

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG EPPENDORF

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Direktor Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

Yersinien-induzierte Autophagie: Untersuchung zur Bedeutung potentiell relevanter bakterieller Virulenzfaktoren

Dissertation

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

vorgelegt von Melanie Quitmann, geb. Gut
aus Pinneberg

Hamburg 2021

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

06.08.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

PD. Dr. Stephan Storch

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. Klaus Ruckdeschel

Inhaltsverzeichnis

1	Fragestellung und Arbeitshypothese	6
2	Einleitung	7
2.1	Autophagie: Funktion, Mechanismus und Rolle bei der Immunabwehr	7
2.2	Bedeutung von Autophagie bei Infektion mit Yersinien	10
2.3	Yersinien: Bakteriologie und Pathogenese	12
2.4	Bedeutung der untersuchten <i>Yersinia</i> -Virulenzfaktoren	14
2.4.1	Hrep	14
2.4.2	YpIA.....	14
2.4.3	PIdA.....	15
2.4.4	Hfq.....	16
2.4.5	CsrA	16
2.4.6	Yts1	17
2.4.7	FliA	18
2.4.8	PilQ	18
2.4.9	PhoP	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Materialien und Geräte	21
3.1.1	Mikroskop	21
3.1.2	Allgemeine Geräte	21
3.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	22
3.1.4	Antibiotika.....	23
3.1.5	Selektivagarplatten	23
3.1.6	Molekulargewichtsstandard	24
3.1.7	Primer.....	24
3.1.7.1	PIdA.....	24
3.1.7.2	YpIA.....	25
3.1.7.3	Hrep	25
3.1.8	Verwendete Bakterienstämme.....	25
3.1.9	Verwendete Zelllinien	27
3.2	Methoden	28
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	28
3.2.1.1	Anzucht von Bakterien.....	28
3.2.1.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	28
3.2.1.3	Transformation	28
3.2.1.4	Plasmidpräparation.....	29

3.2.1.5	Klonierungsschritte	30
3.2.1.6	Konjugation	33
3.2.1.7	Restriktionsverdau	34
3.2.1.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	36
3.2.1.9	Elution von DNA aus Agarosegel.....	37
3.2.1.10	PCR ohne Proof-reading-Funktion zur Überprüfung des Inserts	37
3.2.1.11	Ligation.....	38
3.2.1.12	Sequenzierung rekombinanter Plasmide	39
3.2.2	Zellbiologische Methoden	39
3.2.2.1	Anzucht von Bakterien.....	39
3.2.2.2	Zellkulturexperimente	40
3.2.2.2.1	Anzucht und Kultivierung der Zellen	40
3.2.2.2.1.1	HeLa-Zellen	40
3.2.2.2.1.2	m-IC _{cl2} -Zellen.....	40
3.2.2.2.2	Zellzahlbestimmung.....	41
3.2.2.2.3	Infektion der Zellen für die LC3-Immunoblotversuche	41
3.2.2.2.4	Infektion und Vorbereitung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	42
3.2.2.2.5	Transfektion von HeLa-Zellen.....	43
3.2.2.2.6	Transfektion von m-IC _{cl2} -Zellen.....	43
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	44
3.2.3.1	Herstellung von Zelllysaten zur Immunoblotuntersuchung	44
3.2.3.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
3.2.3.3	Westernblot und Immunodetektion von Proteinen.....	46
4	Ergebnisse	49
4.1	Prozessierung von LC3 bei HeLa-Zellen nach Infektion mit unterschiedlichen Yersinienmutanten	50
4.2	Prozessierung von LC3 bei m-IC _{cl2} -Zellen nach Infektion mit Yersinien	55
4.3	Mobilisierung von GFP-LC3 bei HeLa-Zellen mit verschiedenen Yersinienmutanten.....	56
4.4	Detektion der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen mittels Lysotrackerfärbung	62
5	Diskussion	68
6	Zusammenfassung	75
7	Abkürzungsverzeichnis.....	78
8	Tabellenverzeichnis.....	81
9	Abbildungsverzeichnis.....	83
10	Literaturverzeichnis.....	85

11	Danksagung	92
12	Lebenslauf	93
13	Eidesstattliche Versicherung.....	94

1 Fragestellung und Arbeitshypothese

Autophagie ist ein zellulärer Degradationsmechanismus, welcher dazu dient, Proteine, Lipide und Organellen in Lysosomen abzubauen, um die gespaltenen Bestandteile wieder dem Zellstoffwechsel zur Verfügung zu stellen. Während der Zellhomöostase findet Autophagie auf basalem Level statt und kann je nach erforderlichem Maße unter dem Einfluss von Stressoren verstärkt werden. Außerdem ist Autophagie Teil der Immunantwort, indem sich im Rahmen der sogenannten Xenophagie eine doppelwandige Membran um intrazelluläre Pathogene ausbildet. Es folgt eine Verschmelzung dieser Autophagosomen mit Lysosomen, so dass ein Verdau der Bakterien in den entstandenen Autolysosomen stattfindet. Allerdings haben pathogene Bakterien Mechanismen entwickelt, dem Abbau im Autolysosom zu entgehen und Autophagie für die eigene Replikation auszunutzen. Von *Yersinia enterocolitica* ist bekannt, dass die Bakterien in Epithelzellen in autophagosomalen Kompartimenten überleben. Die Verschmelzung der Yersinien-haltigen Autophagosomen mit Lysosomen ist blockiert, so dass *Yersinia enterocolitica* diese als Nische zur intrazellulären Replikation nutzt.

Bislang ist nichts über die bakteriellen Mechanismen, über welche Yersinien Autophagie auslösen, bekannt. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit unterschiedlichen *Yersinia*-Faktoren, welche potentiell über einen Einfluss auf Autophagie zur Virulenz von *Yersinia enterocolitica* beitragen könnten.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene *Yersinia*-Mutanten untersucht. Dafür wurde mittels Westernblot die Prozessierung von LC3 analysiert. Denn im Rahmen der Autophagie wird das autophagosomale Protein LC3 am C-terminalen Ende gespalten und anschließend mit Phosphatidylethanolamin konjugiert, so dass LC3-I zu LC3-II prozessiert wird. In einem weiteren Schritt wurde mittels GFP-LC3-Fluoreszenzmikroskopie untersucht, ob die detektierten Unterschiede mit einer verminderten Menge an Autophagosomenbildung korrelieren. Schließlich sollte die Frage beantwortet werden, ob nach Autophagieinduktion durch die unterschiedlichen Yersinienmutanten weiterhin die Ansäuerung der Autophagosomen durch Verschmelzung mit Lysosomen ausbleibt und die Bakterien dadurch der Degradation entgehen können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Erkenntnis über die molekularen Mechanismen der Autophagieinduktion durch Yersinien zu erlangen. Daraus könnten sich langfristig neue Anregungen zu Behandlungsstrategien bei Yersiniosen und anderen bakteriellen Infektionen ergeben.

2 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der durch *Yersinia enterocolitica* vermittelten Autophagie und der Frage, welche *Yersinia*-Faktoren dabei eine Rolle spielen können. Es wurde in Zellkulturexperimenten mit HeLa- und m-IC_{cl2}-Zellen untersucht, ob es bei einem Fehlen von bestimmten *Yersinia*-Virulenzfaktoren weiterhin zu Autophagie kommt, wenn Infektionen mit entsprechenden Yersinien-Mutanten vorgenommen werden.

2.1 Autophagie: Funktion, Mechanismus und Rolle bei der Immunabwehr

Das Wort Autophagie stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus „auto“ für „selbst“ und „phagein“ für „essen“ zusammen (Yang und Klionsky, 2010). Erstmals wurde dieser Begriff in den 1960-iger Jahren geprägt, als das Vorkommen von Vesikeln, die Zytoplasma und Organellen umschließen, als Autophagie bezeichnet wurde (De Duve und Wattiaux, 1966). Autophagie ist ein zellulärer Mechanismus zum Abbau und zum Recycling von zytoplasmatischen Proteinen, Lipiden und Organellen, indem diese in einer doppelmembranösen Vakuole, dem sogenannten Autophagosom, aufgenommen und dem Lysosom zugeführt werden (Klionsky et al., 2007). In dem entsprechenden Autolysosom wird der Inhalt des Autophagosoms degradiert und die gespaltenen Bestandteile werden anschließend wieder dem Zellstoffwechsel zur Verfügung gestellt.

Autophagie ist essentiell für die Zellhomöostase, spielt aber auch bei der Immunabwehr von intrazellulären mikrobiellen Pathogenen eine wichtige Rolle. Daher ist Autophagie als Teil der nicht-spezifischen Immunantwort anzusehen. Bei der sogenannten „Xenophagie“ formiert sich um intrazelluläre Bakterien eine doppelwandige Membran, die als „Phagophor“ bezeichnet wird und die Bakterien schließlich in einem autophagosomalen Vesikel einschließt. Das entstandene Autophagosom verschmilzt anschließend mit Lysosomen und resultiert in den Verdau der Bakterien im Autolysosom (Shahnazari und Brumell, 2011). Fehlfunktionen bei der Autophagie können unter anderem zur Entstehung von degenerativen Erkrankungen und Krebs beitragen (Webb et al., 2003, Won et al., 2010, Schmid und Münz, 2007).

In Säugetierzellen und Hefen werden die Autophagosomen an einer „phagopore assembly site“ (PAS) gebildet (Parzych und Klionsky, 2013). Unterschiedliche Proteine (ATGs, autophagy-related-proteins) spielen eine bedeutende Rolle bei der Autophagie.

Die Autophagie läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst bilden der Unc-51-like kinase 1 (ULK1)-Komplex und ATG 101 den Initiationskomplex. Dieser hat eine Schlüsselrolle bei der Rekrutierung anderer ATGs zum PAS (Mizushima, 2010). Sind unter physiologischen Bedingungen Nährstoffe vorhanden, ist ULK1 durch mTORC1 („mammalian target of rapamycin complex I“) genauso wie ATG13 phosphoryliert, wodurch die Rekrutierung des ULK1-Komplexes zum PAS inhibiert ist. Ist mTORC1 durch vermindertes Nährstoffangebot inhibiert, so kann ULK1 das „focal adhesion kinase (FAK)-family interacting protein of 200 kDa“ (FIP200) phosphorylieren, sich zum PAS begeben und andere ATGs zur Initiation von Autophagie rekrutieren. Auch bei der selektiven Autophagie, zum Beispiel bei der Abtötung von Bakterien durch Xenophagie, spielt der ULK1-Komplex eine entscheidende Rolle. Dabei ist allerdings unklar, ob die Aktivierung von ULK1 von mTORC1 oder auch von anderen Signalmolekülen abhängig ist. Anschließend gelangen durch den ULK1-Komplex Beclin 1, ATG14-like und die „phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4“ (PIK3R4) zum PAS. Dort sind diese an der Synthese der Phagophorenmembran beteiligt. Für die Weiterentwicklung der Phagophore zum Autophagosom spielen ein Komplex aus ATG12-ATG5 und ATG16L eine Rolle. ATG12-ATG5 ist notwendig für die Formierung des LC3-PE-Komplexes, wobei ATG12-ATG5 das LC3-Molekül zur Ziellmembran führt, wo es mit Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert wird. An dieser Konjugation ist auch ATG4B beteiligt. Außerdem prozessiert ATG4B einen Teil der LC3-PE Komplexe, wenn das Autophagosom fertiggestellt ist, so dass dieses für die Bildung eines neuen Autophagosoms wieder zur Verfügung steht. Die anschließende Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom erfordert noch weitere Proteine. Darunter sind die GTPase RAB7, Syntaxin 17, VAMP8 (lysosomal SNARE vesicle-associated membrane protein 8) und LAMP2 (lysosomal-associated membrane protein 2) (Huang und Brumell, 2014).

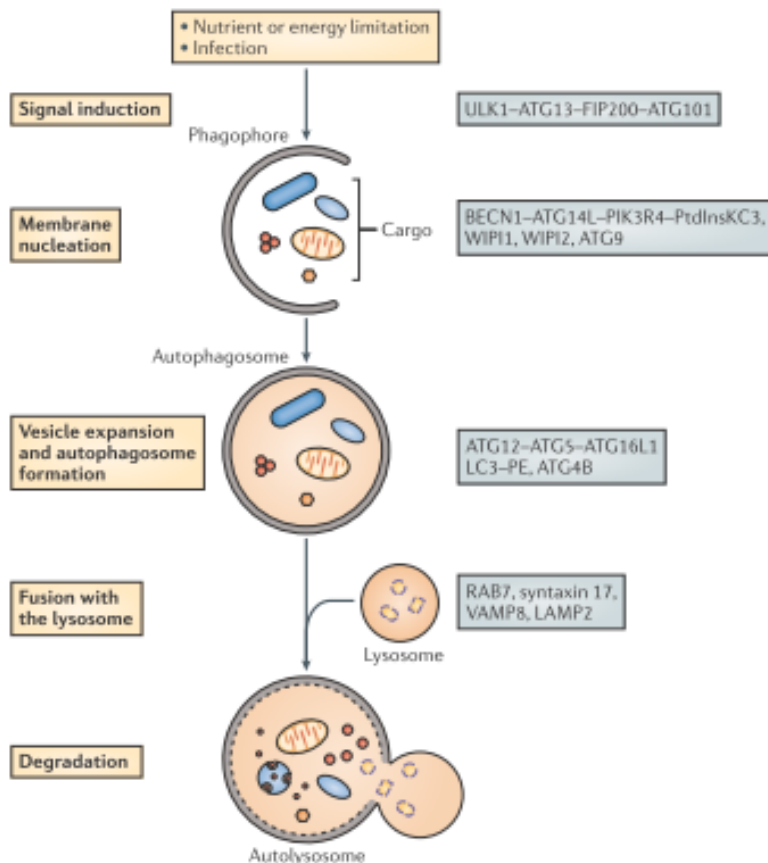


Abbildung 1 Schema zum Ablauf von Autophagie. (modifiziert nach Figure 1, Huang und Brumell, 2014).

Zu Beginn der Autophagie kommt es zur Ausbildung einer Membranausstülpung, der sogenannten Phagophore, welche zytoplasmatische Bestandteile umschließt. Die Phagophore wächst und reift zu einem doppelmembranösen Kompartiment heran, dem sogenannten Autophagosom, welches zytoplasmatische Proteine, Organellen oder Mikroorganismen aufnimmt. Durch Verschmelzung des Autophagosoms mit dem Lysosom entsteht das Autolysosom, in dem es zum Abbau der Bestandteile durch hydrolytische Enzyme kommt. Die Schlüsselproteine der Autophagie bei Säugetieren sind rechts abgebildet; ATG, autophagy-related; ATG14L, ATG14-like; ATG16L1, ATG16-like 1; BECN1, beclin 1; FIP200, FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa; LAMP2, lysosomal-associated membrane glycoprotein 2; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; PE, phosphatidylethanolamine; PIK3R4, phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4; PtdInsKC3, phosphatidylinositol-3 kinase class III; ULK1, Unc-51-like kinase; VAMP8, vesicle-associated membrane protein 8; WIPI, WD-repeat domain phosphoinositide-interacting

Pathogene Bakterien haben Mechanismen entwickelt, der Autophagie zu entgehen. Dabei inhibieren einige Bakterien die Signalwege zur Autophagieinduktion, andere maskieren sich mit Wirtsproteinen, um nicht als fremd erkannt zu werden. Wieder andere interagieren mit dem Autophagieprozess und umgehen so die Zusammenkunft mit dem Lysosom oder blockieren die Verschmelzung von Autophagosom und Lysosom. Es gibt Bakterien, die die Autophagie ausnutzen, um sich intrazellulär zu vermehren (Huang und Brumell, 2014).

Viele der Proteine, die an der Bildung des Autophagosoms beteiligt sind, sind auf dem ausgereiften Autophagosom nicht mehr nachweisbar. So sind beispielsweise ULK1/2, Beclin 1 oder ATG13 nur auf der Phagophor-Membran detektierbar (Longatti und Tooze, 2009). Das „microtubule-associated protein light chain 3“-Protein LC3 findet sich hingegen auf den komplett ausgebildeten Autophagosomen und kann somit als Marker für die Autophagie herangezogen werden (Kabeya et al., 2000, Mizushima, 2004).

Bei Autophagieinduktion wird LC3 von LC3-I zu LC3-II prozessiert. Dabei wird LC3 zunächst am C-terminalen Ende durch ATG4 gespalten und anschließend mit Phosphatidylethanolamin konjugiert, wodurch LC3-II entsteht. LC3-II ist sowohl in der äußeren als auch in der inneren Membran des Autophagosoms lokalisiert. Mittels Fluoreszenzmarkierung und -mikroskopie kann detektiert werden, dass diffus im Zytoplasma vorkommendes LC3 an Autophagosomen lokalisiert ist, wenn Autophagie stattfindet. Die Prozessierung von LC3-I zu LC3-II kann auch mittels Immunoblot detektiert werden (Matsui et al., 2007, Hosokawa et al., 2009). Beide Methoden wurden in dieser Arbeit angewendet, um Zellen auf Autophagie zu untersuchen. Die Stimuli, die als Positivkontrolle für Autophagie-assoziierte Prozesse eingesetzt wurden, waren Rapamycin und Chloroquin.

Rapamycin induziert Autophagie, indem es die Kinaseaktivität des mTOR blockiert. Dadurch fällt die Hemmung von ULK1 weg und ULK1 kann Autophagie auslösen (Hartford und Ratain, 2007, Tanemura et al., 2012).

Chloroquin andererseits verhindert die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen zu Autophagolysosomen (Shintani und Klionsky, 2004). Da LC3-II während des physiologischen Autophagieprozesses abgebaut wird, kommt es durch eine Blockade der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion durch Chloroquin zu einem vermehrten Anfall von LC3-II, was mittels Immunoblot detektiert werden kann (Tanida et al., 2005).

2.2 Bedeutung von Autophagie bei Infektion mit Yersinien

Bei *Yersinia pestis* wurde gezeigt, dass die Bakterien in Makrophagen replizieren können, wobei sie sich in Vakuolen befinden, die sich positiv für den Autophagosomentypischen Marker LC3 darstellen. Durch fehlende Ansäuerung des Kompartiments kommt es jedoch nicht zur Abtötung des Bakteriums (Pujol et al., 2009). Auch bei Infektionen von Makrophagen mit *Yersinia pseudotuberculosis* konnte demonstriert werden, dass sich die in Autophagosomen befindlichen Bakterien vermehren können, da offenbar die Ansäuerung des Kompartiments blockiert ist. Autophagosomen, die

keine Bakterien beinhalteten, sind jedoch in der Lage, mit dem Lysosom zu fusionieren. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass *Yersinia pseudotuberculosis*, und vermutlich auch *Yersinia pestis*, Mechanismen entwickelt haben, der Ansäuerung und damit der intrazellulären Abtötung zu entgehen. Wenn Autophagiewege molekulargenetisch inhibiert werden, lassen sich die Bakterien vermehrt in sauren Kompartimenten nachweisen. Es scheint möglich, dass die Bakterien Autophagosomen in Makrophagen ausnutzen, um dorthin transportierte Nährstoffe für ihre eigene Replikation zu nutzen (Moreau et al., 2010). Weitere Untersuchungen an HeLa-Zellen haben gezeigt, dass auch hier *Yersinia pseudotuberculosis* in LC3-positiven Kompartimenten zu finden ist und diese nicht mit dem Lysosom fusionieren, so dass damit die Ansäuerung des Autophagosoms ausbleibt. Allerdings scheint es sich um LC3-positive Kompartimente mit einer singulären Membran zu handeln, in denen *Yersinia pseudotuberculosis* in epithelialen Zellen zur Replikation befähigt ist. Solche Kompartimente finden sich typischerweise nach Vorgängen, die als LC3-assoziierte Phagozytose bezeichnet werden und die sich von klassischen Autophagie-Ereignissen, wie Xenophagie, unterscheiden. *Yersinia pseudotuberculosis* scheint somit in unterschiedlichen Zellen auf verschiedene Arten in Vakuolen aus LC3-positiven Membranen überleben und replizieren zu können (Ligeon et al. 2014).

Auch *Yersinia enterocolitica* löst Autophagie bei infizierten Wirtszellen aus, was zuerst bei Makrophagen gezeigt werden konnte. Nach Aktivierung des Yersinia Typ III Proteinsekretionssystems werden jedoch sowohl Phagozytose, als auch Autophagie inhibiert (Deuretzbacher et al., 2009) und die Yersinien gehen von einer intrazellulären in eine extrazelluläre Phase über. Später konnte auch bei epithelialen Zellen nach Infektion mit *Yersinia enterocolitica* Autophagie nachgewiesen werden. Sowohl in HeLa-Zellen als auch in intestinalen m-IC_{cl2}-Zellen zeigten sich intrazellulär fluoreszenzmikroskopisch nach GFP-LC3-Transfektion und auch elektronenmikroskopisch Yersinien in Autophagosomen. Proteinuntersuchungen mittels Westernblot konnten ebenfalls eine Akkumulation von LC3-II darlegen. Es konnte somit gezeigt werden, dass das Eindringen von *Yersinia enterocolitica* in Epithelzellen Autophagie auslöst. Des Weiteren kam es zu keiner Ansäuerung der Autophagosomen. Dies weist darauf hin, dass *Yersinia enterocolitica* die Verschmelzung von Autophagosom und Lysosom verhindert. Gleichzeitig konnte eine zweite Population intrazellulärer Bakterien nachgewiesen werden, die sich in sauren Kompartimenten befand und somit der zelleigenen Abwehr nicht entging und abgetötet wurde. Dies ist hinweisend darauf, dass intrazellulär befindliche Yersinien zwei

unterschiedlichen Wegen zugeführt werden können. Zum einen scheint ein Teil der Bakterien im Lysosom degradiert zu werden. Zum anderen entgeht ein zweiter Teil der Bakterien dieser Lyse, indem sie Autophagie auslösen und in Autophagosomen überleben. Avitale Yersinien hingegen sind nicht in der Lage, LC3-II zu rekrutieren und Autophagie zu induzieren. Diese Bakterien konnten intrazellulär in sauren Kompartimenten nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Autophagieinduktion und die Blockade der Ansäuerung aktiv von *Yersinia enterocolitica* hervorgerufen werden. Des Weiteren konnte eine Vermehrung von den Bakterien in HeLa-Zellen gezeigt werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass *Yersinia enterocolitica* in Autophagosomen repliziert und somit die autophagosomale Vakuole eine Nische für deren intrazelluläre Vermehrung darstellt (Valencia López, 2015).

2.3 Yersinien: Bakteriologie und Pathogenese

Yersinien gehören zu der Gruppe der Enterobacteriaceae. Sie sind gramnegative, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien, die unter fakultativ anaeroben Bedingungen lebensfähig sind.

Neben der für gastrointestinale Infekte verantwortlichen Spezies *Yersinia enterocolitica*, welche circa 1 % der gastrointestinalen Infekte in Europa auslösen, spielen bezüglich ihrer Humanpathogenität vor allem *Yersinia pestis* als Erreger der Pest, sowie *Yersinia pseudotuberculosis* als Ursache einer Lymphadenitis mesenterica eine Rolle.

Während es sich bei *Yersinia pestis* um ein sporen- und geißellooses Bakterium handelt, welches unbeweglich ist und Harnstoff zu spalten vermag, sind sowohl *Yersinia pseudotuberculosis* als auch *Yersinia enterocolitica* begeißelt und somit zu Bewegung befähigt. Die Geißelbildung wird bei einer Wachstumstemperatur von 30 °C beobachtet.

Infektionen mit *Yersinia pestis* entstehen durch Übertragung der Bakterien durch Ektoparasiten, wie zum Beispiel dem Rattenfloh. Zunächst kommt es zu lokaler Infektion der Lymphknoten, welche durch die starke Vermehrung des Erregers hämorrhagisch werden. Man spricht in diesem Fall von der Bubonen- oder Beulenpest. Beim Einbruch in die Blutbahn kann sich durch Streuung des Erregers ein septischer Verlauf entwickeln. Dabei kann es zu einer Lungenpest kommen, wodurch eine aerogene Übertragung von Mensch zu Mensch möglich ist. Während die Letalität bei

der unbehandelten Bubonenpest mit 50-60 % angegeben ist, beträgt diese bei primärer Lungenpest 100 %.

Infektionen mit *Yersinia pseudotuberculosis* sind auf eine orale Aufnahme des Erregers mit der Nahrung zurück zu führen. Die Yersinien gelangen nach Aufnahme durch die Epithelzellen der Darmmukosa in die Submukosa. Dort werden sie von Makrophagen aufgenommen, welche sie zu den Lymphknoten transportieren können. Es bildet sich eine Lymphadenitis mesenterica aus. Am häufigsten kommt es jedoch zu einem pseudoappendizitischen Verlauf bei Infektion der Peyer Plaques im Ileum, seltener zu einer enterischen Verlaufsform. Septikämien wie bei einer Infektion mit *Yersinia pestis* treten nur äußerst selten, zum Beispiel unter Immunsuppression, auf. Im weiteren Verlauf kann sich eine reaktive Arthritis oder ein Erythema nodosum ausbilden.

Eine Infektion mit *Yersinia enterocolitica* erfolgt am häufigsten nach Aufnahme unzureichend erhitzten Schweinefleisches. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist äußerst unwahrscheinlich, da der Erreger nur sehr kurz und in kleinen Mengen im Stuhl ausgeschieden wird. Die Pathogenese von *Yersinia enterocolitica*-Infektionen ist der von *Yersinia pseudotuberculosis* vergleichbar. Beide Bakterienarten nutzen das auf ihrer äußeren Membran befindliche Oberflächenprotein Invasin für die Durchwanderung der intestinalen Mukosa (Pepe und Miller, 1993). Invasin bindet an Beta-1-Integrinrezeptoren und löst dadurch eine Endozytose der Bakterien aus, was die Invasion der Schleimhaut unterstützt. Die Bakterien können anschließend in den Peyer Plaques mehrere Tage überdauern. Die Virulenz der Yersinien wird im Anschluss an die Invasion des Wirtes zu einem Großteil über auf einem großen Plasmid befindliche Gene bestimmt, die für das *Yersinia* Typ III Proteinsekretionssystem kodieren. Dieses ermöglicht die Einschleusung von sogenannten Yop-Virulenzfaktoren in infizierte Abwehrzellen des Wirts, wodurch deren antibakteriellen Aktivitäten gehemmt werden. Nach Infektion kommt es zu wässrigen Stühlen und abdominalen Koliken. Fieber, Erbrechen und allgemeines Krankheitsgefühl können begleitend auftreten. Eine mesenteriale Lymphadenitis tritt vor allem bei älteren Kindern und Erwachsenen in Erscheinung. Ähnlich wie bei *Yersinia pseudotuberculosis* kann es im Verlauf zu Arthritiden oder einem Erythema nodosum kommen. Die Erregerisolation aus dem Stuhl gestaltet sich in der Praxis oft schwierig, bei Yersinien-assoziierten Folgeerkrankungen können serologische Untersuchungen einen Erregerkontakt indirekt nachweisen.

Während bei der Infektion mit *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* eine medikamentöse Therapie nur bei schwerwiegendem Krankheitsverlauf notwendig

ist, muss eine Infektion mit *Yersinia pestis* stets behandelt werden. Hierzu eignen sich neben Streptomycin oder Gentamycin auch Chinolone und Tetracyclin (Hof und Dörries, 2014).

2.4 Bedeutung der untersuchten *Yersinia*-Virulenzfaktoren

Im Rahmen dieser Arbeit sollten *Yersinia*-Faktoren identifiziert werden und charakterisiert werden, die eine Rolle bei der Autophagieinduktion durch Yersinien spielen können. Zum einen mussten Knockout-Mutanten für die entsprechenden Faktoren in dieser Arbeit erst erzeugt werden. Dafür wurden *Yersinia enterocolitica*-Stämme hergestellt, bei denen durch Insertion eines Antibiotikaresistenzgens eine Deletion des zu mutierenden Gens hervorgerufen wurde. Dieses Verfahren wurde eingesetzt, um die *Yersinia enterocolitica*-Proteine YpIA, Hrep und PIdA auszuschalten. Des Weiteren wurden bereits vorhandene Yersinien-Deletionsmutanten herangezogen, um zu untersuchen, wie sich die entsprechenden Knockout-Stämme im Hinblick auf Autophagieinduktion verhalten. Dabei wurde zum einen der *Yersinia enterocolitica* Stamm SOR5 untersucht, welcher eine Deletion von *hfq* trägt, sowie SOR38c, wobei es sich dabei um einen Stamm mit einer Deletion von *csrA* handelt. Ferner wurde eine *yts1E*-Mutante verwendet. Bei diesem Stamm ist die ATPase, die das Typ II Sekretionssystem Yts1 antreibt, ausgeschaltet. Zudem wurden in einem zweiten genetischen Hintergrund zwei Mutanten getestet, von denen eine eine Deletion von *fliA* trägt, die andere eine von *pilQ*. Außerdem wurde eine *Yersinia pseudotuberculosis* Mutante vergleichend zum Wildtyp untersucht, welche negativ für *phoPQ* ist.

2.4.1 Hrep

Die Protease Hrep weist eine große Ähnlichkeit zu Proteasen der Familie der eukaryoten Subtilisin/Kexin-like Proteasen auf. Das Gen befindet sich in einem Cluster von Genen, die für die Flagellenbiosynthese und Chemotaxis relevant sind. Der hohe Gehalt an Cytosin und Guanin spricht dafür, dass *Yersinia enterocolitica* das Gen via horizontalem Gentransfer erhalten hat (Heusipp et. al., 2001). Der Funktionsverlust dieser Protease führte bei Infektion von Mäusen mit einer entsprechenden Mutante zu einer deutlich verminderten Virulenz, was sich in einer erhöhten LD₅₀ zeigen lässt. Auch ist eine verminderte Zahl an überlebenden Bakterien in den Peyer Plaques nachweisbar (Young und Miller, 1997).

2.4.2 YpIA

Bei YpIA handelt es sich um eine Phospholipase A. Während die Phospholipasen C gut untersucht sind und eine Rolle bei der Virulenz von Bakterien nachgewiesen ist (Songer, 1997), ist über die Bedeutung von Phospholipasen A weniger bekannt. Mit

einer Deletionsmutante des Gens für YpIA konnte gezeigt werden, dass bei einem Fehlen von YpIA eine Infektion der Peyer Plaques und der mesenterialen Lymphknoten bei der oralen Infektion von Mäusen nicht in gleichem Maße wie mit dem Wildtyp möglich ist. Außerdem konnte bei Infektion mit sehr hohen Dosen zwar eine gleiche Anzahl von Bakterien in dem lymphatischen Gewebe detektiert werden. Allerdings zeigten sich eine deutlich schwächere inflammatorische Antwort und weniger Nekrosen bei Infektion mit der Mutante. Hierfür scheinen mehrere Ursachen möglich. Zum einen könnte die Phospholipase die Penetration der Bakterien in die Wirtszelle begünstigen, indem die Zellmembran zerstört wird. Zum anderen könnte die zelluläre Immunantwort des Wirts durch die Phospholipase gestört sein. Außerdem erscheint es möglich, dass die Phospholipase Nährstoffe in Form von Fettsäuren für das Bakterienwachstum zur Verfügung stellt (Schmiel et al., 1998).

2.4.3 PIdA

Bei *Yersinia pseudotuberculosis* wurde das Gen *pIdA* nachgewiesen, welches für eine Phospholipase kodiert. Bei anderen Bakterienspezies gelten Phospholipasen als Virulenzdeterminanten. Auch *Yersinia pseudotuberculosis* PIdA-Mutanten zeigen eine signifikant abgeschwächte Virulenz in Mäusen. So war die mediane letale Dosis bei der intravenösen Infektion 200-fach gegenüber dem Wildtyp erhöht. Es wird postuliert, dass PIdA sowohl Phosphatidylcholin, als auch Shingomyelin spalten kann, welche Hauptbestandteile der Membran von Wirtszellen sind. Dadurch könnte PIdA an der Invasion der Wirtszelle durch die Bakterien beteiligt sein (Karlyshev et al., 2001). Die Autoren vermuten, dass PIdA Effekte der Wirtsphospholipase A imitiert, was dazu führt, dass Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Wirtszellmembran abgegeben wird. Diese Freisetzung könnte als Substrat für die Generierung von Entzündungsmediatoren fungieren. Auch wurde postuliert, dass PIdA eine Rolle bei der Zellinvasion spielen könnte, wenngleich dies nicht getestet wurde. Dabei machen die Autoren für ihre Hypothese zwei Beobachtungen verantwortlich. Zum einen ist PIdA bei *Helicobacter pylori* wichtig für die Kolonisierung der Mukosa des Magens. Zum anderen ist die Aktivität der Wirtsphospholipase A2 für die Invasion von *Salmonella enterica* Serovar *Thyphimurium* essentiell. Auch wenn es sich bei diesen Erkenntnissen um Untersuchungen zu einer wirtseigenen Phospholipase handelt, könnte die bakterienoberflächennahe Phospholipase PIdA von *Yersinia* eine ähnliche Funktion haben. Die Phospholipase YpIA von *Yersinia enterocolitica* zeigt keine wesentliche Homologie zu PIdA.

2.4.4 Hfq

Bei Hfq handelt es sich um ein RNA-bindendes Protein, welches die Genexpression bei unterschiedlichen Bakterien kontrolliert. Es ist ein Co-Faktor für die Interaktion zwischen sRNA und mRNA und spielt somit auf der Ebene der Translation und post-transkriptionellen Genregulation eine bedeutsame Rolle bei der Regulation der Expression einer Vielzahl wichtiger Virulenzfaktoren (Vogel und Luisi, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Hfq auch Einfluss auf den Metabolismus von Kohlenhydraten, Stickstoff, Eisen und Fettsäuren, sowie die Stressresistenz nimmt. Des Weiteren spielt es bei der ATP-Synthese eine Rolle. Es beeinflusst die Produktion der Virulenzfaktoren Urease und Yersiniabactin. Die Hfq-Mutante zeichnet sich durch ein langsames Wachstum aus und erreicht die stationäre Wachstumsphase bei einer geringeren OD. Anders als *Yersinia pseudotuberculosis* zeigt sich bei Mutanten von *Yersinia enterocolitica* keine negative Beeinflussung des Typ III Sekretionssystems durch das Fehlen von Hfq (Kakoschke et al., 2014, Schiano et al., 2010). Das Typ III Sekretionssystem verhindert als Virulenzfaktor die Phagozytose und vermindert die inflammatorische Antwort von Wirtsabwehrzellen (Heesemann et al., 2006, Trosky et al., 2008). Yersiniabactin spielt bei der Virulenz von *Yersinia enterocolitica* als Siderophor eine Rolle, in dem es Eisen bindet und durch Wechselwirkung mit Rezeptoren wie FyuA die Eisenversorgung der Bakterien sicherstellt (Rakin et al., 1994). Bei hochvirulenten Yersinienstämmen werden Proteine, welche wichtig für die Bildung und den Import des Siderophors Yersiniabactin sind, im Bereich der HPI (high pathogenicity islands) kodiert (Schubert et al., 2004). Urease spielt in der frühen Phase der Infektion eine Rolle, indem es *Yersinia enterocolitica* das Überleben im sauren Milieu des Magens ermöglicht (De Koning-Ward und Robins-Browne, 1995). So konnte gezeigt werden, dass die Virulenz von Urease-negativen Yersinien bei der oralen Infektion von Mäusen vermindert ist. Ein Einfluss von Urease auf die Ausbildung einer reaktiven Arthritis konnte nicht nachgewiesen werden (Gripenberg-Lerche et al., 2000). Relevant für unsere hier durchgeführten Untersuchungen ist ferner, dass Hfq auch die Produktion von *Yersinia*-Invasin positiv reguliert (Kakoschke et al., 2014)

2.4.5 CsrA

CsrA ist ein Protein, welches die bakterielle Genexpression post-transkriptionell beeinflusst. Als 61-Aminosäuren langes Effektorprotein, dessen Sequenz große Ähnlichkeit zu anderen RNA-bindenden Proteinen aufweist, ermöglicht es den Abbau von spezifischen mRNA-Transkripten, in dem es nahe der Ribosomenbindungsstelle bindet. Es gehört zu der Csr (carbon storage regulator)-Familie, welche ein globales Regulationssystem der bakteriellen Genexpression darstellt. CsrA ist für die

Flagellenausbildung und Beweglichkeit von Bedeutung, indem es die Expression von *flhDC* in dessen Funktion als Masteroperon für die Flagellengene kontrolliert (Romeo, 1998). *CsrA* hat somit einen direkten Einfluss auf die Motilität von Bakterien, indem es die Regulationszentren beeinflusst, die für die Expression von Genen für den Flagellenapparat zuständig sind (LeGrand et al., 2015). Neben der Bakterienmotilität kontrolliert *CsrA* über den Virulenzregulator *RovA* auch die Expression von Invasin und damit die Invasivität der Yersinien.

2.4.6 Yts1

Yts1 ist Teil eines Genclusters, welches für ein Typ II Sekretionssystem bei hochvirulenten Bakterienstämmen von *Yersinia enterocolitica* kodiert. Es besteht eine große Ähnlichkeit zu *EpsE* von *Vibrio cholerae*, welches auch einem Typ II Sekretionsapparat angehört. Dieser ist für die Biogenese der Außenmembran und die Sekretion des Cholera-toxins erforderlich (Sandkvist et al., 1997). Bei *Yts1E* handelt es sich um ein zytoplasmatisches, energietransduzierendes Protein. Untersuchungen mit *Yersinia-yts1E*-Mutanten haben gezeigt, dass sich die Virulenz im Vergleich zum Wildtyp insoweit unterscheidet, dass aus der Leber und Milz 100-mal mehr Bakterien bei Infektion mit dem Wildtyp isoliert werden konnten als bei der *yts1E*-Mutanten, wohingegen die Bakterienzahlen in der Darmschleimhaut und den Peyer Plaques ähnlich waren. Der Unterschied ließ sich nur bei oralem Infektionsweg nachweisen, bei intravenöser Infektion zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Virulenz der Bakterien. Da eine vermehrte Transkription von *yts1* bei 37 °C erfolgt und die Bakterienzahlen sich erst in tieferen Geweben zwischen Wildtyp und Mutante unterscheiden, kann vermutet werden, dass das *Yts1*-Sekretionssystem eine Rolle in späteren Phasen der Infektion spielt (Iwobi et al., 2003). Es gibt im Wesentlichen drei Substrate, die durch *Yts1* sekretiert und durch die Zellmembran transportiert werden. Dabei handelt es sich um *ChiY*, *EngY* und *YE3650*. Alle sekretierten Proteine scheinen eine Rolle bei der Interaktion mit Polysacchariden oder deren Abbau während der Infektion oder in der Umwelt zu spielen (Shutinoski et al., 2010). *ChiY* verfügt über eine Chitinbindungsstelle und zeigt große Ähnlichkeit zu *GbpA* von *Vibrio cholerae*, welches wichtig für eine effiziente Kolonisation des Intestins ist. Es unterstützt die Bindung an epitheliale Zellen (Stauder et al., 2012). Auch *EngY* verfügt über eine Bindungsstelle für Chitin und zudem auch für Polysaccharide. In der Aminosäuresequenz von *EngY* findet sich eine Domäne der M60-like Superfamilie, welche mit der Enhancin Peptidasen Familie verwandt ist. Bei diesen handelt es sich um Zink-Metalloproteasen. Diese Peptidasen führen bei Schmetterlingen zu einem Abbau der Muzinschicht im Magen und ermöglichen so die Kolonisation mit speziellen

Baculoviren (Wang und Granados, 1997). YE3650 verfügt auch über eine Kohlenhydratbindungsstelle und Teile einer „pectate lyase superfamily“ Domäne. Bei der Pektin-Lyase handelt es sich um ein Enzym, welches auf Pflanzen einwirkt. So bewirkt es den Abbau des Pektins und im weiteren Verlauf ein Absterben der Pflanze (Henrissat et al., 1995; Xie et al., 2012). Es scheint möglich, dass dieses Enzym bei *Yersinia enterocolitica* für das Überleben außerhalb des Wirts von Bedeutung ist (von Tils et al., 2012).

2.4.7 FliA

Der „flagellar sigma factor“ FliA hemmt als übergeordneter Regulator die Transkription der Gene des Typ III Sekretionssystems (Helman, 1991). Die Expression ist temperaturabhängig und kommt bei Temperaturen von 37 °C zum Stillstand (Kapatral et al., 1996). Umgekehrt induziert FliA unter anderem die Transkription der Phospholipase YpIA und von Komponenten des Flagellenapparates. Die Expression von fliA wird wiederum durch flhDC kontrolliert, welches somit sowohl die Expression von Genen des Typ II und des Typ III Sekretionssystems beeinflusst (Schmiel et al., 2000). FliA hat über VirF einen indirekten Einfluss auf Virulenzgene, welche auf dem Virulenzplasmid kodiert sind und für die Typ III Proteinsekretion verantwortlich sind. Hier hat FliA einen inhibitorischen Effekt, so dass diese Typ III-Gene erst zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion angeschaltet werden, wenn FliA bereits temperaturbedingt inhibiert ist (Horne und Prüss, 2006). Des Weiteren wird die Expression des für die frühe Phase der Infektion notwendigen Virulenzgens *inv* durch FliA positiv beeinflusst (Young et al., 2000).

2.4.8 PilQ

PilQ gehört der Gruppe der Sekretine an, welche für die Translokation von Makromolekülen durch die Membran zuständig sind. Es ist verantwortlich für die Bildung von Typ IV Pili. PilQ ist ein Oberflächenprotein. Mutanten für pilQ von *Neisseria meningitidis* zeigen eine verminderte Expression von Pili (Tønjum et al., 1998). Diese Typ IV Pili vermitteln den ersten Kontakt der Bakterien mit den epithelialen Wirtszellen während der Infektion und sind somit relevant für die Kolonisierung (Collins et al., 2004). Bei *Francisella tularensis* konnte gezeigt werden, dass PilQ für die vollwertige Virulenz bei Infektion von Mäusen benötigt wird (Forslund et al., 2010). PilQ spielt bei *Neisseria meningitidis* zusammen mit PilG eine Rolle bei der DNA-Aufnahme im Rahmen einer Transformation von Bakterien (Frye et al., 2015).

2.4.9 PhoP

Da die meisten enteropathogenen Bakterien unter wechselnden Umgebungsbedingungen überleben müssen, haben sie Strategien entwickelt, möglichst schnell auf Veränderungen reagieren zu können. Bedingt durch die äußere Umgebung wird die bakterielle Genexpression angepasst (Beier und Gross, 2006). Ein sehr effizientes System ist das „Two-component regulatory system“ PhoP/PhoQ. Es konnte gezeigt werden, dass die Virulenz von PhoP-Mutanten von *Yersinia pseudotuberculosis* in murinen Infektionsversuchen 100-fach vermindert ist. Es wurde darauf geschlossen, dass das Überleben und die Replikation in Makrophagen wichtig für dieses Bakterium sind, da die Mutante ein vermindertes Überleben in Makrophagen zeigt (Grabenstein et al., 2004). Ferner wurde eine veränderte Effizienz in der Kolonisation lymphatischen Gewebes, sowie ein unterschiedlicher Einfluss auf die Immunantwort des Wirts für die PhoP/PhoQ-Mutante nachgewiesen. Dies lässt die Vermutung zu, dass das PhoP/PhoQ-Regulationssystem bei der Feinjustierung der Virulenz eine Rolle spielt (Pisano et al., 2014). Bei der Untersuchung von PhoP muss allerdings beachtet werden, dass in unterschiedlichen Yersinienstämmen der Einfluss auf die Virulenz offenbar sehr unterschiedlich sein kann. So scheinen bei *Yersinia pestis* CO92 Mutanten keine Veränderung in der Virulenz herbei zu führen, während bei *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 ein Fehlen von PhoP zu einer 40-fachen Zunahme der LD₅₀ gegenüber dem Wildtyp führt (Bozue et al., 2011). Demgegenüber steht allerdings eine andere Studie zu *Yersinia pestis*, die gezeigt hat, dass bei Infektion von Mäusen mit einer PhoP-Mutante die LD₅₀ 75-fach erhöht ist (Oysten et al., 2000).

3 Material und Methoden

Um die einzelnen Gene *hrep*, *pIdA* und *yplA* auszuschalten, wurde mittels molekulargenetischer Methode ein Antibiotikaresistenzgen in die DNA-Sequenzen der jeweiligen Gene eingefügt, so dass deren Expression dadurch unterbrochen und die Bildung der entsprechenden Genprodukte verhindert wurde (Erzeugung einer Deletionsmutante). Die eingebrachte Antibiotikaresistenz konnte im weiteren Verlauf dann auch für die Selektionierung der Bakterienmutanten genutzt werden. Die einzelnen Klonierungs- und Mutagenisierungsschritte fanden mithilfe unterschiedlicher Vektoren statt. Letztendlich lagen die Sequenzen der durch Insertion eines Antibiotikaresistenzgens ausgeschalteten Gene auf dem Suizidvektor pKAS46 in SM-10 *E. coli* vor. Der Suizidvektor kann in den Yersinien nicht repliziert werden. Damit erlaubt dieses Plasmid nach Konjugation in die Yersinien und Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum nur ein Überleben solcher Yersinien, bei denen eine genomische Rekombination des mutierten Gens in das Wildtyp-Ausgangsgen der Yersinien stattgefunden hat. Somit besteht bei den dann noch anwachsenden Kolonien Anhalt dafür, dass das Ausgangsgen tatsächlich ausgeschaltet ist.

Die Primer zur Amplifikation der Gene wurden auf der Basis der Sequenzen für die entsprechenden Gene aus der Gene Bank des National Center for Biotechnology designt. Mithilfe der Primer wurden Restriktionsschnittstellen für ausgewählte Restriktionsenzyme an die Randregionen der Gene eingefügt. Dadurch konnten die Sequenzen für weitere Klonierungsschritte aus dem Klonierungsvektor herausgeschnitten werden. Dabei wurden als einzufügende Restriktionsstellen bei den Genen *hrep*, *pIdA* und *yplA* die Enzyme Sac-I (#FD1133, Fermentas) und Not-I (#FD 0594) ausgewählt, weil sich diese für die Klonierung in den Suizidvektor pKAS46 eignen und keines der Gene oder den pMiniT-Vektor zerschneiden. Für die Einfügung des Antibiotikaresistenzgens wurde nach einer Restriktionsschnittstelle gesucht, welche mittig in dem jeweiligen Gen genau eine Schnittstelle hat, zur gleichen Zeit aber weder den pMiniT-Vektor oder die Sequenz, die für die Antibiotikaresistenz kodiert, verdaut. Hierbei fiel die Wahl bei dem Gen, welches für *PIdA* kodiert, auf das Restriktionsenzym Mef-I (#FD0753), bei den Genen für *YplA* und *Hrep* auf Dra-III (#FD1234). Auch hier wurden die Restriktionsschnittstellen über die Primer an die Enden der Gene für die Antibiotikaresistenzen angefügt. In *pIdA* wurde ein Gen eingefügt, welches für eine Resistenz gegenüber Spectinomycin kodiert, während in die Gene für *YplA* und *Hrep* eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol eingefügt werden sollte. Die Spectinomycinresistenz wurde dabei aus dem Plasmid pHP45Ω per

PCR amplifiziert, um es in den Klonierungsvektor pMiniT-Vektor zu überführen. Als Quelle für die Chloramphenicolresistenz wurde der Vektor pACYC184 genutzt.

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Mikroskop

Tabelle 1 Mikroskop

Fluoreszenzmikroskopie	
Anbieter	Zeiss ApoTome
Mikroskop	Axiovert 200M, Zeiss (Jena, Deutschland)
Objektiv	63x Plan-Apochromat Oil DIC, NA 1,4
Kamera	CCD AxioCam MRc 1.4MP color
UV-Lampe	HBO 100W mit Hg-Lampe
Fluoreszenz-Filter	49 (blue DAPI): G365, FT 395, BP 445/50 44 (green; AF 488 GFP): BP 475/40, FT 500, BP 530/50 43 (red; AF 568, mCherry): BP 545/25, FT 570, BP 605/70 50 (far-red; AF633, CY5): BP 640/30, FT 660, BP 690/50
Halogenlampe	100 W, Zeiss (Jena, Deutschland)
Software	Axiovision v4.8.2, Zeiss (Jena, Deutschland)

3.1.2 Allgemeine Geräte

Tabelle 2 Allgemeine Geräte

Gerät	Anbieter
Cryo-Einfriergerät	Mr. Frosty, Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Elektrophorese-/Agarosegelkammer	Agagel, Biometra (Jena, Deutschland)
Elektrophorese-/SDS-PAGE	Mini-Protean-Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) Hoefer SE 400, Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
Gefrierschrank -20 °C	Öko super, high performance, Liebherr (Kirchdorf an der Iller, Deutschland)
Gefrierschrank -80 °C	HERA freeze, Thermo fischer Scientific (Waltham, USA)
Inkubatoren	BBD 6220, B5090E, Heraeus (Hanau, Deutschland)
Kippschüttler	EB WS-10, Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Mikrowelle	Severin (Sundern, Deutschland)
NanoDrop 1000	peqLab Biotechnology (Erlangen, Deutschland)
Netzgeräte	Power Pac 1000, Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)

Gerät	Anbieter
	Blue Power 500, Serva (Heidelberg, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
PCR-Cycler	Mastercycler epgradient, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
ph-Meter	320 pH Meter, Mettler Toledo (Hamburg, Deutschland)
Photometer	Ultraspect 3000, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)
Pipetten	2, 10, 20, 100, 200 und 1000 µl Pipetten Gilson (Middleton, USA)
Röntgenkassette	Dr. Goos Suprema, Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Röntgenfilmentwickler	Curix 60, AGFA (Köln, Deutschland)
Rotationsschüttler	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Scanner	HP OfficeJet Pro 8710, Hewlett Packard (Wilmington, USA)
Sicherheitswerkbank	HERA safe, Thermo Fischer Scientific (Heidelberg, Deutschland)
Thermoblock	TDB-120, Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
UV-Transilluminator	ETX-20. M, Vilber Lourmat, Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
UV-Dokumentationssystem	Universal Hood II, Software Quantity One 4.5.0, Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Vortex	Labinco L46, Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Wasserbad	GFL Typ 1013, GFL (Würzburg, Deutschland)
Westernblot Kammer	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Zentrifugen	3K30, Sigma (Harz, Deutschland) 5810R, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Chromatographie-Papier Whatman 3MM Paper	Whatman (Mainstone, Vereinigtes Königreich)
Deckgläschen (rund, Durchmesser 12 mm)	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Eppendorf Tubes	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Parafilm M	Bemis (Neenah, USA)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Polyvinyliden-Membran	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Röntgenfilme	Super RX, Fujifilm (Tokyo, Japan)

Artikel	Hersteller
Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturplatten 24-Loch	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	Greiner (Frickenhäusen, Deutschland)

3.1.4 Antibiotika

Die Antibiotikallösungen wurden in entsprechender Konzentration in einem 15 ml Volumen angesetzt, mit 0,22 µl Filtern steril filtriert und anschließend aliquotiert. Die Antibiotikallösungen wurden dann bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4 Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration	Lösungsmittel	Hersteller	Stock
Ampicillin	100 µg/µl	Ampu-H ₂ O	Sigma A9518	1000X
Chloramphenicol	20 µg/µl	70%-EtOH	Sigma C0378	1000X
Gentamycin	2 µg/µl	Ampu-H ₂ O	Sigma G1264	100X
Kanamycin	50 µg/µl	Ampu-H ₂ O	Sigma K4000	1000X
Nalidixinsäure	60 µg/µl	Ampu-H ₂ O	Sigma N4382	1000X
Spectinomycin	50 µg/µl	Ampu-H ₂ O	Sigma S9007	1000X
Tetracyclin	20 µg/µl	70%-EtOH	Sigma T3383	1000X

3.1.5 Selektivagarplatten

Zur Ausplattierung und Selektion der transformierten Bakterien wurden Selektivagarplatten benötigt. Dazu wurde LB-Agar angesetzt und autoklaviert. Nachdem dieser dann handwarm abgekühlt war, wurde das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt und die Platten wurden gegossen. Nach Trocknung wurden diese dann bei 4 °C gelagert.

Tabelle 5 Selektivagarplatten

Antibiotikum	Bakterienstämme
Ampicillin	-NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> + pMiniT-Vektor mit Hrep, PldA, YpIA -NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> + PUC 19
Ampicillin + Chloramphenicol	-NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> + pMiniT-Vektor mit Gen für Chloramphenicolresistenz -NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> + pMiniT-Vektor mit Gen für Hrep und Chloramphenicolresistenz -NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> + pMiniT-Vektor mit Gen für YpIA und Chloramphenicolresistenz

Antibiotikum	Bakterienstämme
Ampicillin + Spectinomycin	-NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> + pMiniT-Vektor mit Gen für Spectinomycinresistenz -NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> + pMiniT-Vektor mit Gen für PldA und Spectinomycinresistenz
Chloramphenicol	DH5α + pACYC 184 (Chloramphenicolresistenzkassette)
Kanamycin + Ampicillin	-S-17-1 + pKAS46-Vektor -SM-10 + pKAS46-Vektor mit YplA
Kanamycin + Chloramphenicol	-SM-10 + pKAS46 mit Hrep und Chlor. -SM-10 + pKAS46 mit YplA und Chlor.
Kanamycin + Spectinomycin	-SM-10 + pKAS46 mit PldA und Spect.
Nalidixinsäure	WA-C
Nalidixinsäure + Chloramphenicol	WA-C mit ausgeschaltetem Hrep und YplA
Nalidixinsäure + Spectinomycin	WA-C mit ausgeschaltetem PldA
Spectinomycin	DH5α + pHP45Ω (Spectinomycinresistenzkassette)

3.1.6 Molekulargewichtsstandard

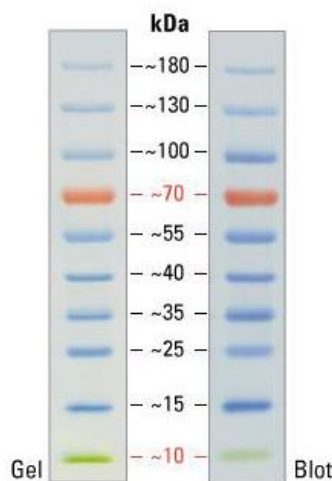


Abbildung 2 PageRuler Plus Prestained Protein Ladder Thermo Scientific (#26619).

3.1.7 Primer

3.1.7.1 PldA

Primer zur Amplifikation von pldA und zum Einfügen der Restriktionsstellen:

FW

AAA**GCGGCCGC**ATGGGTAGATTTTGGCAGATT

RV

AAAGAGCTCTTAAAGGACATCATTCAACATG

Primer für die Amplifikation der Ω Kasette (Spectinomycin-Resistenz)

FW

AAA**CAATTG**ACAGAAATGCCTCGACTTCG

RV

AAA**CAATTG**CCGGATCAGCTTAGTAAAGCC

3.1.7.2 YpIA

Primer zur Amplifikation von yplA and zum Einfügen der Restriktionsstellen:

FW

AAAGCGGCCGCGATGAGTATATCTGTTAGTTTAGCCCG

RV

AAAGAGCTCTCAGGCATACTGCCGCTCCC

Primer zur Amplifikation der Chloramphenicolresistenzkasette:

FW

AAA**CAATTG**TGACGGAAGATCACTTCGCAG

RV

AAA**CAATTG**TTGAGAAGCACACGGTCAC

3.1.7.3 Hrep

Primer zur Amplifikation von hrep und zum Einfügen der Restriktionsstellen:

FW

AAAGCGGCCGCGATGAAACGATTTGACGTTACTTATG

RV

AAA**GAGCTC**TTATTTATGGCACCCCTACCATTTC

Primer zur Amplifikation der Chloramphenicolresistenzkasette:

FW

AAA**CACCATGTG**TGACGGAAGATCACTTCGCAG

RV

AAA**CACCATGTG**TTGAGAAGCACACGGTCAC

Primer zur Amplifikation von hrep+Chloramphenicolresistenzkasette aus dem pMiniT-Vektor und zum Einfügen der Restriktionsstelle von Sac-I:

RV

AAAGAGCTCGGCTTTGCCCGCATTGACTCGC

Primer zur Amplifikation von hrep+Chloramphenicolresistenzkasette aus dem pMiniT und zum Einfügen der Restriktionsstelle von Not-I:

FW

AAAGCGGCCGCGATGAAACGATTTGACGTTACTTATG

3.1.8 Verwendete Bakterienstämme

Neben den Yersinienmutanten, bei denen eigens für vorliegende Arbeit die Gene für die Phospholipase PldA und die Protease Hrep durch Einbringen einer

Antibiotikaresistenzkassette ausgeschaltet wurden, wurden bereits vorhandene, zum Teil mutierte Stämme in den Zellkulturexperimenten zur Infektion herangezogen.

Dabei handelte es sich zum einen um den *Yersinia enterocolitica*-Stamm WA-C. WA-C ist eine Serotyp O8 Wildtyp-Yersinie, der das pYV-Virulenzplasmid von *Yersinia enterocolitica* fehlt. WA-C ist Ausgangsreferenzstamm für die PldA- und die Hrep-Mutante und für eine Reihe weiterer Yersinienmutanten. Darunter befand sich der Stamm WA-C SOR5, der eine Deletion in dem Gen hfg trägt, und der Stamm WA-C SOR38c, der eine Deletion in dem Gen csrA trägt. Beide Stämme wachsen langsamer und produzieren zudem weniger Invasin als der Wildtyp. Das Bakterium WA-C yts1E trägt eine Insertion in der ATPase, die dem Typ-II-Sekretionssystem Yts1 Energie liefert. Zum anderen wurden Abkömmlinge des *Yersinia enterocolitica* Serotyp O8-Stammes 8081 untersucht. Neben dem JB580c-Ausgangsstamm wurde eine Mutante analysiert, die eine Deletion im Gen fliA trägt und somit nicht beweglich ist. Außerdem wurde eine Mutante mit einer Deletion in dem Gen pilQ untersucht, welche dadurch keine Typ IV Pili bilden kann. Des Weiteren wurde ein *Yersinia pseudotuberculosis*-Stamm (Wildtyp IP32953) und eine davon abgeleitete phoPQ-negative Mutante (YPIP06) untersucht.

Tabelle 6 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Resistenz	Referenz
<i>Yersinia enterocolitica</i>			
WA-C	Derivat von WA mit fehlendem Virulenzplasmid	Nalidixinsäure	Heesemann und Kaufs, 1983
WA-C SOR5	WA-C mit Deletion in hfg	Nalidixinsäure	Kakoschke et al., 2014
WA-C SOR38c	WA-C mit Deletion in csrA	Nalidixinsäure	
WA-C yts1E	WA-C mit Insertion in der ATPase für das Typ II Sekretionssystem Yts1	Kanamycin	
WA-C hrep	WA-C mit ausgeschaltetem hrep	Chloramphenicol Nalidixinsäure	diese Arbeit
WA-C pldA	WA-C mit ausgeschaltetem pldA	Spectinomycin Nalidixinsäure	diese Arbeit
JB580c	Derivat von 8081 mit fehlendem Virulenzplasmid	keine	
JB580c fliA	JB580c mit Deletion	Chloramphenicol	

Bakterienstamm	Beschreibung	Resistenz	Referenz
	in <i>fliA</i>		
JB580c <i>pilQ</i>	JB580c mit Deletion in <i>pilQ</i>	Chloramphenicol	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>			
IP32953	Wildtyp		
YPIP06	IP32953 <i>phoPQ</i> -negativ		
<i>Escherichia coli</i>			
NEB 10-beta	Derivat von DH10B™		New England BioLabs (#C3019)
Top10	<i>mcrA</i> , Δ (<i>mcrBC-hsdRMS-mrr</i>), <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , Φ 80/ <i>lacZ</i> ΔM15, <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>araD139</i> , F(<i>lacIq</i> , Tn10(Tetr)), <i>galU</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galK</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697	keine	Invitrogen (Karlsruhe)
DH5-alpha	ϕ 80/ <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrAB</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>phoA</i>	keine	Hanahan, 1983

3.1.9 Verwendete Zelllinien

Tabelle 7 Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Kulturbedingungen	Referenz
HeLa	Epitheliale Zelllinie aus humanem Adenokarzinom	DMEM, 10 % FBS, 1 % MEM nicht essentielle Aminosäuren	Scherer et al., 1953
m-IC _{cl2}	Epitheliale Zelllinie aus murinem Darmtrakt	50 % Ham's F12, 50 % DMEM, 2 % FBS, 2 mM Glutamine, 20 mM HEPES, 5 µg/mL Insulin, 10 ng/mL EGF, 1x10 ⁻⁹ M Triiodothyronine, 5 µg/mL Transferrin, 60 nM Selenium, 5x10 ⁻⁸ M Dexamethasone, 2.24 % D-Glucose (10 % solution)	Bens et al., 1996

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Anzucht von Bakterien

Die Kulturen der *E. coli*-Stämme, die zur Plasmidpräparation mithilfe des MidiPrep Kits herangezogen wurden, wurden in Erlenmeyerkolben passender Größe mit 100 ml Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium mit entsprechender Zugabe eines Antibiotikums angesetzt. Bei Verwendung des MiniPrep Kits wurden Kulturen mit 5 ml LB-Medium verwendet. Dazu wurde das Medium mit einer von einer Agarplatte mit einer sterilen Impfschlinge aufgenommenen Bakterienkolonie beimpft. Die Kulturen wurden anschließend bei 37 °C für 12-16 Stunden bei 180 rpm inkubiert.

3.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien für die Plasmidtransformationen wurde die Rubidiumchlorid-Methode verwendet. Dazu wurde zunächst eine 20 ml-Übernachtskultur bei 37° C aus einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes angesetzt. Am nächsten Morgen wurde eine Subkultur im Verhältnis 1:100 in 200 ml LB-Medium plus 0,8 ml 1 M MgSO₄ und 2 ml 1 M KCl angelegt. Diese Subkultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD von 0,5 bei 600 nm inkubiert. Die Subkultur wurde dann aus dem Erlenmeyerkolben in Falcon-Tubes überführt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C. Nachdem der Überstand dekantiert war, wurden die Pellets in je 15 ml TFB1-Puffer (10 mM CaCl₂, 30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glycerin, pH mittels CH₃COOH auf 5,8 eingestellt) resuspendiert und für 70 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 3000 rpm bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und die Falcon-Tubes wurden kurz kopfüber zum Abtropfen der restlichen Flüssigkeit abgestellt. Nun wurden den Pellets je 2 ml TFB2-Puffer (10 nM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 10 mM Mopslösung, 15 % Glycerin) hinzugefügt. Die Resuspension erfolgte dann durch vorsichtiges Schwenken der Falcon-Tubes in Eiswasser. Nach vollständiger Lösung der Pellets wurden je 200 µl der kompetenten Bakterien mittels 5 ml-Pipette in Eppendorf-Tubes aliquotiert und sofort in flüssigen Stickstoff verbannt. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

3.2.1.3 Transformation

Bei allen Transformationen wurde nach dem folgenden Protokoll verfahren. Ausschließlich die Menge an Ligationsmischung wurde verändert. Während bei der Ligation der PCR-Produkte mit dem pMiniT-Vektor 2 µl Ligationsmischung verwendet

wurden, wurde bei den Ligationen nach einem Verdau mit Restriktionsenzymen 10 µl Ligationsmischung für 50 µl kompetente Zellen verwendet.

Zunächst wurden die kompetenten *E. coli* auf Eis für 10 Minuten aufgetaut und anschließend zu je 50 µl in entsprechend beschriftete Eppendorf-Reagenzgefäße aliquotiert. Es wurden 2 µl beziehungsweise 10 µl Ligationsansatz hinzugefügt und der Ansatz zügig vermischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden wurden die Bakterien erneut für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Hinzugabe von 950 µl SOC-Medium erfolgte eine einstündige Inkubation der Bakterien bei 37 °C mit 250 rpm. Anschließend wurden die Bakterien auf Selektivagarplatten ausplattiert.

Bei der Verwendung des pMiniT- beziehungsweise pUC19-Vektors wurde der NEB 10-beta *E. coli*-Stamm als kompetentes Bakterium verwendet, während für die Transformation des Suizidvektors pKAS46 *E. coli* SM-10 genutzt wurde.

3.2.1.4 Plasmidpräparation

Für die Gewinnung der Plasmid-DNA mit Genen, welche für die Antibiotikaresistenzen kodieren, sowie des leeren Suizidvektors pKAS46 wurde das Kit Nucleobond® PC 100 (Macherey Nagel) nach Herstellerprotokoll verwendet. Da es sich bei den Plasmiden um low-copy-Plasmide handelt, wurde die MidiPrep gemäß dem dafür angegebenen Protokoll durchgeführt.

Da es sich bei dem Vektor pACYC184, welcher die Chloramphenicolresistenz trägt, um einen low-copy-Plasmid handelt und sich dieser nicht effizient mittels MidiPrep aufreinigen ließ, wurde folgendes Protokoll zur Gewinnung des Plasmids verwendet.

Zunächst wurden 30 ml YT-Medium mit Chloramphenicol mit einer einzelnen Kolonie des *E. coli*-Stammes mit dem Plasmid pACYC184 beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD von 0,6 bei 600 nm inkubiert. Anschließend wurde eine Subkultur im Verhältnis 1:20 mit entsprechendem Antibiotikum im Medium angesetzt. Diese wurde dann bei 300 rpm für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nun wurde noch so viel Chloramphenicol hinzugefügt, dass die Endkonzentration 20 µg/ml beträgt und die Kultur für weitere 12-16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur dann bei 4100 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in STE-Puffer resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben konnten die Bakterien dann zur Plasmidextraktion mittels Midi-Prep verwendet werden (Sambrook, Russell, 2001).

Bei den weiteren Plasmidpräparationen, die für die Klonierung notwendig waren, war die Ausbeute bei Verwendung eines MiniPrep ausreichend, so dass hierfür das Qiagen Plasmid Kit nach Anleitung des Herstellers Verwendung fand.

3.2.1.5 Klonierungsschritte

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte, die zur Klonierung nötig waren, chronologisch dargestellt. Um die entsprechenden Gene, die Gegenstand der Untersuchung werden sollten, zu gewinnen, wurden diese mit passenden Primern aus dem Donorstamm WA-C amplifiziert. Die DNA von WA-C wurde dafür mittels TE-boil-Extraktion (Jing-Long et al., 2008) vorbereitet. Dazu wurde zunächst eine Übernachtskultur mit LB-Medium und Nalidixinsäure mit WA-C beimpft und bei 27 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann bei 3000 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 200 µl TE-boil Puffer resuspendiert und gut vermischt. Die Resuspension wurde dann für eine Minute bei 100 °C inkubiert. Darauf folgten 3 Zyklen mit abwechselnder Inkubation bei -70 °C für 3 Minuten und 100 °C für 2 Minuten. Anschließend wurde die Suspension für 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und 100 µl des Überstandes wurden für die PCR abgenommen.

Tabelle 8 TE-boil Puffer

TE-boil Puffer	
0,01 M	Tris-HCl (pH 8)
1 mM	EDTA

In einem ersten Schritt sollten die Primer in ihrer Funktion überprüft werden. Hierfür wurde zunächst die DNA-Polymerase Dream Taq (#EP 0702, Thermoscientific) verwendet. Diese verfügt über keine proof-reading-Funktion, was allerdings zur alleinigen Überprüfungsreaktion ausreichend ist. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf die zu erwartende korrekte Größe hin überprüft.

Nachdem die DNA mittels TE-boil-Extraktion für die PCR zur Klonierung der Gene in den pMiniT-Vektor vorbereitet war, wurde die DNA mithilfe der Polymerase Ultra Pfu-II (Agilent Technologies #600850) mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde dann nach Herstellerprotokoll in den pMiniT-Vektor ligiert und anschließend in NEB 10-beta kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert.

Die transformierten Bakterien wurden anschließend auf Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde die Resistenz des Vektors gegenüber Ampicillin ausgenutzt. Bei diesem Vektor handelt es sich um einen Vektor, der kein

Bakterienwachstum erlaubt, wenn sich der Vektor ohne Insert geschlossen hat. Somit ist sichergestellt, dass die wachsenden Bakterienkolonien die Plasmide mit dem gewünschten Insert tragen. Dennoch wurde eine Probe-PCR durchgeführt, um zu kontrollieren, welche Länge die Inserts haben. Dabei haben die Primer für den pMiniT-Vektor Verwendung gefunden. Es zeigte sich jeweils die erwartete Größe der DNA-Abschnitte, so dass zur letztendlichen Verifizierung eine Sequenzierung der Plasmide durchgeführt wurde. Dafür wurden die Plasmide mittels MiniPrep extrahiert.

Nachdem die entsprechenden Gene in den pMiniT-Vektor kloniert waren, wurde das Plasmid mit dem Gen *pIdA* mit dem Restriktionsenzym Mef-I, die Plasmide mit den Genen *yplA* und *hrep* mit Dra-III verdaut. Ebenso wurden die Vektoren mit den einzufügenden Antibiotikaresistenzgenen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die Vektoren mit den Genen für *pIdA*, *yplA* oder *hrep* wurden dabei zusätzlich mit einer Phosphatase (FastAP #0651) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, um eine spontane Religation zu vermeiden. Anschließend wurden dann die Sequenz, die für die entsprechende Antibiotikaresistenz kodiert, und der pMiniT-Vektor, der das entsprechende Gen trägt, mittels T4 Ligase (M0202, NEB) miteinander ligiert. Der Ligationsansatz wurde in NEB 10-beta kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert und die Bakterien wurden auf Selektivagarplatten ausplattiert.

Bei dem Gen für die Phospholipase *YplA* sind mehrfache Versuche der Ligation im pMiniT-Vektor auch unter Verwendung unterschiedlicher kompetenter *E. coli*-Stämme (NEB 10-beta competent *E. coli*, Top 10, DH5-alpha) fehlgeschlagen. Denn, obwohl das Gen nach der Ligation mit dem pMiniT-Vektor korrekt sequenziert werden konnte, fehlten nach Restriktion und Ligation mit der Sequenz für die Antibiotikaresistenz große Teile des Gens. Daher entschied man sich dafür, das Gen aus dem pMiniT in den eigentlich erst in einem späteren Schritt Verwendung findenden Suizidvektor pKAS46 zu klonieren und in diesem Vektor das Antibiotikaresistenzgen einzufügen. Da der Suizidvektor nicht vollständig sequenziert ist, musste mit einem Probeverdau getestet werden, dass dieser nicht von dem verwendeten Enzym Dra-III verdaut wird. Leider zeigten sich hier nach dem Verdau in einem 1%igen Agarosegel drei Banden. Daher konnte der Suizidvektor nicht direkt verwendet werden, um die Antibiotikaresistenz in das Gen zu klonieren. Es wurde dann in einem nächsten Schritt ausgenutzt, dass sich außerhalb der Schnittstellen für Sac-I und Not-I, die das Gen einschließen, auf dem Suizidvektor noch weitere Schnittstellen für Restriktionsenzyme befinden. Es wurde neben Sac-I noch ein weiteres Enzym ausgewählt, welches innerhalb des Gens keine Schnittstelle hat. Außerdem musste noch ein mögliches Übergangsplasmid gefunden werden, in den das Gen nach Verdau aus dem Suizidvektor kloniert werden konnte.

Als Plasmid wurde pUC19 gewählt, das sowohl über eine Schnittstelle für Sac-I als auch Xba-I verfügt. Zur Gewinnung und Vermehrung des Plasmids wurde dieses aus dem NEB PCR Cloning Kit in einen NEB 10-beta kompetenten *E. coli* transformiert und mittels MiniPrep extrahiert. Es wurde ein Verdau von pKAS46 mit dem yplA-Gen sowie dem Vektor pUC19 mit den Restriktionsenzymen Sac-I und Xba-I (# FD 0685) durchgeführt. Der Verdau wurde dann auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 60 V für zirka 2 Stunden aufgetrennt. Die gewünschte DNA-Sequenz wurde anhand ihrer Größe identifiziert und ausgeschnitten. Nach der Aufreinigung aus dem Gel wurde der pUC19-Vektor mit der Sequenz für YplA ligiert, in NEB 10-beta kompetenten *E. coli* transformiert und die Bakterien wurden auf Selektivagarplatten ausplattiert. Nach Subkultur der Kolonien und Überprüfung des Inserts mittels PCR wurde das Plasmid mittels MiniPrep für einen Verdau mit Dra-III präpariert, um die DNA-Sequenz einzufügen, die für die Antibiotikaresistenz kodiert. Es wurde hier wie bei den anderen Verdaureaktionen mit anschließender Ligation und Transformation verfahren.

Nach Subkultivierung und Probe-PCR zeigte eine Sequenzierung, dass sich die erwarteten Sequenzen, bestehend aus den jeweiligen, durch Einfügung eines Antibiotikaresistenzgens unterbrochenen Genen, in dem pMiniT-Vektor beziehungsweise pUC19-Vektor befanden. Allerdings war bei der Ligation des pMiniT-Vektors mit der DNA-Sequenz, die für das Gen hrep kodiert, und der Sequenz für die Antibiotikaresistenz die Restriktionsstelle für das Enzym Sac-I verloren gegangen. Es erfolgte erneut eine PCR mit einem neu designten Primer, um die Restriktionsstelle wieder einzufügen. Nach Ligation des PCR Produktes mit dem pMiniT-Vektor wurde eine Transformation in NEB 10-beta kompetente *E. coli* durchgeführt. Nach anschließender erfolgreicher Sequenzierung konnte mit dem nächsten Klonierungsschritt begonnen werden. Dazu sollten die ausgeschalteten Gene mit der eingefügten Antibiotikaresistenz jeweils in den Suizidvektor pKAS46 überführt werden.

Dafür wurde das Plasmid mittels MidiPrep mit dem entsprechenden Protokoll gewonnen, da es sich hierbei um ein low-copy-Plasmid handelt. Die zwei pMiniT-Vektoren mit den entsprechenden Genen sowie der pUC19-Vektor wurden mittels MiniPrep für den Verdau präpariert. Der Verdau wurde mit den Restriktionsenzymen Sac-I und Not-I durchgeführt. Die mit der Antibiotikaresistenz unterbrochenen Gene sowie der verdaute Suizidvektor pKAS46 werden nach Verdau bei 37 °C für 35 Minuten mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aufgereinigt. Es erfolgte die Ligation des Plasmids und der Sequenzen mit den ausgeschalteten Genen mit anschließender Transformation in SM-10 *E. coli*. Die Bakterien wurden auf Selektivagarplatten mit Kanamycin (Suizidvektor und SM-10 *E. coli*) sowie entweder

Spectinomycin (unterbrochenes Gen für PldA) oder Chloramphenicol (unterbrochene Gene für Hrep und YplA) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Subkultivierung und Größenüberprüfung mittels PCR wurden die Plasmide mithilfe eines MiniPreps für die Sequenzierung präpariert. Hierdurch wurden die Sequenzen auf ihre Richtigkeit überprüft.

Anschließend wurde der Suizidvektor pKAS46, der sich nun in dem SM-10 *E. coli* befand, in den *Yersinia enterocolitica* Stamm WA-C konjugiert. Nachdem die angewachsenen Kolonien zwei- bis dreimal subkultiviert worden waren, wurden die Bakterien mittels PCR auf das Vorhandensein des Gens mit der eingefügten Antibiotikaresistenz und damit auf die erfolgreiche Mutation des Ausgangsgens überprüft. Außerdem wurden die Bakterien auf CIN-Platten als Selektivmedium für Yersinien ausgestrichen, um zu verifizieren, dass es sich bei den entsprechend angewachsenen und resistenten Bakterien tatsächlich um Yersinien handelte.

3.2.1.6 Konjugation

Zur Überführung des Suizidvektors pKAS46 mit den entsprechenden Inserts von dem SM-10 *E. coli*-Stamm in den Yersinienstamm WA-C wurde eine Konjugation durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine 5 ml-Bakterienkultur mit LB-Medium und den entsprechenden Antibiotikazusätzen angesetzt. WA-C wurde mit Nalidixinsäure bei 27 °C und SM-10 mit den unterschiedlichen Plasmiden mit Kanamycin und Spectinomycin oder Chloramphenicol bei 37 °C für 12 Stunden inkubiert. Aus der Kultur von WA-C wurde je 1 ml mit 1 ml der SM-10 Kultur vermischt und anschließend 2 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in dem restlichen Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde als Tropfen auf eine Blutagarplatte gegeben, welche dann für zirka 5 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend wurden mittels Impfschlinge Bakterien von der Platte aufgenommen, in 1000 µl LB-Medium resuspendiert und in verschiedenen Mengen auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden für 2 Tage bei 27 °C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden dann zunächst auf einer frischen Selektivagarplatte neu ausgestrichen. Es erfolgte nach je eintägiger Inkubation bei 27 °C eine drei- bis viermalige Subkultivierung der potentiellen Mutanten, um sicher zu stellen, dass nicht-mutierte Ausgangsgen-DNA möglichst vollständig eliminiert worden war. Die Verifizierung, dass die entsprechenden Gene im Genom der Bakterien nun durch die eingefügte Antibiotikaresistenzkassette unterbrochen waren, erfolgte, wie auch in den anderen Schritten, durch PCR mit den entsprechenden Primern.

Da die Konjugation und Mutation nach oben stehendem Protokoll nur für die Gene *pIdA* und *hrep* erfolgreich war, wurden nach mehrmaliger Wiederholung für das Gen *yplA* noch zwei weitere Protokolle für die Konjugation des Suizidplasmids angewendet. Dabei fand zunächst eine Anzucht des Donor- und Rezipientenstamms auf Agarplatten mit entsprechender Antibiotikazugabe statt. Am nächsten Tag wurde dann eine Kultur in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht angesetzt. Dabei wurde der Donorstamm *E. coli* bei 37 °C kultiviert, während die Wachstumstemperatur bei WA-C 27 °C betrug. Die Kultur des Donors wurde in Zehnerschritten auf bis zu 10^{-3} verdünnt und anschließend wurden je 100 µl 10^2 /ml und 10^3 /ml Donorzellen mit 100 µl der unverdünnten Rezipientenkultur vermischt. Es folgte eine 30-minütige Kultivierung bei 37 °C unter mäßigem Schütteln. Die Konjugation wurde dann durch kräftiges Mischen mit dem Vortex beendet und das Medium wurde anschließend auf Agarplatten mit Nalidixinsäure und Chloramphenicol ausgestrichen. Es erfolgte die Inkubation über Nacht bei 27 °C (Phornphisutthimas et al., 2007).

Je 1 ml der Übernachtskulturen von Donor- und Rezipientenstamm wurden in ein auf 37 °C vorgewärmtes Röhrchen zusammengegeben und anschließend im Wasserbad bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit einer Impfschlinge aufgenommen und auf Selektivagarplatten ausgestrichen, die dann für zwei Tage bei 27 °C inkubiert wurden (Mikrobiologie, Praktikum für Studenten der Humanmedizin, 2013).

Wie bei Verwendung des ursprünglichen Protokolls zeigten sich auch hier wiederholt Kolonien, die zwar gegen Chloramphenicol resistent waren, allerdings keine Unterbrechung beziehungsweise Mutation des *yplA*-Gens aufwiesen. Vielmehr zeigten die durchgeführten PCR im Vergleich zwischen den erhaltenen Stämmen und dem Ausgangsstamm WA-C immer die ursprüngliche Ausgangslänge des Gens an, welches darauf hinwies, dass die Mutation nicht erfolgreich war. Da es somit nicht möglich war, Mutanten für *yplA* zu entwickeln, musste in den folgenden Versuchsschritten darauf verzichtet werden, die Auswirkungen des Fehlens von YplA in *Yersinia enterocolitica* auf die Induktion der Autophagie zu untersuchen.

3.2.1.7 Restriktionsverdau

Für den Verdau der durch MidiPrep beziehungsweise MiniPrep gewonnenen Plasmide wurden die FastDigest Enzyme (Thermoscientific) verwendet. Die Verdauansätze wurden dann je nach verwendetem Enzym bei 37 °C für entweder 22 Minuten für den Verdau mit Dra-III oder Mef-I oder für 35 Minuten bei Verwendung der Enzyme Sac-I, Not-I und Xba-I inkubiert. Es wurde stets darauf geachtet, die unspezifische

Staraktivität nicht zu überschreiten. Bei Verdau mit nur einem Restriktionsenzym wurden die Vektoren, in die die Sequenz für die Antibiotikaresistenz kloniert werden sollte, zusätzlich in dem Restriktionsansatz mit alkalischer Phosphatase (Fast AP #0651) behandelt, um eine spontane Religation des Plasmids zu vermeiden. Dies war notwendig, da der Verdau anders als in den anderen Klonierungsschritten mit nur einem Restriktionsenzym durchgeführt wurde. Der Restriktionsansatz wurde nach der Inkubation auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, damit anschließend die gewünschten DNA-Fragmente ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert werden konnten.

Tabelle 9 Restriktionsansatz für den Verdau von pUC19 und pKAS46 yplA

	pUC19	pKAS46 yplA
FD Green Buffer (10X)	5 µl	5 µl
FD Sac-I (#FD)	2,5 µl	2,5 µl
FD Xba-I (#FD0685)	2,5 µl	2,5 µl
DNA (5 µg)	17,4 µl	26,1 µl
H ₂ O	22,6 µl	13,9 µl
Totalvolumen	50 µl	50 µl

Tabelle 10 Restriktionsansatz für den Verdau von pMiniT hrep, pMiniT Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette) für hrep, pUC19 yplA, pMiniT Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette) für yplA, pMiniT pldA und pMiniT Spect. (Spectinomycinresistenzkassette) für pldA

	pMiniT hrep	pMiniT Chlor. hrep	pUC19 yplA	pMiniT Chlor. yplA	pMiniT pldA	pMiniT Spect. pldA
FD Green Buffer (10X)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
FD Mef-I (#FD0753)	-	-	-	-	5 µl	5 µl
FD Dra-III (#FD1234)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	-	-
DNA (5 µg)	19,5 µl	19,7 µl	15 µl	16,8 µl	35 µl	35,4 µl
Fast AP	5 µl	-	5 µl	-	5 µl	-
H ₂ O	15,5 µl	20,5 µl	20 µl	23,2 µl	-	4,6 µl
Totalvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Tabelle 11 Reskriktionsansatz für den Verdau von pMiniT hrep + Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette), pMiniT pldA + Spect. (Spectinomycinresistenzkassette), pUC19 yplA + Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette) und pKAS46

	pMiniT hrep + Chlor.	pMiniT pldA + Spect.	pUC19 yplA + Chlor.	pKAS46
FD Green Buffer (10X)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
FD Sac-I (#FD1133)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
FD Not-I (#FD0594)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
DNA (5 µg)	10,1 µl	11,7 µl	40 µl	6,6 µl
H ₂ O	29,9 µl	28,3 µl	-	33,4 µl
Totalvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

3.2.1.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung der DNA anhand ihrer molekularen Masse. Dazu wird die Eigenschaft der DNA, durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen zu sein, genutzt. Denn durch die negative Ladung wandert die DNA im elektrischen Feld zur Anode. Dabei ist die Wanderungsrate der DNA im Agarosegel von der Größe des Moleküls, dem angelegten Strom und der Konzentration des Gels abhängig (Towbin, 1993, Adkins & Burmeister, 1996).

Die verdaute Plasmid-DNA oder die DNA-Fragmente, die durch PCR amplifiziert wurden, wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt. Dazu wurde die Agarose in 1X TAE-Puffer gelöst und anschließend in der Mikrowelle zum Sieden gebracht. Nachdem die Flüssigkeit handwarm abgekühlt war, wurde *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution* nach Angaben des Herstellers zugegeben und anschließend in die Gelkammer mit entsprechendem Kamm gegossen. Bis zur Verwendung ließ man das Gel bei Raumtemperatur abkühlen und aushärten.

Zum Auftragen der DNA wurde diese im Verhältnis 5:1 mit 6X Probenpuffer vermischt und in die Kammern gegeben. Zur Darstellung der Molekulargewichte wurde stets ein Molekulargewichtsstandard (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb DNA Ladder) mitlaufen gelassen. Als Laufpuffer wurde 1X TAE-Puffer verwendet. Die angelegte Spannung variierte je nach späterer Verwendung der DNA-Fragmente zwischen 50 und 90 V. Für die Geldokumentation diente UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm.

Tabelle 12 1X TAE Puffer

1X TAE-Puffer	
40 mM	Tris-Acetat, pH 8,3
10 mM	EDTA

Tabelle 13 6X Probenpuffer für Agarosegelelektrophorese

6X Probenpuffer Agarosegelelektrophorese	
0,25 %	Bromphenolblau
0,1 M	EDTA
30 %	Glycerin

3.2.1.9 Elution von DNA aus Agarosegel

Um die verdauten DNA-Fragmente für Klonierungsschritte verwenden zu können, wurden diese mittels Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mussten anschließend aus dem Gel extrahiert werden.

Zu diesem Zweck wurde die gewünschte, durch Verwendung der RedSafe™ *Nucleic Acid Staining Solution* sichtbar gemachte Bande unter UV-Licht knapp aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mithilfe des NucleoSpin Extract II-Kits (Macherey Nagel) nach Herstellerprotokoll eluiert und in 50 µL sterilem H₂O resuspendiert.

3.2.1.10 PCR ohne Proof-reading-Funktion zur Überprüfung des Inserts

Um die Inserts in den Plasmiden nach den einzelnen Klonierungsschritten auf die richtige Größe überprüfen zu können, wurden Probe-PCRs durchgeführt. Dazu wurden von den subkultivierten Kolonien mit einer Impfschlinge Bakterien von der Agarplatte aufgenommen und in 500 µl H₂O gelöst. Die DNA wurde anschließend bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert und die Suspension dann für 2 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Als Polymerase fand dann die Dream Taq Polymerase (#EP 0702, Thermoscientific) Verwendung. Hierbei wurden 5 µl Bakteriensuspension und 20 µl PCR-Mix eingesetzt. Die PCR wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Primer dienten je nach Klonierungsschritt entweder die Primer des pMiniT-Vektors oder die Primer für die entsprechenden Gene. Die Auftrennung der DNA erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

Tabelle 14 PCR Mix zur Überprüfung der Inserts durch Dream Taq Polymerase

20 µl PCR Mix	
2,5 µl	10X Dream Taq Buffer
0,5 µl	dNTPs (25 nM)
0,5 µl	Forward Primer (10 nM)
0,5 µl	Reverse Primer (10 nM)
15,9 µl	steriles H ₂ O
0,1 µl	Dream Taq Polymerase

3.2.1.11 Ligation

Bei den Klonierungsschritten wurden PCR-Produkte zum einen mit einem bereits aufgereinigten linearisierten Vektor und zum anderen mit verdauten und aus Agarosegel aufgereinigten Plasmiden ligiert.

Für die Ligation der PCR-Produkte mit dem pMiniT-Vektor wurde das NEB PCR Cloning Kit verwendet. Dazu wurden 25 ng linearisierter pMiniT-Vektor, das Insert in einem Insert-Vektor-Verhältnis von 3:1 als PCR-Produkt, 5 µl Cloning Master Mix (2X) und H₂O bis zu einem Volumen von 10 µl vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis und die Transformation des Ansatzes.

Folgendes Protokoll fand bei allen Ligationen Verwendung, wenn DNA zuvor nach Verdau aus dem Agarosegel aufgereinigt wurde. Eine Reaktionsmischung bestehend aus 1 µl T4 Ligase (M0202, NEB) und 2 µl T4 Ligase Buffer (10X) wurde mit 50 ng Vektor-DNA und Insert-DNA im Verhältnis 1:10 angesetzt, wobei der Ansatz auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt wurde. Die Menge der Insert-DNA errechnete sich dabei wie folgt: $\text{ng Insert} = 10 \times (50 \text{ ng Vektor}) \times (\text{bp Insert} / \text{bp Vektor})$. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert

Tabelle 15 Ligationsansatz für yplA und pKAS46 sowie yplA und pUC19

	yplA und pKAS46	yplA und pUC19
T4 Ligase	1 µl	1 µl
T4 Ligase Buffer (10X)	2 µl	2 µl
Vektor DNA (50 ng)	0,5 µl	1,75 µl
Insert DNA (Verhältnis 1:10)	2,25 µl	13 µl
H ₂ O	14,25 µl	2,25 µl
Totalvolumen	20 µl	20 µl

Tabelle 16 Ligationsansatz für Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette) und hrep in pMiniT, Spect. (Spectinomycinresistenzkassette) und pldA in pMiniT sowie Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette) und yplA in pUC19

	Chlor. und hrep in pMiniT	Spect. und pldA in pMiniT	Chlor. und yplA in pUC19
T4 Ligase	1 µl	1 µl	1 µl
T4 Ligase Buffer (10X)	2 µl	2 µl	2 µl
Vektor DNA (50 ng)	0,6 µl	0,5 µl	1,95 µl
Insert DNA (Verhältnis 1:10)	13,9 µl	1,44 µl	7,5 µl
H ₂ O	2,5 µl	15,06 µl	7,55 µl
Totalvolumen	20 µl	20 µl	20 µl

Tabelle 17 Ligationsansatz für hrep + C (Chloramphenicolresistenzkassette) und pKAS46, yplA + C (Chloramphenicolresistenzkassette) und pKAS46 sowie pldA + S (Spectinomycinresistenzkassette) und pKAS46

	hrep+C und pKAS46	yplA+C und pKAS46	pldA+S und pKAS46
T4 Ligase	1 µl	1 µl	1 µl
T4 Ligase Buffer (10X)	2 µl	2 µl	2 µl
Vektor DNA (50 ng)	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl
Insert DNA (Verhältnis 1:10)	9,1 µl	15,7 µl	7,4 µl
H ₂ O	4,8 µl	-	6,8 µl
Totalvolumen	20 µl	20 µl	20 µl

3.2.1.12 Sequenzierung rekombinanter Plasmide

Zur endgültigen Verifizierung der Inserts wurde im Anschluss an die Überprüfung mittels PCR eine molekulare Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurden Ansätze zu je 15 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und an die Firma SeqLab verschickt. Jeder Ansatz beinhaltete 1,2 µg des Plasmids, 3 µl des jeweiligen Primers (10 nM) und steriles H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 15 µl. Die zurückgesendeten Sequenzen wurden mithilfe des Programms SnapGene analysiert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Anzucht von Bakterien

Für die Anzucht der Yersinien wurden 10 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben passender Größe unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit einer solitären Kolonie, welche mit einer sterilen Impfschlinge von einer Agarplatte gewonnen worden war, beimpft. Hier erfolgte die Inkubation für 12-16 Stunden bei 27 °C und 120 rpm.

3.2.2.2 Zellkulturexperimente

3.2.2.2.1 Anzucht und Kultivierung der Zellen

Bei den Zellkulturexperimenten wurden sowohl HeLa-Zellen und als auch intestinale m-IC_{cl2}-Zellen genutzt.

3.2.2.2.1.1 HeLa-Zellen

Die HeLa-Zellen wurden in 10 cm-Schalen mit DMEM-Medium und 10 % FCS kultiviert. Dabei wurden diese in der Regel alle zwei Tage gesplittet. Dazu wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit sterilem DPBS gewaschen und mittels Trypsin/EDTA abgelöst. Die Enzymaktivität wurde durch den Serumanteil in dem frischen Medium gestoppt.

Für die Infektionsversuche wurden die Zellen am Vortag der Infektion gesplittet und mit 50.000 Zellen/Vertiefung in einer 24-*well*-Platte ausgesät. Sollten die Zellen infiziert werden, um diese fluoreszenzmikroskopisch zu beurteilen, wurden sie am Tag vor der Transfektion auf Deckgläschen ausgesät.

3.2.2.2.1.2 m-IC_{cl2}-Zellen

Die m-IC_{cl2}-Zellen wurden in T75-Flaschen aufgezogen. Das Medium wurde speziell für die Anzucht der Zellen hergestellt. Während ein Mediumwechsel alle zwei Tage stattfand, wurden die Zellen in der Regel einmal wöchentlich gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit sterilem DPBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden dann für 5 Minuten bei 1500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet wurde in 5 ml frischem Medium resuspendiert. In einer neuen T75-Flasche wurden die Zellen dann in einer 1:10 Verdünnung weiter kultiviert. Für die Infektionsversuche wurden die Zellen drei Tage vor der Infektion gesplittet und mit 50.000 Zellen/Vertiefung in einer 24-*well*-Platte ausgesät. Für Infektionen von Zellen, die anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie auf Autophagie untersucht werden sollen, wurden 10.000 Zellen auf Deckgläschen am Tag vor der Transfektion ausgesät.

Tabelle 18 Medium für m-IC_{cl2}

Medium m-IC _{cl2}	
Ham's F12	250 ml
DMEM ohne Phenolrot	250 ml
Insulin	5 µg/ml
Dexamethason	5 x 10 ⁻⁸ M
Selenium	60 nM
Transferrin	5 µg/ml
Triiodthyronin	1 x 10 ⁻⁹ M
EGF	10 ng/ml

Medium m-IC _{cl2}	
HEPES	20 mM
Glutamine	2 mM
Decomplemented Fetal calf serum	2 %
D-Glucose 10 %ige Lösung	11,2 ml

In den Inkubatoren zur Bebrütung der Zellen herrschten grundsätzlich 37 °C bei 5 % CO₂.

3.2.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Um die Zellen quantifizieren zu können, wurden diese enzymatisch mit Trypsin abgelöst und anschließend wurde ein Aliquot im Verhältnis von 1:8 mit 5%igem Tryphanblau vermischt. Mit dieser Mischung wurde eine Neubauer Zählkammer bestückt und die Zellen wurden anschließend ausgezählt. Dabei wurden ausschließlich die lebenden Zellen berücksichtigt, welche aufgrund ihrer intakten Zellwand keine Farbe aufnehmen und daher mikroskopisch weiß erscheinen. Folgende Formel wurde zur Bestimmung der Zellzahl verwendet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{4}$$

Die gewünschte Anzahl an Zellen wurde stets mindestens einen Tag vor der weiteren Verwendung in einem entsprechenden Zellkulturgefäß ausgesät.

3.2.2.2.3 Infektion der Zellen für die LC3-Immunoblotversuche

Zur Infektion wurden am Vortag 10 ml LB-Kulturen mit Bakterien und den entsprechenden Antibiotikazusätzen angesetzt und über Nacht bei 27 °C inkubiert. Die Kulturen wurden dabei mit einer Einzelkolonie beimpft. Am Tag der Infektion wurden die Kulturen dann bei 4 °C für 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert. 900 µl PBS und 100 µl der Bakteriensuspension wurden anschließend in einer Küvette photometrisch bei 600 nm gemessen. Anschließend wurde der Suspension so viel PBS hinzugefügt, dass die OD 0,33 betrug.

Um die Menge an benötigtem PBS zu ermitteln, wurde folgende Rechnung herangezogen:

$$\text{Auffüllung [ml]} = \frac{(OD_{600} \times \text{Suspensionsvolumen [ml]} - \text{Suspensionsvolumen [ml]})}{0,33}$$

Zu Beginn des Zellkulturexperimentes wurde das alte Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Als Positivkontrolle diente Chloroquin, welches in einer Konzentration von 1,5 µl Chloroquin pro 500 ml Medium hinzugegeben wurde. Die zu infizierenden Zellen wurden mit je 5 µl Bakteriensuspension in 200 µl Medium infiziert. Nach einer Stunde erfolgte die Zugabe von 5 µl Gentamycin, um alle sich noch extrazellulär befindlichen Bakterien abzutöten. Nach vier Stunden der Infektion wurden die Zellen mittels Lysepuffer lysiert und die Proteine anschließend in einem SDS-Gel aufgetrennt. Mittels Westernblot erfolgte die Sichtbarmachung der Proteine nach Antikörperbindung.

3.2.2.2.4 Infektion und Vorbereitung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Zur Infektion wurden am Vortag 10 ml LB-Kulturen mit Bakterien und den entsprechenden Antibiotikazusätzen angesetzt und über Nacht bei 27 °C inkubiert. Am Tag der Infektion wurden die Bakterienkulturen dann wie oben beschrieben weiterbearbeitet und eingestellt.

Nachdem die Zellen auf den Deckgläschen am Morgen der Infektion mit Medium gewaschen worden waren, konnten sie mit den entsprechenden Stämmen infiziert werden. Hierzu wurden auf die Deckgläschen 200 µl Medium und 1 µl der Bakteriensuspension gegeben. Nach einer Stunde der Infektion wurde das Medium abgesaugt und es wurden 500 µl neues Medium mit 5 µl Gentamycin hinzugefügt. Nach insgesamt 4 Stunden der Infektion wurden die Deckgläschen dreimal mit Medium gewaschen und anschließend in PBS mit MgCa überführt. Zur Fixation wurde das Deckgläschen dann in einer 12-well-Platte in 1 ml Formaldehyd (3,7 %) in der Dunkelheit für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Anschließend wurde das Deckgläschen auf einen Objektträger mit 5 µl DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech) platziert und bis zur Mikroskopie im Dunklen aufbewahrt.

Um zu untersuchen, ob es zu einer Ansäuerung der Autophagosomen durch eine Verschmelzung mit Lysosomen kommt, wurde LysoTracker verwendet. Dabei reichert sich der fluoreszierende Farbstoff LysoTracker im sauren Milieu an und kann somit fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Viia et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde dafür das Medium 3,5 Stunden nach der Infektion abgesaugt und durch frisches ersetzt, welches 5 µl Gentamycin sowie 0,05 µl LysoTracker (molecular probes by life technologies) enthielt. Bis zur endgültigen Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Zellen weiter bei 37 °C inkubiert.

Um beurteilen zu können, wie viele Bakterien sich intrazellulär befinden, wurden diese mit einem Antikörper, der gegen Yersinien der Serogruppe O8 gerichtet ist, markiert. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben auf Deckgläschen ausgesät und infiziert. Nach Fixation in Formaldehyd (3,7 %) für 15 Minuten und Waschen mit PBS wurden die einzelnen Deckgläschen in je 800 µl PBS mit 0,1 % Triton inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift für je 5 Minuten mit PBS-T (0,05 %). Anschließend wurden die Deckgläschen für 30 Minuten in 800 µl blocking solution mit 1 % BSA in PBS-T gegeben. Auf eine saubere Oberfläche wurde dann pro Deckgläschen 30 µl 1 % BSA in PBS-T mit Anti-Yersinia O8-Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 pipettiert und die Deckgläschen daraufgelegt. Es erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Nun folgte die Markierung mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper in BSA PBS-T in der Verdünnung von 1:1000 mit 30 µl für 45 Minuten. Nach einem weiteren Waschschrift wie oben beschrieben wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger überführt, auf welchen schon Mounting-Medium (SouthernBiotech) vorgelegt war.

3.2.2.2.5 Transfektion von HeLa-Zellen

Um das zu Autophagosomen rekrutierte LC3-II in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar machen zu können, wurden die Zellen am Tag vor der Infektion mit hGFP-LC3 transfiziert. Dazu wurde zunächst das Medium gewechselt. Pro Deckgläschen wurden 0,3 µg DNA, 2,3 µl PEI und bis zu einem Gesamtvolumen von 30 µl OptiMEM benötigt. Zunächst wurden die DNA und das OptiMEM zusammengefügt und kurz mit dem Vortex vermischt. Nachdem das PEI hinzugefügt und wiederum kurz mit dem Vortex vermischt wurde, erfolgte die Inkubation der Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 30 µl der Mischung pro Deckgläschen tröpfchenweise auf diesem verteilt. Nach mindestens vierstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Deckgläschen dreimal mit Medium gewaschen und anschließend mit 500 µl neuem Medium versorgt. Es folgte die Inkubation der Zellen bei 37 °C über Nacht.

3.2.2.2.6 Transfektion von m-IC_{cl2}-Zellen

Zur Sichtbarmachung des bei der Autophagie prozessierten Proteins LC3 in der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen mit hGFP-LC3 transfiziert. Dazu wurde bei dieser Zelllinie zur Transfektion Lipofectamine LTX und Plus-Reagenz verwendet. In einer 24-well-Platte wurden drei Tage vor der Transfektion Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Zur Transfektion werden pro Deckgläschen 750 ng DNA, 1,125 µl Lipofectamin und 0,375 µl Plus-Reagenz in 100 µl OptiMEM benötigt. Zunächst wurde

die DNA in dem OptiMEM gelöst und kurz mit dem Vortex vermischt. Nachdem das Plus-Reagenz hinzugefügt und auch mit dem Vortex vermischt worden war, folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde Lipofectamine hinzugefügt und die Mischung nochmals für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden pro Deckgläschen 100 µl der Mischung tröpfchenweise in 200 µl frisches Medium gegeben und die Zellen wurden anschließend für 4 bis 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen konnten am nächsten Morgen für Infektionsexperimente verwendet werden.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten zur Immunoblotuntersuchung

Um nach einem Infektionsexperiment die Prozessierung von LC3 mittels Westernblot bestimmen zu können, mussten die Zellen lysiert werden. Dazu wurde nach Ablauf der Inkubationszeit das Medium zügig abgesaugt und in jede Vertiefung der 24-well-Platte wurden 35 µl Lysepuffer pipettiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zelllysate aus den Vertiefungen mittels Pipettenspitzen gelöst und in vorbereitete Eppendorf-Gefäße gegeben, in denen schon 15 µl SDS-Probenpuffer vorgelegt waren. Anschließend wurden die Proteine des Gemischs bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert und dann bei 14.000 g für 2 Minuten zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen.

Tabelle 19 1X RIPA-Lysepuffer

1X RIPA Lysepuffer	
2,5 ml	Tris-HCl pH 8, 1 M
1,5 ml	NaCl, 5 M
5 ml	NP-40, 10 %
0,5 ml	SDS, 10 %
2,5 ml	DOC, 10 %
0,1 ml	EDTA, 0,5 M
0,05 ml	EGTA, 1 M
1 Tablette	cOmplete (Protease Inhibitor-Mischung)
Bis 50 µl mit ddH ₂ O auffüllen	

3.2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Zur elektrophoretischen Auftrennung diente hierbei eine SDS-PAGE mit zwei Gelen unterschiedlich starker Konzentration. Das oben liegende Sammelgel bewirkt durch niedrigere Konzentration und minderen pH eine Ansammlung der Proteine, deren Auftrennung im stärker konzentrierten und basischen Trenngel erfolgt.

Durch das SDS (*sodium dodecyl sulfate*) wird es möglich, auf Grundlage der Wanderungsgeschwindigkeit auf die Proteingröße zu schließen. Denn dieses denaturiert die Proteine und tritt mit seinem unpolaren Molekülanteil mit den unpolaren Seitenketten der Proteine in Kontakt. Dadurch werden die Proteinladungen maskiert, so dass durch die Wanderungsrate der Proteine durch das Gel direkt auf deren molekulare Masse geschlossen werden kann. Die Proteinkonzentration im Sammelgel erfolgt durch ein Zusammenspiel des sauren pH von 6,8 des Gels und dem Glycin des Elektrophoresepuffers, welches als Ladungsträger dient. Das Glycin wandert am langsamsten und behindert den Stromfluss. Die Chloridionen des Gels wiederum wandern besonders schnell, so dass sich die Proteine dazwischen in einem Feldstärkegradienten befinden. Dadurch werden schnell wandernde Proteine durch die Chloridionen gebremst und die langsam wandernden durch das Glycin angeschoben.

Trifft das Glycin auf das Trenngel, geht es in den Glycinat-Zustand über und wandert fortan schneller als die Proteine. Durch Siebeffekte separiert das engmaschige Trenngel anschließend die Proteine nach ihrer Molekülmasse.

Als Standard wurden stets 5 µl PageRuler™ Prestained Protein-Marker mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V. Es folgte eine anschließende Analyse mittels Westernblot.

Tabelle 20 Puffer zur Herstellung von SDS-Gelen

Puffer zur Herstellung von SDS-Gelen		
Name	Beschreibung	Quelle
Sammelgelpuffer	1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8	Biorad (#161-0798)
Trenngelpuffer	0,5 M Tris-HCl Puffer, pH 6,8	Biorad (#161-0799)

Tabelle 21 4X SDS sample buffer

4X SDS sample buffer (10ml)	
1,2 g	SDS
4,7 ml	Glycerol
2 ml	TrisHCl pH 7, 1 M
0,4 mg	Bromphenolblau
0,5 ml	2-β Mercaptoethanol
Auf 10 ml mit ddH ₂ O auffüllen	

Tabelle 22 1X SDS running buffer

1X SDS running buffer pH 8,3	
3 g	Tris base
14,4 g	Glycin
1 g	SDS
Bis 1 l mit ddH ₂ O auffüllen	

3.2.3.3 Westernblot und Immunodetektion von Proteinen

Um die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine sichtbar machen zu können, wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF 0,2 µm, Roth) durch elektrophoretischen Transfer mittels halb-trockenem Westernblot übertragen. Zu diesem Zweck wurden zwei Whatman-Chromatographie-Papiere (Whatman 3MM Paper, Whatman, Maidstone), getränkt mit Transferpuffer A, und eine mit Transferpuffer B auf die Anode der Blotkammer blasenfrei aufgebracht. Anschließend wurden eine mit Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid-Membran und das Gel aufgelegt. Darauf wurden dann 3 Whatman-Papiere mit Transferpuffer C aufgebracht. Die oben aufgelegte Kathode wurde beschwert, um ein Verrutschen zu vermeiden. Der Transfer erfolgte bei einem Gel in der Kammer für 20 Minuten bei 400 mA, bei zwei Gelen wurden 35 Minuten benötigt.

Tabelle 23 1X Transferpuffer A

1X Transferpuffer A, pH 10,4	
30 ml	Tris 1 M, pH 10,4
10 ml	Methanol
Bis 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen	

Tabelle 24 1X Transferpuffer B

1X Transferpuffer B, pH 10,4	
2,5 ml	Tris 1 M, pH 10,4
10 ml	Methanol
Bis 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen	

Tabelle 25 1X Transferpuffer C

1X Transferpuffer C, pH 9,4	
2,5 ml	Tris 1 M, pH 10,4
0,26 g	6-Aminohexansäure
10 ml	Methanol
Bis 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen	

Anschließend erfolgte die Blockierung der Membran mit 5%iger Milchlösung in PBST für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit PBST wurde die Membran mit den entsprechenden Antikörpern behandelt, um die Proteine sichtbar zu machen. Dabei wurde der Anti-LC3-Antikörper in PBST mit BSA über Nacht bei 4 °C, der Anti-Aktin-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen für je 5 Minuten mit PBST wurden die Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper auf die Membran gebracht, damit diese an den Erstantikörper binden können. Der verwendete Anti-Aktin-Antikörper wurde dabei mit einem Anti-Maus-AK, der Anti-LC3-AK mit einem Anti-Hase-AK für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein weiterer dreiteiliger Waschgang, um überflüssige Antikörper von der Membran zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit 1 ml Chemilumineszenz-Lösung (femtoLUCENT™PLUS-HRP, Biosciences) behandelt. Die Darstellung der Proteinbanden erfolgte durch die Schwärzung von Röntgenfilmen durch Emission von Licht durch die gebundenen Antikörper und anschließender Entwicklung in einem Röntgenfilmentwickler.

Tabelle 26 Puffer für die Antikörperlösungen

1X PBS-0,05 % Tween	
0,2 g	KCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄
8 g	NaCl
1,1 g	Na ₂ HPO ₄
0,5 ml	Tween20
Bis 1 l mit ddH ₂ O auffüllen	

Tabelle 27 Verwendete Antikörper

Spezifität			
Primärer Antikörper	Wirtsspezies	Verdünnung	Quelle
Aktin	Maus	1:2000	Millipore (#MAB1501)
LC3B	Hase	1:2000	Cell Signaling (#2775)
Sekundäre Antikörper			
Peroxidase-konjugiertes Anti-Hase IgG	Ziege	1:20000	Dianova (#111-035-003)
Peroxidase-konjugiertes Anti-Maus IgG	Ziege	1:20000	Dianova (#111-035-062)

4 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, mehr über den Mechanismus der Autophagieinduktion durch Yersinien zu erfahren. Dafür wurden Yersinien-Mutanten, denen bestimmte Virulenzfaktoren beziehungsweise Virulenz-regulierende Proteine fehlten, auf einen möglichen Effekt auf die Auslösung von Autophagie durch Yersinien im Vergleich zu den Ausgangsstämmen untersucht.

LC3 ist ein wesentlicher Bestandteil der Membran von Autophagosomen. Bei der Inkorporation von LC3 in die Autophagosomenmembran bei der Ausbildung von Autophagosomen wird LC3 von LC3-I zu LC3-II prozessiert. Daher wurde bei Infektion der Zellen mit den einzelnen Bakterienstämmen die Stärke der Konversion von LC3-I zu LC3-II als Marker für das Ausmaß der ausgelösten Autophagie herangezogen. So konnte sowohl qualitativ, als auch quantitativ abgeschätzt werden, ob die untersuchten Mutanten in Zellkulturexperimenten Autophagie auslösten und, wenn ja, in welcher Stärke im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen. Da LC3 auch konstitutiv bei basaler Autophagie und unter dem Einfluss anderer Stressoren vermehrt prozessiert wird, wurde grundsätzlich stets eine Kontrolle mitgeführt, bei der die Zellen genauso behandelt wurden wie die zu infizierenden Zellen. Allerdings wurden diese Zellen als Negativkontrolle nicht infiziert, sondern dienten lediglich der Abschätzung der Hintergrund-LC3-Prozessierung im Vergleich zu den Infektionen. Als Positivkontrolle für Autophagie wurde Chloroquin eingesetzt, welches die Autophagosomen-Lysosomen-Fusion hemmt und dadurch eine Anreicherung von Autophagosomen bewirkt.

Alle unterschiedlichen Bakterienstämme wurden sowohl mittels Westernblot auf die Bildung von LC3-II untersucht, als auch mittels Fluoreszenzmikroskopie mit GFP-LC3. Dafür wurden die Zellen mit GFP-LC3 transfiziert und anschließend mit den Yersinien infiziert. Ziel dabei war es herauszufinden, ob sich die intrazellulären Bakterien in LC3-positiven Kompartimenten befinden und somit einem Autophagosom zugeführt wurden. So konnte die Prozessierung von LC3 mit der Lokalisation von LC3 nach der Yersinieninfektion korreliert werden.

Bei den Zellkulturexperimenten zeigte sich bei einigen Bakterienstämmen eine unterschiedlich starke Konversion von LC3-I zu LC3-II. Dies wurde daraus deutlich, dass sich LC3 in Zelllysaten nach SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Sichtbarmachung der Proteine mittels Immunoblot unterschiedlich stark als LC3-I und LC3-II darstellte.

4.1 Prozessierung von LC3 bei HeLa-Zellen nach Infektion mit unterschiedlichen Yersinienmutanten

Zunächst wurde die Mutante WA-C yts1E im Vergleich zum Ausgangsstamm WA-C untersucht. Yts1 kodiert bei hochvirulenten Bakterienstämmen von *Yersinia enterocolitica* als Teil eines Genclusters für ein Typ II Sekretionssystem. Die im Wesentlichen durch Yts1 sekretierten Substrate scheinen an der Interaktion mit Polysacchariden und deren Abbau während des Infektionsgeschehens beteiligt zu sein (Shutinoshi et al., 2010). Unter anderem wird die Bindung an epitheliale Zellen beeinflusst (Stauder et al., 2012). Bei oralen Infektionsversuchen konnte eine verminderte Virulenz von Mutanten für yts1 gezeigt werden (Iwobi et al., 2003). Daher wurde diese Mutante auf ihren Einfluss auf die LC3-II-Konversion und damit auf die Autophagieinduktion in Zellkulturexperimenten mit HeLa-Zellen untersucht. Bei diesen Infektionsexperimenten zeigte der Stamm WA-C yts1E interessanterweise eine stärkere LC3-II-Prozessierung als der Ausgangsstamm WA-C (Abbildung 3). Ein intaktes Yts1 Typ II Sekretionssystem scheint also keinen Autophagie-auslösenden, sondern vielmehr einen Autophagie-hemmenden Effekt zu haben. Dieser inhibitorische Einfluss stellt sich hier in Form einer ausgeprägten LC3-Konversion nach Infektion mit dem Stamm dar, dem das Yts1-System fehlt.

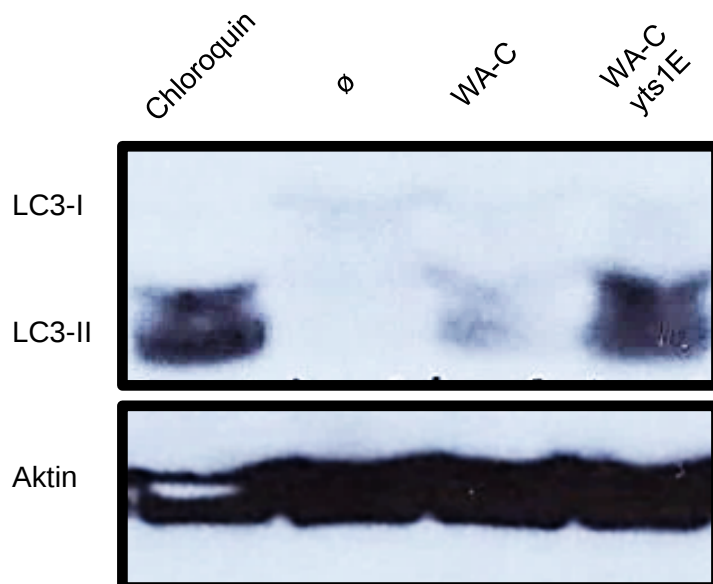


Abbildung 3 LC3-Konversion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit WA-C und WA-C yts1E.

HeLa-Zellen wurden mit WA-C, beziehungsweise WA-C yts1E infiziert oder mit Chloroquin als Positivkontrolle behandelt. Nach 4h wurden Zelllysate gewonnen und im Westernblot auf eine Prozessierung von LC3-I zu LC3-II analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Zelllysaten wurde mittels Aktin Immunoblot überprüft.

Hfq spielt als RNA-bindendes Protein eine Rolle bei der Expression von Virulenzfaktoren (Vogel und Luisi, 2011). Ziel der Untersuchung einer Mutante für Hfq war es, zu untersuchen, ob sich durch eine fehlende Beeinflussung der Translation oder der post-transkriptionellen Genregulation durch Hfq die LC3-II-Konversion bei Infektion mit Yersinien verändert darstellt. Daraus sollte abgeschätzt werden, ob Hfq Einfluss auf die Autophagieinduktion nimmt.

Gleichzeitig wurde auch eine CsrA-Mutante untersucht. CsrA hat einen direkten Einfluss auf die Motilität von Bakterien, da es Regulationszentren beeinflusst, welche für die Expression von Genen eine Rolle spielen, die für die Ausbildung des Flagellenapparats essentiell sind (LeGrand et al., 2015). In dieser Arbeit sollte durch Analyse der Mutante für CsrA der Einfluss der Motilität auf die Autophagieinduktion durch Yersinien ermittelt werden.

Dafür wurden die Stämme WA-C SOR5 und WA-C SOR38c herangezogen, welche Mutationen entweder für *hfq* oder *csrA* tragen. Eine Infektion von HeLa-Zellen mit beiden Mutanten führte zu einer Abschwächung der LC3-Konversion im Vergleich zum WA-C-Ausgangsstamm (Abbildung 4). Sowohl Hfq als auch CsrA sind also offenbar für eine effiziente Auslösung von Autophagie durch Yersinien von Bedeutung.

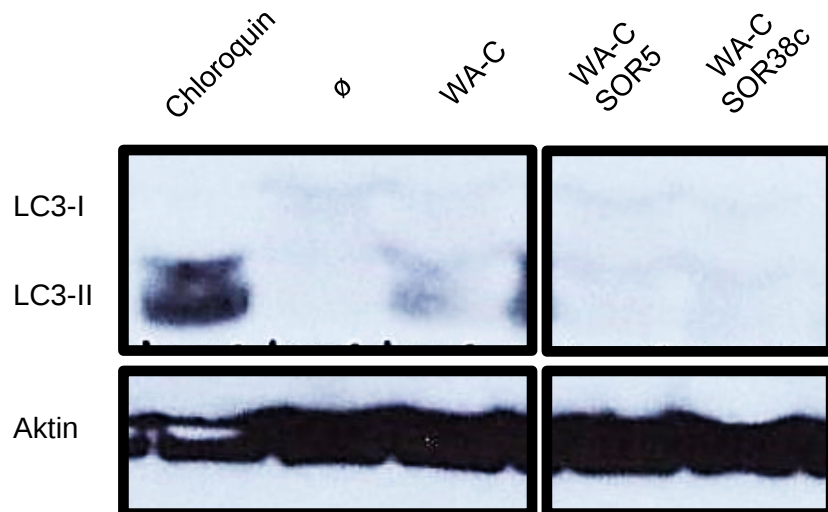


Abbildung 4 LC3-Konversion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit WA-C, WA-C SOR5 und WA-C SOR38c.

HeLa-Zellen wurden mit WA-C, beziehungsweise WA-C SOR5 und WA-C SOR38c infiziert oder mit Chloroquin als Positivkontrolle behandelt. Nach 4h wurden Zelllysate gewonnen und im Westernblot auf eine Prozessierung von LC3-I zu LC3-II analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Zelllysaten wurde mittels Aktin Immunoblot überprüft.

Durch FliA wird die Transkription der Gene des Typ III Sekretionssystems negativ überwacht (Helman, 1991). Umgekehrt wird durch den „flagellar sigma factor“ FliA als übergeordneter Regulator die Transkription von Flagellen, der Phospholipase YplA und auch die Expression des Virulenzgens *inv*, welches für Invasin kodiert und für die frühe Phase der Infektion wichtig ist, positiv reguliert (Young et al., 2000). In vorliegender Arbeit sollte der Einfluss von FliA auf die LC3-II-Konversion und damit die Autophagie untersucht werden, da so Rückschlüsse auf einen möglichen Zusammenhang einer globalen Virulenzgen-Regulation auf Autophagie gezogen werden können.

PilQ steuert als ein Sekretin die Translokation von Makromolekülen durch die Membran und ist verantwortlich für die Bildung von Typ IV-Pili. Bei *Neisseria meningitidis* zeigen Mutanten für PilQ eine verminderte Pili-Expression (Tønjum et al., 1998). Ferner wurde ermittelt, dass diese Pili für die Kolonisierung relevant sind, indem sie den ersten Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle herstellen (Collins et al., 2004). Durch die Untersuchung einer Mutante für PilQ sollte eruiert werden, ob eine verminderte Pili-Expression die LC3-II-Prozessierung und damit die Induktion von Autophagie beeinflusst.

Sowohl die FliA- als auch die PilQ-Mutante wurden im Vergleich zum Ausgangsstamm JB580c analysiert. JB580c entspringt dem Hintergrund des *Yersinia enterocolitica*-Stammes 8081, welcher wie WA-C dem Serotyp O8 und somit einer vergleichbaren Virulenzgruppe zuzuordnen ist. Bei der Auswertung der Immunoblotexperimente zeigte sich eine deutlich abgeschwächte LC3-II-Konversion nach Infektion mit der FliA-Mutante, während diejenige nach der Infektion mit der Mutante für PilQ gegenüber dem Ausgangsstamm JB580c nicht wesentlich vermindert war (Abbildung 5). Der Transkriptionsregulator FliA ist dementsprechend für die Autophagieinduktion essentiell, während PilQ dabei keine Rolle zu spielen scheint.

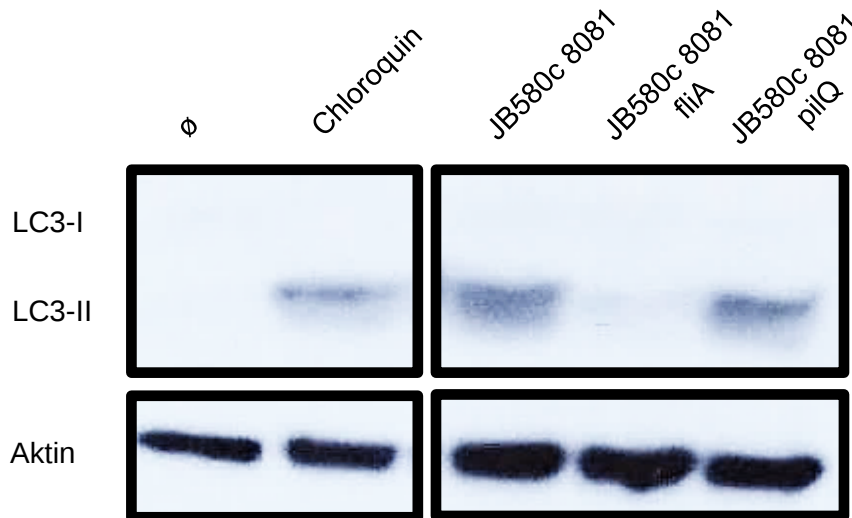


Abbildung 5 LC3-Konversion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit JB580c 8081, JB580c 8081 fliA und JB580c 8081 pilQ.

HeLa-Zellen wurden mit JB580c 8081, JB580c 8081 fliA und JB580c 8081 pilQ infiziert oder mit Chloroquin als Positivkontrolle behandelt. Nach 4h wurden Zelllysate gewonnen und im Westernblot auf eine Prozessierung von LC3-I zu LC3-II analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Zelllysaten wurde mittels Aktin Immunoblot überprüft.

Weiterhin waren wir daran interessiert, die Bedeutung von PldA und Hrep für die Auslösung von Autophagie durch Yersinien herauszufinden. Die Phospholipase PldA vermag Phosphatidylcholin und Shingomyelin spalten und ist daher an der Invasion der Wirtszelle durch *Yersinia pseudotuberculosis* beteiligt (Karlyshev et al., 2001). PldA-Mutanten zeigten in Untersuchungen eine deutlich verminderte Virulenz. Möglicherweise trägt die Wirtszellmembran-schädigende Wirkung von PldA zur Auslösung von Autophagie durch Yersinien bei, was die Invasivität und Virulenz der Yersinien unterstützen könnte. Bei Hrep handelt es sich um eine Protease, welche große Ähnlichkeit zu Proteasen aus der Familie der eukaryoten „subtilisin/kexin-like Proteasen“ aufweist. Das Gen ist in einem Cluster von Genen lokalisiert und organisiert, welche für die Flagellenbiosynthese und Chemotaxis von Bedeutung sind. *Yersinia enterocolitica* scheint das Gen für Hrep via horizontalem Gentransfer erhalten zu haben (Heusipp et al., 2001). Hrep-Mutanten zeigen eine deutlich verminderte Virulenz bei Infektionsversuchen an Mäusen und eine verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit in Peyer Plaques (Young und Miller, 1997). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die verminderte Virulenz der Mutanten darauf zurückführen lässt, dass die Protease Hrep zur Autophagieinduktion und folglich zu einem besseren Überleben der Bakterien in infizierten Zellen beiträgt.

Um mögliche Effekte von Hrep und PldA auf Autophagie bei Yersinieninfektion zu eruieren, war es auch hier notwendig, entsprechende Knockout-Mutanten in

Zellkulturexperimenten auf Autophagie zu untersuchen. Da uns solche Mutanten nicht zur Verfügung standen, mussten im Rahmen dieser Arbeit erst Stämme geschaffen werden, denen diese Proteine fehlten. Dafür wurde mittels Insertionsmutagenese eine Antibiotikaresistenzkassette in die entsprechenden Gene eingebracht, so dass diese nicht mehr vollständig transkribiert werden konnten, was einen Verlust der Funktion von Hrep beziehungsweise PldA zur Folge hat. Infektionsexperimente an HeLa-Zellen mit den neugeschaffenen Mutanten zeigten jedoch, dass das Fehlen von PldA oder Hrep im Vergleich zum Ausgangsstamm WA-C keinen wesentlichen Unterschied in der LC3-II-Konversion bewirkte (Abbildung 6). Eine verminderte Virulenz von PldA- und Hrep-Mutanten im Tiermodell scheint also nicht mit einem Einfluss auf die Auslösung von Autophagie in Yersinien assoziiert zu sein.

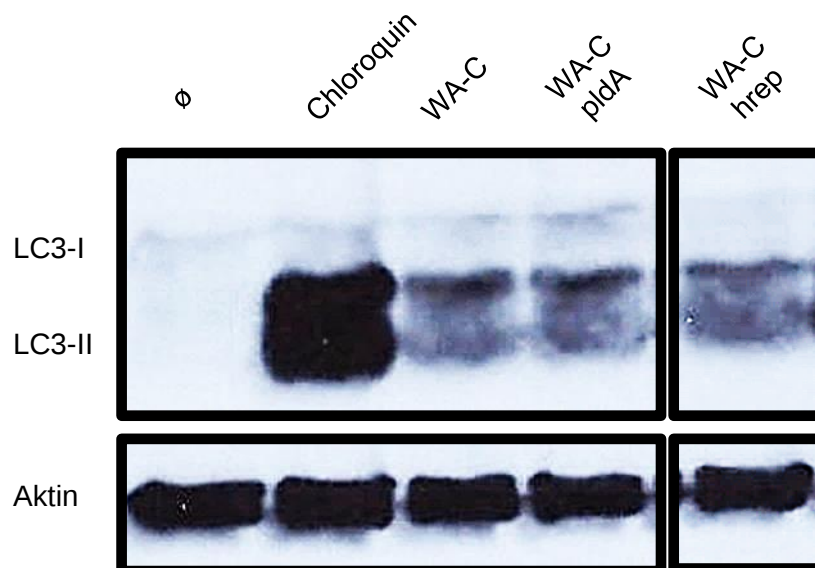


Abbildung 6 LC3-Konversion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit WA-C, WA-C pldA und WA-C hrep.

HeLa-Zellen wurden mit WA-C, beziehungsweise WA-C pldA und WA-C hrep infiziert oder mit Chloroquin als Positivkontrolle behandelt. Nach 4h wurden Zelllysate gewonnen und im Westernblot auf eine Prozessierung von LC3-I zu LC3-II analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Zelllysaten wurde mittels Aktin Immunoblot überprüft.

Des Weiteren wurde auch vergleichend eine Versuchsreihe mit *Yersinia pseudotuberculosis* durchgeführt. Dabei wurde eine Mutante für PhoP untersucht. Um ein Überleben von enteropathogenen Bakterien in wechselnden Umgebungsbedingungen zu sichern, ist eine schnelle Anpassung notwendig. Das „two component regulatory system“ PhoP/PhoQ stellt ein sehr effizientes System dar, die bakterielle Genexpression an veränderte Bedingungen anzupassen (Beier und Gros, 2006). Untersuchungen an PhoP-Mutanten haben eine deutlich verminderte Virulenz in

murinen Infektionsversuchen gezeigt. PhoP scheint am Überleben und der Möglichkeit zur Replikation in Makrophagen beteiligt zu sein, da Mutanten ein verringertes Überleben in Makrophagen aufweisen (Grabenstein et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ferner untersucht werden, ob die verminderte Virulenz der PhoP-Mutante durch eine Abnahme der Autophagieinduktion bedingt sein könnte.

Tatsächlich zeigte die Auswertung der LC3-Immunoblotexperimente eine leicht verminderte LC3-II-Prozessierung der PhoP-Mutanten gegenüber dem Ausgangsstamm IP32953, was auf eine Bedeutung des PhoP/PhoQ-Systems auch bei der Induktion der Autophagie durch Yersinien hinweist (Abbildung 7).

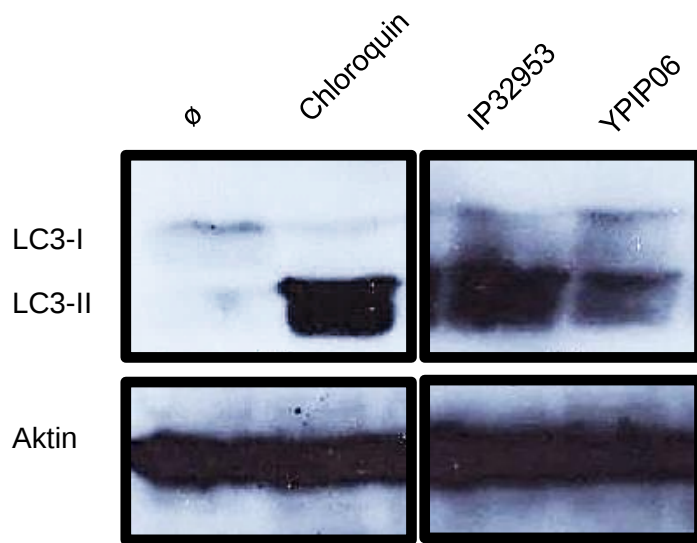


Abbildung 7 LC3-Konversion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit IP32953 und YPIP06.

HeLa-Zellen wurden mit IP32953, beziehungsweise YPIP06 (IP32953 *phoP/Q* negativ) infiziert oder mit Chloroquin als Positivkontrolle behandelt. Nach 4h wurden Zelllysate gewonnen und im Westernblot auf eine Prozessierung von LC3-I zu LC3-II analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Zelllysaten wurde mittels Aktin Immunoblot überprüft.

4.2 Prozessierung von LC3 bei m-IC_{cl2}-Zellen nach Infektion mit Yersinien

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob sich die Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten mit HeLa-Zellen auch bei anderen Zellen reproduzieren lassen. Dafür wurde eine Zelllinie herangezogen, die die physiologische Situation der Yersinieninfektion möglicherweise besser reflektiert als HeLa-Zellen. Es wurden intestinale m-IC_{cl2}-Zellen verwendet, die aus dem Dünndarm fötaler Mäuse gewonnen und immortalisiert worden waren. Die mit diesen Zellen durchgeführten LC3-II-Prozessierungsversuche erbrachten zu den HeLa-Zell-Analysen vergleichbare Resultate. Dementsprechend zeigten Infektionsexperimente unter Verwendung der m-

IC_{cl2}-Zellen eine vermehrte LC3-II-Prozessierung durch den Stamm WA-C yts1E gegenüber dem Ausgangsstamm WA-C (Abbildung 8), wenn auch nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei den Infektionsversuchen mit den HeLa-Zellen. Bei Infektion mit den Stämmen WA-C SOR5 (Hfq-Mutante) und WA-C SOR38c (CsrA-Mutante) stellten sich, vor allem bei dem Stamm WA-C SOR5, verminderte LC3-Prozessierungssignale gegenüber WA-C dar, was ähnlich zu den Infektionsversuchen mit HeLa-Zellen ist. Auch die Deletion des Gens *fliA* im Stamm JB580c bewirkte eine deutlich reduzierte Menge an LC3-II im Vergleich zum Ausgangsstamm und zu der PilQ-Mutante. Auch diese Ergebnisse waren denen mit HeLa-Zellen erhaltenen vergleichbar. Insgesamt sprechen diese Resultate dafür, dass Infektionsexperimente an HeLa-Zellen ähnliche Resultate erbringen wie mit m-IC_{cl2}-Zellen. HeLa-Zellen stellen somit scheinbar kein unterlegenes Infektionsmodell zur in-vitro-Analyse der Effekte von Yersinien auf Autophagie dar.

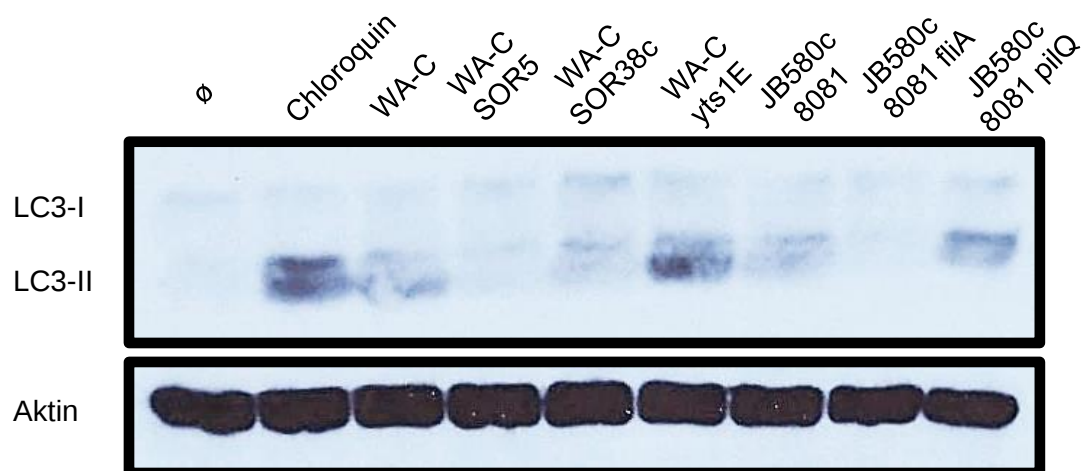


Abbildung 8 LC3-Konversion bei m-IC_{cl2}-Zellen nach Infektion mit WA-C, WA-C SOR5, WA-C SOR38c, WA-C yts1E, JB580c 8081, JB580c 8081 *fliA* und JB580c 8081 *pilQ*.

m-IC_{cl2}-Zellen wurden mit WA-C, beziehungsweise WA-C SOR5, WA-C SOR38c, WA-C yts1E, sowie JB580c 8081, JB580c 8081 *fliA* und JB580c 8081 *pilQ* infiziert oder mit Chloroquin als Positivkontrolle behandelt. Nach 4h wurden Zelllysate gewonnen und im Westernblot auf eine Prozessierung von LC3-I zu LC3-II analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Zelllysaten wurde mittels Aktin Immunoblot überprüft.

4.3 Mobilisierung von GFP-LC3 bei HeLa-Zellen mit verschiedenen Yersinienmutanten

Nachdem über die Analyse der Ausprägung der LC3-Prozessierung ein Einfluss der untersuchten Yersinia-Faktoren auf die Autophagie nach Yersinieninfektion abgeschätzt werden konnte, sollten die erhaltenen Ergebnisse für einen Teil der Yersinienmutanten mit der Mobilisierung von LC3 bei infizierten Zellen korreliert

werden. Dadurch konnte auch auf Einzelzellebene beurteilt werden, wie sich Infektionen mit den Yersinienmutanten auf Autophagie auswirken. Um eine Mobilisierung und Rekrutierung von LC3 an intrazelluläre Yersinien zu detektieren, wurden HeLa-Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert, welches für GFP-markiertes LC3 kodiert. Dies erlaubt, mittels Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation von GFP-LC3 bei den mit Yersinien infizierten Zellen zu untersuchen. Die Bakterien wurden in einem Teil der Experimente mit einem anti-*Yersinia*-Antikörper und einem Alexa-Fluor-586-markierten Zweitantikörper rot gegengefärbt. Es wurden hier nur grob orientierende Untersuchungen durchgeführt, um die im LC3-Immunoblot erhaltenen Ergebnisse auf Plausibilität in der Mikroskopie zu überprüfen. Auf eine genaue Quantifizierung von Bakterienaufnahme und Autophagosomenbildung wurde verzichtet.

Beim Vergleich der Stämme WA-C und WA-C yts1E bei GFP-LC3-transfizierten HeLa-Zellen wurde deutlich, dass die WA-C yts1E-Mutante stärker invasiv war, sich also eine größere Anzahl an Bakterien in den einzelnen Zellen befand (Abbildung 10). Allerdings war das Verhältnis von Bakterien, die sich in Autophagosomen befanden, zu denen, die ohne eine GFP-LC3-Rekrutierung in den Zellen sichtbar waren, bei beiden Stämmen sehr ähnlich. Etwa 50 % der intrazellulären Bakterien waren bei beiden Stämmen von GFP-LC3 umgeben. Wir folgerten daraus, dass die vermehrte LC3-Prozessierung, die bei der WA-C yts1E-Mutante beobachtet wurde, vermutlich auf eine stärkere intrazelluläre Aufnahme der Bakterien selbst, aber nicht auf eine effizientere Auslösung von Autophagie zurückzuführen ist. Wie ein Verlust des Yts1 Typ II Sekretionssystems die Aufnahme von Yersinien in Wirtszellen begünstigt, ist bisher unklar.

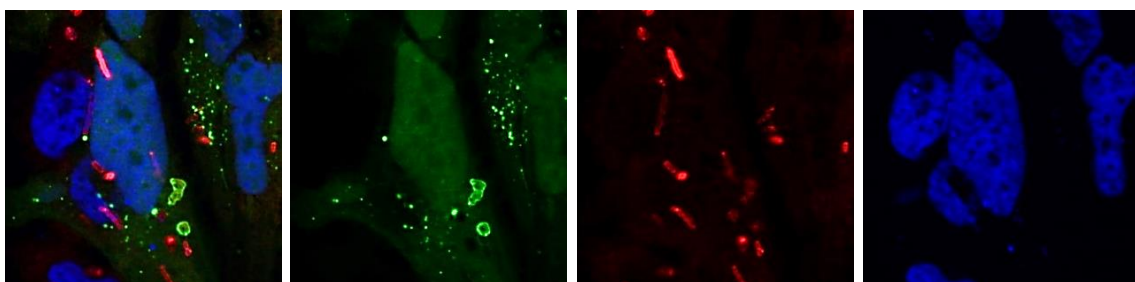


Abbildung 9 Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Die Auslösung von Autophagie wurde mittels Rekrutierung von GFP-LC3 (grün) an Yersinien-haltigen Vakuolen fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Die Bakterien wurden mit Hilfe eines anti-*Yersinia*-Antikörpers angefärbt (rot). Die Zellkerne stellen sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau dar.

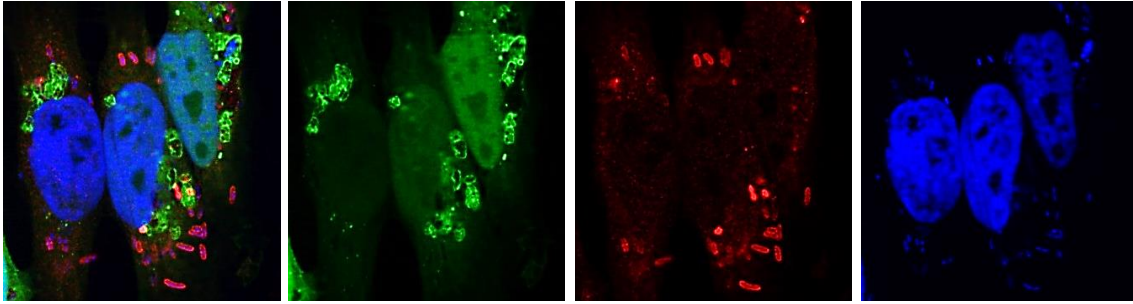


Abbildung 10 Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C yts1E.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C yts1E statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Die Auslösung von Autophagie wurde mittels Rekrutierung von GFP-LC3 (grün) an Yersinien-haltigen Vakuolen fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Die Bakterien wurden mit Hilfe eines anti-*Yersinia*-Antikörpers angefärbt (rot). Die Zellkerne stellen sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau dar.

Bei den Stämmen WA-C SOR5 (Hfq-Mutante) und WA-C SOR38c (CsrA-Mutante) konnte hingegen eine verminderte Autophagosomenbildung im Vergleich zu WA-C detektiert werden (Abbildung 11, Abbildung 12). Dies korreliert mit der reduzierten LC3-Prozessierung, die für beide Stämme beobachtet wurde (Abbildung 4). Allerdings schien auch die intrazellulär aufgenommene Bakterienmenge für die beiden Mutanten im Vergleich zu WA-C reduziert zu sein. Die verminderte Induktion von Autophagie durch die Hfq- und die CsrA-Mutante ist also vermutlich auf das herabgesetzte Vermögen der Bakterien, in die Zellen einzudringen, zurückzuführen. Diese verminderte Zellinvasion ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass sowohl für Hfq als auch für CsrA eine regulatorische Funktion bei der Expression von Invasin und der damit einhergehenden Zellinvasivität beschrieben wurde.

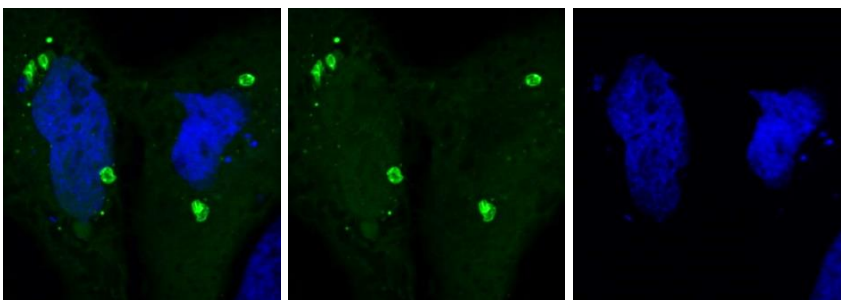


Abbildung 11 Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C SOR5.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C SOR5 statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Die Auslösung von Autophagie wurde mittels Rekrutierung von GFP-LC3 (grün) an Yersinien-haltigen Vakuolen fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Die Zellkerne stellen sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau dar.

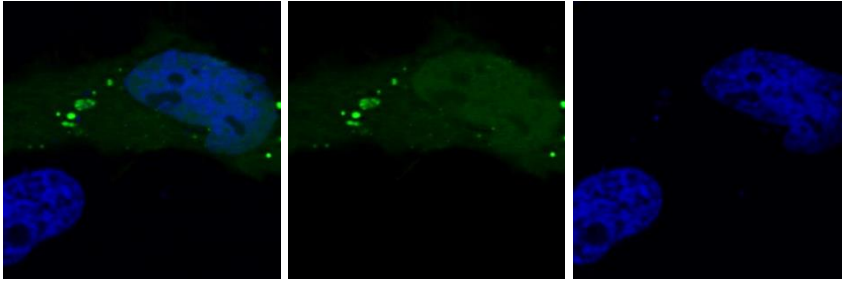


Abbildung 12 Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C SOR38c.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C SOR38c statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Die Auslösung von Autophagie wurde mittels Rekrutierung von GFP-LC3 (grün) an Yersinien-haltigen Vakuolen fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Die Zellkerne stellen sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau dar.

Bei dem Stamm JB580c 8081 pilQ zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Autophagosomenbildung zu dem Ausgangsstamm JB580c 8081 (Abbildung 13, Abbildung 14). Bei dem Stamm JB580c 8081 fliA hingegen konnte insgesamt eine leicht verminderte Autophagosomenbildung detektiert werden (Abbildung 15). Diese korreliert mit der im Immunoblot festgestellten, reduzierten LC3-Prozessierung (Abbildung 5). Allerdings erschien auch hier die intrazellulär aufgenommene Bakterienmenge an JB580c 8081 fliA im Vergleich zum Ausgangsstamm JB580c 8081 in der Gesamtheit vermindert.

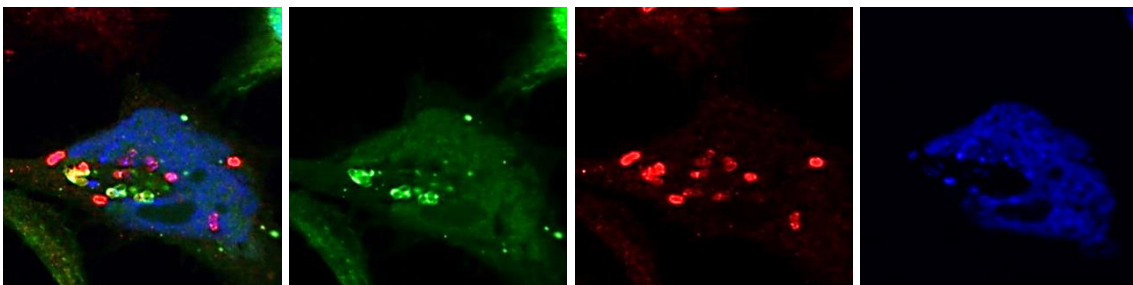


Abbildung 13 Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit JB580c 8081.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit JB580c 8081 statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Die Auslösung von Autophagie wurde mittels Rekrutierung von GFP-LC3 (grün) an Yersinien-haltigen Vakuolen fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Die Bakterien wurden mit Hilfe eines anti-*Yersinia*-Antikörpers angefärbt (rot). Die Zellkerne stellen sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau dar.

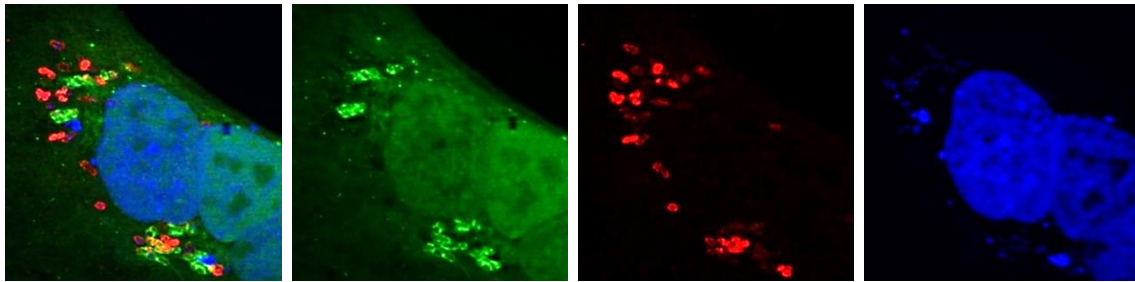


Abbildung 14 Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit JB580c 8081 pilQ.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit JB580c 8081 pilQ statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Die Auslösung von Autophagie wurde mittels Rekrutierung von GFP-LC3 (grün) an Yersinien-haltigen Vakuolen fluorezenzmikroskopisch evaluiert. Die Bakterien wurden mit Hilfe eines anti-*Yersinia*-Antikörpers angefärbt (rot). Die Zellkerne stellen sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau dar.

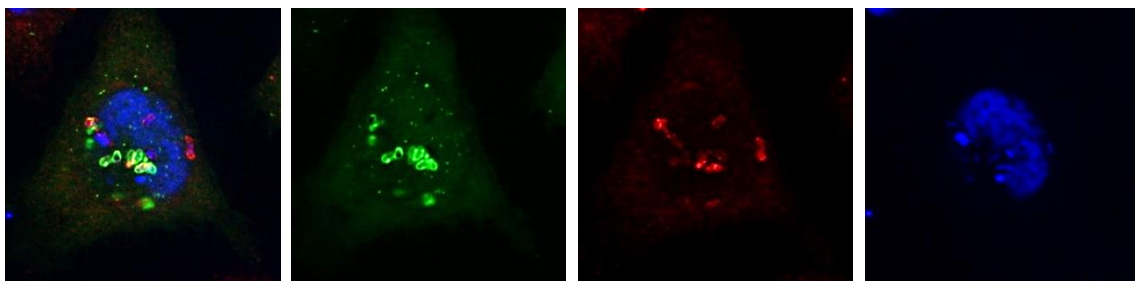


Abbildung 15 Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit JB580c 8081 fliA.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit JB580c 8081 fliA statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Die Auslösung von Autophagie wurde mittels Rekrutierung von GFP-LC3 (grün) an Yersinien-haltigen Vakuolen fluorezenzmikroskopisch evaluiert. Die Bakterien wurden mit Hilfe eines anti-*Yersinia*-Antikörpers angefärbt (rot). Die Zellkerne stellen sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau dar.

Bei den Bakterienstämmen WA-C hrep und WA-C pldA zeigte sich im Vergleich zu WA-C keine unterschiedliche Anzahl an Bakterien in den untersuchten Zellen (Abbildung 17, Abbildung 18). Auch der Anteil derer, welche sich in einem LC3-II-positiven Kompartiment befanden, war gegenüber WA-C annähernd gleich. In Übereinstimmung mit den bei der LC3-Prozessierung erhaltenen Ergebnissen sprechen diese Daten dafür, dass Hrep und PldA keinen Einfluss auf die Invasivität der Bakterien und die sich daran anschließende Auslösung von Autophagie ausüben.

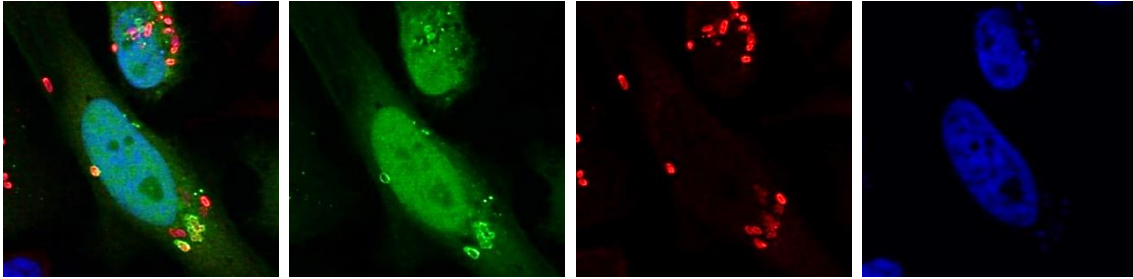


Abbildung 16 Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Die Auslösung von Autophagie wurde mittels Rekrutierung von GFP-LC3 (grün) an Yersinien-haltigen Vakuolen fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Die Bakterien wurden mit Hilfe eines anti-*Yersinia*-Antikörpers angefärbt (rot). Die Zellkerne stellen sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau dar.

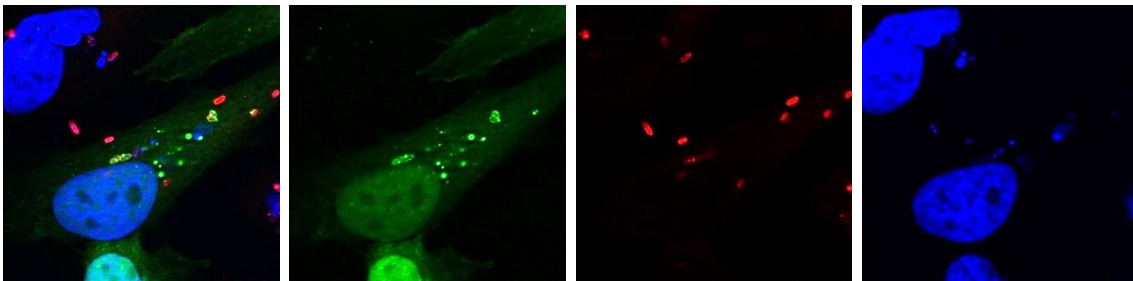


Abbildung 17 Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C pldA.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C pldA statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Die Auslösung von Autophagie wurde mittels Rekrutierung von GFP-LC3 (grün) an Yersinien-haltigen Vakuolen fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Die Bakterien wurden mit Hilfe eines anti-*Yersinia*-Antikörpers angefärbt (rot). Die Zellkerne stellen sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau dar.

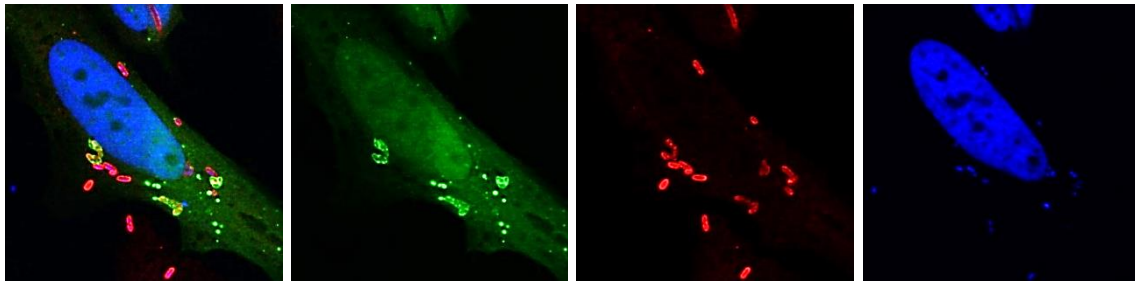


Abbildung 18 Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C hrep.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C hrep statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Die Auslösung von Autophagie wurde mittels Rekrutierung von GFP-LC3 (grün) an Yersinien-haltigen Vakuolen fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Die Bakterien wurden mit Hilfe eines anti-*Yersinia*-Antikörpers angefärbt (rot). Die Zellkerne stellen sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau dar.

Insgesamt zeigen sich die Ergebnisse der GFP-LC3-Fluoreszenzmikroskopie jenen der Prozessierung von LC3 im Westernblot kongruent. Es konnte ermittelt werden, dass bei der Infektion Bakterien intrazellulär aufgenommen werden und ein gleicher Anteil davon (etwa 50 %) in LC3-positiven Kompartimenten zu finden war. Die Autophagievorgänge scheinen bei den Ausgangsstämmen und den davon abgeleiteten Mutanten in weitestgehend gleicher Weise abzulaufen. Die untersuchten bakteriellen Virulenzfaktoren scheinen folglich keinen wesentlichen Einfluss auf die Autophagie zu haben, wenn die Yersinien erst einmal aufgenommen worden sind. Unterschiede gab es lediglich in der Zellinvasivität einzelner Mutanten, die sich zumindest teilweise über eine veränderte Expression von *Yersinia*-Invasin und die dadurch vermittelte Endozytose der Bakterien erklären lassen.

4.4 Detektion der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen mittels LysoTrackerfärbung

Zusätzlich zur Testung der Yersinienstämme auf ihre Fähigkeit, Autophagie auszulösen, wurde für einzelne Mutanten im Anschluss noch untersucht, ob die Mutation dazu führt, dass es den infizierten Zellen möglich ist, die Autophagosomen durch Verschmelzung mit Lysosomen anzusäuern. Es könnte sein, dass die untersuchten Virulenzfaktoren zwar nicht in die Induktion der Autophagie involviert sind, wie oben untersucht, aber möglicherweise zur Verhinderung der Reifung des Autophagosoms zum Autolysosoms beitragen. Dafür wurde der Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker verwendet, welcher bei einem pH-Wert unter 5,5 rot fluoresziert und damit saure Kompartimente markiert. Dieser wurde bei GFP-LC3-transfizierten und mit Yersinien infizierten HeLa-Zellen angewendet. Dort wurde folglich mikroskopisch nach Bakterien gesucht, die sich in einem GFP-LC3-positiven Autophagosom befinden

(Grünfärbung), in welchem ein saures Milieu herrscht (Rotfärbung). In keinem der untersuchten Yersinienstämme konnte jedoch ein solcher Fall identifiziert werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass weder das ausgeschaltete Gen in dem Stamm WA-C *yts1E* (Abbildung 20), noch die ausgeschaltete Phospholipase *PldA* (Abbildung 21) oder Protease *Hrep* (Abbildung 22), diejenigen Virulenzfaktoren sind, welche die Ansäuerung der Autophagosomen verhindern. Es wurden zwar einzelne, rot angefärbte Bakterien nachgewiesen, welche sich in einem sauren Kompartiment (Lysosom) befanden, jedoch handelte es sich dabei durchweg um GFP-LC3-negative Yersinien, also solche Bakterien, die nicht dem Autophagosomenweg zugeführt worden waren.

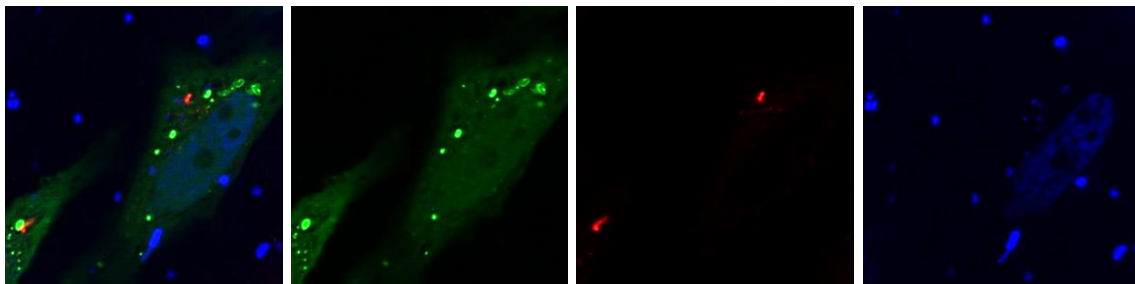


Abbildung 19 Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Um eine Reifung autophagosomaler Kompartimente (grün) zu sauren Autolysosomen nach Verschmelzung mit Lysosomen darstellen zu können, wurde der Farbstoff LysoTracker angewendet, durch welchen saure Kompartimente (rot) markiert werden. Die Zellkerne färben sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau an.

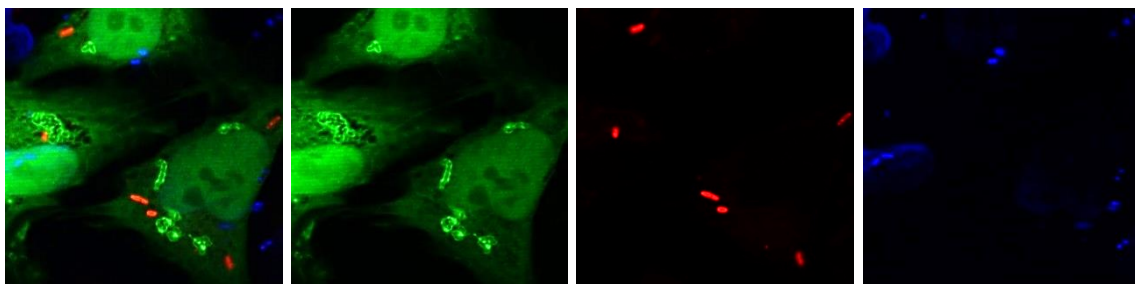


Abbildung 20 Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C *yts1E*.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C *yts1E* statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Um eine Reifung autophagosomaler Kompartimente (grün) zu sauren Autolysosomen nach Verschmelzung mit Lysosomen darstellen zu können, wurde der Farbstoff LysoTracker angewendet, durch welchen saure Kompartimente (rot) markiert werden. Die Zellkerne färben sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau an.

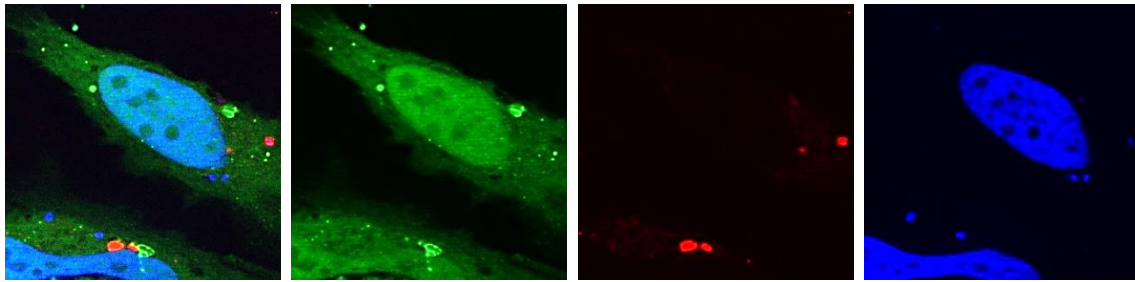


Abbildung 21 Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C pldA.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C pldA statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Um eine Reifung autophagosomaler Kompartimente (grün) zu sauren Autolysosomen nach Verschmelzung mit Lysosomen darstellen zu können, wurde der Farbstoff LysoTracker angewendet, durch welchen saure Kompartimente (rot) markiert werden. Die Zellkerne färben sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau an.

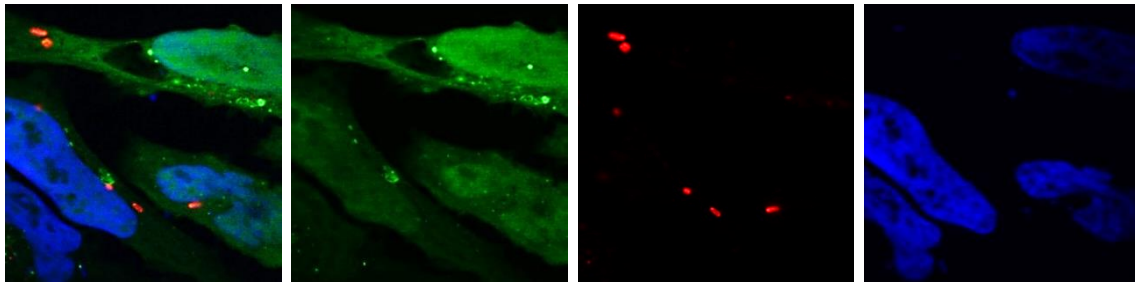


Abbildung 22 Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C hrep.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C hrep statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Um eine Reifung autophagosomaler Kompartimente (grün) zu sauren Autolysosomen nach Verschmelzung mit Lysosomen darstellen zu können, wurde der Farbstoff LysoTracker angewendet, durch welchen saure Kompartimente (rot) markiert werden. Die Zellkerne färben sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau an.

Auch bei dem Stamm JB580c 8081 sowie seinen Mutanten (PilQ- und FliA-Mutante) ließen sich keine Bakterien in angesäuerten Autophagosomen darstellen (Abbildung 24, Abbildung 25). LysoTracker-positive Bakterien des Stammes JB580c 8081 wiesen in Abbildung 23 zwar eine unspezifische Grünfärbung auf, befanden sich aber nicht in GFP-LC3-positiven Vakuolen.

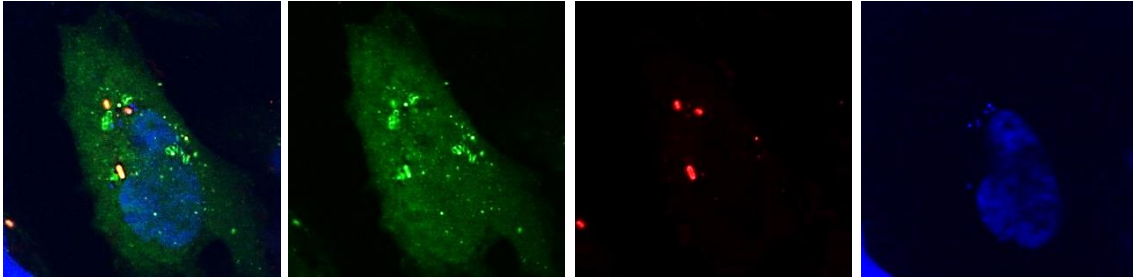


Abbildung 23 Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit JB580c 8081.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit JB580c 8081 statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Um eine Reifung autophagosomaler Kompartimente (grün) zu sauren Autolysosomen nach Verschmelzung mit Lysosomen darstellen zu können, wurde der Farbstoff Lysotracker angewendet, durch welchen saure Kompartimente (rot) markiert werden. Die Zellkerne färben sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau an.

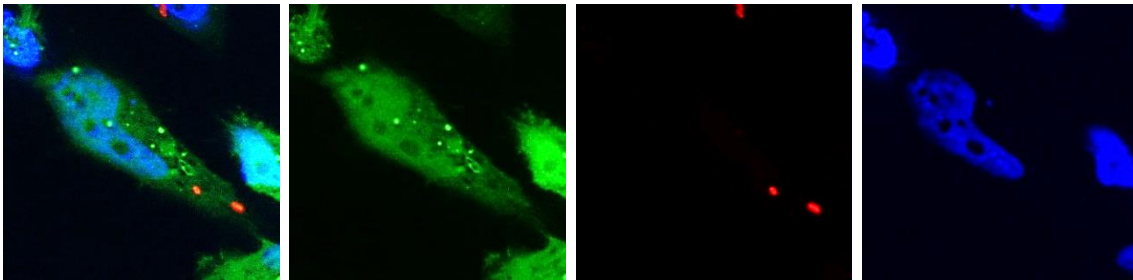


Abbildung 24 Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C JB580c 8081 pilQ.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit JB580c 8081 pilQ statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Um eine Reifung autophagosomaler Kompartimente (grün) zu sauren Autolysosomen nach Verschmelzung mit Lysosomen darstellen zu können, wurde der Farbstoff Lysotracker angewendet, durch welchen saure Kompartimente (rot) markiert werden. Die Zellkerne färben sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau an.

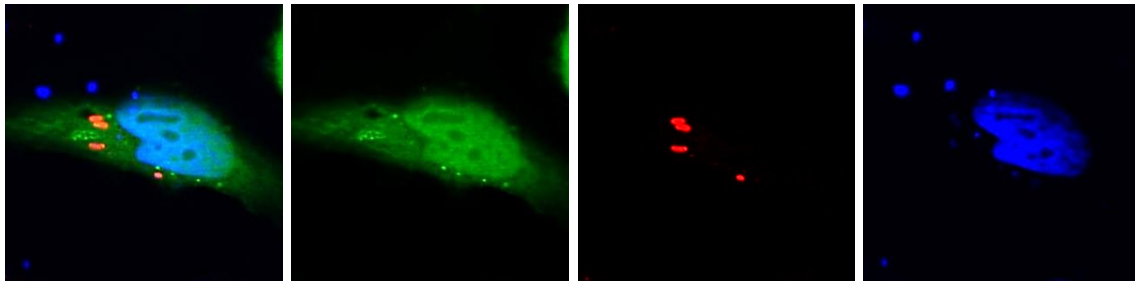


Abbildung 25 Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit JB580c 8081 fliA.

HeLa-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit JB580c 8081 fliA statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Um eine Reifung autophagosomaler Kompartimente (grün) zu sauren Autolysosomen nach Verschmelzung mit Lysosomen darstellen zu können, wurde der Farbstoff Lysotracker angewendet, durch welchen saure Kompartimente (rot) markiert werden. Die Zellkerne färben sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau an.

Mit m-IC_{cl2}-Zellen wurden am Beispiel von WA-C und WA-C yts1E vergleichbare Ergebnisse erzielt (Abbildung 26, Abbildung 27). Lysotracker-positive WA-C-Bakterien zeigten in Abbildung 26 zwar eine unspezifische Grünfluoreszenz, befanden sich aber nicht in GFP-LC3-positiven Autophagosomen. Dies deutet in Zusammenschau mit den vitalen Bakterien in LC3-II-positiven Kompartimenten (Valencia López, 2015) darauf hin, dass die untersuchten bakteriellen Faktoren nicht die entscheidenden Virulenzfaktoren sind, die es den Yersinien ermöglichen, Autophagie auszulösen oder durch Hemmung der Autophagosomenreifung dem Verdau zu entgehen und das Autophagosom für die Replikation zu nutzen.

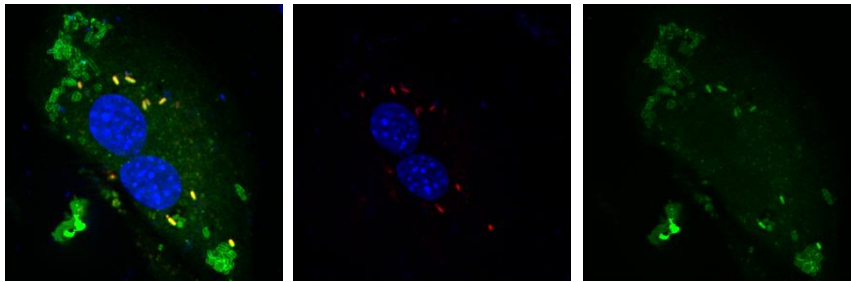


Abbildung 26 Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C (m-IC_{cl2}-Zellen).

m-IC_{cl2}-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Um eine Reifung autophagosomaler Kompartimente (grün) zu sauren Autolysosomen nach Verschmelzung mit Lysosomen darstellen zu können, wurde der Farbstoff LysoTracker angewendet, durch welchen saure Kompartimente (rot) markiert werden. Die Zellkerne färben sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau an.

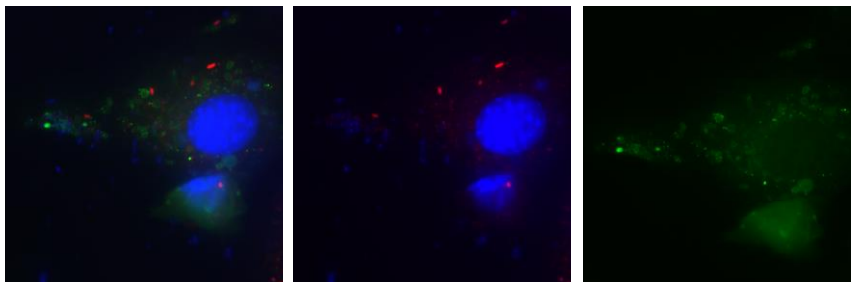


Abbildung 27 Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C yts1E (m-IC_{cl2}-Zellen).

m-IC_{cl2}-Zellen wurden mit hGFP-LC3 transfiziert. Am folgenden Tag fand die Infektion mit WA-C yts1E statt. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Infektionszeit betrug insgesamt 4 Stunden. Um eine Reifung autophagosomaler Kompartimente (grün) zu sauren Autolysosomen nach Verschmelzung mit Lysosomen darstellen zu können, wurde der Farbstoff LysoTracker angewendet, durch welchen saure Kompartimente (rot) markiert werden. Die Zellkerne färben sich nach Einbettung der fixierten Zellen in DAPI blau an.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser vorliegenden Dissertationsarbeit sollte untersucht werden, ob bestimmte *Yersinia*-Virulenzfaktoren einen Einfluss auf die Induktion von Autophagie durch *Yersinia enterocolitica* bei epithelialen Zellen haben. Ziel war es, mehr über die Mechanismen zu erfahren, über die intrazellulär befindliche Yersinien Autophagie induzieren. Zunächst zeigte sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Valencia L6pez (2015), dass *Yersinia enterocolitica* Autophagie bei epithelialen Zellen ausl6st und anschließend die Ansäuerung dieses Kompartiments, welche physiologischerweise durch Verschmelzung mit Lysosomen zustande kommt, verhindert. Von den in dieser Arbeit untersuchten bakteriellen Faktoren war bereits von Vorstudien bekannt, dass sie Auswirkungen auf die Virulenz von Yersinien haben können. Einige der hier analysierten Faktoren sind gerade in den frühen Stadien der Infektion von pathogenetischer Bedeutung. Im frühen Infektionsstadium dringen die Yersinien in den Wirtsorganismus ein und durchlaufen dabei eine intrazelluläre Phase, in der Autophagie-assoziierte Vorgänge die Pathophysiologie der Erkrankung bestimmen können. Virulenzfaktoren, die im frühen Stadium der Yersinieninfektion krankheitsrelevant sind, könnten über eine Einflussnahme auf Autophagie und den Fusionsprozess mit Lysosomen also die Infektion und den Krankheitsverlauf zum Vorteil der Yersinien verändern. Es sollte daher geklärt werden, ob manche der untersuchten Faktoren einen Effekt auf Autophagie bei Epithelzellen ausüben, was für die erste, frühe Phase des Infektionsgeschehens bei der Yersiniose von Bedeutung sein könnte.

Da davon auszugehen ist, dass sich *Yersinia pestis* entwicklungsbiologisch erst spät von *Yersinia pseudotuberculosis* heraus entwickelt hat, sind Ähnlichkeiten in den Virulenzmechanismen gegeben (Achtman et al., 1999, Skurnik et al., 2000). Erkenntnisse über eine der beiden Spezies können somit in vielen Fällen auch für die andere als bedeutsam angenommen werden. Auch sind Gemeinsamkeiten bei *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* bekannt, da trotz der früheren entwicklungsgeschichtlichen Trennung der beiden Spezies beide über eine Vielzahl ähnlicher Virulenzfaktoren verfügen und mit gastroenterischen Symptomen klinisch vergleichbare Krankheitsbilder auslösen können.

Hrep scheint als Protease in einem frühen Stadium der Infektion wichtig zu sein. Substrate der proteolytischen Aktivität von Hrep sind bisher allerdings noch nicht bekannt. Da Proteasen Zellmembranen schädigen und dadurch Autophagie auslösen können, ist eine intrazelluläre Aktivität von Hrep und ein davon abhängiger Effekt auf

die Induktion der Autophagie denkbar. Allerdings war die Hrep-Mutante in unseren Untersuchungen nicht eingeschränkt, Autophagie hervorzurufen. Die nicht verminderte Induktion von Autophagie nach der Infektion mit der Hrep-Mutante schließt einen Einfluss dieser Protease auf Autophagie dennoch nicht gänzlich aus, da eine Aktivität von Hrep bislang lediglich durch eine verminderte Virulenz bei oraler Infektion von Mäusen nachgewiesen werden konnte. Eine Spaltung von Proteinen durch Hrep unter Laborbedingungen konnte bisher nicht gezeigt werden. Als mögliche Ursachen hierfür, beziehungsweise auch für den bei uns ausbleibenden Effekt auf Autophagie, könnten nicht optimale Bedingungen für die proteolytische Enzymaktivität von Hrep angeführt werden. Außerdem scheint es möglich, dass zum Beispiel auch Proproteine inhibitorisch wirken und damit die Funktion von Hrep einschränken (Heusipp et. al, 2001). So ist es denkbar, dass Hrep aus diesen Gründen in unserem Versuchsaufbau als Autophagiemodulator keine Rolle spielt. Dementsprechend müssten Mäuse unter in vivo Bedingungen, unter denen die Hrep-Mutante eine verminderte Virulenz zeigt, auf Autophagie untersucht werden. Studien zur Analyse der Autophagieinduktion durch *Yersinien* im Mausinfektionsmodell sind bisher jedoch noch nicht etabliert.

Bei vielen pathogenen Bakterienarten spielen Phospholipasen eine wichtige Rolle für die Virulenz. So ist es *Helicobacter pylori* bei Fehlen der Phospholipase A nicht möglich, Zellen der Magenschleimhaut zu penetrieren und zu kolonisieren (Dorrell et al., 1999). Bei *Legionella pneumophila* führt die Phospholipaseaktivität dazu, dass das Surfactant durch den Phospholipidabbau angegriffen wird. Dadurch ist die Regulierung der Oberflächenspannung in den kleinen Atemwegen gestört und die Lungenerkrankung wird unterhalten (Flieger et al., 2000). Untersuchungen haben gezeigt, dass Mutanten für *plaB*, einer wichtigen Phospholipase in *Legionella pneumophila*, schlechter das Lungengewebe penetrieren und darin replizieren können. Auch war im „guinea pig pneumonia model“ eine Ausbreitung in Leber und Milz weniger ausgeprägt gegenüber dem Wildtyp (Schunder et al., 2010).

In vorliegender Arbeit wurde eine Knockout-Mutante der Phospholipase A von *Yersinia enterocolitica* geschaffen, um einen möglichen Effekt von PldA auf die Auslösung von Autophagie zu eruieren. Wie für Hrep ist auch für PldA denkbar, dass eine Schädigung der Wirtszellmembran durch PldA als Trigger von Autophagie wirkt. Allerdings konnten in vorliegender Arbeit auch für PldA keine Unterschiede in der Autophagieinduktion durch *Yersinia enterocolitica* in epithelialen Zellen ermittelt werden. Bei *Yersinia pseudotuberculosis* war für die PldA-Knockout-Mutante eine Reduzierung der Virulenz im Mausinfektionsmodell beschrieben worden. Daher erscheint auch für die PldA-Mutante von *Yersinia enterocolitica* eine Untersuchung in vivo an Mäuse interessant, in

welchen die Virulenz von Mutanten von PldA untersucht werden kann. Ein Vergleich der Virulenz im Mausmodell zur Abschätzung eines Unterschiedes zwischen *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* in Bezug auf die Bedeutung von PldA könnte weiterführend sein. Es ließe sich durch einen solchen Versuch untersuchen, ob PldA in vivo Einfluss auf die Virulenz hat und eventuell erst in späteren, extrazellulären Stadien der Infektion eine Rolle spielt, die in vorliegenden Versuchen möglicherweise nicht adäquat abgebildet werden. Bei *Yersinia pseudotuberculosis* wurde mittels IVET-Scans das Gen für PldA als Virulenzdeterminante ausgemacht. Bei Mutanten für PldA konnte eine verminderte Virulenz festgestellt werden, wenn die Übertragung der Bakterien durch intravenöse Infektion stattfand, wobei die in dieser Arbeit untersuchte Invasion epithelialer Zellen möglicherweise keine Rolle spielt. Es erfolgte keine direkte Analyse der Zellinvasivität, wenngleich eine veränderte Zellinvasion von den Autoren als wahrscheinlich erachtet wurde (Karlyshev et al., 2001). Dies lässt den Schluss zu, dass PldA, wie möglicherweise auch Hrep (siehe oben), unter den untersuchten Laborbedingungen eventuell keine entscheidende Rolle spielt, wenngleich dieses Enzym eine Bedeutung für die Virulenz in vivo hat. Dafür spricht auch die weite Verbreitung unter den Enterobacteriaceae (Brok et al., 1994).

Auch die Untersuchung des Einflusses von YpIA auf die Autophagieinduktion wäre sehr interessant gewesen, weil andere Arbeiten bereits eine verminderte Penetration von lymphatischen Geweben bei der oralen Infektion von Mäusen mit Mutanten für YpIA gezeigt haben. Auch konnte bei einer Infektion mit sehr hohen Dosen ermittelt werden, dass zwar zunächst gleich viele Bakterien im Wirt überleben, aber in späteren Stadien der Infektion die Anzahl von überlebenden Bakterien gegenüber dem Wildtyp abnimmt (Schmiel et al., 1998). YpIA scheint also sowohl in frühen als auch in späten Stadien der Yersinieninfektion von Relevanz zu sein. Man könnte daraus spekulieren, dass YpIA-negative Bakterien eventuell zunächst weniger Autophagie auslösen, anschließend das Autophagosom aber nicht als Kompartiment zur Replikation nutzen können. Auf der anderen Seite könnte es auch möglich sein, dass Autophagie wie beim Wildtyp induziert wird, dann aber die Blockade der Verschmelzung mit dem Lysosom ausbleibt und die Bakterien der Immunabwehr der Wirtszelle zum Opfer fallen. Natürlich ist letztendlich auch nicht ausgeschlossen, dass sich, ähnlich wie auch für Hrep und PldA, unter Laborbedingungen in Zellkulturexperimenten kein Unterschied in der Induktion von Autophagie gezeigt hätte. Denn auch YpIA könnte möglicherweise erst in späteren Stadien der Infektion im lymphatischen Gewebe eine Rolle spielen, eine Infektionssituation, die durch unsere Studien mit Epithelzellen nicht erfasst wird. Hier sind weiterführende Untersuchungen sinnvoll. Leider waren unsere Bemühungen

zur Herstellung einer *Yersinia enterocolitica* YplA-Mutante, analog zu den Mutanten von PldA und Hrep, nicht erfolgreich.

Bei den Versuchen mit der Mutante für das Typ II Sekretionssystem Yts1 wäre entgegen der in dieser Arbeit gezeigten vermehrten eine nicht veränderte oder verminderte Prozessierung von LC3 bei Epithelzellen erwartbar gewesen. Denn vorherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass Yts1 bei Infektionsversuchen in vivo vor allem für die späten Phasen der Infektion bei der Ausbreitung in tiefere lymphatische Gewebe wichtig ist (Iwobi et al., 2003). Die in den hier durchgeführten Arbeiten nachgewiesene Zunahme an Autophagie nach Infektion mit der yts1E-Mutante war offenbar nicht auf eine grundsätzlich verstärkte Induktion von Autophagie durch das Bakterium zurückzuführen, sondern auf eine erhöhte Zellinvasivität der yts1E-Mutante. Das bedeutet umgekehrt, dass das Yts1 Sekretionssystem einer übermäßigen Aufnahme der Yersinien in Epithelzellen unter physiologischen Wildtyp-Infektionsbedingungen entgegenwirkt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Yts1 eine zu starke Kolonisation von Zellen mit *Yersinia enterocolitica* verhindert, um so zu bewirken, dass das Nährstoffangebot in den Zellen ausreichend ist und die Epithelzelle nicht durch eine Überladung mit Bakterien zugrunde geht. Somit könnte die Autophagie als Nische zur intrazellulären Replikation gesichert werden. Eine intrazelluläre Vermehrung von Yersinien mag nicht nur in der ersten, intrazellulären Invasionsphase relevant sein, sondern könnte auch in späteren Krankheitsstadien eine wichtige Rolle spielen.

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch eine Untersuchung von Yts2-Mutanten. Denn hier konnte bei Untersuchungen an Makrophagen gezeigt werden, dass die entsprechenden Gene des Yts2 Typ II Sekretionssystems bei der Infektion von Makrophagen hochreguliert werden und somit eine Rolle für das Überleben in Makrophagen spielen (Bent et al., 2015). Das könnte als Hinweis darauf verstanden werden, dass Yersinien in späteren Infektionsstadien möglicherweise Makrophagen als intrazelluläre Nische zur Replikation nutzen. Auch dabei könnte eine Induktion von Autophagie von Bedeutung sein. Über welche Substrate und molekulare Mechanismen die Yts Sekretionssysteme von *Yersinia* Einfluss auf Wirt und Wirtszelle nehmen, ist bisher unbekannt.

Die Mutante für das Gen hfq, welches für ein RNA-bindendes Protein kodiert, zeigte eine verminderte LC3-Konversion in der Immunodetektion und eine fluoreszenzmikroskopisch verminderte Anzahl von Autophagosomen, die Bakterien

beinhalteten. Im Folgenden werden mögliche Ursachen angesprochen, die dafür mitverantwortlich sein könnten.

Zum einen muss beachtet werden, dass die Hfq-Mutante ein langsames Wachstum zeigt und weniger Invasin produziert. Dadurch kann die Penetration in Zellen herabgesetzt sein und es würden sich folglich weniger Bakterien in den Zellen befinden, welche den Prozess der Autophagie antreiben. Hierfür spricht die insgesamt verminderte Anzahl von Bakterien in den Zellen gegenüber dem Wildtyp. Denn Invasin ist an der Anheftung und der Invasion von *Yersinia enterocolitica* in die Wirtszelle wesentlich beteiligt (Isberg, 1996). Bei Untersuchungen mit Mutanten für Invasin konnten auch in vivo weniger Bakterien im Vergleich zum Wildtyp aus den Peyer Plaques in frühen Stadien der Infektion gewonnen werden (Pepe und Miller, 1993). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Invasin bei der Autophagieinduktion eine wichtige Rolle spielt (Valencia López, 2015). Da die Hfq-Mutante weiterhin in der Lage war, die Reifung des Autophagosoms zum Autolysosom zu blockieren, um damit Autophagosomen als Replikationsnische zu nutzen, ist die reduzierte Auslösung von Autophagie wahrscheinlich auf die verminderte Zellinvasivität der Hfq-Mutante zurückzuführen.

Zum anderen soll erwähnt werden, dass die Hfq-Mutante auch weniger Urease und Yersiniabactin produziert. Durch die verminderte Urease ist das extrazelluläre Überleben der Yersinien im sauren Milieu herabgesetzt (De Koning-Ward und Robins-Browne, 1995) und dadurch spielt Urease bereits in sehr frühen Stadien der Infektion eine Rolle für die Virulenz. In Versuchen mit Ratten und Mäusen zeigte sich sowohl für die intravenöse als auch die orale Infektion eine verminderte Virulenz bei Mutanten für Urease (Gripenberg-Lerche et al., 2000). Auch Yersiniabactin ist für die Pathogenität von *Yersinia enterocolitica* unverzichtbar (Brem et al., 2001). Es stellt unter anderem die Eisenversorgung der Bakterien sicher (Rakin et al., 1994). Eine verminderte Virulenz bei reduzierter Produktion von Urease und Yersiniabactin könnte möglicherweise auch dazu beitragen, dass die Bakterien weniger Autophagie auslösen.

Die im Immunoblot festgestellte, leicht verminderte Prozessierung von LC3 bei Infektion der Zellen mit der Mutante für den Regulator CsrA könnte zumindest teilweise dadurch erklärt werden, dass CsrA durch Beeinflussung der bakteriellen Genexpression einen Einfluss auf die Beweglichkeit von *Yersinia enterocolitica* hat (LeGrand et al., 2015). Durch die csrA-Mutation sind die Bakterien weniger beweglich und können somit schlechter zu den Zellen gelangen. Untersuchungen haben gezeigt,

dass die Motilität einen wichtigen Faktor für die Herstellung des Zellkontakts und die Invasion der Wirtszelle darstellt (Young et al., 2000). Durch eine Regulation von FlhDC (Romeo et al., 1998), welches den Hauptregulator für die Motilität darstellt, hat CsrA auch einen Einfluss auf weitere untergeordnete Faktoren, welche die Virulenz von *Yersinien* mitbestimmen. So wird unter anderem auch die Phospholipase YplA bei der CsrA-Mutante weniger exprimiert. Wie bereits oben erwähnt, gilt YplA bei *Yersinia enterocolitica* als Virulenzfaktor, der in einer frühen Phase der Infektion eine Rolle spielt (Schmiel et al., 1998). Vermutlich wird die Induktion von Autophagie auch dadurch maßgeblich negativ beeinflusst, dass die in vorliegender Arbeit verwendete CsrA-Mutante weniger Invasin als der Wildtyp produziert und dadurch die Penetration der Zellen erschwert ist (siehe oben).

Dass die Mutante für den „flagellar sigma factor“ FliA eine deutlich verminderte LC3-Konversion in den Zellkulturexperimenten zeigt, lässt sich durch seinen Einfluss auf die Expression von Invasin erklären. Dieses ist von wichtiger Bedeutung bei der Vermittlung von Zellinvasivität und der Auslösung von Autophagie durch *Yersinien* (Valencia Lòpez, 2015). Zum anderen kontrolliert FliA auch die Transkription von YplA. Diese Phospholipase könnte, wie oben beschrieben, mit der Ausnutzung von Autophagosomen als Replikationsnische in Verbindung stehen, welche möglicherweise eine initiale Einwanderung der Bakterien in das lymphatische Gewebe begünstigt.

Demgegenüber war die LC3-Prozessierung nach Infektion mit einer Mutante für PilQ im Vergleich zum Wildtyp kaum inhibiert. Von anderen Bakteriengattungen ist bekannt, dass PilQ in die Regulation der Ausbildung von Pili involviert ist, die einen Kontakt zur Wirtszelle herstellen (Tønnum et al., 1998) und für eine vollwertige Virulenz bei der Infektion von Mäusen von Bedeutung sind (Forslund et al., 2010). Bei *Yersinien* scheint ein Fehlen von PilQ keinen Effekt auf die Auslösung von Autophagie zu haben.

Die verminderte Autophagieinduktion bei der Mutante für PhoP in Zellkulturexperimenten mit Stämmen von *Yersinia pseudotuberculosis* zeigt, dass das Regulatorsystem PhoP/PhoQ in die Vermittlung von Autophagie durch *Yersinien* involviert ist.

Pujol und Bliska konnten sowohl für *Yersinia pestis*, als auch für *Yersinia pseudotuberculosis* nachweisen, dass für beide Bakterienarten die Fähigkeit zum Überleben in Makrophagen und, sich dort zu vermehren, gegeben und durch PhoP reguliert ist (Pujol und Bliska, 2003). So erbrachten Untersuchungen an PhoP-Mutanten, dass das PhoP/PhoQ Zweikomponentensystem essentiell zum Überleben in Makrophagen beiträgt und auch in vivo die LD₅₀ dieser Mutanten deutlich erhöht ist.

Daraus lässt sich ableiten, dass das Regulationssystem um PhoP für die Virulenz der Bakterien von wichtiger Bedeutung ist (Oyston et al., 2000). Unser Ergebnis, dass PhoP bei epithelialen Zellen zur Auslösung von Autophagie beiträgt, was mit einer verbesserten intrazellulären Vermehrung assoziiert ist, impliziert, dass dieser Mechanismus auch für eine effiziente Replikation der Yersinien in Makrophagen von Bedeutung sein könnte. Als globales Regulationssystem koordiniert das PhoP/PhoQ System die Anpassung der Virulenz der Yersinien an die jeweilige Infektsituation. Welche durch PhoP kontrollierten Faktoren zur Induktion von Autophagie genau beitragen, ist bisher jedoch noch unklar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit bisherige Erkenntnisse unterstützen, dass *Yersinia enterocolitica* in epithelialen Zellen Autophagie auslöst und dieser Mechanismus zur intrazellulären Vermehrung der Bakterien beiträgt, da eine Reifung der Yersinien-haltigen Autophagosomen zu Autolysosomen und eine dadurch stattfindende Ansäuerung der Vakuolen unterblieb. *Yersinia enterocolitica* kann so dem intrazellulären, wirtseigenen lysosomalen Abwehrmechanismen entgehen. Erhoffte, neue Erkenntnisse zu bakteriellen Faktoren, die bei *Yersinia*-Infektion die Autophagosomenbildung induzieren und eine Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen hemmen, wurden jedoch nur bedingt erfüllt. Die untersuchten Yersinienmutanten zeigten zwar teilweise verringerte und sogar verstärkte Autophagie-Signale, das Ausmaß der Autophagie korrelierte jedoch jeweils eng mit der intrazellulären Aufnahme der Bakterien. Wir folgern daraus, dass diese Faktoren primär die Invasivität der Bakterien, aber nicht die Fähigkeit zur Induktion von Autophagie kontrollieren. Die molekularen Mechanismen, über welche die Yersinien, die in die Zelle aufgenommen wurden und sich in einer intrazellulären Vakuole befinden, schließlich Autophagie auslösen, bleiben bisher weiter unbekannt und es bedarf dazu noch weiterer, tiefergehender Untersuchungen.

6 Zusammenfassung

Pathogene *Yersinien* überleben und replizieren intrazellulär in Autophagosomen. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind bisher weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche *Yersinia*-Faktoren zu ihrem Einfluss auf die Autophagieinduktion und die Hemmung der Autolysosomenreifung in *Yersinien*-infizierten epithelialen Zellen untersucht.

Zu den untersuchten *Yersinia*-Mutanten zählten zum einen eigens erzeugte Knockout-Mutanten, bei denen eine Deletion der Gene für die Protease Hrep beziehungsweise für die Phospholipase PldA durch Insertion eines Antibiotikaresistenzgens herbeigeführt wurde. Zum anderen wurden bereits vorhandene *Yersinien*-Mutanten untersucht. Dabei handelte es sich um Mutanten für das RNA-bindende Protein Hfq, das die bakterielle Genexpression post-transkriptionell beeinflussende Protein CsrA und für das Typ II Proteinsekretionssystem Yts1. Außerdem wurden *Yersinien* mit Mutationen für die übergeordneten Regulatoren FliA, das Sekretin PilQ, sowie für PhoP untersucht. Alle diese Faktoren haben in früheren Untersuchungen bei Mutanten zu einer veränderten Virulenz bei Infektion mit *Yersinien* geführt.

Als Indikator für Autophagie wurde die Prozessierung des Autophagosom-assoziierten Proteins LC3 mittels Westernblot analysiert. Es wurde ermittelt, dass bei den Mutanten für Hfq und CsrA, sowie für FliA und PhoP die Autophagieinduktion vermindert war. Bei der Mutante für Yts1 war die LC3-Konversion erhöht, was darauf schließen ließ, dass sich ein funktionelles Typ II Sekretionssystem hemmend auf Autophagie auswirkt. Die LC3-Prozessierung bei den Mutanten für Hrep und PldA zeigte sich unverändert zum Ausgangsstamm WA-C.

In der Fluoreszenzmikroskopie an GFP-LC3-transfizierten Zellen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Allerdings waren die Veränderungen in der LC3-Prozessierung im Westernblot eher auf eine veränderte Invasivität der *Yersinien*-mutanten zurück zu führen, als auf eine veränderte Autophagieinduktion. Denn wie bei den Ausgangsstämmen befanden sich bei den Mutanten etwa 50 % der intrazellulären Bakterien in LC3-positiven Kompartimenten.

Bei keiner der verwendeten Mutanten konnten fluoreszenzmikroskopisch Bakterien in angesäuerten Kompartimenten dargestellt werden, so dass die untersuchten *Yersinia*-Faktoren offenbar nicht entscheidend dazu beitragen, die Verschmelzung von Autophagosom und Lysosom zum Autolysosom zu blockieren.

Da die von uns untersuchten *Yersinia*-Faktoren vor allem einen Einfluss auf die Invasivität der Yersinien und nicht auf die Induktion von Autophagie und die Hemmung der Autolysosomenbildung hatten, bleiben die molekularen Mechanismen, die das Überleben von Yersinien in Autophagosomen sichern, zunächst weiter unklar.

Abstract

Pathogenic *Yersinia* species can survive and replicate intracellularly in autophagosomes. However, it is yet largely unknown which mechanisms the bacteria use for this purpose. In this dissertation work we analysed different *Yersinia* factors on their responsibility for the induction of autophagy and the inhibition of autolysosome maturation in infected epithelial cells.

On one hand, we analysed knock-out mutants of *Yersinia enterocolitica* that were specially designed for these investigations. These mutants had either a deletion of the protease Hrep or of the phospholipase PldA due to insertion of an antibiotic resistance cassette in the respective genes. On the other hand, we examined already existing bacterial mutants that were deficient for the RNA-binding protein Hfq, for the protein CsrA that influences bacterial gene expression on a post-transcriptional level, or for the type II secretion system Yts1. Furthermore, we analysed mutants for the global regulatory proteins FliA, the PilQ secretin, as well as for PhoP. In previous studies, all these factors have been shown to influence the virulence of *Yersinia*.

As a marker of autophagy execution, we investigated processing of the autophagosome-associated protein LC3 by Western immunoblotting. It was revealed that *Yersinia enterocolitica* strains with deletions of Hfq or CsrA, as well as of FliA or PhoP induced less autophagy than the wild type strains. In contrast, the mutant for Yts1 induced more LC3 conversion. This implies that the Yts1 type II secretion system may physiologically inhibit autophagy. The mutants for Hrep and PldA displayed no differences in the processing of LC3 compared to wild type bacteria.

By applying GFP-LC3 transfected cells, we could confirm our results in fluorescence microscopy. However, it appeared that the differences in the processing of LC3 resulted from distinct abilities of the various mutants to invade cells but not from differential capacities of autophagy induction, since almost 50 % of all intracellular bacteria resided inside LC3-positive compartments irrespective of the investigated mutant or parent strain.

For none of the mutants we detected bacteria in acidified vacuoles. Thus, the *Yersinia* factors studied in this dissertation seem not to be important for blocking the observed fusion of autophagosomes with lysosomes.

Since the analysed *Yersinia* factors affected predominantly the capacity of host cell invasion, but not the induction of autophagy or the inhibition of autolysosome formation, it is hitherto yet unclear which molecular mechanisms ensure the survival of *Yersinia* in autophagosomes.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

ATG	<i>Autophagy-related gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Chlor.	Chloramphenicol
DAPI	<i>4',6'-diamidino-2-phenylindole</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Deoxycholsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FIP200	<i>FAK family kinase interacting protein of 200 kDa</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HPI	<i>high-pathogenicity island</i>
Ig	Immunglobulin
Inv	Invasin
LAMP2	<i>lysosomal-associated membrane protein 2</i>
LB	Luria-Bertani
LC3	<i>light chain protein 3</i>
LD ₅₀	letale Dosis 50 %
m-IC _{cl2}	<i>mouse intestinal cell clone 2</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
OD	optische Dichte
PAS	<i>phagophore assembly site</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBST	PBS Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatedylethanolamin
PEI	<i>Polyethylenimine</i>
PIK3R4	<i>phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pYV	<i>Yersinia</i> Virulenzplasmid

RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC-Medium	<i>super optimal broth</i> -Medium mit 20 mM Glucose
Spect.	Spectinomycin
sRNA	<i>small RNA</i>
ULK1-Komplex	Unc-51-like kinase 1-Komplex
UV	Ultraviolett
VAMP8	<i>lysosomal SNARE vesicle-associated membrane protein 8</i>

Abkürzungen für Mikroorganismen

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
WA-C	Derivat von <i>Yersinia enterocolitica</i> Wildtypstamm WA-314, Serotyp O:8 ohne Virulenzplasmid

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm beziehungsweise Schwerebeschleunigung
h	Stunde
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
nm	Nanometer
U	Unit
V	Volt

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Mikroskop.....	21
Tabelle 2	Allgemeine Geräte.....	21
Tabelle 3	Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 4	Antibiotika.....	23
Tabelle 5	Selektivagarplatten.....	23
Tabelle 6	Verwendete Bakterienstämme.....	26
Tabelle 7	Verwendete Zelllinien	27
Tabelle 8	TE-boil Puffer	30
Tabelle 9	Restriktionsansatz für den Verdau von pUC19 und pKAS46 yplA....	35
Tabelle 10	Restriktionsansatz für den Verdau von pMiniT hrep, pMiniT Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette) für hrep, pUC19 yplA, pMiniT Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette) für yplA, pMiniT pldA und pMiniT Spect. (Spectinomycinresistenzkassette) für pldA.....	35
Tabelle 11	Reskriktionsansatz für den Verdau von pMiniT hrep + Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette), pMiniT pldA + Spect. (Spectinomycinresistenzkassette), pUC19 yplA + Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette) und pKAS46	36
Tabelle 12	1X TAE Puffer	37
Tabelle 13	6X Probenpuffer für Agarosegelelektrophorese	37
Tabelle 14	PCR Mix zur Überprüfung der Inserts durch Dream Taq Polymerase	38
Tabelle 15	Ligationsansatz für yplA und pKAS46 sowie yplA und pUC19	38
Tabelle 16	Ligationsansatz für Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette) und hrep in pMiniT, Spect. (Spectinomycinresistenzkassette) und pldA in pMiniT sowie Chlor. (Chloramphenicolresistenzkassette) und yplA in pUC19	39
Tabelle 17	Ligationsansatz für hrep + C (Chloramphenicolresistenzkassette) und pKAS46, yplA + C (Chloramphenicolresistenzkassette) und pKAS46 sowie pldA + S (Spectinomycinresistenzkassette) und pKAS46	39
Tabelle 18	Medium für m-IC _{cl2}	40
Tabelle 19	1X RIPA-Lysepuffer.....	44
Tabelle 20	Puffer zur Herstellung von SDS-Gelen	45
Tabelle 21	4X SDS sample buffer	46
Tabelle 22	1X SDS running buffer.....	46
Tabelle 23	1X Transferpuffer A	46
Tabelle 24	1X Transferpuffer B	47
Tabelle 25	1X Transferpuffer C	47
Tabelle 26	Puffer für die Antikörperlösungen	47

Tabelle 27	Verwendete Antikörper	48
------------	-----------------------------	----

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schema zum Ablauf von Autophagie. (modifiziert nach Figure 1, Huang und Brumell, 2014).....	9
Abbildung 2	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder Thermo Scientific (#26619).....	24
Abbildung 3	LC3-Konversion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit WA-C und WA-C yts1E.....	50
Abbildung 4	LC3-Konversion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit WA-C, WA-C SOR5 und WA-C SOR38c.....	51
Abbildung 5	LC3-Konversion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit JB580c 8081, JB580c 8081 fliA und JB580c 8081 pilQ.....	53
Abbildung 6	LC3-Konversion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit WA-C, WA-C pldA und WA-C hrep.....	54
Abbildung 7	LC3-Konversion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit IP32953 und YPIP06.....	55
Abbildung 8	LC3-Konversion bei m-IC _{cl2} -Zellen nach Infektion mit WA-C, WA-C SOR5, WA-C SOR38c, WA-C yts1E, JB580c 8081, JB580c 8081 fliA und JB580c pilQ.....	56
Abbildung 9	Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C.....	57
Abbildung 10	Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C yts1E.....	58
Abbildung 11	Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C SOR5.....	58
Abbildung 12	Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C SOR38c.....	59
Abbildung 13	Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit JB580c 8081.....	59
Abbildung 14	Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit JB580c 8081 pilQ.....	60
Abbildung 15	Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit JB580c 8081 fliA.....	60
Abbildung 16	Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C.....	61
Abbildung 17	Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C pldA.....	61
Abbildung 18	Lokalisierung von GFP-LC3 nach Infektion mit WA-C hrep.....	62
Abbildung 19	Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C.....	63
Abbildung 20	Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C yts1E.....	63
Abbildung 21	Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C pldA.....	64
Abbildung 22	Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C hrep.....	64
Abbildung 23	Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit JB580c 8081.....	65
Abbildung 24	Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C JB580c 8081 pilQ.....	65

Abbildung 25	Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit JB580c 8081 fliA.....	66
Abbildung 26	Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C (m-IC _{cl2} -Zellen).....	67
Abbildung 27	Analyse der Ansäuerung Yersinien-haltiger Vakuolen nach Infektion mit WA-C yts1E (m-IC _{cl2} -Zellen).	67

10 Literaturverzeichnis

Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 14043–14048.

Adkins S, Burmeister M. 1996. Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem* 240, 17–23.

Beier D, Gross R. 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* 9: 143–152.

Bens M, Bogdanova A, Cluzeaud F, Migureol L, Kerneis S, Kraehenbuhl JP, Kahn A, Pringault E, Vandewalle A. 1996. Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *The American journal of physiology*, 270(6 Pt 1), pp.C1666–74.

Bent ZW, Poorey K, Brazel DM, LaBauve AE, Sinha A, Curtis DJ, House SE, Tew KE, Hamblin RY, Williams KP, Branda SS, Young GM, Meagher RJ. 2015. Transcriptomic Analysis of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B Infecting Murine Macrophages Reveals New Mechanisms of Extracellular and Intracellular Survival. *Infection and Immunity*, 83(7), 2672–2685.

Bozue J, Mou S, Moody KL, Cote CK, Trevino S, et al. 2011. The role of the *phoPQ* operon in the pathogenesis of the fully virulent CO92 strain of *Yersinia pestis* and the IP32953 strain of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb Pathog* 50: 314–321.

Brem D, Pelludat C, Rakin A, Jacobi CA, Heesemann J. 2001. Functional analysis of yersiniabactin transport genes of *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology*, 147, pp. 1115–1127.

Brok RG, Brinkman E, van Bortel R, Bekkers AC, Verheij HM, Tommassen J. 1994. Molecular characterization of enterobacterial *pldA* genes encoding outer membrane phospholipase A. *Journal of Bacteriology*, 176(3), 861–870.

Collins RF, Frye SA, Kitmitto A, Ford RC, Tønnum T, Derrick JP. 2004. Structure of the *Neisseria meningitidis* outer membrane PilQ secretin complex at 12 Å resolution. *J Biol Chem*;279(38):39750–6.

De Duve C, Wattiaux R. 1966. Functions of lysosomes. *Annual review of physiology*, 28, pp.435–92.

de Koning-Ward TF, Robins-Browne RM. 1995. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 63: 3790–3795.

Deuretzbacher A, Czymmek N, Reimer R, Trülsch K, Gaus K, Hohenberg H, Heesemann J, Aepfelbacher M, Ruckdeschel K. 2009. Beta1 integrin-dependent engulfment of *Yersinia enterocolitica* by macrophages is coupled to the activation of

autophagy and suppressed by type III protein secretion. *J Immunol.*;183(9):5847–60. 10.4049/jimmunol.0804242

Dorrell N, Martino MC, Stabler RA, Ward SJ, Zhang ZW, McColm AA, Farthing MJ, Wren BW. 1999. Characterization of *Helicobacter pylori* PldA, a phospholipase with a role in colonization of the gastric mucosa. *Gastroenterology* 117:1098–1104.

Flieger A, Gongab S, Faigle M, Mayer HA, Kehrer U, Mussotter J, Bartmann P, Neumeister B. 2000. Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. *FEMS Microbiol Lett* 188:129–133.

Forslund AL, Salomonsson EN, Golovliov I, Kuoppa K, Michell S, Titball R, Oyston P, Noppa L, Sjöstedt A, Forsberg A. 2010. The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *BMC Microbiol.* 10:227. 10.1186/1471-2180-10-227.

Frye SA, Lång E, Beyene GT, Balasingham SV, Homberset H, Rowe AD, Amburg OH, Tønjum T. 2015. The Inner Membrane Protein PilG Interacts with DNA and the Secretin PilQ in Transformation. *PLoS ONE*, 10(8), e0134954.

Grabenstein JP, Marceau M, Pujol C, Simonet M, Bliska JB. 2004. The response regulator PhoP of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for replication in macrophages and for virulence. *Infect Immun* 72: 4973–4984

Gripenberg-Lerche C, Zhang L, Ahtonen P, Toivanen P, Skurnik M. 2000. Construction of urease-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and o:8: role of urease in virulence and arthritogenicity. *Infect Immun* 68: 942–947.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580.

Hartford CM, Ratain MJ. 2007. Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin Pharmacol Ther.*; 82: 381–8.

Heesemann J, Sing A, Trulzsch K. 2006. *Yersinia's* stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol* 9: 55–61.

Helman J D. 1991. Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol Microbiol.*;5:2875–2882.

Henrissat B, Heffron SE, Yoder MD, Lietzke SE, Jurnak F. 1995. Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. *Plant Physiol.* 107, 963–976 10.1104/pp.107.3.963.

Hensel M. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36:1015-1023.

Heusipp G, Young GM, Miller VL. 2001. HreP, an in vivo-expressed protease of *Yersinia enterocolitica*, is a new member of the family of subtilisin/kexin-like proteases. *J. Bacteriol.* 183:3556-3563.

Hof, H., Dörries, Medizinische Mikrobiologie Duale Reihe, Thieme, 5. Auflage (2014)

- Horne SM, Prüss BM. 2006. Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid-encoded virulence genes. *Arch Microbiol* 185:115–126. doi:10.1007/s00203-005-0077-1.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan J, Oshiro N, Mizushima N. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 1981–1991.
- Huang J, Brumell J.H. 2014. Bacterial-autophagy interplay: a battle for survival, *Nature Reviews* 12, 101-114.
- Isberg RR. 1996. Uptake of enteropathogenic *Yersinia* by mammalian cells. *Current topics in microbiology and immunology*, 209, pp.1–24.
- Iwobi A, Heesemann J, Garcia E, Igwe E, Noeltling C, Rakin A. 2003. Novel virulence-associated type II secretion system unique to high-pathogenicity *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 71, 1872–1879.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.*;19:5720–5728.
- Kakoschke T, Kakoschke S, Magistro G, Schubert S, Borath M, Heesemann J, Rossier, O. 2014. The RNA chaperone Hfq impacts growth, metabolism and production of virulence factors in *Yersinia enterocolitica*. *PLoS One.*;9(1):e86113 doi: 10.1371/journal.pone.0086113 ; PubMed Central PMCID: PMC3893282.
- Kapatral V, Olson J W, Pepe J C, Miller V L, Minnich S A. 1996 Temperature-dependent regulation of *Yersinia enterocolitica* class III flagellar genes. *Mol Microbiol.*;19:1061–1071.
- Karlyshev AV, Oyston PCF, Williams K, Clark GC, Titball RW, Winzeler EA, Wren BW. 2001. Application of high-density array-based signature-tagged mutagenesis to discover novel *Yersinia* virulence-associated genes. *Infect. Immun.* 69: 7810–7819.
- Klionsky DJ, Cuervo AM, Dunn WA Jr, Levine B, van der Klei I, Seglen PO. 2007. How shall I eat thee? *Autophagy* 3, 413-416.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Legrand K, Petersen S, Zheng Y, Liu KK, Ozturk G, Chen J, Young GM. 2015. CsrA impacts survival of *Yersinia enterocolitica* by affecting a myriad of physiological activities. *BMC Microbiol.* 15:31. 10.1186/s12866-015-0343-6.
- Ligeon, L.-A., Moreau, K., Barois, N., Bongiovanni, A., Lacorre, D.-A., Werkmeister, E., ... Lafont, F. (2014). Role of VAMP3 and VAMP7 in the commitment of *Yersinia pseudotuberculosis* to LC3-associated pathways involving single- or double-membrane vacuoles. *Autophagy*, 10(9), 1588–1602.

Longatti A, Tooze SA. 2009. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ.* 2009;16:956–965.

López, MJV. Targeting of autophagy by *Yersinia enterocolitica* in epithelial cells. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fachbereich Biologie der Universität Hamburg, 2015

Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, Sadoshima J. 2007. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and beclin 1 in mediating autophagy. *Circulation Research.*;100(6):914–922.

Mikrobiologie, Praktikum für Studenten der Humanmedizin, Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Direktor Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher. 1. Trimester 2013.

Mizushima N. 2004. Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*;36:2491–2502.

Mizushima N. 2010. The role of Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 132-139

Moreau K, Lacas-Gervais S, Fujita N, Sebbane F, Yoshimori T, Simonet M, Lafont F. 2010. Autophagosomes can support *Yersinia pseudotuberculosis* replication in macrophages. *Cell. Microbiol.* 12, 1108–1123. 10.1111/j.1462-5822.2010.01456.x

Oyston PCF, Dorrell N, Williams K, Li SR, Green M, Titball RW, Wren BW. 2000. The Response Regulator PhoP Is Important for Survival under Conditions of Macrophage-Induced Stress and Virulence in *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity*, 68(6), 3419–3425.

Parzych KR, Klionsky DJ. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 20, 460-473.

Pepe JC, Miller VL. 1993. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14), 6473–6477.

Phornphisutthimas S, Thamchaipenet A, Panijpan B. 2007. Conjugation in *Escherichia coli*. *Biochem Mol Biol Educ* 35:440–445. doi:10.1002/bmb.113

Pisano F, Heine W, Rosenheinrich M, Schweer J, Nuss AM, Dersch P. 2014. Influence of PhoP and Intra-Species Variations on Virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* during the Natural Oral Infection Route. *PLoS ONE*, 9(7), e103541.

Pujol C, Klein KA, Romanov GA, Palmer LE, Ciota C, Zhao Z, Bliska JB. 2009. *Yersinia pestis* Can Reside in Autophagosomes and Avoid Xenophagy in Murine Macrophages by Preventing Vacuole Acidification. *Infection and Immunity*, 77(6), 2251–2261.

- Pujol C, Bliska JB. 2003. The Ability To Replicate in Macrophages Is Conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*, 71(10), 5892–5899.
- Rakin, A, Saken, E, Harmsen, D, Heesemann, J. 1994. The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. *Mol. Microbiol.*, 13, pp. 253–263.
- Romeo T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol.*;29:1321–30. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01021.x.
- Sambrook J, Russell DW, *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Vol 1. 2001. 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sandkvist M, Michel LO, Hough LP, Morales VM, Bagdasarian M, Koomey M, DiRita VJ, Bagdasarian M. 1997. General secretion pathway (*eps*) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 179:6994–7003.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of Experimental Medicine*, 97(5), 695–710.
- Schiano CA, Bellows LE, Lathem WW. 2010. The Small RNA Chaperone Hfq Is Required for the Virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*, 78(5), 2034–2044.
- Schmid D, Münz C. 2007. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity*, 27(1), pp.11–21.
- Schmiel DH, Wagar E, Karamanou L, Weeks D, Miller VL. 1998. Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect. Immun.* 66, 3941–3951.
- Schmiel DH, Young GM, Miller VL. 2000. The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. *J Bacteriol.*;182:2314–20.
- Schubert S, Rakin A, Heesemann J. 2004. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* 294: 83–94.
- Schunder E, Adam P, Higa F, Remer KA, Lorenz U, Bender J, Schulz T, Flieger A, Steinert M, Heuner K. 2010. Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *J Med Microbiol* 300: 313–323.
- Shahnazari S, Brumell JH. 2011. Mechanisms and consequences of bacterial targeting by the autophagy pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 68–75.
- Shintani T, Klionsky DJ. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*.306(5698):990–5.

- Shutinoski B, Schmidt MA, Heusipp G. 2010. Transcriptional regulation of the Yts1 type II secretion system of *Yersinia enterocolitica* and identification of secretion substrates. *Mol. Microbiol.* 75, 676–691 10.1111/j.1365-2958.2009.06998.
- Sitaraman R, Israel DA, Romero-Gallo J, Peek RM. 2012. Cell-Associated Hemolysis Induced by *Helicobacter pylori* Is Mediated by Phospholipases with Mitogen-Activated Protein Kinase-Activating Properties. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 1014–1018.
- Skurnik M, Peippo A, Ervela E. 2000. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol. Microbiol.* 37:316-330.
- Songer JG. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 156:156-161.
- Stauder M, Huq A, Pezzati E, Grim CJ, Ramoino P, Pane L, Colwell RR, Pruzzo C, Vezzulli L. 2012. Role of GbpA protein, an important virulence-related colonization factor, for *Vibrio cholerae*'s survival in the aquatic environment. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 439–445.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. 2005. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*. 1:84–91.
- Tanemura M, Ohmura Y, Deguchi T, Machida T, Tsukamoto R, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Echuchi H, Ito T, Nagano H, Mori M, Doki Y. 2012 Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo. *Am J Transplant*.
- Tønrum T, Caugant DA, Dunham SA, Koomey M. 1998. Structure and function of repetitive sequence elements associated with a highly polymorphic domain of the *Neisseria meningitidis* PilQ protein. *Mol Microbiol*;29(1):111–24.
- Towbin JA. 1993. Introduction to the techniques of molecular biology. *Herz* 18, 213–221.
- Trosky JE, Liverman AD, Orth K. 2008. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* 10: 557–565.
- Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V. 1998. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci* 111 (Part 7): 897–905.
- Vogel J, Luisi BF. 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* 9: 578–589.
- Von Tils D, Bladel I, Schmidt MA, Heusipp G. 2012. Type II secretion in *Yersinia*-a secretion system for pathogenicity and environmental fitness. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:160. 10.3389/fcimb.2012.00160
- Wang P, Granados RR. 1997. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *PNAS* 94, 6977–6982.

Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. 2003. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry*, 278(27), pp.25009–13.

Won KY, Kim GY, Kim YW, Song JY, Lim S-J. 2010. Clinicopathologic correlation of beclin-1 and bcl-2 expression in human breast cancer. *Human Pathology*, 41, pp.107–112.

Xie F, Murray JD, Kim J, Heckmann AB, Edwards A, Oldroyd GED, Downie JA. 2012. Legume pectate lyase required for root infection by *Rhizobia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 633–638 10.1073/pnas.1113992109.

Yang Z, Klionsky DJ. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature cell biology*, 12(9), pp.814–822.

Young GM, Badger JL, Miller VL. 2000. Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 68:4323–4326.

Young GM, Miller VL. 1997. Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Mol Microbiol.* 1997;25:319–328.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Klaus Ruckdeschel, der mich in die interessante Welt der Autophagie eingeführt hat und mich während der Arbeit im Labor und der Anfertigung der Dissertationsarbeit herausragend betreut hat. Auch gilt mein Dank María José Valencia López, die mich in die Arbeit im Labor eingeführt hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit an seinem Institut anzufertigen.

Der UKE Microscopy Imaging Facility und ihren Mitarbeitern danke ich für die Unterstützung bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre stete Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei den Laborkolleginnen Julia Gropengießer, Manja Czech-Sioli, Claudia Schmidt und Friederike Neumann bedanken.

Ganz herzlichen Dank möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie aussprechen, die mich jederzeit unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Sie haben mich motiviert, nicht aufzugeben, auch wenn es einmal nicht einfach war, weiter zu machen. Vielen Dank.

12 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

13 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Melanie Quitmann