verlust der Flagelle bei 37°C die Erkennung durch TLR-5 (Kapatral und Minnich 1995). Bei Besiedlung des lymphatischen Gewebes bilden Yersinien die Oberflächenmoleküle YadA und Ail aus, die Komplementfaktoren wie das C4b-Bindeprotein oder Faktor H binden und neutralisieren (Kirjavainen et al. 2008; Biedzka-Sarek et al. 2008; Biedzka-Sarek et al. 2005; Bliska und Falkow 1992).

Makrophagen stehen meist in Erstkontakt mit Erregern und haben vielseitige Aufgaben in Form von Detektion, Phagozytose, Abtötung und Anschalten der adaptiven Immunantwort (Galli et al. 2011). Bei der Infektion mit enteropathogenen Yersinien treffen diese in den Peyer Plaques erstmals auf phagozytische Zellen. *Yersinia* ist durch eine extrazelluläre Lebensweise gekennzeichnet, welche durch die Translokation von anti-phagozytischen Effektoren über das T3SS vermittelt wird. Im Tierversuch konnten nach 12-stündiger Infektion Aggregate von extrazellulären Bakterien (in Schnitten des Lymphgewebes) gefunden werden. Innerhalb von Abszessen sind die Yersinien resistent gegenüber der Phagozytose durch Neutrophile (Lian et al. 1987; Hanski et al. 1989) und induzieren Apoptose in Makrophagen (Monack et al. 1997). Die anti-phagozytische Wirkung sowie Modulation der Immunantwort durch die Yops (kurz für *Yersinia outer proteins*) ist bereits gut erforscht. Unter bestimmten Bedingungen werden *Y. enterocolitica* allerdings trotz Expression der Yops phagozytiert (Grosdent et al. 2002). Unklar bleibt, ob *Y. enterocolitica* nach Aufnahme in Makrophagen replizieren kann und das T3SS in intrazellulären Kompartimenten ausbildet. Für die enteropathogenen *Y. enterocolitica* sind bisher wenige Mechanismen bekannt, die das Überleben in den Makrophagen fördern könnten. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Expression von regulatorischen Faktoren wie OmpR und GsrA die Anpassung an Stressbedingungen wie Osmolarität oder Hitzeschock möglich ist (Yamamoto et al. 1996; Brzostek et al. 2003). Die Fähigkeit enteropathogener Yersinien in vitro in Makrophagen zu replizieren wird weiterhin kontrovers diskutiert. Einerseits zeigten verschiedene Studien, dass *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* nicht fähig sind in Neutrophilen oder Makrophagen zu überleben (Cornelis et al. 1998). Die Autoren folgerten daraus, dass die Yersinien vermutlich direkt nach Passage des Darmepithels in die extrazelluläre Wachstumsphase übergehen (Lian et al. 1987; Hanski et al. 1989). Andererseits wurde für *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* mehrfach ein intrazelluläres Kompartiment zur Replikation beschrieben. In verschiedenen Studien mit murinen Makrophagen konnte auch für *Y. enterocolitica* eine intrazelluläre Replikation beobachtet werden (Une 1977; Tabrizi und Robins-

Browne 1992; Yamamoto et al. 1996; Brzostek et al. 2003; Pujol und Bliska 2003). Bei der Infektion von Kaninchen konnten nach 3 bis 6 Stunden Infektionsdauer in Gewebeschnitten von Peyer Plaques intakte Bakterien in Monozyten beobachtet werden (Une 1977). Bei intraperitonealen Infektionen von Mäusen mit voraktivierten, bei 37°C kultivierten oder mit bei 28°C kultivierten Yersinien konnte gezeigt werden, dass die voraktivierten Yersinien resistenter gegenüber der Phagozytose durch Makrophagen waren. Dennoch konnte eine signifikante Anzahl von intrazellulären Bakterien beobachtet werden (Hanski et al. 1991; Charnetzky und Shuford 1985; Cavanaugh und Randall 1959). Innerhalb der ersten Stunden der Infektion blieb die Anzahl der intakten Yersinien konstant und nahm dann stetig ab. Daraus folgerten die Autoren, dass die intrazellulären Yersinien über die Zeit abgetötet werden (Hanski et al. 1991; Charnetzky und Shuford 1985). Pujol und Bliska konnten in der Infektion mit Yersinien zeigen, dass diese in dichten Aggregaten in der Zelle sitzen, die sich nur schwierig auflösen lassen und damit möglicherweise die Bakterienzählung beeinträchtigen (Pujol und Bliska 2003). Als weiteren Grund für die mit der Zeit abnehmende intrazelluläre Bakterienzahl sehen sie, dass Makrophagen abwandern könnten oder Neutrophile zuströmen und die Yersinien abtöten (Pujol und Bliska 2003). Um tiefere Gewebe wie Leber und Milz zu besiedeln, können *Y. enterocolitica* vermutlich in Immunzellen überdauern, wie für CD18-positive Zellen gezeigt werden konnte (Autenrieth et al. 1996).

## 2.4 Phagozytose und die Ausbildung Yersinia-spezifischer Zellkompartimente

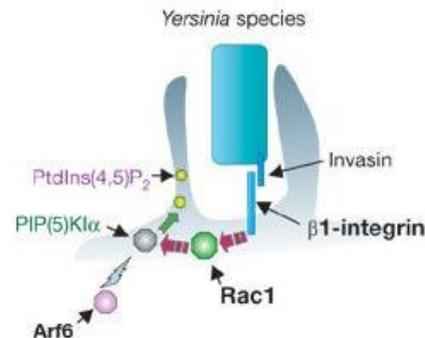
Die Phagozytose ist ein komplexer, Rezeptor-vermittelter Prozess zur kontrollierten Aufnahme von Fremdstoffen (Flannagan et al. 2012). Die Aktin-abhängige Aufnahme von infektiösen wie auch nicht-infektiösen Partikeln (> 0,5 µm) erfolgt vorwiegend durch sogenannte professionelle Phagozyten (z.B. Makrophagen) durch die Umstrukturierung des Zytoskeletts und der Plasmamembran (Flannagan et al. 2012; Greenberg et al. 1991).

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) ist ein wichtiger Faktor in der Phagozytose und damit Angriffspunkt zahlreicher Pathogene, um die Internalisierung zu ihrem Vorteil zu manipulieren (Pizarro-Cerdá et al. 2015). PI(4,5)P<sub>2</sub> stellt eins von sieben verschiedenen sogenannten Phosphoinositiden dar, die je eine eigene Funktion und Lokalisation in der Membran aufzeigen (Di Paolo und Camilli 2006). Sie dienen als Signalmoleküle oder Vorläufer von sekundären Botenstoffen und entstehen durch die reversible Phosphorylierung des Ausgangsmoleküls Phosphatidylinositol (an Position 3, 4 und 5 des Inositolrings) (Di Paolo und Camilli 2006). Phosphatidylinositol (ein Phosphoglycerid) wird im endoplasmatischen Retikulum gebildet und an die Plasmamembran transportiert. Hier unterstützt es einerseits als Phospholipid die Membranstruktur (~15% aller zellulären Phospholipide), andererseits dient es als Ausgangsmolekül

für PI(4,5)P<sub>2</sub> (Di Paolo und Camilli 2006). PI(4,5)P<sub>2</sub> bildet sich vorwiegend aus Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI(4)P) durch Typ I-Phosphatidylinositolphosphat-Kinasen oder seltener aus Phosphatidylinositol-5-Phosphat (PI(5)P) durch Typ II-Phosphatidylinositolphosphat-Kinasen (Yin und Janmey 2003; Rameh et al. 1997; Roth 2004; Di Paolo und Camilli 2006). Das Phosphoinositid PI(4,5)P<sub>2</sub> ist durch seine Lokalisation an der Plasmamembran in nahezu alle Prozesse involviert, die die Zelloberfläche oder die Transduktion extrazellulärer Signale betreffen. Es kann einerseits als Substrat für die Phospholipase C (PLC) oder Phospholipase A2 (PLA2) dienen, um sekundäre Botenstoffe zu bilden, oder um andere Proteine zu rekrutieren, die spezifisch Phosphatidylinositole erkennen. Bei Dephosphorylierung von PI(4,5)P<sub>2</sub> durch Phosphoinositid-5-Phosphatasen kann die Signalkaskade durch die lokale Änderung des PI(4,5)P<sub>2</sub>-Levels unterbunden werden (Di Paolo und Camilli 2006). Zur vollständigen Phagozytose sind biphasische Veränderungen von PI(4,5)P<sub>2</sub> nötig und erst das Verschwinden von PI(4,5)P<sub>2</sub> und gleichzeitige Depolymerisieren von Aktin am phagosomalen *Cup* führt zur Abschnürung der Vakuole (Sarantis und Grinstein 2012; Clarke 2003). PI(4,5)P<sub>2</sub> kann mithilfe seiner Kopfgruppe Pleckstrin-Homologie-Domänen oder Lysin- oder Argininreiche hydrophobe Motive erkennen und damit verschiedenen Aktin-Bindeproteine regulieren (Lemmon 2003). Die PLC hydrolysiert PI(4,5)P<sub>2</sub> und Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinasen) katalysieren die Phosphorylierung von PI(4,5)P<sub>2</sub> zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) und tragen gemeinsam zur Schließung des Phagosoms bei (Botelho et al. 2000; Clarke 2003).

*Yersinia* nutzt die Invasin-vermittelte Phagozytose (Zipper-Mechanismus) nicht nur für die Aufnahme in M-Zellen, sondern auch zur Invasion von phagozytischen Immunzellen (Pepe et al. 1995; Cornelis und Wolf-Watz 1997; Fällman et al. 1995). Durch die Bindung von Invasin an  $\beta$ 1-Integrine wird die Integrin-Cluster-Bildung induziert und die nachgeschaltete Signalkaskade wird aktiviert (Isberg und Leong 1990) (Abbildung 2-1). Die Umorganisation des Aktinzytoskeletts zur Phagozytose wird durch die Aktivität verschiedener Rho-GTPasen reguliert, so werden Tyrosinkinase wie FAK und Src, zusammen mit der PI3-Kinase und Rac zum C-Terminus der  $\beta$ 1-Untereinheit rekrutiert (Alrutz et al. 2001; Alrutz und Isberg 1998; Schulte et al. 1998). Um die vollständige Internalisierung zu bewerkstelligen sind u.a. Rho-GTPasen, NPFs (*nucleation promoting factors*) wie WAVE und WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteine) und der Aktinnukleator-Komplex Arp2/3 nötig. Die Rho-GTPase Rac1 wird zu den *Yersinia* Eintrittsstellen rekrutiert und induziert dort die Aktinpolymerisierung über Aktivierung des Arp2/3-Komplexes und damit die Internalisierung durch die Zipper-Phagozytose (Alrutz et al. 2001) (Abbildung 2-1). In Makrophagen hingegen spielen neben Rac1 die Rho-GTPasen Cdc42 und Rho eine wichtige Rolle in der Invasin-vermittelten Phagozytose von *Y. enterocolitica* (Wiedemann et al. 2001). Clathrin wurde als ein weiterer wichtiger Faktor für Internalisierung in der Zipper-Phagozytose beschrieben

(Veiga et al. 2007). Arf6 ist ebenfalls an der Internalisierung beteiligt, indem es zusammen mit Rac1 die Phosphoinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PIP5-Kinase) aktiviert, sodass lokal an den Eintrittsstellen der Yersinien mehr PI(4,5)P<sub>2</sub> gebildet wird (Wong und Isberg 2003) (Abbildung 2-1).



**Abbildung 2-1 Internalisierung von *Yersinia*.** Bei Zellkontakt interagiert *Yersinia* über das Oberflächenprotein Invasin mit β-Integrinen der Zielzelle, was zur Rekrutierung von Rac1 zu den Eintrittsstellen führt. Durch die Arf6-abhängige Aktivierung der PIP5-Kinasen (hier als PIP(5)KIα bezeichnet) kommt es zu einer lokalen Anreicherung von PI(4,5)P<sub>2</sub> (hier als PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> bezeichnet). Originalabbildung aus Pizarro-Cerdá und Cossart 2004

Eine Besonderheit bei der Internalisierung der Yersinien ist die in verschiedenen Studien beobachtete beständige Anreicherung von PI(4,5)P<sub>2</sub> (Sarantis et al. 2012; Wong und Isberg 2003; Bahnan et al. 2015). Das Phosphoinositid PI(4,5)P<sub>2</sub> persistiert an den *Yersinia*-Vakuolen und bildet ein Kompartiment (die Prävakuole), das zu diesem Zeitpunkt noch Zugang zum extrazellulären Bereich hat (Wong und Isberg 2003). Sarantis und Kollegen zeigten, dass die Internalisierung von avirulenten Yersinien in Epithelzellen ein mehrstufiger Prozess mit kontinuierlichen PI(4,5)P<sub>2</sub>-Strukturen an der Plasmamembran ist (Sarantis et al. 2012). *Y. pseudotuberculosis* manipuliert die β1-Integrin-vermittelte Internalisierung, indem es die Hydrolyse von PI(4,5)P<sub>2</sub> und damit die Abschnürung und vollständige Schließung des Phagosoms verzögert (Sarantis und Grinstein 2012; Wong und Isberg 2003). Zur vollständigen Invasion der Yersinien ist die PI3-Kinase-abhängige Fusion von Rab5-Vesikeln mit dem bakteriellen Kompartiment nötig. Wie die Rekrutierung von Rab5-Vesikeln zur Prävakuole erfolgt ist bislang unklar. Die dadurch rekrutierten Lipid-Phosphatasen ORCL und Inpp5b sind in der Lage PI(4,5)P<sub>2</sub> zu hydrolysieren, was schließlich zur vollständigen Abschnürung der Vakuole von der Plasmamembran führt (Sarantis et al. 2012).

Bahnan und Kollegen beschrieben kürzlich ebenfalls die Ausbildung eines *Yersinia*-spezifischen Kompartiments, das zugänglich ist für kleine Moleküle wie pHrodo, Gentamicin oder pH-neutralisierende Reagenzien (Bahnan et al. 2015). Die anti-phagozytischen, wildtypischen Yersinien persistieren auf der Zelloberfläche von Makrophagen in einem sauren Kompartiment, das sogenannte *Yersinia acidic compartment* (YAC). Das YAC zeigt keine Anreicherung oder Interaktion

mit Faktoren des endosomalen oder lysosomalen Abbaus wie EEA1 und LAMP1. Versuche mit Translokations-inkompetenten *Yersinia*-Stämmen verdeutlichten die Rolle der Yersinien (mit funktionalem Virulenzplasmid) in der Ausbildung des sauren Kompartiments. Translokatormutanten können das YAC auf der Makrophagenoberfläche nicht aufrechterhalten (Bahnan et al. 2015). Die Autoren folgern aus ihren Ergebnissen, dass die Ansäuerung möglicherweise die Integration der Poren in die Wirtszellmembran begünstigt, ähnlich zu AB-Toxinen wie verschiedene in vitro Versuche zur Poreinsertion indizierten (Bahnan et al. 2015; Romano et al. 2016). Möglicherweise ist auch hier ein mehrstufiger Prozess zu beobachten. Tsukano und Kollegen zeigten, dass *Y. pseudotuberculosis* die Ansäuerung im Phagolysosom in murinen Makrophagen verhindert. Die Yersinien befinden sich in einem leicht sauren Kompartiment (pH 6), indem sie die Aktivität der V-ATPase-Pumpe um das 10-fache vermindern (Tsukano et al. 1999). Der genaue Mechanismus in der Ausbildung und Aufrechterhaltung der *Yersinia*-spezifischen Zellkompartimente sowie die Rolle des T3SS der internalisierten Yersinien bleiben weiterhin Gegenstand der Forschung.

## 2.5 Virulenzstrategien pathogener Yersinien

*Y. enterocolitica* hat eine Vielzahl von Virulenzfaktoren erworben, die das Überleben und die Replikation im Wirt ermöglichen. In den verschiedenen Phasen der Infektion wird die Virulenz durch chromosomale und Plasmid-basierte Virulenzfaktoren vermittelt.

Das etwa 70 kb große Virulenzplasmid pYV ist essentiell für die Pathogenität der Yersinien und die Plasmid-kodierten Virulenzfaktoren vermitteln die ausgeprägte Suppression der Immunantwort (Viboud und Bliska 2005; Bölin et al. 1982; Brubaker 1991). Die Expression des Virulenzplasmids, und damit des T3SS (*ysc*, *yersinia secretion* und *yop*, *yersinia outer protein*) und des Zelladhäsins YadA, sind strikt reguliert und werden Temperatur- und Calcium-abhängig exprimiert (Horne und Prüss 2006). Die Plasmid-kodierten Gene unterliegen dem globalen Regulator VirF, welcher bei 37°C exprimiert und durch den chromosomal-kodierten Faktor YmoA negativ reguliert wird (Rouvroit et al. 1992; Cornelis et al. 1991; Bancercz-Kisiel et al. 2018). Virulenzmarker auf der Oberfläche der Yersinien wie Invasin werden durch das Chaperon Hfq moduliert, welches die Transkription von *rovA* beeinflusst, RovA wiederum induziert die *invA*-Expression (Kakoschke et al. 2016; Bancercz-Kisiel et al. 2018). Dies verdeutlicht die strikt regulierte Expression der Virulenzfaktoren. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass *Yersinia* die Anzahl der Virulenzplasmide unter Infektionsbedingungen erhöht (Wang et al. 2016).

In Infektionsexperimenten in Mäusen konnte gezeigt werden, dass nicht nur Plasmid-kodierte Faktoren wichtig sind für die Virulenz der enteropathogenen Yersinien, auch Plasmid-freie Yersinien

können an Zellen adhären und in diese eindringen (Heesemann und Laufs 1983; Heesemann et al. 1984). Ohne funktionelles Typ-III-Sekretionssystem werden Yersinien jedoch nach wenigen Tagen aus dem Wirt eliminiert (Pujol und Bliska 2005; Viboud und Bliska 2005). Die Persistenz im Körper und die Besiedlung der Peyer Plaques, mesenterialen Lymphknoten und inneren Organe, sowie die Ausbildung nekrotischer Abszesse sind essentiell in der Aufrechterhaltung der Infektion (Hein et al. 2000).

### 2.5.1 Adhäsion und Invasion

Adhäsine sind bakterielle Oberflächenmoleküle, die es Bakterien ermöglichen an Oberflächenstrukturen der Wirtszellen anzuheften. Ohne die Adhäsine Invasin, Ail und YadA sind Yersinien nicht mehr in der Lage die Peyer Plaques zu besiedeln (Pepe et al. 1995; Marra und Isberg 1997; Heise und Dersch 2006). Sie binden an Kollagen, Fibronectin, Laminin und  $\beta_1$ -Integrine und sind damit essentiell für die Invasion der epithelialen Wirtszellen (Isberg et al. 1987; Clark et al. 1998; Mikula et al. 2012; Forman et al. 2007; Miller et al. 2001; Miller et al. 1990). Die Expression der Adhäsine und Invasine erfolgt temperaturabhängig und im Fall von YadA in Abhängigkeit des pYV-Plasmids. In *Y. pestis* sind die Adhäsine Invasin und YadA durch Insertionen und Mutationen inaktiv und tragen nicht zur Virulenz bei (Parkhill et al. 2001; Song et al. 2004; Chain et al. 2006).

Die Ausbildung des Adhäsins Invasin auf der Bakterienoberfläche erfolgt in der frühen Phase der Infektion in Abhängigkeit von Serotyp und Wachstumsphase (Uliczka et al. 2011). Mit einer maximalen Expression bei 26°C ist Invasin essentiell für die Aufnahme in die M-Zellen des Darmepithels und die nachfolgende Besiedlung der Peyer Plaques (Schmid et al. 2004; Grassl et al. 2003). Die InvA-Expression kann auch bei 37°C induziert werden, jedoch nur unter sauren Bedingungen (Pepe et al. 1995). Die direkte Interaktion mit  $\beta_1$ -Integrinen ( $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ) führt durch die Umstrukturierung des Zytoskeletts zur Internalisierung der Yersinien (Biała et al. 2012). Invasin zeigt eine 100-fach höhere Bindungsaffinität zu Integrinen als der natürliche Ligand Fibronectin, sodass die stabile Bindung der Yersinien an die Zielzellen ihre Phagozytose nach dem Zipper-Mechanismus fördert (van Nhieu und Isberg 1991; Hamburger et al. 1999; Isberg und Barnes 2001). Die Bindung von Invasin aktiviert eine Vielzahl von zellulären Signalkaskaden wie Tyrosinkinasen (Rosenshine et al. 1992), PI3-Kinasen (Meccas et al. 1998) und MAP-Kinasen (Fincham et al. 2000). Zudem wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst was u.a. zur Ausschüttung von Interleukin-8 (IL-8) und zur Rekrutierung von Phagozyten führt (Grassl et al. 2003; Thinwa et al. 2014).

Das bakterielle Oberflächenprotein Ail (*attachment invasion locus*) wird bei 37°C gebildet und dient neben Invasin zur Bindung an Zellen und zur Invasion (Miller und Falkow 1988). Das nur 17 kDa

große Protein ist erst bei Verlust der O-Gruppen-Zuckerketten bei 37°C frei zugänglich (Biedzka-Sarek et al. 2005; Dhar und Viridi 2014). Ail wurde für alle drei pathogenen Spezies als wichtiger Faktor in der Serum-Resistenz beschrieben (Miller et al. 1989; Pierson und Falkow 1993) und bildet Schutz vor dem Komplementsystem des Wirts (Biedzka-Sarek et al. 2005; Kirjavainen et al. 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass Ail unter anderem das intrazelluläre Überleben ermöglicht (Bliska und Falkow 1992).

Das Adhäsın YadA bildet bei 37°C eine fibrilläre Matrix auf der Bakterienoberfläche (Mühlenkamp et al. 2015). Es gehört zu den trimeren Autotransporter-Adhäsinen (TAA) und bildet eine Struktur auf der Bakterienoberfläche aus, die eine Bindung an epitheliale Zellen und Mikrovilli vermittelt (Mühlenkamp et al. 2015). Dabei bindet YadA indirekt über Proteine der extrazellulären Matrix an Integrine der Wirtszellen (Deuschle et al. 2016). Die Bindung an Kollagen I, II, IV und Laminin löst vermutlich die reaktive Arthritis aus (Galindo et al. 2011). YadA unterstützt die Bildung von Mikrokolonien wie Freund und Kollegen in 3D-Kollagen-Gelen zeigten (Freund et al. 2008). YadA vermittelt neben Ail ebenfalls Serumresistenz (Pilz et al. 1992; Kirjavainen et al. 2008) und induziert die Produktion von Cytokinen wie IL-8 über die MAP-Kinase-Signalkaskade (Leo et al. 2010; El Tahir und Skurnik 2001; Miętko et al. 2016; Mühlenkamp et al. 2017).

### 2.5.2 Das Typ-III-Sekretionssystem

Das Typ-III-Sekretionssystem, auch Injektisom genannt, ist eine bakterielle Nanomaschine zum Transport von Effektorproteinen über die Membranen der Gram-negativen Bakterien und der eukaryotischen Zielzellen hinweg.

Rosqvist und Kollegen definierten die molekulare Transportmaschine erstmals im Jahr 1994 in *Yersinia* spp. (Rosqvist et al. 1994). Heute sind sieben verschiedene Sekretionssysteme in Bakterien bekannt (Tseng et al. 2009; Costa et al. 2015; Green und Mecsas 2016). Das Typ-III-Sekretionssystem gehört zu den bestuntersuchtsten bakteriellen Protein-Sekretionssystemen und zeigt eine weite Verbreitung unter pathogenen Bakterien. Hier sind drei Varianten zu unterscheiden: Das Ysc-Injektisom kommt in *Yersinia* spp., *Pseudomonas* spp. und *Aeromonas* spp. vor (Troisfontaines und Cornelis 2005; Cornelis 2006). *Chlamydia* spp., *Salmonella* SPI-1 und *Shigella* spp. nutzen das Inv-Mxi-Spa-Injektisom (Cornelis und van Gijsegem 2000; Mota et al. 2005b). Die dritte Familie umfasst enteropathogene und enterohämorrhagische *E. coli* und das *Salmonella* SPI-2 mit Ssa-Esc-Injektisomen (Diepold und Armitage 2015). Oft besitzen Pathogene mehr als eine Injektisomform mit unterschiedlichen Funktionen innerhalb der Infektionsstrategie. *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* Biovar 1B besitzen zusätzlich ein chromosomal-kodiertes Typ-III-Sekretionssystem, das Ysa-T3SS, mit bisher

ungeklärter Rolle in der Pathogenese (Young und Young 2002; Foulter et al. 2003). Studien zeigten, dass es dem für die Replikation im Wirt wichtigen SPI-2 aus *Salmonella* gleicht. Diese Rolle scheint es bei *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* aber nicht einzunehmen (Pujol und Bliska 2005). Ferner bilden auch Pflanzenpathogene wie *Erwinia* spp., *Pseudomonas syringae* spp. oder *Xanthomonas* spp. ein Injektisom aus, ebenso der Pflanzensymbiont Rhizobium (Büttner 2012).

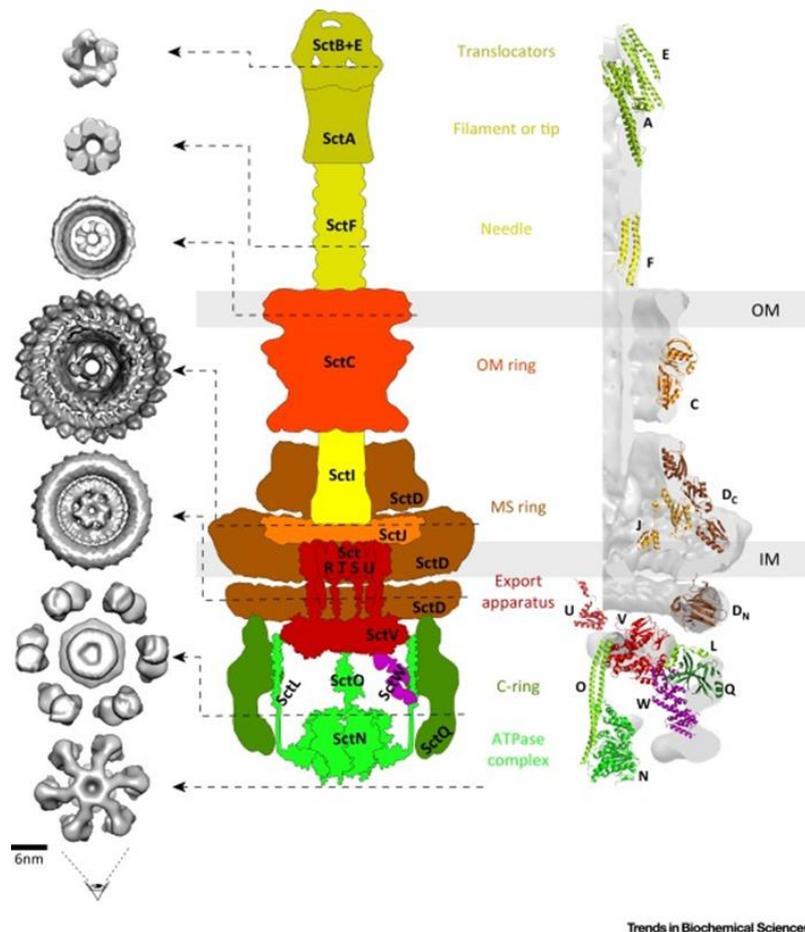
Das Injektisom zeigte eine hohe strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zur bakteriellen Flagelle (Diepold und Armitage 2015). Der Vorfahr des heutigen T3SS wurde vermutlich auch zur Fortbewegung genutzt. Phylogenetische Analysen zeigten, dass die Entwicklung der Injektisome durch horizontalen Gentransfer spät in der Bakterienevolution stattfanden und zur Ausbildung der bakteriellen Proteintransportmaschinen führte (Cornelis 2006; Troisfontaines und Cornelis 2005; Abby und Rocha 2012; Gophna et al. 2003; McCann und Guttman 2008; Saier 2004; Nguyen et al. 2000). Das T3SS zeichnet, im Gegensatz zum Flagellum aus, dass es erst bei Zellkontakt aktiviert wird und dabei eine nadelförmige Struktur ausbildet, durch welche bakterielle Proteine über die Plasmamembran der Wirtszelle hinweg gebracht werden (Viboud und Bliska 2005). Die Sekretion der Komponenten des Injektisoms unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen. Die T3SS-Gene werden bei 37°C und millimolaren Calciumkonzentrationen exprimiert und das Injektisom bildet sich aus (Straley et al. 1993). In vitro kann bei Calcium-Chelatkomplex-Bildung das Phänomen der *low calcium response* (LCR) beobachtet werden (Straley et al. 1993; Michiels et al. 1990; Sample et al. 1987). Die Genexpression der T3SS-Komponenten wird stark erhöht, gleichzeitig vermindert sich das Bakterienwachstum und die *Yersinia*-Effektorproteine werden sekretiert (Brubaker, R. R., Surgalla, M. J. 1964; Straley und Bowmer 1986; Michiels et al. 1990; Straley et al. 1993; Fowler et al. 2009; Fowler und Brubaker 1994). Die Sekretion und Translokation der Effektorproteine wird in vivo durch Zellkontakt vermittelt (Rosqvist et al. 1994; Vallis et al. 1999; Nordfelth und Wolf-Watz 2001). Der Mechanismus hinter der Herunterregulation der Replikation ist bislang nicht vollständig geklärt (Diepold und Armitage 2015).

In Abhängigkeit des T3SS und des Organismus wurden verschiedene Verteilungsmuster und Anzahl an Injektisomen beobachtet. Bei *Shigella* und *Yersinia* konnte eine geordnete Verteilung von Injektisomen auf der Bakterienoberfläche beobachtet werden mit 50-100 Injektisomen in *Shigella* und 10-30 Injektisomen in *Y. enterocolitica* (Diepold und Armitage 2015; Blocker et al. 1999; Notti et al. 2015). Kudryashev und Kollegen konnten in kombinierter Fluoreszenzmikroskopie und Kryoelektronentomographie (Kryo-ET) zeigen, dass sich die Injektisomen von *Y. enterocolitica* auf der Bakterienoberfläche im Abstand von 400 nm zueinander gruppieren. Einzelne Fluoreszenzpunkte in konfokal-mikroskopischen Aufnahmen bestanden durchschnittlich aus zwei bis drei Injektisomen. Bei Aktivierung des T3SS stieg die Anzahl der Injektisome in jeder Gruppe an,

wobei die Anzahl der Gruppen konstant blieb. Innerhalb einer Injektisom-Gruppe ordneten sich die Injektisome im Abstand von bis zu 100 nm zueinander an (Kudryashev et al. 2015). Die Variationen in der Injektisomexpression und -verteilung hängen vermutlich vom Erreger und von den Versuchsbedingungen ab. Für die beiden *Salmonella*-Systeme SPI-1 und SPI-2 sind beispielsweise unterschiedliche Rollen im Prozess der Infektion beschrieben. *Salmonella* SPI-1 (10-100 Injektisome pro Bakterium) wird von extrazellulären Bakterien exprimiert, SPI-2-exprimierende *Salmonella* (nur wenige Injektisome pro Bakterium) stehen bereits in engem Zellkontakt innerhalb der Vakuole (Kubori et al. 1998; Blocker et al. 1999; Diepold et al. 2010; Diepold et al. 2011; Notti et al. 2015; Kudryashev et al. 2015; Chakravorty et al. 2005).

## 2.6 Komponenten des Injektisoms

Das etwa 6 MDa große Injektisom ist eine bakterielle Nanomaschine, die aus insgesamt 20 Untereinheiten aufgebaut ist (Zilkenat et al. 2016). Hochaufgelöste kryoelektronenmikroskopische Strukturen der einzelnen Komponenten unterstützen und erweitern das Injektisom-Modell (Abbildung 2-2). Zur besseren Vergleichbarkeit der Injektisomkomponenten wurde eine allgemeine, familienübergreifende Nomenklatur vorgeschlagen, die konservierte Komponenten mit dem Präfix Sct benennt und stetig erweitert wird (Hueck 1998; Portaliou et al. 2016; Deng et al. 2017; Wagner et al. 2018). Nachfolgend wird der aktuelle Stand der Forschung zu Injektisom und Translokon in *Yersinia* erläutert. Zur besseren Übersichtlichkeit wird hier die *Yersinia* Ysc-Nomenklatur verwendet.



**Abbildung 2-2 Schematische Darstellung des Injektisoms mit hochaufgelösten Strukturdaten.** Das Injektisom mit distalem Translokon ist schematisch in verschiedenen Farben dargestellt (Mitte), die verfügbaren Strukturdaten zu den einzelnen Komponenten sind als Querschnitte (links) und als Längsschnitt der rechten Injektisomhälfte (rechts) gezeigt. Beschriftung mit der allgemeingültigen Sct-Nomenklatur. Von oben nach unten: die Translokatoren SctB/E (in *Y. enterocolitica*: YopB/D) und die SctA-Plattform (LcrV) sitzen am Ende der SctF-Nadel (YscF, alle in olivgrün), in der äußeren Bakterienmembran befindet sich der äußere SctC-Membranring (OM outer membrane ring, YscC, hellrot), gefolgt vom SctI-Rohr (gelb, YscI), in der inneren Membran sitzt der innerere SctD/SctJ-Membranring (braun, YscD/YscJ), darunter der Exportapparat aus SctR, SctT, SctU, SctS, SctV (dunkelrot, YscR, YscS, YscT, YscU und YscV) und der C-Ring/zytoplasmatische SctQ-Ring (dunkelgrün, zytoplasmatische Komponente aus YscQ) in Verbindung mit dem SctN-ATPase-Komplex mit dem Stator SctL, dem Ko-Faktor SctK und dem Stiel SctO (hellgrün, YscN, YscL, YscK, YscO). SctW (lila, YopN). Originalabbildung aus „Trends in Biochemical Sciences 2016 41, 175-189DOI: (10.1016/j.tibs.2015.09.005) Copyright 2015 Elsevier Ltd“ (Portaliou et al. 2016).

Für die korrekte Assemblierung des Injektisoms müssen alle Komponenten in einer bestimmten Reihenfolge sekretiert werden. In der ersten, Sec-abhängigen Phase bildet sich der Basalkörper in der Membran. In der darauffolgenden T3SS-Phase lokalisiert der ATPase-Komplex an der Membran und interagiert mit dem Exportapparat und dem C-Ring, was schließlich zur Sekretion der frühen Substrate führt. Nach Ausbildung der Nadel folgt die Sekretion der mittleren Substrate (die Translokatoren), und schließlich die späten Substrate (die Effektoren) (Dewoody et al. 2013b).

### 2.6.1 Der Basalkörper

Der Basalkörper bildet das Grundgerüst des Injektisoms und besteht aus mehreren ringförmigen Strukturen, die die innere und äußere Membran der Gram-negativen Bakterien durchspannen und einen Kanal für den Export von Bakterientoxinen bilden. *Yersinia* zeigt in der Ausbildung des Injektisoms im Gegensatz zur Flagelle ein von außen nach innen gerichtetes Modell der Assemblierung (Diepold et al. 2010). YscC bildet als erste sekretierte Komponente des Injektisoms eine Ringstruktur in der äußeren Membran und reicht bis ins Periplasma (Diepold et al. 2010; Koster et al. 1997) (hellrot in Abbildung 2-2). Studien unterstützen die Theorie, dass sich YscC evolutionär mehrfach etabliert hat und *Yersinia* scheint diesen Mechanismus zeitlich nach der Entwicklung des T3SS aus der Flagelle entwickelt zu haben (Deng et al. 2017; Abby und Rocha 2012). Darauf folgt die Sekretion von YscD, welches ringförmig den inneren mit dem äußeren Ring verknüpft (Diepold et al. 2010; Spreter et al. 2009; Ross und Plano 2011) (braun in Abbildung 2-2). YscJ bildet im nächsten Schritt den Ring in der inneren Membran (Hodgkinson et al. 2009; Diepold et al. 2010). Am basalen Ende der Ringstruktur bilden YscK, YscQ, YscL, YscN die zytoplasmatische Komponente des Injektisoms (hellgrün in Abbildung 2-2). Die zytosolischen Komponenten liegen sowohl frei als auch ans Injektisom gebunden vor (Diepold et al. 2017; Diepold et al. 2015; Zhang et al. 2017; Lara-Tejero et al. 2011). In einem unabhängigen Signalweg bildet sich der hoch konservierte Exportapparat aus den fünf hydrophoben Proteinen YscR, YscS, YscT, YscU und YscV (Wagner et al. 2010) (dunkelrot in Abbildung 2-2). Zum kontrollierten Export der verschiedenen Substrate liegen diese an ihre Chaperone gebunden im bakteriellen Zytoplasma vor. Injektisomkomponenten (Chaperone Klasse 3), Translokatoren (Chaperone Klasse 2) wie auch Effektoren (Chaperone Klasse 1) müssen zum Transport durch die Nadel von den Chaperonen losgelöst und entfaltet werden (Neyt und Cornelis 1999b; Akeda und Galán 2005; Foultier et al. 2003; Wattiau et al. 1994). Die hexamere ATPase YscN bewerkstelligt diesen Prozess und kontrolliert den Transport durch die Nadel (Akeda und Galán 2005; Roblin et al. 2015). Der Export wird vermutlich durch die protonenmotorische Kraft angetrieben (Wilharm et al. 2004). YscK, YscQ und YscL bilden die *Sorting Plattform*, welche die Chaperon-Substrat-Komplexe rekrutieren, mit unterschiedlicher Affinität binden und die Exportreihenfolge bestimmen (Lara-Tejero et al. 2011). YscL stellt den negativen Regulator der ATPase dar (Blaylock et al. 2006), YscK bildet das Verbindungsstück zwischen ATPase-Komplex und C-Ring (hellgrün in Abbildung 2-2). Der fertiggestellte Basalkörper ist nun in der Lage die frühen Substrate zur Assemblierung der Nadel zu sekretieren. In verschiedenen T3SS konnte ein sehr effizienter Export mit Raten von hunderten bis tausende Effektoren pro Sekunde erfasst werden (Schlumberger et al. 2005; Enninga et al. 2005; Mills et al. 2008; Wilharm et al. 2004).

## 2.6.2 Die Injektisomnadel

In der frühen Phase der Sekretion bildet YscI (gelb in Abbildung 2-2) ein Tunnel zum Transport der Substrate durch die innere Membran (Allaoui et al. 1995; Sukhan et al. 2003; Marlovits et al. 2004; Wood et al. 2008; Sal-Man et al. 2012). Nachfolgend kann das Nadelprotein YscF (olivgrün in Abbildung 2-2) durch den YscI-Tunnel sekretiert werden und die Monomere polymerisieren zu einer helikalen Nadel, deren Länge sich je nach Erreger unterscheidet (Diepold et al. 2012). Die Hohnadel fasst einen Durchmesser von 2-3 nm und ist je nach Spezies zwischen 30 und 80 nm lang (*Y. pestis*: 41 nm; *Y. enterocolitica*: 58 nm (Kubori et al. 1998; Blocker et al. 2001; Hoiczky und Blobel 2001; Journet et al. 2003)). YscP kontrolliert die Nadellänge (Mota et al. 2005a; Journet et al. 2003; Agrain et al. 2005; Stainier et al. 2000; Payne und Straley 1999). YopR assistiert vermutlich in der Polymerisation der YscF-Monomere zur Hohnadeln oder kontrolliert die Sekretion von YscF (Sorg et al. 2006; Allaoui et al. 1995; Lee und Schneewind 1999; Riordan und Schneewind 2008; Blaylock et al. 2010; Riordan et al. 2008). Ohne Ausbildung der korrekten Nadel ist die nachfolgende Sekretion der Translokatoren und Effektoren stark beeinträchtigt (Edqvist et al. 2003; Journet et al. 2003; Agrain et al. 2005; Diepold et al. 2012). Die funktionalen Rollen von YscX, YscY und YscO sind noch nicht vollständig verstanden, sie sind jedoch alle wichtig im Export der Frühe-Phase-Proteine (Dewoody et al. 2013b).

Durch Interaktion mit YscP kommt es nach Ausbildung der Nadel zur proteolytischen Spaltung von YscU, was die Sekretion der Translokatoren initiiert (Edqvist et al. 2003; Lavander et al. 2003; Sorg et al. 2007; Riordan und Schneewind 2008). Die Translokatoren werden auch als mittlere-Phase-Proteine bezeichnet und werden unabhängig vom Zellkontakt über das T3SS sekretiert (Tomalka et al. 2012). Verschiedene Signale wie Serumalbumin (bei *Yersinia*) (Lee et al. 2001) oder Gallensalze/Desoxychoalate (bei *Shigella*) (Olive et al. 2007; Stensrud et al. 2008) können die Sekretion der Translokatorproteine aktivieren.

Der YopN-TyeA-YscB-SycN-Komplex, der sogenannte *calcium plug* (Calcium-Stopfen), verhindert die Sekretion der späte-Phase-Proteine (Yother und Goguen 1985; Forsberg et al. 1991). TyeA bindet als negativer Regulator an den C-Terminus von YopN und verhindert dessen Sekretion (Cheng et al. 2001; Ferracci et al. 2005; Iriarte et al. 1998; Ferracci et al. 2004; Schubot et al. 2005; Lee et al. 2001; Plano und Schesser 2013). YscB und SycN binden aneinander im Zytosol und binden an den N-Terminus von YopN (Cheng et al. 2001; Day und Plano 1998). Bei Zellkontakt bildet der Komplex aus YscB und SycN dann ein Chaperon für den YopN-Export (Dewoody et al. 2013b).

Anhand des N-terminalen Exportsignals erkennt der ATPase-Komplex Translokatoren und Effektoren (Sorg et al. 2007). Translokatoren und einige Effektoren benötigen zusätzlich eine

C-terminale Domäne zum Export (Allen-Vercoe et al. 2005; Kim et al. 2007; Tomalka et al. 2012). Sobald die Effektoren transloziert werden, stoppt der Export der Translokatoren wie in verschiedenen T3SS beobachtet werden konnte (Kubori und Galán 2002; O'Connell et al. 2004).

### 2.6.3 Die Translokatoren

Zahlreiche Studien zeigen, dass die Translokatoren YopB, YopD und LcrV für die Translokation der Effektorproteine über die Wirtzellmembran erforderlich sind (Holmström et al. 2001; Pettersson et al. 1999; Persson et al. 1995; Håkansson et al. 1996b; Sarker et al. 1998). Die zwei hydrophoben Membranproteine YopB und YopD und das hydrophile Nadelspitzenprotein LcrV sind zusammen mit den Chaperonen LcrG und SycD im *lcrGV-sycD-yopBD*-Operon kodiert (Matteï et al. 2011; Håkansson et al. 1993; Mulder et al. 1989; Price et al. 1989; Bergman et al. 1991). Das Klasse 2 Chaperon SycD bindet an YopB und YopD im bakteriellen Zytoplasma und verhindert die Interaktion und die lysierende Wirkung der stark hydrophoben Translokatoren (Neyt und Cornelis 1999b; Tengel et al. 2002; Wattiau et al. 1994; Ménard et al. 1994). Gleichermaßen essentiell für die geregelte Translokation ist das Chaperon LcrG (Hamad und Nilles 2007; Matson und Nilles 2001; Nilles et al. 1997; Price et al. 1989; Bergman et al. 1991). Durch die Bindung an LcrV im bakteriellen Zytoplasma verhindert LcrG die LcrV-Sekretion und die Effektortranslokation (Nilles et al. 1997; Matson und Nilles 2001; Nilles et al. 1998; Sundin et al. 2004; Hamad und Nilles 2007). Innerhalb der Ysc-Familie sind die Translokatoren austauschbar, jedoch nur, wenn das gesamte Operon exprimiert wird (Bröms et al. 2003; Hermant et al. 1995; Armentrout und Rietsch 2016).

#### 2.6.3.1 Der Tip-Komplex

LcrV (*low calcium response protein V*) bildet einen pentameren Komplex am distalen Ende der Nadel, welcher als Plattform (*Tip*-Komplex) für die Assemblierung der Pore dient (Mueller et al. 2005; Goure et al. 2004; Goure et al. 2005; Picking et al. 2005; Broz et al. 2007; Mueller et al. 2008; Park et al. 2018). Goure und Kollegen konnten in Infektionsexperimenten mit Erythrozyten zeigen, dass YopB und YopD eine Pore in der Erythrozytenmembran bilden, jedoch ausschließlich in Anwesenheit von LcrV (Goure et al. 2005). LcrV lokalisiert am distalen Ende der Nadel wie mit Elektronenmikroskopie visualisiert werden konnte (Mueller et al. 2005; Espina et al. 2006; Sani et al. 2007). Das Nadelspitzenprotein ist bereits vor Zellkontakt zu detektieren und stellt die Verbindung zwischen Nadel und Pore dar (Mueller et al. 2005). Die LcrV-Homologen zeigen trotz Unterschieden in der Gensequenz und in der Struktur eine ähnliche funktionelle filamentöse Struktur am Ende der Injektionsnadel (Blocker et al. 1999; Picking et al. 2005; Goure et al. 2004; Schoehn et al. 2003; Yip et al. 2005; Knutton et al. 1998). Strukturanalysen zeigten für LcrV wie auch für das Shigellen-Analogon IpaD eine hantelförmige Struktur (Johnson et al. 2007; Derewenda et al. 2004).

Der hydrophile Translokator LcrV am distalen Ende der T3SS-Nadel dient nicht nur als Regulator der Effektorsekretion (Ménard et al. 1993; Picking et al. 2005; Espina et al. 2006; Nilles et al. 1997; Pettersson et al. 1999; Lee et al. 2010; Goure et al. 2004), sondern beeinflusst auch die Immunantwort (Matteï et al. 2011). Erstmals wurde LcrV im Jahr 1956 in *Y. pestis* als lösliches, protektives V-Antigen beschrieben (Bacon und Burrows 1956). LcrV oder Homologe zeigten jedoch keine enzymatische Aktivität. In Mausexperimenten führte die Immunisierung mit LcrV zur Bildung von Antikörpern, sodass das V-Antigen Gegenstand der Impfstoffforschung wurde (Wang et al. 2004; DeBord et al. 2006; Overheim et al. 2005; Quenee et al. 2010; Ivanov et al. 2014). LcrV-Homologe sind in allen humanpathogenen Yersinien sowie in anderen Pathogenen mit T3SS wie *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *Aeromonas* spp. und *Photobacterium luminescens* zu finden (Sawa et al. 2014). In der Infektion von Makrophagen unterdrückt LcrV die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und stimuliert die Produktion von IL-10 (Nakajima und Brubaker 1993; Nedialkov et al. 1997; Gendrin et al. 2010). In vitro und in vivo konnte eine verminderte Migration neutrophiler Granulozyten durch LcrV beobachtet werden (Welkos et al. 1998).

#### 2.6.3.2 Die Porenproteine

Die stark hydrophoben Translokatoren YopB (42 kDa) und YopD (33 kDa) weisen unter allen sekretierten Proteinen als einzige Transmembrandomänen auf und inserieren in Form einer heteromeren Pore in die Wirtszellmembran (Håkansson et al. 1993; Håkansson et al. 1996b; Hume et al. 2003; Galán et al. 2014; McGhie et al. 2002).

YopB und die Homologe in *P. aeruginosa* (PopB), *Shigella* (IpaB), *Salmonella* (SipB) und pathogenen *E. coli* (EspD) weisen neben zwei Transmembrandomänen, eine N-terminale Superhelix-Region und in einigen Fällen auch eine C-terminale amphipathische Helix auf (Matteï et al. 2011). Insbesondere die Transmembrandomänen, die durch einen Loop verbunden sind, zeigen eine sehr hohe Sequenzidentität innerhalb der Familie, was die Wichtigkeit des Porenproteins in der Infektion unterstreicht (Matteï et al. 2011). Zum heutigen Stand der Forschung ist nur die Kristallstruktur von AopB in Verbindung mit dem Chaperon AcrH aus *Aeromonas* spp. bekannt, welches das Porenprotein lediglich in seiner entfalteten Form zeigt (van Nguyen et al. 2015). Erste Untersuchungen der heute als Porenproteine bekannten YopB und YopD vermuteten anhand der Sequenzdaten eine Ähnlichkeit zu Leukotoxinen und  $\alpha$ -Hämolsinen (Håkansson et al. 1993). Frühe Infektionsexperimente zeigten, dass die Translokation der Effektoren in die eukaryotische Zielzelle abhängig ist von YopB (Sory und Cornelis 1994). Translokator-Mutanten sind weiterhin in der Lage Effektoren in Calcium-depletiertem Medium zu sekretieren, jedoch nicht in die Zellen zu translozieren (Håkansson et al. 1996b). Die Membraninsertion von YopB allein konnte u.a. in Erythrozyten mittels Kontakthämolyse gezeigt werden (Håkansson et al. 1996b; Goure et al. 2004;

Hume et al. 2003; Shaw et al. 2001). PopB aus *Pseudomonas* spp. ist in der Lage Poren in künstliche Membranen und in Zellmembranen zu inserieren. Diese waren ohne die Anwesenheit der weiteren Translokatoren jedoch nicht funktionell (Goure et al. 2004; Faudry et al. 2006).

Auch das kleinere Porenprotein YopD und die homologen Proteine PopD (*Pseudomonas*), IpaC (*Shigella*) und SipC (*Salmonella*) weisen Sequenzähnlichkeiten auf und sind innerhalb einer T3SS-Familie austauschbar (Osiecki et al. 2001; Harrington et al. 2003). Im Ysc-System lassen sich die Translokatoren jedoch nur bei gleichzeitiger Expression des zugehörigen Chaperons und Translokonpartners ersetzen (Bröms et al. 2003). Zur Struktur des kleinen Translokators gibt es derzeit nur wenige Information. Tengel und Kollegen lösten die C-terminale Superhelix-Domäne mittels NMR (*nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanz)-Spektroskopie (Tengel et al. 2002). Diese ist wichtig zur Oligomerisierung und für die Interaktion mit dem *Tip*-Komplex-Protein LcrV, jedoch nicht für die Interaktion mit dem großen Translokator (Costa et al. 2015). Faudry und Kollegen zeigten in *in vitro* Experimenten, dass PopD allein fähig ist Poren in Lipidvesikeln zu bilden (Faudry et al. 2006).

YopD spielt, im Gegensatz zu seinen homologen Proteinen, ferner als RNA-bindendes Protein eine wichtige Rolle in der post-transkriptionellen Kontrolle (Schiano und Lathem 2012). YopD bindet an *yop*-mRNAs im Bereich des Startcodons und verhindert, in Interaktion mit SycD, deren Translation am Ribosom (Francis et al. 2001; Anderson et al. 2002; Chen und Anderson 2011). Dieser Regulationsmechanismus auf mRNA-Ebene während der *low calcium response* ermöglicht eine geregelte Abfolge der Expression und Sekretion der einzelnen Komponenten und Effektor-Yops (Chen und Anderson 2011).

#### 2.6.4 Die Translokationspore

Beide porenbildenden Proteine YopB und YopD sind in der Lage in die Membran zu inserieren (Håkansson et al. 1993; Håkansson et al. 1996b; Neyt und Cornelis 1999a; Montagner et al. 2011; Rosqvist et al. 1995). Zur Ausbildung funktioneller Poren sind beide Proteine nötig (Goure et al. 2004; Faudry et al. 2006). Translokator-Mutanten waren im Mausmodell stets avirulent (Håkansson et al. 1996b).

Bisher war es nicht möglich Translokationsporen aus infizierten Zellen zu isolieren. Rekonstitutions-, Osmoprotektions- und Dextranfreisetzungsversuche bestätigten einen inneren Porendurchmesser von 2 - 4 nm (Håkansson et al. 1996b; Holmström et al. 1997; Blocker et al. 1999; Neyt und Cornelis 1999a; Dacheux et al. 2001; Mueller et al. 2008; Miki et al. 2004; Ide et al. 2001). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Poren in EPEC (enteropathogene

*E. coli*) und in *Pseudomonas* einen äußeren Durchmesser von 55-65 nm bzw. 80 Å umfassen (Schoehn et al. 2003; Ide et al. 2001).

Bei Ausbildung der Pore in der Wirtszellmembran treten die Translokatoren mit verschiedenen zellulären Proteinen in Kontakt (Nordfelth und Wolf-Watz 2001; Schoehn et al. 2003; Lee et al. 1998; Sory und Cornelis 1994; Parsot et al. 1995). Kürzlich konnte in Infektionen mit *Y. pestis* gezeigt werden, dass die Interaktion mit zellulären Faktoren wie dem Chemokinrezeptor CCR5 die Poreinsertion unterstützt (Sheahan und Isberg 2015). Die Interaktion mit Vimentin fördert die Bindung von *Yersinia* spp., *Shigella* spp. und *Salmonella* spp. an die Zielzelle und damit die Poreinsertion und Effektortranslokation (Russo et al. 2016). Die Poreinsertion löst zudem eine Immunantwort der Zelle aus. Ohne die immunsuppressive Wirkung der Effektoren kommt es zu einer Ausschüttung des pro-inflammatorischen Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Shin und Cornelis 2007). In Abwesenheit der anti-inflammatorischen Effektoren YopE, YopH und YopJ, führte die Insertion von YopB zur gesteigerten IL-8-Freisetzung, sowie zur Aktivierung von NF $\kappa$ B, der MAP-Kinasen ERK und JNK und der Rho-GTPase Ras in der Infektion von Epithelzellen (Viboud et al. 2003).

In verschiedenen Ansätzen wurden die bakteriellen Poren hinsichtlich Aufbaus und Stöchiometrie untersucht. Die Untersuchung der aus Erythrozytenmembranen isolierten nativen YopB/D-Porenkomplexes grenzte den multimeren Komplex auf 500-700 kDa mit 15 - 20 Untereinheiten beider Translokatoren ein (Montagner et al. 2011). Kürzlich konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Mittels *single molecule fluorescence photobleaching*-Mikroskopie zeigten PopB-PopD-Heterokomplexe eine hexadecamere Stöchiometrie in künstliche Membranen mit je 8 Molekülen PopB und PopD (Romano et al. 2016).

Die exakte räumliche Anordnung der Proteine innerhalb des Translokons bleibt jedoch ungeklärt. Armentrout und Rietsch zeigten durch wechselseitiges Ersetzen der Translokatorproteine aus *Yersinia* und *Pseudomonas*, dass eine für die Funktion wichtige Interaktion zwischen YopD und LcrV und zwischen den porenbildenden Proteinen YopB und YopD besteht (Armentrout und Rietsch 2016). Durch die Substitution einzelner Aminosäuren in den Translokatorproteinen und durch Versuche mit Yop-Pop-Hybridproteinen konnten sie die Interaktionsdomänen der Translokatoren näher beschreiben. PopB (AS 274-AS 297) und PopD (AS 228-AS 245) interagieren im extrazellulären Bereich des Translokons miteinander. PopB inseriert mit zwei Transmembrandomänen in die Membran, wobei N- und C-Termini in den extrazellulären Bereich ragen (Armentrout und Rietsch 2016; Discola et al. 2013). Das in die Membran inserierte PopD zeigte eine andere Orientierung mit dem N-Terminus im Zytoplasma und einen extrazellulären C-Terminus. PopD dient vermutlich als Verbindungsstück zwischen Porenkomplex und PcrV-Plattform und bindet nur oberflächlich an die Membran der Zielzelle (Armentrout und Rietsch 2016). Die Interaktion von YopD/PopD mit

LcrV/PcrV spielt eine wichtige Rolle in der Sekretion der Effektoren (Costa et al. 2015). Mutationen im C-terminalen Bereich von YopD beeinträchtigen die Interaktion mit LcrV und damit auch die Translokation der Effektoren (Francis und Wolf-Watz 1998; Costa et al. 2010; Olsson et al. 2004). Durch ein bislang unbekanntes Signal bei Zellkontakt, kommt es durch Kontakt von PopD mit PcrV zu einer Konformationsänderung in der Translokationspore. Vermittelt über eine Signaltransduktionskaskade über die Injektionsnadel, wird die Effektorsekretion veranlasst (Armentrout und Rietsch 2016).

#### 2.6.5 Regulation der Translokation

Der genaue Mechanismus der Effektortranslokation ist bislang nicht eindeutig geklärt. Das weitgehend anerkannte Ein-Schritt-Modell, auch Injektionsmodell genannt, beschreibt das Vorkommen eines durchgehenden Kanals zwischen Bakterium und Wirtszelle (Lee et al. 1998; Marenne et al. 2003; Ryndak et al. 2005; Lara-Tejero und Galán 2009). Lee und Kollegen zeigten bereits 1998 anhand von Immungold-markierten, elektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass der Effektor YopE nicht auf der Oberfläche der Yersinien, sondern ausschließlich innerhalb der Bakterien und im Wirtszellzytoplasma zu finden ist (Lee et al. 1998). Kürzlich gelang es Park und Kollegen mittels Kryo-ET in *Salmonella*-Minizellen das Zusammenspiel des bakteriellen Translokons mit der Wirtszellmembran zu visualisieren (Park et al. 2018). Die Porenproteine konnten in der Plasmamembran inseriert als eine zeltförmige Einstülpung beobachtet werden und zeigten eine Verbindung zu LcrV-Plattform und Injektisom (Park et al. 2018). Eine Penetration der Nadel durch die Wirtszellmembran, wie zuvor postuliert (Hoiczky und Blobel 2001), konnte hier nicht beobachtet werden. Das Translokon mit halbrundem, mittigem Kanal zeigte eine Länge von 8 nm über die Plasmamembran und einen Durchmesser von 13,5 nm, wobei die Hälfte in der Membran lokalisierte und die andere Hälfte in das Zytoplasma der Wirtszelle ragte (Park et al. 2018). Vieles deutet darauf hin, dass die Translokation der Effektorproteine in einem Schritt durch das Injektisom und die Translokationspore in die Wirtszelle stattfindet. Andererseits wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Effektortranslokation auch in einem Zwei-Schritt-Mechanismus stattfinden könnte. Hierbei würden Effektor- und Translokator-Yops zunächst auf die Bakterienoberfläche sezerniert werden und dort Komplexe bilden, die dann in einem zweiten Schritt die Wirtszellmembran passieren. Unterstützt wird diese Hypothese durch folgende Beobachtungen: In *Y. pseudotuberculosis* wurde beobachtet, dass Yops bereits vor Zellkontakt auf der Bakterienoberfläche zu finden sind (Akopyan et al. 2011; Edgren et al. 2012). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass rekombinant exprimierte Yops, die von extern auf Translokations-kompetente Yersinien gegeben wurden, in Abhängigkeit von YopB und YopD transloziert werden können (Akopyan et al. 2011).

Der durchgehende Kanal stellt vermutlich den primären Mechanismus der Effektortranslokation dar, wobei das Zwei-Schritt-Modell abhängig von Gattung und Infektionsbedingungen ebenfalls vorkommen kann (Galán et al. 2014; Deng et al. 2017; Dewoody et al. 2013b).

#### 2.6.6 Die Effektoren

In *Yersinia* sind die sechs Effektorproteine YopE, YopH, YopM, YopT, YopO und YopP bekannt (Sory und Cornelis 1994; Persson et al. 1995; Pha und Navarro 2016). Die bakteriellen Effektoren imitieren zelluläre Proteine als Kinasen, Phosphatasen oder Proteasen, modulieren die Aktivität von Rho-GTPasen und das Aktin-Zytoskelett, manipulieren Signalwege und unterdrücken die zelluläre Immunantwort (Aepfelbacher et al. 2007; Cornelis 2002b; Viboud und Bliska 2005; Trosky et al. 2008; Pha und Navarro 2016). Vier der Effektorproteine (YopH, YopE, YopT und YopO) beeinträchtigen durch Manipulation des Zytoskeletts die Phagozytose der Yersinien, wobei YopE, YopT und YopO auf unterschiedliche Weise mit Rho-GTPasen interagieren (Aepfelbacher 2004; Grosdent et al. 2002; Barbieri et al. 2002). YopM und YopP modulieren zusammen mit YopH die Entzündungsreaktion (Berneking et al. 2016; Cornelis 2002a) (für weitergehende Literatur siehe nachfolgende Abschnitte).

**YopH** (50 kDa) ist eine Phosphotyrosin-Phosphatase, die Proteine, die an der Bildung fokaler Adhäsionen beteiligt sind, wie das Adaptorprotein p130Cas, die Kinase Fak, Paxillin, das Fyn-Bindeprotein und das Adapterprotein SKAP-HOM, dephosphoryliert (Andersson et al. 1996; Viboud und Bliska 2005; Aepfelbacher 2004; Cornelis 2002b). In der Invasin-abhängigen Phagozytose bilden sich bei Zellkontakt durch Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts im Zusammenspiel mit Integrinen Aufnahmestrukturen aus, welche fokalen Adhäsionen ähneln. Die Aufnahmestrukturen werden durch die Wirkung des anti-phagozytischen Effektors YopH aufgelöst (Aepfelbacher et al. 2007). Die katalytische Domäne von YopH ist am C-Terminus lokalisiert und hat große Ähnlichkeit zu eukaryotischen Phosphatasen (Phan et al. 2003; Sun et al. 2003). YopH ist nicht nur ein entscheidender Faktor in der Hemmung der Phagozytose durch Neutrophile und murinen Makrophagen (Fallman et al., 1995; Ruckdeschel et al., 1996; Aepfelbacher et al., 2007), sondern blockiert auch die zelluläre Calcium-Signalkaskade, was die Degranulation von Immunzellen verhindert und das Überleben der Yersinien sichert (Persson et al. 1999). YopH unterbindet außerdem die T-Zell-Aktivierung und die Produktion des Cytokins CC-Chemokin-Ligand-2 in Makrophagen, sowie die Aktivierung des PI3-Kinase-Signalswegs, was wiederum die Proliferation der Lymphozyten und Rekrutierung von Makrophagen verhindert (Yao et al. 1999; Sauvonnnet et al. 2002).

**YopP** (YopJ in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, 32,5 kDa) inhibiert zentrale pro-inflammatorische Signalwege, u. a. indem es als Serin/Threonin/Lysin-Acetyltransferase die NFκB- und MAP-Kinase-Signalkaskaden inhibiert (Monack et al. 1997; Ruckdeschel et al. 1997; Schesser et al. 1998; Orth et al. 1999; Denecker et al. 2002). Dies verhindert die Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine wie TNF-α, IL-8 oder IL-6 und induziert die Apoptose in Makrophagen (Orth et al. 2000; Ruckdeschel et al. 1998; Mittal et al. 2006; Boland und Cornelis 1998; Mukherjee et al. 2006).

Das Leucin-reiche Protein **YopM** zeigt eine große Variabilität innerhalb der Spezies und ist als einziges Yop auch im Nukleus zu finden (Boland et al. 1998; Berneking et al. 2016). Für YopM ist bisher keine enzymatische Aktivität bekannt, es ist jedoch ein wichtiger Faktor in der Etablierung der Infektion (Höfling et al. 2015). YopM zeigt immunsupprimierende Eigenschaften in der Bindung und Aktivierung der Kinasen RSK und PKN (Hentschke et al. 2010). Über die Interaktion mit der Helikase DDX3 gelangt YopM vermutlich in den Kern und beeinflusst dort über Phosphorylierung von RSK die Transkription von IL-10. Des Weiteren vermindert YopM auf bisher unbekannte Weise die Transkription weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IFN-γ, IL-1β, TNF-α und IL-15 und trägt damit zum Fortgang der Infektion bei (McPhee et al. 2010; Kerschen et al. 2004; Berneking et al. 2016). In Abhängigkeit der *Yersinia*-Spezies und des Infektionswegs zeigte sich YopM als wichtiger Virulenzfaktor in der Kolonisierung und Verbreitung der Yersinien in Milz, Leber und Lunge, sowie in der Rekrutierung von Neutrophilen, Monozyten und dendritischen Zellen (Ye et al. 2009; Ye et al. 2011; McCoy et al. 2010; MCPhee et al. 2010). YopM zeigt einen inhibierenden Effekt auf das Caspase-1-Inflammasom, möglicherweise durch Interaktion mit dem potentiellen Caspase-1-Aktivator und GTPase-aktivierenden Protein IQGAP1 (Chung et al. 2014; LaRock und Cookson 2012; Hentschke et al. 2010).

#### 2.6.6.1 Rho-GTPasen manipulierende Yops: YopE, YopT und YopO

Als zentrale Schaltstellen der Zelle sind Rho-GTPasen Angriffspunkte einer Vielzahl bakterieller Virulenzfaktoren (Popoff 2014). Die kleinen GTPasen sind nicht nur wichtig in der Phagozytose und der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, sondern auch regulierend im Vesikeltransport, Gentranskription und Zellzyklus und in der Modulation von Entzündungsmediatoren (Jaffe und Hall 2005; Aktories und Barbieri 2005; van Aelst und D'Souza-Schorey 1997). Die Rho-GTPasen bilden eine Familie der kleinen G(Guanosinriphosphat)-Proteine innerhalb der Ras-Superfamilie und sind in allen eukaryotischen Zellen vertreten (Jaffe und Hall 2005).

Die *Yersinia*-Effektoren YopE, YopT und YopO manipulieren die kleinen Rho-GTPasen auf unterschiedliche Weise mit dem Ziel Umbauprozesse des Aktinzytoskeletts zu inhibieren und damit ihre Phagozytose zu verhindern (Barbieri et al. 2002; Aktories und Barbieri 2005). Die Rho-GTPasen zeigen bei Aktivierung unterschiedliche Phänotypen wie die Ausbildung von Stressfasern (RhoA)

oder Filopodien (Cdc42) (Jaffe und Hall 2005). Rho-GTPasen sind molekulare Schaltstellen, die durch Bindung von GTP aktiviert und durch Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP wieder in den inaktiven Zustand versetzt werden. Der Wechsel zwischen aktiv und inaktiv wird durch drei Gruppen von Proteinen reguliert: (i) GTP-Austauschfaktoren (*Guanosine triphosphate exchange factor*, GEF), (ii) GTPase-aktivierende Proteine (*GTPase-activating proteins*, GAP), und (iii) Guanin-Nukleotid Dissoziationsinhibitoren (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*, GDI). Bakterielle Effektorproteine imitieren diese eukaryotischen, regulatorischen Proteine. YopE ist ein GTPase-aktivierendes Protein, welches die intrinsische Aktivität der GTPase steigert und damit die Hydrolyse des gebundenen GTPs zu GDP+P beschleunigt (Pawel-Rammingen et al. 2000; Black und Bliska 2000). Die kleinen GTPasen sind in ihrer aktiven Form über einen Prenylrest membrangebunden. Guanin-Nukleotid Dissoziationsinhibitoren wie YopO binden und neutralisieren die C-terminalen Isoprenoide und bringen sie in ihre inaktive zytosolische Form (Aepfelbacher und Wolters 2017; Shao et al. 2002; Groves et al. 2010; Prehna et al. 2006).

Die Rho-GTPase Rac1 ist ein wichtiges Zielprotein von *Yersinia*, was sich durch die vielseitigen Aufgaben der GTPase in der Zelle erklären lässt. Rac1 kann auf verschiedenen Ebenen die Aktin-Dynamiken und schließlich die Phagozytose steuern. Durch Aktivierung des Arp2/3-Komplexes über den Faktor WAVE kann Rac1 die Bildung und Verzweigung von Aktinfilamenten bewirken (Takenawa und Miki 2001). Es interagiert u.a. mit der PIP5-Kinase und fördert die Anreicherung von PI(4,5)P<sub>2</sub> an der Plasmamembran, was zur Depolymerisation/*Uncapping* von Aktinfilamenten führt (Wong und Isberg 2003; Tolia et al. 2000). Rac1 wirkt ferner auf PAK1 und die LIM-Kinase, was nachfolgend das depolymerisierende Cofilin inaktiviert (Bierne et al. 2001). Die Transfektion von Zellen mit der konstitutiv aktiven Form von Rac1 führte in Infektionsexperimenten zu einer 5 bis 10-fach gesteigerten Yop-Translokation (Wolters et al. 2013; Aili et al. 2008; Aepfelbacher und Wolters 2017).

**YopE** (23 kDa) zeigt seine regulatorische Funktion erst in der Zielzelle (Aili et al. 2008). Über die hydrophobe Membran-Lokalisationsdomäne bindet YopE an perinukleäre Membranen und interagiert mit RhoA, RhoG, Rac1 und Cdc42 (Pawel-Rammingen et al. 2000; Black und Bliska 2000; Aili et al. 2008; Roppenser et al. 2009; Isaksson et al. 2009). Als GTPase-aktivierender Faktor zeigte YopE bei der Zellinfektion eine Präferenz für RhoG und Rac1. YopE wirkt direkt auf Rac1 oder auf die im Signalweg vorgestellte GTPase RhoG und beeinträchtigt die Phagozytose (Andor et al. 2001; Ruckdeschel et al. 2006; Aili et al. 2006; Roppenser et al. 2009; Mohammadi und Isberg 2009; Aepfelbacher et al. 2011; Aepfelbacher und Wolters 2017). Die Interaktion von YopE mit den Rho-GTPasen findet über eine konservierte Argininfinger-Domäne statt. Strukturanalysen zeigten keine Ähnlichkeit zu eukaryotischen GAPs (Evdokimov et al. 2002; Cornelis 2002b). Der Effektor

YopE zeigt eine regulatorische Funktion in der Effektortranslokation, indem es die Translokation negativ reguliert (Aili et al. 2008; Aili et al. 2006; Isaksson et al. 2009; Aepfelbacher et al. 2011; Gaus et al. 2011) und die Porenbildung verhindert (Viboud und Bliska 2001; Viboud et al. 2006; Mejía et al. 2008). Dieser Effekt wurde besonders deutlich bei der Infektion mit der YopE-Deletionsmutante. Hier zeigte sich eine Hypertranslokation und unkontrollierte Expression der Effektoren (Viboud und Bliska 2005; Viboud und Bliska 2001; Aili et al. 2006; Mejía et al. 2008; Wolters et al. 2013; Aili et al. 2008; Viboud et al. 2006). Eine direkte Interaktion mit der Translokationspore konnte bisher nicht gezeigt werden (Dewoody et al. 2013b).

Die Cystein-Protease **YopT** (35,5 kDa) schneidet Rho-GTPasen nahe des C-terminalen Geranylgeranyl-Cysteinrests. Der hierdurch bedingte Verlust der Membranbindung führt zur Inaktivierung der GTPasen und zeigt sich phänotypisch in der Zerstörung von Aktin-Mikrofilamenten (Shao et al. 2003; Shao et al. 2002). YopT moduliert hier das Aktin-Zytoskelett am phagozytischen *Cup* und an den podosomalen Adhäsionsstrukturen und verhindert damit nicht nur die Phagozytose der Yersinien, sondern auch die Chemotaxis der Makrophagen (Aepfelbacher 2004; Shao et al. 2002; Shao et al. 2003).

**YopO** (YpkA in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*, 81,7 kDa) ist ein multifunktionales Protein mit einer N-terminalen Serin/Threonin-Kinase-Domäne, einer C-terminalen GTPase-Bindedomäne sowie zwei spezifischen Aktin-Interaktionsbereichen. Nach Translokation lokalisiert YopO mithilfe des N-Terminus an die Plasmamembran und manipuliert die Signaltransduktion zellulärer Rho-GTPasen (Håkansson et al. 1996a). Die Bindung von globulärem (G)-Aktin führt zur Autophosphorylierung der katalytischen Domäne und zur Phosphorylierung zellulärer Proteine und Histone (Trasak et al. 2007; Juris et al. 2000). Der Komplex aus YopO und Aktin konnte kürzlich strukturell gelöst werden (Lee et al. 2015). YopO nutzt die Bindung von Aktin zur Rekrutierung zellulärer Faktoren der Aktinpolymerisation, die in der Phagozytose involviert sind, und inaktiviert diese durch Phosphorylierung (Lee et al. 2015). Die C-terminale Domäne interagiert mit den zellulären Rho-GTPasen, bevorzugt mit Rac1, und inaktiviert diese zur Inhibierung der Phagozytose der Yersinien (Groves et al. 2010; Prehna et al. 2006).

#### 2.6.6.2 Regulation der Translokation

Neben YopN spielt **YopQ** (YopK in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) eine wichtige Rolle in der Regulation der Translokation (Dewoody et al. 2013a; Francis und Wolf-Watz 1998). Der Effektor wird in geringen Mengen in die Zielzelle transloziert, doch eine katalytische Aktivität konnte bisher nicht beschrieben werden (Holmström et al. 1995b, 1995a). YopQ hat keinen Einfluss auf die Transkription oder Expression der Effektoren (Holmström et al. 1997). Vielmehr steuert YopQ durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Translokationsrate. Durch Interaktion mit der

Translokationspore und dem Injektisom scheint YopQ ein Signal zu übermitteln, das die Translokation stoppt (Dewoody et al. 2013b). In Infektionsversuchen mit der YopQ-Effektormutante kam es zu einer Hypertranslokation der Effektoren YopE und YopH, was zur Anreicherung stark zytotoxischer Effektoren und somit zur Aktivierung des Inflammasoms und von Caspase-1 führte (Holmström et al. 1997; Aili et al. 2002; Brodsky et al. 2010). Zudem sind YopQ-Mutanten *in vivo* in der Kolonisierung und Verbreitung gehemmt (Straley und Bowmer 1986; Straley und Cibull 1989; Holmström et al. 1995a, 1995b). Immunopräzipitations- und *Pulldown*-Versuche bewiesen eine direkte Interaktion mit dem Translokon (Holmström et al. 1995a, 1995b; Holmström et al. 1997; Brodsky et al. 2010; Dewoody et al. 2013a; Thorslund et al. 2011). YopQ scheint durch direkte Bindung an YopD eine Konformationsänderung im Porenkomplex hervorzurufen, die zur bakteriellen Basis des Injektisoms übermittelt wird und die Porengröße beeinflusst (Holmström et al. 1997; Dewoody et al. 2013b; Dewoody et al. 2013a). Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher unklar und bedarf weiterer Forschung.

### 3 Zielsetzung

Das unter pathogenen Bakterien weit verbreitete Typ-III-Sekretionssystem dient dem Transport bakterieller Effektorproteine in die Wirtszelle. Während viele Komponenten des Basalkörpers, der Nadel und des Tip-Komplexes bereits strukturell aufgelöst und in ein detailliertes Modell des Injektisoms integriert wurden, gibt es bislang nur wenige Informationen zu Struktur und Funktionsweise der Translokationspore. Einerseits wird weithin anerkannt, dass die Translokationspore bei Zellkontakt am distalen Ende der Injektisomnadel assembliert und einen kontinuierlichen Kanal zwischen Bakterium und Wirtszytosol bildet (Lee et al. 1998; Marenne et al. 2003; Ryndak et al. 2005; Lara-Tejero und Galán 2009; Dewoody et al. 2013b; Rosqvist et al. 1994; Sory und Cornelis 1994; Persson et al. 1995; Cheng et al. 2001; DeBord et al. 2006). Dieses etablierte Injektions- oder Ein-Schritt-Modell der Translokation wurde andererseits für das T3SS von *Y. pseudotuberculosis* in Frage gestellt und alternativ ein der Wirkweise von AB-Toxinen ähnliches Zwei-Schritt-Modell vorgeschlagen (Akopyan et al. 2011; Edgren et al. 2012). Auch über die spezifischen Wechselwirkungen des Translokons mit der Wirtszelle ist bislang wenig bekannt. So wurde für das *Yersinia* T3SS bislang nicht untersucht, in welchem Wirtszellkompartiment die Insertion des Translokons stattfindet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mithilfe hochauflösender Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie-Techniken neue Erkenntnisse zur räumlich-zeitlichen Organisation, Regulation und Lokalisation des Translokons während der Wirtszellinfektion zu erlangen. Um Informationen über die Interaktion mit physiologisch relevanten Wirtszellen zu erlangen, sollen die Infektionsversuche auch in primären humanen Makrophagen durchgeführt werden.

Folgende spezifische Fragestellungen standen im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertationsarbeit:

- Wie ist der räumliche Bezug der Translokationspore zum Injektisom während der Infektion von Wirtszellen?
- Welche zellulären und bakteriellen Faktoren beeinflussen die Ausbildung der Translokationspore?
- In welchem Wirtszellkompartiment wird die Insertion des Translokons initiiert?
- Verändert sich die Translokationspore unter Bedingungen gesteigerter Translokationsaktivität?
- Können auch unter Sekretionsbedingungen Porenkomplexe gefunden werden?

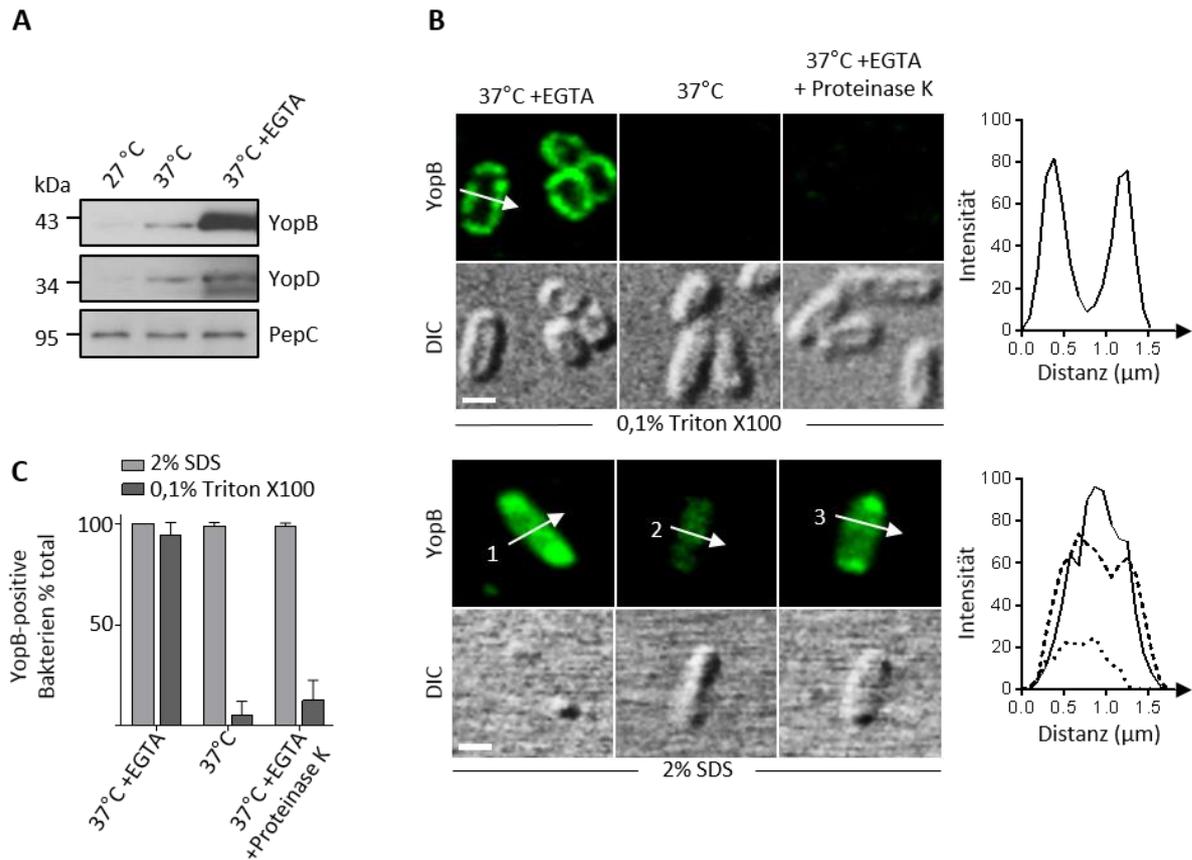
## 4 Für das Verständnis der Ergebnisse relevante Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits einige thematisch relevante Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe. Ergebnisse zur Ausbildung und Lokalisation der Porenkomplexe von *Y. enterocolitica* und deren Visualisierung sind Bestandteil der Dissertation von Franziska Huschka (Huschka 2017). Im Rahmen ihrer Arbeit wurden die hier verwendeten polyklonalen Kaninchen- und Ratten-Antikörper gegen die Porenproteine YopB und YopD hergestellt und auf Spezifität getestet. Die für die vorliegende Dissertation relevanten Ergebnisse der Dissertation Huschka sind nachfolgend dargestellt. Viele der hier gezeigten Daten sind Bestandteil der Veröffentlichung

Theresa Nauth, Franziska Huschka, Michaela Schweizer, Jens B. Bosse, Andreas Diepold, Antonio V. Failla, Anika Steffen, Theresia E. B. Stradal, Manuel Wolters, Martin Aepfelbacher (2018) **Visualization of translocons in *Yersinia* type III protein secretion machines during host cell infection.** PLOS Pathogens 14(12): e1007527. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007527>

### 4.1 Die Translokatoren YopB und YopD lokalisieren unter Sekretionsbedingungen auf der Bakterienoberfläche

Die Expression und Sekretion der Translokatoren YopB und YopD wurde in in vitro-Experimenten mit dem *Y. enterocolitica* Wildtypstamm WA-314 (Tabelle 7-14) untersucht. Die Expression des T3SS kann durch Inkubation bei 37°C induziert werden (Cornelis et al. 1987; Rouvroit et al. 1992). Die Yersinien wurden unter verschiedenen Kulturbedingungen hinsichtlich der Ausbildung und Lokalisation der Porenproteine YopB und YopD in Western Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen betrachtet. Gesamtzell-Lysate des Wildtypstamms WA-314 zeigten in Western Blot-Analysen, dass die Porenproteine YopB und YopD erst bei einer Temperaturerhöhung auf 37°C detektierbar sind (Abbildung 4-1A, 27°C und 37°C). Durch die Depletion des Calciums mit EGTA-Zugabe zum Kulturmedium wurde die Sekretion der Yops induziert (Heesemann et al. 1986). Unter diesen Bedingungen konnte eine gesteigerte Expression der Porenproteine beobachtet werden (Abbildung 4-1A, 37°C +EGTA).



**Abbildung 4-1 Die Translokatorproteine YopB und YopD lokalisieren auf der Bakterienoberfläche unter in vitro-Sekretionsbedingungen.** (A) Expression der Translokatoren. Yersinien (WA-314) wurden bei 27°C, 37°C und bei 37°C und Ca<sup>2+</sup>-Depletion (durch Zugabe von EGTA), d.h. unter Sekretionsbedingungen kultiviert und im Western Blot analysiert. (B) Immunfluoreszenzfärbungen zeigen die Lokalisation des Porenproteins YopB unter verschiedenen Kulturbedingungen. Repräsentative konfokale Fluoreszenzaufnahmen (obere Reihe) und dazugehörige Differentialinterferenzkontrast (*differential interference contrast*, DIC)-Bilder (untere Reihe) von YopB-immungefärbten Yersinien unter Bedingungen, die die innere und äußere Membran der Bakterien nicht permeabilisieren (0,1% Triton X100) oder permeabilisieren (2% SDS). Graphen zeigen Intensitätsprofile der Färbung des Porenproteins YopB entlang des Pfeils. Intensität in absoluten Einheiten. Maßstab: 1µm (C) Quantifizierung der YopB-positiven Bakterien. Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte ± Standardabweichung von 260-800 Bakterien aus 2-3 unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind Bestandteil der Dissertation von F. Huschka (Huschka 2017) und der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Immunfluoreszenzfärbungen von fixierten und mit YopB-Antikörpern immungefärbten Yop-sekretierenden Yersinien (37°C mit EGTA-Zugabe) zeigten, dass das Porenprotein YopB unter Bedingungen, die die äußere und innere Membran der Gram-negativen Yersinien nicht permeabilisieren (0,1% Triton X-100), auf der Bakterienoberfläche nachweisbar ist (Abbildung 4-1B obere Reihe, links). Die YopB-Färbung ist homogen an der Peripherie der Bakterien lokalisiert, wie auch im dazugehörigen Intensitätsprofil entlang des Pfeils zu sehen ist (Abbildung 4-1B, oberer Graph). Yersinien, die bei 37°C kultiviert wurden, zeigten nahezu keine YopB-Färbung (37°C, keine EGTA-Zugabe, Abbildung 4-1B obere Reihe, Mitte). Wurden sekretionsaktive Bakterien vor der Fixierung mit Proteinase K behandelt (37°C mit EGTA- plus Proteinase K-Zugabe), war ebenfalls kein

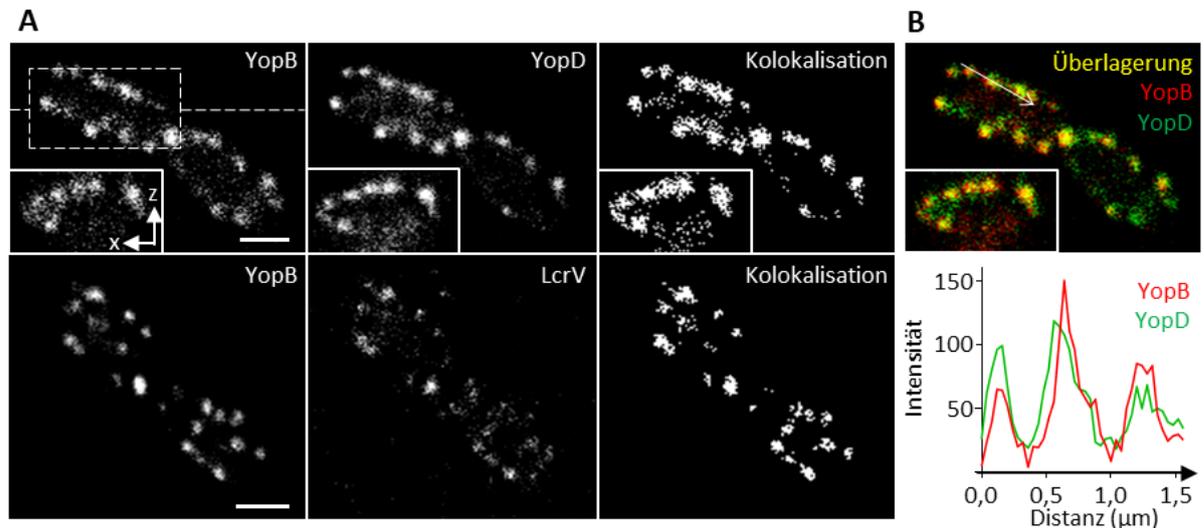
YopB-Signal auf der Bakterienoberfläche nachweisbar, was die extrazelluläre Lokalisation des YopBs bestätigte (Abbildung 4-1B obere Reihe, rechts + Abbildung 4-1C). Zur Visualisierung des intrabakteriellen Pools des Porenproteins YopB wurden die Bakterien mit 2%iger SDS-Lösung permeabilisiert (untere Reihe Abbildung 4-1B). Hier zeigte sich, dass das Porenprotein bereits bei 37°C exprimiert wird (Abbildung 4-1B untere Reihe, Pfeil 2), was auch in der Western Blot-Analyse ersichtlich war (Abbildung 4-1A). Vergleicht man die verschiedenen Bedingungen der Permeabilisierung (Abbildung 4-1B obere Reihe 0,1% Triton X100 und untere Reihe 2% SDS), wird deutlich, dass die Porenproteine bei 37°C bereits exprimiert, jedoch noch nicht sekretiert werden. Eine Proteinase K-Behandlung vor Permeabilisierung der Bakterien mit 2% SDS beeinträchtigte den intrazellulären Pool von YopB nicht (Abbildung 4-1B untere Reihe, Vergleich Pfeil 1 und Pfeil 3). Die Exo- und Endopeptidase Proteinase K degradiert Proteine durch proteolytische Spaltung und kann die innere und äußere Bakterienmembran nicht überwinden. Bei Behandlung der Bakterien mit 0,1% Triton X-100 wurde folglich ausschließlich extrabakterielles (sekretiertes) Protein immungefärbt. Diese Färbebedingung wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung des Translokons in der Interaktion mit der Wirtszelle verwendet.

Die homogene Verteilung des Translokators YopB auf der Bakterienoberfläche konnte in 2D-STED-Aufnahmen (Auflösung von ~40 nm in der lateralen und ~150 nm in der axialen Ebene) bestätigt werden. Konfokal-mikroskopische Aufnahmen zeigten für das zweite Porenprotein YopD eine ähnliche Oberflächenlokalisation. Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte daher mit hochauflösender STED-Mikroskopie (7.2.5.2) untersucht werden, ob die beiden Porenproteine eine spezifische Kolo-kalisation zeigen und regelmäßig angeordnete Gruppen bilden wie es kürzlich für Injektisome des *Y. enterocolitica* E40-Stamms beschrieben wurde (Kudryashev et al. 2015).

## 4.2 YopB, YopD und LcrV kolokalisieren bei der Wirtszellinfektion

Die Visualisierung des Translokons unter Infektionsbedingungen erfolgte mit konfokaler und hochauflösender Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Translokatorproteine wurden in der konfokalen Mikroskopie stets bakterien-assoziiert detektiert und zeigten eine fleckförmige Verteilung auf der Bakterienoberfläche (Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100; (Huschka 2017; Nauth et al. 2018)). In der Yersinieninfektion von HeLa-Zellen zeigte nur ein sehr geringer Anteil der gesamten Zell-assoziierten Bakterien eine positive Immunfärbung für YopB und YopD (Huschka 2017; Nauth et al. 2018). Bakterielle und zelluläre Faktoren können demnach die Fraktion der Translokon-bildenden Yersinien modulieren. Die Untersuchung dieser Regulationsmechanismen ist Bestandteil dieser Arbeit.

Die Verwendung der STED-Mikroskopie ermöglichte eine verbesserte Auflösung der in der Konfokalmikroskopie fleckförmigen Porenkomplexe und zeigte eine deutliche Kolokalisation der Translokatoren YopB und YopD sowie YopB und LcrV bei der Infektion von HeLa-Zellen (Abbildung 4-2). Ein konfokales YopB-Fluoreszenzsignal konnte mit 2D-STED-Mikroskopie in durchschnittlich drei Signale aufgelöst werden (Huschka 2017; Nauth et al. 2018).



**Abbildung 4-2 3D-STED-Mikroskopie zeigt Kolokalisation der Translokatoren YopB und YopD sowie YopB und LcrV-Plattform bei der Zellinfektion.** HeLa-Zellen wurden mit Yersinien (WA-314 $\Delta$ yopE, Tabelle 7-14) infiziert und ko-immungefärbt mit polyklonalen Ratten anti-YopB und Kaninchen anti-YopD oder anti-LcrV Antikörpern, gefolgt von anti-Ratte AlexaFluor594 und anti-Kaninchen AbberiorStarRed Sekundärantikörpern. Die Aufnahmen erfolgten im 80%igen 3D-STED-Modus. **(A)** Repräsentative Bilder einer einzelnen z-Ebenen von WA-314 $\Delta$ yopE bei der HeLa-Zellinfektion sind dargestellt. Einsätze zeigen xz-Projektion auf Ebene der gestrichelten Linie. Kolokalisierende Punkte wurden durch das ImageJ Plug-In „Colocalization“ generiert und dargestellt. **(B)** Die Überlagerung der beiden Kanäle und das dazugehörige Intensitätsprofil entlang der Bakterienmembran (weißer Pfeil) verdeutlichen die Kolokalisation der Porenproteine (gelb). Intensität in absoluten Einheiten. Maßstab: 1 $\mu$ m. Die Ergebnisse sind Bestandteil der Dissertation von F. Huschka (Huschka 2017) und der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

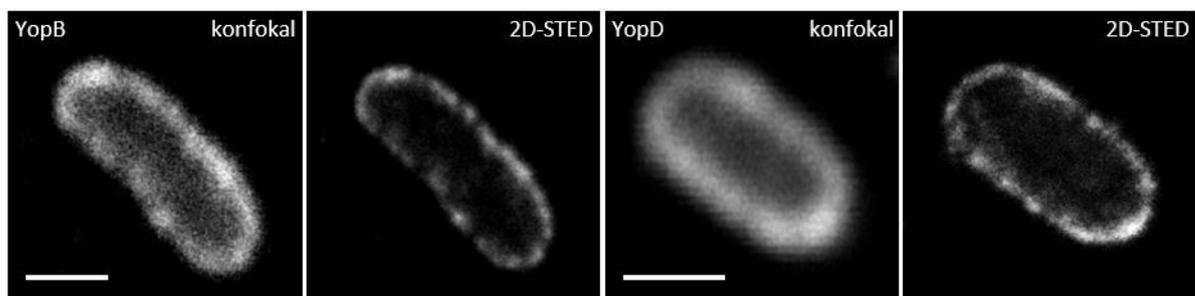
Die bei Verwendung der 3D-STED-Mikroskopie (laterale und axiale Auflösung  $\sim$ 80 nm) beobachtete Kolokalisation der Porenproteine mit der LcrV-Plattform zeigte bereits, dass Pore und Plattform in räumlicher Nähe zueinanderstehen und möglicherweise Teil einer assemblierten T3-Sekretionsmaschinerie sind. Neben der Mikroskopie-Technik STED wurde zur Untersuchung des Injektisoms und der Translokationspore die *Structured Illumination* (SIM)-Mikroskopie (laterale Auflösung  $\sim$ 100 nm, 7.2.6 Gustafsson et al. 2008; Schermelleh et al. 2008) angewandt. In ersten hochaufgelösten Aufnahmen konnte der Aufbau des Injektisoms von *Y. enterocolitica* im zellulären Kontext betrachtet und analysiert werden. Zur Bekräftigung und Erweiterung der vorläufigen Ergebnisse sollen in dieser Arbeit mehr hochaufgelöste Daten gesammelt und analysiert werden.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 YopB und YopD kolokalisieren nur partiell auf Bakterien unter Sekretionsbedingungen

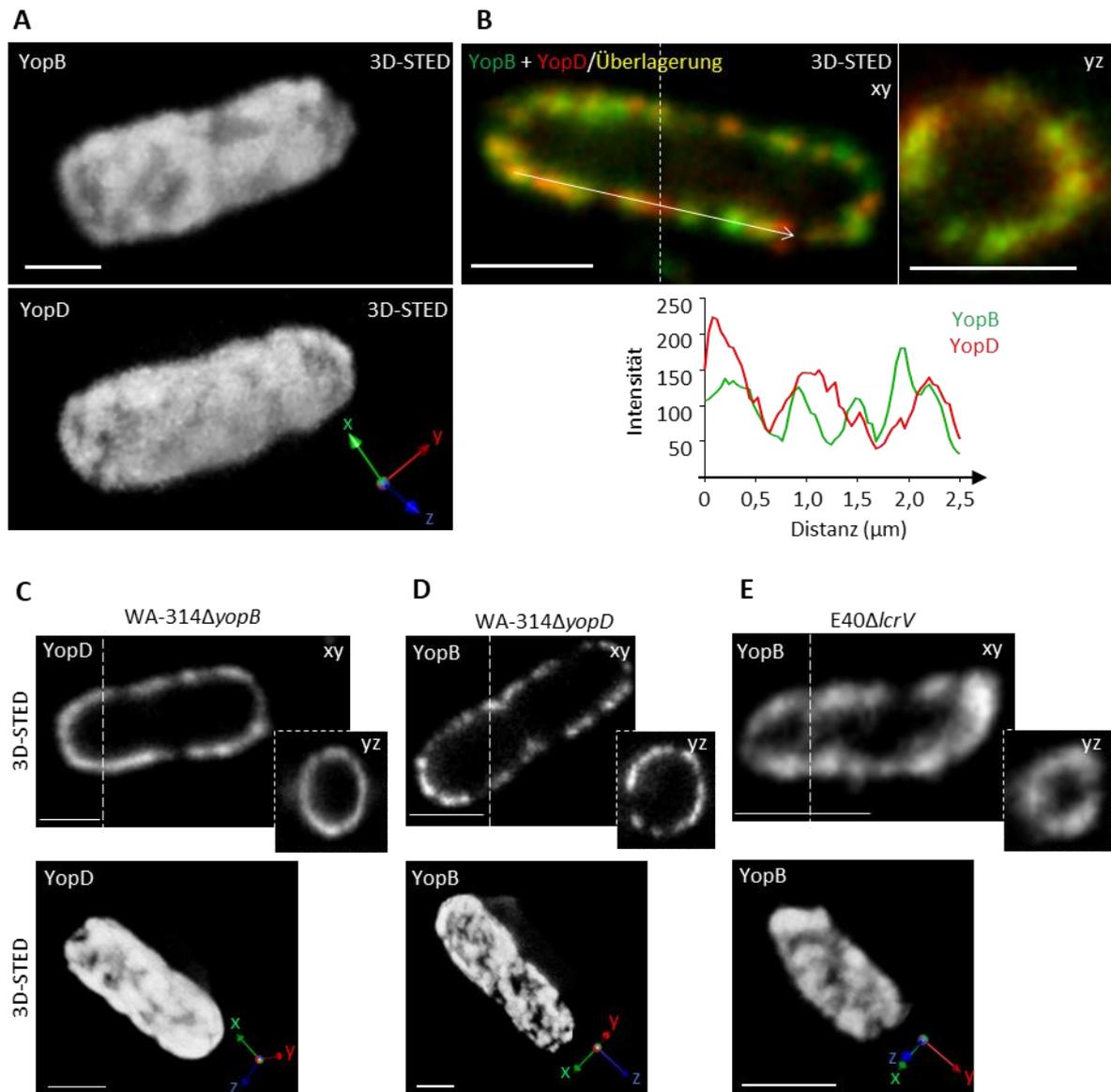
Die Ausbildung des Injektisoms und die Sekretion der Translokatoren und Effektoren können, wie aus der Literatur bekannt, *in vitro* induziert werden. Die Kultivierung von Yersinien bei 37°C aktiviert die Expression des Virulenzplasmids. Bei Calcium-Depletion des Kulturmediums wird eine starke Sekretion der mittleren und späten T3SS-Substrate beobachtet (Heesemann et al. 1986; Heesemann et al. 1984; Michiels et al. 1990). Dieser als *low calcium response* beschriebene Effekt der verstärkten Yop-Sekretion konnte auch für die hier untersuchten Translokatorproteine YopB und YopD beobachtet werden (siehe 4.1, (Huschka 2017; Nauth et al. 2018)). Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten in STED-Aufnahmen eine homogene Verteilung des Translokators YopB an der Bakterienperipherie unter Sekretionsbedingungen (Kultivierung bei 37°C + Calcium-Depletion; (Huschka 2017; Nauth et al. 2018)).

Als initialer Schritt wurde auch die Lokalisation und Verteilung des zweiten Porenproteins YopD mithilfe hochauflösender STED-Mikroskopie untersucht. Unter Sekretionsbedingungen zeigte sich in der YopD Immunfluoreszenzfärbung ein der YopB-Färbung ähnliches Muster. YopD wies eine dichte und homogene Oberflächenlokalisation auf, die sich in 2D-STED-Aufnahmen als scharf abgegrenztes Band an der Bakterienperipherie mit unregelmäßigen Intensitätsunterschieden darstellte (Abbildung 5-1).



**Abbildung 5-1 2D-STED-Aufnahmen von Wildtyp-Yersinien unter Sekretionsbedingungen bestätigen die homogene Oberflächenverteilung der Porenproteine YopB und YopD.** Yersinien wurden unter Bedingungen der Sekretion (37°C mit EGTA-Zugabe) kultiviert und mit YopB- oder YopD-Antikörpern immungefärbt. Gezeigt sind repräsentative konfokale und 2D-STED-Aufnahmen von YopB- (links) und YopD-positiven (rechts) WA-314 Bakterien. Maßstäbe: 1µm. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Zur Klärung der Frage, ob die Porenproteine YopB und YopD unter Sekretionsbedingungen eine spezifische Kollokalisierung und Verteilung auf der Bakterienoberfläche zeigen, wurden die beiden Porenproteine gleichzeitig mittels 3D-STED-Mikroskopie betrachtet. Yersinien des Wildtypstamms WA-314 wurden unter Bedingungen der Sekretion kultiviert und zur nachfolgenden Mikroskopie fixiert und mit YopB- und YopD-Antikörpern ko-immunofärbt (siehe Methoden). 3D-STED-Aufnahmen von sekretionsaktiven Yersinien zeigten auch in der Doppelfärbung das aus den Einzelfärbungen bekannte Bild. Beide Proteine konnten auf der Bakterienoberfläche in relativ homogener Verteilung gefunden werden wie in der 3D-Rekonstruktion deutlich wird (Abbildung 5-2A). Bei Betrachtung einer einzelnen z-Ebene ist in der Überlagerung der beiden Kanäle und dem dazugehörigen Intensitätsprofil jedoch ersichtlich, dass sich die lokalen Intensitätsunterschiede der beiden Färbungen nicht deckungsgleich verhalten (Abbildung 5-2B). Zur Überprüfung der Spezifität und Verteilung der Porenproteine wurden Translokator-Mutanten unter den gleichen Versuchsbedingungen untersucht. Hierzu wurden die *Yersinia*-Mutanten WA-314 $\Delta$ yopB, WA-314 $\Delta$ yopD und E40 $\Delta$ lcrV (Tabelle 7-14) unter Sekretionsbedingungen kultiviert und mit YopB- oder YopD-Antikörpern immunofärbt. 3D-STED-Aufnahmen zeigten ebenfalls eine homogene Oberflächenlokalisierung des Porenproteins YopD in YopB-defizienten Bakterien (Abbildung 5-2C). Ein ähnliches Muster konnte für YopB in den YopD- und LcrV-defizienten Yersinien beobachtet werden (Abbildung 5-2D, E). Die Deletion einzelner Komponenten des Translokons zeigte demnach keine Auswirkung auf die Lokalisation und Verteilung der Porenproteine YopB und YopD.



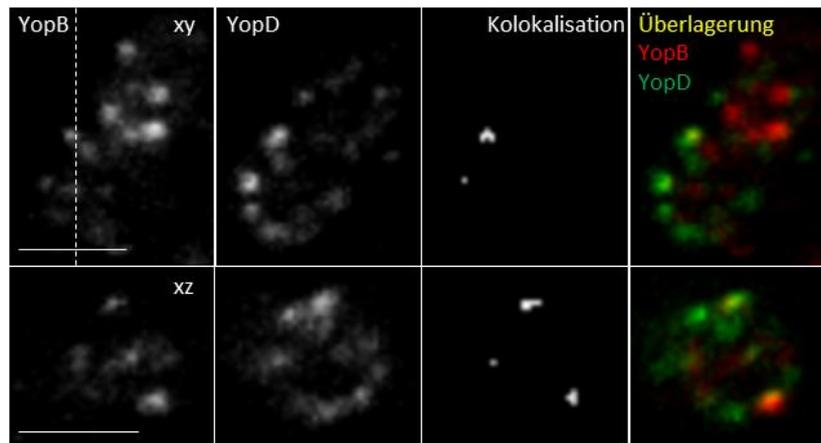
**Abbildung 5-2 3D-STED-Aufnahmen sekretionsaktiver Yersinien zeigen nur eine partielle Kolo­kalisierung der Porenproteine YopB und YopD.** Yersinien wurden unter Bedingungen der *in vitro*-Sekre­tion (37°C mit EGTA-Zugabe) kultiviert und mit YopB- und/oder YopD-Antikörpern immun­gefärbt. **(A)** Repräsentative 3D-STED-Rekonstruktionen von YopB (oben) und YopD (unten) auf der Bakterienoberfläche eines Wildtyp-Bakteriums (WA-314). **(B)** Die Überlagerung der beiden Kanäle mit YopB in grün und YopD in rot und das dazugehörige Intensitätsprofil entlang des Pfeils in der Überlagerung zeigen zueinander versetzte Intensitätsmaxima der beiden Porenproteine. Intensität in absoluten Einheiten. **(C)**, **(D)** und **(E)** zeigen repräsentative 3D-STED-Aufnahmen von YopB- oder YopD-immun­gefärbten, sekretionsaktiven *Yersinia*-Mutanten. Obere Reihe: Einzelne z-Ebene (xy) einer 3D-STED-Aufnahme. Die Einsätze zeigen die zugehörige yz-Projektion auf Ebene der gestrichelten Linie. Untere Reihe: 3D-Rekonstruktion (xyz) des in der oberen Reihe dargestellten Bakteriums. Maßstäbe: 1µm. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Zusammenfassend hat die Untersuchung der unter Sekretionsbedingungen kultivierten Yersinien gezeigt, dass die Porenproteine YopB und YopD relativ homogen auf der Bakterienoberfläche verteilt sind. Es konnten keine Gruppierungen oder definierte Verteilungsmuster festgestellt werden. Die lokal unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten in der YopB-YopD-Doppelfärbung der

Wildtyp-Yersinien deutet darauf hin, dass es sich hierbei nicht um assemblierte Porenkomplexe handeln kann. Die gleichermaßen homogene und dichte Verteilung von YopB und YopD bei den Mutanten des jeweiligen anderen Translokators und des *Tip*-Komplexproteins LcrV lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich um eine Aggregation von Proteinen auf der Bakterienoberfläche handelt.

## 5.2 LcrV wird für die Assemblierung des Translokons bei der Wirtszellinfektion benötigt

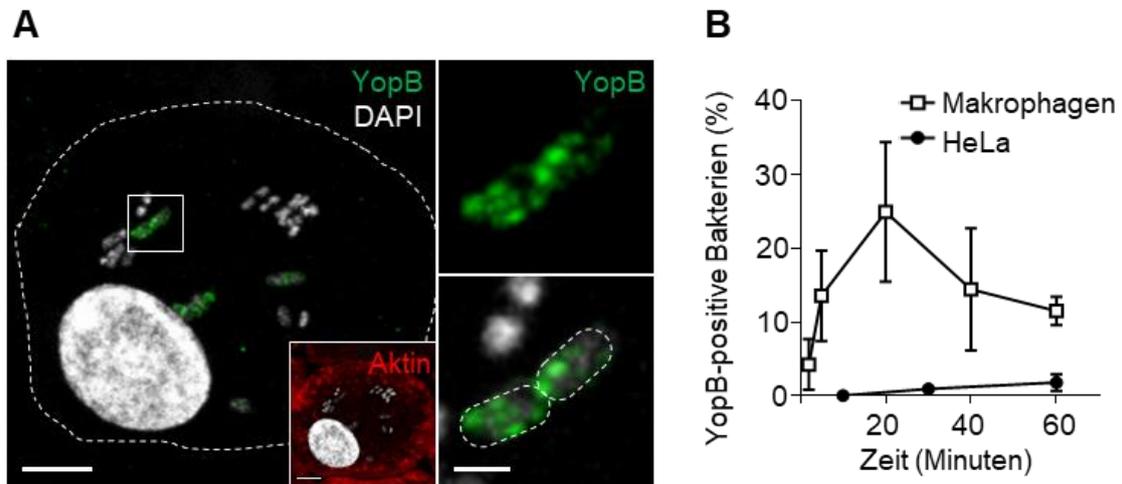
STED-Fluoreszenzbilder zeigten eine enge räumliche Nähe der drei Translokatoren YopB, YopD und LcrV (siehe 4.2, (Huschka 2017; Nauth et al. 2018)). Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass LcrV eine wichtige Rolle in der Ausbildung des Translokons spielt. Der hydrophile Translokator LcrV wird als pentamerer Komplex am distalen Ende der Nadel beschrieben, der hier vermutlich eine Plattform zur Assemblierung der Pore bildet und Kontakt zur Nadel vermittelt (Mueller et al. 2005; Goure et al. 2004; Goure et al. 2005; Broz et al. 2007; Mueller et al. 2008). Daraus ergab sich die Frage, ob die Ausbildung der Translokationspore in der Wirtszellinfektion LcrV-abhängig ist. Hierzu sollte unter Bedingungen der Wirtszellinfektion überprüft werden, ob YopB und YopD in Abwesenheit von LcrV kolokalisieren. HeLa-Zellen wurden mit dem *lcrV*-defizienten Yersinienstamm E40Δ/*crV* für eine Stunde infiziert und mit anti-YopB und anti-YopD-Antikörpern ko-immungefärbt. 3D-STED-Aufnahmen der dual-immungefärbten Proben zeigten eine punktförmige Verteilung beider Translokatorproteine auf der Bakterienoberfläche (Abbildung 5-3). YopB- und YopD-Signale konnten in unterschiedlichen Ebenen und Bereichen auf der Bakterienoberfläche detektiert werden (Abbildung 5-3 zeigt eine einzelne z-Ebene). Eine Kolokalisationsanalyse von YopB und YopD (siehe Methoden, ImageJ Plug-In „Colocalization“) identifizierte nur wenige kolokalisierende Fluoreszenzpunkte (siehe Kolokalisation Abbildung 5-3). Die Daten zeigen, dass die Porenproteine YopB und YopD bei Infektion mit der LcrV-Deletionsmutante E40Δ/*crV* nicht kolokalisieren (Abbildung 5-3).



**Abbildung 5-3 Die LcrV-Plattform wird für die Assemblierung des Translokons bei der Wirtszellinfektion benötigt.** HeLa-Zellen wurden mit E40 $\Delta$ lcrV Bakterien infiziert (60 Minuten, *multiplicity of infection* (MOI) 50) und ko-immunofärbt mit polyklonalen Ratten anti-YopB und Kaninchen anti-YopD Antikörpern, gefolgt von anti-Ratte AlexaFluor594 und anti-Kaninchen AbberiorStarRed Sekundärantikörpern. Die Aufnahmen erfolgten im 80%igen 3D-STED-Modus. Repräsentative Bilder zeigen einzelne z-Ebenen von E40 $\Delta$ lcrV in der HeLa-Zellinfektion. In der unteren Reihe sind die xz-Projektionen auf Ebene der gestrichelten Linie dargestellt. Kolocalisierende Punkte wurden durch das ImageJ Plug-In „Colocalization“ generiert und dargestellt. Die Überlagerung zeigt beide Kanäle und verdeutlicht kolocalisierende Fluoreszenzpunkte (gelb). Maßstab: 1 $\mu$ m. Die Daten sind Bestandteil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

### 5.3 Visualisierung von YopB und YopD bei der Infektion von primären humanen Makrophagen

Nach Passage der M-Zellen treffen Yersinien in den Peyer-Plaques des Ileums auf Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen, Neutrophile sowie auf Granulozyten (Cornelis et al. 1998; Marketon et al. 2005; Köberle et al. 2009; Durand et al. 2010). Um die Translokatoren unter Infektionsbedingungen in einer möglichst physiologischen Umgebung zu untersuchen, wurden neben HeLa-Zellen primäre humane Makrophagen mit *Y. enterocolitica* WA-314 (Tabelle 7-14) infiziert. Bezogen auf die individuelle Bakterienzelle zeigte die Immunfluoreszenzfärbung der Porenproteine in der Makrophagen-Infektion ein ähnliches Bild wie in der HeLa-Zellinfektion. Die Translokatorproteine YopB und YopD wurden stets Bakterien-assoziiert und in punktförmiger, teils konfluierender Verteilung auf der gesamten Bakterienoberfläche gefunden (siehe zum Vergleich Abbildung 4-2 und Abbildung 5-4).



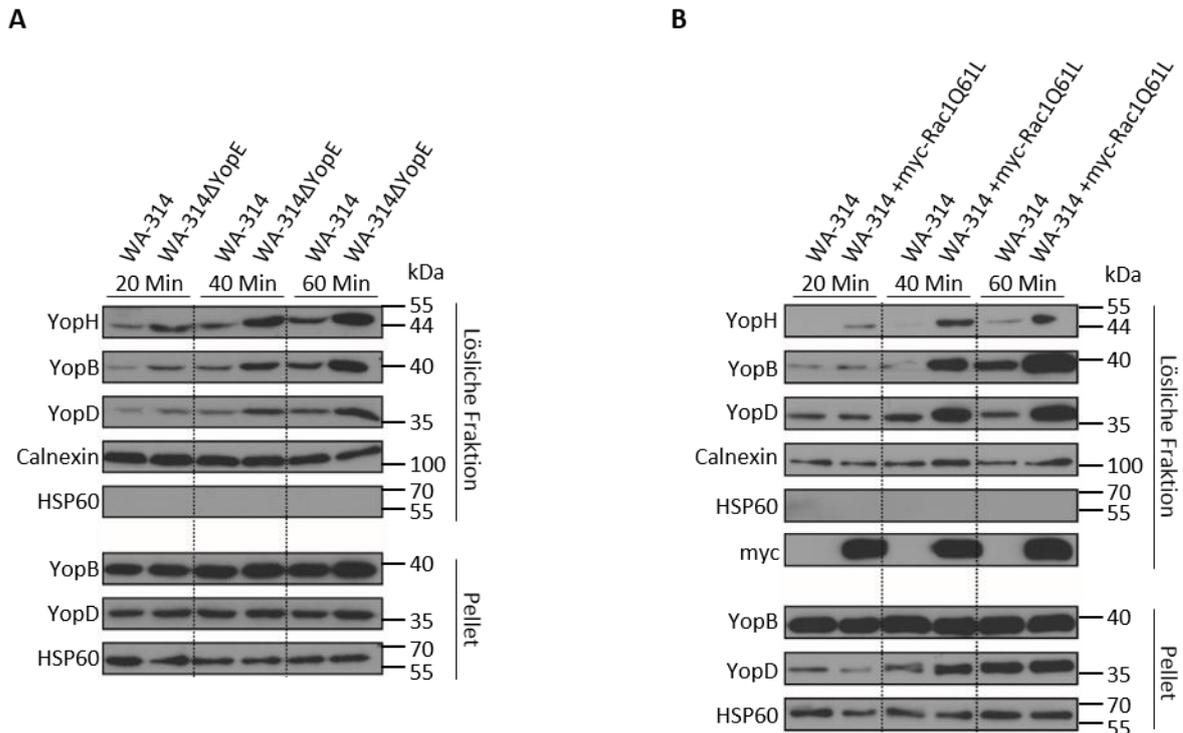
**Abbildung 5-4 Der Zelltyp beeinflusst den Anteil der YopB-positiven Bakterien.** (A) Repräsentatives konfokales Bild eines Makrophagen, infiziert mit biotinylierten Wildtyp-Yersinien (WA-314) für 20 Minuten im Verhältnis 20:1. Infizierte Zellen wurden fixiert, permeabilisiert (0,1% Triton X100) und mit anti-YopB-Antikörpern (grün, Alexa488) und DAPI (weiß) immungefärbt. Die gestrichelte Linie markiert die Zellbegrenzung. Im Einsatz unten rechts ist die Zelle durch eine Phalloidin-Färbung dargestellt (rot). Eine 5-fache Vergrößerung (rechts) zeigt ein YopB-positives Bakterium. Die Bakterienform ist mithilfe einer gestrichelten Linie verdeutlicht. Maßstab: 5 µm in der Übersicht, 1 µm in der Vergrößerung. (B) HeLa-Zellen und Makrophagen wurden mit Wildtyp-Yersinien über den Zeitraum einer Stunde infiziert, fixiert, permeabilisiert und mit anti-YopB-Antikörpern immungefärbt. Die Infektion erfolgte im Bakterien-Zell-Verhältnis von 50:1 bei der HeLa-Zellinfektion und 10:1 bei der Makrophagen-Infektion. Die YopB-positiven Bakterien wurden gezählt und die Fraktion der YopB-positiven Bakterien ist im Verhältnis zu allen Zell-assoziierten Bakterien im Graph dargestellt. Der Graph zeigt die Mittelwerte ± Standardabweichung der Auswertung von n=4210 Bakterien bei der HeLa-Zellinfektion aus zwei unabhängigen Experimenten und n=3047 Bakterien bei der Makrophagen-Infektion von drei verschiedenen Donoren. Die Daten der HeLa-Zellinfektion wurden von F. Huschka experimentell erhoben und analysiert (Huschka 2017). Die Daten sind Bestandteil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Betrachtet man während der Zellinfektion den Anteil der YopB-positiven Bakterien über eine Stunde, zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Zelltypen. Unmittelbar nach Zellkontakt mit Makrophagen zeigten bereits durchschnittlich 4% der Zell-assoziierten Bakterien ein YopB-Signal (Abbildung 5-4B). Der Anteil YopB-positiver Bakterien steigerte sich bis zum 20 Minuten Wert auf rund 25% der Zell-assoziierten Bakterien. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl YopB-positiver Bakterien wieder ab und sank nach 60 Minuten auf 10% der Zell-assoziierten Bakterien. Im Vergleich konnte in der HeLa Zell-Infektion ein maximaler Anteil von 2% YopB-positiver Bakterien nach 60-minütiger Infektion beobachtet werden. Zu früheren Zeitpunkten nach 10 (0,5%) und 30 Minuten (0,95%) Infektion zeigten weniger als 1% der Zell-assoziierten Bakterien eine YopB-Positivität (Abbildung 5-4B).

## 5.4 Bakterielle und zelluläre Faktoren beeinflussen die Ausbildung des Translokons und die Translokation bei der Zellinfektion

Die Translokation der Effektorproteine unterliegt verschiedenen bakteriellen und zellulären Regulationsmechanismen. Das Effektorprotein YopE wurde neben seiner anti-phagozytischen Funktion als negativ regulierender Faktor der Yop-Translokation beschrieben. Als Rho-GTPasen-aktivierendes Protein interagiert YopE mit der kleinen Rho-GTPase Rac1 und inaktiviert diese. Eine Deletion von YopE führt daher zur gesteigerten Aktivität von Rac1, was eine gesteigerte Translokation der Effektorproteine zur Folge hat (Black und Bliska 2000; Pawel-Rammingen et al. 2000). Wird eine konstitutiv aktive Form der Rho-GTPase Rac1 exprimiert, kann eine 5 bis 10-fach gesteigerte Effektor-Yop-Translokation beobachtet werden (Wolters et al. 2013; Aili et al. 2008; Aepfelbacher und Wolters 2017). Mit der Visualisierung des Translokons war es nun möglich zu untersuchen, ob die für WA-314 $\Delta$ yopE und konstitutiv aktives Rac1 beobachtete gesteigerte Translokation der Effektorproteine mit einer gleichen oder erhöhten Zahl Translokon-positiver Bakterien einhergeht. Ersteres würde für eine Steigerung der Translokation individueller Bakterien und letzteres für die Aktivierung eines größeren Anteils der Zell-assoziierten Bakterien sprechen.

In einem ersten Schritt sollten die vorbeschriebenen Bedingungen der gesteigerten Translokation unter den eigenen Versuchsbedingungen reproduziert und untersucht werden. Es sollte insbesondere überprüft werden, ob die gesteigerte Effektortranslokation auch von einer gesteigerten Freisetzung der Translokatorproteine begleitet wird. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den *Yersinia*-Stämmen WA-314 und WA-314 $\Delta$ yopE infiziert und nach 20, 40 und 60 Minuten lysiert. Gleichermaßen wurden HeLa-Zellen, die eine konstitutiv aktive Form der GTPase Rac1 überexprimierten, mit WA-314 infiziert und für nachfolgende Western Blot-Analysen lysiert. Die Überexpression der konstitutiv aktiven Form von Rac1 erfolgte mittels eines in HeLa-Zellen transfizierten eukaryotischen myc-Expressionsvektors (myc-Rac1Q61L). Als Kontrolle diente die Transfektion des myc-Leervektors in HeLa-Zellen.



**Abbildung 5-5 Biochemischer Nachweis der gesteigerten Zellintegration von Effektoren sowie der Translokatoren YopB und YopD unter Bedingungen der künstlich gesteigerten Translokation.** HeLa-Zellen wurden mit WA-314 und WA-314 $\Delta$ yopE für 20, 40 und 60 Minuten infiziert (MOI 100), mit Digitonin lysiert und in eine lösliche, zytoplasmatische Fraktion und ein Membran-Bakterien-Pellet fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Der Effektor YopH diente als Maß für die Translokation, HSP60 als bakterielle Lade- und Lyse-Kontrolle, Calnexin als zelluläre Ladekontrolle, Myc als Transfektionskontrolle. Repräsentative Western Blot-Bilder für n=3 unabhängige Experimente. Die Experimente in (A) wurden zu Teilen von Dr. Manuel Wolters durchgeführt. **(A)** Die Deletion des Effektors YopE führte zur gesteigerten Translokation von Effektoren (YopH) und Translokatoren (YopB, YopD) mit ansteigender Menge in der löslichen Zytoplasma-Fraktion im Zeitverlauf. **(B)** Die Expression von konstitutiv aktivem Rac1 in HeLa-Zellen steigerte die Effektor-Translokation (YopH) und die Fraktion der Translokatoren (YopB, YopD) im Zytoplasma im Zeitverlauf. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

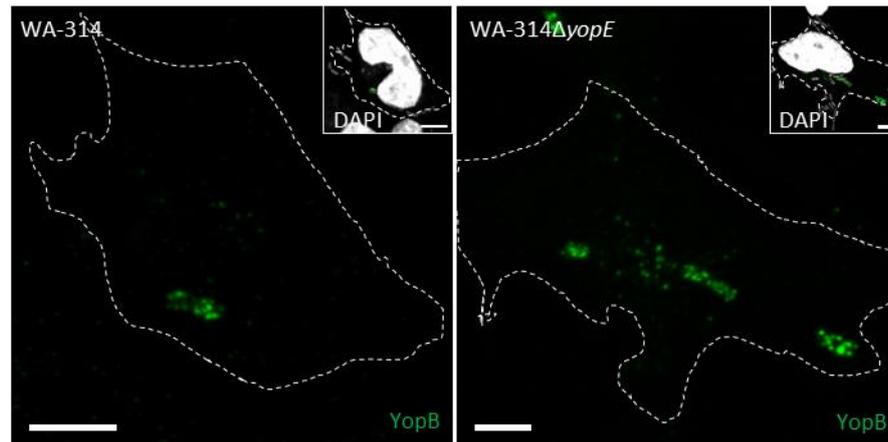
Zur Zelllyse wurde Digitonin verwendet, weil es in der verwendeten Konzentration (0,5% in phosphatpufferter Kochsalzlösung, PBS) spezifisch eukaryotische Zellen, nicht aber Bakterien lysiert. Die Lyse und Fraktionierung erfolgte nach Nordfelth et al. (Nordfelth und Wolf-Watz 2001) in eine Digitonin-lösliche, zytoplasmatische Fraktion und in ein Membranpellet bestehend aus Zellmembranen und daran gebundenen, intakten Bakterien. Wie in der Pellet-Fraktion im unteren Teil von Abbildung 5-5 zu erkennen, konnten die Translokatorproteine YopB und YopD über einen Infektionszeitraum von 60 Minuten im Pellet nachgewiesen werden. Als bakterielle Lade- und Lysekontrolle diente das bakterienspezifische Hitzeschockprotein HSP60. Das Effektorprotein YopH, welches als zytoplasmatisches Effektorprotein beschrieben wurde (Black et al. 2000), diente als Indikator für die Effektortranslokation. Die Translokation und damit die Anreicherung des Effektors YopH in der löslichen Digitonin-Fraktion steigerte sich im Zeitverlauf bis 60 Minuten in allen

untersuchten Bedingungen (Abbildung 5-5A und B). Gleichzeitig wurde die Freisetzung der Porenproteine YopB und YopD im Zeitverlauf unter Bedingungen der Wildtyp-Infektion und der Hypertranslokation (Infektion mit der YopE-Deletionsmutante/Überexpression von aktivem Rac1 in HeLa-Zellen) untersucht. In der löslichen Fraktion diente Calnexin als zelluläre Ladekontrolle.

Im Vergleich zu Infektionen mit Wildtyp-Yersinien konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten für WA-314 $\Delta$ yopE-infizierte Zellen eine Steigerung der Bandenintensität von YopB und YopD in der Digitonin-löslichen Fraktion detektiert werden. Dieser Anstieg von YopB und YopD in der zytoplasmatischen Fraktion korrelierte stets mit der gleichermaßen gesteigerten YopH-Translokation (Abbildung 5-5A).

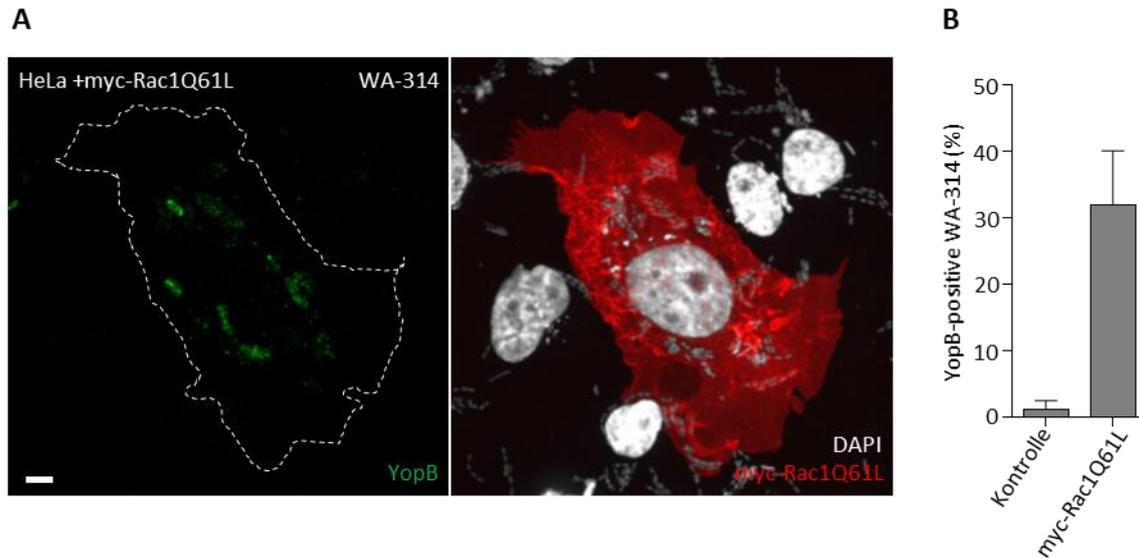
In WA-314-infizierten und mit dem myc-Rac1Q61L-Expressionsvektor transfizierten Zellen konnte verglichen mit Kontroll-transfizierten Zellen (myc-Leervektor) ebenfalls eine gesteigerte Freisetzung von YopH und der Porenproteine YopB und YopD in die lösliche Fraktion beobachtet werden. Kontroll-transfizierte Zellen zeigten in der Translokation von Effektoren und Translokatoren keinen signifikanten Unterschied zu unbehandelten Zellen nach Infektion mit WA-314 (Vergleich WA-314 in Abbildung 5-5A und B).

Unter Bedingungen der Hypertranslokation konnte neben der bekannten verstärkten Effektor-Translokation eine simultane, gesteigerte Freisetzung der Porenproteine YopB und YopD nachgewiesen werden (Abbildung 5-5A und B). Zur Untersuchung der daraus resultierenden Frage, ob diese gesteigerte Translokation der Porenproteine durch eine vermehrte Porenbildung individueller Bakterien oder durch eine vermehrte Anzahl Poren-bildender Bakterien bedingt ist, erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung von *Yersinia*-infizierten HeLa-Zellen unter Bedingungen der Hypertranslokation. Vorversuche aus der Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass der Verlust des Effektors YopE die Anzahl der YopB-positiven Bakterien beeinflusst. Bei Infektionen mit der YopE-Effektormutante (WA-314 $\Delta$ yopE) konnte der Anteil der YopB-positiven Bakterien aller Zell-assoziierten Bakterien im Vergleich zur Wildtyp-Infektion um das 15-fache gesteigert werden (Huschka 2017; Nauth et al. 2018). Abbildung 5-6 zeigt beispielhaft WA-314 (links) und WA-314 $\Delta$ yopE (rechts) infizierte HeLa-Zellen, in denen das Porenprotein YopB mit YopB-Antikörpern immungefärbt wurde.



**Abbildung 5-6 Deletion des Effektors YopE steigert die Anzahl YopB-positiver Bakterien in der Zellinfektion.** HeLa-Zellen wurden mit WA-314 oder WA-314 $\Delta$ yopE mit MOI 50 für 1 Stunde infiziert, fixiert, permeabilisiert und mit YopB-Antikörpern (grün) immungefärbt. Gestrichelte Linien zeigen die Zellgrenzen. Die Einsätze zeigen eine zusätzliche DAPI-Färbung, die den Nukleus der Zelle und die bakterielle DNA markiert. Maßstäbe: 5  $\mu$ m. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Analog zur Infektion mit der YopE-Deletionsmutante wurde auch die Stimulation der Translokation durch Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 in Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. HeLa-Zellen wurden hierzu mit einem aktiven Rac1-Expressionsplasmid oder mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert und nachfolgend mit WA-314 Bakterien für eine Stunde infiziert. Anschließend wurden die Proben fixiert und mit YopB-Antikörpern immungefärbt. Aufgrund der hohen Zytotoxizität und um die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu erleichtern, wurde hier eine niedrigere Infektionsrate als in den Western Blot-Analysen gewählt. In drei unabhängigen Experimenten wurden die Zell-assoziierten Bakterien auf YopB-Positivität überprüft und quantifiziert. Die Anzahl der YopB-positiven Bakterien konnte durch die Überexpression von aktivem myc-Rac1Q61L in der Zielzelle deutlich gesteigert werden (Abbildung 5-7). Die Expression der Rho-GTPase Rac1 in der HeLa-Zelle ist hier durch eine Immunfärbung mit myc-Antikörpern (rot, Abbildung 5-7A) visualisiert. Umliegende Zellen zeigten keine aktive Rac1-Expression und interessanterweise nahezu keine Immunfärbung für YopB, obgleich diese Zellen ebenfalls von Yersinien infiziert sind wie im DAPI-Kanal deutlich sichtbar ist (Abbildung 5-7A, rechts). Eine Quantifizierung aller Zell-assoziierten Bakterien zeigte eine nur kleine Fraktion YopB-positiver Bakterien auf unbehandelten HeLa-Zellen (~2%, Abbildung 5-7B) und bestätigte die signifikante Erhöhung der Anzahl der YopB-positiven Bakterien durch die Überexpression von aktivem Rac1 in HeLa-Zellen. Der Anteil der YopB-positiven Bakterien bezogen auf alle Zell-assoziierten Bakterien konnte um das 15-fache gesteigert werden (30%, Abbildung 5-7B).



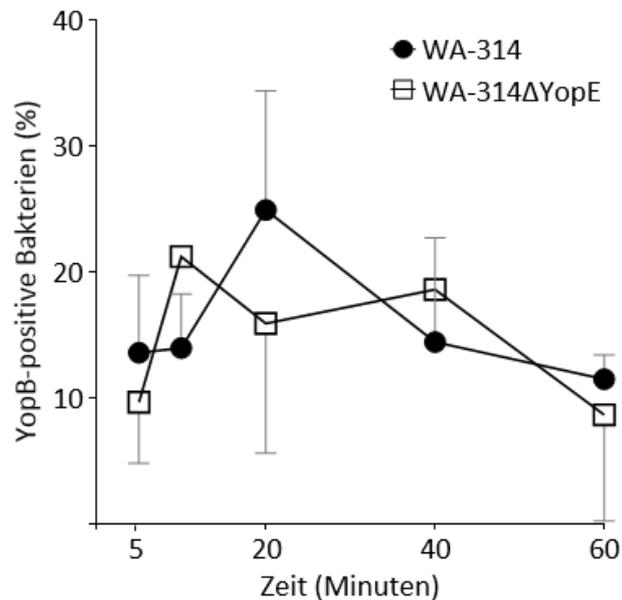
**Abbildung 5-7 Konstitutiv aktives Rac1 steigert die Anzahl der Translokator-bildenden Bakterien.** Mit dem myc-Rac1Q61L-Expressionsvektor oder Leervektor (Kontrolle) transfizierte HeLa-Zellen wurden mit WA-314 für eine Stunde infiziert (MOI 50), fixiert, permeabilisiert und mit YopB-Antikörpern immungefärbt. **(A)** Repräsentatives Bild einer Rac1-überexprimierenden Zelle in der Infektion mit Wildtyp-Yersinien. Die YopB-positiven Bakterien (grün) sind ausschließlich auf der transfizierten Zelle zu finden. Die aktive Rac1-Expression wurde durch eine myc-Antikörper-Färbung (rot) visualisiert. Zellkerne und bakterielle DNA wurden mit DAPI angefärbt (weiß). Die gestrichelte Linie zeigt die Zellbegrenzung der Rac1-exprimierenden HeLa-Zelle. Maßstab: 5  $\mu$ m. **(B)** Quantifizierung der YopB-positiven Bakterien. Der Anteil der YopB-positiven Bakterien von allen Zell-assoziierten Bakterien wurde für n=3423 WA-314 Bakterien auf kontroll-transfizierten Zellen und n=7882 WA-314 Bakterien auf myc-Rac1Q61L-transfizierten Zellen quantifiziert. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen unter Bedingungen der Hypertranslokation (Infektion mit YopE-Effektormutante/Überexpression von aktivem Rac1 in HeLa-Zellen) deuten auf eine Erhöhung der Anzahl der Translokation-bildenden Bakterien pro Wirtszelle hin. Eine Aussage zur zusätzlich möglichen vermehrten Porenbildung pro Bakterium konnte anhand von konfokaler Mikroskopie und biochemischen Immunblot-Analysen nicht getroffen werden. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die hochauflösende STED-Mikroskopie verwendet. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt (siehe 5.4.2).

#### 5.4.1 Die YopE-Deletionsmutante WA-314 $\Delta$ yopE hat keinen Einfluss auf die Ausbildung des Translokons in Makrophagen

Der Anteil YopB-positiver Wildtyp-Bakterien unterschied sich deutlich zwischen infizierten HeLa-Zellen und Makrophagen (5.3). In Makrophagen konnte ein signifikant höherer Anteil Translokation-bildender Bakterien im Vergleich zu HeLa-Zellen beobachtet werden (5.3). Bei Infektion von HeLa-Zellen mit einer WA-314-Mutante, die eine Deletion des GTPase-aktivierenden Proteins YopE aufwies, konnte ein ähnlich hoher Anteil YopB-positiver Bakterien wie bei der Infektion von

Makrophagen detektiert werden (5.4). Als nächstes galt es daher zu untersuchen, ob der in HeLa-Zellen beobachtete Effekt der gesteigerten Anzahl der Translokator-positiven Bakterien bei Infektion mit der YopE-Effektormutante auch in den physiologisch-relevanten Makrophagen zu finden ist.



**Abbildung 5-8 Die Deletion des Effektorproteins YopE in Yersinien hat keinen Einfluss auf den Anteil der YopB-positiven Bakterien bei der Makrophageninfektion.** Makrophagen wurden mit den *Yersinia*-Stämmen WA-314 und WA-314ΔyopE über einen Zeitraum von 60 Minuten infiziert (MOI 10), fixiert, permeabilisiert und mit anti-YopB-Antikörpern immungefärbt. Alle Zell-assoziierten Bakterien wurden auf YopB-Positivität überprüft. Dargestellt ist der Anteil der YopB-positiven Bakterien von allen Zell-assoziierten Bakterien. Hierzu wurden n = 3047 WA-314 in drei unabhängigen Experimenten und n = 1822 WA-314ΔyopE aus zwei unabhängigen Experimenten ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von jeweils 10 analysierten Makrophagen pro Zeitpunkt und Donor. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

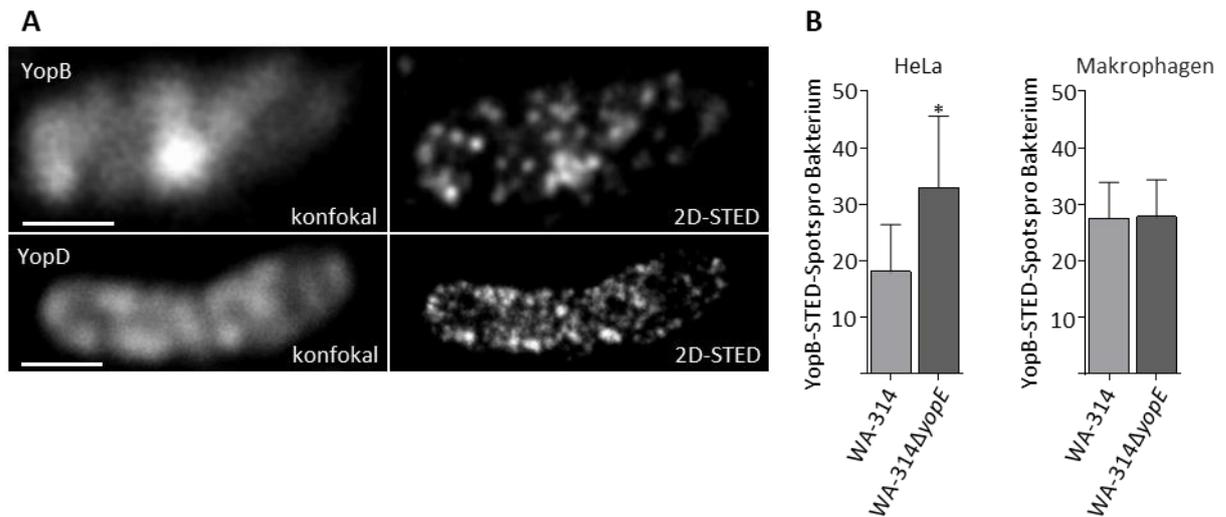
Primäre Makrophagen wurden mit den *Yersinia*-Stämmen WA-314 und WA-314ΔyopE infiziert, fixiert, permeabilisiert und mit anti-YopB-Antikörpern immungefärbt. Der Anteil YopB-positiver Bakterien in der Infektion mit WA-314ΔyopE unterschied sich nicht signifikant vom Wildtyp (Abbildung 5-8). Der Effekt der gesteigerten Porenbildung durch die Deletion des Effektors YopE in *Yersinia* konnte in Makrophagen nicht beobachtet werden.

#### 5.4.2 STED-Mikroskopie zeigt unterschiedliche Anzahl von Translokons pro Bakterium

*Yersinia*-infizierte HeLa-Zellen zeigten in Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blot-Analysen jeweils unter Verwendung eines YopB-spezifischen Antikörpers eine erhöhte Fraktion YopB-positiver Bakterien unter Bedingungen der Hypertranslokation (5.4). Konfokale Aufnahmen der Translokatorproteine beantworteten jedoch nicht die Frage, ob die gesteigerte Anzahl

YopB-positiver Bakterien mit einer vermehrten Porenbildung einhergeht (5.4). Mit einer Auflösung von  $\sim 200$  nm in der konfokalen Mikroskopie, war es nicht möglich die im Außendurchmesser vermutlich 13 nm großen Translokationsporen aufzulösen (Park et al. 2018). Wie aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bekannt, lässt sich mithilfe der STED-Mikroskopie ein konfokaler YopB-Fluoreszenzfleck in durchschnittlich drei STED-Fluoreszenzpunkte auflösen, die möglicherweise Translokationsporen repräsentieren (Huschka 2017; Nauth et al. 2018). Für eine detaillierte Untersuchung der Porenproteine unter verschiedenen Infektionsbedingungen wurde daher die STED-Mikroskopie angewandt.

HeLa-Zellen und primäre humane Makrophagen wurden mit WA-314 und WA-314 $\Delta$ yopE Bakterien infiziert. Die Infektionen erfolgten unter den zuvor beschriebenen Bedingungen. HeLa-Zellen wurden für eine Dauer von 60 Minuten und Makrophagen für eine Dauer von 20 Minuten mit Yersinien infiziert. Die Proben wurden fixiert, permeabilisiert und mit anti-YopB-Antikörpern, gefolgt von STED-kompatiblen Sekundärantikörpern, immungefärbt (siehe Methoden). Die Aufnahmen erfolgten im 2D-STED-Modus, sowie im 3D-STED-Modus zur Quantifizierung der Fluoreszenzpunkte. Besonders bei der Infektion von Makrophagen konnten konfokale YopB-Fluoreszenzflecke zum Teil kaum als Einzelpunkte unterschieden werden (Abbildung 5-9). Erst die Anwendung der STED-Mikroskopie ermöglichte die Auflösung der YopB- und YopD-Signale in einzelne punktförmige Signale (Abbildung 5-9A). Bei Infektion mit Wildtyp-Yersinien konnte ein signifikanter, 1,5-facher Unterschied von durchschnittlich 18 Fluoreszenzpunkten pro Bakterium auf HeLa-Zellen und rund 30 Fluoreszenzpunkte pro Bakterium auf Makrophagen detektiert werden (Abbildung 5-9B,  $P < 0,05$ ). Die im Vergleich zu HeLa-Zellen deutlich höhere Dichte an mittels STED-Mikroskopie aufgelösten punktförmigen Translokator-Signalen ist vermutlich die Ursache für die in der konfokalen Auflösung teils konfluierenden, fleckförmigen YopB/D Signale bei der Infektion von Makrophagen (Abbildung 5-4A, Abbildung 5-9A). Bei Infektion mit der YopE-Effektormutante konnte in HeLa-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Yersinien eine signifikant höhere Anzahl an mittels STED-Mikroskopie aufgeflösten YopB-Fluoreszenzpunkten pro WA-314 $\Delta$ yopE Bakterium detektiert werden (Abbildung 5-9B,  $*P < 0,05$ ).



**Abbildung 5-9 STED-Mikroskopie zeigt Unterschiede in der Anzahl der Fluoreszenzpunkte pro Bakterium abhängig von den Wirtszellen und dem infizierenden Yersinienstamm.** HeLa-Zellen wurden für 60 Minuten im Verhältnis 100:1 und primäre humane Makrophagen wurden für 20 Minuten im Verhältnis 20:1 jeweils mit den *Yersinia*-Stämmen WA-314 und WA-314ΔyopE infiziert. Die infizierten Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und immungefärbt mit anti-YopB- oder anti-YopD-Antikörpern und STED-geeigneten Sekundärantikörpern (AbberiorStarRed oder Abberior635P). Die Aufnahmen erfolgten im 2D- und 3D-STED-Modus. (A) repräsentative konfokale und 2D-STED-Bilder von für YopB und YopD immungefärbten Yersinien in der Makrophagen-Infektion. (B) Die Anzahl der Fluoreszenzpunkte pro Bakterium wurde mithilfe der Software Imaris bestimmt (siehe Methoden). Durchschnittliche Werte  $\pm$  Standardabweichung sind im Balkendiagramm dargestellt. Datenpunkte in der HeLa-Infektion, n = Anzahl der quantifizierten Bakterien: n = 20 WA-314, n = 27 WA-314ΔyopE; Datenpunkte in der Makrophagen-Infektion: n = 55 WA-314 und n = 7 WA-314ΔyopE. Die Daten wurden in 1-3 unabhängigen Experimenten erfasst. Die Datenpunkte der WA-314 infizierten HeLa-Zellen wurden von F. Huschka erhoben (Huschka 2017). Die Auswertung der normalverteilten Datenpunkte erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test. \*P < 0.05. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bakterielle sowie zelluläre Faktoren die Anzahl der YopB/D-Fluoreszenzpunkte pro Bakterienzelle beeinflussen. Besonders hervorzuheben ist, dass die Zahl der Signale pro Bakterium stark durch den Wirtszelltyp beeinflusst wurde. Der Verlust des bakteriellen Effektors YopE beeinflusste die Zahl der YopB/D-Fluoreszenzpunkte pro Bakterium nur bei der Infektion von HeLa-Zellen positiv, nicht jedoch bei der Infektion von Makrophagen.

#### 5.4.3 Translokons zeigen gruppierte Anordnung während der Wirtszellinfektion

Kürzlich konnte in Sekretionsexperimenten für *Y. enterocolitica* die Ausbildung von gruppierten Injektisomen beobachtet werden. Bei Aktivierung des T3SS durch Calcium-Depletion bildeten sich neue Injektisome in den regelmäßig auf der Bakterienoberfläche verteilten Injektisom-Gruppen und nicht an neuen Positionen (Kudryashev et al. 2015). Da unklar ist, inwieweit die durch Calcium-Depletion künstlich induzierte Sekretion von T3SS-Komponenten die physiologischen Bedingungen einer Wirtszellinfektion wiedergibt, wird in dieser Arbeit die räumliche Anordnung der STED-aufgelösten YopB/D-Fluoreszenzpunkte während der Zellinfektion näher analysiert. Ziel

dieser Analyse war es, die Verteilung von YopB-Fluoreszenzpunkten hinsichtlich ihrer räumlichen Anordnung und auf mögliche Gruppierungen zu untersuchen. Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass mithilfe hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie einzelne konfokale YopB-Fluoreszenzflecken in durchschnittlich drei Fluoreszenzpunkte aufgelöst werden können, was auf eine enge Gruppierung der Translokons hindeutete (Huschka 2017; Nauth et al. 2018).

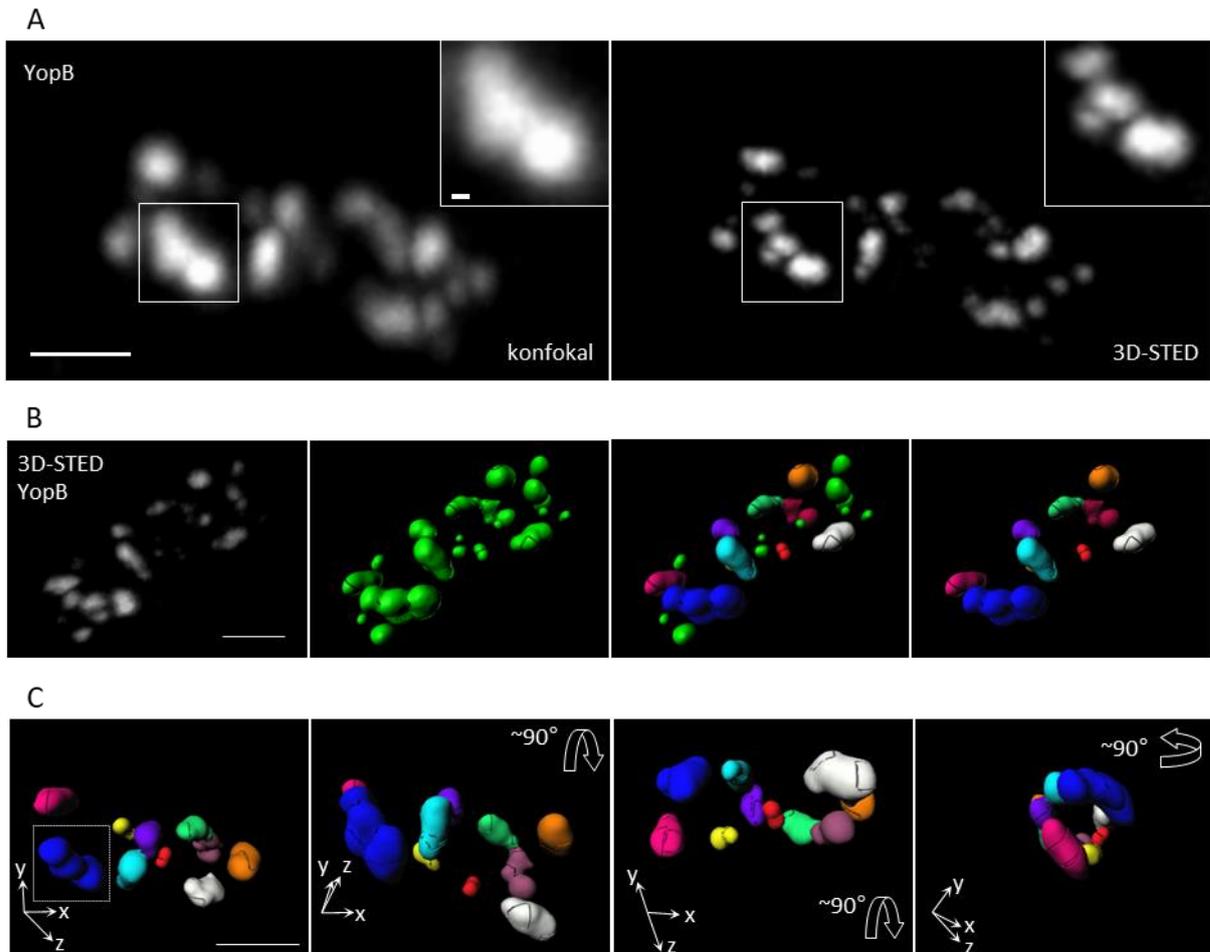
Zur Untersuchung der YopB-Verteilung auf der Bakterienoberfläche unter Bedingungen der Wirtszellinfektion, wurden HeLa-Zellen mit Wildtyp-Yersinien infiziert. Zur einfacheren Detektion von YopB-positiven Bakterien wurden die HeLa-Zellen mit dem eukaryotischen Expressionsvektor myc-Rac1Q61L transfiziert, was zu einer Überexpression von aktivem Rac1 und einem größeren Anteil YopB-positiver Bakterien führte (5.4, Abbildung 5-7). Nach einstündiger Infektion wurden die Proben fixiert und mit anti-YopB-Antikörpern und STED-kompatiblen Sekundäantikörpern immungefärbt. Einzelne YopB-positive Bakterien wurden im 3D-STED-Modus aufgenommen und analysiert.

Mit einer Auflösung von etwa 80 nm in der lateralen und etwa 100 nm in der axialen Ebene war eine umfassende Analyse der Verteilung und Anordnung der punktförmigen YopB-Signale auf der Bakterienoberfläche möglich (Aufnahmen im 80%igen 3D-STED-Modus). Hierzu wurden die Fluoreszenzpunkte aus 3D-Aufnahmen einzelner Bakterien hinsichtlich ihrer durchschnittlichen Größe und Lage zueinander untersucht. Eine Auswertung mit dem Bildverarbeitungsprogramm Imaris ermöglichte eine Detektion und Segmentierung einzelner Fluoreszenzpunkte (Abbildung 5-10A, Segmentierung in einzelne Sphären (grün); Methoden). Die hierbei gewonnenen Informationen zu deren Position und Volumen konnten mittels eines Matlab-Skripts ausgewertet werden (Methoden). Der ermittelte, durchschnittliche Durchmesser eines Fluoreszenzpunktes von 100 nm definierte sich durch die Halbwertsbreite seines Fluoreszenzprofils (FWHM, *Full Width at Half Maximum*, Halbwertsbreite, Auflösung  $\sim 100$  nm).

Eine Analyse von 64 Fluoreszenzpunkten (in drei unterschiedlichen Bakterien) zeigte, dass sich diese in Gruppen von durchschnittlich  $2,8 \pm 1$  Fluoreszenzpunkte anordnen. Innerhalb einer Gruppe liegen einzelne Fluoreszenzpunkte  $127 \text{ nm} \pm 42 \text{ nm}$  voneinander entfernt. Die individuellen Gruppen verteilen sich mit einer minimalen Distanz von durchschnittlich  $713 \text{ nm} \pm 121 \text{ nm}$  auf der Bakterienoberfläche. Exemplarisch sind hier ein YopB-positives Bakterium und dessen schrittweise Gruppenanalyse dargestellt (Abbildung 5-10). Abbildung 5-10A zeigt die totale Projektion im konfokalen und im 3D-STED-Modus und verdeutlicht die flecken- bzw. punktförmige Oberflächenverteilung von YopB während der Zellinfektion (Abbildung 5-10A). Die 4-fache Vergrößerung eines konfokalen Fluoreszenzfleckes und der zugehörigen 3D-STED-Aufnahme

illustrieren die in der Arbeitsgruppe beobachtete, verbesserte Auflösung der konfokal aufgelösten YopB-Signale durch die STED-Mikroskopie (Abbildung 5-10A, (Nauth et al. 2018)).

Abbildung 5-10B zeigt schrittweise die Detektion der einzelnen YopB-Fluoreszenzpunkte (weiß, links), die mithilfe der Imaris Software als einzelne Sphären/Volumen (grün) definiert wurden. Die Fluoreszenzpunkte bzw. Volumen wurden anhand der Ergebnisse der Imaris- und Matlab-Analysen Gruppen zugeordnet, welche in den nachfolgenden Abbildungen farblich markiert sind. Die Analyse identifizierte all die Fluoreszenzpunkte als gruppzugehörig, die eine Distanz definiert als die Summe zweier Fluoreszenzpunkt-Radien nicht überschritten (Methoden). Die daraus resultierenden Gruppen sind zur besseren Veranschaulichung in Abbildung 5-10C in verschiedenen Farben in vier Winkeln visualisiert (Abbildung 5-10B und C). Fluoreszenzpunkte, die keiner Gruppe zugeordnet werden konnten, erscheinen nicht in der Gruppen-Darstellung und bleiben deshalb grün dargestellt (Abbildung 5-10C, grün in B). Die in der Vergrößerung (Abbildung 5-10A) gezeigten Fluoreszenzpunkte entsprechen in der Darstellung der blauen Gruppe (Abbildung 5-10C, gestrichelter Kasten im linken Bild).



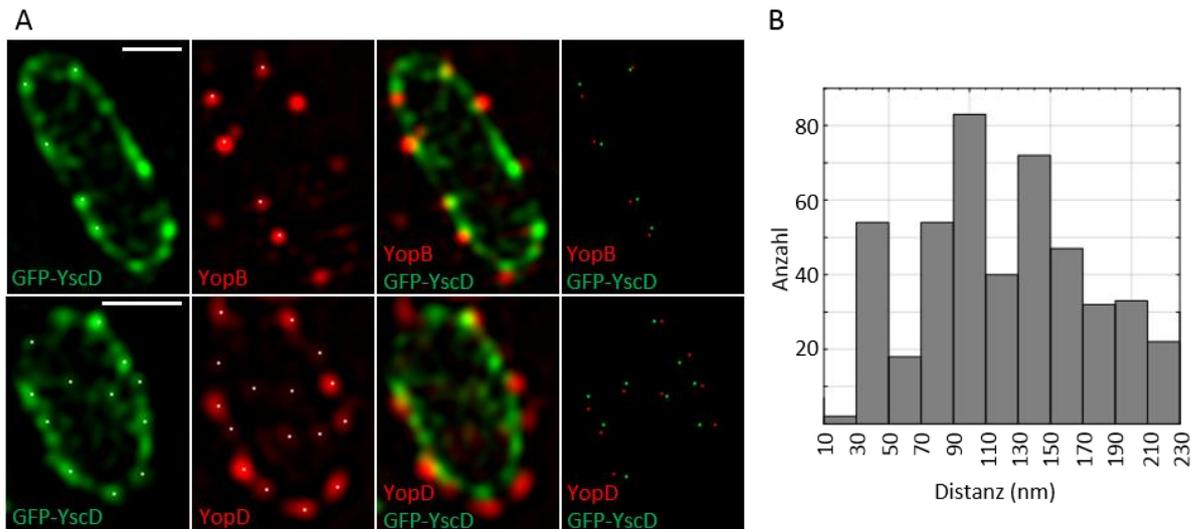
**Abbildung 5-10 YopB-Fluoreszenzsignale, die mittels STED-Mikroskopie aufgenommen wurden, zeigen Gruppenbildung auf der Bakterienoberfläche während der Zellinfektion.** Myc-Rac1Q61L-überexprimierende HeLa-Zellen (+myc-Rac1Q61L) wurden mit WA-314 für 60 Minuten infiziert (MOI 50), fixiert und mit anti-YopB-Antikörpern und dem STED-geeigneten Sekundärantikörper Abberior635P immungefärbt. Die Aufnahmen erfolgten im 80%igen 3D-STED-Modus und einzelne Bakterien wurden hinsichtlich ihrer Fluoreszenzverteilung untersucht. **(A)** Konfokale und 3D-STED-Aufnahme eines YopB-positiven Bakteriums. Maßstab: 1  $\mu\text{m}$ . Kasten zeigt eine 4-fache Vergrößerung der Fluoreszenzpunkte. Maßstab: 100 nm. **(B)** Fluoreszenzpunkte (weiß) wurden mithilfe der Imaris Software identifiziert und als einzelne Volumina (grün) markiert. Die Gruppen-Analyse identifizierte alle die Fluoreszenzpunkte, die eine Distanz definiert als die Summe zweier Radien nicht überschritten. Gruppierte Fluoreszenzpunkte sind jeweils einer Farbe zugeordnet und wurden in das 3D-STED-Bild zurück projiziert. Gezeigt sind alle identifizierten Fluoreszenzpunkte in grün und alle definierten Gruppen des WA-314 Bakteriums aus (A) in verschiedenen Farben. **(C)** Darstellung der Gruppen in verschiedenen Winkeln. Die blaue Gruppe (angezeigt durch gestrichelten Kasten) entspricht den Fluoreszenzpunkten in der Vergrößerung in (A). Maßstäbe: 1  $\mu\text{m}$ . Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Durch Anwendung der STED-Mikroskopie und Software-gestützten Gruppenanalyse konnte die Verteilung des Porenproteins YopB auf der Bakterienoberfläche in der Interaktion mit Zellen näher beschrieben werden. Die vorliegenden Daten zeigen eine regelmäßige Organisation des Translokators und damit der Translokons bei der Wirtszellinfektion.

## 5.5 Visualisierung des assemblierten Typ-III-Sekretionssystems bei der Wirtszellinfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie

In Immunfluoreszenzfärbungen der Translokatoren YopB und YopD während der Wirtszellinfektion konnte stets eine bakterien-assoziierte Lokalisation der Proteine beobachtet werden (siehe 5.3). Ko-Färbungen von YopB und LcrV zeigten eine Assoziation des Porenproteins mit der am distalen Ende der Nadel befindlichen LcrV-Plattform (4.2, Abbildung 4-2). Die Relevanz des hydrophilen Translokators LcrV in der Ausbildung des Translokons konnte mithilfe von Infektionsversuchen mit der LcrV-Deletionsmutante (E40 $\Delta$ lcrV) gezeigt werden. In der Literatur sind gegenwärtig zwei Translokations-Modelle bekannt, die Aufbau und Beschaffenheit des Injektisoms beschreiben (Dewoody et al. 2013b). Die vorliegenden Ergebnisse sind mit dem Ein-Schritt-Modell vereinbar, bei dem das Translokon am distalen Ende der Nadel auf der LcrV-Plattform sitzt und einen kontinuierlichen Kanal zwischen Bakterium und Zelle bildet (Dewoody et al. 2013b). Das Vorkommen freier Poren, d. h. ohne Verbindung zur LcrV-Plattform und zum Injektisom, wie im vorgeschlagenen Zwei-Schritt-Modell, konnte aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet, aber auch nicht ausgeschlossen werden (Akopyan et al. 2011; Edgren et al. 2012).

Zur weiteren Untersuchung der räumlichen Anordnung des Porenkomplexes in Bezug auf den Nadelkomplex des T3SS (Injektisom ohne Translokon) von *Y. enterocolitica* während der Zellinfektion, wurde die hochauflösende *Structured Illumination*-Mikroskopie verwendet. Auf Grundlage der hierzu bereits durchgeführten Vorversuche aus der Arbeitsgruppe (Huschka 2017) wurden im Rahmen dieser Arbeit größere Datensätze gesammelt. Um eine weitere Komponente des Injektisoms darzustellen wurde ein *Yersinia*-Stamm verwendet, der das Fluoreszenz-markierte Basalkörperprotein GFP-YscD exprimiert (Abbildung 5-11). HeLa-Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* E40 GFP-YscD (Tabelle 7-14) für eine Stunde infiziert, fixiert, permeabilisiert und anschließend mit anti-YopB- oder anti-YopD-Antikörpern immungefärbt. Mit SIM war eine gleichzeitige Visualisierung von GFP-markiertem YscD und immunfluoreszenzgefärbtem Translokatoren möglich. Starke Photobleichung des zudem schwachen GFP-Signals machte die Anwendung der STED-Technologie für diese Analyse undurchführbar (Methoden). Nachfolgend wurden alle SIM-Aufnahmen mit einer alternativen Methode ausgewertet (7.2.6.1). Die im Rahmen dieser Arbeit verbesserte Methode zur Datengewinnung und -auswertung berücksichtigte ausschließlich hochaufgelöste Fluoreszenzpunkte einzelner Ebenen, welche ein detailliertes Bild der Distanzen zwischen Basalkörper und Pore lieferten (Methoden).

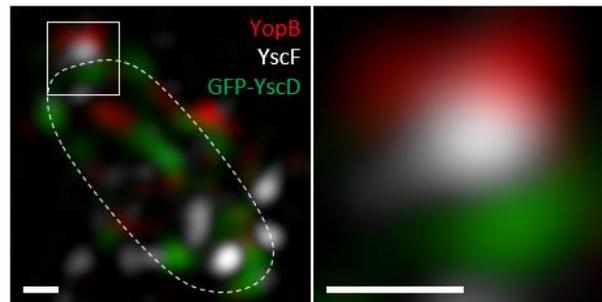


**Abbildung 5-11 Die Translokatorproteine YopB und YopD befinden sich reproduzierbar in räumlicher Nähe zum Basalkörperprotein YscD.** E40 GFP-YscD infizierte HeLa-Zellen wurden mit anti-YopB- oder anti-YopD-Antikörpern immungefärbt (Alexa-568). **(A)** Repräsentative SIM-Aufnahmen zeigen GFP-YscD-Fluoreszenz und YopB/D-Immunfluoreszenz mit projizierten Koordinatenpunkten der in der Bildanalyse detektierten einzelnen Fluoreszenzpunkte. Distanzen zwischen YopB/YopD und GFP-YscD wurden anhand einer Nearest-Neighbor-Analyse festgestellt und alle Paare aus YopB/YopD und GFP-YscD mit einer maximalen Distanz von 200 nm sind exemplarisch für zwei Bakterien dargestellt. Maßstab: 1µm. **(B)** Das Histogramm zeigt alle ausgewerteten 424 Paare mit Distanzen von maximal 200 nm. Eine Distanz von YopB/D zu GFP-YscD von 90 bis 100 nm konnte am Häufigsten beobachtet werden. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Abbildung 5-11A zeigt exemplarisch eine einzelne z-Ebene eines YopB- bzw. YopD-immungefärbten Bakteriums des Stammes E40 GFP-YscD während der Wirtszellinfektion. Einzelne Fluoreszenzpunkte konnten für YopB oder YopD (rot) und GFP-YscD (grün) detektiert werden und wurden mithilfe des ImageJ Plug-Ins TrackMate anhand von Fluoreszenzintensität und Punktgröße (0,3 µm) identifiziert (7.2.6.1). In der Überlagerung der beiden Kanäle ist die räumliche Anordnung von Basalkörperprotein und Pore zu erkennen (Abbildung 5-11A). Mithilfe einer *Nearest-Neighbor*-Analyse (7.2.6.1) konnten die vorab lokalisierten Fluoreszenzpunkte für Basalkörperprotein und Translokatoren zueinander in Bezug gesetzt werden und es zeigte sich ein wiederkehrender Abstand zwischen YopB oder YopD und GFP-YscD von 90-110 nm (Abbildung 5-11B). Um einzelne Bakterien zu betrachten und umliegende Signale (von anderen Bakterien stammend oder unspezifisch) auszuschließen, wurde eine maximale Distanz von 200 nm für die YopB/D - GFP-YscD - Paare gewählt. Die aus der ImageJ-Analyse resultierenden Koordinatenpunkte für YopB und GFP-YscD, die in einer maximalen Entfernung von 200 nm zueinander lagen, wurden hier beispielhaft in die Fluoreszenzbilder projiziert (weiße Punkte in den Fluoreszenzbildern, Abbildung 5-11A). Die gefilterten YopB/D – GFP-YscD - Paare, die hier gezeigten Bakterien, sind in Abbildung 5-11A rechts als farbige Koordinatenpunkte dargestellt (YopB/D: rot, GFP-YscD: grün).

Der mittlere Abstand, ermittelt aus 424 YopB/D – GFP-YscD - Paaren in vier unabhängigen Experimenten, lag bei  $109 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$ .

Um das vermutete Injektisom mit angeschlossener Pore weiter zu untersuchen wurde unter gleichen experimentellen Bedingungen eine Ko-Immurfärbung gegen das Nadelprotein YscF und das Porenprotein YopB durchgeführt. Es zeigte sich eine Färbung aller Komponenten auf der Bakterienoberfläche, wobei Basalkörper, Nadel und Pore räumlich voneinander getrennt zu sehen waren (Abbildung 5-12).



**Abbildung 5-12 Gleichzeitige Visualisierung der Injektisomkomponenten Basalkörper, Nadel und Translokationspore.** HeLa-Zellen wurden mit E40 GFP-YscD Bakterien infiziert, nach einer Stunde fixiert, permeabilisiert und mit anti-YopB-Antikörpern (Alexa-568) und anti-YscF-Antikörpern immungefärbt (Alexa-633). Repräsentative SIM-Aufnahmen der Doppel-Immurfärbung zeigen gleichzeitig drei Komponenten des T3SSs. Die gestrichelte Linie begrenzt den Bakterienumfang. In der Vergrößerung ist die räumliche Anordnung von Basalkörperprotein GFP-YscD, Nadelprotein YscF und Porenprotein YopB zu erkennen. Maßstäbe: 100 nm. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

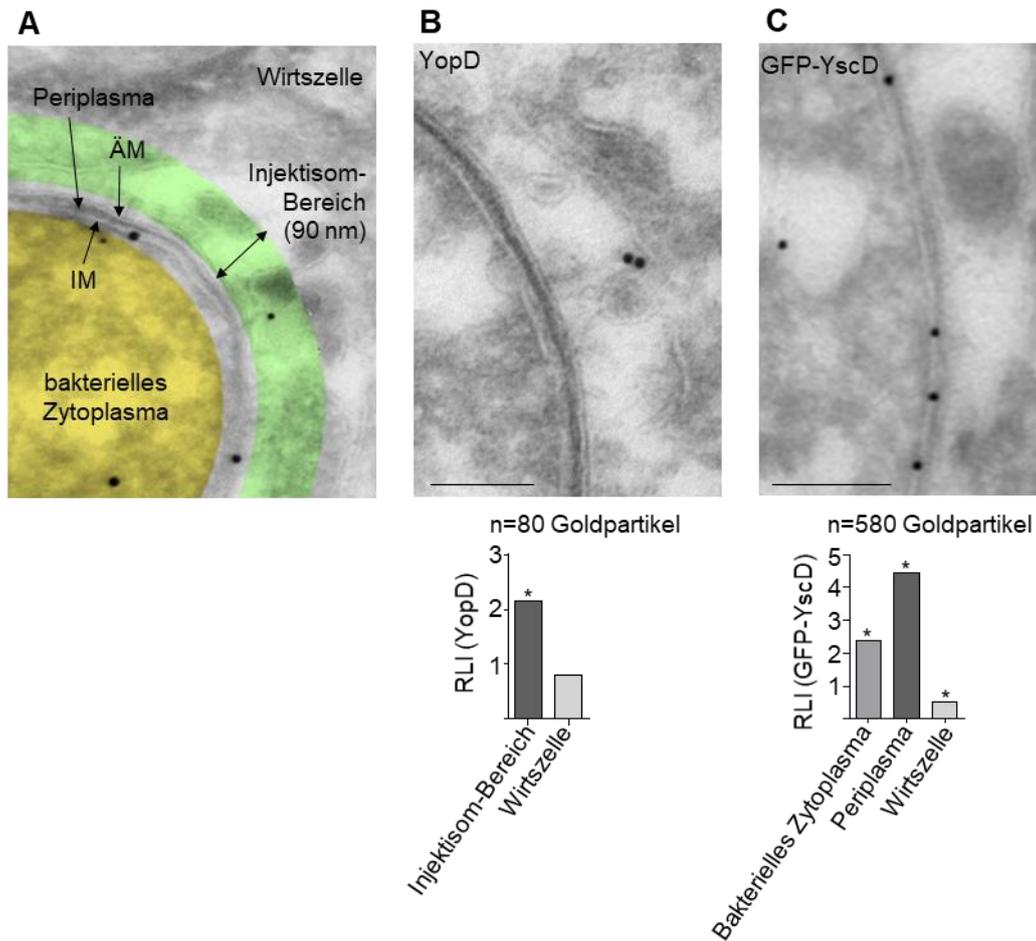
Die gleichzeitige Visualisierung der Injektisomkomponenten Basalkörper, Nadel und Translokationspore unterstützt die Ergebnisse der *Nearest-Neighbor*-Analyse und das Vorkommen des durchgehenden Kanals zwischen Bakterium und Zelle. Die Ergebnisse bekräftigen das Ein-Schritt-Modell als Translokationsmechanismus in *Y. enterocolitica*, schließen das gleichzeitige Vorkommen des Zwei-Schritt-Modells jedoch nicht aus.

## 5.6 Immungold-Elektronenmikroskopie zeigt assembliertes

### Typ-III-Sekretionssystem im subzellulären Kontext

Nach erfolgreicher Visualisierung des assemblierten Injektiums und Translokons mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie (5.5), zielte die nächste Frage auf die genauere Lokalisation des Injektiums mit distal angeschlossenen Translokons im Kontext der Zellinfektion. Immungold-Elektronenmikroskopie ermöglicht die Darstellung kleinster Strukturen in hoher Auflösung im zellulären Kontext der Wirtszellinfektion (Griffiths 1993; Koster und Klumperman 2003). Die Methode erlaubt die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Proteine in ihrem nativen, zellulären Kontext (Slot und Geuze 2007). Zur Untersuchung des Injektiums und Translokons im

zellulären Kontext wurden Kryoschnitte (~60 nm Dicke) von aktivem Rac1-überexprimierenden (Transfektion von myc-Rac1Q61L) und *Y. enterocolitica* E40 GFP-YscD infizierten HeLa-Zellen hergestellt (7.2.7). Mithilfe von Immungoldmarkierungen konnten das Basalkörperprotein GFP-YscD und das Porenprotein YopD gleichzeitig auf einem Schnitt angefärbt und auf ihre subzelluläre Lokalisation untersucht werden (7.2.7.1). Zur gleichzeitigen Betrachtung der beiden Komponenten wurden Goldpartikel unterschiedlicher Größe (Protein-A-Gold: 10 nm und 15 nm) verwendet. Um die Spezifität der Immungoldfärbung und schließlich die Verteilung und räumliche Anordnung von YopD und GFP-YscD zueinander zu untersuchen, wurden transmissionselektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahmen angefertigt und ausgewertet (7.2.7). Zur Auswertung wurden zunächst die in Abbildung 5-13A gezeigten Kompartimente definiert: bakterielles Zytoplasma (gelb), innere (IM) und äußere (ÄM) Membran mit dazwischen liegenden Periplasma und die Wirtszellen außerhalb der Bakterien mit der Unterteilung in den Injektisom-Bereich (grün) und die daran angrenzende Zelle (grau, Abbildung 5-13A, 7.2.7.1). Alle Goldpartikel wurden gezählt und einem der Kompartimente zugeordnet. Mithilfe von Kontingenztabelle und Chi-Quadrat-Tests wurde die Verteilung der Goldpartikel statistisch analysiert und bewertet (siehe Tabelle 5-1, Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3, nach Griffiths und Hoppeler 1986; Mayhew et al. 2002). Die Spezifität der Immungoldmarkierung und die Verteilung der Goldpartikel auf die Kompartimente wurden mit je 10 nm großen Goldpartikeln geprüft. Ultradünne Schnitte des gleichen Infektionsexperimentes wurden nur mit Sekundäntikörper und Protein-A-Gold behandelt, um eine unspezifische Bindung der Goldpartikel auszuschließen. In insgesamt 23 zufällig ausgewählten TEM-Aufnahmen konnten lediglich zwei zellgebundene Goldpartikel beobachtet werden.



**Abbildung 5-13 Auswertung der Immungold-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen von assemblierten T3SS bei der Zellinfektion.** (A) Schema zur Auswertung der Immungold-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurden zur Analyse der Verteilung der Goldpartikel in die Kompartimente bakterielles Zytoplasma (gelb), innere und äußere Membran mit Periplasma, Injektisombereich (grün) und angrenzende HeLa-Wirtszelle (grau) unterteilt. Die Kompartimente sind beispielhaft in einer TEM-Aufnahme farblich gekennzeichnet. (B) Das Porenprotein YopD zeigt eine Anreicherung im Injektisombereich. Zur Veranschaulichung der Verteilung der mit Goldpartikeln markierten Proteine YopD und GFP-YscD wurden die relativen Labelling Indizes (RLI) beider Proteine für die zuvor bestimmten Kompartimente berechnet (Methoden, Tabellen). Der RLI für YopD wurde für den Injektisombereich und die angrenzende Wirtszelle anhand von n=80 Goldpartikeln bestimmt. (C) Das Basalkörperprotein GFP-YscD zeigt eine Anreicherung im Bereich der inneren und äußeren Membran der Bakterien. Die RLI für GFP-YscD wurden für die Kompartimente bakterielles Zytoplasma und Periplasma und den extrabakteriellen Bereich der Wirtszelle berechnet. Hierzu wurden n=580 Goldpartikel hinsichtlich ihrer Lokalisation ausgewertet. Die Verteilung der Goldpartikel wurde mittels Kontingenztafeln und Chi-Quadrat-Tests wie in (Griffiths und Hoppeler 1986; Mayhew et al. 2002) beschrieben statistisch analysiert. \* $p < 0.00001$  (siehe Tabelle 5-1, Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3). Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Die Spezifität von GFP-YscD wurde in 41 TEM-Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten untersucht und zeigte eine Verteilung der Goldpartikel, die sich signifikant von einer zufälligen Verteilung unterschied (Tabelle 5-1, n = 580 Goldpartikel). Um die bakterielle Zellwand (Periplasma zwischen innerer und äußerer Membran) mit den übrigen Volumen-einnehmenden Kompartimenten zu vergleichen, wurde eine Akzeptanzzone um das Periplasma bestimmt (siehe

7.2.7.1, nach Mayhew und Lucocq 2008). Das Basalkörperprotein GFP-YscD zeigte eine spezifische Anreicherung im Periplasma (RLI: 4,44) sowie im bakteriellen Zytoplasma (RLI: 2.38, Tabelle 5-1, Abbildung 5-13B). Die beobachtete Golddichte überstieg die erwartete signifikant im bakteriellen Zytoplasma und im Periplasma. Außerhalb der Bakterien konnten durchschnittlich nur 0,5 Goldpartikel pro  $\mu\text{m}^2$  (RLI: 0,52) detektiert werden. Diese niedrige Gold-Dichte unterscheidet sich deutlich von einer rein zufälligen Verteilung (Tabelle 5-1, Abbildung 5-13B).

Tabelle 5-1 Verteilung von GFP-YscD in der Immungold-Elektronenmikroskopie.

Kompartiment	beobachtete Goldpartikel ( $n_o$ )	beobachtete Punkte (P)	erwartete Goldpartikel ( $n_e$ )	Labelling-Dichte (gold/ $\mu\text{m}^2$ )	Relativer Labelling Index (RLI)	Partieller Chi-Quadrat
bakterielles Zytoplasma	222	331	93.34	2.32	2.38 <sup>b</sup>	177.34 <sup>b</sup>
Periplasma	121	96.73	27.28	4.33	4.44 <sup>c</sup>	322.03 <sup>c</sup>
Wirtszelle	237	1629	459.38	0.50	0.52 <sup>d</sup>	107.65 <sup>d</sup>
<b>Total</b>	<b>580</b>	<b>2056.73</b>	<b>580</b>	<b>0.97</b>	<b>1.0<sup>a</sup></b>	<b>607.01<sup>a</sup></b>

Kryoschnitte von E40 GFP-YscD infizierten HeLa-Zellen wurden mit anti-GFP-Biotin Antikörpern immungefärbt, gefolgt von anti-Biotin Antikörpern und 10 nm großen Protein-A-Goldpartikeln. 41 TEM-Aufnahmen (30 000-fache Vergrößerung) aus zwei unabhängigen Experimenten wurden anhand der Goldverteilung auf die zuvor definierten Kompartimente analysiert. Freiheitsgrade (FG)=2

<sup>a</sup> Verteilung der Goldpartikel unterscheidet sich signifikant von einer zufälligen Verteilung ( $P < 0.00001$ )

<sup>b</sup> Die Anzahl der Goldpartikel ist signifikant erhöht ( $P < 0.0001$ )

<sup>c</sup> Die Anzahl der Goldpartikel ist signifikant erhöht ( $P < 0.0001$ )

<sup>d</sup> Die Anzahl der Goldpartikel ist signifikant kleiner ( $P < 0.0001$ )

Die Spezifität der Färbung von YopD wurde an 36 TEM-Aufnahmen in zwei unabhängigen Experimenten geprüft (Tabelle 5-2,  $n = 252$  Goldpartikel). YopD zeigte eine signifikante Anreicherung in den Bakterien mit einer Golddichte von 3,3 Goldpartikeln pro  $\mu\text{m}^2$  Bakterienfläche (RLI: 2,73, Tabelle 5-2). Außerhalb der Bakterien konnten nur eine geringe Anzahl von Goldpartikeln detektiert werden (RLI: 0,42, Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2 Verteilung von YopD in der Immungold-Elektronenmikroskopie.

Kompartiment	beobachtete Goldpartikel ( $n_o$ )	beobachtete Punkte (P)	erwartete Goldpartikel ( $n_e$ )	Labelling-Dichte (gold/ $\mu\text{m}^2$ )	Relativer Labelling Index (RLI)	Partieller Chi-Quadrat
bakterielles Zytoplasma	172	425	63	3.30	2.73 <sup>b</sup>	188.59 <sup>b</sup>
Wirtszelle	80	1275	189	0.51	0.42 <sup>c</sup>	62.86 <sup>c</sup>
<b>Total</b>	252	1700	252	1.21	1.0 <sup>a</sup>	251.45 <sup>a</sup>

Kryoschnitte von E40 GFP-YscD infizierten HeLa-Zellen wurden mit anti-YopD-Antikörpern immungefärbt, gefolgt von 10 nm großen Protein-A-Goldpartikeln, sowie mit anti-GFP-Biotin Antikörpern, gefolgt von anti-Biotin Antikörpern und 15 nm großen Protein-A-Goldpartikeln. 36 dual-markierte TEM-Aufnahmen (30 000-fache Vergrößerung) aus zwei unabhängigen Experimenten wurden anhand der Verteilung und Lokalisation von 10 nm-Goldpartikel-markiertem YopD auf die zuvor definierten Kompartimente analysiert. FG=1

<sup>a</sup> Verteilung der Goldpartikel unterscheidet sich signifikant von einer zufälligen Verteilung ( $P < 0.00001$ )

<sup>b</sup> Die Anzahl der Goldpartikel ist signifikant erhöht ( $P < 0.00001$ )

<sup>c</sup> Die Anzahl der Goldpartikel ist signifikant kleiner ( $P < 0.00001$ )

Zur genaueren Analyse der Verteilung von YopD während der Interaktion mit der Wirtszelle, unter Einbeziehung der erwarteten Lokalisation an der Spitze des Injektisoms, wurde ein Bereich in unmittelbarer Nähe um die Bakterien definiert. Ausgehend von den in der Literatur bekannten Kenngrößen für Nadel (60 nm nach Journet et al. 2003), LcrV-Plattform (8 nm nach Mueller et al. 2005) und Antikörper-Protein-A-Gold-Komplexen (20 nm nach Mayhew und Lucocq 2008), wurde ein Injektisom-Bereich im Umkreis von 90 nm um die Bakterienoberfläche definiert (grün im Schema Abbildung 5-13A). Hierzu wurden alle Goldpartikel auf der Wirtszelle (außerhalb der Bakterienzelle liegend) quantifiziert und abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation dem Injektisom-Bereich (grün im Schema Abbildung 5-13) oder der angrenzenden HeLa-Zellen (grau im Schema Abbildung 5-13) zugeordnet. Die Goldverteilung zeigte eine signifikante Anreicherung im direkten Umkreis um die Bakterien (RLI: 2,16) im Vergleich zur angrenzenden Wirtszelle (RLI: 0,79; Abbildung 5-13B, Tabelle 5-3,  $n = 80$  Goldpartikel). Der Translokator YopD konnte in Einzel- wie auch in Doppelfärbungen wiederkehrend in nächster Nähe zu Wirtszellmembranen gefunden werden.

Tabelle 5-3 Verteilung von YopD in der Wirtszelle.

Kompartiment	beobachtete Goldpartikel ( $n_o$ )	beobachtete Punkte (P)	erwartete Goldpartikel ( $n_e$ )	Labelling-Dichte (gold/ $\mu\text{m}^2$ )	Relativer Labelling Index (RLI)	Partieller Chi-Quadrat
Injektisom-Bereich	26	192	12.05	1.10	2.16 <sup>b</sup>	16.16 <sup>b</sup>
Wirtszelle	54	1083	67.95	0.41	0.79 <sup>c</sup>	2.86 <sup>c</sup>
<b>Total</b>	80	1275	80	0.51	1.0 <sup>a</sup>	19.03 <sup>a</sup>

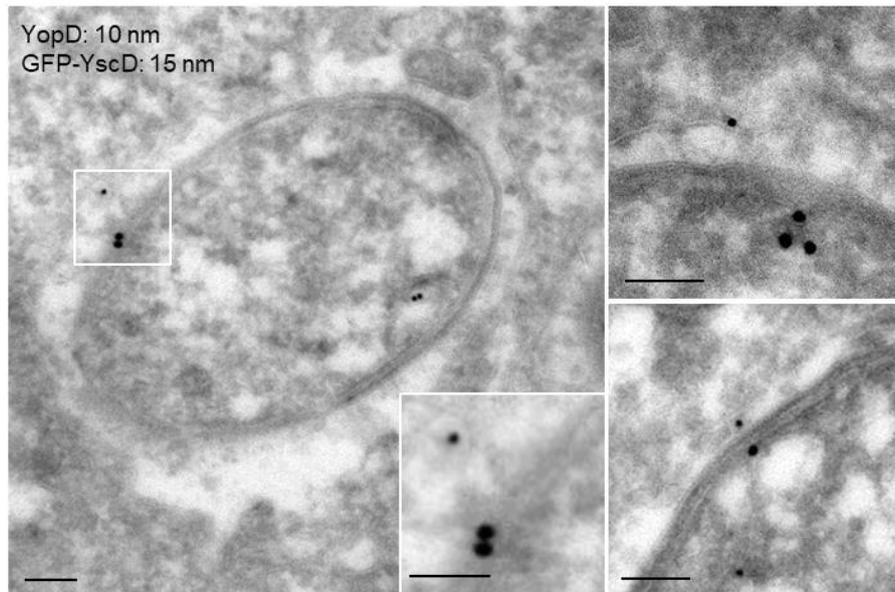
Dual-markierte Kryoschnitte aus Tabelle 5-2 wurden auf die Verteilung von YopD außerhalb der Bakterien untersucht. FG=1

<sup>a</sup> Verteilung der Goldpartikel unterscheidet sich signifikant von einer zufälligen Verteilung ( $P < 0.00001$ )

<sup>b</sup> Die Anzahl der Goldpartikel ist signifikant erhöht ( $P < 0.0001$ )

<sup>c</sup> nicht signifikant

Dual-Immungoldfärbungen von YopD (10 nm große Goldpartikel) und GFP-YscD (15 nm große Goldpartikel) bestätigten die gleichzeitige Präsenz der Injektisom-Komponenten in nächster Nähe zueinander während der Wirtszellinfektion (Abbildung 5-14). Um zu definieren, ob sich ein Porenprotein in nächster Nähe zu einem im Periplasma lokalisierten GFP-YscD befindet, wurde eine maximale Distanz von  $\sim 140$  nm festgesetzt. Zusätzlich zum vorab definierten Injektisom-Bereich müssen einerseits die Dicke der bakteriellen inneren und äußeren Membran mit Periplasma ( $\sim 30$  nm nach Kudryashev et al. 2013), sowie die Reichweite der Antikörper- und Protein-A-Gold-Komplexe für das mit 15 nm-Goldpartikeln markierte GFP-YscD berücksichtigt werden ( $\sim 20$  nm nach Mayhew und Lucocq 2008). Das kombinierte Auftreten von GFP-YscD mit YopD im maximalen Abstand von 140 nm zueinander konnte wiederholt beobachtet werden (Abbildung 5-14). Zudem wurden die assemblierten Injektisome stets in einem membranumschlossenen Kompartiment gefunden (Abbildung 5-14). Das Porenprotein YopD konnte in dieser Konfiguration in nächster Nähe zur Plasmamembran der Zelle detektiert werden (Abbildung 5-14).



**Abbildung 5-14 Vermutlich vollständig assemblierte Injektisome befinden sich in einem membranumschlossenen Zellkompartiment.** HeLa-Zellen wurden mit einem myc-Rac1Q61L-Vektor transfiziert und mit E40 GFP-YscD für eine Stunde infiziert (MOI 50). Die Probenaufbereitung für die nachfolgenden TEM wurde nach Tokuyashu durchgeführt (Methoden). Immungoldfärbungen, die Anfertigung von Kryoschnitten und die Elektronenmikroskopie wurden von Dr. Michaela Schweizer der Core Facility Morphologie und Elektronenmikroskopie am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) durchgeführt. Zur gleichzeitigen Visualisierung von YopD und GFP-YscD wurden unterschiedlich große Goldpartikel zur Markierung verwendet (YopD: 10 nm, GFP-YscD: 15 nm). Informationen zur Methodik der Immungoldfärbung in Methoden. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

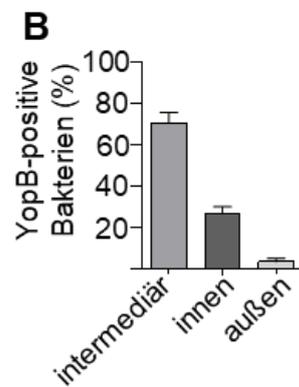
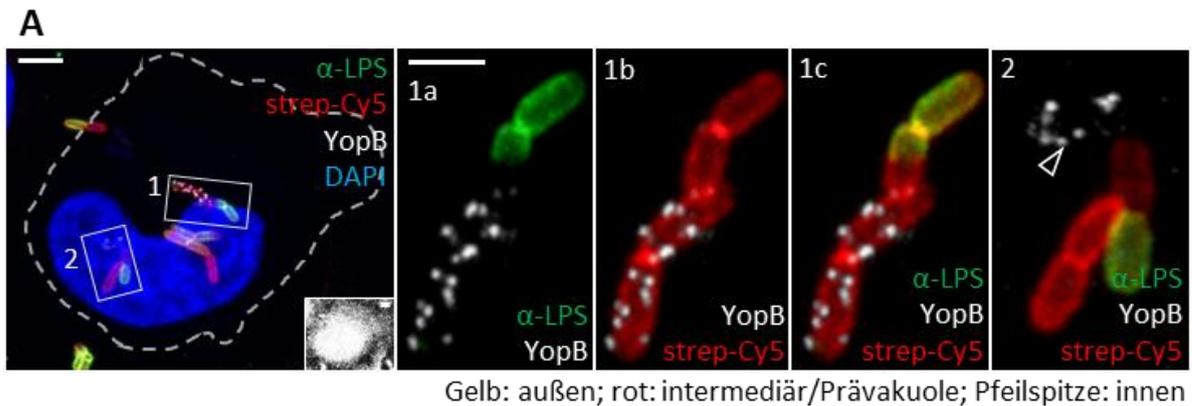
Die Darstellung vollständig assemblierter Injektisome (mit assoziierten Translokationsporen) im zellulären Kontext bekräftigte einerseits die Existenz eines durchgängigen Kanals, was bereits durch die hochaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden konnte (5.5). Des Weiteren gab die elektronenmikroskopische Betrachtung der Yersinien Einblick in die Lokalisation der Bakterien in der Zellinfektion. Die assemblierten T3SS konnten in membranumschlossenen Kompartimenten detektiert werden.

## 5.7 Charakterisierung und Dynamik des zur Ausbildung des Translokons nötigen Wirtszellkompartiments

Die hier durchgeführten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine scheinbar intrazelluläre, meist membranumschlossene Lokalisation der Translokon-bildenden Yersinien (5.6). Kürzlich zeigten Sarantis und Kollegen mit einem avirulenten Yersinienstamm und bei Infektion von Epithelzellen, dass es vor der vollständigen Internalisierung der Bakterien zur Ausbildung einer temporären Prävakuole kommt (Sarantis et al. 2012). Diese Prävakuole kommuniziert mit dem extrazellulären Milieu und bleibt für kleine Moleküle bis etwa 50 kDa zugänglich, jedoch besteht eine Diffusionsbarriere für größere Moleküle wie Antikörper (ca. 150 kDa, Sarantis et al. 2012). Zur

Darstellung und Beschreibung dieser Prävakuole wurden oberflächenmarkierte (biotinylierte) Yersinien mit einem Fluoreszenz-konjugiertem Streptavidin (~53 kDa) detektiert (Sarantis et al. 2012).

Als nächster Schritt sollte das Membran-assoziierte Kompartiment, das die YopB/D-exprimierenden Yersinien einschließt, näher charakterisiert werden. Um die Lokalisation, der in dieser Studie untersuchten virulenten Yersinien des Wildtypstamms WA-314 - und insbesondere der Gruppe der Translokon-bildenden Bakterien - genauer zu analysieren, wurden die Yersinien vor der Infektion biotinyliert (siehe Methoden). Diese Oberflächenmarkierung konnte durch Zugabe von Cy5-markiertem Streptavidin sichtbar gemacht werden (Abbildung 5-15A rot) und diente in Kombination mit einer sequentiellen Immunfluoreszenzfärbung dem Zweck die Bakterien anhand ihrer Zugänglichkeit durch unterschiedlich große Moleküle zu charakterisieren. Mit dem oberflächenmarkierten Wildtypstamm WA-314 infizierte HeLa-Zellen wurden nach einer Infektionsdauer von 60 Minuten wie folgt sequentiell immungefärbt: Zunächst wurden die Zellen ohne vorhergehende Permeabilisierung mit dem *Yersinia enterocolitica* O:8 spezifischen LPS-Antikörper und Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper immungefärbt (Abbildung 5-15A/1a grün). Gleichzeitig erfolgte die Inkubation mit Cy5-gekoppeltem Streptavidin (Abbildung 5-15A rot). Extrazelluläre Bakterien zeigten folglich eine Doppelfärbung, die in der Überlagerung gelb erscheint (Abbildung 5-15A/1c). Yersinien, die lediglich dem Cy5-gekoppeltem Streptavidin zugänglich waren und keine LPS-Antikörperfärbung (grün) zeigten, erscheinen rot und befinden sich entsprechend in einem Antikörper-unzugänglichen Kompartiment (Prävakuole). Zuletzt erfolgte die Permeabilisierung der Zellen und eine anti-YopB-Antikörperfärbung (Abbildung 5-15A weiß) und DAPI-Färbung (blau in der Übersichtsabbildung). Die YopB-Antikörperfärbung konnte aufgrund der Zellpermeabilisierung alle Yersinien erreichen. Diese Variante der Innen-Außen-Färbung ermöglichte die Unterscheidung der drei Kompartimente „ausen“ (zugänglich für LPS-Antikörper und Cy5-Streptavidin, gelb), „intermediär/Prävakuole“ (zugänglich nur für Cy5-Streptavidin, rot) und „innen“ (keine Zugänglichkeit, keine Färbung durch *Yersinia*-Antikörper oder Cy5-Streptavidin; Abbildung 5-15A).



**Abbildung 5-15 YopB-positive Bakterien befinden sich in der intermediären Prävakuole und innerhalb der HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen wurden mit oberflächen-biotinylierten, Wildtyp-Yersinien (WA-314) für eine Stunde infiziert (MOI 20), fixiert und mit anti-LPS-Antikörpern (grün) und Cy5-gekoppeltem Streptavidin (rot) immungefärbt. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und mit anti-YopB-Antikörpern immungefärbt. **(A)** repräsentative konfokale Aufnahmen von Yersinien in der HeLa-Zellinfektion. Die Übersichtsabbildung zeigt die Lokalisation der Bakterien auf der HeLa-Zelle sowie die Zellbegrenzung (gestrichelte Linie und Einsatz mit maximaler Belichtung des YopB-Antikörper-Kanals). DAPI markiert die bakterielle DNA und den Nukleus der Zelle. Maßstab: 5  $\mu$ m. Vergrößerungen 1 und 2: Die Bakterien können anhand der Fluoreszenzfärbung in drei Kompartimente unterteilt werden. YopB-positive Bakterien (weiß) sind im

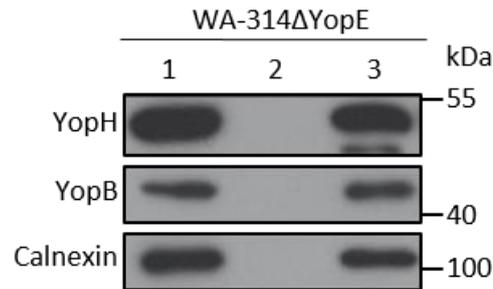
intermediären (rot, Streptavidin-zugänglich, 1b und 1c) und inneren Kompartiment (keine Fluoreszenzfärbung und Zugänglichkeit, markiert durch Pfeilspitze in 2) zu detektieren. Extrazelluläre Bakterien (gelb in der Überlagerung in 1c), die zugänglich sind für Antikörper (grün in 1a) und Streptavidin (rot in 1b, 1c und 2), zeigten keine YopB-Immunfluoreszenzfärbung. Maßstab: 1  $\mu$ m. **(B)** Quantifizierung der Verteilung der YopB-positiven Bakterien auf die drei Kompartimente. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von  $n = 95$  YopB-positiven Bakterien aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Versuche wurden von Dr. Manuel Wolters durchgeführt und ausgewertet. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Die Ausbildung der beschriebenen Prävakuole konnte auch bei den hier verwendeten virulenten Yersinien bei Infektion der epithelialen HeLa-Zelllinie beobachtet werden. Die YopB-positiven Bakterien konnten, wie in Abbildung 5-15A exemplarisch zu sehen, in der Prävakuole (Abbildung 5-15, Vergrößerungsausschnitt 1a-c, YopB in weiß) und im inneren Kompartiment (Abbildung 5-15 Vergrößerungsausschnitt 2, YopB in weiß) gefunden werden. Die YopB-Antikörperfärbung zeigte das aus vorhergehenden Versuchen bekannte punktartige Muster auf der Bakterienoberfläche. Bei Betrachtung der Fraktion der YopB-positiven Bakterien zeigte sich, dass sich etwa 70% der Translokator-bildenden Yersinien in der Prävakuole befanden (Abbildung 5-15B). Etwa 25% der YopB-positiven Bakterien waren weder für Antikörper noch für die Streptavidinmarkierung zugänglich und wurden entsprechend dem inneren Kompartiment zugeordnet (Abbildung 5-15B). Nur eine kleine Fraktion der YopB-positiven Wildtyp-Yersinien zeigte eine LPS-Antikörper-Zugänglichkeit und befand sich folglich noch außerhalb der Zellen (Abbildung 5-15B).

Um die Lokalisation der YopB-positiven Bakterien mit einer alternativen Methode zu untersuchen, wurde die Zugänglichkeit der Porenproteine YopB und YopD durch die exo- und endoproteolytische Proteinase K in der Zellinfektion geprüft. Proteinase K hat mit einem relativ niedrigen Molekulargewicht von 29 kDa vermutlich Zugang zur Prävakuele.

HeLa-Zellen wurden in diesem Versuchsaufbau für eine Stunde infiziert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Proteinase K, um den Zugang und den damit verbundenen Abbau von YopB, YopD und YopH zu prüfen. Die Proteinase K wurde anschließend durch Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Protease-Inhibitor) inaktiviert. Nachfolgend wurden die infizierten Zellen mit Digitonin lysiert (nach Nordfelth und Wolf-Watz 2001) und die Digitonin-löslichen Fraktionen wurden im Western Blot untersucht.

Die Funktionalität des Proteinase K-Assays wurde zunächst in dem in Abbildung 5-16 dargestellten Versuch untersucht. Es sollte geprüft werden, ob das Effektorprotein YopH und der Translokator YopB unter den gewählten Versuchsbedingungen effizient durch die Behandlung mit Proteinase K degradiert und die Aktivität der Proteinase K durch Zugabe des Proteaseinhibitors PMSF inhibiert werden kann. Für eine Western Blot-Analyse mit Nachweis von YopH und YopB wurden HeLa-Zellen mit WA-314 $\Delta$ yopE-Bakterien für eine Stunde infiziert und zu den angegebenen Bedingungen 1 bis 3 lysiert (Abbildung 5-16). In der Kontrolle (1) waren nach Digitonin-Lyse YopB, YopH und Calnexin im Überstand nachweisbar (Abbildung 5-16). Bei Proteinase K-Behandlung des Lysats (2) konnten diese Proteine nicht mehr detektiert werden (Abbildung 5-16). Die weitgehende Inhibition der Proteinase K durch PMSF konnte durch die gleichzeitige Zugabe von PMSF und Proteinase K zum Lysat (3) demonstriert werden (Abbildung 5-16). Zur besseren Vergleichbarkeit der Bedingungen wurden gleiche Gesamtmengen an Proteinlysaten verwendet, Calnexin diente als zelluläre Ladekontrolle.



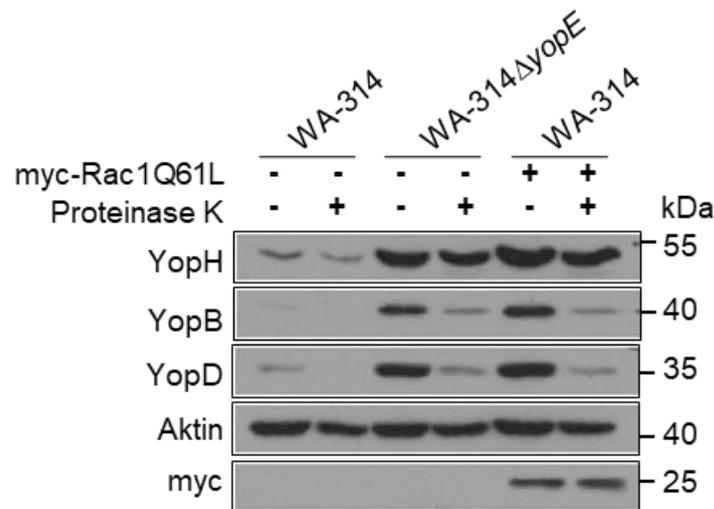
1: 0,5% Digitonin + PMSF

2: 0,5% Digitonin + Proteinase K

3: 0,5% Digitonin + Proteinase K + PMSF

**Abbildung 5-16 Validierung des Proteinase K-Digitonin-Assays.** HeLa-Zellen wurden mit der YopE-Deletionsmutante WA-314ΔyopE für eine Stunde infiziert (MOI 100). Zur funktionellen Überprüfung der Proteinase K, ob diese Yops degradieren kann und durch Zugabe von PMSF inhibiert werden kann, wurden die dargestellten Infektionsansätze ausgetestet. Die Zellysate wurden anschließend im Western Blot analysiert und auf die Anwesenheit des Effektors YopH und des Translokators YopB untersucht. Calnexin diente als zelluläre und zytoplasmatische Ladekontrolle. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

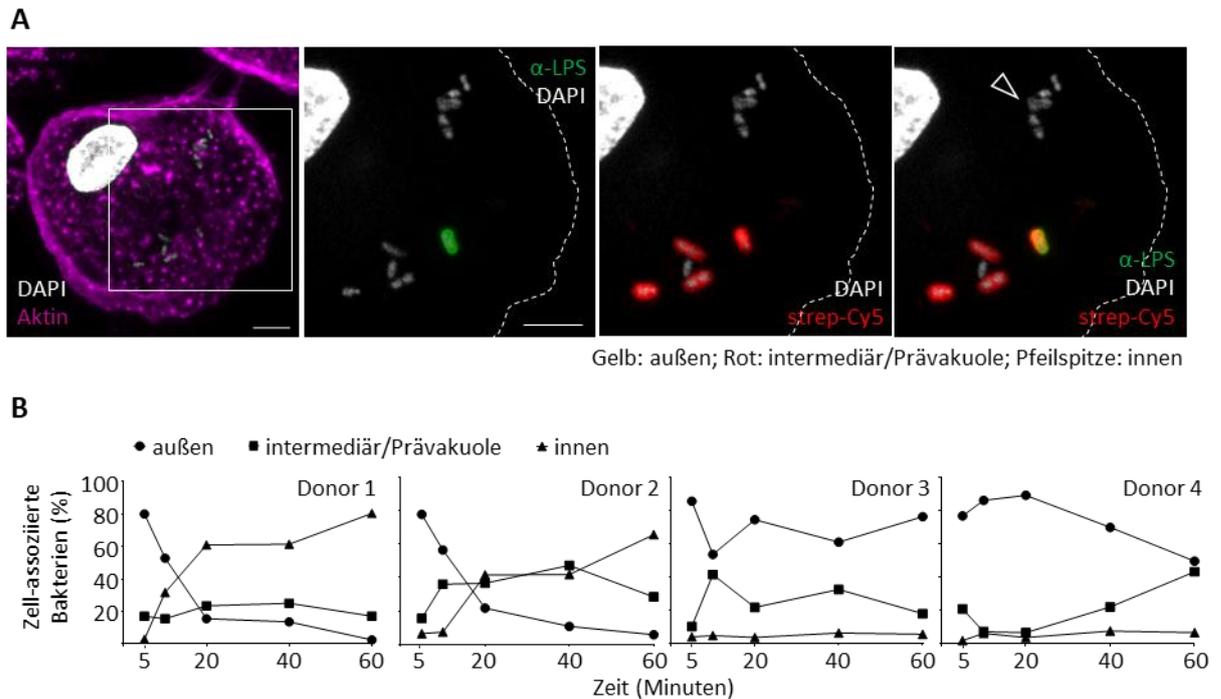
Um schließlich die Zugänglichkeit von YopB und YopD für Proteinase K bei der Zellinfektion (vor der Zell-Lyse) zu untersuchen, wurden infizierte HeLa-Zellen mit Proteinase K behandelt und das Ausmaß der Degradation von YopB und YopD im Western Blot analysiert. Das zytoplasmatische Effektorprotein YopH diente als Indikator für die Effektortranslokation und als Negativkontrolle bezüglich der Proteinase K-Zugänglichkeit (Black et al. 2000). Unbehandelte und mit einem myc-Rac1Q61L-Überexpressionsvektor transfizierte HeLa-Zellen wurden mit WA-314 Bakterien für eine Stunde infiziert. Unbehandelte HeLa-Zellen wurden außerdem mit WA-314ΔyopE infiziert. Abbildung 5-17 zeigt die Ergebnisse der Western Blot-Analyse der Digitonin-löslichen, zytoplasmatischen Fraktion. Aktin diente hier als zelluläre Ladekontrolle. Die Expression von myc-Rac1Q61L in HeLa-Zellen wurde im Western Blot bestätigt (anti-myc, Abbildung 5-17). Die Western Blot-Analyse zeigte die bereits bekannte verstärkte Bandenintensität für YopH sowie für YopB und YopD unter Bedingungen der Hypertranslokation (Infektion mit YopE-Deletionsmutante/Überexpression von aktivem Rac1 in HeLa-Zellen) ohne PK-Behandlung (PK-). Durch Zugabe von Proteinase K (PK+) wurde ein erheblicher Anteil der Porenproteine YopB und YopD, jedoch nicht die intrazellulär lokalisierten Proteine YopH und Aktin degradiert (Abbildung 5-17).



**Abbildung 5-17 Die Translokatorproteine YopB und YopD werden durch Zugabe von Proteinase K degradiert.** HeLa-Zellen wurden mit WA-314 oder WA-314 $\Delta$ yopE Bakterien für eine Stunde infiziert (MOI 100). Je nach Angabe wurden die HeLa-Zellen vorab mit einem aktiven Rac1-Überexpressionsvektor (myc-Rac1Q61L) transfiziert. Die Zellen wurden zunächst für 20 Minuten mit Proteinase K inkubiert, welche durch Zugabe von PMSF inhibiert wurde und anschließend mit Digitonin lysiert. Die Digitonin-löslichen, zytoplasmatischen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Der Effektor YopH diente als Maß für die Translokation, Aktin als zelluläre Ladekontrolle und myc als Kontrolle der Rac1-Expression. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Die Experimente wurden zur Hälfte von Dr. Manuel Wolters durchgeführt. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

### 5.7.1 Dynamik der bakteriellen Aufnahme in primäre humane Makrophagen

Nachdem im Epithelzellmodell die Lokalisation der Translokation-bildenden Bakterien vor allem in der Prävakuoole festgestellt wurde, sollte nun untersucht werden, ob dieser Befund auch in physiologischen Zielzellen der Yersinien reproduzierbar ist. Hierzu wurden im ersten Schritt primäre humane Makrophagen, aus vier verschiedenen Donoren stammend, mit Wildtyp-Yersinien WA-314 infiziert und die zelluläre Lokalisation der Bakterien im Zeitverlauf untersucht. Dabei konnten, wie in Abschnitt 5.7 für HeLa-Zellinfektionen beschrieben, ebenfalls die drei Kompartimente „außen“, „intermediär/Prävakuoole“ und „innen“ anhand von Streptavidin- und Antikörper-Außenfärbungen unterschieden werden (Abbildung 5-18A).



**Abbildung 5-18 Dynamik und Lokalisation der Zell-assoziierten WA-314 Yersinien in der Infektion von primären humanen Makrophagen.** Makrophagen wurden mit biotinylierten WA-314 Yersinien infiziert (MOI10) und nach den angegebenen Zeitpunkten (5-60 Minuten) auf ihre Lokalisation untersucht. Hierzu wurden die Proben mit anti-LPS-Antikörpern (grün), Cy5-gekoppeltem Streptavidin (strep-Cy5, rot) und DAPI (weiß) immungefärbt (Methoden). Die Bakterien wurden entsprechend ihrer Färbung einem der drei Kompartimente zugeordnet. **(A)** Yersinien in den verschiedenen Stadien der Internalisierung. Repräsentative Darstellung der Kompartimente. Von links nach rechts: Übersichtsaufnahme einer mit Yersinien infizierten Makrophage. Die Zellbegrenzung ist mit einer Phalloidin-Färbung sichtbar gemacht, Zellkern und bakterielle DNA wurden mit DAPI angefärbt. Die nachfolgenden Bilder zeigen eine Vergrößerung des Ausschnitts (Kasten) und verdeutlichen die Kategorisierung in die drei Kompartimente „außen“ (Bakterien gelb durch Überlagerung des LPS-Antikörpers und der Streptavidin-Markierung), „intermediär/Prävakuole“ (rote Streptavidin-Markierung) und „innen“ (mit Pfeilspitze angezeigte DAPI-Färbung). Maßstäbe: 5  $\mu$ m. **(B)** Quantifizierung zu (A). Zur quantitativen Auswertung der Lokalisation der Yersinien wurden Makrophagen aus vier individuellen Donoren infiziert, wie oben beschrieben immungefärbt und ausgewertet. Pro Donor wurden mindestens 1000 Yersinien analysiert. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

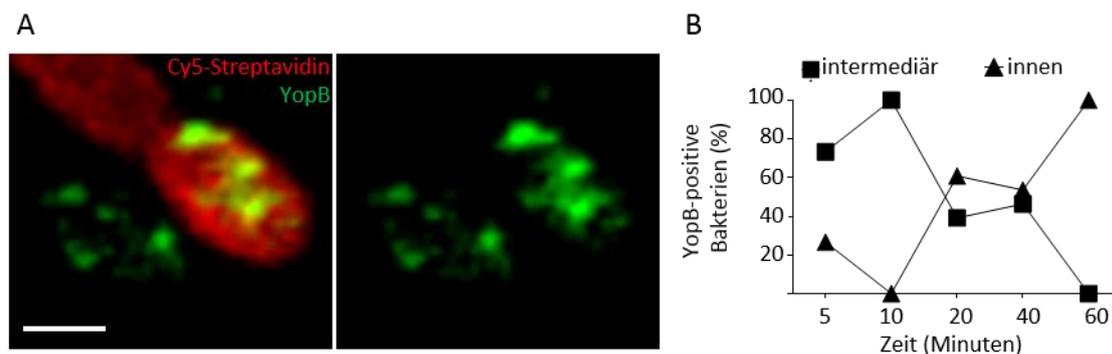
Abbildung 5-18B zeigt die Dynamik der Phagozytose der Zell-assoziierten Wildtyp-Yersinien (WA-314) in einem Infektionszeitraum von 5 bis 60 Minuten. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Werte aus 10 analysierten Makrophagen. Die einzelnen Donoren zeigten eine zum Teil stark unterschiedliche Dynamik bei der Aufnahme der Bakterien. Bei Makrophagen von zwei Donoren konnten nach 60 Minuten Infektion bis zu 70-80% der Bakterien im inneren Kompartiment gefunden werden (Donor 1+2), wohingegen Zellen der Donoren 3 und 4 ein gänzlich anderes Bild zeigten (Abbildung 5-18B). Hier verblieb ein großer Teil der Bakterien im extrazellulären Raum, eine Passage nach innen in den Antikörper- und Streptavidin-unzugänglichen Bereich war nicht zu beobachten. Bereits zu Beginn der Infektion nach 5 Minuten befanden sich bei allen untersuchten Donoren Yersinien in der Prävakuole. Im Zeitverlauf ist zu beobachten, dass sich bei drei von vier

Donoren (Donor 1-3) durchgehend etwa 20-40% der Bakterien in der Prävakuoel befanden. Bei Donor 4 fand sich bei annähernd ausbleibender vollständiger Aufnahme ein über die Zeit zunehmender Anteil in der Prävakuoel (Abbildung 5-18B).

### 5.7.2 Lokalisation der Translokon-bildenden Yersinien in humanen Makrophagen

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, befinden sich die Wildtyp-Yersinien auch während der Infektion von primären humanen Makrophagen zu einem relevanten Anteil in einer Prävakuoel. Um herauszufinden, in welchem Kompartiment das Translokon detektierbar ist, wurden erneut Makrophagen mit biotinylierten WA-314 Bakterien infiziert.

Um die Fraktion YopB-exponierender Bakterien in den Makrophagen im Zeitverlauf der 60-minütigen Infektion zu lokalisieren, wurden die Proben zunächst einer Streptavidin-Außenfärbung unterzogen und nach Permeabilisierung mit anti-YopB-Antikörpern immungefärbt. Die hier verwendete Makrophagen-Präparation zeigte ein ähnliches Verhalten bei der Internalisierung der Bakterien wie Donor 1 (Abschnitt 5.7.1, Abbildung 5-18B). Bei Betrachtung aller Zell-assoziierten YopB-positiven Yersinien befanden sich innerhalb der ersten 5 bis 10 Minuten Infektionszeit annähernd alle YopB-positiven Bakterien (80-100%) im intermediären Kompartiment (Abbildung 5-19B). Im weiteren Verlauf der Infektion konnte eine stetige Abnahme des Anteils YopB-positiver Bakterien im intermediären Kompartiment und entsprechend ein Anstieg des Anteils YopB-positiver Bakterien im Streptavidin-unzugänglichen Kompartiment beobachtet werden (Abbildung 5-19B).



**Abbildung 5-19 YopB-positive Bakterien durchlaufen das intermediäre Kompartiment.** Makrophagen wurden mit biotinylierten WA-314 Bakterien über 60 Minuten infiziert (MOI 10), fixiert, permeabilisiert und mit anti-YopB-Antikörpern und Cy5-gekoppelten Streptavidin immungefärbt. **(A)** repräsentatives Immunfluoreszenzbild YopB-positiver Bakterien nach 20-minütiger Infektion von Makrophagen. Die Streptavidinfärbung zeigt die Lokalisation der YopB-positiven Yersinien in der Zelle. Maßstab: 1 µm. **(B)** Alle zellassoziierten Bakterien wurden auf YopB-Positivität überprüft. Dargestellt ist die Verteilung aller YopB-positiven Bakterien auf das intermediäre und innere Kompartiment. Hierzu wurden n=952 YopB-positive Bakterien in der Infektion eines Donors quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils 10 analysierten Makrophagen pro Zeitpunkt. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

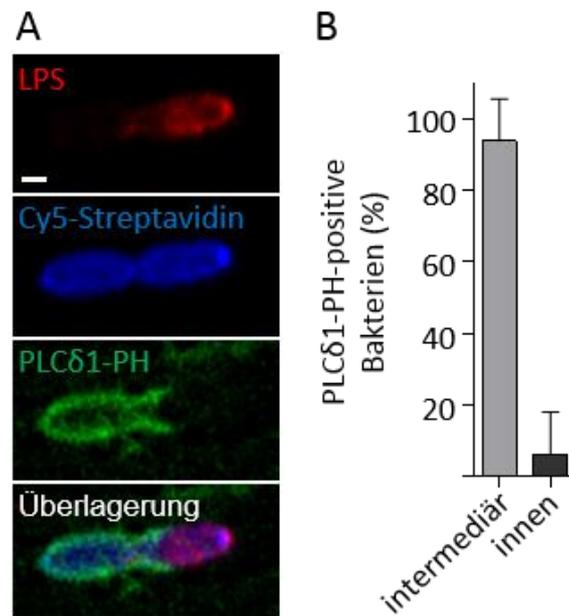
Abbildung 5-19A zeigt exemplarisch die Verteilung der YopB-positiven Wildtyp-Yersinien auf das intermediäre und innere Kompartiment nach 20-minütiger Infektion. Ein Auftreten von YopB-positiven Bakterien außerhalb der Wirtszellen konnte nicht beobachtet werden. Um die möglichen YopB-positiven Bakterien außerhalb der Zellen sichtbar zu machen, wurden WA-314 infizierte Makrophagen mit anti-YopB-Antikörpern immungefärbt ohne die Zellen vorab zu permeabilisieren. Die Fixierung der infizierten Zellen erfolgte mit Methanol-freiem, 4%igem Paraformaldehyd, um eine Permeabilisierung zu verhindern. In 50 untersuchten Zellen konnten keine YopB-positiven Yersinien detektiert werden. Zur Kontrolle erfolgten gleichzeitig Immunfärbungen mit permeabilisierten Zellen.

### 5.7.3 Die Prävakuole zeigt eine Anreicherung in Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

Wie der Proteinase K – Digitonin - Versuch und Immunfluoreszenzversuche mit Oberflächen-markierten Yersinien zeigten, stellt die Prävakuole ein Kompartiment dar, in dem die Oberflächenexposition und Translokation der Porenproteine stattfindet und vermutlich induziert wird (siehe 5.7 und 5.7.2). Die durch Sarantis und Kollegen beschriebene Prävakuole ist charakterisiert durch eine Anreicherung von PI(4,5)P<sub>2</sub> an der Plasmamembran (Sarantis et al. 2012). Zur weiteren Charakterisierung der Prävakuole wurden HeLa-Zellen und Makrophagen mit dem Plasmamembranmarker PLCδ-PH-GFP transfiziert und mit WA-314 Bakterien infiziert. Die Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne der Phospholipase C (PLCδ) diente als PI(4,5)P<sub>2</sub>-Biosensor. Ziel war es herauszufinden, ob sich die YopB-positiven Bakterien in einem membranständigen Kompartiment befinden und ob die durch virulente Yersinien gebildete Prävakuole ebenfalls durch eine Anreicherung von PI(4,5)P<sub>2</sub> charakterisiert ist.

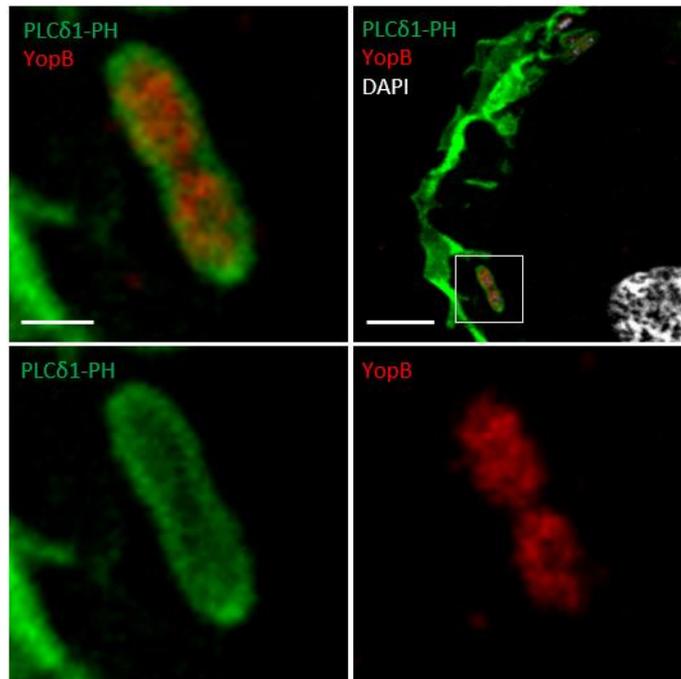
Hierzu wurde zunächst überprüft, ob das in dieser Studie beobachtete Streptavidin-zugängliche Kompartiment auch eine Anreicherung von PI(4,5)P<sub>2</sub> aufweist. HeLa-Zellen wurden mit zwei Expressionsplasmiden transfiziert und zeigten eine Überexpression des konstitutiv aktiven myc-Rac1Q61L und des Plasmamembranmarkers PLCδ-PH-GFP (Abbildung 5-20A). Die Zellen wurden mit biotinylierten WA-314 Bakterien für 60 Minuten infiziert. Anschließend wurden die infizierten Zellen in einer Innen-Außen-Färbung wie in 5.7 beschrieben immungefärbt. Die Zellen wurden hierbei nicht permeabilisiert, um anhand der Streptavidin-Färbung die Lokalisation der Yersinien zu identifizieren. In Abbildung 5-20A sind exemplarisch in der Aufnahme befindliche Yersinien dargestellt. Diese ragen zum Teil in den extrazellulären Raum (rot), befinden sich zum Teil aber bereits in der durch PI(4,5)P<sub>2</sub> und Streptavidin gekennzeichneten Prävakuole (Abbildung 5-20A). Die quantitative Auswertung dieser Versuche zeigte, dass das PLCδ-PH-GFP-positive Kompartiment zu 95% dem intermediären, Streptavidin-zugänglichen Kompartiment entspricht

(Abbildung 5-20B). Nur etwa 5% der PLC $\delta$ -PH-GFP-positiven Bakterien wurden entsprechend der Streptavidin-Färbung dem inneren Kompartiment zugeordnet (Abbildung 5-20B).



**Abbildung 5-20 Verifizierung des PI(4,5)P<sub>2</sub>-Biosensors im Infektionsmodell mit biotinylierten Yersinien.** (A) HeLa-Zellen wurden gleichzeitig mit zwei Expressionsplasmiden über Nacht transfiziert. Die HeLa-Zellen überexprimierten aktives Rac1 sowie den Plasmamembranmarker und PI(4,5)P<sub>2</sub>-Biosensor PLC $\delta$ -PH-GFP (grün). Nachfolgend wurden die Zellen mit biotinylierten Bakterien (WA-314) für 60 Minuten infiziert, fixiert und mit anti-LPS-Antikörpern (rot) und Cy5-gekoppeltem Streptavidin (blau) immungefärbt. Kategorisierung der Bakterien: extrazelluläre: LPS (rot) + Streptavidin (blau), intermediär: Streptavidin (blau), innen: keine Immunfärbung. Gezeigt ist die konfokale Aufnahme eines halb-internalisierten Bakteriums. Maßstab: 1  $\mu$ m (B) Quantifizierung zu (A). Zur besseren Auswertung und Visualisierung aller Bakterien wurden die Proben zusätzlich mit DAPI gefärbt. Alle Bakterien mit einer deutlichen Anreicherung von PLC $\delta$ -PH-GFP (grün) wurden anhand ihrer subzellulären Lokalisation beurteilt (Streptavidin-Markierung). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 398 PLC $\delta$ -PH-GFP-positiven Bakterien aus einem Experiment. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Nach Verifizierung des PI(4,5)P<sub>2</sub>-Biosensors als Marker für die Prävakuele im HeLa-Infektionsmodell, wurde der Versuch in humanen Makrophagen wiederholt. Um eine möglichst große Fraktion YopB-positiver Bakterien hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation und PI(4,5)P<sub>2</sub>-Anreicherung untersuchen zu können, wurden die Makrophagen für 20 Minuten (Zeitpunkt der meisten YopB-positiven Bakterien, siehe 5.3) infiziert. Die Ausbildung des PI(4,5)P<sub>2</sub>-Kompartiments konnte ebenfalls in der Infektion von Makrophagen beobachtet werden. Zudem zeigten YopB-positive Bakterien auch hier eine Anreicherung von PI(4,5)P<sub>2</sub> wie in Abbildung 5-21 exemplarisch zu sehen.



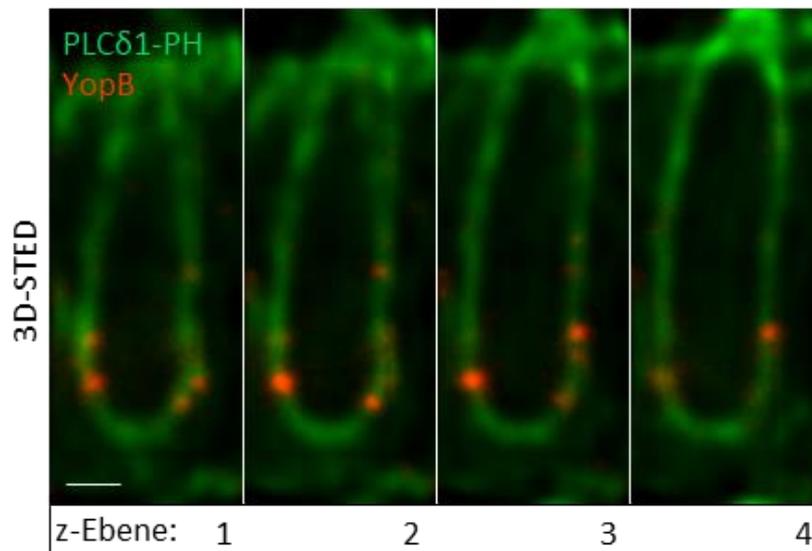
**Abbildung 5-21 YopB-positive Bakterien in der Prävakuelle von Makrophagen anreichert mit dem Plasmamembranmarker PLC $\delta$ -PH-GFP.** Makrophagen wurden mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid PLC $\delta$ -PH-GFP transfiziert und zeigten nach drei Stunden eine Überexpression des Plasmamembranmarkers. Die Zellen wurden für 20 Minuten mit Wildtyp-Yersinien (WA-314) infiziert (MOI 20), fixiert, permeabilisiert und mit anti-YopB-Antikörpern und DAPI immungefärbt. Repräsentatives Bild eines PLC $\delta$ -PH-GFP-exprimierenden Makrophagen und die 5-fache Vergrößerung eines YopB-positiven Bakteriums mit deutlicher Anreicherung von PLC $\delta$ -PH-GFP. Maßstab in der Übersicht: 5  $\mu$ m, Maßstab in der Vergrößerung: 1  $\mu$ m. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

#### 5.7.4 3D-STED-Aufnahmen zeigen die Insertion von YopB in die Prävakuelle

Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten YopB-positive Bakterien in einem membranumschlossenen Kompartiment. Die Daten geben jedoch keinen direkten Hinweis auf die in der Literatur beschriebene Membraninsertion des Translokons (Park et al. 2018). Im nächsten Schritt sollte daher in möglichst hoher lateraler und axialer Auflösung die Translokationpore in Interaktion mit der Membran der Prävakuelle dargestellt werden.

Zur Visualisierung der Plasmamembran wurden HeLa-Zellen mit dem PLC $\delta$ -PH-GFP-Expressionsplasmid transfiziert. Um eine möglichst hohe Anzahl YopB-positiver Bakterien in der Prävakuelle untersuchen zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit dem myc-Rac1Q61L-Expressionsplasmid transfiziert (5.4). Die Zellen wurden mit Wildtyp-Yersinien für eine Stunde infiziert und nach Fixierung immungefärbt. Zur gleichzeitigen Bildaufnahme des GFP-markierten Membranmarkers und des Porenproteins YopB im 3D-STED-Modus, wurde die Plasmamembran mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper immungefärbt. Um die genaue Position der Translokationspore näher zu untersuchen wurden 3D-STED-Aufnahmen von YopB-positiven Bakterien im Stadium der Prävakuelle angefertigt (Abbildung 5-22). Wie in

Abbildung 5-22 dargestellt, zeigen YopB-Fluoreszenzsignale (rot) eine Kolokalisation mit dem Plasmamembranmarker PLC $\delta$ -PH-GFP (grün). Der Plasmamembranmarker ist, wie aus vorhergehenden Versuchen bekannt, deutlich um das Bakterium angereichert. Einzelne YopB-Fluoreszenzpunkte lassen sich über mehrere z-Ebenen (hier gezeigt im Abstand von 90 nm) innerhalb der Membran verfolgen und zeigen eine Insertion der YopB-Fluoreszenzpunkte in die Zellmembran (Abbildung 5-22).

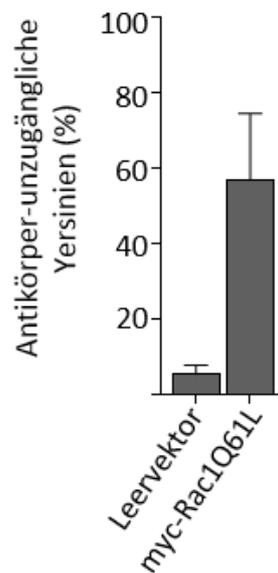


**Abbildung 5-22 YopB-Fluoreszenzsignale kolokalisieren mit der Membran der Prävakuole.** HeLa-Zellen wurden mit den zwei eukaryotischen Expressionsplasmiden PLC $\delta$ -PH-GFP und myc-Rac1Q61L transfiziert und für 60 Minuten mit Wildtyp-Yersinien (WA-314) infiziert (MOI 50). Die infizierten Zellen wurden koinmungefärbt mit anti-GFP- und anti-YopB-Antikörpern, gefolgt von STED-kompatiblen Sekundärantikörpern. Die Zwei-Farben-STED-Aufnahmen erfolgten im 3D-STED-Modus. Gezeigt sind einzelne z-Ebenen eines YopB-positiven Bakteriums mit deutlicher Anreicherung des Plasmamembranmarkers PLC $\delta$ -PH-GFP. Die Abstände zwischen den Einzelbildern betragen 90 nm. Maßstab: 500 nm. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

#### 5.7.5 Rac1 moduliert die Internalisierung von Yersinien

Vorherige Versuche zeigten, dass die Aktivierung von Rac1 den Anteil der Translokation-positiven Bakterien erhöht (5.4). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Rac1-Aktivierung die Aufnahme von Bakterien in Epithelzellen steigern kann (Alrutz et al. 2001; Wong et al. 2008; Wong und Isberg 2005). Um dies in unserem System zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit dem myc-Rac1Q61L-Expressionsvektor (oder zur Kontrolle mit dem myc-Leervektor) transfiziert. Die Zellen wurden mit Wildtyp-Yersinien (WA-314) infiziert und durch eine LPS-Antikörperfärbung in der Zelle lokalisiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte im ersten Schritt auf unpermeabilisierten Zellen, um extrazelluläre (Antikörper-zugängliche) von internalisierten (Antikörper-unzugänglichen) Bakterien zu unterscheiden. Zur Visualisierung aller Bakterien wurden die Zellen permeabilisiert und erneut mit LPS-Antikörpern immungefärbt, jedoch unter

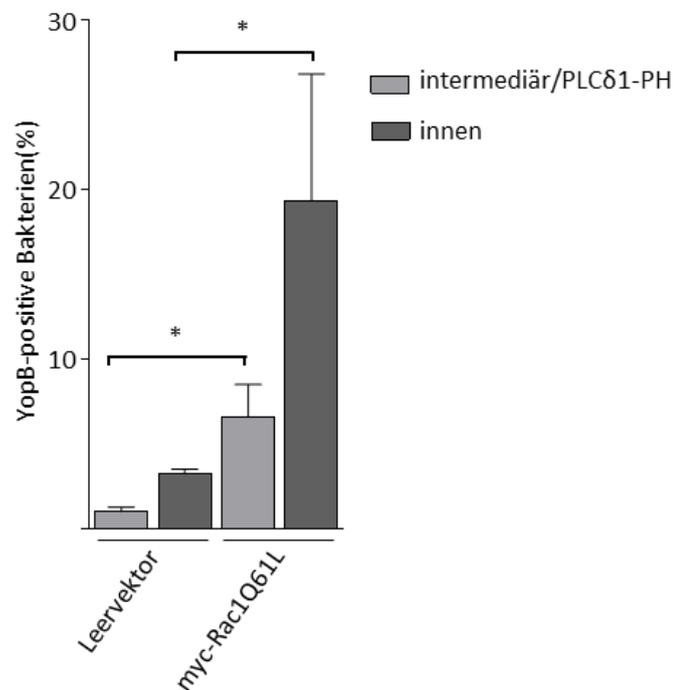
Verwendung eines zweiten Sekundärantikörpers. Außen liegende Yersinien zeigten demnach eine Doppelfärbung und konnten in der Auswertung deutlich von den Antikörper-unzugänglichen Bakterien unterschieden werden. In der Quantifizierung zeigte sich, dass nach einstündiger Infektion noch etwa 90% der Zell-assoziierten Wildtyp-Yersinien außerhalb der Kontrollzellen detektierbar sind. Durch die Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 verminderte sich dieser Anteil auf etwa 40% (Abbildung 5-23). Der Vergleich von Kontroll- und transfizierten Zellen verdeutlichte, dass die Rac1-Aktivierung zu einer verstärkten Aufnahme der Wildtyp-Yersinien in das Antikörper-unzugängliche Kompartiment führte (Abbildung 5-23).



**Abbildung 5-23 Die Überexpression von aktivem Rac1 in HeLa-Zellen verstärkt die Internalisierung der Wildtyp-Yersinien.** HeLa-Zellen wurden mit dem myc-Leervektor oder dem myc-Rac1Q61L-Expressionsvektor transfiziert und anschließend mit WA-314 Bakterien für eine Stunde infiziert (MOI20). Die infizierten Zellen wurden fixiert und zur Markierung der extrazellulären, Antikörper-zugänglichen Yersinien mit anti-LPS-Antikörpern und Alexa-488-Sekundärantikörpern immungefärbt. Erst im Anschluss wurden die Zellen permeabilisiert und mit dem gleichen LPS-Antikörper, jedoch mit einem anderen Sekundärantikörper (Alexa-568) immungefärbt, um alle intermediären und innen liegenden Yersinien anzufärben (Antikörper-unzugängliche Yersinien). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von  $n = 1609$  Zell-assoziierten Bakterien auf Kontroll-transfizierten Zellen und  $n = 3482$  Zell-assoziierten Bakterien auf aktivem Rac1-überexprimierenden Zellen. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

Basierend auf der Beobachtung, dass die Rac1-Aktivierung in HeLa-Zellen die Aufnahme der Yersinien in das Antikörper-unzugängliche Kompartiment verstärkt (Abbildung 5-23), sollte darauffolgend die Fraktion der YopB-positiven Bakterien im Kontext dieses Effekts untersucht werden. Da das Antikörper-unzugängliche Kompartiment mithilfe der PI(4,5)P<sub>2</sub>-Anreicherung weiter differenziert werden kann, wurden HeLa-Zellen mit dem myc-Rac1Q61L-Expressionsvektor oder dem myc-Leervektor, sowie zusätzlich mit dem PLC $\delta$ -PH-GFP-Expressionsvektor transfiziert und mit Wildtyp-Yersinien für eine Stunde infiziert. Zur Untersuchung der YopB-positiven Bakterien

wurden die infizierten Zellen mit anti-YopB-Antikörpern immungefärbt und hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle, definiert durch eine deutliche Anreicherung von PLC $\delta$ -PH-GFP, kategorisiert. Die YopB-positiven Bakterien konnten im intermediären (PLC $\delta$ -PH-GFP-positiv) und innen liegenden Zellkompartiment gefunden werden (Abbildung 5-24). Dabei befand sich unter allen untersuchten Bedingungen etwa ein Drittel der YopB-positiven Bakterien im intermediären Kompartiment (Abbildung 5-24). Durch die aktive Rac1-Überexpression in HeLa-Zellen zeigte sich eine 6-fache Erhöhung der Translokator-ausbildenden Bakterien in beiden intrazellulären Kompartimenten (Abbildung 5-24). Der Anteil der YopB-positiven Bakterien in Bezug auf alle Zell-assoziierten Bakterien steigerte sich signifikant von rund 1% auf 6% im PLC $\delta$ -PH-GFP-angereicherten Kompartiment und von rund 3% auf 19% im intrazellulären, Antikörper-unzugänglichen Kompartiment (Abbildung 5-24).



**Abbildung 5-24 Die myc-Rac1Q61L-Überexpression erhöht die Anzahl YopB-positiver Bakterien im intermediären und inneren Zellkompartiment.** HeLa-Zellen wurden mit dem PLC $\delta$ -PH-GFP-Expressionplasmid und entweder mit dem myc-Leervektor oder dem myc-Rac1Q61L-Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden mit Wildtyp-Yersinien (WA-314) für 60 Minuten infiziert (MOI50), fixiert, permeabilisiert und mit anti-YopB-Antikörpern immungefärbt. Die Fraktion der YopB-positiven Bakterien wurde hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle untersucht. Eine Anreicherung von PLC $\delta$ -PH-GFP kategorisierte Bakterien für das intermediäre Kompartiment. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von n = 1820 Bakterien auf Kontroll-behandelten Zellen und n = 6020 Bakterien auf Rac1-überexprimierenden Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Daten sind Teil der Veröffentlichung (Nauth et al. 2018).

Zusammenfassend ließ sich in Epithelzellen und Phagozyten zeigen, dass die Ausbildung der Translokationsspore vermutlich in einem intermediären Kompartiment/Prävakuele induziert wird,

Yersinien diese Prävakuole durchlaufen und schließlich – zumindest in einigen Präparationen von primären Makrophagen - vollständig aufgenommen werden. Durch Modulation der kleinen Rho-GTPase Rac1 lässt sich die Anzahl der Translokator-bildenden Bakterien signifikant steigern, was vermutlich durch eine verstärkte Internalisierung in die Prävakuole begründet ist.

## 6 Diskussion

*Yersinia* hat vielseitige Virulenzfaktoren, um den Wirt zu besiedeln und die Immunantwort zu umgehen. Der wichtigste Faktor ist dabei das Typ-III-Sekretionssystem. Diese etwa 150 nm lange und 40 nm breite Struktur durchspannt die bakterielle innere und äußere Membran und baut sich aus Basalkörper, Nadel, *Tip*-Komplex und Translokation auf (Zhang et al. 2017; Kudryashev et al. 2013; Cornelis 2006). Das Translokation, bestehend aus den Porenproteinen YopB und YopD, ist ein essentieller Bestandteil der T3-Sekretionsmaschine und ist mit homologen Proteinen in zahlreichen Pathogenen vertreten (Håkansson et al. 1996b; Holmström et al. 2001; Pettersson et al. 1999; Mattei et al. 2011; Achtman et al. 1999; Persson et al. 1995; Sarker et al. 1998). Dennoch sind der genaue Aufbau, die Lokalisation und die Regulation der Translokationspore weitgehend unbekannt. Zahlreiche Studien zum T3SS zeigten, dass die Effektortranslokation eine enge Verbindung zwischen den Bakterien und der Wirtszelle erfordert (Grosdent et al. 2002; Russo et al. 2016). Die Translokationspore stellt das zentrale Verbindungsstück zwischen Wirtszelle und Bakterium dar und unterliegt demnach unausweichlich dem Einfluss zellulärer Faktoren.

Die Untersuchung einzelner Komponenten des Translokations gestaltet sich schwierig. Die stark hydrophoben, porenbildenden Proteine YopB und YopD sind sowohl *in vitro* als auch bei der Zellinfektion schwierig zu isolieren und zu charakterisieren. Zum einen müssen die Translokationsproteine in entfalteter Form durch die Nadel exportiert werden, um anschließend in die Wirtszellmembran zu inserieren. Zum anderen können Fusionsproteine mit gängigen Fluoreszenzmarkern wie GFP aufgrund ihrer Tertiärstruktur nicht exportiert werden und führen zu einer Blockierung der Sekretionsnadel (Radics et al. 2014). Die innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelten spezifischen Antikörper gegen YopB und YopD ermöglichten in Kombination mit STED- und SIM-Mikroskopie sowie Immungold-Transmissionselektronenmikroskopie die hochaufgelöste Darstellung des Translokations in Interaktion mit der Wirtszelle. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Translokationspore inseriert in die Wirtszellmembran in Verbindung mit weiteren Komponenten des Injektisoms visualisiert werden, was das Injektionsmodell der Translokation in *Yersinia* bestätigte. Die Daten deuten gesamt genommen darauf hin, dass die Ausbildung der Translokationsporen in einem Membran-assoziierten Wirtszellkompartiment initiiert wird, welches die Bakterien vor dem extrazellulären Milieu abschirmt, jedoch zugänglich bleibt für niedermolekulare Substanzen. Dieses als Prävakuoole bezeichnete Kompartiment zeigt eine starke Anreicherung des Phosphoinositids PI(4,5)P<sub>2</sub>. Zelluläre Faktoren, wie beispielsweise die Rho-GTPase Rac1, können die Ausbildung dieses Kompartiments und der Translokationspore in *Yersinia* stimulieren und regulieren.

## 6.1 Das Translokon wird in der Prävakuole ausgebildet

Die Translokationspore bildet sich bei Zellkontakt und inseriert in die Wirtszellmembran (Håkansson et al. 1996b; Neyt und Cornelis 1999a; Ide et al. 2001; Faudry et al. 2006). Bislang ist jedoch unklar in welchem Wirtszellkompartiment sich die Yersinien bei Ausbildung des Translokons befinden. Im Unterschied zu *Salmonella* oder *Shigella* wird *Yersinia* generell als ein extrazelluläres Pathogen gesehen (Hanski et al. 1989; Lian et al. 1987; Pizarro-Cerdá et al. 2015). In Untersuchungen der letzten Jahre zeigte sich allerdings, dass sich im Verlauf der Infektion ein Teil der Yersinienpopulation auch in intrazellulären Kompartimenten befindet (Pujol und Bliska 2005; Sarantis et al. 2012; Curfs, Jo H. A. J. et al. 1995; Bahnan et al. 2015; Grosdent et al. 2002). Bislang wurden wenige Untersuchungen zu intrazellulären Yersinien durchgeführt und ihre Rolle während der Infektion bleibt spekulativ. Es gibt bisher keine eindeutigen Hinweise, ob *Y. enterocolitica* nach Aufnahme in Makrophagen replizieren kann, das T3SS in intrazellulären Kompartimenten ausbildet und Effektorproteine transloziert. Die Untersuchung des Translokons in der Interaktion mit der Wirtszelle stand im Fokus dieser Arbeit. Die hier gewonnenen Ergebnisse erweitern das Bild der zellulären Lokalisation der Yersinien und sollen nachfolgend diskutiert werden.

Das Phosphoinositid PI(4,5)P<sub>2</sub> scheint ein wichtiger Faktor bei der Phagozytose von Yersinen zu sein. So konnte für *Y. pseudotuberculosis* bei der Invasin-Integrin-abhängigen Phagozytose eine verstärkte Bildung von PI(4,5)P<sub>2</sub> an der Eintrittsstelle der Bakterien gezeigt werden (Wong und Isberg 2003). Sarantis und Kollegen zeigten weitergehend, dass das PI(4,5)P<sub>2</sub>-haltige Membrankompartiment die Bakterien nicht vollständig vom extrazellulären Milieu trennt. Vielmehr bleibt bei der hier in Cos-Zellen beschriebenen Prävakuole eine Verbindung zur Plasmamembran bestehen. Diese Verbindung zum extrazellulären Raum ist für kleine Moleküle wie FM4-64 (600 Da) oder Streptavidin (60 kDa), aber nicht für Antikörper (150 kDa) passierbar (Sarantis et al. 2012). Die Ausbildung der Prävakuole konnte in dieser Arbeit auch während der Infektion von HeLa-Zellen und primären humanen Makrophagen mit *Y. enterocolitica* beobachtet werden. Zur Untersuchung und Visualisierung der Prävakuole und der darin befindlichen Yersinien wurden in dieser Arbeit Wildtyp-Yersinien vor Infektion biotinyliert. Nachfolgend wurden die infizierten Zellen sequentiell mit Antikörpern und Fluoreszenz-markiertem Streptavidin gefärbt. Die Infektion von Makrophagen über einen Zeitraum von 60 Minuten verdeutlichte, dass die Aufnahme der Yersinien ein dynamischer Prozess ist. Die Yersinien durchlaufen während der Infektion mehrere Stufen der Internalisierung. So lassen sich zum einen Zell-adhärente Yersinien finden, die noch außerhalb der Zelle sind, zum anderen sind Yersinien in der Prävakuole sowie im inneren Kompartiment detektierbar. Auch in dieser Arbeit konnte eine starke Anreicherung von PI(4,5)P<sub>2</sub> an den intermediär lokalisierten Yersinien während der Infektion von HeLa-Zellen und Makrophagen

beobachtet werden. Nahezu alle (95%) HeLa-Zellen-assoziierten Yersinien, die für Streptavidin zugänglich waren, zeigten auch eine deutliche Anreicherung von PI(4,5)P<sub>2</sub>. Zur Untersuchung der PI(4,5)P<sub>2</sub>-angereicherten Prävakuole wurden die Zellen mit der GFP-markierten Pleckstrin-Homologie(PH)-Domäne der Phospholipase C  $\delta$  (PLC $\delta$ ) transfiziert. Die Überexpression des PI(4,5)P<sub>2</sub>-Biosensors zeigte keine Auswirkung auf die Zellviabilität oder die Phagozytose der Yersinien. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind stimmig mit den bereits publizierten Daten zur Prävakuole und konnten durch die Untersuchung des Translokons erweitert werden. Die fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten erstmals die Ausbildung des Translokons in diesem Wirtszellkompartiment (5.6 und 5.7). Verschiedene Ergebnisse zeigen, dass die Translokatorproteine YopB und YopD erst nach Aufnahme der Yersinien in die Prävakuole auf der Bakterienoberfläche zu finden sind (5.7 und 5.7.2). Zum einen bestätigten Versuche mit unpermeabilisierten Zellen und YopB/D-Antikörper-Außen-Färbungen, dass Bakterien, die sich noch außerhalb der Zelle befinden, kein Translokons ausbilden (5.7.2). Zum anderen konnten die Translokons-bildenden Bakterien in elektronenmikroskopischen Aufnahmen in engem Kontakt zur Wirtszellmembran detektiert werden (5.6), auch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der PI(4,5)P<sub>2</sub>-angereicherten Prävakuole zeigten eine enge Membranhülle um die Bakterien (5.7.3 und 5.7.4). Die Lokalisation der Translokons-bildenden Yersinien innerhalb der Prävakuole konnte zusätzlich durch Verwendung eines modifizierten Digitonin-Lyse-Assay nach Nordfelth und Wolf-Watz mit vorhergehender Proteinase K-Behandlung bestätigt werden (5.4). Aufgrund ihrer geringen Größe (~29 kDa) hatte die Proteinase K Zugang zur Prävakuole und konnte einen Teil der Translokatorproteine YopB und YopD degradieren, wobei die im Zytoplasma befindlichen Effektoren (YopH) und Translokatoren (YopB, YopD) unbeeinträchtigt blieben. Diese Ergebnisse deuteten bereits auf die Lokalisation Translokons-positiver Bakterien im inneren Kompartiment hin und konnten mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen bestätigt werden. So konnte während der Infektion von Makrophagen über 60 Minuten beobachtet werden, dass sich der Anteil der Translokons-positiven Yersinien im inneren Kompartiment vergrößerte (5.7.2). Die Bakterien waren weder für Antikörper, noch für kleine Moleküle wie Streptavidin zugänglich und zeigten keine PI(4,5)P<sub>2</sub>-Anreicherung (5.7 und 5.7.2). Gleichzeitig konnte eine abnehmende Anzahl Translokons-positiver Bakterien innerhalb der Prävakuole beobachtet werden (5.7.2). Die Daten deuten gesamt darauf hin, dass die Ausbildung des Translokons in der Prävakuole initiiert wird und es nachfolgend zur vollständigen Aufnahme der Translokons-positiven Yersinien kommt. Aus der Literatur ist bekannt, dass zur Abschnürung der Prävakuole und vollständigen Phagozytose der Bakterien eine Änderung der PI(4,5)P<sub>2</sub>-Konzentration an der Plasmamembran nötig ist (Sarantis und Grinstein 2012; Clarke 2003; Botelho et al. 2000). Die anfängliche Anreicherung von PI(4,5)P<sub>2</sub> an den Eintrittsstellen der Yersinien wird durch die lokale Aktivierung von PIP5-Kinasen durch die GTPasen

Rac und Arf6 initiiert (Wong und Isberg 2003). Das synergistische Zusammenspiel von Rac1 und PI(4,5)P<sub>2</sub> zur Aufnahme der Yersinien konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden (5.7.5). So konnte bei Überexpression der konstitutiv aktiven Form von Rac1 (myc-Rac1Q61L) und des PI(4,5)P<sub>2</sub>-Biosensors eine gesteigerte Ausbildung der Prävakuole und ein signifikant erhöhter Anteil Translokation-bildender Yersinien detektiert werden (5.7.5). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass nachfolgend auf die PI(4,5)P<sub>2</sub>-Akkumulation und auf das Schließen der Membran die sofortige Metabolisierung des Phosphoinositids folgt. Dieser Prozess wird für eine Vielzahl von Internalisierungsprozessen einschließlich der Phagozytose, der (Clathrin-vermittelten) Endozytose und der Makropinozytose beschrieben (Di Paolo und Camilli 2006; Botelho et al. 2000; Porat-Shliom et al. 2008). PI(4,5)P<sub>2</sub> kann auf mehrere Wege metabolisiert werden. Das Phosphoinositid kann einerseits durch Inositol-Phosphatasen dephosphoryliert oder durch die PLC zu den sekundären Botenstoffen Inosit-3,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert werden. Aus Untersuchungen an professionellen Phagozyten, zu denen Makrophagen gehören, ist bekannt, dass bei der Rezeptor-abhängigen Phagozytose PI3-Kinasen aktiviert werden, welche eine entscheidende Rolle bei der Phosphorylierung von PI(4,5)P<sub>2</sub> zu PI(3,4,5)P<sub>3</sub> spielen (Araki et al., 1996; Cox et al., 1999; Herre et al., 2004). Auch bei der Internalisierung von Yersinien in epitheliale Zellen konnte eine PI3-Kinase Abhängigkeit gezeigt werden (Schulte et al. 1998). Sarantis et al. zeigten, dass die PLC vermutlich keine wichtige Rolle bei der Internalisierung von *Y. pseudotuberculosis* spielt. Zudem konnte während der Infektion von Cos-Zellen die Rab5-abhängige Rekrutierung der Phosphatasen OCRL and Inpp5b zur Prävakuole beobachtet werden, deren Aktivität vermutlich zur Hydrolyse von PI(4,5)P<sub>2</sub> und damit zur Abschnürung der Vakuole von der Plasmamembran führte. Die Fusion der Rab5-Vesikel mit der Prävakuole erfolgt in einem bisher nicht weiter beschriebenen PI3-Kinase-abhängigen Prozess (Sarantis et al. 2012). Die bislang veröffentlichten Untersuchungen zur Aufnahme von Yersinien in eukaryotische Zellen wurden vorwiegend mit *Y. pseudotuberculosis* und epithelialen Zelllinien durchgeführt und können daher nur unter Vorbehalt mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen werden. Insbesondere der Zelltyp ist ein entscheidender Faktor bei der Untersuchung der Internalisierung von *Yersinia*. Die vorliegenden Studien differenzieren zudem nicht zwischen Translokation-bildenden Yersinien mit vermutlich aktiven T3SS und Translokations-inaktiven Bakterien. Es ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit untersuchten *Y. enterocolitica* analog der Beschreibung von Sarantis et al. internalisiert werden. Des Weiteren zeigen die vorliegenden Daten, dass Translokation-positive Bakterien nach der Prävakuole in einem inneren, Streptavidin und Proteinase K unzugänglichen Kompartiment ohne PI(4,5)P<sub>2</sub>-Anreicherung zu finden sind. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigten ebenfalls eine intrazelluläre Lokalisation der Translokation-bildenden Yersinien. Dabei konnten mit Immungold markierte Translokations stets in einem membranumschlossenen Kompartiment gefunden werden. Die hier

betrachteten Ultradünnschnitte berücksichtigen allerdings nur einzelne Ebenen. Für eine vollumfassende Betrachtung der Yersinien während der Wirtszellinfektion wäre daher eine Kryoelektronentomographie sinnvoll. Zum jetzigen Zeitpunkt ist der genaue Prozess der vollständigen Aufnahme der Translokation-positiven *Y. enterocolitica* sowie die Zusammensetzung des inneren Kompartiments und der Prävakuole noch unklar. Des Weiteren müssen diese Kompartimente auf das Vorhandensein spezifischer zellulärer Marker (wie z. B. Rab5), sowie auf den pH-Wert untersucht werden. Bahnan und Kollegen beschrieben in ihrer Studie das sogenannte *Yersinia acidic compartment* (Bahnan et al. 2015). Wildtyp-Yersinien mit funktionalem T3SS persistierten auf der Zelloberfläche von Makrophagen und zeigten keine Anreicherung oder Interaktion mit Faktoren des endosomalen oder lysosomalen Abbaus wie EEA1 und LAMP1 (Bahnan et al. 2015). Die Autoren vermuteten, dass der niedrige pH-Wert in diesem Kompartiment die Insertion der Translokationsporen fördern könnte, wie in in vitro-Experimenten von Romano et al. beschrieben wurde (Romano et al. 2016; Bahnan et al. 2015). In einer anderen Studie zeigten Tsukano und Kollegen, dass *Y. pseudotuberculosis* die Ansäuerung im Phagolysosom in murinen Makrophagen verhindert, indem die Yersinien die Aktivität der V-ATPase-Pumpe um das 10-fache vermindern (Tsukano et al. 1999). Im Gegensatz hierzu stehen eigene vorläufige Daten, die zeigen, dass sich etwa 20% der YopB-positiven Yersinien nach einer Stunde Infektion in LAMP1-positiven Vakuolen befinden (durch Überexpression des lysosomalen Markers LAMP1 in Makrophagen). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen außerdem, dass bei der Infektion von primären Makrophagen der Gesamtanteil der YopB-positiven Bakterien nach 20-30 Minuten Infektion wieder stetig abnahm (5.3). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Translokation-bildenden Yersinien zumindest teilweise durch den phagolysosomalen Abbau der Zelle erkannt und abgebaut werden. Die genauen Mechanismen hinter der Ausbildung und Aufrechterhaltung der *Yersinia*-spezifischen Zellkompartimente, welche Faktoren die Translokationspore beeinflussen und welche Eigenschaften das nach der Prävakuole folgende Kompartiment hat, bleiben weiterhin Gegenstand der T3SS-Forschung.

## 6.2 Wirtszellfaktoren beeinflussen die Ausbildung der Translokationspore

### 6.2.1 Der Wirtszelltyp bestimmt den Anteil der Translokation-bildenden Yersinien

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen verschiedene Wirtszellfaktoren auf, die die Ausbildung des Translokons beeinflussen und regulieren. Um das Translokon unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden primäre humane Makrophagen mit Wildtyp-Yersinien infiziert und mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie auf die Ausbildung der Porenproteine YopB und YopD untersucht (5.3). Makrophagen sind typische Zielzellen der

enteropathogenen Yersinien. Nach Überwinden der M-Zellen im Darm kommen Yersinien in den Peyer Plaques erstmals in Kontakt mit den Zellen der angeborenen Immunantwort (Köberle et al. 2009; Marketon et al. 2005; Durand et al. 2010). Die in dieser Arbeit gezeigten Daten indizieren, dass bei der Ausbildung der Translokationspore die Internalisierung der Yersinien eine wichtige Rolle spielt. Infektionsversuche mit den phagozytisch-aktiven Makrophagen zeigten, dass diese einen stärkeren, fördernden Effekt auf die Ausbildung der Translokationspore haben als HeLa-Zellen (5.3). Der Internalisierungsprozess der Yersinien beginnt in Makrophagen unmittelbar nach Zellkontakt und ebenso schnell können Translokation-bildende Bakterien detektiert werden (5.7.1 und 5.7.2). Während der HeLa-Zellinfektion war nur ein geringer Anteil der Bakterien positiv für YopB und YopD, was sich vermutlich durch die verminderte phagozytische Aktivität der Zellen erklären lässt (5.3). Die epithelialen Zellen sind in der Lage Bakterien zu internalisieren, zeigen jedoch eine weitaus niedrigere Aktivität als die stark phagozytischen Makrophagen. Die vergleichsweise schnelle Ausbildung der Translokationsporen in Makrophagen verdeutlicht, dass der Zelltyp einen signifikanten Einfluss auf die Porenbildung ausübt. Um möglichst ähnliche Versuchsbedingungen bei Infektion der verschiedenen Zelltypen zu schaffen, wurden die Yersinien zur Aktivierung des Virulenzplasmids vorab bei 37°C kultiviert und für einen simultanen Infektionsstart auf die Zellen zentrifugiert. Auch bei Infektion mit unterschiedlichen MOIs konnte keine Änderung in der relativen Anzahl der Translokation-bildenden Bakterien in Bezug auf alle Zell-assoziierten Bakterien beobachtet werden. Die Makrophagen-Präparationen zeigten aufgrund unterschiedlicher und zufällig ausgewählter, anonymer Donoren unterschiedlich stark ausgeprägte Phagozytoseverhalten (5.7.1).

Die bei der HeLa-Zellinfektion beobachtete geringe Anzahl an Translokation-bildenden Bakterien wurde bereits Ende der 1990er Jahre von Håkansson et al. beschrieben (Håkansson et al. 1996b). Die Autoren vermuteten damals, dass aufgrund einer niedrigen YopB-Expression die YopB-Fluoreszenzsignale unterhalb der Detektionsgrenze lagen und sich damit die geringe Anzahl von positiven Bakterien erklären ließ. Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die Expression der Porenproteine unter allen untersuchten Bedingungen annähernd gleich ist. Die Ergebnisse aus Western Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass die hier untersuchten zellulären und bakteriellen Faktoren nicht die Expression der Porenproteine beeinflussen, sondern die T3SS-abhängige Translokation der Porenproteine regulieren und stimulieren (5.4). Die gezielte Lyse der eukaryotischen Membranen mit Digitonin ermöglichte die Fraktionierung der infizierten Zellen in die Digitonin-lösliche, zytoplasmatische Fraktion und die Membranfraktion mit daran gebundenen, intakten Yersinien. So konnte in der Western Blot-Analyse unter allen untersuchten Bedingungen, d.h. auch unter Bedingungen gesteigerter

Translokationsaktivität und damit verstärkter Translokationbildung, eine gleichermaßen starke Expression der Porenproteine beobachtet werden.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass Makrophagen einen stärkeren aktivierenden Effekt auf Yersinien haben. Die vermehrte Aufnahme in die Prävakuoole steigert vermutlich den Anteil der Translokation-bildenden Bakterien in Makrophagen. Wie die Interaktion der Yersinien und der Translokatoren mit der Wirtszelle im Einzelnen erfolgt, bedarf weiterer Untersuchungen.

#### 6.2.2 Rac1 moduliert die Internalisierung der Yersinien in die Prävakuoole

Aus der Literatur und aus Ergebnissen innerhalb der Arbeitsgruppe sind verschiedene Mechanismen zur Steigerung der Translokationsaktivität bekannt. So hat beispielsweise die Infektion mit der YopE-Deletionsmutante eine gesteigerte Effektortranslokation zur Folge (Black und Bliska 2000; Pawel-Rammingen et al. 2000). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass YopE ein wichtiger Faktor in der Regulation der Translokation und in der Phagozytose der Yersinien ist. Das Rho-GTPase-aktivierende Protein YopE beeinflusst durch die Deaktivierung kleiner Rho-GTPasen (RhoA, RhoG, Rac1, Cdc42) die Aktin-Polymerisierung und wirkt der Phagozytose entgegen (Black und Bliska 2000; Pawel-Rammingen et al. 2000; Aili et al. 2002; Roppenser et al. 2009). Infektionsstudien zeigten, dass YopE während der Zellinfektion vorwiegend mit Rac1 und mit der im Signalweg vorgestellten GTPase RhoG interagiert (Aili et al. 2006; Aepfelbacher et al. 2011). Neben der anti-phagozytischen Wirkung auf Makrophagen und HeLa-Zellen (Black und Bliska 2000; Rosqvist et al. 1990), verhindert das Effektorprotein die Bildung lytischer Poren (Viboud et al. 2006; Viboud und Bliska 2001; Aili et al. 2006; Aili et al. 2008; Mejía et al. 2008) und reguliert vermutlich in einem negativen Rückkopplungsmechanismus die Translokation der Effektor-Yops (Aili et al. 2006; Aili et al. 2008; Isaksson et al. 2009; Aepfelbacher et al. 2011; Dewoody et al. 2011; Gaus et al. 2011). Die YopE-Deletionsmutante stellt daher ein hilfreiches Werkzeug zur Untersuchung des Translokons unter Bedingungen der gesteigerten Translokation dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeitsgruppe zeigen, dass das Effektorprotein die Ausbildung der Translokationspore stark beeinflusst. Der Verlust von YopE in Yersinien führte während der Wirtszellinfektion zu einer um das 15-fache gesteigerten Anzahl Translokation-bildender Yersinien im Vergleich zu Wildtyp-Yersinien und damit zu einer verstärkten Effektortranslokation (Huschka 2017; Nauth et al. 2018). Mithilfe der STED-Mikroskopie konnte zusätzlich dargestellt werden, dass unter diesen Infektionsbedingungen auch eine signifikant gesteigerte Anzahl der Translokatorproteine pro Bakterienzelle auftritt (5.4; Huschka 2017; Nauth et al. 2018).

Als weiterer Faktor, der die Anzahl der YopB-positiven Bakterien während der Wirtszellinfektion beeinflusst, konnte die Rho-GTPase Rac1 selbst identifiziert werden. Vorhergehende Studien

zeigten, dass auch bei der Überexpression der konstitutiv aktiven Form von Rac1 eine verstärkte Effektortranslokation während der Infektion mit Wildtyp-Yersinien besteht (Wolters et al. 2013; Aili et al. 2008; Aepfelbacher und Wolters 2017). Die vorliegenden Daten zeigen durch Anwendung biochemischer und fluoreszenzmikroskopischer Methoden, dass die Anzahl der Translokation-bildenden Bakterien durch die Aktivierung von Rac1 gesteigert wird. Dies ist vermutlich durch eine verstärkte Internalisierung der Yersinien begründet. Rac1 wurde in der Literatur bereits mehrfach als wichtiger Faktor in der Aufnahme von Yersinien beschrieben. In der Rezeptor-abhängigen Phagozytose treten Yersinien über ihr Oberflächenprotein Invasin mit  $\beta$ -Integrinen der Zielzellen in Kontakt, was zur Rekrutierung von Rac1 zu den Eintrittsstellen der Yersinien führte (Alrutz et al. 2001). Bei Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 in HeLa-Zellen und Infektion mit Wildtyp-Yersinien konnte die Anzahl der YopB-positiven Yersinien um mehr als das 15-fache gesteigert werden und erreichte ähnliche Werte wie bei der Infektion von Makrophagen (5.4). Der Prozess der Aufnahme der Yersinien in die HeLa-Zellen und die Ausbildung der Porenproteine auf der Bakterienoberfläche erfolgte deutlich langsamer im Vergleich mit Makrophagen. Bei der Infektion von Makrophagen konnte bereits nach 20-minütiger Infektionszeit bei etwa einem Drittel der Bakterien die Translokation-Bildung beobachtet werden. Bei HeLa-Zellen dauerte es bis zu 60 Minuten bis die Translokationsproteine YopB und YopD detektierbar waren (5.3). Während der Infektion von HeLa-Zellen erhöhte sich der Anteil der Translokation-bildenden Bakterien durch die Überexpression der aktiven Form von Rac1 jeweils um das 6-fache in der Prävakuelle und im inneren Kompartiment (5.7.5). Vergleichende Studien von Makrophagen und HeLa-Zellen aus der Arbeitsgruppe zeigten sowohl ein höheres endogenes Rac1-Level als auch erhöhten Anteil von aktivem Rac1 in Makrophagen. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass durch Aktivierung von Rac1 die niedrige intrinsische Aktivität der epithelialen HeLa-Zellen gesteigert werden kann. Dies führt sehr wahrscheinlich zu einer verstärkten Internalisierung der Bakterien und Ausbildung der Prävakuelle.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die aus der Literatur bekannte gesteigerte Effektor-Translokation durch die verstärkte Ausbildung von Translokationsporen und damit einer höheren Anzahl aktiver T3SS begründet ist. Zelluläre Faktoren, wie die aktivierte Rho-GTPase Rac1 und die damit verbundene Aufnahme der Yersinien in die Prävakuelle fördern die Ausbildung der Translokationspore. Die deutlich verstärkte Internalisierung der Yersinien und gesteigerte Translokationspore-Anzahl bei der Infektion mit Makrophagen ist vermutlich durch erhöhte endogene Rac-Aktivität begründet. Die Aufnahme in die Prävakuelle ist vermutlich Voraussetzung für die Ausbildung der Translokationspore. Bei Fehlen des Rac1 inhibierenden Faktors YopE wird dieser Prozess wahrscheinlich begünstigt. Des Weiteren konnte bei der Infektion von aktivem Rac1-überexprimierenden HeLa-Zellen mit der YopE-Deletionsmutante keine weitere Steigerung

der Translokationsporen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Daraus ist zu folgern, dass YopE in der Infektion mit Wildtyp-Yersinien die konstitutiv aktive Form von Rac1 nicht inhibieren kann.

### 6.3 STED-Mikroskopie gibt neuen Einblick in die Translokation-Bildung während der Wirtszellinfektion

Bei STED-Auflösung konnte die Insertion der Porenproteine in die Plasmamembran der Wirtszelle beobachtet werden (5.7.4). Die hier verwendete STED-Mikroskopie zeigte eine dreifach verbesserte Auflösung konfokaler YopB- und YopD-Fluoreszenzflecke (Nauth et al. 2018; Huschka 2017). Die nähere Untersuchung der Translokatorproteine YopB und YopD mittels STED-Mikroskopie erbrachte erstmals Informationen zur Ausbildung des Translokons. So zeigte sich, dass die Anzahl der Translokatorproteine eines einzelnen Bakteriums in Abhängigkeit des Zelltyps variiert, und dass die Translokons eine definierte räumliche Anordnung während der Wirtszellinfektion aufweisen (5.4.2 und 5.4.3).

Die eher konfluierenden YopB/YopD-Fluoreszenzsignale in konfokal-mikroskopische Aufnahmen während der Infektion von Makrophagen (5.3 und 5.7.2) ließen eine erhöhte Anzahl von YopB und YopD unter dem Einfluss zellulärer Faktoren vermuten. Die Charakterisierung der Porenproteine mittels STED-Mikroskopie zeigte, dass bei der Infektion von Makrophagen die Anzahl der Fluoreszenzpunkte pro Bakterium um das 1,5-fache gesteigert ist (5.4.2). Es ist zu vermuten, dass die gesteigerte Aufnahme der Yersinien in die Prävakuale nicht nur die Anzahl der Translokation-positiven Bakterien erhöht, sondern auch die Anzahl der Porenproteine des einzelnen Bakteriums. Übergreifend konnte bei HeLa-Zellen mit durchschnittlich 18 Fluoreszenzpunkten und bei Makrophagen mit 33 Fluoreszenzpunkten (5.4.2) eine deutlich höhere Anzahl an Translokatorproteinen beobachtet werden, als nach den Ergebnissen von Kudryashev et al. und Zhang et al. zu erwarten wäre.

Bei näherer Betrachtung der Fluoreszenzpunkte zeigte sich außerdem eine gruppierte Anordnung der Translokons auf der Bakterienoberfläche während der Infektion von HeLa-Zellen (5.4.3). Mithilfe einer Software-unterstützten Gruppenanalyse wurden die Fluoreszenzsignale hinsichtlich ihrer Größe und Position untersucht. Dabei zeigte sich, dass durchschnittlich drei Fluoreszenzpunkte eine Gruppierung bilden. Diese verteilten sich auf der Bakterienoberfläche im Abstand von durchschnittlich 716 nm zueinander. Innerhalb einer Gruppe lagen die einzelnen Fluoreszenzpunkte durchschnittlich 127 nm voneinander entfernt. Die Daten bestätigen die Beobachtungen von Kudryashev und Kollegen, die in *Y. enterocolitica* Minizellen eine Gruppenbildung von Injektisomnadeln beschrieben (Kudryashev et al. 2015). In kombinierter

Fluoreszenzmikroskopie und Kryo-ET untersuchten Kudryashev et al. Fluoreszenz-markierte Basalkörper-Komponenten des Injektisoms (YscD, YscV und YscQ) unter Sekretionsbedingungen in *Y. enterocolitica* E40 Minizellen (250 - 350 nm) (Kudryashev et al. 2015). Kryo-elektronentomographische Aufnahmen der Yersinien zeigten eine gruppierte räumliche Verteilung der Injektisome auf der Bakterienoberfläche. Die in Tomogrammen identifizierten Injektisome wurden einer Simulation unterzogen, welche die Auflösung auf das Niveau fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen reduzierte (~300 nm). Dabei zeigte sich, dass sich in einem Fluoreszenzpunkt durchschnittlich 2,5 Injektisome befinden. Bei Induktion der Sekretion durch Chelatierung des Calciums im Kulturmedium bildeten sich neue Injektisome in bereits bestehende Injektisom-Gruppen. Diese Gruppen aus durchschnittlich 2,5 Injektisomen verteilten sich auf der Bakterienoberfläche im Abstand von 400 nm zueinander. Innerhalb einer Gruppierung ordneten sich die einzelnen Injektisome im Abstand von 100 nm zueinander an. Trotz unterschiedlicher Versuchsbedingungen und Techniken zeigen die Daten eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die gruppierte Anordnung der Injektisome und Translokons scheint ein wichtiger Aspekt der Bakterien-Wirtszell-Interaktion zu sein (Kudryashev et al. 2015). Zum einen maximiert die Verteilung der Injektisom-Gruppen auf der gesamten Bakterienoberfläche die mögliche Interaktion mit der Wirtszelle. Zum anderen könnte die Bildung dieser Injektisom-Gruppierungen ein Mechanismus darstellen, um die Translokationsaktivität zu steuern und anzupassen (Kudryashev et al. 2015). Diese Hypothese kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit zum Teil unterstützt werden. So zeigte sich unter Bedingungen erhöhter Translokationsaktivität neben dem erhöhten Anteil Translokon-bildender Bakterien teilweise auch eine gesteigerte Translokon-Bildung pro Bakterium (5.4.2).

Die Quantifizierung der Fluoreszenzpunkte ergab eine von den Literaturwerten abweichende Zahl an Injektisomen pro Bakterium. In der Gesamtheit konnten in der Studie von Kudrashev et al. durchschnittlich 6,2 Injektisome pro Tomogramm ermittelt werden. Die Autoren merkten jedoch an, dass diese Injektisomen-Anzahl aufgrund der verminderten Größe der Minizellen und der Artefakte des Kryo-ETs um Faktor zwei auf 12 Injektisome pro Bakterienzelle bzw. Tomogramm korrigiert werden muss. Das sogenannte *missing wedge*-Problem führt zum Datenverlust in der Elektronentomographie (Lucić et al. 2005). Injektisomen, die auf der oberen und unteren Seite der Bakterien gebildet werden, sind nur schwer zu visualisieren und entgehen damit der Detektion. Zhang et al. untersuchten in *Salmonella* Typhimurium die mEos-Fluoreszenz-markierte Basalkörper-Komponente PrgH unter Bedingungen der stimulierten T3SS-Expression (Zhang et al. 2017). Das YscD-Analogon PrgH wurde mit hochauflösender Mikroskopie (single-molecule switching nanoscopy, SMSN mit einer lateralen Auflösung von ~35 nm bzw. mit 4Pi-SMSN mit einer lateralen und axialen Auflösung von 20 nm) untersucht. Dabei konnten durchschnittlich 12 PrgH-Cluster pro

Bakterium identifiziert werden. Die gleichzeitige Antikörperfärbung des Nadelspitzenproteins SipD (homolog zu LcrV in *Yersinia*) bestätigte, dass es sich hierbei um assemblierte Injektisome handelte. Die Autoren vermuteten, dass die beobachtete Anzahl an PrgH-Clustern unterschätzt wurde, da Signale außerhalb des Sichtfeldes und der Detektion liegen können. Insbesondere die in dieser Untersuchung verwendete photoaktivierende mEos-Markierung beeinträchtigte die Detektion der Injektisome. Untersuchungen zeigten, dass nur 42% der mEos-Moleküle aktiviert und als Fluoreszenzsignale detektiert werden können (Zhang et al. 2017). Die Studien von Kudryashev et al. und Zhang et al. identifizierten je eine Mindestanzahl von 12 Injektisomen pro Bakterium (die Autoren vermuteten höhere Injektisom-Anzahlen aufgrund technischer Limitierungen). Dabei ist anzumerken, dass die Untersuchungen an Komponenten des Basalkörpers des T3SS ohne Zellkontakt durchgeführt wurden und daher nur unter Vorbehalt mit den vorliegenden Daten verglichen werden können. Zhang et al. untersuchten zudem das Inv-Mxi-Spa-Injektisom in *Salmonella* Typhimurium, das sich in Ausbildung und Regulation vom Ysc-T3SS in *Yersinia* spp. unterscheidet (Cornelis und van Gijsegem 2000; Mota et al. 2005b). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten vorwiegend auf die Ausbildung des durchgängigen Injektionsmodells während der Wirtszellinfektion hin. Das gleichzeitige Vorkommen freier Translokons ohne Bindung zum Injektisom ist aber weiterhin nicht auszuschließen und könnte eine Erklärung für die hier beobachtete hohe Translokons-Anzahl von bis zu 30 Translokons während der Makrophageninfektion sein (5.4.2).

Die Untersuchung der Porenproteine mit STED brachte eine enorme Auflösungsverbesserung. Dennoch kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden, ob es sich bei den hier gezeigten YopB-Fluoreszenzpunkten um einzelne Translokons handelt. Ausgehend von den aktuellen Erkenntnissen zur Größe der Translokationspore (Park et al. 2018), ist es möglich, dass es sich bei den Fluoreszenzpunkten um mehr als eine einzelne Pore handelt. Die Größe der Translokationspore wurde bis vor kurzem ausschließlich indirekt durch Rekonstitutions-, Osmoprotektions- und Dextranfreisetzungsversuche beschrieben (Håkansson et al. 1996b; Holmström et al. 1997; Blocker et al. 1999; Neyt und Cornelis 1999a; Dacheux et al. 2001; Mueller et al. 2008; Miki et al. 2004; Ide et al. 2001). Das von Park und Kollegen in der Wirtszellinfektion visualisierte *Salmonella*-Translokons ist mit einem Durchmesser von 13,5 nm und Länge von 8 nm viel kleiner als vorherige Daten indizierten (äußerer Porendurchmesser von 55-65 nm in EPEC bzw. 80 Å in *Pseudomonas* Schoehn et al. 2003; Ide et al. 2001). Zur Gruppenanalyse wurden die Fluoreszenzpunkte vermessen und es zeigte sich eine durchschnittliche Größe von rund 100 nm. Unbeantwortet bleibt, ob Fluoreszenzpunkte, die in dieser Untersuchung keiner Gruppe zugeordnet werden konnten, einzelne Translokons oder nicht aufgelöste Gruppen darstellen. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten unterstützen die Idee von Park et al., dass Zellkontakt und die

Interaktion mit dem *Tip*-Komplex essentiell für die Assemblierung funktioneller Translokons sind (5.2). Dabei ist es vermutlich zweitrangig in welchem Erreger das T3SS untersucht wird (Park et al. 2018). Um die tatsächliche Größe und Anzahl der Translokatoren zu identifizieren, bedarf es einer noch höher auflösenden Methode wie die kürzlich veröffentlichte MINFLUX-Mikroskopie, die es ermöglicht Strukturen im unteren Nanometerbereich aufzulösen (Balzarotti et al. 2017).

#### 6.4 Das Translokon steht in direkter Verbindung mit der Injektisomnadel

Bei Zellkontakt assembliert die Translokationspore am distalen Ende der Injektisomnadel und bildet dadurch einen kontinuierlichen Kanal zwischen Bakterium und Wirtszytosol (Lee et al. 1998; Marenne et al. 2003; Ryndak et al. 2005; Lara-Tejero und Galán 2009). Dieses in der T3SS-Forschung anerkannte Injektions- oder Ein-Schritt-Modell der Translokation konnte kürzlich erstmals während der Wirtszellinfektion für das *Salmonella*-T3SS visualisiert werden (Park et al. 2018). Zu Beginn dieser Arbeit wiesen mehrere Studien unter Anwendung unterschiedlicher Methoden auf das Vorkommen des Injektionsmodells in *Yersinia* hin, das den direkten Transport der Effektoren in das Zytoplasma der Zielzelle ermöglicht (Rosqvist et al. 1994; Schlumberger et al. 2005; Enninga et al. 2005). Anhand von *Yersinia*-Mutanten (Deletion von *YscP* oder *YadA*) konnte gezeigt werden, dass eine direkte Korrelation zwischen der Nadellänge und der Translokation besteht. *YscP*-Mutanten, mit kürzeren Nadeln im Vergleich zum Wildtyp, zeigten eine verminderte Effektor-Translokation. Eine Sekretion der Effektor-Yops ins Zellmedium konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass Kontakt zwischen Nadelspitze und Wirtszelle für die T3SS-abhängige Translokation bestehen muss (Mota et al. 2005a). Das Zwei-Schritt-Modell der Translokation beschreibt einen alternativen Mechanismus zur Translokation der Effektorproteine in die Zielzelle (Tejeda-Dominguez et al. 2017; Akopyan et al. 2011; Edgren et al. 2012; Dewoody et al. 2013b). Das Modell entstand aus der Beobachtung, dass während der Zellinfektion mit *Y. pseudotuberculosis* sowohl Effektoren als auch die Translokatoren *YopB* und *YopD* bereits vor Zellkontakt auf der Bakterienoberfläche zu finden waren (Akopyan et al. 2011; Edgren et al. 2012). In *Salmonella* Typhimurium konnten Lara-Tejero und Kollegen mittels Immunfluoreszenzfärbungen das LrcV-Analogon *SipD* vor Zellkontakt auf der Bakterienoberfläche detektieren. Die Translokatoren *SipB* (homolog zu *YopB*) und *SipC* (homolog zu *YopD*) hingegen waren erst unmittelbar nach Kontakt des Bakteriums mit der Zielzelle auf der Bakterienoberfläche detektierbar (Lara-Tejero und Galán 2009). In *Shigella* konnten beide Mechanismen der Translokation beobachtet werden, sowohl die Oberflächen-Lokalisation der Effektoren vor Zellkontakt (Watarai et al. 1995), als auch die Assemblierung der Pore am Ende der Injektisomnadel (Stensrud et al. 2008).

Mithilfe der hier verwendeten Mikroskopie-Techniken SIM, STED und Immungold-TEM konnte die Organisation des T3SS in *Y. enterocolitica* näher untersucht werden. Der Fokus der Untersuchung lag dabei auf der Translokationspore und ihrer räumlichen Anordnung zum Injektisom während der Infektion. Mit 3D-STED-Mikroskopie konnte das Porenprotein YopB während der Wirtszellinfektion inseriert in die Prävakuole dargestellt werden (5.7.4). Vorarbeiten zeigten bereits die Kollokalisierung der Translokatoren YopB, YopD und LcrV und deuteten auf die direkte Verbindung von Injektisom und Pore über die LcrV-Plattform hin (Huschka 2017; Nauth et al. 2018). Die gleichzeitige Visualisierung von Basalkörper, Nadel und Translokation innerhalb gleicher Injektisome mittels SIM-Mikroskopie (5.5) vervollständigte das Bild des durchgehenden Injektisoms in *Yersinia*. Die Translokatoren YopB und YopD konnten in enger räumlicher Nähe zur Basalkörperkomponente (GFP-)YscD gefunden werden. Die Quantifizierung der SIM-Mikroskopie-Daten ergab eine durchschnittliche Distanz von 104 nm zwischen YopB/YopD und GFP-YscD. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den Ergebnissen von Zhang et al. Zhang und Kollegen visualisierten mit hochauflösender *single-molecule switching*-Mikroskopie die Basalkörperkomponente PrgH (homolog zu YscD in *Yersinia*) im Abstand von 101 nm zum *Tip*-Komplex-Protein SipD (homolog zu LcrV in *Yersinia*) in lebenden *Salmonella* Typhimurium (Zhang et al. 2017). In dieser Arbeit sowie in der Studie von Zhang et al. wurden zur Immunfluoreszenzfärbung konventionelle Antikörper verwendet, die mit einer Größe von rund 150 kDa etwa 20 nm einnehmen und in der hochauflösenden Mikroskopie kleinster Strukturen zu Ungenauigkeiten führen. Für nachfolgende Studien ist daher die Verwendung von Nanotags, Nanobodies oder alternativen, derzeit noch in der Entwicklung stehenden Markierungen zu empfehlen.

Auch in Immungold-markierten TEM-Aufnahmen konnte das Porenprotein YopD in nächster Nähe zum Basalkörperprotein YscD detektiert werden. Basierend auf den bekannten Kenngrößen der einzelnen Injektisom-Komponenten sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für das Injektionsmodell. Dabei sei anzumerken, dass in beiden Untersuchungen (SIM und TEM) *Yersinia* verwendet wurden, die keine Effektoren ausbilden, was sich auf die Lokalisation und Assemblierung der Pore auswirken könnte. Bislang gibt es jedoch keine Indizien zur direkten Interaktion von Effektoren mit YopB oder YopD während der Ausbildung der Translokationspore.

## 6.5 LcrV assistiert in der Ausbildung des Translokons

Die in der Literatur bekannten Daten zu den Translokatoren stammen aus *in vitro* Studien und Infektionsversuchen und verdeutlichen die Abhängigkeit der drei Translokatorproteine während der Ausbildung des Translokons zueinander (Holmström et al. 2001; Persson et al. 1995; Pettersson et al. 1999; Sarker et al. 1998; Mueller et al. 2005; Broz et al. 2007; Mueller et al. 2008; Goure et al.

2004; Goure et al. 2005; Håkansson et al. 1996b). So konnte gezeigt werden, dass bei der Infektion von Erythrozyten, die Porenproteine nur in Anwesenheit von LcrV in die Membran inserieren (Goure et al. 2005; Broz et al. 2007). Die Interaktion von YopD und dem Nadelspitzenprotein LcrV ist essentiell für die Effektor-Translokation wie Untersuchungen mit mutierten Translokatorproteinen zeigten (Olsson et al. 2004; Armentrout und Rietsch 2016; Costa et al. 2010; Costa et al. 2015; Francis und Wolf-Watz 1998; Ligtenberg et al. 2013). Diese Daten werden durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. In Infektionsversuchen mit der LcrV-Deletionsmutante konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung der Porenproteine YopB und YopD eine scheinbar zufällige Verteilung der Proteine auf der Bakterienoberfläche gezeigt werden (5.2). Die unter diesen Bedingungen sichtbare punktförmige Verteilung der Porenproteine ähnelte dem Erscheinungsbild der funktionellen Translokationsporen in Wildtyp-Yersinien, doch die Porenproteine YopB und YopD zeigten nahezu keine Kollokalisierung. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte zudem keine Gruppierung der Fluoreszenzpunkte verzeichnet werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen ist daher zu folgern, dass es sich hierbei vermutlich nicht um funktionelle Poren handelt. Zu kritisieren ist, dass in dieser Arbeit nur die Ausbildung der Translokons untersucht wurde, nicht aber ob die Effektor-Translokation beeinträchtigt war. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass zur Ausbildung der funktionalen Translokationspore mehrere Bedingungen erfüllt sein müssen: Neben Zellkontakt und der Ausbildung der Prävakuoole, ist das Vorhandensein von allen drei Translokatorproteinen (YopB, YopD und LcrV) nötig. Auch in der kürzlich erschienen Arbeit von Park und Kollegen konnte gezeigt werden, dass bei Fehlen einer Komponente des Translokons keine funktionelle Pore gebildet werden kann (Park et al. 2018). Die Insertion der Translokationspore in die Plasmamembran der Wirtszelle ohne die Assistenz des *Tip*-Komplexes führt wahrscheinlich zu einer Struktur, die porenförmig ist, aber nicht der physiologischen, funktionellen Pore entspricht (Park et al. 2018).

## 6.6 Die Translokatoren YopB und YopD zeigen kein strukturiertes Muster unter Sekretionsbedingungen

Bei Kultivierung von *Y. enterocolitica* bei 37°C können die Porenproteine YopB und YopD mit Immunfluoreszenzfärbungen nicht auf der Bakterienoberfläche detektiert werden. Erst durch Induktion der Sekretion werden die Translokatorproteine auf der Bakterienoberfläche detektierbar (Huschka 2017). Zur Beantwortung der Frage nach der Organisation der Porenproteine unter der künstlich induzierten Sekretionsbedingung wurden die Proteine YopB und YopD im Einzelnen und gemeinsam in hochauflösender 2D- und 3D-STED-Mikroskopie untersucht. Die Studie von Kudryashev und Kollegen in *Y. enterocolitica* E40 Minizellen zeigte eine strukturierte Anordnung

von Injektisomen auf der Bakterienoberfläche unter den gleichen Versuchsbedingungen (Kudryashev et al. 2015). Die Autoren konnten anhand von kombinierter Fluoreszenzmikroskopie und Kryo-ET zeigen, dass sich bei Calcium-Depletion im Kulturmedium neue Injektisome in bereits bestehenden Injektisom-Gruppen bilden. Eine Gruppierung wie von Kudryashev et al. für Injektisomnadeln gesehen, konnte in dieser Arbeit für die Translokatorproteine unter Sekretionsbedingungen nicht beobachtet werden (5.1, Kudryashev et al. 2015).

Es ist aus der Literatur bekannt, dass Yersinien bei Calcium-Depletion im Kulturmedium große Mengen an Yops in den Kulturüberstand sekretieren. Für einige Yops, Effektoren und Transloaktoren, wurde ein Zurückfallen und vermutlich unspezifisches Rückbinden auf die Bakterienoberfläche beschrieben. Die Autoren früherer Studien erklärten dieses Phänomen durch die schlechte Löslichkeit der Yops. Die Proteine bilden demnach aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften Proteinaggregate auf der Bakterienoberfläche (Darveau et al. 1980; Straley und Brubaker 1981; Bölin et al. 1982; Yother und Goguen 1985). Die in dieser Arbeit und in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beobachtete dichte, homogene Oberflächenverteilung der Porenproteine YopB und YopD beruht vermutlich auf der Akkumulation der Proteine auf der Bakterienoberfläche. Auch in Dual-Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich dieser Phänotyp (5.1). Die Betrachtung einzelner Schnittebenen der 3D-STED-Aufnahmen verdeutlichte jedoch, dass die Porenproteine nicht immer deckungsgleich waren (5.1). Bei einer assemblierten und funktionalen Pore wäre eher eine deckende Kolo-kalisation zu erwarten wie sie unter Infektionsbedingungen beobachtet werden konnte (4.2). Zur Ausbildung eines funktionellen Translokons sind alle drei Translokatoren nötig (Cornelis und Wolf-Watz 1997; Marenne et al. 2003; Pettersson et al. 1999). Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass das Nadelspitzenprotein LcrV zur Assemblierung der funktionellen Translokationspore benötigt wird und sich bereits vor Zellkontakt und unter Sekretionsbedingungen an der Spitze der Injektisomnadel bildet (Mueller et al. 2005; Cornelis und Wolf-Watz 1997; Goure et al. 2005; Sarker et al. 1998; Ménard et al. 1994). Versuche mit Deletionsmutanten der einzelnen Translokatoren YopB, YopD und LcrV unter gleichen Versuchsbedingungen machte deutlich, dass die Ausbildung einer funktionalen Translokationspore an der Nadelspitze unter den hier untersuchten Bedingungen eher unwahrscheinlich ist. Denn auch bei Verlust einer Translokon-Komponente konnte eine dichte Oberflächenlokalisation der Porenproteine YopB und YopD beobachtet werden (5.1). Dies deutet vielmehr auf eine unspezifische Anreicherung der Translokatorproteine unter allen untersuchten Bedingungen hin.

Die Daten deuten in der Gesamtheit auf die Aggregation der stark hydrophoben Porenproteine auf der Bakterienoberfläche hin. Die Akkumulation hat vermutlich keine funktionelle Bedeutung und kommt durch die künstlich induzierte Yop-Sekretion zustande. Aufgrund der dicht gepackten,

starken Anreicherung auf der Bakterienoberfläche sind mögliche einzelne Injektisome vermutlich nicht detektierbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Infektionsstudien deuten darauf hin, dass die Assemblierung der Pore erst bei Zellkontakt erfolgt. Eine Gruppierung der Porenproteine wie Kudryashev et al. (Kudryashev et al. 2015) unter gleichen Versuchsbedingungen detektierten, konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

## 7 Material und Methoden

### 7.1 Materialien

#### 7.1.1 Geräte

Tabelle 7-1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Accu-Jet	Accu-jet pro, Brand, Wertheim, Deutschland
Elektrophorese	Mini-Protean II, Biorad, München, Deutschland
Entwickler für Röntgenfilme	Curix 60, Agfa, Morsel, Deutschland
Entwicklerkassette	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Gefrierbehälter	Kryogefrierbehälter, Nalgene Scientific, Rockford, USA
Gefrierschränke	-80°C: HERA freeze, Heraeus, Kendro Laboratory, Hanau, Deutschland -20 °C: comfort, Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	4-8°C, Liebherr Premium, Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Magnetrührer	RCT-Basic, IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
NanoDrop ND-1000	PegLab, Erlangen, Deutschland
Netzanschlussgerät	Power Pac 2000, BioRad, München, Deutschland
pH-Meter	Seven easy, Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
Photometer	Ultrospec 3000 pro, Amersham/GE Healthcare Europe, München, Deutschland
Pipetten	2, 10, 100, 200, 1000 µl, Research Plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Scanner	CanoScan 4400F, Canon, Amsterdam, Niederlande
Schüttelinkubator	Certomat BS-1, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Sterilbank	Hera Safe, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler	Primus-96, MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex	REAX Topo, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Waage	440-47N, Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
Wasserbad	GFL Typ 1013, GFL, Burgwedel, Deutschland
Western Blot-Apparatur	OWL HEP-1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Zellinkubator	CB Series, Binder, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugen	Sorvall RC-5B, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; 5417R and 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland; biofuge pico, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland; Sigma 3-18K, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Zählkammer	Neubauer-Zellzählkammer, Hartenstein, Würzburg, Deutschland

### 7.1.2 Mikroskope

Tabelle 7-2 Technische Daten zum *Laser-Scanning*-Mikroskop

<b>Laser-Scanning-Mikroskop</b>	<b>Produktbezeichnung, Hersteller</b>
Hersteller	Leica, Wetzlar, Deutschland
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 7-3 Technische Daten zum STED-Mikroskop

<b>Stimulated Emission Depletion (STED)</b>	<b>Produktbezeichnung, Hersteller</b>
Hersteller	Abberior Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Stativ	Nikon Ti-E mit Perfect Fokus System, Tokio, Japan
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> ),
STED Laser	775 nm

UV-VIS Illumination	LED
Inkubationskammer	Temperatur/ Feuchtigkeit/ CO <sub>2</sub> -Kontrolle, Okolab, Pozzuoli, Italien
Weitere Ausstattung	<i>Piezo Focus drive</i> : P-736 PInano, Motorisierte XY-stage: M-687 (PILine, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland)
Software	Abberior Inspector

Tabelle 7-4 Technische Daten zum SIM-Mikroskop

<b>3D-N-SIM</b>	<b>Produktbezeichnung, Hersteller</b>
Hersteller	Nikon, Tokio, Japan
Objektiv	100 x CFI SR Apochromat TIRF Ölimmersion, NA 1,49; Nikon N-SIM E mit Ti eclipse, invertiertes Mikroskop
Kamera	Ultra EM CCD Kamera DU-897E (Andor Technology Ltd., Belfast, UK)
Laser	LU-N3-SIM 488 nm, 561 nm, 640 nm
Imaging mode	<i>Slice</i> 3D-SIM, <i>Stack</i> 3D-SIM
Weitere Ausstattung	Perfect Focus System, Motorisierte XY-stage, Piezo Z-stage (Mad City Labs, Wisconsin, USA)
Software	NIS-Elements Ar/ NIS-Elements C

Die 3D-N-SIM-Mikroskopie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Anika Steffen und Prof. Dr. Theresia Stradal am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig.

### 7.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7-5 Einmalartikel

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
Deckgläser	Rund, 12 mm Durchmesser, No 1, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Einmalspritzen	Steril, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, B. Braun, Melsungen, Deutschland
Flaschenfilter	Steritop Filter Units 0,22 µm, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Gewebekulturschale	100 mm, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Glaspasteurpipette	230 mm, Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburg, Deutschland

Impföse	10 µl, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryogefriergefäß	1,6 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multi-Well-Platten	6 bzw. 24-Well, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objekträger	76 x 26 mm, Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Parafilm M	Bemis, Pechiney Plastic Packaging, Neenah, USA
Pipettenspitzen	Sterile Filterspitzen, Biosphere 10, 200, 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präzisionsdeckgläser	Rund, 12 mm Durchmesser, No 1.5, mit definierter Stärke, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
PVDF-Membran	Immobilion-P, 0,45 µm Porengröße, Millipore, Billerica, USA
Reaktionsgefäße	Sterile 15 ml/50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland 0,2 ml, Biozym Scientific, Hessisch Odendorf, Deutschland 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilme	Super RX, Fuji Medizinische Röntgenfilme, Fujifilm, Tokyo, Japan
Serologische Pipetten	Sterile 2, 5, 10, 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Skalpell	Steril, B. Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzenfilter	SFCA 0,2 µm, Thermo Scientific/Nalgene, Rockford, Illinois, USA
Whatman Papier	190 g/m <sup>2</sup> , BioRad, München, Deutschland

Tabelle 7-6 Kits, Enzyme und Reagenzien

<b>Kits, Enzyme, Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Accutase, Enzyme Cell Detachment Medium	eBioscience, San Diego, California, USA
CD 14 Microbeads, human	MACS, Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Complete Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Digitonin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
16% para-Formaldehyd	Electron Microscopy Science, Hatfield, USA
Phenylmethylsulfonylfluid (PMSF)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ProLong Diamand	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim, Deutschland
Trypsin 0.05 %, 0,53 mM EDTA	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BioRad Protein Assay	BioRad, München, Deutschland

NucleoBond PC 100 Midiprep Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
SuperSignal West Femto/ Pico detection	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin 0.05 %, 0,53 mM EDTA x 4 Na mit Phenolrot	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA

#### 7.1.4 Puffer und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungen wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham/GE Healthcare (München, Deutschland), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Biozym (Oldendorf, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), PAA (Pasching, Österreich), PromoCell (Heidelberg, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) sowie Invitrogen/Life Technologies/Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Die selbst hergestellten Puffer wurden entweder autoklaviert (20 min bei 121°C und 1,4 bar) oder bei hitzeempfindlichen Lösungen mit 0,22 µm feinen Filtereinheiten steril filtriert.

Tabelle 7-7 Pufferzusammensetzung

Puffer	Konzentration	Komponenten
Zell-Lysispuffer	1 % (v/v)	Triton X-100
Permeabilisierungspuffer für Immunfluoreszenz	0,1 % (v/v)	Triton X-100
Digitonin-Lyse-Puffer	0,5 % (w/v)	Digitonin
PBS (10x)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	14,4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,3 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>SDS-PAGE/Western Blot-Analyse</b>		
4x Lämmli (Ladepuffer für SDS-PAGE)	240 mM	Tris pH 6,8
	8 % (w/v)	SDS
	40 % (w/v)	Glycerol
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,04 % (w/v)	Bromphenolblau
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
	0,1 % (w/v)	SDS

Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-HCl pH 6,8
	0,1 % (w/v)	SDS
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
	150 mM	Tris
Transferpuffer	25 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	1x	PBS
PBS-T	0,1 % (v/v)	Tween20
	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
Coomassie-Färbelösung	25 % (w/v)	Methanol
	10 % (w/v)	Eisessig
		ddH <sub>2</sub> O
	25 % (w/v)	Methanol
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (w/v)	Essigsäure
		ddH <sub>2</sub> O

### 7.1.5 Plasmide

Tabelle 7-8 eukaryotische Expressionsplasmide

Plasmid	Vektor	Herkunft
pRK5-myc	Leervektor, <i>myc-tag</i> , humaner Expressionsvektor	BD Clontech
myc-Rac1Q61L	pRK5-myc, konstitutiv aktives Rac1	Pontus Aspenström, Uppsala, Schweden
PLCδ1-PH-GFP	Plasmamembranmarker, Indikator für PI(4,5)P <sub>2</sub>	T. Balla, National Institutes of Health, Bethesda, USA

## 7.1.6 Antikörper

Für Immunfluoreszenzfärbungen (IF) wurden die verwendeten Antikörper in 3% BSA (bovines Serumalbumin in PBS) gelöst. Zur Visualisierung von F-Aktin wurde Alexa-488-, 568-, oder 647-gekoppeltes Phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, USA) in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Zellkerne und bakterielle DNA wurden mittels 300 nM DAPI (Invitrogen, Carlsbad, USA) gefärbt. Im Western Blot (WB) wurden die Antikörper in 5% Milch-PBST-T gelöst.

Tabelle 7-9 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung IF	Verdünnung WB	Herkunft
Aktin (monoklonal)	Maus	-	1:10000	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Calnexin (polyklonal)	Kaninchen	-	1:2000	Enzo, Lörrach, Germany
Myc-tag	Kaninchen	1:200	1:1000	Cell Signaling, Cambridge, UK
GFP Biotin-konjugiert (polyclonal)	Ziege	1:300	-	Rockland, Limerick, USA
HSP60	Maus	-	1:1000	A57-E4, Thermo Scientific, Rockford, USA
<i>Y. enterocolitica</i> O:8	Kaninchen	1:50	-	Sifin, Berlin, Deutschland
YopH	Kaninchen	-	1:5000	Serum
LcrV	Kaninchen	1:50	-	Serum
PepC	Kaninchen	-	1:1000	Serum
YscF	Ratte	1:50	1:1000	Serum
YopB (1-168)	Kaninchen	1:100	1:1000	Serum
YopB (1-168)	Ratte	1:100	1:1000	Serum
YopD (150-287)	Kaninchen	1:100	1:1000	Serum

Tabelle 7-10 Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung (in 3 % BSA)</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Immunfluoreszenz</b>		
Alexa-488 Huhn anti-Kaninchen IgG	1:200	Invitrogen
Alexa-488 Ziege anti-Ratte IgG	1:200	Invitrogen
Alexa-568 Ziege anti-Kaninchen IgG	1:200	Invitrogen
Alexa-568 Ziege anti-Ratte IgG	1:200	Invitrogen
Alexa-568 Esel anti-Maus IgG	1:200	Invitrogen
Alexa-594 Huhn anti-Ratte IgG	1:200	Invitrogen
Alexa-647 Ziege anti-Kaninchen	1:200	Invitrogen
Abberior Esel anti-Kaninchen Star580	1:200	Abberior
Abberior Ziege anti-Kaninchen IgG Star635P	1:200	Abberior
Abberior Ziege anti-Kaninchen IgG Star	1:200	Abberior
Abberior Ziege anti-Ratte IgG Star	1:200	Abberior
Kaninchen anti-Biotin IgG	1:10 000	Rockland
<b>Western Blot: HRP-konjugierte Sekundärantikörper</b>		
Schaf anti-Maus IgG	1: 50 000	GE Healthcare
Esel anti-Kaninchen IgG	1: 50 000	GE Healthcare
Ziege anti-Ratte IgG	1: 50 000	GE Healthcare

## 7.1.7 Wachstumsmedien und Zusätze

Die aufgeführten Komplexmedien zur Anzucht von *Y. enterocolitica* wurden vor Gebrauch für 20 Minuten 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 7-11 Wachstumsmedien zur Kultivierung von *Y. enterocolitica*

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

Tabelle 7-12 Antibiotika und Zusätze zur Kultivierung und Selektion von *Y. enterocolitica*

Antibiotikum	Gelöst in	Konzentration	Hersteller
Arbeitslösung			
Nalidixinsäure	1M NaOH	100 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kanamycin	ddH <sub>2</sub> O	50 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Arsen	ddH <sub>2</sub> O	65 ng/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Diaminopimelinsäure (DAP)	ddH <sub>2</sub> O	80 ng/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 7-13 Wachstumsmedien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen

Medium	Konzentration	Komponente	Hersteller
<i>Dulbeco's Modified Eagle</i> Medium (DMEM)	10 % (v/v)	Fetales Kälberserum	Gibco, Carlsbad, Californien, USA
RPMI Medium 1640	20 % (v/v)	Autologes Serum	Gibco, Carlsbad,
	1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin	Californien, USA

## 7.1.8 Yersinienstämme und eukaryotische Zellen

Tabelle 7-14 *Yersinia enterocolitica*-Stämme

Stamm	Merkmale	Referenz
WA-314	<i>Y. enterocolitica</i> Wildtyp, Serotyp O:8, klinisches Isolat, pYV; +Kanamycin-Resistenz	(Heesemann und Laufs 1983; Oellerich et al. 2007)
WA-C	Plasmid-befreite Mutante von WA-314	(Heesemann und Laufs 1983)
WA-314 $\Delta$ yopE	Wildtyp mit Insertionsmutation in <i>yopE</i> , Kanamycin-Resistenz (KanR)	(Trulzsch et al. 2004)
WA-314 $\Delta$ yopB	Wildtyp mit Insertionsmutation in <i>yopB</i> , KanR	Konrad Trülzsch, (Nauth et al. 2018)
WA-314 $\Delta$ yopD	Wildtyp mit Insertionsmutation in <i>yopD</i> , KanR	Konrad Trülzsch, (Nauth et al. 2018)
E40 $\Delta$ lcrV	<i>Y. enterocolitica</i> Wildtyp, Serotyp O:9; pYVe40 $\Delta$ lcrV	Andreas Diepold, (Nauth et al. 2018)
E40 GFP-YscD	E40 pAD4306; Serotyp O:9; (pYVe40 <i>yopQ</i> $\Delta$ 2-427 <i>yopE</i> 21 <i>yopH</i> $\Delta$ 1-352 <i>yopM</i> 23 <i>yopP</i> 23 <i>yopT</i> 135) $\Delta$ asd $\Delta$ 292-610 <i>egfp-yscD</i>	(Diepold et al. 2015)

Tabelle 7-15 eukaryotische Zellen

Name	Merkmale	Herkunft
HeLa	Humane Zervixkarzinom Zelllinie	ACC# 57, DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
Primäre humane Makrophagen	Isolierte periphere Blutmonozyten, die durch Zusatz von Wachstumsfaktoren innerhalb von 6-8 Tagen zu Makrophagen differenziert wurden	Wöchentliche Isolation aus Buffy-Coats, zur Verfügung gestellt von Frank Bentzien, Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## 7.1.9 Elektronische Datenverarbeitung

Tabelle 7-16 verwendete Software und Datenbanken

<b>Software und Datenbanken</b>	<b>Hersteller</b>
Abberior Inspector Version 0.13	Abberior Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Graphpad Prism 6	La Jolla, CA, USA
Fiji Version 1.51n/ ImageJ Plugin	Bethesda, USA
TrackMate v3.5.1	
Imaris	Bitplane, Zürich, CH
Matlab	The MathWorks Inc., Natick, USA
Office Software Paket 2013	Microsoft, Redmond, USA
Volocity 6	PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA
Volocity DEMO 6.1.1	PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA
NCBI Datenbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>

## 7.2 Methoden

Alle Experimente wurden in Laboren der gentechnischen Sicherheitsstufe 2 (S2) durchgeführt.

### 7.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 7.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von Yersinien

Alle verwendeten *Yersinia enterocolitica*-Stämme (Tabelle 7-14) wurden auf Luria Bertani(LB)-Agarplatten bei 27°C kultiviert. Die LB-Agarplatten mit den jeweiligen Antibiotika wurden für 24 - 48 Stunden bebrütet und anschließend für maximal vier Wochen bei 4°C aufbewahrt. Zur Kryokonservierung wurden Bakterienkulturen in der exponentiellen Phase zu gleichen Teilen mit 40%igem Glycerin in LB-Medium gemischt und bei -80°C gelagert.

Die Kultivierung in Flüssigkultur erfolgte in 3 ml Luria Bertani (LB)-Medium. Hierzu wurden einzelne Kolonien von Agarplatten oder aus der Glycerolaufbewahrung mit steriler Impföse überimpft. Die Vorkulturen wurden mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 27°C im Schüttelinkubator (180 rpm) kultiviert.

#### 7.2.1.2 Sekretionsbedingung (*released proteins assay*)

Die *in vitro* Sekretion der Yops kann durch Ca<sup>2+</sup>-Depletion des Kulturmediums bei 37°C erreicht werden (Heesemann et al. 1986). Zur Aktivierung des T3SS wurden die Yersinienvorkulturen am Versuchstag in frisches LB-Medium überimpft (1:20) und für 1,5 Stunden im Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Die Zugabe von 15 nM MgCl<sub>2</sub>, 5 nM EGTA und 0,2% Glucose und eine Inkubation bei 37°C für weitere zwei Stunden induzierte die Sekretion der Yops. Die sekretierten Proteine wurden durch Zentrifugation (10 min, 6.800 rpm, 4°C) von den Bakterien getrennt.

Für Immunfluoreszenzfärbungen von Yop-sekretionsaktiven Bakterien wurden diese in eiskaltem PBS resuspendiert, auf Gelatine-beschichtete Deckgläser gegeben (0.2 % [V/V] Gelatine, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) und mit 4% Para-Formaldehyd (PFA) in PBS für 5-10 Minuten fixiert.

Zur biochemischen Untersuchung der sezernierten Effektorproteine wurde der Bakterienüberstand mit 10% TCA (Trichloressigsäure) versetzt. Die Präzipitation der bakteriellen Proteine erfolgte für eine Stunde auf Eis oder über Nacht bei -20°C. Die Präzipitanten wurden anschließend zentrifugiert (14.000 rpm, 4°C, 30 Minuten) und mit eiskaltem Aceton gewaschen (14.000 rpm, 4°C, 10 Minuten). Das Proteinpellet wurde unter dem Abzug abgedampft und in heißem Lämmli resuspendiert. Aufgrund der vorhergehenden Behandlung und durch Acetonrückstände konnte es zu einer pH-Änderung und damit verbundenen Farbumschlag kommen. Dies konnte durch Zugabe von kristalliner Tris-Base korrigiert werden. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 7.2.1.3 Yersinieninfektion

Für Infektionsexperimente wurden die Übernachtskulturen am Versuchstag 1:20 in frischem LB-Medium verdünnt und für 1,5 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden nachfolgend zentrifugiert (6.800 rpm, 4°C, 10 Minuten), die Überstände verworfen und die Pellets in eiskaltem PBS resuspendiert. Die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) der Bakteriensuspension wurde photometrisch bestimmt und auf  $OD_{600}$  3,6 eingestellt. Entsprechend des gewünschten Bakterien-Zell-Verhältnisses (*multiplicity of infection*, MOI) wurde die Bakteriensuspension in PBS verdünnt und an die Fläche des Zellgefäßes angepasst (100  $\mu$ l  $OD_{600}$  3,6 im 6-Well-Format = MOI 100 in der HeLa-Zellinfektion).

Um die Infektion synchron zu starten, wurden die Yersinien auf die Zellen zentrifugiert (1.000 rpm, 2 Minuten). Die Infektion erfolgte bei 37°C für 60 Minuten (HeLa-Zellen) oder im Zeitverlauf für 5 bis 60 Minuten (Makrophagen). Im Anschluss wurden die infizierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um ungebundene Bakterien und Serumrückstände zu entfernen.

### 7.2.1.4 Oberflächenmarkierung von Yersinien (Biotinylierung)

Die Biotinylierung der Bakterienoberfläche erfolgte mit EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Scientific). Hierzu wurden die Yersinien wie in 7.2.1.3 beschrieben für die Infektion vorbereitet und nach Zentrifugation in 0,5 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin in PBS resuspendiert. Nach einer 30 - 60-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Bakterien zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, resuspendiert und zur Zellinfektion verwendet.

## 7.2.2 Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten an Sicherheitsbänken unter sterilen Bedingungen.

### 7.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die in dieser Studie verwendete HeLa-Zelllinie wurde in DMEM (nach Dulbecco modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium), supplimentiert mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), bei 37°C und 5%  $CO_2$  kultiviert. Bei vollständiger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin für 5 Minuten bei 37°C abgelöst. Nach Zentrifugation bei 1.000 rpm für 5 Minuten wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine neue Gewebekulturschale überführt.

### 7.2.2.2 Kryokonservierung und Reaktivierung eukaryotischer Zelllinien

Zur Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen wurden diese bei 70% Konfluenz wie in 7.2.2.1 beschrieben trypsinisiert und in 1,5 ml FKS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden in Kryogefäßen (Sarstedt) gelagert. Der Einfrierprozess erfolgte schrittweise in einem

mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter bei -80°C. Nach 24 Stunden wurden die gefrorenen Zellen zur Langzeitlagerung in Stickstoff überführt.

Zur Reaktivierung der kryokonservierten Zellen wurde die Zellsuspension bei 37°C aufgetaut und in vorgewärmtes Zellkulturmedium aufgenommen. Durch Zentrifugation (1.000 rpm, 5 Minuten) konnte das DMSO-haltige Einfriermedium entfernt werden. Das Zellpellet wurde in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Gewebekulturschale zur weiteren Kultivierung überführt.

#### 7.2.2.3 Transfektion von HeLa-Zellen

Die Transfektion von HeLa-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Turbofect nach Angaben des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Für die Expression von konstitutiv aktivem Rac1 (myc-Rac1Q61L) wurden die Zellen im 6-Well-Format mit 2,4 µg Plasmid-DNA bzw. im 24-Well-Format mit 500 ng Plasmid-DNA für 8 - 16 Stunden transfiziert. Die Transfektion von PLCδ-PH-GFP erfolgte für 16 Stunden mit 500 ng Plasmid-DNA im 24-Well-Format.

#### 7.2.2.4 Isolierung, Kultivierung und Transfektion primärer humaner Makrophagen

Humane Makrophagen sind neben einer Vielzahl anderer Immunzellen physiologische Zielzellen von Yersinien. Um möglichst physiologische Infektionsbedingungen zu schaffen wurden menschliche periphere Blutmonozyten über eine CD14<sup>+</sup>-spezifische Isolierung aus heparinisiertem Blut gewonnen und zu Makrophagen differenziert. Die Isolation erfolgte stets mit eiskalten Reagenzien unter sterilen Bedingungen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C und 1.500 rpm. Zunächst wurden in drei Ansätzen jeweils 15 ml Lymphozyten-Separationsmedium (LSM) mit je 20 ml Blut vorsichtig überschichtet (gesamt ca. 60 ml aus 500 ml Vollblut). Durch die nachfolgende 30-minütige Zentrifugation wurden Lymphozyten von Erythrozyten und Plasma getrennt. Die mononukleären CD14<sup>+</sup>-Zellen befanden sich in der weiß-milchigen Interphase zwischen der gelblichen Plasmaschicht und der klaren LSM und roten Erythrozytenschichten. Die gewünschten mononukleären Zellen der weißen Interphase wurden in eiskaltes RPMI-Medium überführt und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Die daraus resultierenden Zellpellets wurden in je 10 mL RPMI resuspendiert, vereinigt und in je 50 ml eiskaltem RPMI dreimal gewaschen. Das resultierende Zellpellet wurde schließlich in 1,5 ml Monozyten-Isolierungspuffer aufgenommen und mit 250 µl magnetischen CD14-Microbeads versetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden die Zellen für 15 Minuten auf Eis inkubiert, sodass eine Bindung der Antikörper-gekoppelten Beads an die Oberflächenproteine der Monozyten erfolgen konnte. Währenddessen wurde die Separationsapparatur bestehend aus Säule, Magnetblock und Prä-Separationsfilter, aufgebaut und mit eiskaltem Monozyten-Isolierungspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Zell-Bead-Suspension auf die vorbereitete Säule gegeben und

mittels Gravitationsfluss beladen. Die Säule wurde zweimal mit Monozyten-Isolationspuffer gewaschen. Zur Elution der CD14<sup>+</sup>-Zellen wurde die Säule aus dem magnetischen Ständer herausgenommen und über ein mit 10 ml RPMI gefülltes 50 ml-Zentrifugenröhrchen gehalten. Die Zellsuspension wurde mit einem Stempel herausgedrückt und anschließend mit RPMI auf ein Gesamtvolumen von 30 ml aufgefüllt. Mithilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und je  $1,5 \times 10^5$  Zellen wurden in einem Volumen von 1 ml RPMI pro *Well* einer 6-*Well*-Platte ausgesät. Nach einer 2-4 stündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sup>2</sup>-Gehalt erfolgte ein Mediumwechsel mit vorgewärmten Makrophagen-Kulturmedium (RPMI supplimentiert mit humanem Serum und Penicillin/Streptomycin). Die CD14<sup>+</sup>-Zellen differenzierten sich durch die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren innerhalb von 6 Tagen zu Makrophagen.

Zum schonenden Ablösen der Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und mit 500 µl Accutase pro 6-*Well* bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Makrophagen haften stark am Untergrund, sodass die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst wurden. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Für Immunfluoreszenzexperimente wurden Makrophagen mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Deckglas ausgesät und am nachfolgenden Tag infiziert und anschließend mit 4% PFA in PBS fixiert.

Zur Transfektion primärer humaner Makrophagen per Elektroporation wurden 1 Million Zellen pro Transfektionsansatz verwendet. Hierbei werden die Zellen einem elektrischen Puls ausgesetzt, der temporär Poren in der Zellmembran hervorruft und somit die Aufnahme von DNA ermöglichte. Für eine effiziente Elektroporation müssen die Zellen in einer serumfreien Suspension vorliegen. Die Transfektion wurde in R-Puffer mit 2 Pulsen mit je 1000 V für 40 ms nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Expression von PLCδ-PH-GFP wurde 5 µg Plasmid-DNA verwendet. Die transfizierten Zellen wurden nachfolgend in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Deckglas ausgesät. Nach einer Stunde wurde vorgewärmtes Makrophagen-Kulturmedium hinzugegeben, um zu verhindern, dass die im Vollmedium enthaltenen Antibiotika in die elektroporierte Zelle gelangen. Die GFP-Expression wurde mikroskopisch kontrolliert und bei Einsetzen des GFP-Signals nach 3-4 Stunden erfolgte nach Mediumwechsel zu Serum- und Antibiotikafreiem RPMI die Infektion mit Yersinien. Nach der Infektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 4% PFA in PBS für 5-10 Minuten fixiert.

### 7.2.3 Mikroskopische Methoden

#### 7.2.3.1 Immunofluoreszenzfärbung

HeLa-Zellen und primäre humane Makrophagen wurden mit Yersinien infiziert, nach dreimaligem Waschen mit PBS in 4%igem PFA fixiert, mit 0,1% Triton X100 für 5-10 Minuten permeabilisiert und anschließend fluoreszenzgefärbt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Blockieren mit 3% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS für 60 Minuten abgesättigt. Die Zellen wurden anschließend für eine Stunde mit dem jeweiligen Primärantikörper in 3% BSA und nach dreimaligem Waschen für weitere 45 Minuten mit dem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Alle Antikörperfärbungen erfolgten in 3% BSA in PBS. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörperkonzentrationen sind in Tabelle 7-9 zu finden. Den Sekundärantikörpern wurden DAPI und Phalloidin zur Darstellung der Zellkerne und bakterieller DNA sowie der Zellstrukturen zugesetzt. Die Deckgläser wurden abschließend nach dreimaligem Waschen mit PBS in Prolong Diamond eingebettet und über Nacht bei Raumtemperatur abgedunkelt ausgehärtet. Die langfristige Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

Zur Unterscheidung zwischen extrazellulären und von den Zellen internalisierten Bakterien wurde eine Innen-Außen-Färbung angewandt. Hierzu wurden die Bakterien vor der Zellinfektion wie in 7.2.1.4 beschrieben biotinyliert und nach Blockieren in BSA mit Cy5-gekoppelten Streptavidin inkubiert (1:100 in BSA). Gleichzeitig erfolgte die Inkubation mit dem *Yersinia enterocolitica* spezifischen Primärantikörper anti-LPS O:8 für eine Stunde (1:50 in BSA). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben mit dem anti-Kaninchen Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Zur Visualisierung aller Bakterien und Zellen wurden die Proben außerdem mit DAPI (300 mM) und Phalloidin (1:200 in BSA) gefärbt. Bei der Innen-Außen-Färbung erfolgte keine Permeabilisierung der Zellen.

### 7.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 7.2.4.1 Nadelpräparation

Die Nadelaufreinigung erfolgte aus Yersinienkulturen, die unter Sekretionsbedingungen kultiviert wurden (siehe 7.2.1.2). Hierzu wurden insgesamt 300 ml Yersinienhauptkultur des Wildtypstamms WA-314 verwendet. Nach Induktion und Sekretion des T3SS wurde die Bakteriensuspension für 5 Minuten bei 4.000 G zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert und in einem Dounce-Homogenisator geschert. Die dabei entstehenden Scherkräfte brechen die Nadeln von den Yersinien ab. Durch Zentrifugation (4.000 G, 4°C, 5 Minuten) können die Nadeln aus dem Überstand gewonnen werden. Um Kontaminationen mit Yersinien zu verhindern wurde der Überstand durch einen Spritzenfilter (0,2 µm) steril filtriert. Zur Präzipitation

der Nadeln wurde die Nadelsuspension für 1 Stunde auf Eis oder über Nacht bei -20°C mit 10% TCA versetzt. Anschließend wurden die Nadelproteine durch Zentrifugation (15.000 rpm, 4°C, 20 Minuten) gewonnen und in heißem Lämmli gelöst.

#### 7.2.4.2 Affinitätsreinigung von Antiseren für die Immunfluoreszenz

Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper gegen die Yersinia-spezifischen Proteine YopB und YopD wurden von Franziska Huschka hergestellt und auf Spezifität getestet (Huschka 2017). Die Seren wurden wie in Huschka 2017 beschrieben über Affinitätsäulen gegen das native, immobilisierte Antigen aufgereinigt.

Für eine Detektion der Proteine YopB, YopD und YscF in Immunfluoreszenz-gefärbten Präparaten war eine zusätzliche Aufreinigung erforderlich. Hierzu wurden sekretierte Proteine von WA-314 (siehe Sekretion) auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot übertragen. Die Membran wurde für eine Minute in Coomassie-Färbelösung inkubiert, die jeweiligen Proteinbanden (YopB 43 kDa, YopD 33 kDa) wurden aus der Membran geschnitten und für die weitere Aufreinigung mit Methanol entfärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T (PBS mit 0,1% Tween20), wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5 % (w/v) fettarmer Milchpulver in PBS-T abgesättigt. Nachfolgend wurden die Membranstreifen erneut mit PBS-T gewaschen und in kleine Fragmente geschnitten. Diese wurden in 2 ml-Reaktionsgefäßen mit verdünntem Antiserum (1:3 in PBS) über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Die Membranstücke wurden danach dreimal mit PBS-T gewaschen. Die verdünnten Antiseren wurden steril filtriert und für weitere Aufreinigungen bei -20°C aufbewahrt. Die Membranfragmente wurden mit 100 - 200 µl 100 mM Glycin-HCl (pH 2,5) versetzt und bei maximaler Drehzahl auf einem Vortexmischer (Heidolf Instruments, Schwabach) eluiert. Die Antikörperlösung wurde sofort mit 5,5 µl 1 M Tris-Base neutralisiert. Die Antikörperlösungen wurden zur Stabilisierung mit BSA (Endkonzentration > 2%) und Glycerin (50%ig in der Antikörperlösung) zur Kryoaufbewahrung versetzt.

Zur Aufreinigung von YscF-spezifischen Antikörpern wurde eine Nadelpräparation (siehe 7.2.4.1) durchgeführt. Die isolierten Nadelproteine wurden in Lämmli gelöst in einem Gradientengel (4 - 20%, Biorad) elektrophoretisch aufgetrennt. Da die Nadelproteine ein sehr geringes Molekulargewicht haben (YscF 9,8 kDa), wurde die Gelelektrophorese frühzeitig gestoppt. Die weiteren Schritte der Antikörperaufreinigung erfolgten wie für YopB und YopD beschrieben.

#### 7.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mit dem BioRad Protein-Assay Kit (Biorad) nach Angaben des Herstellers. Die Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffs *Coomassie Brilliant blue G-250* an Proteine und der daraus folgenden Verschiebung des

Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm (Bradford 1976). Die Absorption wurde photometrisch bei 595 nm bestimmt.

#### 7.2.4.4 Translokationsexperimente

Zur Detektion der durch Yersinien translozierten Effektorproteine wurde ein Translokationsassay nach Nordfelth und Wolf-Watz durchgeführt. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit einer MOI von 100 für eine Stunde infiziert und dreimal mit PBS gewaschen, um ungebundene Bakterien zu entfernen. Zur Untersuchung der Lokalisation der Translokatoren, wurden die Zellen vor der Zelllyse bei Raumtemperatur mit Proteinase K (500 mg/ml in PBS) behandelt, um extrazelluläre Effektorproteine zu entfernen. Die Proteaseaktivität wurde nach 20 Minuten durch Zugabe von PMSF (4 mM in PBS) blockiert. Die Zell-Lyse erfolgte mit Digitonin (0,5% in PBS) bei Raumtemperatur mit dreimaligem Vortexen. Die lysierten Zellen wurden dann durch Zentrifugation (10.000 G, 4°C, 10 Minuten) in die Digitonin-lösliche, zytoplasmatische Fraktion und Zellmembranen mit daran gebundenen Bakterien fraktioniert. Die Digitonin-lösliche Fraktion und die Pellets wurden mittels SDS-PAGE und nachfolgender Western Blot-Analyse untersucht.

#### 7.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) nach Lämmli (Laemmli 1970) ist ein analytisches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.

Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mit Lämmli-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Dabei werden Disulfidbrücken durch  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert. Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und überdeckt die Eigenladung der Proteine, sodass diese nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld auftrennt werden. Die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe wandern durch ein zweiteiliges Gel, bestehend aus einem 4%igen Sammelgel (Tris-HCl pH 6,8) und einem 10%igen Trenngel (Tris-HCl pH 8,8), zur Anode. Chemisch inerte Acrylamid-Bisacrylamidgele wurden selbst hergestellt. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tabelle 7-17 aufgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mitgeführt.

Tabelle 7-17 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

<b>Verbindung</b>	<b>Trenngel (10 %)</b>		<b>Sammelgel (4 %)</b>	
ddH <sub>2</sub> O	4,2	ml	1,55	ml
Trennpuffer pH 8.8	2,5	ml	-	
Sammelgelpuffer 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

#### 7.2.4.6 Western Blot-Analyse

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine erfolgte durch das Semidry-Proteinblot-System. Hierbei werden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilion-P, Millipore) übertragen. Zur Aktivierung des Trägermaterials wurde die PVDF-Membran kurz in Methanol aktiviert. Für den Elektrotransfer wird die Membran anodenseitig und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Alle Bestandteile der Proteinblots wurden in Transferpuffer getränkt. Puffergetränkte Filterpapiere aus je drei Lagen Whatman-Filterpapier (Hartenstein, Deutschland) umgeben Membran und Gel. Der Transfer der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke (125 mA/cm<sup>2</sup>) für 75 Minuten. Anschließend erfolgte die Immundetektion einzelner Proteine durch epitopspezifische Antikörper (Tabelle 7-9). Die Membran wurde zunächst in Blockierungslösung (5% Milchpulver in PBS-T) für mindestens 30 Minuten bei RT blockiert. Primäre und sekundäre Antikörper wurden ebenfalls in 5% Milchlösung gelöst. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach drei Waschschritten mit PBS-T wurden die Membranen für 45 Minuten mit HRP-(horseradish/Meerrettich-Peroxidase)-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Die Membranen wurden erneut dreimal mit PBS-T gewaschen, für 5 Minuten mit Chemilumineszenzreagenz (Supersignal West Femto, Pierce Chemical) inkubiert und schließlich entwickelt. Die Chemilumineszenzsignale wurden auf Röntgenfilmen (Fujifilm) gesammelt, gescannt und mit Fiji quantifiziert. Zur Filmentwicklung wurde ein Curix 60 (Agfa, Belgien) verwendet. Alle für die Western Blot-Analyse verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 7-9 und Tabelle 7-10 zu finden.

## 7.2.5 Mikroskopie und hochauflösende Mikroskopie

### 7.2.5.1 Konfokale Mikroskopie

Fixierte und fluoreszenzgefärbte Zellpräparate wurden an konfokalen und hochauflösenden Mikroskopen betrachtet. Die konfokale Mikroskopie erfolgte an *Laser-Scanning*-Mikroskopen (Leica TCS SP5 oder SP8, Tabelle 7-2) mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv (NA 1.4). Die Aufnahmen erfolgten mit der jeweiligen Software Leica LAS AF oder LAS X SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland).

### 7.2.5.2 Stimulated Emission Depletion (STED)-Mikroskopie

Die hochauflösenden 2D- und 3D-STED-Aufnahmen erfolgten an einem STED-Mikroskop (Abberior Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland, Tabelle 7-3) mit einem Nikon Ti-E Mikroskopkörper mit perfektem Fokussierungssystem im Sequential-Line-Scanning-Modus. Die Fluoreszenzsignale wurde mit einem 60x P-Apo Ölimmersionsobjektiv (NA 1.4) detektiert. Zur Anregung dienten zwei Puls laser bei 561 nm (Cy3) und 640 nm (Cy5). Die Depletion erfolgte durch einen Puls laser im nahen Infrarotbereich bei 775 nm. Das Fluoreszenzsignal wurde durch eine Aperaturblende mit variabler Größe (meist 1 Airy bei 640 nm) gelenkt und durch modernste Avalanche - Photodioden (APD) mit geeigneten Filtereinstellungen für Cy3 (605-635 nm) und Cy5 (615-755 nm) detektiert. Die Bilder wurden mit einer Verweilzeit von 10  $\mu$ s aufgezeichnet und die Voxelgröße wurde auf 20  $\times$  20  $\times$  150 nm für 2D-STED oder 40  $\times$  40  $\times$  40 nm für 3D-STED gesetzt. Alle 3D-STED-Bilder wurden mit 80%igem 3D-STED-Donut aufgenommen. Die Bildaufnahmen wurden mit zeitlich definierten Parametern durchgeführt, beispielsweise mit einem Zeitfenster von 8 ns und einer Verzögerung von 781 ps (Cy3) und 935 ps (Cy5).

### 7.2.5.3 Bildanalyse der STED-Daten

Die Anzahl der Fluoreszenzpunkte wurden mit IMARIS v6.1.1 in 3D-STED-Aufnahmen quantifiziert. Zunächst wurde der Hintergrund jedes Bildes subtrahiert. Um einzelne Punkte zu detektieren wurde die durchschnittliche Größe eines einzelnen Punktes bestimmt. Der Durchmesser eines Einzelpunktes lag bei 0,11-0,24  $\mu$ m. Der Gaußfilter wurde anhand dieser Messwerte für jedes Bild individuell gesetzt. Lokale Maxima wurden nach Größe und Qualität der Punkte gefiltert. Die Qualität definierte sich durch die Höhe der Intensität im Zentrum eines Einzelpunktes.

### 7.2.5.4 Gruppen-Analyse von 3D-STED-Aufnahmen

Die Detektion und Segmentierung der Fluoreszenzpunkte erfolgten wie in 7.2.5.3 beschrieben. Die Positionen und Volumen der einzelnen Fluoreszenzpunkte wurden mithilfe einer Gruppen-Analyse (`cluster_analysis.m`, Skript von Dr. A. Failla, veröffentlicht in Nauth et al. 2018) in Matlab ausgewertet. Anhand der Volumina wurde der Radius jedes detektierten Fluoreszenzpunktes

berechnet. Die hieraus resultierenden Sphären wurden anhand der Fluoreszenzpunkt-Koordinaten in der Matrix lokalisiert. Zur Bestimmung der Fluoreszenzpunkte-Größe wurde die Halbwertsbreite eines Fluoreszenzprofils definiert (Auflösung  $\sim 100$  nm). Alle Fluoreszenzpunkte wurden hinsichtlich ihrer Position zueinander untersucht und in Gruppen kategorisiert. Der Grenzwert für Fluoreszenzpunkte innerhalb einer Gruppe wurde durch die Summe der Radien zweier Sphären definiert. Zur Überprüfung und Visualisierung von Gruppen wurden diese in verschiedenen Farben in die ursprünglichen 3D-STED-Bilder projiziert.

#### 7.2.5.5 Dekonvolution von 3D-STED-Aufnahmen

Die Dekonvolution wurde mithilfe der Abberior Inspector Software durchgeführt und erfolgte ausschließlich für die in Abbildung 5-22 dargestellte Plasmamembran. Hierzu wurde das iterative Richardson-Lucy-Verfahren mit 30 Wiederholungen verwendet. Das STED-PSF (*Point Spread Function*, *Punktspreizfunktion*) wurde anhand einer definierten 20 nm großen, dreidimensionalen Fluoreszenzkugel (fluoreszierende TetraSpeck beads, Thermo Fisher Scientific) abgeschätzt.

#### 7.2.6 Structured Illumination-Mikroskopie (SIM)

Zur Visualisierung des Injektions mit distaler Translokationspore in der Zellinfektion wurde die hochauflösende 3D-SIM-Mikroskopie verwendet (Tabelle 7-4). Zur Markierung des Injektions wurden Yersinien verwendet, die das mit EGFP markierte Basalkörperprotein YscD exprimieren (E40 GFP-YscD). Die Basalkörperkomponente besteht aus 24 Untereinheiten und die Expression des GFP-YscD unterliegt dem bakteriellen Promotor, sodass nur ein schwaches Fluoreszenzsignal detektierbar ist (Diepold et al. 2015; Kudryashev et al. 2013). Die 3D-SIM-Mikroskopie ermöglichte entgegen der STED-Mikroskopie eine verbesserte Auflösung auch bei schwachen Fluoreszenzsignalen. Eine Antikörperfärbung zur Verstärkung des GFP-YscD-Signals war nicht möglich, da YscD innerhalb der Bakterien lokalisiert. Zur Permeabilisierung der Bakterien ist ein starkes Detergenz (2%iges SDS) nötig, was zum Ablösen der HeLa-Zellen führt. Eine Betrachtung der Struktur im zellulären Kontext wäre dann nicht mehr möglich. Um gleichzeitig Translokationspore und Injektion zu beobachten wurden die E40 GFP-YscD-infizierten HeLa-Zellen zusätzlich mit anti-YopB- oder anti-YopD-Antikörpern immungefärbt.

SIM ermöglicht eine verdoppelte Auflösung im Vergleich zur konventionellen Weitfeld-Mikroskopie (Auflösung  $\sim 100-130$  nm in xy (Gustafsson et al. 2008; Schermelleh et al. 2008)). Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie nutzt den Moiré-Effekt, um die Beugungsgrenze zu überwinden und kleinere Strukturen darzustellen. Laserstrahlen werden durch das Objektiv geleitet, überlagern sich in der Fokusebene und erzeugen ein definiertes, sinusförmiges Streifenmuster, bevor sie auf die Probe treffen. Das bewegliche Beugungsgitter, das auf Objektiv

und Anregungswellenlänge abgestimmt ist, wird mit der unbekannt Struktur der Probe überlagert. Durch die Überlagerung des bekannten Gittermusters und der unbekannt Struktur entsteht ein Interferenzmuster, das mithilfe von hochempfindlichen CCD-Kamerasystemen detektiert wird. Für ein hochaufgelöstes 3D-SIM-Bild sind 15 Einzelbilder in 3 Rotationen des Beugungsgitters und 5 Phasenlagen nötig, die anschließend mathematisch rekonstruiert werden (Schermelleh et al. 2010).

HeLa-Zellen wurden auf Präzisionsdeckgläsern (Nr. 1.5H) ausgesät und mit *Yersinia enterocolitica* E40 GFP-YscD mit einer MOI von 10 für 60 Minuten infiziert. Fixierung, Permeabilisierung und Antikörperfärbung für YopB und YopD erfolgten wie in 7.2.3.1 beschrieben mit Alexa-568 Sekundäntikörpern. Die Proben wurden in Prolong Diamond eingebettet und mindestens 48 Stunden bei Raumtemperatur ausgehärtet. Die Aufnahmen erfolgten am N-SIM in Zusammenarbeit mit Dr. Anika Steffen und Prof. Dr. Theresia Stradal am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig.

Die infizierten Zellen wurden mit einem inversen N-SIM Ti-E Mikroskop mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv (NA 1.49, CFI Apochromat TIRF, Nikon) abgebildet. Die Aufnahmen erfolgten mit der dazugehörigen Software NIS Elements. Das Mikroskop war mit einer LU-N3-SIM 488/561/640 Lasereinheit ausgestattet. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Orca Flash 4.0 LT (Hamamatsu) sCMOS-Kamera oder mit einer Ultra EM-CCD DU-897-Kamera (Andor). Das System verfügte zudem über ein Piezo z-drive (Mad City Labs), einen motorisierten N-SIM-Vierbandfilter kombiniert mit N-SIM 488 und 561 Bandpass-Emissionsfiltern unter Verwendung der Laserlinien 488 und 561 bei 100% Ausgangsleistung und einstellbaren Belichtungszeiten von 300-800 ms. Die Z-Stapel umfassten etwa 1,6 bis 2,2  $\mu\text{m}$  mit einer Schrittweite von 200 nm. Die Rekonstruktion erfolgte mit dem Stack-Rekonstruktions-Programm mit Standardparametern (Nikon, NIS-Elements).

#### 7.2.6.1 Bildanalyse der SIM-Daten

Die Partikelerkennung erfolgte mit dem ImageJ-Plugin TrackMate v3.5.1 (Tinevez et al. 2017) gefolgt von einer *Nearest-Neighbor*-Analyse (KNN search) in Matlab (Version 9.2). Einzelne z-Ebenen von zweifarbigem 3D-SIM-Bildern wurden für die Analyse verwendet. Hier wurden auch die von Franziska Huschka gewonnenen Daten verwendet. Diese Aufnahmen erfolgten an N-SIM-Mikroskopen in Kooperation mit Dr. Christian Schuberth am Institut für Zelldynamik und Bildgebung, Universität Münster und in Zusammenarbeit mit Dr. Jens Bosse am Heinrich-Pette-Institut Hamburg. Deutliche abgrenzbare Fluoreszenzpunkte von GFP-YscD und YopB oder YopD wurden mit TrackMate mit einem geschätzten Punkt-Durchmesser von 0,3  $\mu\text{m}$  detektiert. In beiden Farbkanälen wurden die Schwellenwerte individuell gesetzt und mit aktiviertem Medianfilter

ausgewertet. Die resultierenden x/y-Koordinaten wurden in XML-Dateien exportiert und mit parseXML ([github.com/samuellab](https://github.com/samuellab)) in Matlab importiert. Die euklidischen nächsten Nachbarn von GFP-YscD-Signalen für jedes YopB oder YopD-Signal wurden mit der Funktion "Knnsearch" detektiert und die daraus resultierenden Distanzen wurden graphisch dargestellt. Die zueinander gehörenden Datenpunkte wurden auf eine maximale Entfernung von 200 nm gefiltert, um Signale nebeneinander liegender Bakterien auszuschließen. Die Koordinatenpunkte wurden zur bildlichen Veranschaulichung beispielhaft in die Originalbilder projiziert. Die verwendeten Skripte wurden von Dr. Jens Bosse (HPI Hamburg) geschrieben und sind Teil der Veröffentlichung Nauth et al. 2018.

### 7.2.7 Immungold-Elektronenmikroskopie

Für die TEM (Transmissionselektronenmikroskopie)-Analyse wurden HeLa-Zellen mit der konstitutiv aktiven Form von Rac1 (myc-Rac1Q61L) für 16 Stunden transfiziert und mit E40 GFP-YscD in einem Verhältnis von 50: 1 für 1 h infiziert. Die Proben wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit einem Fixiermittel mit doppelter Stärke aus 4% PFA mit 0,2% Glutaraldehyd (GA) in Phosphatpuffer (PB) fixiert. Das Fixiermittel wurde nach 10 Minuten durch frisches Fixiermittel mit einfacher Stärke (2% PFA mit 0,1% GA in PB für 20 Minuten) bei RT ersetzt. Nach der Fixierung folgten drei Waschschriffe mit PBS bei RT. Die Proben wurden dann auf 37°C erwärmt und mit 1% Gelatine (Dr. Oetker) beschichtet. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, in 12% Gelatine in PBS resuspendiert und bei 37°C für 5 Minuten eingebettet. Das Pellet wurde auf Eis gehärtet, nachfolgend in kleine Blöcke geschnitten und über Nacht in 2,3 M Sucrose inkubiert. Danach wurden die Blöcke auf Probenhalter montiert und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren. Ultradünne Schnitte (~70 nm) wurden nach (Slot und Geuze 2007) geschnitten, mit Immungold markiert und nachfolgend auf Kohlenstoff-Formvar-beschichteten Nickelgittern (Science Services GmbH, Deutschland) gesammelt. Zur Antikörperfärbung wurden die Schnitte mit anti-GFP-Biotin (1:300), gefolgt von anti-Biotin und 10 nm oder 15 nm großen Protein A-Gold-Sekundäntikörpern, sowie mit anti-YopD (1:50) und 10 nm großen Protein A-Gold-Sekundäntikörper in Einzel- und Doppelantikörperfärbungen inkubiert. Die Präparate wurden in einem Elektronenmikroskop des Typs EM902 (Zeiss, Deutschland) untersucht. Die Aufnahmen erfolgten mit einer TRS 2K Digitalkamera (A. Tröndle, Moorenweis, Deutschland).

#### 7.2.7.1 Quantifizierung der TEM-Aufnahmen

Um die Effizienz der Immungold-Färbung von GFP-YscD und YopD im Bakterium und in der infizierten Zelle zu bestimmen, wurden zunächst Färbungen mit je 10 nm Goldpartikeln durchgeführt. Zur Auswertung der Spezifität und Verteilung der beiden Proteine wurden Standardverfahren nach Griffiths und Hoppeler 1986 und Mayhew et al. 2002 angewandt. Testgitter definierter Größe wurden auf die Bilder von zufällig ausgewählten Schnittbildern

projiziert (Vergrößerung 30.000-fach). Hierzu wurden für jedes untersuchte Antigen Kompartimente definiert. Zur Lokalisation des Porenproteins YopD wurden folgende Kompartimente unterschieden: das bakterielle Zytoplasma und der Bereich außerhalb der Bakterien, unterteilt in einen 90 nm breite Injektisom-Bereich um das Bakterium und daran angrenzende HeLa-Zellen.

Für die Analyse des Basalkörperproteins GFP-YscD wurden die folgenden drei Kompartimente definiert. Neben dem bakteriellen Zytoplasma und dem extrabakteriellen Bereich, wurden die bakterielle innere und äußere Membran und das dazwischenliegende Periplasma betrachtet. Mayhew und Lucocq schlugen einen Ansatz für die quantitative Immungoldmarkierung einer kombinierten Analyse von Volumen (Organellen) und Oberflächen (Membranen) einnehmenden Kompartimenten vor (Mayhew und Lucocq 2008). Hierbei werden Membranen als Oberflächen behandelt, sodass die Kompartimente und ihre Markierungsintensitäten vergleichbar sind. Dazu musste eine Akzeptanzzone ( $W_{az}$ ) um die Membran definiert werden. Hier wurde ein Bereich von 25 nm (primärer und sekundärer Antikörper + Protein-A-Gold) auf jeder Seite der Membran als die Breite der Akzeptanzzone gewählt. Jeder Mikrometer Membran stellte damit ein Akzeptanzonenprofil von  $0,05 \mu\text{m}^2$  dar. Die Anzahl der Punkte des Gitters, von denen erwartet wird, dass sie in der Akzeptanzzone liegen, ist definiert als  $P_{\text{Membran}} = (2W_{az} \times \Sigma I_{\text{Membran}} \times \pi/4) / d$  mit  $I_{\text{Membran}}$  als Schnittpunkte der Membran, die das Gitter trifft.  $P_{\text{Membran}}$  ist gleich  $P_{\text{Kompartiment}}$ . Die Labeling-Dichte beschreibt die Anzahl der Goldpartikel pro Fläche und wurde aus beobachteten Goldpartikeln und Punkten jedes Kompartiments berechnet. Der relative Labeling-Index (RLI) vergleicht erwartete und beobachtete Goldpartikel. Ein spezifisch markiertes Kompartiment ist vorzugsweise durch einen  $\text{RLI} > 1$  und einem partiellen Chi-Quadrat-Wert mit einem wesentlichen Beitrag zum Chi-Quadrat-Gesamtwert gekennzeichnet.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abby, Sophie S.; Rocha, Eduardo P. C. (2012): The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. In: *PLoS genetics* 8 (9), e1002983. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002983.
- Achtman, Mark; Zurth, Kerstin; Morelli, Giovanna; Torrea, Gabriela; Guiyoule, Annie; Carniel, Elisabeth (1999): *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (24), S. 14043–14048.
- Adeolu, Mobolaji; Alnajar, Seema; Naushad, Sohail; S Gupta, Radhey (2016): Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66 (12), S. 5575–5599. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485.
- Aepfelbacher, M. (2004): Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of *Yersinia*. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 152, S. 65–77. DOI: 10.1007/s10254-004-0035-3.
- Aepfelbacher, Martin; Roppenser, Bernhard; Hentschke, Moritz; Ruckdeschel, Klaus (2011): Activity modulation of the bacterial Rho GAP YopE: an inspiration for the investigation of mammalian Rho GAPs. In: *European Journal of Cell Biology* 90 (11), S. 951–954. DOI: 10.1016/j.ejcb.2010.12.004.
- Aepfelbacher, Martin; Trasak, Claudia; Ruckdeschel, Klaus (2007): Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. In: *Thrombosis and haemostasis* 98 (3), S. 521–529.
- Aepfelbacher, Martin; Wolters, Manuel (2017): Acting on Actin: Rac and Rho Played by *Yersinia*. In: *Current topics in microbiology and immunology* 399, S. 201–220. DOI: 10.1007/82\_2016\_33.
- Agrain, Céline; Sorg, Isabel; Paroz, Cécile; Cornelis, Guy R. (2005): Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. In: *Molecular microbiology* 57 (5), S. 1415–1427. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04758.x.
- Aili, Margareta; Hallberg, Bengt; Wolf-Watz, Hans; Rosqvist, Roland (2002): GAP activity of *Yersinia* YopE. In: *Methods in enzymology* 358, S. 359–370.
- Aili, Margareta; Isaksson, Elin L.; Carlsson, Sara E.; Wolf-Watz, Hans; Rosqvist, Roland; Francis, Matthew S. (2008): Regulation of *Yersinia* Yop-effector delivery by translocated YopE. In:

*International journal of medical microbiology: IJMM* 298 (3-4), S. 183–192. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.04.007.

Aili, Margareta; Isaksson, Elin L.; Hallberg, Bengt; Wolf-Watz, Hans; Rosqvist, Roland (2006): Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Cellular microbiology* 8 (6), S. 1020–1033. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00684.x.

Akeda, Yukihiko; Galán, Jorge E. (2005): Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. In: *Nature* 437 (7060), S. 911–915. DOI: 10.1038/nature03992.

Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.

Akopyan, Karen; Edgren, Tomas; Wang-Edgren, Helen; Rosqvist, Roland; Fahlgren, Anna; Wolf-Watz, Hans; Fallman, Maria (2011): Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (4), S. 1639–1644. DOI: 10.1073/pnas.1013888108.

Aktories, Klaus; Barbieri, Joseph T. (2005): Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. In: *Nature reviews. Microbiology* 3 (5), S. 397–410. DOI: 10.1038/nrmicro1150.

Aleksić, S.; Bockemühl, J. (1984): Proposed revision of the Wauters et al. antigenic scheme for serotyping of *Yersinia enterocolitica*. In: *Journal of clinical microbiology* 20 (1), S. 99–102.

Allaoui, A.; Schulte, R.; 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. In: *Molecular microbiology* 18 (2), S. 343–355.

Allen-Vercoe, Emma; Toh, Michael C. W.; Waddell, Barbara; Ho, Harmony; DeVinney, Rebekah (2005): A carboxy-terminal domain of Tir from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC O157:H7) required for efficient type III secretion. In: *FEMS microbiology letters* 243 (2), S. 355–364. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.12.027.

Alrutz, M. A.; Isberg, R. R. (1998): Involvement of focal adhesion kinase in invasin-mediated uptake. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (23), S. 13658–13663.

Alrutz, M. A.; Srivastava, A.; Wong, K. W.; D'Souza-Schorey, C.; Tang, M.; Ch'Ng, L. E. et al. (2001): Efficient uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function. In: *Molecular microbiology* 42 (3), S. 689–703.

- Anderson, Deborah M.; Ramamurthi, Kumaran S.; Tam, Christina; Schneewind, Olaf (2002): YopD and LcrH Regulate Expression of *Yersinia enterocolitica* YopQ by a Posttranscriptional Mechanism and Bind to yopQ RNA. In: *Journal of bacteriology* 184 (5), S. 1287–1295. DOI: 10.1128/JB.184.5.1287-1295.2002.
- Andersson, K.; Carballeira, N.; Magnusson, K. E.; Persson, C.; Stendahl, O.; Wolf-Watz, H.; Fällman, M. (1996): YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. In: *Molecular microbiology* 20 (5), S. 1057–1069.
- Andor, A.; Trülzsch, K.; Essler, M.; Roggenkamp, A.; Wiedemann, A.; Heesemann, J.; Aepfelbacher, M. (2001): YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. In: *Cellular microbiology* 3 (5), S. 301–310.
- Armentrout, Erin I.; Rietsch, Arne (2016): The Type III Secretion Translocation Pore Senses Host Cell Contact. In: *PLoS Pathogens* 12 (3), e1005530. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005530.
- Autenrieth, I. B.; Firsching, R. (1996): Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. In: *Journal of medical microbiology* 44 (4), S. 285–294. DOI: 10.1099/00222615-44-4-285.
- Autenrieth, I. B.; Kempf, V.; Sprinz, T.; Preger, S.; Schnell, A. (1996): Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. In: *Infection and Immunity* 64 (4), S. 1357–1368.
- BACON, G. A.; BURROWS, T. W. (1956): The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence. In: *British journal of experimental pathology* 37 (5), S. 481–493.
- Bahnan, Wael; Boettner, Douglas R.; Westermarck, Linda; Fällman, Maria; Schesser, Kurt (2015): Pathogenic *Yersinia* Promotes Its Survival by Creating an Acidic Fluid-Accessible Compartment on the Macrophage Surface. In: *PloS one* 10 (8), e0133298. DOI: 10.1371/journal.pone.0133298.
- Balzarotti, Francisco; Eilers, Yvan; Gwosch, Klaus C.; Gynnå, Arvid H.; Westphal, Volker; Stefani, Fernando D. et al. (2017): Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. In: *Science (New York, N.Y.)* 355 (6325), S. 606–612. DOI: 10.1126/science.aak9913.
- Bancerz-Kisiel, Agata; Pieczywek, Marta; Łada, Piotr; Szweda, Wojciech (2018): The Most Important Virulence Markers of *Yersinia enterocolitica* and Their Role during Infection. In: *Genes* 9 (5). DOI: 10.3390/genes9050235.

- Barbieri, Joseph T.; Riese, Matthew J.; Aktories, Klaus (2002): Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. In: *Annual review of cell and developmental biology* 18, S. 315–344. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.18.012502.134748.
- Bengoechea, José Antonio; Najdenski, Hristo; Skurnik, Mikael (2004): Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. In: *Molecular microbiology* 52 (2), S. 451–469. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.03987.x.
- Bergman, T.; Håkansson, S.; Forsberg, A.; Norlander, L.; Macellaro, A.; Bäckman, A. et al. (1991): Analysis of the V antigen *lcrGVH-yopBD* operon of *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for a regulatory role of *LcrH* and *LcrV*. In: *Journal of bacteriology* 173 (5), S. 1607–1616.
- Berneking, Laura; Schnapp, Marie; Rumm, Andreas; Trasak, Claudia; Ruckdeschel, Klaus; Alawi, Malik et al. (2016): Immunosuppressive *Yersinia* Effector *YopM* Binds DEAD Box Helicase *DDX3* to Control Ribosomal *S6* Kinase in the Nucleus of Host Cells. In: *PLoS Pathogens* 12 (6), e1005660. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005660.
- Bhagat, Neeru; Viridi, Jugsharan S. (2009): Molecular and biochemical characterization of urease and survival of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A in acidic pH in vitro. In: *BMC microbiology* 9, S. 262. DOI: 10.1186/1471-2180-9-262.
- Białas, Nataniel; Kasperkiewicz, Katarzyna; Radziejewska-Lebrecht, Joanna; Skurnik, Mikael (2012): Bacterial cell surface structures in *Yersinia enterocolitica*. In: *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 60 (3), S. 199–209. DOI: 10.1007/s00005-012-0168-z.
- Bibel, D. J.; Chen, T. H. (1976): Diagnosis of plaque: an analysis of the *Yersin*-*Kitasato* controversy. In: *Bacteriological Reviews* 40 (3), S. 633–651.
- Biedzka-Sarek, Marta; Salmenlinna, Saara; Gruber, Markus; Lupas, Andrei N.; Meri, Seppo; Skurnik, Mikael (2008): Functional mapping of *YadA*- and *Ail*-mediated binding of human factor H to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. In: *Infection and Immunity* 76 (11), S. 5016–5027. DOI: 10.1128/IAI.00314-08.
- Biedzka-Sarek, Marta; Venho, Reija; Skurnik, Mikael (2005): Role of *YadA*, *Ail*, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. In: *Infection and Immunity* 73 (4), S. 2232–2244. DOI: 10.1128/IAI.73.4.2232-2244.2005.
- Bierne, H.; Gouin, E.; Roux, P.; Caroni, P.; Yin, H. L.; Cossart, P. (2001): A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis. In: *The Journal of cell biology* 155 (1), S. 101–112. DOI: 10.1083/jcb.200104037.

- Black, D. S.; Bliska, J. B. (2000): The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. In: *Molecular microbiology* 37 (3), S. 515–527.
- Black, D. S.; Marie-Cardine, A.; Schraven, B.; Bliska, J. B. (2000): The *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages. In: *Cellular microbiology* 2 (5), S. 401–414.
- Blaylock, Bill; Berube, Bryan J.; Schneewind, Olaf (2010): YopR impacts type III needle polymerization in *Yersinia* species. In: *Molecular microbiology* 75 (1), S. 221–229. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06988.x.
- Blaylock, Bill; Riordan, Kelly E.; Missiakas, Dominique M.; Schneewind, Olaf (2006): Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. In: *Journal of bacteriology* 188 (10), S. 3525–3534. DOI: 10.1128/JB.188.10.3525-3534.2006.
- Bleves, Sophie; Marenne, Marie-Noëlle; Detry, Gautier; Cornelis, Guy R. (2002): Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* yop regulon by deletion of the flagellum master operon flhDC. In: *Journal of bacteriology* 184 (12), S. 3214–3223.
- Bliska, J. B.; Falkow, S. (1992): Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (8), S. 3561–3565.
- Blocker, A.; Gounon, P.; Larquet, E.; Niebuhr, K.; Cabiaux, V.; Parsot, C.; Sansonetti, P. (1999): The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. In: *The Journal of cell biology* 147 (3), S. 683–693.
- Blocker, A.; Jouihri, N.; Larquet, E.; Gounon, P.; Ebel, F.; Parsot, C. et al. (2001): Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. In: *Molecular microbiology* 39 (3), S. 652–663.
- Boland, A.; Cornelis, G. R. (1998): Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. In: *Infection and Immunity* 66 (5), S. 1878–1884.
- Boland, A.; Havaux, S.; Cornelis, G. R. (1998): Heterogeneity of the *Yersinia* YopM protein. In: *Microbial Pathogenesis* 25 (6), S. 343–348. DOI: 10.1006/mpat.1998.0247.
- Bölin, I.; Norlander, L.; Wolf-Watz, H. (1982): Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. In: *Infection and Immunity* 37 (2), S. 506–512.

- Botelho, R. J.; Teruel, M.; Dierckman, R.; Anderson, R.; Wells, A.; York, J. D. et al. (2000): Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. In: *The Journal of cell biology* 151 (7), S. 1353–1368.
- Bottone, E. J. (1997): *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. In: *Clinical Microbiology Reviews* 10 (2), S. 257–276.
- Bottone, E. J. (1999): *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. In: *Microbes and infection* 1 (4), S. 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. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254.
- Brodsky, Igor E.; Palm, Noah W.; Sadanand, Saheli; Ryndak, Michelle B.; Sutterwala, Fayyaz S.; Flavell, Richard A. et al. (2010): A *Yersinia* effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. In: *Cell host & microbe* 7 (5), S. 376–387. DOI: 10.1016/j.chom.2010.04.009.
- Bröms, Jeanette E.; Forslund, Anna-Lena; Forsberg, Ake; Francis, Matthew S. (2003): Dissection of homologous translocon operons reveals a distinct role for YopD in type III secretion by *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Microbiology (Reading, England)* 149 (Pt 9), S. 2615–2626. DOI: 10.1099/mic.0.26322-0.
- Broz, Petr; Mueller, Catherine A.; Müller, Shirley A.; Philippsen, Ansgar; Sorg, Isabel; Engel, Andreas; Cornelis, Guy R. (2007): Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. In: *Molecular microbiology* 65 (5), S. 1311–1320. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05871.x.
- Brubaker, R. R. (1991): Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. In: *Clinical Microbiology Reviews* 4 (3), S. 309–324.
- Brubaker, Robert R. (2003): Interleukin-10 and Inhibition of Innate Immunity to *Yersiniae*: Roles of Yops and LcrV (V Antigen). In: *Infection and Immunity* 71 (7), S. 3673–3681. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3673-3681.2003.
- Brubaker, R. R., Surgalla, M. J. (1964): The effect of Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> on lysis, growth, and production of virulence antigens by *pasteurella pestis*. In: *The Journal of infectious diseases* 114, S. 13–25.
- Brzostek, Katarzyna; Raczowska, Adrianna; Zasada, Aleksandra (2003): The osmotic regulator OmpR is involved in the response of *Yersinia enterocolitica* O:9 to environmental stresses and survival within macrophages. In: *FEMS microbiology letters* 228 (2), S. 265–271.

- Bursová, Šárka; Necidová, Lenka; Haruštiaková, Danka; Janštová, Bohumíra (2017): Growth potential of *Yersinia enterocolitica* in pasteurised cow's and goat's milk stored at 8 °C and 24 °C. In: *Food Control* 73, S. 1415–1419. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.11.006.
- Büttner, Daniela (2012): Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. In: *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 76 (2), S. 262–310. DOI: 10.1128/MMBR.05017-11.
- Carniel, E. (2002): Plasmids and pathogenicity islands of *Yersinia*. In: *Current topics in microbiology and immunology* 264 (1), S. 89–108.
- Carniel, Elisabeth; Autenrieth, Ingo; Cornelis, Guy; Fukushima, Hiroshi; Guinet, Françoise; Isberg, Ralph et al. (2006): *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer und Erko Stackebrandt (Hg.): *The Prokaryotes*. Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. New York, NY: Springer-Verlag, S. 270–398. Online verfügbar unter [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X\\_13](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_13).
- CAVANAUGH, D. C.; RANDALL, R. (1959): The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plague. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 83, S. 348–363.
- Chain, Patrick S. G.; Hu, Ping; Malfatti, Stephanie A.; Radnedge, Lyndsay; Larimer, Frank; Vergez, Lisa M. et al. (2006): Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. In: *Journal of bacteriology* 188 (12), S. 4453–4463. DOI: 10.1128/JB.00124-06.
- Chakravorty, Dipshikha; Rohde, Manfred; Jäger, Lorenz; Deiwick, Jörg; Hensel, Michael (2005): Formation of a novel surface structure encoded by *Salmonella* Pathogenicity Island 2. In: *The EMBO journal* 24 (11), S. 2043–2052. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600676.
- Charnetzky, W. T.; Shuford, W. W. (1985): Survival and growth of *Yersinia pestis* within macrophages and an effect of the loss of the 47-megadalton plasmid on growth in macrophages. In: *Infection and Immunity* 47 (1), S. 234–241.
- Chen, Yuqing; Anderson, Deborah M. (2011): Expression hierarchy in the *Yersinia* type III secretion system established through YopD recognition of RNA. In: *Molecular microbiology* 80 (4), S. 966–980. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07623.x.
- Cheng, L. W.; Kay, O.; Schneewind, O. (2001): Regulated secretion of YopN by the type III machinery of *Yersinia enterocolitica*. In: *Journal of bacteriology* 183 (18), S. 5293–5301.

- Chung, Lawton K.; Philip, Naomi H.; Schmidt, Valentina A.; Koller, Antonius; Strowig, Till; Flavell, Richard A. et al. (2014): IQGAP1 is important for activation of caspase-1 in macrophages and is targeted by *Yersinia pestis* type III effector YopM. In: *mBio* 5 (4), e01402-14. DOI: 10.1128/mBio.01402-14.
- Clark, M. A.; Hirst, B. H.; Jepson, M. A. (1998): M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. In: *Infection and Immunity* 66 (3), S. 1237–1243.
- Clarke, Jonathan H. (2003): Lipid signalling: picking out the PIPs. In: *Current biology: CB* 13 (20), R815-7.
- Cornelis, G. R.; Sluiter, C.; Delor, I.; Geib, D.; Kaniga, K.; Lambert de Rouvroit, C. et al. (1991): ymoA, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. In: *Molecular microbiology* 5 (5), S. 1023–1034.
- Cornelis, G. R.; van Gijsegem, F. (2000): Assembly and function of type III secretory systems. In: *Annual review of microbiology* 54, S. 735–774. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.735.
- Cornelis, G. R.; Wolf-Watz, H. (1997): The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. In: *Molecular microbiology* 23 (5), S. 861–867.
- Cornelis, Guy; Vanootegem, J.-C.; Sluiter, C. (1987): Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. In: *Microbial Pathogenesis* 2 (5), S. 367–379. DOI: 10.1016/0882-4010(87)90078-7.
- Cornelis, Guy R. (1997): The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. Hg. v. *Molecular Microbiology - Wiley Online Library*. Online verfügbar unter <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-2958.1997.2731623.x>, zuletzt geprüft am 19.06.2018.
- Cornelis, Guy R. (2002a): The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (10), S. 742–752. DOI: 10.1038/nrm932.
- Cornelis, Guy R. (2002b): *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. In: *The Journal of cell biology* 158 (3), S. 401–408. DOI: 10.1083/jcb.200205077.
- Cornelis, Guy R. (2006): The type III secretion injectisome. In: *Nature reviews. Microbiology* 4 (11), S. 811–825. DOI: 10.1038/nrmicro1526.
- Cornelis, Guy R.; Boland, Anne; Boyd, Aoife P.; Geuijen, Cecile; Iriarte, Maite; Neyt, Cécile et al. (1998): The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (4), S. 1315–1352.

- Costa, Tiago R. D.; Edqvist, Petra J.; Bröms, Jeanette E.; Åhlund, Monika K.; Forsberg, Åke; Francis, Matthew S. (2010): YopD Self-assembly and Binding to LcrV Facilitate Type III Secretion Activity by *Yersinia pseudotuberculosis*\*. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (33), S. 25269–25284. DOI: 10.1074/jbc.M110.144311.
- Costa, Tiago R. D.; Felisberto-Rodrigues, Catarina; Meir, Amit; Prevost, Marie S.; Redzej, Adam; Trokter, Martina; Waksman, Gabriel (2015): Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. In: *Nature reviews. Microbiology* 13 (6), S. 343–359. DOI: 10.1038/nrmicro3456.
- Curfs, Jo H. A. J.; Meis, Jacques F. G. M.; Fransen, Jack A. M.; van der Lee, Hein A. L.; Hoogkamp-Korstanje, Jacomina A. A. (1995): Interactions of *Yersinia enterocolitica* with polarized human intestinal Caco-2 cells. In: *Medical microbiology and immunology* 184 (3), S. 123–127. DOI: 10.1007/BF00224348.
- Dacheux, D.; Goure, J.; Chabert, J.; Usson, Y.; Attree, I. (2001): Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. In: *Molecular microbiology* 40 (1), S. 76–85.
- Darveau, R. P.; Charnetzky, W. T.; Hurlbert, R. E. (1980): Outer membrane protein composition of *Yersinia pestis* at different growth stages and incubation temperatures. In: *Journal of bacteriology* 143 (2), S. 942–949.
- Day, J. B.; Plano, G. V. (1998): A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. In: *Molecular microbiology* 30 (4), S. 777–788.
- DeBord, Kristin L.; Anderson, Deborah M.; Marketon, Melanie M.; Overheim, Katie A.; DePaolo, R. William; Ciletti, Nancy A. et al. (2006): Immunogenicity and protective immunity against bubonic plague and pneumonic plague by immunization of mice with the recombinant V10 antigen, a variant of LcrV. In: *Infection and Immunity* 74 (8), S. 4910–4914. DOI: 10.1128/IAI.01860-05.
- Denecker, Geertrui; Töttemeyer, Sabine; Mota, Luís J.; Troisfontaines, Paul; Lambermont, Isabelle; Youta, Carine et al. (2002): Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. In: *Infection and Immunity* 70 (7), S. 3510–3520.
- Deng, Wanyin; Marshall, Natalie C.; Rowland, Jennifer L.; McCoy, James M.; Worrall, Liam J.; Santos, Andrew S. et al. (2017): Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. In: *Nature reviews. Microbiology* 15 (6), S. 323–337. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.20.

- Derewenda, Urszula; Mateja, Agnieszka; Devedjiev, Yancho; Routzahn, Karen M.; Evdokimov, Artem G.; Derewenda, Zygmunt S.; Waugh, David S. (2004): The structure of Yersinia pestis V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. In: *Structure (London, England: 1993)* 12 (2), S. 301–306. DOI: 10.1016/j.str.2004.01.010.
- Deuschle, Eva; Keller, Birgit; Siegfried, Alexandra; Manncke, Birgit; Spaeth, Tanja; Köberle, Martin et al. (2016): Role of  $\beta$ 1 integrins and bacterial adhesins for Yop injection into leukocytes in Yersinia enterocolitica systemic mouse infection. In: *International journal of medical microbiology: IJMM* 306 (2), S. 77–88. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.12.001.
- Dewoody, Rebecca; Merritt, Peter M.; Houppert, Andrew S.; Marketon, Melanie M. (2011): YopK regulates the Yersinia pestis type III secretion system from within host cells. In: *Molecular microbiology* 79 (6), S. 1445–1461. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07534.x.
- Dewoody, Rebecca; Merritt, Peter M.; Marketon, Melanie M. (2013a): YopK controls both rate and fidelity of Yop translocation. In: *Molecular microbiology* 87 (2), S. 301–317. DOI: 10.1111/mmi.12099.
- Dewoody, Rebecca S.; Merritt, Peter M.; Marketon, Melanie M. (2013b): Regulation of the Yersinia type III secretion system: traffic control. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 3, S. 4. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00004.
- Dhar, Mahesh Shanker; Viridi, Jugsharan Singh (2014): Strategies used by Yersinia enterocolitica to evade killing by the host: thinking beyond Yops. In: *Microbes and infection* 16 (2), S. 87–95. DOI: 10.1016/j.micinf.2013.11.002.
- Di Paolo, Gilbert; Camilli, Pietro de (2006): Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. In: *Nature* 443 (7112), S. 651. DOI: 10.1038/nature05185.
- Diepold, Andreas; Amstutz, Marlise; Abel, Sören; Sorg, Isabel; Jenal, Urs; Cornelis, Guy R. (2010): Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome. In: *The EMBO journal* 29 (11), S. 1928–1940. DOI: 10.1038/emboj.2010.84.
- Diepold, Andreas; Armitage, Judith P. (2015): Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 370 (1679). DOI: 10.1098/rstb.2015.0020.
- Diepold, Andreas; Kudryashev, Mikhail; Delalez, Nicolas J.; Berry, Richard M.; Armitage, Judith P. (2015): Composition, formation, and regulation of the cytosolic c-ring, a dynamic component of the type III secretion injectisome. In: *PLoS biology* 13 (1), e1002039. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002039.

- Diepold, Andreas; Sezgin, Erdinc; Huseyin, Miles; Mortimer, Thomas; Eggeling, Christian; Armitage, Judith P. (2017): A dynamic and adaptive network of cytosolic interactions governs protein export by the T3SS injectisome. In: *Nature communications* 8, S. 15940. DOI: 10.1038/ncomms15940.
- Diepold, Andreas; Wiesand, Ulrich; Amstutz, Marlise; Cornelis, Guy R. (2012): Assembly of the Yersinia injectisome: the missing pieces. In: *Molecular microbiology* 85 (5), S. 878–892. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08146.x.
- Diepold, Andreas; Wiesand, Ulrich; Cornelis, Guy 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. In: *Molecular microbiology* 82 (2), S. 502–514. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07830.x.
- Discola, Karen F.; Förster, Andreas; Boulay, François; Simorre, Jean-Pierre; Attree, Ina; Dessen, Andréa; Job, Viviana (2013): Membrane and Chaperone Recognition by the Major Translocator Protein PopB of the Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*\*. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (6), S. 3591–3601. DOI: 10.1074/jbc.M113.517920.
- Drummond, Niall; Murphy, Brenda P.; Ringwood, Tamara; Prentice, Michael B.; Buckley, James F.; Fanning, Séamus (2012): Yersinia enterocolitica: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. In: *Foodborne pathogens and disease* 9 (3), S. 179–189. DOI: 10.1089/fpd.2011.0938.
- Durand, Enrique A.; Maldonado-Arocho, Francisco J.; Castillo, Cynthia; Walsh, Rebecca L.; Mecas, Joan (2010): The presence of professional phagocytes dictates the number of host cells targeted for Yop translocation during infection. In: *Cellular microbiology* 12 (8), S. 1064–1082. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01451.x.
- Edgren, Tomas; Forsberg, Ake; Rosqvist, Roland; Wolf-Watz, Hans (2012): Type III secretion in Yersinia: injectisome or not? In: *PLoS Pathogens* 8 (5), e1002669. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002669.
- Edqvist, Petra J.; Olsson, Jan; Lavander, Moa; Sundberg, Lena; Forsberg, Ake; Wolf-Watz, Hans; Lloyd, Scott A. (2003): YscP and YscU regulate substrate specificity of the Yersinia type III secretion system. In: *Journal of bacteriology* 185 (7), S. 2259–2266.
- EFSA (2016): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. In: *EFSA* 14 (12), S. 148. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4634.
- El Tahir, Y.; Skurnik, M. (2001): YadA, the multifaceted Yersinia adhesin. In: *International journal of medical microbiology: IJMM* 291 (3), S. 209–218. DOI: 10.1078/1438-4221-00119.

- Enninga, Jost; Mounier, Joëlle; Sansonetti, Philippe; van Tran Nhieu, Guy (2005): Secretion of type III effectors into host cells in real time. In: *Nature methods* 2 (12), S. 959–965. DOI: 10.1038/nmeth804.
- Espina, Marianela; Olive, Andrew J.; Kenjale, Roma; Moore, David S.; Ausar, S. Fernando; Kaminski, Robert W. et al. (2006): IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of *Shigella flexneri*. In: *Infection and Immunity* 74 (8), S. 4391–4400. DOI: 10.1128/IAI.00440-06.
- Evdokimov, Artem G.; Tropea, Joseph E.; Routzahn, Karen M.; Waugh, David S. (2002): Crystal structure of the *Yersinia pestis* GTPase activator YopE. In: *Protein science: a publication of the Protein Society* 11 (2), S. 401–408. DOI: 10.1110/ps.34102.
- Fällman, M.; Andersson, K.; Håkansson, S.; Magnusson, K. E.; Stendahl, O.; Wolf-Watz, H. (1995): *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. In: *Infection and Immunity* 63 (8), S. 3117–3124.
- Faudry, Eric; Vernier, Grégory; Neumann, Emmanuelle; Forge, Vincent; Attree, Ina (2006): Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Biochemistry* 45 (26), S. 8117–8123. DOI: 10.1021/bi060452.
- Ferracci, Franco; Day, James B.; Ezelle, Heather J.; Plano, Gregory V. (2004): Expression of a functional secreted YopN-TyeA hybrid protein in *Yersinia pestis* is the result of a +1 translational frameshift event. In: *Journal of bacteriology* 186 (15), S. 5160–5166. DOI: 10.1128/JB.186.15.5160-5166.2004.
- Ferracci, Franco; Schubot, Florian D.; Waugh, David S.; Plano, Gregory V. (2005): Selection and characterization of *Yersinia pestis* YopN mutants that constitutively block Yop secretion. In: *Molecular microbiology* 57 (4), S. 970–987. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04738.x.
- Fincham, V. J.; James, M.; Frame, M. C.; Winder, S. J. (2000): Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. In: *The EMBO journal* 19 (12), S. 2911–2923. DOI: 10.1093/emboj/19.12.2911.
- Flannagan, Ronald S.; Jaumouillé, Valentin; Grinstein, Sergio (2012): The cell biology of phagocytosis. In: *Annual review of pathology* 7, S. 61–98. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011811-132445.
- Food and Drug Administration (FDA) (2012): Bad Bug Book. Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Second Edition. Online verfügbar unter <https://www.fda.gov/downloads/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodborne pathogensnaturaltoxins/badbugbook/ucm297627.pdf>, zuletzt geprüft am 27.08.2018.

- Forman, Stanislav; Wulff, Christine R.; Myers-Morales, Tanya; Cowan, Clarissa; Perry, Robert D.; Straley, Susan C. (2007): yadBC of *Yersinia pestis*, a New Virulence Determinant for Bubonic Plague †. In: *Infection and Immunity* 76 (2), S. 578–587. DOI: 10.1128/IAI.00219-07.
- Forsberg, A.; Viitanen, A. M.; Skurnik, M.; Wolf-Watz, H. (1991): The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Molecular microbiology* 5 (4), S. 977–986.
- Foultier, Boris; Troisfontaines, Paul; Vertommen, Didier; Marenne, Marie-Noëlle; Rider, Mark; Parsot, Claude; Cornelis, Guy R. (2003): Identification of substrates and chaperone from the *Yersinia enterocolitica* 1B Ysa type III secretion system. In: *Infection and Immunity* 71 (1), S. 242–253.
- Fowler, J. M.; Brubaker, R. R. (1994): Physiological basis of the low calcium response in *Yersinia pestis*. In: *Infection and Immunity* 62 (12), S. 5234–5241.
- Fowler, Janet M.; Wulff, Christine R.; Straley, Susan C.; Brubaker, Robert R. (2009): Growth of calcium-blind mutants of *Yersinia pestis* at 37 degrees C in permissive Ca<sup>2+</sup>-deficient environments. In: *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 8), S. 2509–2521. DOI: 10.1099/mic.0.028852-0.
- Francis, M. S.; Lloyd, S. A.; 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*. In: *Molecular microbiology* 42 (4), S. 1075–1093.
- Francis, M. S.; 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. In: *Molecular microbiology* 29 (3), S. 799–813.
- Fredriksson-Ahomaa, Maria; Stolle, Andreas; Korkeala, Hannu (2006): Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. In: *FEMS immunology and medical microbiology* 47 (3), S. 315–329. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2006.00095.x.
- Fredriksson-Ahomaa, Maria; Stolle, Andreas; Stephan, Roger (2007): Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. In: *International journal of food microbiology* 119 (3), S. 207–212. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.050.
- Freund, Sandra; Czech, Beate; Trülzsch, Konrad; Ackermann, Nikolaus; Heesemann, Jürgen (2008): Unusual, virulence plasmid-dependent growth behavior of *Yersinia enterocolitica* in three-dimensional collagen gels. In: *Journal of bacteriology* 190 (12), S. 4111–4120. DOI: 10.1128/JB.00156-08.

- Galán, Jorge E.; Lara-Tejero, Maria; Marlovits, Thomas C.; Wagner, Samuel (2014): Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. In: *Annual review of microbiology* 68, S. 415–438. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155725.
- Galindo, Cristi L.; Rosenzweig, Jason A.; Kirtley, Michelle L.; Chopra, Ashok K. (2011): Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. In: *Journal of pathogens* 2011, S. 182051. DOI: 10.4061/2011/182051.
- Galli, Stephen J.; Borregaard, Niels; Wynn, Thomas A. (2011): Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. In: *Nature immunology* 12 (11), S. 1035–1044. DOI: 10.1038/ni.2109.
- Gaus, Kristin; Hentschke, Moritz; Czymmeck, Nicole; Novikova, Lena; Trülzsch, Konrad; Valentin-Weigand, Peter et al. (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. In: *Infection and Immunity* 79 (3), S. 1166–1175. DOI: 10.1128/IAI.00694-10.
- Gendrin, Claire; Sarrazin, Stéphane; Bonnaffé, David; Jault, Jean-Michel; Lortat-Jacob, Hugues; Dessen, Andréa (2010): Hijacking of the pleiotropic cytokine interferon- $\gamma$  by the type III secretion system of *Yersinia pestis*. In: *PLoS one* 5 (12), e15242. DOI: 10.1371/journal.pone.0015242.
- Gophna, Uri; Ron, Elisha Z.; Graur, Dan (2003): Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. In: *Gene* 312, S. 151–163.
- Goure, Julien; Broz, Petr; Attree, Olivier; Cornelis, Guy R.; Attree, Ina (2005): Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. In: *The Journal of infectious diseases* 192 (2), S. 218–225. DOI: 10.1086/430932.
- Goure, Julien; Pastor, Alexandrine; Faudry, Eric; Chabert, Jacqueline; Dessen, Andréa; Attree, Ina (2004): The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. In: *Infection and Immunity* 72 (8), S. 4741–4750. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4741-4750.2004.
- Grassl, Guntram A.; Bohn, Erwin; Müller, Yvonne; Bühler, Oliver T.; Autenrieth, Ingo B. (2003): Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasion beyond invasion. In: *International journal of medical microbiology: IJMM* 293 (1), S. 41–54. DOI: 10.1078/1438-4221-00243.
- Green, Erin R.; Mecsas, Joan (2016): Bacterial Secretion Systems: An Overview. In: *Microbiology spectrum* 4 (1). DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.

- Greenberg, S.; el Khoury, J.; Di Virgilio, F.; Kaplan, E. M.; Silverstein, S. C. (1991): Ca<sup>2+</sup>-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. In: *The Journal of cell biology* 113 (4), S. 757–767.
- Griffiths, G.; Hoppeler, H. (1986): Quantitation in immunocytochemistry: correlation of immunogold labeling to absolute number of membrane antigens. In: *J Histochem Cytochem.* 34 (11), S. 1389–1398. DOI: 10.1177/34.11.3534077.
- Griffiths, Gareth (1993): *Fine Structure Immunocytochemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Grosdent, Nadine; Maridonneau-Parini, Isabelle; Sory, Marie-Paule; Cornelis, Guy R. (2002): Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. In: *Infection and Immunity* 70 (8), S. 4165–4176.
- Groves, Eleanor; Rittinger, Katrin; Amstutz, Marlise; Berry, Sara; Holden, David W.; Cornelis, Guy R.; Caron, Emmanuelle (2010): Sequestering of Rac by the *Yersinia* effector YopO blocks Fcγ receptor-mediated phagocytosis. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (6), S. 4087–4098. DOI: 10.1074/jbc.M109.071035.
- Grützkau, A.; Hanski, C.; Hahn, H.; 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. In: *Gut* 31 (9), S. 1011–1015.
- Gu, Wenpeng; Wang, Xin; Qiu, Haiyan; Luo, Xia; Di Xiao; Xiao, Yuchun et al. (2012): Comparative antigenic proteins and proteomics of pathogenic *Yersinia enterocolitica* bio-serotypes 1B/O: 8 and 2/O: 9 cultured at 25°C and 37°C. In: *Microbiology and immunology* 56 (9), S. 583–594. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2012.00478.x.
- Gupta, V.; Gulati, P.; Bhagat, N.; Dhar, M. S.; Viridi, J. S.: Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34 (4), S. 641–650. DOI: 10.1007/s10096-014-2276-7.
- Gustafsson, Mats G. L.; Shao, Lin; Carlton, Peter M.; Wang, C. J. Rachel; Golubovskaya, Inna N.; Cande, W. Zacheus et al. (2008): Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. In: *Biophysical journal* 94 (12), S. 4957–4970. DOI: 10.1529/biophysj.107.120345.
- Håkansson, S.; Bergman, T.; Vanooteghem, J. C.; Cornelis, G.; Wolf-Watz, H. (1993): YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. In: *Infection and Immunity* 61 (1), S. 71–80.

- Håkansson, S.; Galyov, E. E.; Rosqvist, R.; Wolf-Watz, H. (1996a): The Yersinia YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. In: *Molecular microbiology* 20 (3), S. 593–603.
- Håkansson, S.; Schesser, K.; Persson, C.; Galyov, E. E.; Rosqvist, R.; Homblé, F.; Wolf-Watz, H. (1996b): 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. In: *The EMBO journal* 15 (21), S. 5812–5823.
- Hamad, Mohamad A.; Nilles, Matthew L. (2007): Roles of YopN, LcrG and LcrV in controlling Yops secretion by Yersinia pestis. In: *Advances in experimental medicine and biology* 603, S. 225–234. DOI: 10.1007/978-0-387-72124-8\_20.
- Hamburger, Z. A.; Brown, M. S.; Isberg, R. R.; Bjorkman, P. J. (1999): Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 286 (5438), S. 291–295.
- Hanski, C.; Kutschka, U.; Schmoranzler, H. P.; Naumann, M.; Stallmach, A.; Hahn, H. et al. (1989): Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of Yersinia enterocolitica serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. In: *Infection and Immunity* 57 (3), S. 673–678.
- Hanski, C.; Naumann, M.; Grützkau, A.; Pluschke, G.; Friedrich, B.; Hahn, H.; Riecken, E. O. (1991): Humoral and cellular defense against intestinal murine infection with Yersinia enterocolitica. In: *Infection and Immunity* 59 (3), S. 1106–1111.
- Harrington, Amanda T.; Hearn, Patricia D.; Picking, Wendy L.; Barker, Jeffrey R.; Wessel, Andrew; Picking, William D. (2003): Structural Characterization of the N Terminus of IpaC from Shigella flexneri. In: *Infection and Immunity* 71 (3), S. 1255–1264. DOI: 10.1128/IAI.71.3.1255-1264.2003.
- Heesemann, J.; Algermissen, B.; Laufs, R. (1984): Genetically manipulated virulence of Yersinia enterocolitica. In: *Infection and Immunity* 46 (1), S. 105–110.
- Heesemann, J.; Gross, U.; Schmidt, N.; Laufs, R. (1986): Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic Yersinia sp. grown in calcium-deficient media. In: *Infection and Immunity* 54 (2), S. 561–567.
- Heesemann, J.; Keller, C.; Morawa, R.; Schmidt, N.; Siemens, H. J.; Laufs, R. (1983): Plasmids of human strains of Yersinia enterocolitica: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. In: *The Journal of infectious diseases* 147 (1), S. 107–115.

- Heesemann, J.; Laufs, R. (1983): Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. In: *Journal of bacteriology* 155 (2), S. 761–767.
- Hein, J.; Kempf, V. A. J.; Diebold, J.; Bucheler, N.; Preger, S.; Horak, I. et al. (2000): Interferon Consensus Sequence Binding Protein Confers Resistance against *Yersinia enterocolitica*. In: *Infection and Immunity* 68 (3), S. 1408–1417. DOI: 10.1128/IAI.68.3.1408-1417.2000.
- Heise, Tanja; Dersch, Petra (2006): Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (9), S. 3375–3380. DOI: 10.1073/pnas.0507749103.
- Hentschke, Moritz; Berneking, Laura; Belmar Campos, Cristina; Buck, Friedrich; Ruckdeschel, Klaus; Aepfelbacher, Martin (2010): *Yersinia* virulence factor YopM induces sustained RSK activation by interfering with dephosphorylation. In: *PLoS one* 5 (10). DOI: 10.1371/journal.pone.0013165.
- Hermant, D.; Ménard, R.; Arricau, N.; Parsot, C.; Popoff, M. Y. (1995): Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. In: *Molecular microbiology* 17 (4), S. 781–789.
- Hodgkinson, Julie L.; Horsley, Ashley; Stabat, David; Simon, Martha; Johnson, Steven; da Fonseca, Paula C. A. et al. (2009): Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. In: *Nature structural & molecular biology* 16 (5), S. 477–485. DOI: 10.1038/nsmb.1599.
- Höfling, Sabrina; Grabowski, Benjamin; Norkowski, Stefanie; Schmidt, M. Alexander; Rüter, Christian (2015): Current activities of the *Yersinia* effector protein YopM. In: *International journal of medical microbiology: IJMM* 305 (3), S. 424–432. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.03.009.
- Hoiczky, E.; Blobel, G. (2001): Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (8), S. 4669–4674. DOI: 10.1073/pnas.071065798.
- Holmström, A.; Olsson, J.; Cherepanov, P.; Maier, E.; Nordfelth, R.; Petterson, J. et al. (2001): LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. In: *Molecular microbiology* 39 (3), S. 620–632.
- Holmström, A.; Petterson, J.; Rosqvist, R.; Håkansson, S.; Tafazoli, F.; Fällman, M. et al. (1997): YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. In: *Molecular microbiology* 24 (1), S. 73–91.

- Holmström, A.; Rosqvist, R.; Wolf-Watz, H.; Forsberg, A. (1995a): Virulence plasmid-encoded YopK is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systemic infection in mice. In: *Infection and Immunity* 63 (6), S. 2269–2276.
- Holmström, A.; Rosqvist, R.; Wolf-Watz, H.; Forsberg, A. (1995b): YopK, a novel virulence determinant of *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Contributions to microbiology and immunology* 13, S. 239–243.
- Horne, Shelley M.; Prüss, Birgit M. (2006): Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid-encoded virulence genes. In: *Archives of microbiology* 185 (2), S. 115–126. DOI: 10.1007/s00203-005-0077-1.
- Hu, Ping; Elliott, Jeffrey; McCready, Paula; Skowronski, Evan; Garnes, Jeffrey; Kobayashi, Arthur et al. (1998): Structural Organization of Virulence-Associated Plasmids of *Yersinia pestis*. In: *Journal of bacteriology* 180 (19), S. 5192–5202.
- Hueck, Christoph J. (1998): Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (2), S. 379–433.
- Hume, Peter J.; McGhie, Emma J.; Hayward, Richard D.; Koronakis, Vassilis (2003): The purified *Shigella* IpaB and *Salmonella* SipB translocators share biochemical properties and membrane topology. In: *Molecular microbiology* 49 (2), S. 425–439.
- Huschka, Franziska (2017): Visualisierung des Typ III Translokator-Komplexes von *Yersinia enterocolitica* während der Wirtszellinfektion. Dissertation. Universität Hamburg, Hamburg.
- Ide, T.; Laarmann, S.; Greune, L.; Schillers, H.; Oberleithner, H.; Schmidt, M. A. (2001): Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. In: *Cellular microbiology* 3 (10), S. 669–679.
- Iriarte, M.; Sory, M. P.; Boland, A.; Boyd, A. P.; Mills, S. D.; Lambermont, I.; Cornelis, G. R. (1998): TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. In: *The EMBO journal* 17 (7), S. 1907–1918. DOI: 10.1093/emboj/17.7.1907.
- Isaksson, Elin L.; Aili, Margareta; Fahlgren, Anna; Carlsson, Sara E.; Rosqvist, Roland; Wolf-Watz, Hans (2009): The membrane localization domain is required for intracellular localization and autoregulation of YopE in *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Infection and Immunity* 77 (11), S. 4740–4749. DOI: 10.1128/IAI.00333-09.
- Isberg, R. R.; Barnes, P. (2001): Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. In: *Journal of cell science* 114 (Pt 1), S. 21–28.

- Isberg, R. R.; Leong, J. M. (1990): Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. In: *Cell* 60 (5), S. 861–871.
- Isberg, R. R.; Voorhis, D. L.; Falkow, S. (1987): Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. In: *Cell* 50 (5), S. 769–778.
- Ivanov, Maya I.; Hill, Jim; Bliska, James B. (2014): Direct neutralization of type III effector translocation by the variable region of a monoclonal antibody to *Yersinia pestis* LcrV. In: *Clinical and vaccine immunology: CVI* 21 (5), S. 667–673. DOI: 10.1128/CVI.00013-14.
- Jaffe, Aron B.; Hall, Alan (2005): Rho GTPases: biochemistry and biology. In: *Annual review of cell and developmental biology* 21, S. 247–269. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.
- Jepson, M. A.; Clark, M. A. (1998): Studying M cells and their role in infection. In: *Trends in microbiology* 6 (9), S. 359–365.
- Johnson, Steven; Roversi, Pietro; Espina, Marianela; Olive, Andrew; Deane, Janet E.; Birket, Susan et al. (2007): Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (6), S. 4035–4044. DOI: 10.1074/jbc.M607945200.
- Journet, Laure; Agrain, Céline; Broz, Petr; Cornelis, Guy R. (2003): The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. In: *Science (New York, N.Y.)* 302 (5651), S. 1757–1760. DOI: 10.1126/science.1091422.
- Juris, S. J.; Rudolph, A. E.; Huddler, D.; Orth, K.; Dixon, J. E. (2000): A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17), S. 9431–9436. DOI: 10.1073/pnas.170281997.
- Kakoschke, Tamara Katharina; Kakoschke, Sara Carina; Zeuzem, Catharina; Bouabe, Hicham; Adler, Kristin; Heesemann, Jürgen; Rossier, Ombeline (2016): The RNA Chaperone Hfq Is Essential for Virulence and Modulates the Expression of Four Adhesins in *Yersinia enterocolitica*. In: *Scientific reports* 6, S. 29275. DOI: 10.1038/srep29275.
- Kapatral, V.; Minnich, S. A. (1995): Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three *Yersinia enterocolitica* flagellin genes. In: *Molecular microbiology* 17 (1), S. 49–56.
- Kerschen, Edward J.; Cohen, Donald A.; Kaplan, Alan M.; Straley, Susan C. (2004): The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. In: *Infection and Immunity* 72 (8), S. 4589–4602. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4589-4602.2004.

- Kim, Bae Hoon; Kim, Hyeon Guk; Kim, Jin Seok; Im Jang, Jung; Park, Yong Keun (2007): Analysis of functional domains present in the N-terminus of the SipB protein. In: *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 9), S. 2998–3008. DOI: 10.1099/mic.0.2007/007872-0.
- Kirjavainen, Vesa; Jarva, Hanna; Biedzka-Sarek, Marta; Blom, Anna M.; Skurnik, Mikael; Meri, Seppo (2008): Yersinia enterocolitica serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. In: *PLoS Pathogens* 4 (8), e1000140. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000140.
- Kitasato, S. (1894): THE BACILLUS OF BUBONIC PLAGUE. In: *The Lancet* 144 (3704), S. 428–430. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)58670-5.
- Knutton, S.; Rosenshine, I.; Pallen, M. J.; Nisan, I.; Neves, B. C.; Bain, C. et al. (1998): A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells. In: *The EMBO journal* 17 (8), S. 2166–2176. DOI: 10.1093/emboj/17.8.2166.
- Köberle, Martin; Klein-Günther, Annegret; Schütz, Monika; Fritz, Michaela; Berchtold, Susanne; Tolosa, Eva et al. (2009): Yersinia enterocolitica targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model. In: *PLoS Pathogens* 5 (8), e1000551. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000551.
- Koning-Ward, T. F. de; Ward, A. C.; Hartland, E. L.; Robins-Browne, R. M. (1995): The urease complex gene of Yersinia enterocolitica and its role in virulence. In: *Contributions to microbiology and immunology* 13, S. 262–263.
- Koornhof, H. J.; Smego, R. A.; Nicol, M. (1999): Yersiniosis. II: The pathogenesis of Yersinia infections. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 18 (2), S. 87–112.
- Koster, Abraham J.; Klumperman, Judith (2003): Electron microscopy in cell biology: integrating structure and function. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* Suppl, SS6-10.
- Koster, M.; Bitter, W.; Cock, H. de; Allaoui, A.; Cornelis, G. R.; Tommassen, J. (1997): The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of Yersinia enterocolitica forms a ring-shaped multimeric complex. In: *Molecular microbiology* 26 (4), S. 789–797.
- Kubori, T.; Matsushima, Y.; Nakamura, D.; Uralil, J.; Lara-Tejero, M.; Sukhan, A. et al. (1998): Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 280 (5363), S. 602–605.

- Kubori, Tomoko; Galán, Jorge E. (2002): Salmonella Type III Secretion-Associated Protein InvE Controls Translocation of Effector Proteins into Host Cells. In: *Journal of bacteriology* 184 (17), S. 4699–4708. DOI: 10.1128/JB.184.17.4699-4708.2002.
- Kudryashev, Mikhail; Diepold, Andreas; Amstutz, Marlise; Armitage, Judith P.; Stahlberg, Henning; Cornelis, Guy R. (2015): Yersinia enterocolitica type III secretion injectisomes form regularly spaced clusters, which incorporate new machines upon activation. In: *Molecular microbiology* 95 (5), S. 875–884. DOI: 10.1111/mmi.12908.
- Kudryashev, Mikhail; Stenta, Marco; Schmelz, Stefan; Amstutz, Marlise; Wiesand, Ulrich; Castaño-Díez, Daniel et al. (2013): In situ structural analysis of the Yersinia enterocolitica injectisome. In: *eLife* 2, e00792. DOI: 10.7554/eLife.00792.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lara-Tejero, María; Galán, Jorge E. (2009): Salmonella enterica serovar typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. In: *Infection and Immunity* 77 (7), S. 2635–2642. DOI: 10.1128/IAI.00077-09.
- Lara-Tejero, María; Kato, Junya; Wagner, Samuel; Liu, Xiaoyun; Galán, Jorge E. (2011): A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. In: *Science (New York, N.Y.)* 331 (6021), S. 1188–1191. DOI: 10.1126/science.1201476.
- LaRock, Christopher N.; Cookson, Brad T. (2012): The Yersinia virulence effector YopM binds caspase-1 to arrest inflammasome assembly and processing. In: *Cell host & microbe* 12 (6), S. 799–805. DOI: 10.1016/j.chom.2012.10.020.
- Lavander, Moa; Sundberg, Lena; Edqvist, Petra J.; Lloyd, Scott A.; Wolf-Watz, Hans; Forsberg, Ake (2003): Characterisation of the type III secretion protein YscU in Yersinia pseudotuberculosis. YscU cleavage--dispensable for TTSS but essential for survival. In: *Advances in experimental medicine and biology* 529, S. 109–112. DOI: 10.1007/0-306-48416-1\_20.
- Lee, L. A.; Gerber, A. R.; Lonsway, D. R.; Smith, J. D.; Carter, G. P.; Puhr, N. D. et al. (1990): Yersinia enterocolitica O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. In: *The New England journal of medicine* 322 (14), S. 984–987. DOI: 10.1056/NEJM199004053221407.
- Lee, Pei-Chung; Stopford, Charles M.; Svenson, Amanda G.; Rietsch, Arne (2010): Control of effector export by the Pseudomonas aeruginosa type III secretion proteins PcrG and PcrV. In: *Molecular microbiology* 75 (4), S. 924–941. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.07027.x.

- Lee, V. T.; Anderson, D. M.; 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. In: *Molecular microbiology* 28 (3), S. 593–601.
- Lee, V. T.; Mazmanian, S. K.; Schneewind, O. (2001): A program of Yersinia enterocolitica type III secretion reactions is activated by specific signals. In: *Journal of bacteriology* 183 (17), S. 4970–4978.
- Lee, V. T.; Schneewind, O. (1999): Type III machines of pathogenic yersiniae secrete virulence factors into the extracellular milieu. In: *Molecular microbiology* 31 (6), S. 1619–1629.
- Lee, Wei Lin; Grimes, Jonathan M.; Robinson, Robert C. (2015): Yersinia effector YopO uses actin as bait to phosphorylate proteins that regulate actin polymerization. In: *Nature structural & molecular biology* 22 (3), S. 248–255. DOI: 10.1038/nsmb.2964.
- Lemmon, Mark A. (2003): Phosphoinositide Recognition Domains. In: *Traffic* 4 (4), S. 201–213. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2004.00071.x.
- Leo, Jack C.; Elovaara, Heli; Bihan, Dominique; Pugh, Nicholas; Kilpinen, Sami K.; Raynal, Nicolas et al. (2010): First analysis of a bacterial collagen-binding protein with collagen Toolkits: promiscuous binding of YadA to collagens may explain how YadA interferes with host processes. In: *Infection and Immunity* 78 (7), S. 3226–3236. DOI: 10.1128/IAI.01057-09.
- Lian, C. J.; Hwang, W. S.; Pai, C. H. (1987): Plasmid-mediated resistance to phagocytosis in Yersinia enterocolitica. In: *Infection and Immunity* 55 (5), S. 1176–1183.
- Ligtenberg, Katherine Given; Miller, Nathan C.; Mitchell, Anthony; Plano, Gregory V.; Schneewind, Olaf (2013): LcrV mutants that abolish Yersinia type III injectisome function. In: *Journal of bacteriology* 195 (4), S. 777–787. DOI: 10.1128/JB.02021-12.
- Lucić, Vladan; Förster, Friedrich; Baumeister, Wolfgang (2005): Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. In: *Annual review of biochemistry* 74, S. 833–865. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074112.
- Mantle, M.; Husar, S. D. (1993): Adhesion of Yersinia enterocolitica to purified rabbit and human intestinal mucin. In: *Infection and Immunity* 61 (6), S. 2340–2346.
- Marenne, Marie-Noëlle; Journet, Laure; Mota, Luis Jaime; Cornelis, Guy R. (2003): Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by Yersinia enterocolitica: role of LcrV, YscF and YopN. In: *Microbial Pathogenesis* 35 (6), S. 243–258.

- Marketon, Melanie M.; DePaolo, R. William; DeBord, Kristin L.; Jabri, Bana; Schneewind, Olaf (2005): Plague Bacteria Target Immune Cells During Infection. In: *Science (New York, N.Y.)* 309 (5741), S. 1739–1741. DOI: 10.1126/science.1114580.
- Marlovits, Thomas C.; Kubori, Tomoko; Sukhan, Anand; Thomas, Dennis R.; Galán, Jorge E.; Unger, Vinzenz M. (2004): Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 306 (5698), S. 1040–1042. DOI: 10.1126/science.1102610.
- Marra, A.; Isberg, R. R. (1997): Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. In: *Infection and Immunity* 65 (8), S. 3412–3421.
- Matson, Jyl S.; Nilles, Matthew L. (2001): LcrG-LcrV Interaction Is Required for Control of Yops Secretion in *Yersinia pestis*. In: *Journal of bacteriology* 183 (17), S. 5082–5091. DOI: 10.1128/JB.183.17.5082-5091.2001.
- Matteï, Pierre-Jean; Faudry, Eric; Job, Viviana; Izoré, Thierry; Attree, Ina; Dessen, Andréa (2011): Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. In: *The FEBS journal* 278 (3), S. 414–426. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07974.x.
- Mayhew, T. M.; Lucocq, J. M.; Griffiths, G. (2002): Relative labelling index: a novel stereological approach to test for non-random immunogold labelling of organelles and membranes on transmission electron microscopy thin sections. In: *Journal of microscopy* 205 (Pt 2), S. 153–164.
- Mayhew, Terry M.; Lucocq, John M. (2008): Quantifying immunogold labelling patterns of cellular compartments when they comprise mixtures of membranes (surface-occupying) and organelles (volume-occupying). In: *Histochem Cell Biol* 129 (3), S. 367–378. DOI: 10.1007/s00418-007-0375-6.
- McCann, Honour C.; Guttman, David S. (2008): Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. In: *The New phytologist* 177 (1), S. 33–47. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02293.x.
- McCoy, Melissa W.; Marré, Meghan L.; Lesser, Cammie F.; Mecsas, Joan (2010): The C-terminal tail of *Yersinia pseudotuberculosis* YopM is critical for interacting with RSK1 and for virulence. In: *Infection and Immunity* 78 (6), S. 2584–2598. DOI: 10.1128/IAI.00141-10.
- McGhie, Emma J.; Hume, Peter J.; Hayward, Richard D.; Torres, Jaume; Koronakis, Vassilis (2002): Topology of the *Salmonella* invasion protein SipB in a model bilayer. In: *Molecular microbiology* 44 (5), S. 1309–1321.

- McNally, Alan; Thomson, Nicholas R.; Reuter, Sandra; Wren, Brendan W. (2016): 'Add, stir and reduce': *Yersinia* spp. as model bacteria for pathogen evolution. In: *Nature reviews. Microbiology* 14 (3), S. 177–190. DOI: 10.1038/nrmicro.2015.29.
- McPhee, Joseph B.; Mena, Patricio; Bliska, James B. (2010): Delineation of regions of the *Yersinia* YopM protein required for interaction with the RSK1 and PRK2 host kinases and their requirement for interleukin-10 production and virulence. In: *Infection and Immunity* 78 (8), S. 3529–3539. DOI: 10.1128/IAI.00269-10.
- Mecscas, J.; Raupach, B.; Falkow, S. (1998): The *Yersinia* Yops inhibit invasion of *Listeria*, *Shigella* and *Edwardsiella* but not *Salmonella* into epithelial cells. In: *Molecular microbiology* 28 (6), S. 1269–1281.
- Medzhitov, Ruslan (2007): Recognition of microorganisms and activation of the immune response. In: *Nature* 449 (7164), S. 819–826. DOI: 10.1038/nature06246.
- Mejía, Edison; Bliska, James B.; Viboud, Gloria I. (2008): *Yersinia* controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity. In: *PLoS Pathogens* 4 (1), e3. DOI: 10.1371/journal.ppat.0040003.
- Ménard, R.; Sansonetti, P.; Parsot, C.; Vasselon, T. (1994): Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. In: *Cell* 79 (3), S. 515–525.
- Ménard, R.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1993): Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. In: *Journal of bacteriology* 175 (18), S. 5899–5906.
- Michiels, T.; Wattiau, P.; Brasseur, R.; Ruysschaert, J. M.; Cornelis, G. (1990): Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. In: *Infection and Immunity* 58 (9), S. 2840–2849.
- Miętka, K.; Brzostek, K.; Guz-Regner, K.; Bugła-Płoskońska, G. (2016): The mechanisms of complement activation in normal bovine serum and normal horse serum against *Yersinia enterocolitica* O:9 strains with different outer membrane proteins content. In: *Polish journal of veterinary sciences* 19 (1), S. 99–107. DOI: 10.1515/pjvs-2016-0013.
- Miki, Tsuyoshi; Okada, Nobuhiko; Shimada, Yukie; Danbara, Hirofumi (2004): Characterization of *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion-dependent hemolytic activity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. In: *Microbial Pathogenesis* 37 (2), S. 65–72. DOI: 10.1016/j.micpath.2004.04.006.

- Mikula, Kornelia M.; Kolodziejczyk, Robert; Goldman, Adrian (2012): Yersinia infection tools-characterization of structure and function of adhesins. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, S. 169. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00169.
- Miller, V. L.; Beer, K. B.; Heusipp, G.; Young, B. M.; Wachtel, M. R. (2001): Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. In: *Molecular microbiology* 41 (5), S. 1053–1062.
- Miller, V. L.; Bliska, J. B.; Falkow, S. (1990): Nucleotide sequence of the Yersinia enterocolitica ail gene and characterization of the Ail protein product. In: *Journal of bacteriology* 172 (2), S. 1062–1069.
- Miller, V. L.; Falkow, S. (1988): Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells. In: *Infection and Immunity* 56 (5), S. 1242–1248.
- Miller, V. L.; Farmer, J. J.; Hill, W. E.; Falkow, S. (1989): The ail locus is found uniquely in Yersinia enterocolitica serotypes commonly associated with disease. In: *Infection and Immunity* 57 (1), S. 121–131.
- Mills, Erez; Baruch, Kobi; Charpentier, Xavier; Kobi, Simi; Rosenshine, Ilan (2008): Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic Escherichia coli. In: *Cell host & microbe* 3 (2), S. 104–113. DOI: 10.1016/j.chom.2007.11.007.
- Mittal, Rohit; Peak-Chew, Sew-Yeu; McMahon, Harvey T. (2006): Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (49), S. 18574–18579. DOI: 10.1073/pnas.0608995103.
- Mohammadi, Sina; Isberg, Ralph R. (2009): Yersinia pseudotuberculosis virulence determinants invasin, YopE, and YopT modulate RhoG activity and localization. In: *Infection and Immunity* 77 (11), S. 4771–4782. DOI: 10.1128/IAI.00850-09.
- Monack, D. M.; Meccas, J.; Ghori, N.; Falkow, S. (1997): Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (19), S. 10385–10390.
- Montagner, Caroline; Arquint, Christian; Cornelis, Guy R. (2011): Translocators YopB and YopD from Yersinia enterocolitica form a multimeric integral membrane complex in eukaryotic cell membranes. In: *Journal of bacteriology* 193 (24), S. 6923–6928. DOI: 10.1128/JB.05555-11.

- Montminy, Sara W.; Khan, Naseema; McGrath, Sara; Walkowicz, Mitchell J.; Sharp, Fiona; Conlon, Joseph E. et al. (2006): Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. In: *Nature immunology* 7 (10), S. 1066–1073. DOI: 10.1038/ni1386.
- Mota, Luís Jaime; Journet, Laure; Sorg, Isabel; Agrain, Céline; Cornelis, Guy R. (2005a): Bacterial injectisomes: needle length does matter. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (5713), S. 1278. DOI: 10.1126/science.1107679.
- Mota, Luís Jaime; Sorg, Isabel; Cornelis, Guy R. (2005b): Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. In: *FEMS microbiology letters* 252 (1), S. 1–10. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.08.036.
- Mueller, C. A.; Broz, P.; Cornelis, G. R. (2008): The type III secretion system tip complex and translocon. In: *Molecular microbiology* 68 (5), S. 1085–1095. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06237.x.
- Mueller, Catherine A.; Broz, Petr; Müller, Shirley A.; Ringler, Philippe; Erne-Brand, Françoise; Sorg, Isabel et al. (2005): The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectosome needles. In: *Science (New York, N.Y.)* 310 (5748), S. 674–676. DOI: 10.1126/science.1118476.
- Mühlenkamp, Melanie; Oberhettinger, Philipp; Leo, Jack C.; Linke, Dirk; Schütz, Monika S. (2015): *Yersinia* adhesin A (YadA)—beauty & beast. In: *International journal of medical microbiology: IJMM* 305 (2), S. 252–258. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.12.008.
- Mühlenkamp, Melanie C.; Hallström, Teresia; Autenrieth, Ingo B.; Bohn, Erwin; Linke, Dirk; Rinker, Janina et al. (2017): Vitronectin Binds to a Specific Stretch within the Head Region of *Yersinia* Adhesin A and Thereby Modulates *Yersinia enterocolitica* Host Interaction. In: *Journal of innate immunity* 9 (1), S. 33–51. DOI: 10.1159/000449200.
- Mukherjee, Sohini; Keitany, Gladys; Li, Yan; Wang, Yong; Ball, Haydn L.; Goldsmith, Elizabeth J.; Orth, Kim (2006): *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. In: *Science (New York, N.Y.)* 312 (5777), S. 1211–1214. DOI: 10.1126/science.1126867.
- Mulder, B.; Michiels, T.; Simonet, M.; Sory, M. P.; Cornelis, G. (1989): Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. In: *Infection and Immunity* 57 (8), S. 2534–2541.
- Nakajima, R.; Brubaker, R. R. (1993): Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. In: *Infection and Immunity* 61 (1), S. 23–31.

- Nauth, Theresa; Huschka, Franziska; Schweizer, Michaela; Bosse, Jens B.; Diepold, Andreas; Failla, Antonio Virgilio et al. (2018): Visualization of translocons in *Yersinia* type III protein secretion machines during host cell infection. In: *PLoS Pathogens* 14 (12), e1007527. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007527.
- Nedialkov, Y. A.; Motin, V. L.; Brubaker, R. R. (1997): Resistance to lipopolysaccharide mediated by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10. In: *Infection and Immunity* 65 (4), S. 1196–1203.
- Neyt, C.; 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. In: *Molecular microbiology* 33 (5), S. 971–981.
- Neyt, C.; Cornelis, G. R. (1999b): Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. In: *Molecular microbiology* 31 (1), S. 143–156.
- Nguyen, L.; Paulsen, I. T.; Tchieu, J.; Hueck, C. J.; Saier, M. H. (2000): Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. In: *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2 (2), S. 125–144.
- Nilles, M. L.; Fields, K. A.; 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. In: *Journal of bacteriology* 180 (13), S. 3410–3420.
- Nilles, M. L.; Williams, A. W.; Skrzypek, E.; Straley, S. C. (1997): *Yersinia pestis* LcrV forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low-Ca<sup>2+</sup> response. In: *Journal of bacteriology* 179 (4), S. 1307–1316.
- Nordfelth, R.; Wolf-Watz, H. (2001): YopB of *Yersinia enterocolitica* is essential for YopE translocation. In: *Infection and Immunity* 69 (5), S. 3516–3518. DOI: 10.1128/IAI.69.5.3516-3518.2001.
- Notti, Ryan Q.; Bhattacharya, Shibani; Lilic, Mirjana; Stebbins, C. Erec (2015): A common assembly module in injectisome and flagellar type III secretion sorting platforms. In: *Nature communications* 6, S. 7125. DOI: 10.1038/ncomms8125.
- O'Connell, Colin B.; Creasey, Elizabeth A.; Knutton, Stuart; Elliott, Simon; Crowther, Lynette J.; Luo, Wensheng et al. (2004): SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD. In: *Molecular microbiology* 52 (6), S. 1613–1625. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04101.x.

- Oellerich, Mark F.; Jacobi, Christoph A.; Freund, Sandra; Niedung, Katy; Bach, Alexandra; Heesemann, Jürgen; Trülsch, Konrad (2007): *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. In: *Infection and Immunity* 75 (8), S. 3802–3811. DOI: 10.1128/IAI.00419-07.
- Olive, Andrew J.; Kenjale, Roma; Espina, Marianela; Moore, David S.; Picking, Wendy L.; Picking, William 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  $\nabla$ . In: *Infection and Immunity* 75 (5), S. 2626–2629. DOI: 10.1128/IAI.01599-06.
- Olsson, Jan; Edqvist, Petra J.; Bröms, Jeanette E.; Forsberg, Ake; Wolf-Watz, Hans; Francis, Matthew S. (2004): The YopD translocator of *Yersinia pseudotuberculosis* is a multifunctional protein comprised of discrete domains. In: *Journal of bacteriology* 186 (13), S. 4110–4123. DOI: 10.1128/JB.186.13.4110-4123.2004.
- Orth, K.; Palmer, L. E.; Bao, Z. Q.; Stewart, S.; Rudolph, A. E.; Bliska, J. B.; Dixon, J. E. (1999): Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 285 (5435), S. 1920–1923.
- Orth, K.; Xu, Z.; Mudgett, M. B.; Bao, Z. Q.; Palmer, L. E.; Bliska, J. B. et al. (2000): Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 290 (5496), S. 1594–1597.
- Osiecki, J. C.; Barker, J.; Picking, W. L.; Serfis, A. B.; Berring, E.; Shah, S. et al. (2001): IpaC from *Shigella* and SipC from *Salmonella* possess similar biochemical properties but are functionally distinct. In: *Molecular microbiology* 42 (2), S. 469–481.
- Overheim, Katie A.; DePaolo, R. William; DeBord, Kristin L.; Morrin, Elizabeth M.; Anderson, Debra M.; Green, Nathaniel M. et al. (2005): LcrV plague vaccine with altered immunomodulatory properties. In: *Infection and Immunity* 73 (8), S. 5152–5159. DOI: 10.1128/IAI.73.8.5152-5159.2005.
- Pai, C. H.; Mors, V. (1978): Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. In: *Infection and Immunity* 19 (3), S. 908–911.
- Park, Donghyun; Lara-Tejero, Maria; Galan, Jorge E.; Li, Wenwei; Waxham, M. Neal; Hu, Bo; Liu, Jun (2018): Visualization of the type III secretion mediated *Salmonella* -host cell interface using cryo-electron tomography.
- Parkhill, J.; Wren, B. W.; Thomson, N. R.; Titball, R. W.; Holden, M. T.; Prentice, M. B. et al. (2001): Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. In: *Nature* 413 (6855), S. 523–527. DOI: 10.1038/35097083.

- Parsot, C.; Ménard, R.; Gounon, P.; Sansonetti, P. J. (1995): Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. In: *Molecular microbiology* 16 (2), S. 291–300.
- Pawel-Rammingen, U. von; Telepnev, M. V.; Schmidt, G.; Aktories, K.; Wolf-Watz, H.; Rosqvist, R. (2000): GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. In: *Molecular microbiology* 36 (3), S. 737–748.
- Payne, P. L.; Straley, S. C. (1999): YscP of *Yersinia pestis* is a secreted component of the Yop secretion system. In: *Journal of bacteriology* 181 (9), S. 2852–2862.
- Pepe, J. C.; Miller, V. L. (1993): *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (14), S. 6473–6477.
- Pepe, J. C.; Wachtel, M. R.; Wagar, E.; Miller, V. L. (1995): Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. In: *Infection and Immunity* 63 (12), S. 4837–4848.
- Persson, C.; Nordfelth, R.; Andersson, K.; Forsberg, A.; Wolf-Watz, H.; Fällman, M. (1999): Localization of the *Yersinia* PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. In: *Molecular microbiology* 33 (4), S. 828–838.
- Persson, C.; Nordfelth, R.; Holmström, A.; Håkansson, S.; Rosqvist, R.; Wolf-Watz, H. (1995): Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. In: *Molecular microbiology* 18 (1), S. 135–150.
- Pettersson, J.; Holmström, A.; Hill, J.; Leary, S.; Frithz-Lindsten, E.; Euler-Matell, A. von et al. (1999): The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. In: *Molecular microbiology* 32 (5), S. 961–976.
- Pha, Khavong; Navarro, Lorena (2016): *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. In: *World journal of biological chemistry* 7 (1), S. 1–13. DOI: 10.4331/wjbc.v7.i1.1.
- Phan, Jason; Lee, Kyeong; Cherry, Scott; Tropea, Joseph E.; Burke, Terrence R.; Waugh, David S. (2003): High-resolution structure of the *Yersinia pestis* protein tyrosine phosphatase YopH in complex with a phosphotyrosyl mimetic-containing hexapeptide. In: *Biochemistry* 42 (45), S. 13113–13121. DOI: 10.1021/bi030156m.
- Picking, Wendy L.; Nishioka, Hiroaki; Hearn, Patricia D.; Baxter, M. Aaron; Harrington, Amanda T.; Blocker, Ariel; Picking, William 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. In: *Infection and Immunity* 73 (3), S. 1432–1440. DOI: 10.1128/IAI.73.3.1432-1440.2005.
- Pierson, D. E.; Falkow, S. (1993): The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. In: *Infection and Immunity* 61 (5), S. 1846–1852.
- Pilz, D.; Vocke, T.; Heesemann, J.; Brade, V. (1992): Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. In: *Infection and Immunity* 60 (1), S. 189–195.
- Pizarro-Cerdá, Javier; Cossart, Pascale (2004): Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens. In: *Nature Cell Biology* 6 (11), S. 1026. DOI: 10.1038/ncb1104-1026.
- Pizarro-Cerdá, Javier; Kühbacher, Andreas; Cossart, Pascale (2015): Phosphoinositides and host-pathogen interactions. In: *Biochimica et biophysica acta* 1851 (6), S. 911–918. DOI: 10.1016/j.bbali.2014.09.011.
- Plano, Gregory V.; Schesser, Kurt (2013): The *Yersinia pestis* type III secretion system: expression, assembly and role in the evasion of host defenses. In: *Immunologic research* 57 (1-3), S. 237–245. DOI: 10.1007/s12026-013-8454-3.
- Popoff, Michel R. (2014): Bacterial factors exploit eukaryotic Rho GTPase signaling cascades to promote invasion and proliferation within their host. In: *Small GTPases* 5. DOI: 10.4161/sgtp.28209.
- Porat-Shliom, Natalie; Kloog, Yoel; Donaldson, Julie G. (2008): A unique platform for H-Ras signaling involving clathrin-independent endocytosis. In: *Molecular biology of the cell* 19 (3), S. 765–775. DOI: 10.1091/mbc.e07-08-0841.
- Portaliou, Athina G.; Tsolis, Konstantinos C.; Loos, Maria S.; Zorzini, Valentina; Economou, Anastassios (2016): Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. In: *Trends in biochemical sciences* 41 (2), S. 175–189. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.09.005.
- Prehna, Gerd; Ivanov, Maya I.; Bliska, James B.; Stebbins, C. Erec (2006): *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. In: *Cell* 126 (5), S. 869–880. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.056.
- Price, S. B.; Leung, K. Y.; Barve, S. S.; Straley, S. C. (1989): Molecular analysis of IcrGVH, the V antigen operon of *Yersinia pestis*. In: *Journal of bacteriology* 171 (10), S. 5646–5653.
- Pujol, Céline; Bliska, James B. (2003): The Ability To Replicate in Macrophages Is Conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Infection and Immunity* 71 (10), S. 5892–5899. DOI: 10.1128/IAI.71.10.5892-5899.2003.

- Pujol, Céline; Bliska, James B. (2005): Turning Yersinia pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 114 (3), S. 216–226. DOI: 10.1016/j.clim.2004.07.013.
- Quenee, Lauriane E.; Berube, Bryan J.; Segal, Joshua; Elli, Derek; Ciletti, Nancy A.; Anderson, Deborah; Schneewind, Olaf (2010): Amino acid residues 196-225 of LcrV represent a plague protective epitope. In: *Vaccine* 28 (7), S. 1870–1876. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.11.076.
- Radics, Julia; Königsmaier, Lisa; Marlovits, Thomas C. (2014): Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. In: *Nature structural & molecular biology* 21 (1), S. 82–87. DOI: 10.1038/nsmb.2722.
- Rameh, L. E.; Tolia, K. F.; Duckworth, B. C.; Cantley, L. C. (1997): A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. In: *Nature* 390 (6656), S. 192–196. DOI: 10.1038/36621.
- Rebeil, Roberto; Ernst, Robert K.; Gowen, Brian B.; Miller, Samuel I.; Hinnebusch, B. Joseph (2004): Variation in lipid A structure in the pathogenic yersiniae. In: *Molecular microbiology* 52 (5), S. 1363–1373. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04059.x.
- Riordan, Kelly E.; Schneewind, Olaf (2008): YscU cleavage and the assembly of Yersinia type III secretion machine complexes. In: *Molecular microbiology* 68 (6), S. 1485–1501. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06247.x.
- Riordan, Kelly E.; Sorg, Joseph A.; Berube, Bryan J.; Schneewind, Olaf (2008): Impassable YscP substrates and their impact on the Yersinia enterocolitica type III secretion pathway. In: *Journal of bacteriology* 190 (18), S. 6204–6216. DOI: 10.1128/JB.00467-08.
- Roblin, Pierre; Dewitte, Frédérique; Villeret, Vincent; Biondi, Emanuele G.; Bompard, Coralie (2015): A Salmonella type three secretion effector/chaperone complex adopts a hexameric ring-like structure. In: *Journal of bacteriology* 197 (4), S. 688–698. DOI: 10.1128/JB.02294-14.
- Romano, Fabian B.; Tang, Yuzhou; Rossi, Kyle C.; Monopoli, Kathryn R.; Ross, Jennifer L.; Heuck, Alejandro P. (2016): Type 3 Secretion Translocators Spontaneously Assemble a Hexadecameric Transmembrane Complex. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (12), S. 6304–6315. DOI: 10.1074/jbc.M115.681031.
- Roppenser, Bernhard; Röder, Anja; Hentschke, Moritz; Ruckdeschel, Klaus; Aepfelbacher, Martin (2009): Yersinia enterocolitica differentially modulates RhoG activity in host cells. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 5), S. 696–705. DOI: 10.1242/jcs.040345.
- Rosenshine, I.; Duronio, V.; Finlay, B. B. (1992): Tyrosine protein kinase inhibitors block invasion-promoted bacterial uptake by epithelial cells. In: *Infection and Immunity* 60 (6), S. 2211–2217.

- Rosner, Bettina M.; Stark, Klaus; Werber, Dirk (2010): Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. In: *BMC public health* 10, S. 337. DOI: 10.1186/1471-2458-10-337.
- Rosqvist, R.; Forsberg, Å.; Rimpiläinen, M.; Bergman, T.; Wolf-Watz, H. (1990): The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. In: *Molecular microbiology* 4 (4), S. 657–667. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00635.x.
- Rosqvist, R.; Magnusson, K. E.; Wolf-Watz, H. (1994): Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. In: *The EMBO journal* 13 (4), S. 964–972.
- Rosqvist, R.; Persson, C.; Håkansson, S.; Nordfeldt, R.; Wolf-Watz, H. (1995): Translocation of the *Yersinia* YopE and YopH virulence proteins into target cells is mediated by YopB and YopD. In: *Contributions to microbiology and immunology* 13, S. 230–234.
- Ross, Julia A.; Plano, Gregory V. (2011): A C-terminal region of *Yersinia pestis* YscD binds the outer membrane secretin YscC. In: *Journal of bacteriology* 193 (9), S. 2276–2289. DOI: 10.1128/JB.01137-10.
- Roth, Michael G. (2004): Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. In: *Physiological reviews* 84 (3), S. 699–730. DOI: 10.1152/physrev.00033.2003.
- Rouvroit, C. Lambert de; Sluiter, C.; Cornelis, G. R. (1992): Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. In: *Molecular microbiology* 6 (3), S. 395–409. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01483.x.
- Ruckdeschel, K.; Harb, S.; Roggenkamp, A.; Hornef, M.; Zumbihl, R.; Köhler, S. et al. (1998): *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. In: *The Journal of experimental medicine* 187 (7), S. 1069–1079.
- Ruckdeschel, K.; Roggenkamp, A.; Lafont, V.; Mangeat, P.; Heesemann, J.; Rouot, B. (1997): Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. In: *Infection and Immunity* 65 (11), S. 4813–4821.
- Ruckdeschel, Klaus; Pfaffinger, Gudrun; Trülzsch, Konrad; Zenner, Gerhardt; Richter, Kathleen; Heesemann, Jürgen; Aepfelbacher, Martin (2006): The proteasome pathway destabilizes *Yersinia* outer protein E and represses its antihost cell activities. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (10), S. 6093–6102.

- Russo, Brian C.; Stamm, Luisa M.; Raaben, Matthijs; Kim, Caleb M.; Kahoud, Emily; Robinson, Lindsey R. et al. (2016): Intermediate filaments enable pathogen docking to trigger type 3 effector translocation. In: *Nature microbiology* 1, S. 16025. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.25.
- Ryndak, Michelle B.; Chung, Hachung; London, Erwin; Bliska, James B. (2005): Role of predicted transmembrane domains for type III translocation, pore formation, and signaling by the *Yersinia pseudotuberculosis* YopB protein. In: *Infection and Immunity* 73 (4), S. 2433–2443. DOI: 10.1128/IAI.73.4.2433-2443.2005.
- Sabina, Yeasmin; Rahman, Atiqur; Ray, Ramesh Chandra; Montet, Didier (2011): *Yersinia enterocolitica*: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection. In: *Journal of pathogens* 2011, S. 429069. DOI: 10.4061/2011/429069.
- Saier, Milton H. (2004): Evolution of bacterial type III protein secretion systems. In: *Trends in microbiology* 12 (3), S. 113–115. DOI: 10.1016/j.tim.2004.01.003.
- Sal-Man, Neta; Deng, Wanyin; Finlay, B. Brett (2012): Escl: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*. In: *The Biochemical journal* 442 (1), S. 119–125. DOI: 10.1042/BJ20111620.
- Sample, A. K.; Fowler, J. M.; Brubaker, R. R. (1987): Modulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis* via plasmid-plasmid interaction. In: *Microbial Pathogenesis* 2 (6), S. 443–453.
- Sani, Musa; Botteaux, Anne; Parsot, Claude; Sansonetti, Philippe; Boekema, Egbert J.; Allaoui, Abdelmounaïm (2007): IpaD is localized at the tip of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. In: *Biochimica et biophysica acta* 1770 (2), S. 307–311. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.10.007.
- Sarantis, Helen; Balkin, Daniel M.; Camilli, Pietro de; Isberg, Ralph R.; Brumell, John H.; Grinstein, Sergio (2012): *Yersinia* entry into host cells requires Rab5-dependent dephosphorylation of PI(4,5)P<sub>2</sub> and membrane scission. In: *Cell host & microbe* 11 (2), S. 117–128. DOI: 10.1016/j.chom.2012.01.010.
- Sarantis, Helen; Grinstein, Sergio (2012): Subversion of phagocytosis for pathogen survival. In: *Cell host & microbe* 12 (4), S. 419–431. DOI: 10.1016/j.chom.2012.09.001.
- Sarker, M. R.; Neyt, C.; Stainier, I.; Cornelis, G. R. (1998): The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. In: *Journal of bacteriology* 180 (5), S. 1207–1214.
- Sauvonnet, Nathalie; Lambermont, Isabelle; van der Bruggen, Pierre; Cornelis, Guy R. (2002): YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation

through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. In: *Molecular microbiology* 45 (3), S. 805–815.

Sawa, Teiji; Katoh, Hideya; Yasumoto, Hiroaki (2014): V-antigen homologs in pathogenic gram-negative bacteria. In: *Microbiology and immunology* 58 (5), S. 267–285. DOI: 10.1111/1348-0421.12147.

Schermelleh, Lothar; Carlton, Peter M.; Haase, Sebastian; Shao, Lin; Winoto, Lukman; Kner, Peter et al. (2008): Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. In: *Science (New York, N.Y.)* 320 (5881), S. 1332–1336. DOI: 10.1126/science.1156947.

Schermelleh, Lothar; Heintzmann, Rainer; Leonhardt, Heinrich (2010): A guide to super-resolution fluorescence microscopy. In: *The Journal of cell biology* 190 (2), S. 165–175. DOI: 10.1083/jcb.201002018.

Schesser, K.; Spiik, A. K.; Dukuzumuremyi, J. M.; Neurath, M. F.; Pettersson, S.; 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. In: *Molecular microbiology* 28 (6), S. 1067–1079.

Schiano, Chelsea A.; Lathem, Wyndham W. (2012): Post-transcriptional regulation of gene expression in *Yersinia* species. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, S. 129. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00129.

Schlumberger, Markus C.; Müller, Andreas J.; Ehrbar, Kristin; Winnen, Brit; Duss, Iwan; Stecher, Bärbel; Hardt, Wolf-Dietrich (2005): Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (35), S. 12548–12553. DOI: 10.1073/pnas.0503407102.

Schmid, Yvonne; Grassl, Guntram A.; Bühler, Oliver T.; Skurnik, Mikael; Autenrieth, Ingo B.; Bohn, Erwin (2004): *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. In: *Infection and Immunity* 72 (12), S. 6780–6789. DOI: 10.1128/IAI.72.12.6780-6789.2004.

Schoehn, Guy; Di Guilmi, Anne Marie; Lemaire, David; Attree, Ina; Weissenhorn, Winfried; Dessen, Andréa (2003): Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. In: *The EMBO journal* 22 (19), S. 4957–4967. DOI: 10.1093/emboj/cdg499.

Schubot, Florian D.; Jackson, Michael W.; Penrose, Kerri J.; Cherry, Scott; Tropea, Joseph E.; Plano, Gregory V.; Waugh, David S. (2005): Three-dimensional structure of a macromolecular assembly

- that regulates type III secretion in *Yersinia pestis*. In: *Journal of molecular biology* 346 (4), S. 1147–1161. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.12.036.
- Schulte, R.; Zumbihl, R.; Kampik, D.; Fauconnier, A.; Autenrieth, I. B. (1998): Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. In: *Medical microbiology and immunology* 187 (1), S. 53–60.
- Shao, Feng; Merritt, Peter M.; Bao, Zhaoqin; Innes, Roger W.; Dixon, Jack E. (2002): A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. In: *Cell* 109 (5), S. 575–588.
- Shao, Feng; Vacratsis, Panayiotis O.; Bao, Zhaoqin; Bowers, Katherine E.; Fierke, Carol A.; Dixon, Jack E. (2003): Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (3), S. 904–909. DOI: 10.1073/pnas.252770599.
- Shaw, R. K.; Daniell, S.; Ebel, F.; Frankel, G.; Knutton, S. (2001): EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. In: *Cellular microbiology* 3 (4), S. 213–222.
- Shayegani, M.; DeForge, I.; McGlynn, D. M.; Root, T. (1981): Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal, and environmental sources. In: *Journal of clinical microbiology* 14 (3), S. 304–312.
- Sheahan, Kerri-Lynn; Isberg, Ralph R. (2015): Identification of mammalian proteins that collaborate with type III secretion system function: involvement of a chemokine receptor in supporting translocon activity. In: *mBio* 6 (1), e02023-14. DOI: 10.1128/mBio.02023-14.
- Shin, Hwain; Cornelis, Guy R. (2007): Type III secretion translocation pores of *Yersinia enterocolitica* trigger maturation and release of pro-inflammatory IL-1 $\beta$ . In: *Cellular microbiology* 9 (12), S. 2893–2902. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01004.x.
- Slot, Jan W.; Geuze, Hans J. (2007): Cryosectioning and immunolabeling. In: *Nature protocols* 2 (10), S. 2480–2491. DOI: 10.1038/nprot.2007.365.
- Song, Yajun; Tong, Zongzhong; Wang, Jin; Wang, Li; Guo, Zhaobiao; Han, Yanpin et al. (2004): Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 11 (3), S. 179–197.
- Sorg, Isabel; Wagner, Stefanie; Amstutz, Marlise; Müller, Shirley A.; Broz, Petr; Lussi, Yvonne et al. (2007): YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. In: *The EMBO journal* 26 (12), S. 3015–3024. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601731.

- Sorg, Joseph A.; Blaylock, Bill; Schneewind, Olaf (2006): Secretion signal recognition by YscN, the Yersinia type III secretion ATPase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (44), S. 16490–16495. DOI: 10.1073/pnas.0605974103.
- Sory, M. P.; Cornelis, G. R. (1994): Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from Yersinia enterocolitica into HeLa cells. In: *Molecular microbiology* 14 (3), S. 583–594.
- Spreter, Thomas; Yip, Calvin K.; Sanowar, Sarah; André, Ingemar; Kimbrough, Tyler G.; Vuckovic, Marija et al. (2009): A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. In: *Nature structural & molecular biology* 16 (5), S. 468–476. DOI: 10.1038/nsmb.1603.
- Stainier, I.; Bleves, S.; Josenhans, C.; Karmani, L.; Kerbourn, C.; Lambermont, I. et al. (2000): YscP, a Yersinia protein required for Yop secretion that is surface exposed, and released in low Ca<sup>2+</sup>. In: *Molecular microbiology* 37 (5), S. 1005–1018.
- Stensrud, Kenneth F.; Adam, Philip R.; La Mar, Cassandra D.; Olive, Andrew J.; Lushington, Gerald H.; Sudharsan, Raghavi et al. (2008): Deoxycholate Interacts with IpaD of Shigella flexneri in Inducing the Recruitment of IpaB to the Type III Secretion Apparatus Needle Tip<sup>†</sup>. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (27), S. 18646–18654. DOI: 10.1074/jbc.M802799200.
- Straley, S. C.; Bowmer, W. S. (1986): Virulence genes regulated at the transcriptional level by Ca<sup>2+</sup> in Yersinia pestis include structural genes for outer membrane proteins. In: *Infection and Immunity* 51 (2), S. 445–454.
- Straley, S. C.; Brubaker, R. R. (1981): Cytoplasmic and membrane proteins of yersiniae cultivated under conditions simulating mammalian intracellular environment. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (2), S. 1224–1228.
- Straley, S. C.; Cibull, M. L. (1989): Differential clearance and host-pathogen interactions of YopE- and YopK- YopL- Yersinia pestis in BALB/c mice. In: *Infection and Immunity* 57 (4), S. 1200–1210.
- Straley, S. C.; Plano, G. V.; Skrzypek, E.; Haddix, P. L.; Fields, K. A. (1993): Regulation by Ca<sup>2+</sup> in the Yersinia low-Ca<sup>2+</sup> response. In: *Molecular microbiology* 8 (6), S. 1005–1010.
- Sukhan, Anand; Kubori, Tomoko; Galán, Jorge E. (2003): Synthesis and localization of the Salmonella SPI-1 type III secretion needle complex proteins PrgI and PrgJ. In: *Journal of bacteriology* 185 (11), S. 3480–3483.
- Sun, Jin-Peng; Wu, Li; Fedorov, Alexander A.; Almo, Steven C.; Zhang, Zhong-Yin (2003): Crystal structure of the Yersinia protein-tyrosine phosphatase YopH complexed with a specific small

- molecule inhibitor. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (35), S. 33392–33399. DOI: 10.1074/jbc.M304693200.
- Sundin, Charlotta; Thelaus, Johanna; Bröms, Jeanette E.; Forsberg, Ake (2004): Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PcrG, PcrV and PopN. In: *Microbial Pathogenesis* 37 (6), S. 313–322. DOI: 10.1016/j.micpath.2004.10.005.
- Tabrizi, S. N.; Robins-Browne, R. M. (1992): Influence of a 70 kilobase virulence plasmid on the ability of *Yersinia enterocolitica* to survive phagocytosis in vitro. In: *Microbial Pathogenesis* 13 (3), S. 171–179.
- Takao, T.; Tominaga, N.; Shimonishi, Y.; Hara, S.; Inoue, T.; Miyama, A. (1984): Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. In: *Biochemical and biophysical research communications* 125 (3), S. 845–851.
- Takenawa, T.; Miki, H. (2001): WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. In: *Journal of cell science* 114 (Pt 10), S. 1801–1809.
- Tejeda-Dominguez, Farid; Huerta-Cantillo, Jazmin; Chavez-Dueñas, Lucia; Navarro-Garcia, Fernando (2017): A Novel Mechanism for Protein Delivery by the Type 3 Secretion System for Extracellularly Secreted Proteins. In: *mBio* 8 (2). DOI: 10.1128/mBio.00184-17.
- Tengel, Tobias; Sethson, Ingmar; Francis, Matthew S. (2002): Conformational analysis by CD and NMR spectroscopy of a peptide encompassing the amphipathic domain of YopD from *Yersinia*. In: *European journal of biochemistry* 269 (15), S. 3659–3668.
- Thinwa, Josephine; Segovia, Jesus A.; Bose, Santanu; Dube, Peter H. (2014): Integrin-mediated first signal for inflammasome activation in intestinal epithelial cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (3), S. 1373–1382. DOI: 10.4049/jimmunol.1400145.
- Thorslund, Sara E.; Edgren, Tomas; Pettersson, Jonas; Nordfelth, Roland; Sellin, Mikael E.; Ivanova, Ekaterina et al. (2011): The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with *Yersinia pseudotuberculosis* virulence function. In: *PloS one* 6 (2), e16784. DOI: 10.1371/journal.pone.0016784.
- Tinevez, Jean-Yves; Perry, Nick; Schindelin, Johannes; Hoopes, Genevieve M.; Reynolds, Gregory D.; Laplantine, Emmanuel et al. (2017): TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. In: *Methods* 115, S. 80–90. DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.09.016.

- Tipple, M. A.; Bland, L. A.; Murphy, J. J.; Arduino, M. J.; Panlilio, A. L.; Farmer, J. J. et al. (1990): Sepsis associated with transfusion of red cells contaminated with *Yersinia enterocolitica*. In: *Transfusion* 30 (3), S. 207–213.
- Tolias, K. F.; Hartwig, J. H.; Ishihara, H.; Shibasaki, Y.; Cantley, L. C.; Carpenter, C. L. (2000): Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. In: *Current biology : CB* 10 (3), S. 153–156.
- Tomalka, Amanda G.; Stopford, Charles M.; Lee, Pei-Chung; Rietsch, Arne (2012): A translocator-specific export signal establishes the translocator-effector secretion hierarchy that is important for type III secretion system function. In: *Molecular microbiology* 86 (6), S. 1464–1481. DOI: 10.1111/mmi.12069.
- Trasak, Claudia; Zenner, Gerhardt; Vogel, Annette; Yüksekdag, Gülnihal; Rost, René; Haase, Ilka et al. (2007): *Yersinia* protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (4), S. 2268–2277. DOI: 10.1074/jbc.M610071200.
- Treille, Georges-Félix; Yersin, Alexandre: La peste bubonique à Hong Kong. In: *La Peste*, S. 310–311. Online verfügbar unter <https://hal-pasteur.archives-ouvertes.fr/pasteur-00442093/document>, zuletzt geprüft am 18.12.2009.
- Troisfontaines, Paul; Cornelis, Guy R. (2005): Type III secretion: more systems than you think. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 20, S. 326–339. DOI: 10.1152/physiol.00011.2005.
- Trosky, Jennifer E.; Liverman, Amy D. B.; Orth, Kim (2008): *Yersinia* outer proteins: Yops. In: *Cellular microbiology* 10 (3), S. 557–565. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01109.x.
- Trulzsch, K.; Sporleder, T.; Igwe, E. I.; Russmann, H.; Heesemann, J. (2004): Contribution of the Major Secreted Yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to Pathogenicity in the Mouse Infection Model. In: *Infection and Immunity* 72 (9), S. 5227–5234. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5227-5234.2004.
- Tseng, Tsai-Tien; Tyler, Brett M.; Setubal, João C. (2009): Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. In: *BMC microbiology* 9 Suppl 1, S2. DOI: 10.1186/1471-2180-9-S1-S2.
- Tsukano, H.; Kura, F.; Inoue, S.; Sato, S.; Izumiya, H.; Yasuda, T.; Watanabe, H. (1999): *Yersinia pseudotuberculosis* blocks the phagosomal acidification of B10.A mouse macrophages through the inhibition of vacuolar H(+)-ATPase activity. In: *Microbial Pathogenesis* 27 (4), S. 253–263. DOI: 10.1006/mpat.1999.0303.
- Uliczka, Frank; Pisano, Fabio; Schaake, Julia; Stolz, Tatjana; Rohde, Manfred; Fruth, Angelika et al. (2011): Unique cell adhesion and invasion properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the most

- frequent cause of human Yersiniosis. In: *PLoS Pathogens* 7 (7), e1002117. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002117.
- Une, T. (1977): Studies on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica*. II. Interaction with cultured cells in vitro. In: *Microbiology and immunology* 21 (7), S. 365–377.
- Vallis, Amy J.; Yahr, Timothy L.; Barbieri, Joseph T.; Frank, Dara W. (1999): Regulation of ExoS Production and Secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in Response to Tissue Culture Conditions. In: *Infection and Immunity* 67 (2), S. 914–920.
- van Aelst, L.; D'Souza-Schorey, C. (1997): Rho GTPases and signaling networks. In: *Genes & development* 11 (18), S. 2295–2322.
- van Nguyen, Sang; Jobichen, Chacko; Tan, Kang Wei; Tan, Yih Wan; Chan, Siew Leong; Ramesh, Karthik et al. (2015): Structure of AcrH-AopB Chaperone-Translocator Complex Reveals a Role for Membrane Hairpins in Type III Secretion System Translocon Assembly. In: *Structure (London, England : 1993)* 23 (11), S. 2022–2031. DOI: 10.1016/j.str.2015.08.014.
- van Nhieu, G. T.; 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. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (36), S. 24367–24375.
- van Pelt, W.; Wit, M. A. S. de; Wannet, W. J. B.; Ligtvoet, E. J. J.; Widdowson, M. A.; van Duynhoven, Y. T. H. P. (2003): Laboratory surveillance of bacterial gastroenteric pathogens in The Netherlands, 1991-2001. In: *Epidemiology and Infection* 130 (3), S. 431–441.
- Veiga, Esteban; Guttman, Julian A.; Bonazzi, Matteo; Boucrot, Emmanuel; Toledo-Arana, Alejandro; Lin, Ann E. et al. (2007): Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. In: *Cell host & microbe* 2 (5), S. 340–351. DOI: 10.1016/j.chom.2007.10.001.
- Viboud, G. I.; Bliska, J. B. (2001): A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. In: *The EMBO journal* 20 (19), S. 5373–5382. DOI: 10.1093/emboj/20.19.5373.
- Viboud, Gloria I.; Bliska, James B. (2005): *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. In: *Annual review of microbiology* 59, S. 69–89. DOI: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121320.
- Viboud, Gloria I.; Mejía, Edison; Bliska, James B. (2006): Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. In: *Cellular microbiology* 8 (9), S. 1504–1515. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00729.x.

- Viboud, Gloria I.; So, Stephane Shu Kin; Ryndak, Michelle B.; Bliska, James B. (2003): Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Molecular microbiology* 47 (5), S. 1305–1315.
- Wagner, Samuel; Grin, Iwan; Malmshemer, Silke; Singh, Nidhi; Torres-Vargas, Claudia E.; Westerhausen, Sibel (2018): Bacterial type III secretion systems: A complex device for delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. In: *FEMS microbiology letters*. DOI: 10.1093/femsle/fny201.
- Wagner, Samuel; Königsmäier, Lisa; Lara-Tejero, María; Lefebvre, Matthew; Marlovits, Thomas C.; Galán, Jorge E. (2010): Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (41), S. 17745–17750. DOI: 10.1073/pnas.1008053107.
- Wang, He; Avican, Kemal; Fahlgren, Anna; Erttmann, Saskia F.; Nuss, Aaron M.; Dersch, Petra et al. (2016): Increased plasmid copy number is essential for *Yersinia* T3SS function and virulence. In: *Science (New York, N.Y.)* 353 (6298), S. 492–495. DOI: 10.1126/science.aaf7501.
- Wang, Shixia; Heilman, Destin; Liu, Fangjun; Giehl, Theodore; Joshi, Swati; Huang, Xiaoyun et al. (2004): A DNA vaccine producing LcrV antigen in oligomers is effective in protecting mice from lethal mucosal challenge of plague. In: *Vaccine* 22 (25-26), S. 3348–3357. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.02.036.
- Watarai, M.; Tobe, T.; Yoshikawa, M.; Sasakawa, C. (1995): Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness. In: *The EMBO journal* 14 (11), S. 2461–2470.
- Wattiau, P.; Bernier, B.; Deslée, P.; Michiels, T.; Cornelis, G. R. (1994): Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (22), S. 10493–10497.
- Wauters, G.; Kandolo, K.; Janssens, M. (1987): Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. In: *Contributions to microbiology and immunology* 9, S. 14–21.
- Welkos, S.; Friedlander, A.; McDowell, D.; Weeks, J.; Tobery, S. (1998): V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. In: *Microbial Pathogenesis* 24 (3), S. 185–196. DOI: 10.1006/mpat.1997.0188.

- Wiedemann, A.; Linder, S.; Grassl, G.; Albert, M.; Autenrieth, I.; Aepfelbacher, M. (2001): Yersinia enterocolitica invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. In: *Cellular microbiology* 3 (10), S. 693–702.
- Wilharm, Gottfried; Lehmann, Verena; Krauss, Kristina; Lehnert, Beatrix; Richter, Susanna; Ruckdeschel, Klaus et al. (2004): Yersinia enterocolitica type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. In: *Infection and Immunity* 72 (7), S. 4004–4009. DOI: 10.1128/IAI.72.7.4004-4009.2004.
- Wolters, Manuel; Boyle, Erin C.; Lardong, Kerstin; Trülzsch, Konrad; Steffen, Anika; Rottner, Klemens et al. (2013): Cytotoxic necrotizing factor-Y boosts Yersinia effector translocation by activating Rac protein. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (32), S. 23543–23553. DOI: 10.1074/jbc.M112.448662.
- Wong, Ka-Wing; Isberg, Ralph R. (2003): Arf6 and phosphoinositol-4-phosphate-5-kinase activities permit bypass of the Rac1 requirement for beta1 integrin-mediated bacterial uptake. In: *The Journal of experimental medicine* 198 (4), S. 603–614. DOI: 10.1084/jem.20021363.
- Wong, Ka-Wing; Isberg, Ralph R. (2005): Emerging views on integrin signaling via Rac1 during invasin-promoted bacterial uptake. In: *Current opinion in microbiology* 8 (1), S. 4–9. DOI: 10.1016/j.mib.2004.12.009.
- Wong, Ka-Wing; Mohammadi, Sina; Isberg, Ralph R. (2008): The polybasic region of Rac1 modulates bacterial uptake independently of self-association and membrane targeting. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (51), S. 35954–35965. DOI: 10.1074/jbc.M804717200.
- Wood, Sarah E.; Jin, Jin; Lloyd, Scott 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. In: *Journal of bacteriology* 190 (12), S. 4252–4262. DOI: 10.1128/JB.00328-08.
- Wren, Brendan W. (2003): The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. In: *Nature reviews. Microbiology* 1 (1), S. 55–64. DOI: 10.1038/nrmicro730.
- Yamamoto, T.; Hanawa, T.; Ogata, S.; Kamiya, S. (1996): Identification and characterization of the Yersinia enterocolitica gsrA gene, which protectively responds to intracellular stress induced by macrophage phagocytosis and to extracellular environmental stress. In: *Infection and Immunity* 64 (8), S. 2980–2987.
- Yao, T.; Meccas, J.; Healy, J. I.; Falkow, S.; Chien, Y. (1999): Suppression of T and B lymphocyte activation by a Yersinia pseudotuberculosis virulence factor, yopH. In: *The Journal of experimental medicine* 190 (9), S. 1343–1350.

- Ye, Zhan; Kerschen, Edward J.; Cohen, Donald A.; Kaplan, Alan M.; van Rooijen, Nico; Straley, Susan C. (2009): Gr1+ cells control growth of YopM-negative yersinia pestis during systemic plague. In: *Infection and Immunity* 77 (9), S. 3791–3806. DOI: 10.1128/IAI.00284-09.
- Ye, Zhan; Uittenbogaard, Annette M.; Cohen, Donald A.; Kaplan, Alan M.; Ambati, Jayakrishna; Straley, Susan C. (2011): Distinct CCR2(+) Gr1(+) cells control growth of the Yersinia pestis  $\Delta$ yopM mutant in liver and spleen during systemic plague. In: *Infection and Immunity* 79 (2), S. 674–687. DOI: 10.1128/IAI.00808-10.
- Yehualaeshet, Teshome; Graham, Martha; Montgomery, Marica; Habtemariam, Tsegaye; Samuel, Temesgen; Abdela, Woubit (2013): Effects of temperature on the viability, growth and gene profile of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica inoculated in milk. In: *Food Control* 34 (2), S. 589–595. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.05.025.
- Yin, Helen L.; Janmey, Paul A. (2003): Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. In: *Annual review of physiology* 65, S. 761–789. DOI: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142517.
- Yip, Calvin K.; Finlay, B. Brett; Strynadka, Natalie C. J. (2005): Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. In: *Nature structural & molecular biology* 12 (1), S. 75–81. DOI: 10.1038/nsmb879.
- Yother, J.; Goguen, J. D. (1985): Isolation and characterization of Ca<sup>2+</sup>-blind mutants of Yersinia pestis. In: *Journal of bacteriology* 164 (2), S. 704–711.
- Young, Briana M.; Young, Glenn M. (2002): Evidence for Targeting of Yop Effectors by the Chromosomally Encoded Ysa Type III Secretion System of Yersinia enterocolitica. In: *Journal of bacteriology* 184 (20), S. 5563–5571. DOI: 10.1128/JB.184.20.5563-5571.2002.
- Zhang, Yongdeng; Lara-Tejero, María; Bewersdorf, Jörg; Galán, Jorge E. (2017): Visualization and characterization of individual type III protein secretion machines in live bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (23), S. 6098–6103. DOI: 10.1073/pnas.1705823114.
- Zilkenat, Susann; Franz-Wachtel, Mirita; Stierhof, York-Dieter; Galán, Jorge E.; Macek, Boris; Wagner, Samuel (2016): Determination of the Stoichiometry of the Complete Bacterial Type III Secretion Needle Complex Using a Combined Quantitative Proteomic Approach. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 15 (5), S. 1598–1609. DOI: 10.1074/mcp.M115.056598.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Internalisierung von <i>Yersinia</i> .....	15
Abbildung 2-2 Schematische Darstellung des Injektisoms mit hochaufgelösten Strukturdaten. ...	21
Abbildung 4-1 Die Translokatorproteine YopB und YopD lokalisieren auf der Bakterienoberfläche unter in vitro-Sekretionsbedingungen.....	36
Abbildung 4-2 3D-STED-Mikroskopie zeigt Kolo­kalisierung der Translokatoren YopB und YopD sowie YopB und LcrV-Plattform bei der Zellinfektion. ....	38
Abbildung 5-1 2D-STED-Aufnahmen von Wildtyp-Yersinien unter Sekretionsbedingungen bestätigen die homogene Oberflächenverteilung der Porenproteine YopB und YopD. ....	39
Abbildung 5-2 3D-STED-Aufnahmen sekretionsaktiver Yersinien zeigen nur eine partielle Kolo­kalisierung der Porenproteine YopB und YopD.. ....	41
Abbildung 5-3 Die LcrV-Plattform wird für die Assemblierung des Translokons bei der Wirtszellinfektion benötigt. ....	43
Abbildung 5-4 Der Zelltyp beeinflusst den Anteil der YopB-positiven Bakterien. ....	44
Abbildung 5-5 Biochemischer Nachweis der gesteigerten Zellintegration von Effektoren sowie der Translokatoren YopB und YopD unter Bedingungen der künstlich gesteigerten Translokation.. ...	46
Abbildung 5-6 Deletion des Effektors YopE steigert die Anzahl YopB-positiver Bakterien in der Zellinfektion.....	48
Abbildung 5-7 Konstitutiv aktives Rac1 steigert die Anzahl der Translokator-bildenden Bakterien.. ....	49
Abbildung 5-8 Die Deletion des Effektorproteins YopE in Yersinien hat keinen Einfluss auf den Anteil der YopB-positiven Bakterien bei der Makrophageninfektion.. ....	50
Abbildung 5-9 STED-Mikroskopie zeigt Unterschiede in der Anzahl der Fluoreszenzpunkte pro Bakterium abhängig von den Wirtszellen und dem infizierenden Yersinienstamm.....	52
Abbildung 5-10 YopB-Fluoreszenzsignale, die mittels STED-Mikroskopie aufgenommen wurden, zeigen Gruppenbildung auf der Bakterienoberfläche während der Zellinfektion.....	55
Abbildung 5-11 Die Translokatorproteine YopB und YopD befinden sich reproduzierbar in räumlicher Nähe zum Basalkörperprotein YscD. ....	57
Abbildung 5-12 Gleichzeitige Visualisierung der Injektisomkomponenten Basalkörper, Nadel und Translokationspore. ....	58
Abbildung 5-13 Auswertung der Immungold-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen von assemblierten T3SS bei der Zellinfektion.....	60
Abbildung 5-14 Vermutlich vollständig assemblierte Injektisome befinden sich in einem membranumschlossenen Zellkompartiment. ....	64

---

Abbildung 5-15 YopB-positive Bakterien befinden sich in der intermediären Prävakuole und innerhalb der HeLa-Zellen.....	66
Abbildung 5-16 Validierung des Proteinase K-Digitonin-Assays. ....	68
Abbildung 5-17 Die Translokatorproteine YopB und YopD werden durch Zugabe von Proteinase K degradiert.....	69
Abbildung 5-18 Dynamik und Lokalisation der Zell-assoziierten WA-314 Yersinien in der Infektion von primären humanen Makrophagen.....	70
Abbildung 5-19 YopB-positive Bakterien durchlaufen das intermediäre Kompartiment.....	71
Abbildung 5-20 Verifizierung des PI(4,5)P <sub>2</sub> -Biosensor im Infektionsmodell mit biotinylierten Yersinien.....	73
Abbildung 5-21 YopB-positive Bakterien in der Prävakuole von Makrophagen anreichert mit dem Plasmamembranmarker PLCδ-PH-GFP. ....	74
Abbildung 5-22 YopB-Fluoreszenzsignale kolokalisieren mit der Membran der Prävakuole.. ..	75
Abbildung 5-23 Die Überexpression von aktivem Rac1 in HeLa-Zellen verstärkt die Internalisierung der Wildtyp-Yersinien.....	76
Abbildung 5-24 Die myc-Rac1Q61L-Überexpression erhöht die Anzahl YopB-positiver Bakterien im intermediären und inneren Zellkompartiment.....	77

---

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 5-1 Verteilung von GFP-YscD in der Immungold-Elektronenmikroskopie.....	61
Tabelle 5-2 Verteilung von YopD in der Immungold-Elektronenmikroskopie. ....	62
Tabelle 5-3 Verteilung von YopD in der Wirtszelle. ....	63
Tabelle 7-1 Geräte.....	95
Tabelle 7-2 Technische Daten zum <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop.....	96
Tabelle 7-3 Technische Daten zum STED-Mikroskop.....	96
Tabelle 7-4 Technische Daten zum SIM-Mikroskop.....	97
Tabelle 7-5 Einmalartikel.....	97
Tabelle 7-6 Kits, Enzyme und Reagenzien.....	98
Tabelle 7-7 Pufferzusammensetzung.....	99
Tabelle 7-8 eukaryotische Expressionsplasmide.....	100
Tabelle 7-9 Primärantikörper.....	101
Tabelle 7-10 Sekundärantikörper.....	102
Tabelle 7-11 Wachstumsmedien zur Kultivierung von <i>Y. enterocolitica</i> .....	103
Tabelle 7-12 Antibiotika und Zusätze zur Kultivierung und Selektion von <i>Y. enterocolitica</i> .....	103
Tabelle 7-13 Wachstumsmedien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	103
Tabelle 7-14 <i>Yersinia enterocolitica</i> -Stämme.....	104
Tabelle 7-15 eukaryotische Zellen.....	104
Tabelle 7-16 verwendete Software und Datenbanken.....	105
Tabelle 7-17 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.....	113

## 11 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
Å	Ångstrom
ÄM	äußere Membran
Ail	attachment invasion locus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , bovines Serumalbumin
CCD-Kamera	<i>Charge-coupled device camera</i> , Kamera mit ladungsgekoppeltem Bauteil
CCR	Chemokinrezeptor
Cdc42	Cell division cycle 42
cm	Zentimeter
DAP	Diaminopimelinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DDX3	DEAD-box helicase 3
DIC	<i>differential interference contrast</i> , Differentialinterferenzkontrast
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribnonukleinsäure
EEA1	Early endosome antigen 1
EFSA	European Food Safety Authority
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	extracellular signal-regulated kinases
EtOH	Ethanol
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
F-Aktin	Filamentöses Aktin

---

FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Relative Zentrifugalkraft
GA	Glutaraldehyd
GAP	GTPase-activating protein
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosine triphosphate exchange factor
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
HZI	Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	innere Membran
I <sub>Membran</sub>	Intersektion der Membran am Gitter
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
Kryo-ET	Kryoelektronentomographie
l	Liter
LAMP	Lysosome-Associated Membrane Protein
LB	Luria-Bertani
LCR	low calcium response
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Lymphozyten-Separationsmedium
M	Molar
mA	Milliampere
MAP-Kinasen	Mitogen activated protein kinase
MDa	Megadalton
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter

---

---

mM	Millimolar
MOI	multiplicity of infection
mRNA	Messenger ribonucleic acid
ms	Millisekunde
M-Zellen	Microfold-Zellen
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPF	nucleation promoting factor
ns	Nanosekunde
O-Antigene, O:	Oberflächen-Antigene
OD	Optische Dichte
ORCL/ Inpp5b	Lowie oculocerebrorenal syndrome protein, Inositol polyphosphate 5-phosphatase
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PB	Phosphatpuffer
PBS(-T)	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (-Tween20)
PFA	Para-Formaldehyd
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI(5)P	Phosphatidylinositol-5-Phosphat
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinasen
PIP5-Kinase	Phosphoinositol-4-Phosphat-5-Kinase
PK	Proteinase K
PKN	Protein Kinase N
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
P <sub>Membran</sub>	Schnittpunkt der Membran am Gitter
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pop	Pseudomonas outer protein
PRR	Pattern-Recognition-Receptor
PSF	<i>Point Spread Function</i> , Punktspreizfunktion

---

PVDF	Polyvinylidendifluoridmembran
pYV	Plasmid <i>Yersinia Virulence</i> , Virulenzplasmid
RLI	Relativer Labelling Index
rpm	Revolutions per minute
RSK	<i>ribosomal s6 kinase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.D.	Standard deviation, Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfacte, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIM	Structured illumination microscopy
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N-N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll like receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
V	Volt
v/v	<i>Volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
w/v	Weight per volume, Masse proVolumen
WAVE und WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteine
W <sub>az</sub>	Akzeptanzzone
WB	Western Blot
XML	Extensible markup language, Excel-Format
YAC	<i>Yersinia acidic compartment</i>
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
Ysc	<i>Yersinia secretion</i>

---

## 12 Veröffentlichungen

### 12.1 Publikationen

Theresa Nauth, Franziska Huschka, Michaela Schweizer, Jens B. Bosse, Andreas Diepold, Antonio V. Failla, Anika Steffen, Theresia E. B. Stradal, Manuel Wolters, Martin Aepfelbacher (2018) Visualization of translocons in *Yersinia* type III protein secretion machines during host cell infection. PLOS Pathogens 14(12): e1007527. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007527>, Veröffentlichung am 26. 12. 2018

Theresa Nauth, Franziska Huschka, Michaela Schweizer, Jens B. Bosse, Andreas Diepold, Antonio V. Failla, Anika Steffen, Theresia Stradal, Manuel Wolters, Martin Aepfelbacher (2018) Visualization and regulation of translocons in *Yersinia* type III protein secretion machines during host cell infection. bioRxiv 431908; doi: <https://doi.org/10.1101/431908>, Veröffentlichung am 03. 10. 2018

### 12.2 Vorträge

Theresa Nauth, Franziska Huschka, Michaela Schweizer, Jens B. Bosse, Andreas Diepold, Antonio V. Failla, Anika Steffen, Theresia Stradal, Manuel Wolters, Martin Aepfelbacher (April 2018) High resolution visualization of the *Yersinia* type 3 secretion system, Electronmicroscopy of the cell – PANOS Meeting 2018, Berlin, Deutschland

### 12.3 Poster

Theresa Nauth, Franziska Huschka, Michaela Schweizer, Jens B. Bosse, Andreas Diepold, Antonio V. Failla, Anika Steffen, Theresia Stradal, Manuel Wolters, Martin Aepfelbacher (Juli 2018) Visualization and regulation of translocons during the *Yersinia* host cell infection, European *Yersinia* Conference, Jena, Deutschland

Theresa Nauth, Franziska Huschka, Michaela Schweizer, Jens B. Bosse, Andreas Diepold, Antonio V. Failla, Anika Steffen, Theresia Stradal, Manuel Wolters, Martin Aepfelbacher (November 2018) Visualization and regulation of translocons in *Yersinia* type III protein secretion machines during host cell infection, Labeling and Nanoscopy, Heidelberg, Deutschland

## 13 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön an alle, die mich immer wieder motiviert und unterstützt haben und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Martin Aepfelbacher für die Bereitstellung des interessanten Themas. Danke für dein großes Interesse am Projekt, die guten Diskussionen und deine Unterstützung.

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

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an Dr. Manuel Wolters. Danke für die aufbauenden Worte, wenn mal wieder alles schief ging, deine Begeisterung für das Thema und die anregenden Diskussionen. Tausend Dank für die schöne Zeit und das gemeinsame Forschen!

Ich danke Manuel, Martin, Marie, Liane, Lukas und Julia von Herzen für das Korrekturlesen und die wirklich hilfreichen Anmerkungen.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Virgilio und Bernd für die gute und hilfreiche Unterstützung bei der Mikroskopie und bei der Bild-Auswertung, für den netten Schnack zwischen durch und den guten Käse. Danke für die Beantwortung all meiner (unzähligen) Fragen und für die italienischen Feste.

Danke an Anika und Theresia für die schönen Tage am HZI und die hilfreiche Unterstützung mit dem SIM-Mikroskop. Vielen Dank an Michaela, die mir die Faszination für die Elektronenmikroskopie vermittelte. Danke auch für die motivierenden Worte und die schönen und spannenden Tage in Berlin beim Panos-Kongress.

Vielen Dank an alle Koautoren des Papers. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Ein riesiges Danke geht natürlich an die alten und neuen Hasen des Instituts für Mikrobiologie. Danke, dass ihr mich in eure Mitte genommen habt und den Neustart in Hamburg und das Arbeiten so angenehm gemacht habt. Danke für die lustigen Labortage, die musikalische Erziehung, den guten Kaffee, die Schoki-Versorgung, das Tragen der Wasserkanister und die ständige seelisch-moralische Unterstützung. Danke Aileen und Maren, dass ihr mich mit einem kleinen Foto in die Herzen aller gebracht habt (muhaha). Danke an die Frau hinterm Bildschirm, die mir die Welt ein bisschen pinker und flauschiger gemacht hat. Danke an Maren für die Katzenbilder und den wärmenden Schnack bei dir im Eck. Danke Laura, dass du das Labor zu einem hippen Ort machst. Danke an Indra für das nette Tandem zwischendurch und die guten Restaurant-Empfehlungen.

Danke an meine Banknachbarin Claudia, die mich mit ihrem fränkischen Witz an langweiligen Schreibtischtagen bei Laune hielt und immer wusste wo ich was im Labor finde. Danke an die andere Transloziererin Franzi für die schöne gemeinsame Zeit und deine Unterstützung in allen Yop-Problemen. Ein großes Dankeschön an Liane, die mich an meinem ersten Tag unter ihre Fittiche nahm. Danke für die vielen lieben Worte, Ratschläge und die aufregenden Segelabende. Ein großes Danke auch an Kirsten, die mir den Einstieg in Hamburg hüpfend leicht macht. Danke Marie für das tägliche Umsorgen mit Kaffee und Keks, die treue Mittagsbegleitung, das wirklich magische Shopping und so viel mehr! Bedanken möchte ich mich auch bei unseren neuen Sonnenscheinen Gunnar und Alex, die nicht nur ein brillantes Empfangskomitee in Heidelberg waren, sondern immer mit Spaß dabei sind, sei es ein Erfrischungsgetränk oder ein Nobelpreisträger-Vortrag. Danke an Astrid für ihre Hilfe bei allen Antragsproblemen und das gemeinsame Schwärmen über die schönsten Orte der Welt. Danke Dorte, dass du so frischen, fröhlichen Wind ins Labor bringst. Bedanken möchte ich mich auch bei Stefan Linder und seiner Crew. Viele Dank für die immer gute fachliche Hilfe, die aufmunterten Worte und die unterhaltsame Mittagsbegleitung. Danke an die Sonnenscheine der umliegenden Labore, dass ihr immer mit Rat und Tat zur Stelle seid.

Ein besonderer Dank für die unermüdliche, wärmende Fürsorge geht an George und seine Gehilfen.

Tusen takk an Lukas für die kulinarische Versorgung, die liebevolle Rundumbetreuung und deine Begeisterung für diese Arbeit. Es ist auch ein bisschen deine Doktorarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden – von Oberbayern über Rheinhessen bis nach Hamburg – ohne die ich nie so weit gekommen wäre. Danke für die ständige Motivation und Unterstützung auch in schweren Zeiten, und dass ihr immer an mich glaubt.

## 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, Dezember 2018

---

Theresa Nauth