

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl: Bakteriologie
Vorstand: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Chem. Jürgen Heesemann

**Das Yersinia-Adhäsın YadA,
ein oligomerer Autotransporter
als
Prototyp der Oca-Familie
- eine molekulare Struktur- und Funktionsanalyse -**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nikolaus Konrad Maria Ackermann

aus
München

Jahr
2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Chem. Jürgen Heesemann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Ralph Mocikat

Priv. Doz. Dr. Uwe Wintergerst

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Andreas Roggenkamp

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2005

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2000 bis Juli 2004 im Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität München erstellt.

Mein tiefer aufrichtiger Dank gilt allen voran Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die Überlassung des interessanten Themas, für das Bereitstellen eines Arbeitsplatzes, meine Aufnahme in das Graduiertenkolleg für Infektion und Immunität, in besonderer Weise aber auch für die vielen freundlichen, weiterführenden und äußerst hilfreichen Gespräche.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Andreas Roggenkamp für die viele Zeit, die er sich für mich und meine Arbeit genommen hat und für die großartige Hilfe, die er mir bei der Einarbeitung im Labor und bei der Bearbeitung des Themas gewesen ist.

Darüber hinaus danke ich auch Harald Hoffmann für seine spontanen Tipps und Ideen, mit denen er meine Arbeit begleitet hat.

Unserer Forschungs-MTA Frau Gisela Anding bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Durch ihren methodischen Wissensschatz und ihre Hilfe sind viele der Versuche besonders schnell gelungen.

Schließlich danke ich all den anderen hilfsbereiten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Max-von-Pettenkofer-Instituts, in der Außenstelle Großhadern und der Innenstadt.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Entdeckung und Einteilung der Gattung <i>Yersinia</i> | 1 |
| 1.2 Isolierungsmethoden, Differenzierung und Verbreitung | 2 |
| 1.3 Klinik der Yersiniosen | 3 |
| 1.4 Therapie der Yersiniosen | 4 |
| 1.5 Pathogenese und Pathogenitätsprinzip | 4 |
| 1.6 Adhäsine | 6 |
| 1.6.1 Fimbrien und Pili | 7 |
| 1.6.2 Nicht-Fimbrien-Adhäsine | 9 |
| 1.6.3 Autotransporter | 9 |
| 1.6.4 Das <i>Yersinia</i> -Adhäsin A (YadA) | 11 |
| 1.6.5 Struktur von YadA | 11 |
| 1.6.6 Funktionen von YadA | 14 |
| 1.7 Gegenstand der Arbeit | 15 |
| 2. Material und Methoden | 16 |
| 2.1 Material | 16 |
| 2.1.1 Geräte | 16 |
| 2.1.2 Medien | 17 |
| 2.1.3 Verwendete Antikörper | 17 |
| 2.1.4 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide | 18 |
| 2.1.5 Verwendete Primer/Oligonukleotide | 20 |
| 2.1.6 Puffer und Lösungen | 22 |
| 2.2 Methoden: | 27 |
| 2.2.1 Kultivierung von Bakterien | 27 |
| 2.2.2 Herstellung Ca^{2+} -kompetenter Bakterien | 27 |
| 2.2.3 Transformation Ca^{2+} -kompetenter Bakterien | 28 |
| 2.2.4 Konjugation | 28 |
| 2.2.5 Präparation von Plasmid-DNA | 29 |
| 2.2.6 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen | 30 |
| 2.2.7 Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA | 31 |
| 2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten | 31 |
| 2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 32 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.2.10 | Overlap-Extension-PCR..... | 34 |
| 2.2.11 | Herstellung der FLAG-Oligonukleotid-Inserts | 39 |
| 2.2.12 | DNA-Gelelektrophorese..... | 39 |
| 2.2.13 | DNA-Sequenzierung | 40 |
| 2.2.14 | DNA-Konstruktion von YadA-Mutanten und FimH-YadA-Hybriden mit dem Multicopy-Plasmid pUC-A-1 in <i>E. coli</i> DH5 α | 40 |
| 2.2.15 | Transfer der YadA-Mutanten von <i>E. coli</i> DH5 α über <i>E. coli</i> SM10 λ pir in <i>Y. enterocolitica</i> und Konstruktion zusätzlicher Mutanten in <i>E. coli</i> SM10 λ pir..... | 43 |
| 2.2.16 | Isolation von bakteriellen Außenmembranproteinen | 44 |
| 2.2.17 | Proteinmengenbestimmung nach Lowry..... | 46 |
| 2.2.18 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 48 |
| 2.2.19 | Coomassie-Färbung eines Proteingels | 49 |
| 2.2.20 | Immunoblot/Westernblot eines Proteingels | 49 |
| 2.2.21 | Faktor Xa-Verdau..... | 51 |
| 2.2.22 | Immunofluoreszenztests..... | 51 |
| 2.2.23 | ELISA zum Nachweis der Kollagenbindung von Yersinien | 52 |
| 2.2.24 | Antikörperagglutinations- und Autoagglutinationstest | 53 |
| 2.2.25 | Hefezellagglutinationstest | 53 |
| 2.2.26 | Zelladhärenztest | 54 |
| 2.2.27 | Serumresistenztest..... | 54 |
| 3. | Ergebnisse | 56 |
| 3.1 | Konstruktion von YadA-Mutanten und –Hybriden | 56 |
| 3.1.1 | N-terminale Deletionen | 56 |
| 3.1.2 | Aufsetzen der Head-Neck-Region | 56 |
| 3.1.3 | Aufsetzen der Neck-Region | 58 |
| 3.1.4 | FLAG-Konstrukten | 58 |
| 3.1.5 | <i>In-frame</i> Deletionen | 58 |
| 3.1.6 | Konstrukte mit FaktorXa-Protease-Schnittstelle..... | 58 |
| 3.1.7 | FimH-YadA-Hybridkonstrukte | 59 |
| 3.2 | Expression der YadA-Konstrukte | 59 |
| 3.3 | Nachweis der YadA-Konstrukte auf der Oberfläche der Außenmembran von <i>Y. enterocolitica</i> | 61 |
| 3.3.1 | Außenmembranpräparation..... | 61 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.2 Agglutinationsversuche und Immunfluoreszenztest | 61 |
| 3.4 Die Linking-Region als Vermittler der Translokation von YadA durch die Außenmembran | 65 |
| 3.4.1 Die A-HNS-FLAG-Konstrukte | 65 |
| 3.4.2 Die YadA-FaktorXa-Mutanten | 66 |
| 3.5 Der Membrananker als Vermittler der Oligomerisierung von YadA | 68 |
| 3.6 Koexpression zum Nachweis der Trimer-Bildung von YadA | 68 |
| 3.7 Adhärenzverhalten der YadA-Mutanten | 72 |
| 3.7.1 Adhärenzverhalten der YadA-Mutanten mit Kollagen und HeLa-Zellen | 72 |
| 3.7.2 Adhärenzverhalten der FimH-YadA-Hybride mit Hefezellen | 74 |
| 3.8 Serumresistenz der YadA-Mutanten | 75 |
| 4. Diskussion | 77 |
| 5. Zusammenfassung | 86 |
| 6. Literaturnachweise | 88 |

1. Einleitung**1.1 Entdeckung und Einteilung der Gattung *Yersinia***

Der aus der französischen Schweiz stammende Bakteriologe Alexandre Yersin (1863 – 1943) isolierte im Jahr 1894 in Hongkong aus den Beulen von Pestleichen den Erreger der Pest, das später nach ihm benannte Bakterium *Yersinia pestis*. Über Jahrtausende hatte diese Krankheit Millionen von Menschen in großen Epidemien und Pandemien dahingerafft. Bereits 430 v. Chr. beschrieb der griechische Geschichtsschreiber Thukydides eine Seuche während des Peloponnesischen Krieges im belagerten Athen, die in ihrem Auftreten und ihren Eigenheiten sehr an die Pest erinnert. Die im Mittelalter auch unter dem Namen „Schwarzer Tod“ bekannte Krankheit breitete sich zwischen 1347 und 1352 pandemisch aus und tötete dabei 25 Millionen Menschen. Die letzte große Pandemie nahm 1896 ihren Ausgang in Asien, dauerte 50 Jahre und wurde über den Transport infizierter Ratten in der Handelsschiffahrt in allen Häfen der Welt verbreitet. Während dieser Zeit forderte die Krankheit 12 Millionen Tote. Somit war die Identifizierung des Bakteriums durch Alexandre Yersin ein Meilenstein in der Geschichte der Menschheit im Kampf gegen Infektionskrankheiten. Man entdeckte im Laufe der Zeit außer dem Erreger der Pest, *Y. pestis*, noch 10 weitere Yersinien-Arten (siehe Tabelle 1), von denen lediglich zwei weitere für den Menschen pathogen sind, die beiden enteropathogenen Erreger *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*. Nach Salmonellen- oder Campylobacter-*Jejuni*-Infektionen stellen diese die dritthäufigste Gruppe bakterieller Enteritiserreger dar. Entscheidend für die Pathogenität von Yersinien ist das Vorhandensein des 70 kb großen Virulenzplasmids pYV. Phylogenetisch wird die Gattung *Yersinia* (alte Bezeichnung: *Pasteurella*) in die Familie der *Enterobacteriaceae* eingeordnet. Das in dieser Arbeit untersuchte Außenmembranprotein wird lediglich von den beiden enteropathogenen Yersinien-Arten synthetisiert, weshalb sich die folgenden Ausführungen im Wesentlichen auf *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* beschränken.

Tabelle 1: Übersicht über Nomenklatur und Pathogenität der 11 Yersinien-Arten

| Yersinien-Art | Pathogenität |
|---|--|
| <i>Y. pestis</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i> <i>Y. enterocolitica</i> | humanpathogen (Pest durch <i>Y. pestis</i> , Yersiniosen durch <i>Y. pseudotuberculosis</i> und <i>Y. enterocolitica</i>) |
| <i>Y. ruckeri</i> | fischpathogen (Rotmaulerkrankung bei Lachsen und Forellen) |
| <i>Y. frederiksenii</i> , <i>Y. rohdei</i> , <i>Y. aldovae</i> , <i>Y. kristensenii</i> , <i>Y. bercovieri</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. mollaretii</i> | apathogen |

1.2 Isolierungsmethoden, Differenzierung und Verbreitung

Yersinien sind gramnegative, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende Stäbchen mit einem Wachstumsbereich zwischen 4°C und 42°C. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 28°C. Bei diesem sind die beiden enteropathogenen Erreger sogar beweglich, jedoch nicht mehr bei 37°C, während *Y. pestis* stets unbeweglich ist. Da sich diese Keime sogar noch bei 4°C vermehren, hat sich eine Kälteanreicherung zur Isolierung von ihrer Begleitflora, z.B. in Stuhlproben, bewährt. Weiterhin wachsen besonders *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* auf Yersinien-selektiven CIN-Agarplatten an (Schiemann et al., 1979), die mit Hilfe einer Dreierkombination von Antibiotika (Cefsulodin, Irgasan, Novobiocin) Begleitkeime abtöten. Die Unterscheidung verwandter Yersinienarten (z.B. *Y. enterocolitica* von *Y. pseudotuberculosis*) oder anderer fakultativ anaerober gramnegativer Stäbchen aus der Familie der *Enterobacteriaceae* erfolgt biochemisch. *Y. pseudotuberculosis* bildet dabei eine biochemisch einheitliche Gruppe, die sich in 8 Serogruppen aufteilt, von denen in Europa die Serovare I, II und III von humanmedizinischer Bedeutung sind. Dagegen ist *Y. enterocolitica* eine sowohl biochemisch wie auch serologisch äußerst heterogene Art, bei der pathogene und auch apathogene Untergruppen vorkommen. Von ihr unterscheidet man 6 Biovare und ca. 60 Serovare (O- und H-Antigene) (Wauters et al., 1987). Einen Überblick über die Verbreitung der verschiedenen Bio- und Serotypen bietet Tabelle 2. Dabei ist ersichtlich, dass vor allem das Schwein als Hauptreservoir für die humanpathogenen Biogruppen 1B, 2, 3 und 4 zu betrachten ist. In Mitteleuropa sind vor allem die Serotypen O:3 (Biotyp 4), O:9 (Biotyp 2) und O:5,27 (Biotyp 3) von pathologischer Bedeutung, während in den USA neben dem sich

vermehrt verbreitenden Serotyp O:3 besonders Biovar 1B mit den Serovaren O:4, O:8, O:13, O:20 und O:21 auftritt (Aleksic & Bockemühl, 1990).

Tabelle 2: Korrelation von Virulenz, Biotyp, Serotyp und Verbreitung bei *Y. enterocolitica* (nach Bottone et al., 1997).

| Human-pathogen | Biotyp | Serotyp | Verbreitung |
|----------------|--------|--|--|
| - | 1A | O:5, O:6,30, O:7,8, O:18, O:46 | <i>Umwelt, verschiedene Tiere</i> |
| + | 1B | O:8 , O:4, O:13, O:18, O:20, O:21 | USA, <i>Schwein</i> (O:8), <i>Umwelt</i> |
| + | 2 | O:9 , O:5,27 | <i>Schwein</i> , Europa (O:9), USA, Japan (O:5,27) |
| + | 3 | O:1,2,3, O:5,27 | <i>Chinchilla, Schwein</i> (O:5,27) |
| + | 4 | O:3 | Europa, USA, <i>Schwein</i> |
| + | 5 | O:2,3 | <i>Hase</i> |

1.3 Klinik der Yersiniosen

Infektionen mit *Y. pseudotuberculosis* oder *Y. enterocolitica* (sog. Yersiniosen) verursachen eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsbilder, die von Alter, Geschlecht, Verfassung und Histokompatibilitätstyp des Patienten abhängig sind. Größtenteils jedoch verlaufen sie milde und heilen ohne ärztliche Behandlung aus. Meist manifestiert sich die Erkrankung in Form akuter Enteritiden und Enterokolitiden. Charakteristisch bei Jugendlichen ist dabei oftmals ein pseudoappendizitischer Verlauf mit mesenterialer Lymphadenitis, der oft zu unnötigen Appendektomien führt. Besonders bei *Y. pseudotuberculosis*-Infektionen ist das terminale Ileum in Form einer akuten terminalen Ileitis betroffen. Bei Erwachsenen können Yersiniosen auch lediglich mit Pharyngitis, Muskelschmerzen und Fieber einhergehen und so einen grippalen Infekt simulieren. Andererseits führt eine oftmals auftretende chronisch-rezidivierende Ileokolitis mit mesenterialer Lymphadenitis leicht zu einer Verwechslung mit dem Morbus Crohn (sog. Pseudo-Crohn). Extramesenteriale Manifestationen, die bei etwa 25 % der Yersiniosen auftreten, entstehen bevorzugt bei Patientengruppen mit vorbestehenden Grundleiden wie Diabetes mellitus, Immunsuppression, Tumorerkrankungen,

Leberzirrhose und besonders Häm siderosen (Hämochromatose, hämolytische Anämie, Thalassämie) (Hoogkamp-Korstanje & de Koning, 1990). Dialysepatienten unter Therapie mit dem Eisenkomplexbildner Desferrioxamin B sind ebenfalls anfällig. Man unterscheidet bei den extramesenterialen Verläufen fokale septische Manifestationen wie Pleuritis, Perikarditis, Osteomyelitis, Myositis, Pankreatitis oder Cholezystitis von hoch letalen Septikämien mit multiplen Organabszessen, hohem Fieber, Gewichtsverlust und Vaskulitis. Weiterhin findet man bei bis zu 30 % der Yersiniosen aseptische immunologische Begleiterkrankungen. Diese treten meist erst zwei Wochen nach einer Darminfektion auf, weshalb die Erkennung des Zusammenhangs mit Yersiniosen manchmal schwerfällt. Allerdings ermöglicht der Nachweis Yersinien-spezifischer IgA-Antikörper über drei Monate häufig die Diagnose (Heesemann, 1991). Die Folgeerkrankungen sind deutlich mit dem HLA-B27-Allel assoziiert und äußern sich als aseptische, reaktive Arthritis, Erythema nodosum oder Uveitis anterior. Ihre Pathogenese ist noch nicht geklärt, allerdings wurden in der Synovia von Patienten mit reaktiver Arthritis Immunkomplexe mit Yersinia-Antigen entdeckt, die als Zeichen einer Entzündungsreaktion gegen das Antigen zu deuten sind.

1.4 Therapie der Yersiniosen

Bei unkompliziert verlaufenden Yersiniosen ist eine antibiotische Therapie überflüssig. Extraintestinale Manifestationen fokal septischer oder septikämischer Art, sowie Enterokolitiden bei immungeschwächten Patienten sollten mit einem Cephalosporin der III. Generation oder einem Chinolonderivat behandelt werden. Alternativen sind Cotrimoxazol, Tetrazyklin und Aminoglykoside. Breitbandpenicilline und Cephalosporine der I. und II. Generation zeigen aufgrund der induzierbaren β -Laktamase-Aktivität besonders bei *Y. enterocolitica* keine Wirkung (Cover & Aber, 1989). Unklar ist, ob sich die immunpathologischen Folgeerkrankungen durch Antibiotika günstig beeinflussen lassen.

1.5 Pathogenese und Pathogenitätsprinzip

Wie im Mausmodell gezeigt wurde (Carter, 1975; Hanski et al., 1989), invadieren enteropathogene Yersinien im Gegensatz zu apathogenen Stämmen ortsansässige M-Zellen im darmassoziierten lymphatischen Gewebe (v.a. den Peyer-Plaques) des terminalen Ileums. Dies führt zu einer zunehmenden Schädigung der betroffenen Darmabschnitte (Autenrieth & Firsching, 1996). Das retikulo-endotheliale System der Peyerschen Plaques dient den

Erregern dabei als Ausgangspunkt zur Vermehrung und Verbreitung im menschlichen Körper über Darm und Lymphgefäße, so dass sie zu einer generalisierten Infektion mit Lymphadenitis und Abszessbildung befähigt sind. Die Pathogenität von Yersinien hat das Vorhandensein mobiler genetischer Elemente zur Voraussetzung. Dazu zählen die extrachromosomalen Plasmide und die chromosomal lokalisierten Pathogenitätsinseln (Cornelis, 1994). So tragen *Y. enterocolitica* (Biovar 1B und 2-5), *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* das 70 kb große hochkonservierte (55-90%) Virulenzplasmid pYV, das Pathogenitätsfaktoren wie das Typ III-Sekretionssystem mit seinen vielfältigen Effektorproteinen (sog. Yops) und auch YadA kodiert (Gemski et al., 1980; Heesemann et al., 1983; Portnoy & Martinez, 1985).

Diese unterschiedlichen Pathogenitätsfaktoren bieten Schutz vor menschlichen Zellen der angeborenen Immunantwort, wie z. B. Makrophagen. Mit ihnen setzen sich die Bakterien gegen Phagozytose, reaktive Sauerstoffintermediate und Defensine zur Wehr. Die Expression dieser plasmidkodierten Virulenzfaktoren wird durch den temperaturabhängigen, bei 37°C exprimierten Aktivator VirF (LcrF), ein AraC Homologon (Lambert de Rouvroit et al., 1992), gesteuert. Nach Zelladhärenz werden Effektorproteine, sog. Yops (Yersinia Outer Proteins) über das Typ III-Sekretionssystem in die Zelle injiziert, was zu einer Veränderung intrazellulärer Signalwege führt. Bei diesem System wird eine spritzenähnliche Organelle, das Ysc-Injektisom, aus 27 strukturbildenden Proteinen gebildet. Diese Spritze durchspannt sowohl beide Membranen als auch die Peptidoglykanschicht und endet in einer spitzen nadelähnlichen Struktur. Mit ihr werden die Effektorproteine bei Kontakt in die eukaryote Zelle injiziert (Cornelis, 2002). Mehr als ein Dutzend Yops wurden im Laufe der Zeit identifiziert und auf ihre Funktion untersucht. Dabei erkannte man, dass nicht alle Yops als Effektorproteine in Zielzellen sezerniert werden. Eine Gruppe mit regulatorischem Effekt (YopQ, YopN) und eine weitere mit Translokationsfunktion (YopB, YopD) wurde ebenfalls entdeckt. In eukaryoten Zellen konnte man die Effektorproteine YopH, E, T, O, P und M nachweisen. Zusätzlich zu den für die Pathogenität der Erreger unabdingbaren plasmidkodierten existieren auch chromosomale Faktoren, die maßgeblich die Virulenz von *Y. enterocolitica* beeinflussen. Dazu zählen die Außenmembranproteine Inv, Ail und Myf, das sezernierte und hitzestabile Toxin Yst, sowie das Yersiniabactin-Siderophorsystem FyuA mit Irp1-9 (Cornelis et al., 1998).

Inv führt zur Invasion epithelialer Zellen über Kontakt mit β 1-Integrinen (Tran Van Nhieu & Isberg, 1993), wird aber in vitro bei Temperaturen unterhalb von 30°C maximal exprimiert, die bei einer in vivo Infektion nicht zu erwarten wären (Isberg et al., 1988). Bei saurem pH-

Milieu und erhöhter Osmolarität wird es jedoch auch bei 37°C synthetisiert, was den Bedingungen im intestinalen Darmlumen näher kommt (Pepe et al., 1994). Ihm wird eine wichtige Rolle in der Frühphase der Infektion zugesprochen, da es im Mausinfektionsversuch zur Durchdringung enteraler M-Zellen notwendig ist (Pepe & Miller, 1993). 1999 gelang es Hamburger et al., Kristalle von Inv zu gewinnen und so seine Struktur zu analysieren. Danach ist es ein 18 nm langes, stabförmiges Protein mit fünf Domänen und zeigt Ähnlichkeit mit integrinbindenden Bereichen von Fibronectin.

Das Außenmembranprotein Ail (attachment invasive locus) hat einen fördernden Einfluss auf die Serumresistenz von *Y. enterocolitica* und führt zur Invasion in Epithelzellen. Allerdings wird die Virulenz des Erregers durch eine Inaktivierung von Ail im Mausinfektionsversuch nicht abgeschwächt (Wachtel & Miller, 1995). Das 17 kDa große Protein bildet acht transmembrane beta-Faltblätter und vier oberflächenexponierte Loops aus. Serumresistenz und Invasionsfähigkeit konnten durch Mutationen in Loop 2 verändert werden (Miller et al., 2001).

Das nur von pathogenen *Y. enterocolitica*-Serotypen exprimierte Myf (mucoid yersinia fibrillae) bildet ein Protein-Polymer aus 21 kDa-Untereinheiten. Elektronenmikroskopisch zeigen sich bei Expression extrazellulär fibrillenähnliche Strukturen (Iriarte et al., 1993). Die pathogenetische Funktion des Proteins ist noch ungeklärt.

Wie auch Inv wird das hitzestabile Enterotoxin Yst bei 37°C nur dann ausreichend exprimiert, wenn ein saurer pH oder erhöhte Osmolarität vorliegen (Mikulskis et al., 1994). Das Protein führt bei jungen Kaninchen zu Durchfall und Gewichtsverlust und gilt als wichtiger Faktor für die bei Kindern mit *Y. enterocolitica*-Infektion auftretende Diarrhöe (Delor & Cornelis, 1992). Eine effektive Eisenversorgung ist für Bakterien Grundvoraussetzung für Vermehrung und Verbreitung im Wirt, da das Metall in vielen Redoxprozessen wie Sauerstofftransport oder Nukleinsäuresynthese benötigt wird. Pathogene Yersinien verfügen über das Yersiniabaktin-Siderophorsystem mit dem Eisen aufnehmenden Siderophor Ybt (yersiniabactin), dem Ybt-Rezeptor FyuA (ferric yersiniabactin uptake) und den Irp-Proteinen (iron-repressible proteins) 1 bis 9. Es ist chromosomal in einer HPI (high pathogenicity island) kodiert (Perry et al., 1999).

1.6 Adhäsine

Die häufig in der Natur beobachtete Anhaftung von Bakterien an Fremdoberflächen wird durch spezielle Proteinstrukturen, sog. Adhäsine, ermöglicht, die einer physikalischen

Entfernung der Erreger, beispielsweise durch hydrodynamische Scherkräfte entgegenwirken und ihnen somit neue Lebensräume erschließen. Bemerkenswert ist dabei eine den Enzymen und Immunglobulinen vergleichbar hohe Spezifität, mit der auf molekularer Ebene ein bestimmtes Adhäsion an ein bestimmtes Rezeptormolekül haftet. Diese Spezifität spiegelt sich auch in der spezie-eigenen ökologischen Nische wieder. So korreliert z. B. die Fähigkeit von *Escherichia coli*, den Harntrakt zu kolonisieren mit ihrer Fähigkeit, spezifische Adhäsine zu exprimieren (Svanborg, 1994). Der Intestinaltrakt vieler verschiedener Säuger stellt für *E. coli* einen geeigneten Lebensraum dar, was wiederum andere Adhäsionsmoleküle ermöglichen. Das Adhäsion-Repertoire eines Erregers bestimmt und begrenzt somit seinen möglichen Lebensraum. Nur wo eine Anhaftung möglich ist, ist auch die Möglichkeit zu andauernder Kolonisation, Vermehrung und damit Überleben gegeben.

1.6.1 Fimbrien und Pili

Die am besten charakterisierte Gruppe bakterieller Adhäsine gramnegativer Erreger stellen dünne, fadenförmige Strukturen dar, die als Fimbrien oder Pili bezeichnet werden (Klemm, 1994). Diese sind Heteropolymere von etwa 1 µm Länge. Man unterscheidet dabei die eher starren, stabähnlichen Fasern der Typ1-Pili und helikoidalen Polymere der P-Pili mit etwa 7 nm Durchmesser von den dünneren, weniger starren Fimbrien von etwa 2 nm Durchmesser, wie die K88-Adhäsine und *Curli* von *E. coli*. Der Stamm eines Pilus setzt sich aus vielen identischen Kopien eines Strukturproteins zusammen. An seiner Spitze wird das eigentliche Adhäsion eingebaut. Beispielsweise besteht bei Typ1-Fimbrien der größte Teil des Pilus aus etwa 1000 FimA-Strukturproteinen, während FimH als eigentliches Adhäsion die Pilus-Spitze bildet. Alle benötigten Pilusproteine werden von Transportproteinen, sog. Chaperonen, im periplasmatischen Raum gebunden und an ihren im Pilus zugeteilten Ort gebracht. Die Pilussynthese erfolgt dabei progradient an der Außenmembran, beginnend mit der Spitze. Im folgenden Kapitel wird das in dieser Arbeit für Proteinfusionsexperimente verwendete FimH näher beschrieben.

FimH

Das FimH-Protein ist die adhäsive Komponente der Typ1-Fimbrien. Es bildet die Spitze eines aus etwa 1000 FimA-Strukturproteinen bestehenden, rechtshändig-helikalen Pilus und ist

zusätzlich neben FimF und FimG, die vermutlich für die Integration von FimH in die Fimbrie notwendig sind, in einigen Kopien im Stamm vertreten (Jones et al., 1995).

Im chromosomal lokalisierten 9,5-kb *fim* Gen-Cluster sind sämtliche Komponenten der Fimbrien-Organellen kodiert (Klemm et al., 1985). Neben den Strukturkomponenten FimA, FimF, FimG und FimH finden sich dort auch die Regulationskomponenten FimB und FimE und die für den Transport der Strukturkomponenten und die korrekte Biosynthese des Pilus notwendigen Proteine FimI, FimD und FimC (Schembri et al., 2000) (siehe Abb.1).

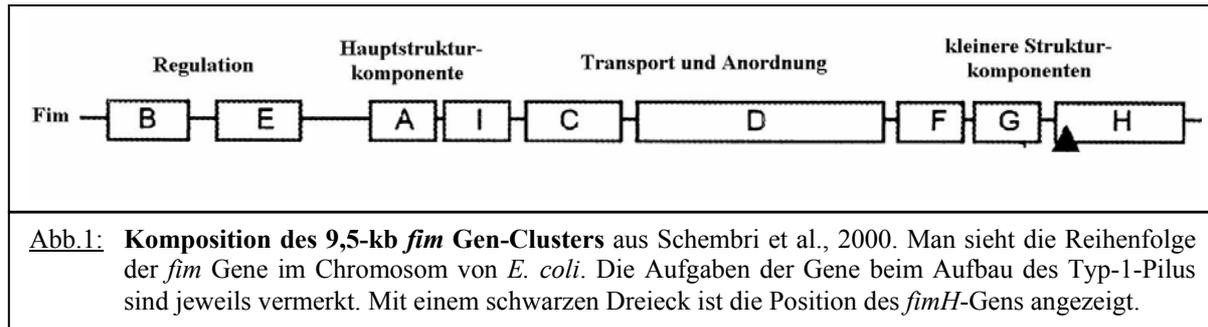


Abb.1: Komposition des 9,5-kb *fim* Gen-Clusters aus Schembri et al., 2000. Man sieht die Reihenfolge der *fim* Gene im Chromosom von *E. coli*. Die Aufgaben der Gene beim Aufbau des Typ-1-Pilus sind jeweils vermerkt. Mit einem schwarzen Dreieck ist die Position des *fimH*-Gens angezeigt.

Wie auch die anderen Strukturproteine wird FimH als Präkursor synthetisiert und trennt während des Transportes durch die Innenmembran seine N-terminale Signalsequenz ab. Das ursprünglich 300 aa lange Protein verliert dadurch die N-terminalen 21 aa. Der weitere Transport der damit aus 279 aa bestehenden, reifen Form des 30-kDa Proteins FimH erfolgt im periplasmatischen Raum durch das Chaperon FimC (Jones et al., 1993). Dieses übergibt das Adhäsins an das als Pilus-Montageeinheit agierende Außenmembranprotein FimD, welches FimH an seine im Pilus vorgesehene Stelle einfügt (Klemm & Christiansen, 1990). Aufgrund von Erkenntnissen aus einer Röntgenstrukturanalyse (Choudhury et al., 1999) besteht das FimH-Protein aus zwei Domänen, einer N-terminalen Lektin-Domäne (aa 1-156), die die Adhäsion bewirkt, und einer C-terminalen Pilin-Domäne (aa 157-279), die im Pilus verankert ist.

FimH gehört zu der am häufigsten vorkommenden und am besten untersuchten Gruppe von Adhäsinen, den Lektinen. Deren Eigenschaft ist es, an bestimmte Zuckerreste von Membranproteinen zu binden und dadurch die Zielzelle zu beeinflussen. Im Falle von FimH sind mannosylierte Glykoproteine, besonders das Mannan von Hefezellen, der bevorzugte Bindungsort (Schembri et al., 2000). Somit adhären Typ1-Pili an humane bukkale Zellen, proximale Tubuluszellen der Niere, epitheliale Zellen in Blase, Lunge und Darm (Baddour et al., 1990) und verschiedene Entzündungszellen (Tewari et al., 1993). Weitere Rezeptoren sind ein 65-kDa-Protein von Meerschweinchen-Erythrozyten (Giampapa et al., 1988), die Leukozytenadhäsionsmoleküle CD11 und CD18 (Gbarah et al., 1991), und das Tamm-

Horsfall-Glykoprotein im menschlichen Harn (Baddour et al., 1990). Auch eine Interaktion mit Laminin (Kukkonen et al., 1993) und Fibronectin (Sokurenko et al., 1994) konnte nachgewiesen werden.

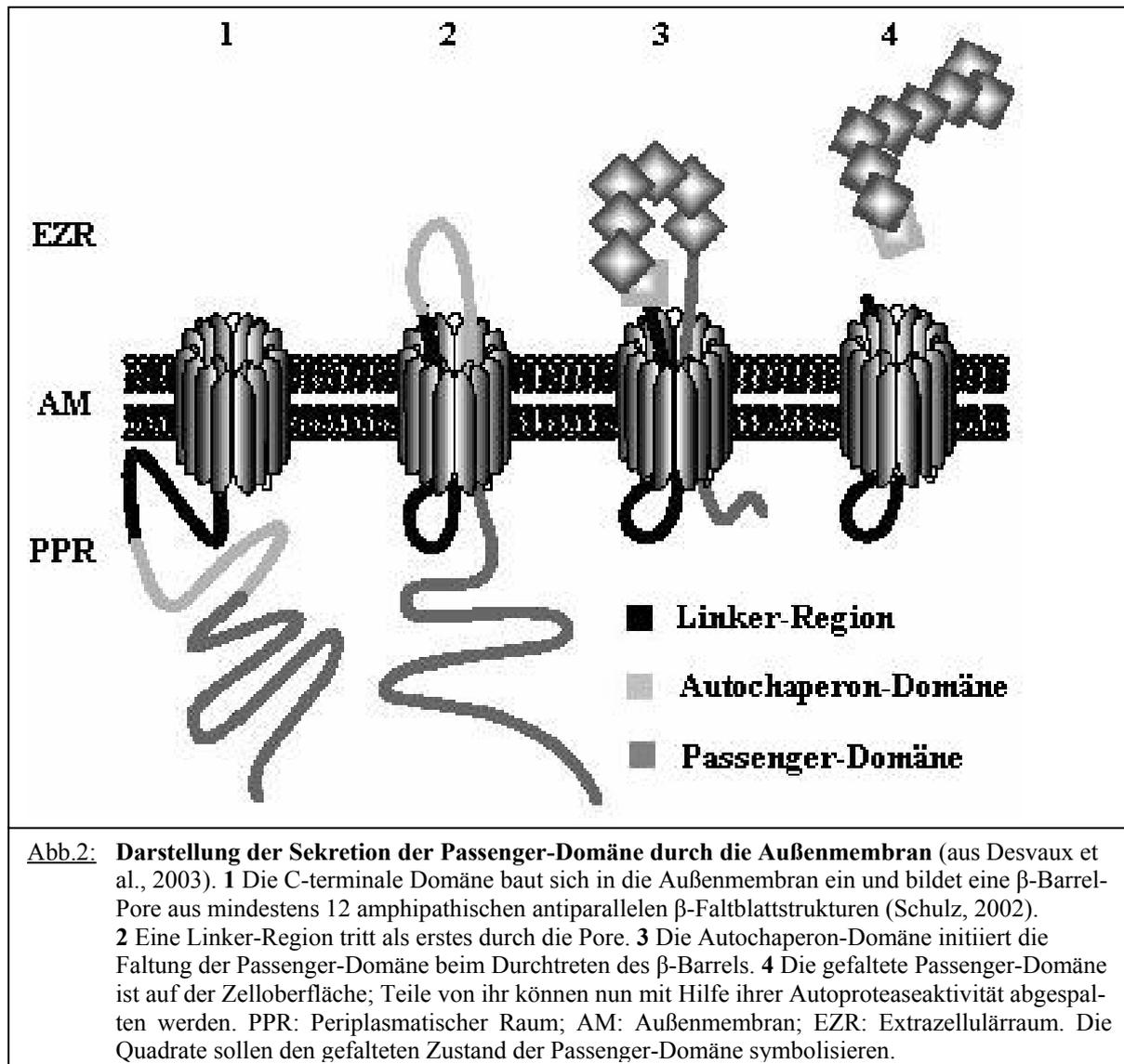
1.6.2 Nicht-Fimbrien-Adhäsine

Alle Adhäsine gramnegativer Erreger, die nicht mit Fimbrien assoziiert sind, sind zu der Gruppe der Nicht-Fimbrien-Adhäsine zuzuordnen. Dazu zählen u. a. das filamentöse Hämagglutinin von *Bordetella pertussis* (Relman et al., 1989), die Adhäsine HMWI, HMWII (high molecular weight adhesion proteins), Hap und Hia von *Haemophilus influenzae* (Barenkamp & Leininger, 1992; Fink et al., 2001; St. Geme & Cutter, 2000), oder das AIDA-I-Adhäsion von *E. coli* (Benz & Schmidt, 1992).

1.6.3 Autotransporter

Bei gramnegativen Bakterien ist der Transport von Proteinen in den Extrazellulärraum besonders kompliziert, da zwei Membranbarrieren überwunden werden müssen. Völlig unterschiedliche Proteinsekretionsmechanismen wurden darum von Erregern im Laufe von Jahrtausenden entwickelt, um dieses Hindernis zu überwinden. Grundsätzlich lassen sich die im Jahre 2000 von Henderson et al. neu klassifizierten Systeme in die Typen I bis V unterteilen. Bei Typ I bis IV findet man verschiedene makromolekulare Proteinkomplexe, die Kanäle oder Transportsysteme im periplasmatischen Raum bilden und somit Innen- und Außenmembran verbinden. Ganz anders stellt sich dagegen der Sekretionstyp V dar, die sog. Gruppe der Autotransporter. Hier verläuft die Translokation relativ unkompliziert, da sämtliche Erfordernisse für den Transport durch beide Membranen im Protein selbst enthalten sind. Dadurch erklärt sich der bei allen Autotransportern vorhandene Aufbau aus (I) einem N-terminalen Signalpeptid, das für die Passage durch den Sec-Apparat der Innenmembran notwendig ist und dabei abgespalten wird, (II) einer Passenger-Domäne, die das zu sezernierende oder präsentierende reife Protein darstellt und (III) einer C-terminalen Pore aus transmembranalen β -Faltblättern (sog. β -Barrel), die sich in die Außenmembran einfädelt und nach Bildung der Pore die Passenger-Domäne hindurchtreten lässt (Henderson et al., 1998) (Abb.2). Die danach oberflächenexponierte Passenger-Domäne wird nun im klassischen Fall autokatalytisch oder mit Hilfe einer Protease abgespalten und ins Extrazellulärraum freigegeben, wie bei der IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner et al., 1987). Bei

anderen Autotransportern bleibt sie nach einer Spaltung nicht-kovalent an das β -Barrel gebunden, wie bei AIDA-I von *E. coli* (Benz & Schmidt, 1992), oder wird überhaupt nicht abgetrennt, wie bei Hia von *H. influenzae* (St. Geme & Cutter, 2000).



Eine weitere Untergruppe der Autotransporter wird aufgrund ihrer besonderen Struktur abgegrenzt. Beim sog. Zwei-Partner-System (*two-partner system*, TPS) werden zwei separate Proteine synthetisiert, TpsA und TpsB, von denen das erste als Passenger-Domäne agiert (sog. Exoprotein) und das zweite ein β -Barrel in der Außenmembran (sog. Transporter-Domäne) bildet. Mit Hilfe eines spezifischen Sekretionssignals findet das ungefaltete TpsA seine TpsB-Pore. Seine Faltung erfolgt wiederum auf der Bakterienoberfläche (Jacob-Dubuisson et al., 2001).

Bislang wirken alle näher charakterisierten Autotransporter als Virulenzfaktoren. Entweder vermitteln sie enzymatische Aktivität (z. B. in Form einer Protease) oder Aktin-gesteuerte bakterielle Motilität, oder sie verkörpern Adhäsine, Toxine oder immunmodulatorische Proteine (Henderson & Nataro, 2001; Henderson et al., 1998).

1.6.4 Das Yersinia-Adhäsins A (YadA)

Das ehemals als P1 oder Yop1 bezeichnete Yersinia-Adhäsins A (YadA) (Skurnik & Wolf-Watz, 1989) wird durch das *yadA*-Gen (früher *yopA*-Gen) kodiert, das sich auf dem 70 kb-Virulenzplasmid pYV zusammen mit dem gesamten Typ III-Sekretionsapparat und dessen Yops befindet. Bei 37°C wird es über den Aktivator VirF (LcrF) exprimiert (Skurnik & Toivanen, 1992). In vitro ist seine Expression am größten, wenn Yersinien-Stämme in Mangelmedium angezüchtet werden (Kapperud et al., 1985). Innerhalb von 2 Minuten ist YadA bei einer Temperaturerhöhung auf 37°C auf der Bakterienoberfläche nachweisbar (Bölin et al., 1982). Bei *Y. pestis* verhindert die Deletion eines Basenpaares zu Beginn der kodierenden Region die Expression des Gens (Skurnik & Wolf-Watz, 1989; Tahir & Skurnik, 2001).

1.6.5 Struktur von YadA

Die Sequenzierung der *yadA*-Gene verschiedener Yersinien-Stämme (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* Serotyp III, *Y. enterocolitica* Serotypen O3 und O8) ergab für das exprimierte YadA-Molekül ein Molekulargewicht zwischen 41,3 und 44,4 kDa (Skurnik & Wolf-Watz, 1989). Da in der SDS-PAGE hitzestabile Aggregate dieses Proteins im Größenbereich von 160 bis 250 kDa feststellbar sind, wird vermutet, dass es sich bei YadA um ein Oligomer handelt, wobei die Anzahl der identischen monomeren Untereinheiten, die das vollständige YadA bilden, umstritten ist (Skurnik & Wolf-Watz, 1989; Tamm et al., 1993; Mack et al., 1994; Gripenberg-Lerche et al., 1995; Hoiczky et al., 2000). Tamm et al. zeigten 1993, dass der hydrophobe C-Terminus des Adhäsins für die Verankerung in der Außenmembran notwendig ist. Weitere Einblicke in die Struktur des Proteins konnten Hoiczky et al. 2000 mit einer elektronenmikroskopischen Darstellung und Aminosäuresequenzanalyse von YadA liefern. Dabei erkannte man im Elektronenmikroskop das Protein als baldachinartige, lollipop-förmige Projektion auf der Außenmembran von Yersinien (Abb.3). Basierend auf dieser Entdeckung und der Aminosäuresequenz des Adhäsins, sowie

funktionaler Expressionsstudien von N- und C-terminal- verkürzten YadA-Mutanten (Tamm et al., 1993; Roggenkamp et al., 1995 und 1996) ließ sich eine Struktureinteilung in drei Hauptdomänen ableiten: Einen N-terminalen lollipop-förmigen Kopf, gefolgt von einem je nach Serotyp unterschiedlich langen Stiel und einem C-terminalen Membrananker. Auch die Analyse mit dem von Lupas 1991 entwickelten „COILS“-Programm lieferte zusätzliche Details über die strukturelle Organisation des Proteins. So wurden im Stiel-Bereich zwischen den Aminosäuren 220 bis 350 der 422 Aminosäuren langen YadA-Sequenz von *Y. enterocolitica* O8 zwei Bereiche identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine *coiled-coil* Struktur ausbilden (Abb.4). Sequenzvergleiche führten zu der Erkenntnis, dass YadA den Prototyp einer neuen Klasse von Nicht-Fimbrien-Adhäsinen verkörpert (Hoiczky et al., 2000), die von unserer Gruppe als Oca (Oligomere coiled-coil Adhäsine)-Familie bezeichnet wird (Roggenkamp et al., 2003). Konservierte Strukturelemente sind (I) ein N-terminales Sec-abhängiges Sekretionssignal, (II) eine hoch konservierte Neck-Domäne, (III) eine längenmäßig variierende Stieldomäne mit hoher Wahrscheinlichkeit für *coiled coils* und (IV) eine C-terminale Membrananker-Domäne aus 93 aa mit einem linkshändigen *coiled-coil* Segment (sog. Linking-Region), gefolgt von vier amphipathischen transmembranen β -Faltblattstrukturen am Ende des Proteins (Abb.5). Solche YadA-homologen Proteine existieren in α -Proteobakterien wie z.B. dem Hülsenfruchtsymbionten *Sinorhizobium meliloti* (Hoiczky et al., 2000), in menschen- und pflanzenpathogenen β -Proteobakterien wie *Neisseria meningitidis* (NadA) (Comanducci et al., 2002) und γ -Proteobakterien wie *Escherichia coli* (Eib-Proteine) (Sandt & Hill, 2001), *Haemophilus influenzae* (Hia) (Surana et al., 2004), *Haemophilus ducreyi* (DsrA) (Elkins et al., 2000), *Moraxella catarrhalis* (UspA1, UspA2) (Hoiczky et al., 2000) und dem Reispathogen *Xanthomonas oryzae* (XadA) (Ray et al., 2002). Wie YadA bilden auch die bereits näher charakterisierten Proteine der Oca-Familie (Hia, NadA, UspA1, UspA2, DsrA, Eib-Proteine) hitzefeste Oligomere in SDS-PAGE. Welche Region des Proteins die Oligomerisierung bewirkt, konnte noch nicht gezeigt werden. Vermutet wird eine Beteiligung der konservierten C-terminalen Membranankerdomäne (Tamm et al., 1993). Dagegen sind die N-terminalen, nicht konservierten Bereiche der Oca-Proteine, denen bei YadA die Kopffregion entspricht, vermutlich die Stelle der verschiedenen Adhäsionseigenschaften (Roggenkamp et al., 1995), die im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

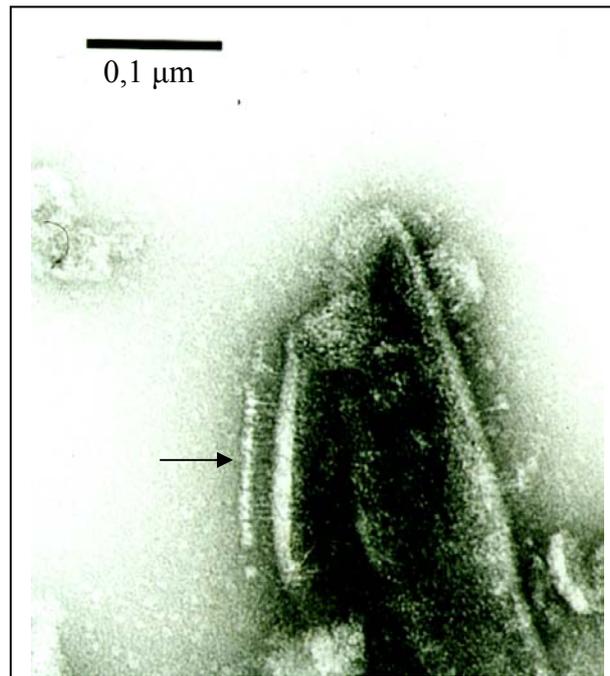


Abb.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von YadA-Proteinen (Pfeil) auf der Oberfläche von *Y. enterocolitica*. Sie zeigt die lollipop-ähnliche Struktur des Proteins mit Kopf- und Stiel-domäne (aus Hoiczky et al, 2000).

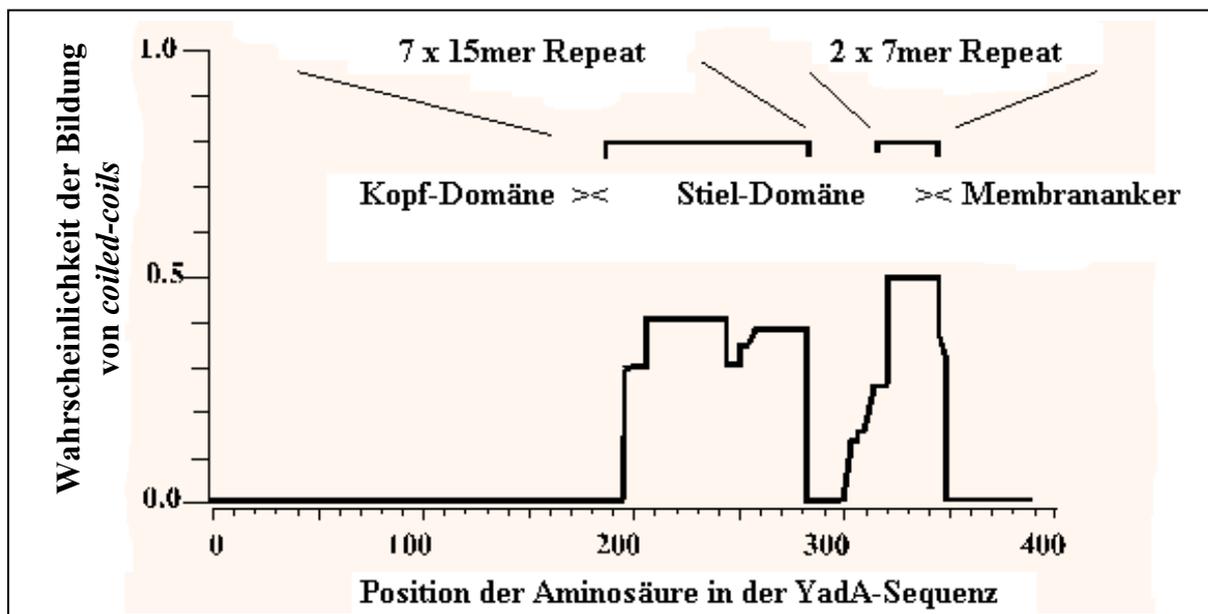
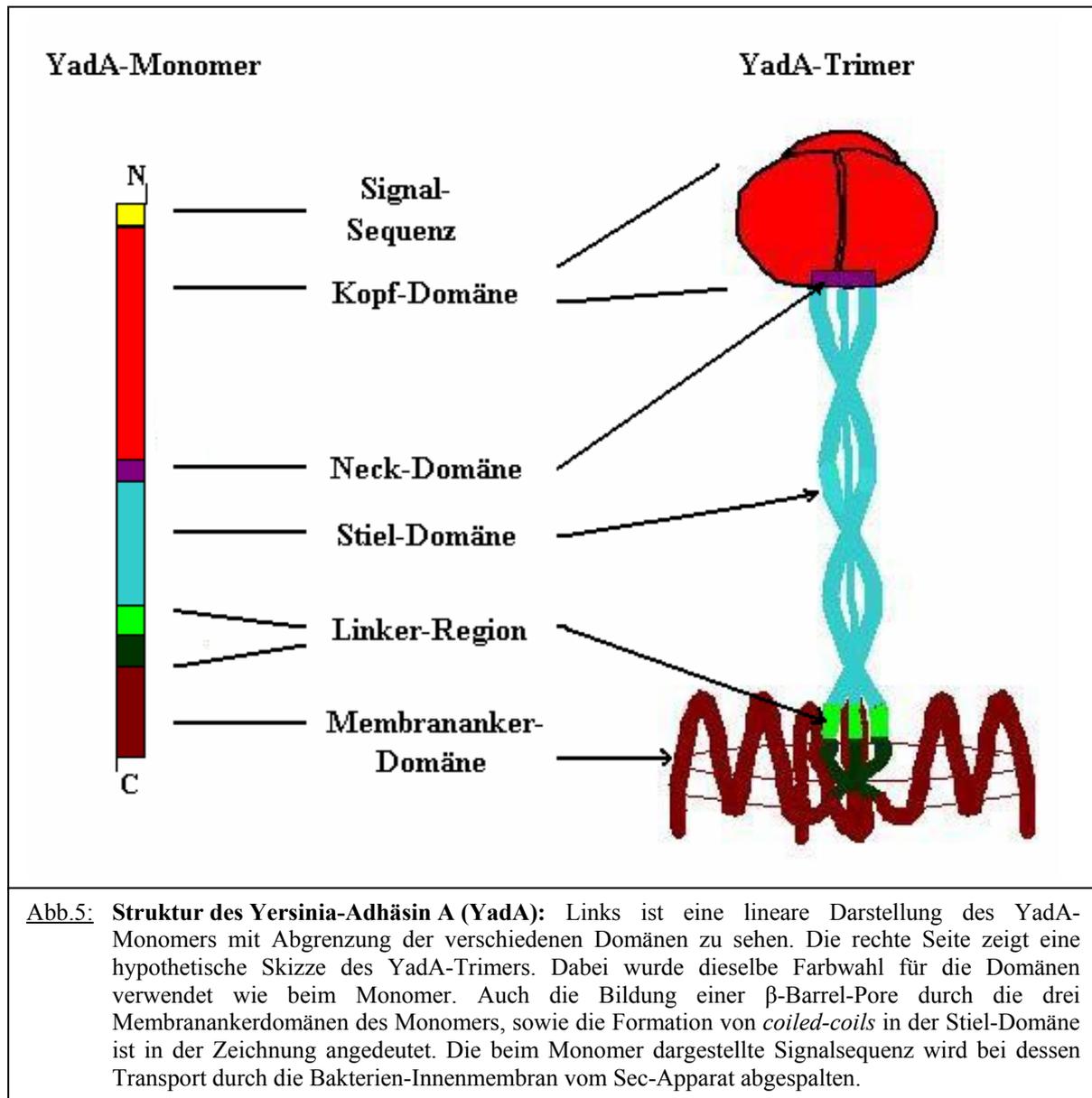


Abb. 4: Darstellung der *coiled-coil*-Bildungswahrscheinlichkeit von YadA nach Lupas, 1991. Dabei sieht man, dass die sieben Pentadekamer-Repeats der Stiel-Region sowie die zwei Heptamer-Repeats zwischen Stiel-Region und Membrananker am ehesten *coiled-coils* ausbilden.



1.6.6 Funktionen von YadA

YadA ist ein multifunktionelles Adhäsins. Neben seiner Adhärenz an epitheliale Zellen (Heesemann & Grüter, 1987), bindet es an Proteine der extrazellulären Matrix (ECM-Proteine) wie Kollagen Typ I, II, IV u.a. (Emödy et al., 1989; Schulze-Koops et al., 1992; Roggenkamp et al., 1995), an zelluläres Fibronectin (Terti et al., 1992; Schulze-Koops et al., 1993) und an Laminin (Flügel et al., 1994; Tamm et al., 1993). Auch eine Adhäsion an intestinalen Mucus und Bürstensaummembranen von Kaninchen konnte *in vitro* nachgewiesen werden (Mantle et al., 1989; Paerregaard et al., 1991). Weiterhin bindet es an humane Granulozyten auch im unopsonierten Zustand (Roggenkamp et al., 1996), was deren Lähmung durch Injektion von Yersinia Outer Proteins (Yops) über das TypIII-Proteinsekretionssystem ermöglicht. Bei maximaler Expression von YadA auf der

Bakterienoberfläche (bei 37°C) vermittelt es Autoagglutination (Skurnik et al., 1984), die von seiner korrekten dreidimensionalen Struktur abhängig ist (Tamm et al., 1993) und deren Ursache bis heute nicht sicher geklärt ist.

Die Serumresistenz ist bei *Y. enterocolitica* in hohem Maße von der YadA-Expression abhängig (Pilz et al., 1991; Roggenkamp et al., 2003). So verliert ein YadA-defizienter *Y. enterocolitica*-Stamm seine Resistenz gegen die Komplementlyse (Heesemann & Grüter, 1987). Darüber hinaus soll YadA einen protektiven Effekt gegen die Defensine von Granulozyten vermitteln (Visser et al., 1996).

Für die Virulenz von *Y. enterocolitica* ist YadA ein bedeutender Pathogenitätsfaktor, wie im Mausinfektionsmodell gezeigt werden konnte (Pepe et al., 1995). Weiterhin ließen sich Mäuse mit YadA-spezifischen Antikörpern gegen eine intravenöse Infektion mit *Y. enterocolitica* passiv immunisieren (Vogel et al., 1993). Welche der einzelnen festgestellten Adhäsionseigenschaften des YadA aber bei der Infektion eine pathogenetische Rolle spielen, ist bislang ungeklärt. Bei *Y. pseudotuberculosis* hingegen konnte keinerlei Einschränkung der Virulenz bei Fehlen des Adhäsins festgestellt werden (Kapperud & Namork, 1987; Rosqvist et al., 1988).

1.7 Gegenstand der Arbeit

YadA ist der Prototyp einer neuen Klasse bakterieller Adhäsine, die oligomere Strukturen bilden und mit dem C-Terminus in der Außenmembran verankert sind. Entsprechend der Aminosäuresequenz lassen sich verschiedene Regionen bzw. Domänen vorhersagen:

Eine N-terminale Sec-abhängige Signalsequenz, eine Head-, Neck- und Stalk-Domäne, eine Linking-Region und ein C-terminaler Membrananker.

Dabei ist unbekannt, inwieweit die einzelnen Domänen die vorhergesagten strukturellen und funktionellen Eigenschaften auch erfüllen.

Durch Deletionsmutagenese, Konstruktion von FLAG-Fusionen und Einfügen von Protease-spaltstellen sollte analysiert werden, inwieweit die verschiedenen Regionen/Domänen essentiell sind für die komplexe dreidimensionale Struktur des Adhäsins und Adhärenzeigenschaften vermitteln.

Hierzu wurden die unterschiedlichen Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Autoagglutination, Kollagenbindung, Epithelzellbindung und Serumresistenz untersucht.

Darüber hinaus wurden FimH-YadA-Fusionsproteine erstellt, um zu untersuchen, ob sich YadA als Fusionspartner für heterologe Adhäsine eignet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|-------------------------------|---------------------------|
| Analysenwaagen | Sartorius |
| Brutschrank | Heraeus |
| Elektroporation | BioRad |
| Fotografie-System | Herolab |
| Gelelektrophorese: | |
| horizontale Gelkammern | BioRad |
| vertikale Gelkammern | BioRad |
| Transformator | BioRad |
| Gel-Fotografie | Pharmacia Biotech |
| Mikroskope | |
| Mikroskopie: | Leitz |
| Mikrotiterplattenphotometer | Titertek Multiskan |
| Absorptionsspektralphotometer | Pharmacia |
| pH-Meter | |
| Pipetten | Eppendorf |
| Sequenziergerät | Applied Biosystems |
| Sterilwerkbank | Laminar Air Flow |
| Thermoblöcke | Eppendorf 5320 Thermostat |
| Ultraschall-Applikator | Bransen Sonifier B15 |
| Whirlmix | Heidolph |
| Zentrifugen: | |
| Kühlzentrifuge | Sigma 3K30 |
| Tischzentrifugen | Sigma 1K1S |

2.1.2 Medien

| | |
|---------------------------|---|
| Luria-Bertani (LB)-Medium | 10 g Trypton, pH 7,4-7,6 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest. |
| LB-Agar | 15 g Agar / 1 LB-Medium |
| LB-Einfriermedium | LB-Medium ad 15% Glycerin-Lsg. |
| RPMI-Medium | |
| SOC-Medium | 20 g Trypton, pH 7,0 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml 250 mM KCl-Lösung 20 mM Glucose hinzugeben und sterilfiltrieren. |
| YT-Medium | 2,0 % Trypton, pH 7,6 0,5 % Hefeextrakt 0,4 % MgSO ₄ 10 mM KCl ad 1000 ml Aqua dest. |

Antibiotika wurden je nach Bedarf den Medien in folgenden Konzentrationen hinzugefügt:

| | |
|----------------|-----------|
| Ampicillin | 100 µg/ml |
| Kanamycin | 25 µg/ml |
| Nalidixinsäure | 60 µg/ml |
| Spectinomycin | 50 µg/ml |
| Tetracyclin | 20 µg/ml |

2.1.3 Verwendete Antikörper

| | |
|----------------------|---|
| Primär-Antikörper: | polyklonale: P1O8, S70 monoklonale: 8D1, 9A6, 9H7, 9H11 Anti-FLAG-mab |
| Sekundär-Antikörper: | FITC-conjugated Goat-Anti-Rabbit-IgG für polyklonale FITC-conjugated Goat-Anti-Mouse-IgG für monoklonale |

2.1.4 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

| Stämme/Plasmide | Eigenschaften | Herkunft/Referenz |
|--------------------------|--|---------------------------|
| Stämme | | |
| <i>Y. enterocolitica</i> | | |
| WA-314 | klinisches Isolat von Serotyp O8, trägt das Virulenz-Plasmid pYVO8, Biogruppe 1B, Nal ^r | Heesemann et al. (1983) |
| WA-C | plasmidloses Derivat von WA-314 | Heesemann et al. (1983) |
| <i>E. coli</i> | | |
| DH5 α | <i>E. coli endA1 supE44 hsdR17</i> ($r_K^+ m_K^+$) <i>thi-1 recA1gyrA96 relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> ($\phi 80$ lacZ Δ M15) | Hanahan (1983) |
| Sm10 λ pir | <i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-TC::Mu-Kan</i> (λ pir), Km ^r | Miller & Mekalanos (1988) |
| ORN172 | <i>thr-1 leuB thi-1</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>U169 xyl-7 ara-13 mtl-2 gal-6 rpsL tonA2 supE44</i> Δ (<i>fimBEACDFGH</i>):: <i>kan pilG1</i> , Km ^r | Woodall et al. (1993) |
| ORN115 | <i>thr-1 leuB thi-1</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>U169 malA1 xyl-7 ara-13 mtl-2 gal-6 rpsL fhuA2 supE44 pilG1</i> | Spears et al. (1986) |
| Plasmide | | |
| pUC-A-1 | pUC13 mit 5 kb <i>EcoRI-HindIII</i> Insertionsfragment von pYVO8, welches das <i>yadA</i> Gen beinhaltet (A-1-Fragment) | Roggenkamp et al. (1995) |
| pUC-A-1 Δ 29-81 | pUC-A-1 mit Deletion der as 29-81 von <i>yadA</i> | Roggenkamp et al. (1996) |
| pUC-A-N | pUC-A-1, bp 568-645 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>neck region</i> as 190-215) | Diese Arbeit |
| pUC-A-S1 | pUC-A-1, bp 685-732 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht dem 1. 15mer Repeat as 229-244) | Diese Arbeit |
| pUC-A-S2 | pUC-A-1, bp 685-777 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht dem 1. und 2. 15mer Repeat as 229-259) | Diese Arbeit |
| pUC-A-S3 | pUC-A-1, bp 685-867 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht den ersten vier 15mer Repeats as 229-289) | Diese Arbeit |
| pUC-A-S4 | pUC-A-1, bp 685-990 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht allen 15mer Repeats as 229-330) | Diese Arbeit |
| pUC-A-H | pUC-A-1, bp 88-564 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>head region</i> as 30-188) | Diese Arbeit |
| pUC-A-HNS1 | pUC-A-1, bp 88-732 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>head region</i> , <i>neck region</i> und dem 1. 15mer Repeat as 30-244) | Diese Arbeit |
| pUC-A-HNS2 | pUC-A-1, bp 88-777 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>head region</i> , <i>neck region</i> und den 1. und 2. 15mer Repeats as 30-259) | Diese Arbeit |
| pUC-A-HNS3 | pUC-A-1, bp 88-867 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>head region</i> , <i>neck region</i> und den ersten vier 15mer Repeats as 30-289) | Diese Arbeit |
| pUC-A-HNS4 | pUC-A-1, bp 88-990 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>head region</i> , <i>neck region</i> und allen 15mer Repeats, as 30-330) | Diese Arbeit |
| pUC-A-HNS5 | pUC-A-1, bp 88-1056 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>head</i> -, <i>neck</i> -, <i>stalk</i> - und proximalen <i>linking region</i> , as 30-352) | Diese Arbeit |
| pUC-A-L1 | pUC-A-1, bp 991-1056 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht den drei 7mer Repeats (=proximaler Teil der <i>linking region</i>), as 331-352) | Diese Arbeit |
| pUC-A-L2 | pUC-A-1, bp 1057-1107 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht dem distalen Teil der <i>linking region</i> , as 353-369) | Diese Arbeit |
| pUC-A-X-Neck | pUC-A-1, bp 592-603 mutiert zu Faktor Xa-Schnittstelle (entspricht Mutation der as 198-201 von AGTK zu IEGR) | Diese Arbeit |
| pUC-A-X-Stalk | pUC-A-1, bp 1012-1023 mutiert zu Faktor Xa-Schnittstelle (entspricht Mutation der as 338-341 von LDNR zu IEGR) | Diese Arbeit |
| pUC-A-X-Loop | pUC-A-1, bp 1138-1149 mutiert zu Faktor Xa-Schnittstelle (entspricht Mutation der as 380-383 von YRSS zu IEGR) | Diese Arbeit |
| pUC-A-FimH158 | pUC-A-1, bp 88-564 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>head region</i> as 30-188) und ersetzt durch bp 70-537 des <i>fimH</i> -Präkursor-Gens (entspricht der gesamten Lektin-Domäne von FimH as 24-179) | Diese Arbeit |
| pUC-A-FimH217 | pUC-A-1, bp 88-564 deletiert in <i>yadA</i> (entspricht der <i>head region</i> as 30-188) und ersetzt durch bp 70-714 des <i>fimH</i> -Präkursor-Gens (entspricht der gesamten Lektin-Domäne und den ersten 61 as der Pilin-Domäne von FimH as 24-238) | Diese Arbeit |
| pHP45 Ω | Ursprung der Spectinomycin (Spc) Kasette | P. J. Sansonetti |
| pGP704 | Suizid-Vector, R6K ² Replikon benötigt π Protein <i>in trans</i> von λ pir-besitzendem Empfänger | Miller & Mekalanos (1988) |
| pGPS-A-1 | pGP704, 1.8 kb Spc-Kasette in der <i>EcoRI</i> Site, trägt das <i>yadA</i> Gen als ein <i>EcoRI-SphI</i> Fragment von pUC-A-1 | Roggenkamp et al. (1995) |
| pGPS-A-N | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-N Fragment von pUC-A-N | Diese Arbeit |

| | | |
|---------------------------|--|--------------------------|
| pGPS-A-S1 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-S1 Fragment von pUC-A-S1 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-S2 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-S2 Fragment von pUC-A-S2 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-S3 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-S3 Fragment von pUC-A-S3 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-S4 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-S4 Fragment von pUC-A-S4 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-H | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-H Fragment von pUC-A-H | Diese Arbeit |
| pGPS-A-HNS1 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-HNS1 Fragment von pUC-A-HNS1 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-HNS2 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-HNS2 Fragment von pUC-A-HNS2 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-HNS3 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-HNS3 Fragment von pUC-A-HNS3 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-HNS4 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-HNS4 Fragment von pUC-A-HNS4 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-HNS5 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-HNS5 Fragment von pUC-A-HNS5 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-L1 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-L1 Fragment von pUC-A-L1 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-L2 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-L2 Fragment von pUC-A-L2 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-X-Neck | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-X-Neck Fragment von pUC-A-X-Neck | Diese Arbeit |
| pGPS-A-X-Stalk | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-X-Stalk Fragment von pUC-A-X-Stalk | Diese Arbeit |
| pGPS-A-X-Loop | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-X-Loop Fragment von pUC-A-X-Loop | Diese Arbeit |
| pGPS-A-FimH158 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-FimH158 Fragment von pUC-A-FimH158 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-FimH217 | pGPS, <i>EcoRI-SphI</i> A-FimH217 Fragment von pUC-A-FimH217 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-N1 | pGPS-A-HNS1, trägt die neck region (<i>yadA</i> bp 568-684) vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNS1 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-N2 | pGPS-A-HNS 2, trägt die neck region (<i>yadA</i> bp568-684) vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNS2 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-N3 | pGPS-A-HNS 3, trägt die neck region (<i>yadA</i> bp568-684) vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNS3 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-N4 | pGPS-A-HNS 4, trägt die neck region (<i>yadA</i> bp568-684) vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNS4 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-HNS2-FLAG | pGPS-A-HNS2, trägt die 32 bp FLAG Epitop-Sequenz vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNS2 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-HNS3-FLAG | pGPS-A-HNS3, trägt die 32 bp FLAG Epitop-Sequenz vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNS3 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-HNS4-FLAG | pGPS-A-HNS4, trägt die 32 bp FLAG Epitope-Sequenz vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNS4 | Diese Arbeit |
| pGPS-A-HNS5-FLAG | pGPS-A-HNS5, trägt die 32 bp FLAG Epitop-Sequenz vor dem verkürzten <i>yadA</i> Gen von pGPS-A-HNS5 | Diese Arbeit |
| pYVO8 | Virulenzplasmid von WA-314 | Heesemann et al. (1983) |
| pYVO8-A-0 | pYVO8, <i>yadA</i> ⁻ , Km-GenBlock inseriert in die <i>PstI</i> -Sites des <i>yadA</i> Gens durch Austausch von Allelen | Roggenkamp et al. (1995) |
| pYVO8-A-1 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-1, Wildtyp <i>yadA</i> | Roggenkamp et al. (1995) |
| pYVO8-A- Δ_{29-81} | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A- Δ_{29-81} | Roggenkamp et al. (1996) |
| pYVO8-A-N | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-N | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-S1 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-S1 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-S2 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-S2 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-S3 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-S3 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-S4 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-S4 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-S5 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-S5 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-H | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-H | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-HNS1 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-HNS1 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-HNS2 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-HNS2 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-HNS3 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-HNS3 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-HNS4 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-HNS4 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-L1 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-L1 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-L2 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-L2 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-X-Neck | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-X-Neck | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-X-Stalk | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-X-Stalk | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-X-Loop | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-X-Loop | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-FimH158 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-FimH158 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-FimH217 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-FimH217 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-N1 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-N1 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-N2 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-N2 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-N3 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-N3 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-N4 | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-N4 | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-HNS2-FLAG | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-HNS2-FLAG | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-HNS3-FLAG | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-HNS3-FLAG | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-HNS4-FLAG | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-HNS4-FLAG | Diese Arbeit |
| pYVO8-A-HNS5-FLAG | pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-HNS5-FLAG | Diese Arbeit |

2.1.5 Verwendete Primer/Oligonukleotide

Sämtliche Primer wurden bei der Firma Metabion (Martinsried) in entsalztem und lyophilisiertem Zustand bestellt und in Aqua_{bide}st gelöst, um eine Konzentration von 100 pmol/μl zu erreichen.

| Primer | Beschreibung | Sequenz |
|--------------|--|--|
| PCR-1 | PCR-1: ^{5'} <i>Cla</i> I - ^{3'} <i>Sac</i> I-Fragmente | Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen |
| A-Cla-f | ständiger forward Primer für PCR-1, Start: 167 bp vor dem <i>YadA</i> -Startcodon | ^{5'} TTTTAAAGATCGATTAGTGCTGT ^{3'} |
| A-87-r | reverse Primer, verwendet für <i>YadA</i> -H(NS)-Mutanten, beinhaltet <i>yadA</i> Signalsequenz plus die ersten vier as von <i>yadA</i> : N26-N27-D28-E29 + ein durch <i>Sac</i> I eingebrachtes L | ^{5'} TACTGGAGCTCGTCATTATTGGCAAA ^{3'} |
| A-567-r | reverse Primer, verwendet für <i>YadA</i> -N, Ende: bp567 (=L189) von <i>yadA</i> , + E-L eingebracht durch <i>Sac</i> I | ^{5'} GAAGAGCTCAAGGCTTTCATGACCAATGGA ^{3'} |
| A-684-r | reverse Primer, verwendet für <i>YadA</i> -S-Mutanten, Ende: bp684 (=E228) von <i>yadA</i> + L eingebracht durch <i>Sac</i> I | ^{5'} CGAGAGCTCAGCTGATTTTTATTGTCAT ^{3'} |
| A-990-r | reverse Primer, verwendet für <i>YadA</i> -L1, Ende: bp990 (=Y330) von <i>yadA</i> + E-L eingebracht durch <i>Sac</i> I | ^{5'} ATGGAGCTCGTATTGATTCGATTCACGGATTG ^{3'} |
| A-1056-r | reverse Primer, verwendet für <i>YadA</i> -L2, Ende: bp1056 (=G352) von <i>yadA</i> + E-L eingebracht durch <i>Sac</i> I | ^{5'} CCAGAGCTCACCTTTGTCAACTCGTGTGTC ^{3'} |
| PCR-2 | PCR-2: ^{5'} <i>Sac</i> I - ^{3'} <i>Sph</i> I Fragmente | Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen |
| A-565-f | forward Primer, verwendet für <i>YadA</i> -H, <i>Sac</i> I-Site, Start: bp565 (=L189) von <i>yadA</i> | ^{5'} GCTAAGAGCTCAATCGCCAATTGACACATCTTG ^{3'} |
| A-646-f | forward Primer, verwendet für <i>YadA</i> -N, <i>Sac</i> I-Site, Start: bp646 (=E216) von <i>yadA</i> | ^{5'} AAGGAGCTCGAAAAAACACAGGAAAATGCAAA ^{3'} |
| A-733-f | forward Primer, verwendet für <i>YadA</i> -HNS1 und <i>YadA</i> -S1, <i>Sac</i> I-Site, Start: bp733 (=L245) von <i>yadA</i> | ^{5'} TAGTAAAAGTGCTGAGCTCTTGAAAAATGCGCGT ^{3'} |
| A-778-f | forward Primer, verwendet für <i>YadA</i> -HNS2 und <i>YadA</i> -S2, <i>Sac</i> I-Site, Start: bp778 (=L260) von <i>yadA</i> | ^{5'} TGACCTGTCTAACGAGCTCTTGATATGCCAAAA ^{3'} |
| A-868-f | forward Primer, verwendet für <i>YadA</i> -HNS3 und <i>YadA</i> -S3, <i>Sac</i> I-Site, Start: bp868 (=L290) von <i>yadA</i> | ^{5'} AAAAAATGAGCTGAGCTCTTAGCAAGCGCTAAT ^{3'} |
| A-990-f | forward Primer, verwendet für <i>YadA</i> -HNS4 und <i>YadA</i> -S4, <i>Sac</i> I-Site, Start: bp991 (=T331) von <i>yadA</i> | ^{5'} AGACAGAGCTCACAGATCATAAATCCATCAAC ^{3'} |
| A-1057-f | forward Primer, verwendet für <i>YadA</i> -L1, <i>Sac</i> I-Site, Start: bp1057 (=L353) von <i>yadA</i> | ^{5'} CGATTGAGCTCTTAGCCAGTTCAGCCGCTT ^{3'} |
| A-1108-f | forward Primer, verwendet für <i>YadA</i> -L2, <i>Sac</i> I-Site, Start: bp1108 (=K370) von <i>yadA</i> | ^{5'} AAAGAGCTCAAAGATAACTTTCTGCAGGTG ^{3'} |
| A-Sph-r | ständiger reverse Primer für PCR-2, Ende: 569 bp nach <i>yad</i> Stopcodon, 30 bp nach <i>Sph</i> I-Site | ^{5'} GTCAATACAGAGATAGAACAGCT ^{3'} |

| | | |
|-----------------------------|---|---|
| FLAG-SacI-f | Konstruktion der 30 bp FLAG-Insert- dsDNA, deletiert eine SacI-Site nach der Insertion | ^{5'} GGACTATAAGGACGATGATGACAAACAGCT ^{3'} |
| FLAG-SacI-r | Konstruktion der 30 bp FLAG-Insert- dsDNA, deletiert eine SacI-Site nach der Insertion | ^{5'} GTTTGTTCATCATCGTCCTTATAGTCCAGCT ^{3'} |
| FaktorXa- OE-PCR | FaktorXa-Overlap-Extension-PCR: ^{5'} ClaI- ^{3'} PstI Fragmente bei A-X-Neck und A-X-Stalk ^{5'} ClaI- ^{3'} SphI Fragment bei A-X-Loop | |
| Mutagenese- Primer | | Veränderte Basen sind unterstrichen |
| A-603Xf | forward Overlap-Mutagenese-Primer, verwendet für A-X-Neck zusammen mit Primer A-1134-r, Start: bp587 von <i>yadA</i> | ^{5'} TTGCGATTGAGGGT <u>CGAGACACT</u> GATGCAGTGAATGT ^{3'} |
| A-591Xr | reverse Overlap-Mutagenese-Primer, verwendet für A-X-Neck zusammen mit Primer A-Cla-f (siehe PCR-1), Ende: bp607 von <i>yadA</i> | ^{5'} TGTCTCGAC <u>CCCTCAAT</u> CGCAAGATGTGTCAATTGGC ^{3'} |
| A-1021Xf | forward Overlap-Mutagenese-Primer, verwendet für A-X-Stalk zusammen mit Primer A-1134-r, Start: bp1004 von <i>yadA</i> | ^{5'} TCCATCAAATTGAGGGCCGTTT <u>AGATAAACT</u> TGACACA ^{3'} |
| A-1011Xr | reverse Overlap-Mutagenese-Primer, verwendet für A-X-Stalk zusammen mit Primer A-Cla-f (siehe PCR-1), Ende: bp1023 von <i>yadA</i> | ^{5'} ACGGCCCTCAATTTGATGGAAATTTATGATCTGTGTA ^{3'} |
| A-1134Xf | forward Overlap-Mutagenese-Primer, verwendet für A-X-Loop zusammen mit Primer A-Sph-r (siehe PCR-2), Start: bp1134 von <i>yadA</i> | ^{5'} GGGAATTGAGGGT <u>AGACAGGCATT</u> AGCAATTGG ^{3'} |
| A-1153Xr | reverse Overlap-Mutagenese-Primer, verwendet für A-X-Loop zusammen mit Primer A-Cla-f (siehe PCR-1), Ende: bp1153 von <i>yadA</i> | ^{5'} CCTGICTAC <u>CCCTCAAT</u> TCCCCGACACCTGCAG ^{3'} |
| Standard- Primer | | Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen |
| A-Cla-f | siehe PCR-1 , hier verwendet für A-X-Neck, A-X-Stalk und A-X-Loop | |
| A-Sph-r | siehe PCR-2 , hier verwendet für A-X-Loop | |
| A-1134-r | reverse Primer, verwendet für A-X-Neck und A-X-Stalk, <i>PstI</i> -Site, Ende: bp1134 (=G378) von <i>yadA</i> | ^{5'} CCC <u>GACACCTGCAGG</u> AAAGT ^{3'} |
| FimH-PCR | FimH-PCR: ^{5'} <i>SacI</i> - ^{3'} <i>SacI</i> Fragmente | Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen |
| Fim-3-f | forward Primer, verwendet für FimH158- und FimH217, <i>SacI</i> -Site, Start: bp70 (=C24) von <i>fimH</i> | ^{5'} ATGTGAGCTCTGTA <u>AAACCGCAAT</u> GGTAC ^{3'} |
| Fim-158-r | reverse Primer, verwendet für FimH158 <i>SacI</i> -Site, Start: bp537 (=T179) von <i>fimH</i> | ^{5'} ATGAGAGCTCAGTAGGCACCACCACATCA ^{3'} |
| Fim-217-r | reverse Primer, verwendet für FimH217 <i>SacI</i> -Site, Start: bp714 (=P238) von <i>fimH</i> | ^{5'} TGGAGAGCTCAGGTGAAAACGACGCGTA ^{3'} |

2.1.6 Puffer und Lösungen

2.1.6.1 Herstellung Ca²⁺-kompetenter Bakterien

TFB 1: 30 mM Kac, pH 5,8
 50 mM MnCl₂
 100 mM RbCl
 10 mM CaCl₂
 15 % Glycerin

TFB 2: 10 mM NaMops, pH 7,0
 75 mM CaCl₂
 10 mM RbCl
 15 % Glycerin

2.1.6.2 Plasmid-DNA-Präparation

Puffer P1: 100 µg/ml RNAase A, pH 8,0
 50 mM Tris-HCl
 10 mM EDTA

Puffer P2: 200 mM NaOH
 1 % SDS

Puffer P3: 3 M KAc, pH 5,5

Puffer QBT: 750 mM NaCl, pH 7,0
 50 mM MOPS
 15 % Ethanol
 0,15 % Triton X-100

Puffer QC: 1 M NaCl, pH 7,0
 50 mM MOPS
 15 % Ethanol

2.1.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

44 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid:

44 g Acrylamid
0,8 g Bisacrylamid
ad 100 ml Aqua dest.

4 % Sammelgel:

2,5 ml 250 mM Tris, pH 6,8
0,5 ml 44 % Acrylamid
0,1 ml 10 % SDS
1,9 ml Aqua dest.
zum Polymerisationsstart:
30 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat)
30 µl TEMED (N,N,N',N' – Tetramethylethylendiamin)

11 % Trenngel:

5,0 ml 750 mM Tris, pH 8,8
2,5 ml 44 % Acrylamid
0,2 ml 10 % SDS
2,3 ml Aqua dest.
zum Polymerisationsstart:
40 µl 10 % APS
20 µl TEMED

10 x Laufpuffer nach Laemmli:

30,2 g Tris-HCl
142,6 g Glycin
ad 1000 ml Aqua dest.

(1 x Laufpuffer nach Laemmli zusätzlich angesetzt mit 0,1 % SDS)

2 x Laemmli-Protein-Stopmix:

125 mM Tris-HCl, pH 6,8
4 % SDS
20 % Glycerin
2 % beta-Mercaptoethanol
0,01 % Bromphenolblau

| | | | |
|----------------------|--------------------|------|-----|
| Proteingrößen-Marker | Phosphorylase B | 97 | kDa |
| | Albumin | 66 | kDa |
| | Ovalbumin | 45 | kDa |
| | Carbonic Anhydrase | 30 | kDa |
| | Trypsin Inhibitor | 20,1 | kDa |
| | Lactalbumin | 14 | kDa |

2.1.6.5 Coomassie-Färbung eines Proteingels

| | | |
|-----------------------------|---------|----------------------------|
| Coomassie-Blau-Färbelösung: | 0,005 % | Coomassie Brilliant Blue R |
| | 50 % | Methanol |
| | 10 % | Essigsäure |
| | 40 % | Aqua dest. |
| Destain I: | 50 % | Methanol |
| | 10 % | Essigsäure |
| Destain II: | 5 % | Methanol |
| | 7 % | Essigsäure |

2.1.6.6 Immunoblot/Westernblot eines Proteingels

| | | |
|--|------------|----------------------------------|
| Westernblot-Puffer: | 100 ml | 10 x Laufpuffer nach Laemmli |
| | 200 ml | Methanol |
| | 700 ml | Aqua dest. |
| Phosphate-buffered Saline (PBS): (Phosphat-gepufferte Salzlösung) | 8 g | NaCl, pH 7,4 |
| | 0,2 g | KCl |
| | 1,44 g | Na ₂ HPO ₄ |
| | 0,24 g | KH ₂ PO ₄ |
| | ad 800 ml | Aqua dest., pH 7,4 |
| | ad 1000 ml | Aqua dest. |

| | | |
|-------------------------|------------|--|
| FKS-Block-Lösung: | 1 x | PBS |
| | 2 % | fetales Kälberserum (FKS) |
| | 0,5 % | Tween 20 |
| Waschpuffer: | 1 x | PBS |
| | 0,5 % | Tween 20 |
| Substratpuffer: | 100 ml | Diethanolamin, pH 9,6 |
| | ad 1000 ml | Aqua dest. |
| Gebrauchspuffer: | 200 ml | Substratpuffer |
| | 800 ml | 0,9 %-NaCl-Lösung |
| | 100 µl | 1 M MgCl ₂ -Lösung |
| NBT-Lösung: | 1 mg/ml | Nitroblautetrazoliumchlorid in Aqua dest. |
| Indolylphosphat-Lösung: | 5 mg/ml | 5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat in Dimethylformamid |
| Färbelösung: | 9 ml | Gebrauchspuffer |
| | 1 ml | NBT-Lösung |
| | 100 µl | Indolylphosphat-Lösung |

2.1.6.7 Serumresistenztest

| | | |
|------------------------------------|--------|----------------------------------|
| PBS-5 mM MgCl ₂ -Puffer | 137 mM | NaCl |
| | 8,1 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | 2,7 mM | KCl |
| | 1,5 mM | KH ₂ PO ₄ |
| | 5,0 mM | MgCl ₂ |

2.2 Methoden:

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Soweit nicht anders beschrieben wurden die Bakterien in Luria-Bertani Medium (LB) über Nacht angezüchtet, *Yersinien* bei 27°C, *E. coli* bei 37°C. Von den Vorkulturen wurden Hauptkulturen im Verhältnis 1:20 beimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm und damit definierten Bakterienkonzentration bei 37°C inkubiert. Um YadA zu exprimieren wurden die Bakterien über Nacht bei 27°C in LB angezüchtet und am nächsten Morgen 1:40 in RPMI 1640 Medium (Biochrom) verdünnt. Für Kollagen- und Zelladhärenztest wurden dann die Kulturen im Thermoschüttler bei 37°C und 150 rpm 2 Stunden belassen, zur Präparation von Außenmembranproteinen 6 Stunden.

2.2.2 Herstellung Ca²⁺-kompetenter Bakterien

1970 entdeckten Mandel und Higa, dass Bakterien unter dem Einfluss von Ca²⁺ vermehrt fremde genetische Information in Form von Phagen-DNA aufnehmen. 1972 brachte Cohen mit Ca²⁺ behandelte Bakterien zur Absorption von Plasmiden. Die Bakterien wurden dabei kurz erhitzt. Erklärt wird dieses Phänomen durch eine verstärkte Permeabilität der bakteriellen Membranen unter dem Einfluss des Ions und der kurzfristigen Temperaturerhöhung. In dieser Arbeit kommt das 1983 von Hanahan noch durch Zugabe anderer Ionen wie Rb²⁺ und Mn²⁺ verbesserte Protokoll zur Anwendung.

Darin wird eine bakterielle Einzelkolonie (in dieser Arbeit zur Herstellung kompetenter *E. coli* vom Stamm SM10λpir, kompetenter *Yersinien* vom Stamm WA-C) von einer Mangelmedien-Agarplatte (Müller-Hinton) über Nacht in YT-Medium bei 37°C angesetzt. Am nächsten Morgen wird diese Vorkultur einem großen Gefäß mit angewärmten YT-Medium im Verhältnis von 1:100 zugegeben und bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 250 rpm für etwa 2 Stunden bebrütet, bis die OD₆₀₀ 0,4 bis 0,5 beträgt. Die so angezüchtete Bakterien-Hauptkultur wird nun auf sterile 40 ml Falcon-Gefäße verteilt und für 5 Minuten auf Eis gekühlt. Danach zentrifugiert man die Behälter 10 Minuten bei 4°C und 3000 rpm. Der Überstand wird abgekippt und die Bakterienpellets in 30 ml gekühltem TFB1-Puffer pro 100 ml Hauptkultur auf Eis resuspendiert. Wiederum folgt eine zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 3000 rpm. Der Überstand wird verworfen und die Pellets nun in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer pro 100 ml Hauptkultur aufgenommen. Jeweils 400 µl der Bakteriensuspension

werden in vorgekühlte Eppendorfhütchen verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die somit kompetent gewordenen Bakterien werden nun bei -80°C gelagert oder können sofort für eine Transformation verwendet werden.

2.2.3 Transformation Ca^{2+} -kompetenter Bakterien

Bei dem Vorgang der Transformation wird DNA von Bakterien eigenständig aufgenommen. Um dies zu erreichen werden zu 150 μl der kompetenten Bakteriensuspension 10 μl eines vorangegangenen Ligationsansatzes oder ca. 5 ng Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wird 30 Minuten lang in Eppendorfhütchen auf Eis gelagert und anschließend für 90 Sekunden im Thermoblock auf 42°C erwärmt. Sofort darauf folgt nun eine fünfminütige Lagerung auf Eis. 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium wird danach hinzupipettiert, und die Probe für 1 Stunde bei 37°C und 650 rpm im Thermoblock inkubiert. In dieser Zeit erholen sich die frisch transformierten Bakterien und produzieren ihre chromosomal- und plasmidvermittelten Antibiotikaresistenz-Mechanismen. Entsprechend des geforderten neuen Resistenzschemas werden je 200 μl der Suspension auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank angezchtet.

2.2.4 Konjugation

Unter Konjugation versteht man in der Molekularbiologie den unidirektionalen Transfer von genetischer Information von einem Donor zu einem Rezipienten. Damit dieser Vorgang zustande kommt, müssen bestimmte genetische Voraussetzungen gegeben sein. Zum einen muss die DNA, die übertragen werden soll, entweder eine *oriT*-Site oder eine *mob*-Site besitzen, zum anderen müssen Proteine vorhanden sein, welche mit diesen Sites interagieren und die DNA transferfähig machen. Kodiert werden diese Proteine in den sogenannten *tra*-Operons, welche unter anderem für die Formation des Pilus zuständig sind, der den Kontakt zum Rezipienten herstellt. Besitzt ein Plasmid sowohl eine *oriT*-Site (bzw. *mob*-Site) als auch die *tra*-Operons, spricht man von einem mobilisierbaren und konjugativen (z.B. RP4), hat es nur eine *oriT*-Site (bzw. *mob*-Site), von einem mobilisierbaren und nicht-konjugativen Plasmid (z.B. pGP704). Letzteres kann aber auch problemlos in einer Konjugation verwendet werden, wenn die *tra*-Gene auf der chromosomalen DNA des Donors (so z.B. bei SM10 λ *pir*) oder auf einem Helferplasmid vorhanden sind.

In dieser Arbeit wurde für die Konjugation als Donor der *E. coli*-Stamm SM10 λ pir mit dem Suizidplasmid pGP704 verwendet. Als Rezipient dienten die *Y. enterocolitica*-Stämme WA-C und WA-314.

Zur Vorbereitung einer Konjugation wird jeweils eine separate Blutagarplatte mit Donor bzw. Rezipient aus der Einfrierkultur beimpft, mit den passenden Antibiotika-Plättchen belegt und über Nacht bei 27°C (*Y. enterocolitica*) oder 37°C (*E. coli*) inkubiert.

Am nächsten Morgen entnimmt man mit einer sterilen Impföse von der Donor-Kultur etwa 4 Kolonien und von der Rezipienten-Kultur etwa 12 Kolonien und führt beide in einem mit 500 μ l PBS-Lösung gefüllten Eppendorfhütchen zusammen. Die Kolonien werden durch sorgfältiges Resuspendieren gelöst. Das Bakterienmischung wird anschließend auf eine frische Blutagarplatte fünfmarkstückgroß pipettiert und zur Konjugation bei der für den Donor idealen Temperatur von 37°C im Brutschrank 6 Stunden lang inkubiert. Danach löst man ein Viertel des fünfmarkstückgroßen Konjugationsrasens in 1 ml PBS und plattiert davon 100 μ l, 200 μ l und 500 μ l auf frisch vorbereiteten LB-Agar-Platten mit passenden Selektionsantibiotika aus.

Diese inkubiert man für 36 Stunden bei 27°C. Die danach angewachsenen Bakterienkolonien können dann mit einer PCR auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

2.2.5 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden zwei verschiedene Kits mit leicht unterschiedlichen Verfahren verwendet.

Wurden größere Mengen an Plasmiden für Klonierungen benötigt (bis zu 100 μ g), bot sich das Nucleobond AX100 Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) an.

Für Klon-Screening und PCR genügte für gewöhnlich kleinere Mengen (bis zu 20 μ g) an Plasmid-DNA, so dass auf die schnellere Methode des „QuickDNA Kits“ der Firma QIAGEN zurückgegriffen werden konnte.

Grundsätzlich beruhen beide Kits auf dem 1979 veröffentlichten Verfahren der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly.

Die Bakterien werden dabei in kurzen zeitlichen Abständen drei verschiedenen Puffern ausgesetzt, die zu einer Trennung der Plasmid-DNA von chromosomaler DNA und bakteriellen Proteinen führen. Die erste Lösung dient zur Resuspension des Bakterienpellets unter hypertonen und komplexbildenden Bedingungen, was durch die Anwesenheit von Glucose und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) erreicht wird und die bakteriellen

Zellmembranen destabilisiert. Weiterhin enthält sie RNase, die störende bakterielle RNA effizient verdaut. Darauf folgt die eigentliche alkalische Lyse in einem NaOH-SDS-Gemisch, welches zur Denaturierung aller Nukleinsäuren und Proteine führt. Der dritte Puffer renaturiert mit Essigsäure wieder die freien Nukleinsäuren, bei denen es sich nach der Lyse fast ausschließlich um Plasmid-DNA handelt, da die chromosomale DNA weiterhin fest mit den durch SDS denaturierten Proteinen verbunden ist. Das ferner enthaltene Kalium führt überdies zum Ausfällen der SDS-Komplexe und erleichtert somit die Trennung der Plasmide von den festen Bestandteilen durch Zentrifugation. Der plasmidhaltige Überstand wird anschließend auf Anionenaustauscher-Säulen übertragen, die Plasmide dann aus diesen eluiert, durch Isopropanol entsalzt, konzentriert und mit 70%igem Ethanol gereinigt.

2.2.6 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

1968 isolierten H.O. Smith, K.W. Wilcox und T.J. Kelley von der John-Hopkins-Universität in den Vereinigten Staaten von Amerika erstmals eine DNase (<http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/CC/restriction.html>), deren Funktion von einer spezifischen DNA-Sequenz abhing. Seitdem sind mehr als 900 Restriktionsendonukleasen aus mehr als 230 verschiedenen Bakterienstämmen isoliert worden. Ihre Bezeichnung spiegelt ihre Herkunft wider. Der erste Buchstabe steht dabei für die Bakterien-Gattung, die nächsten zwei für die Spezies. So erkennt man, dass das Restriktionsenzym *EcoRI* von *Escherichia coli* stammen muss oder das *HindIII* von *Haemophilus influenzae*. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden in einer Palindromsequenz und erzeugen sogenannte „sticky ends“, d.h. die DNA-Fragmente sind an ihren durchtrennten Enden einsträngig und können bei einer darauffolgenden Ligation leicht mit komplementären einsträngig endenden DNA-Fragmenten verbunden werden.

Anbei folgt eine Liste aller in diesen Versuchsreihen benutzten Restriktionsenzyme.

Zum Verdau von DNA wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

| | |
|---|------------------------------|
| 10 x Restriktionsenzym-Puffer | 2 µl |
| Restriktionsenzym | 1 µl (entspricht 2 U/µg DNA) |
| DNA | x µl (entspricht 1 µg) |
| TE-Puffer | ad 20 µl |
| Beschichtung mit 1 Tropfen (20 µl) PCR-Öl | |

Inkubation bei leichtem Schütteln (300 rpm) im Thermoblock bei 37°C für 3 Stunden.

Waren größere Mengen an DNA für Klonierungen notwendig, wurden entsprechende 60 µl-Ansätze vorbereitet.

2.2.7 Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA

Um die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass sich linearisierte Plasmid-Backbones, die nur mit einer Restriktionsendonuklease aufgeschnitten wurden, bei einer folgenden Ligation wieder ohne Insert religieren, hat sich eine kurze Inkubation der Vektoren mit einer Phosphatase bewährt. Dieses Enzym entfernt die randständigen 5'-Phosphatgruppen der DNA, was eine intramolekulare Religation erheblich erschwert.

Nach Reinigung und Elution der Vektor-DNA mit dem NucleoSpin Extract Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) wird diese nach folgendem Protokoll mit der Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) (Gibco, Eggenstein, Deutschland) angesetzt:

| | |
|----------------------------|-----------------------------|
| Vektor-DNA (eluiert) | 30 µl (entspricht 3 µg DNA) |
| 10 x Dephos Buffer (Gibco) | 6 µl |
| CIAP | 0,5 µl |
| Aqua _{bidest} | ad 60 µl |

Die Probe wird 15 Minuten bei 37°C im Thermoblock, danach zur Denaturierung der CIAP für weitere 15 Minuten bei 75°C inkubiert. Dann stellt man sie kurz auf Eis und reinigt sie schließlich über eine weitere DNA-Gelelektrophorese durch Exzision und Elution der Bande aus dem Gel.

2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

In einer Ligation werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Herkunft, die vorher mit dem selben Restriktionsenzym verdaut wurden, miteinander verbunden. Dabei kommt es zwischen den endständigen, durch die Endonuklease entstandenen, komplementären „sticky ends“ der DNA-Moleküle zum Annealing. Die T4-DNA-Ligase schließt dann unter ATP-Verbrauch die zwischen den Fragmenten vorhandene Lücke in der Phosphatkette und führt somit zu einem stabilen neuen DNA-Produkt. Bei sogenannten „blunt-end“-Ligationen werden DNA-Fragmente mit der Ligase fusioniert, denen die einzelsträngigen „sticky ends“ fehlen.

In dieser Arbeit wurde grundsätzlich die dreifache molare Menge an Insert-DNA zur Menge an Vektor-DNA hinzugefügt. So wurden 20 µl-Ansätze mit 2 µl 10 x Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase, 100 ng Vektor-DNA und der dreifach molaren Menge an Insert-DNA zusammengestellt, als Auffüllpuffer diente Tris-Puffer, pH 8,6. Die Proben wurden über

Nacht im 14°C kühlen Wasserbad inkubiert und am nächsten Morgen für eine Transformation verwendet.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

1986 veröffentlichte Kary Mullis eine Methode, die eine Revolution in der Molekularbiologie darstellte und ihm 1993 den Nobelpreis für Chemie einbrachte, die Polymerase-Kettenreaktion. Während es vorher sehr schwierig und aufwändig war, ausreichend viel genetisches Material zu isolieren, war es auf einmal möglich, große Mengen an DNA durch Amplifikation zu gewinnen.

Die PCR ermöglicht die spezifische Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes mit Hilfe von einer thermostabilen Polymerase, Nukleotiden (dNTPs) und entsprechenden Primern. Als Primer bezeichnet man eine durchschnittlich 30 Basenpaare lange einzelsträngige Nukleotidsequenz, die als Startpunkt der DNA-Synthese von einer Polymerase erkannt wird. Die Temperaturvariation im Versuchsablauf beeinflusst dabei die Aktivität des Enzyms.

Jeder DNA-Synthese-Zyklus beginnt dabei mit einer Erhitzung auf 94°C und der darauf folgenden Denaturierung der DNA. Dabei lösen sich die Doppelstränge voneinander. Man verringert die Temperatur auf das primer-spezifische Optimum, so dass es zum Annealing von Primern und komplementärem DNA-Abschnitt kommt. Dieses Optimum liegt 2°C unter dem Schmelzpunkt der gewählten Primer. Danach erhöht man die Temperatur auf das Reaktionsoptimum der Polymerase (72°C für Taq-Polymerase), damit die Elongation der DNA-Stränge mit höchster Effizienz abläuft. Das Enzym verknüpft dabei, ausgehend von den Primern, Desoxynukleotidtriphosphate entsprechend der DNA-Matrize zu einer ihr komplementären Sequenz. Diese neu synthetisierten Moleküle werden nun durch Denaturierung mit einer erneuten Temperaturerhöhung auf 94°C von der Ausgangs-DNA gelöst und dienen nun selbst ebenfalls als Matrize für den nächsten Elongationsschritt. Der Zyklus wird 30 bis 35 mal wiederholt, wodurch sich die gewünschte DNA-Sequenz exponentiell vervielfacht. Zum Abschluss unterzieht man die in den Zyklen gewonnenen Moleküle noch einer Extra-Elongationsphase von etwa 7 Minuten Dauer, in der bis dahin nicht vollständig synthetisierte DNA-Sequenzen komplettiert werden können.

Als genetisches Ausgangsmaterial kann man außer präparatorisch gewonnener, reiner DNA auch ein aufgekochtes Gesamtzell-Lysat verwenden.

In dieser Arbeit wurde die PCR, soweit nicht anders erwähnt, nach folgendem Standard durchgeführt:

Zur Herstellung eines Gesamtzell-Lysats wurde 1 µl einer bakteriellen Übernachtskultur in 50 bis 500 µl Aqua_{bidest} abhängig vom genetischem Material aufgenommen (hohe Verdünnungen für Multicopy-Plasmid-PCRs und niedrige für Lowcopy-Plasmid-PCRs oder chromosomale PCRs), für 10 Minuten aufgekocht, danach abgekühlt und zentrifugiert. Reine DNA wurde entsprechend 1:50 bis 1:1000 in Aqua_{bidest} verdünnt. Alle Primer wurden von der Firma metabion (Martinsried, München) synthetisiert.

Folgender Reaktionsansatz wurde in PCR-Tubes angesetzt:

| | | |
|--------------------------------------|------|-------|
| 10 x PCR-Puffer (Perkin-Elmer) | 5 | µl |
| 2 mM dNTP-Mix (dATP,dGTP,dCTP,dTTP) | 5 | µl |
| 100 µM Primer 1 | 0,5 | µl |
| 100 µM Primer 2 | 0,5 | µl |
| Taq-Polymerase (Perkin-Elmer) | 0,25 | µl |
| DNA (aus Gesamtzell-Lysat oder rein) | 2,5 | µl |
| Aqua _{bidest} | ad | 50 µl |

Die Polymerase wurde kurz vor dem Reaktionsstart hinzupipettiert und die Probengefäße in den auf 94°C vorgeheizten PCR-Thermocycler gestellt.

Das Gerät wurde auf folgende Weise programmiert:

| | | |
|---------------------|---------------|-----------------|
| Start-Denaturierung | 94°C | 5 min |
| 30 Zyklen: | Denaturierung | 94°C 30 sec |
| | Annealing | x°C 45 sec |
| | Elongation | 72°C 2 min |
| Nach-Elongation | 72°C | 7 min |
| Abkühlung | 4°C | bis zum Abbruch |

Die entstandenen PCR-Produkte wurden entweder direkt zur Visualisierung auf ein Agarosegel aufgetragen oder zur weiteren Verarbeitung mit dem NucleoSpin Extract Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach dem dort beschriebenen Protokoll gereinigt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.10 Overlap-Extension-PCR

Die Overlap-Extension-PCR (OE-PCR) stellt eine Variante der Polymerase-Kettenreaktion dar, mit deren Hilfe man gezielt Gen-Mutationen erzeugen kann. Die Methode wurde 1989 erstmalig von Steffan Ho et al. veröffentlicht. Im Prinzip beruht sie darauf, komplementäre Primer (Overlap-Primer) zu verwenden, die zwei DNA-Fragmente mit überlappenden Enden produzieren. Diese Fragmente werden dann in einer darauf folgenden Fusionsreaktion kombiniert. Es kommt zum Annealing der beiden Teile an den überlappenden Enden. Das dabei entstandene Fusionsprodukt wird in der Fusionsreaktion mit Hilfe der entsprechenden Primer amplifiziert. Man kann gezielt Mutationen in der Nukleotid-Sequenz erzeugen, indem man diese in die überlappenden Primer einbringt.

Mit dieser Methode wurden die YadA-Mutanten mit Faktor Xa-Spaltstellen entworfen. Faktor Xa ist eine hochspezifische Serinprotease, die Proteine nach der Aminosäuresequenz IleGluGlyArg (IEGR) spaltet. Um somit YadA für diese Protease zugänglich zu machen, musste die Aminosäurefolge des Proteins an den gewünschten Stellen mutiert werden. Dabei wurde darauf geachtet, nicht allzu große Ladungsänderungen in diesen Bereichen des Proteins hervorzurufen, um das Risiko ausgeprägter Konformationsänderungen von YadA zu verhindern.

Drei YadA-X-Mutanten wurden konstruiert:

YadA-X-Neck, YadA-X-Stalk und YadA-X-Loop.

Folgende Aminosäuren wurden dabei jeweils zu der Faktor Xa-Spaltstelle IEGR mutiert:

YadA-X-Neck: as 198 – 201 (AlaGlyThrLys AGTK)

YadA-X-Stalk: as 338 – 341 (LeuAspAsnArg LDNR)

YadA-X-Loop: as 380 – 383 (TyrArgSerSer YRSS)

Für die OE-PCR mussten für jede Faktor Xa-Mutante zwei komplementäre Primer konstruiert werden, die die IEGR-Mutation beinhalteten. Die Oligonukleotide wurden so erstellt, dass die Länge ihres mit dem anderen Fragment überlappenden Teiles in der Fusionsreaktion eine berechnete Denaturierungstemperatur hatte, die in etwa der Annealing-Temperatur in der PCR entsprach (60°C).

Diese Denaturierungstemperatur wurde wie folgt berechnet:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 4(\text{G}+\text{C})+2(\text{A}+\text{T}) \text{ (Suggs et al., 1981)}$$

Einen genauen Überblick, wie diese Overlap-Primer für die drei Mutanten konstruiert wurden, bietet Abbildung Nr.6.

Abbildung 7 skizziert den Ablauf des OE-PCR-Verfahrens. Danach werden zuerst zwei separate PCR-Reaktionen angesetzt.

In der einen Reaktion wurde der Primer A-Cla-f mit jeweils einem der drei reverse Overlap-Primer (A-591Xr, A-1011Xr, A-1153Xr), in der anderen je einer der drei forward Overlap-Primer (A-603Xf, A-1021Xf, A-1134Xf) mit einem geeigneten reverse Primer (A-1134r für A-603Xf und A-1021Xf; A-Sphr für A-1134Xf) kombiniert. Als DNA-Matrize diente dabei das Plasmid pUC-A1 als Träger des kompletten *yada*-Wildtyp-Gens. Um das Risiko für spontane Punktmutationen zu vermindern, wurde anstelle der Taq-Polymerase die akkuratere ClonedPfu-Polymerase (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet.

Somit wurden folgende 2 PCR-Ansätze vorbereitet:

| <u>Ansatz 1:</u> | | <u>Ansatz 2:</u> | |
|------------------------|---------------|------------------------|---------------|
| 10 x ClonedPfu-Puffer | 5 µl | 10 x ClonedPfu-Puffer | 5 µl |
| 2 mM dNTP-Mix | 5 µl | 2 mM dNTP-Mix | 5 µl |
| 100 µM Primer A-Cla-f | 0,5 µl | | |
| | | Für YadA-X-Neck: | |
| Für YadA-X-Neck: | | 100 µM Primer A-603Xf | 0,5 µl |
| 100 µM Primer A-591Xr | 0,5 µl | 100 µM Primer A-1134-r | 0,5 µl |
| Für YadA-X-Stalk: | | Für YadA-X-Stalk: | |
| 100 µM Primer A-1011Xr | 0,5 µl | 100 µM Primer A-1021Xf | 0,5 µl |
| Für YadA-X-Loop: | | 100 µM Primer A-1134-r | 0,5 µl |
| 100 µM Primer A-1153Xr | 0,5 µl | Für YadA-X-Loop: | |
| | | 100 µM Primer A-1134Xf | 0,5 µl |
| | | 100 µM Primer A-Sph-r | 0,5 µl |
| ClonedPfu-Polymerase | 0,25 µl | ClonedPfu-Polymerase | 0,25 µl |
| pUC-A1 (1:1000) | <u>2,5 µl</u> | pUC-A1 (1:1000) | <u>2,5 µl</u> |
| Aqua _{bidest} | ad 50 µl | Aqua _{bidest} | ad 50 µl |

Der PCR-Thermocycler wurde folgendermaßen programmiert:

| | | |
|---------------------|--------------------|-----------------|
| Start-Denaturierung | 94°C | 5 min |
| 30 Zyklen: | Denaturierung 94°C | 1 min |
| | Annealing 60°C | 2 min |
| | Elongation 72°C | 3 min |
| Nach-Elongation | 72°C | 7 min |
| Abkühlung | 4°C | bis zum Abbruch |

Die PCR-Produkte wurden danach mit dem NucleoSpin Extrakt Kit (Macherey-Nagel) gereinigt und in 30 µl des darin enthaltenen Elutionspuffers aufgenommen.

Für die anschließende Fusionsreaktion wurden jeweils 1,25 μl der beiden zusammengehörigen PCR-Produkte addiert.

Somit ergab sich folgendes Ansatz-Schema:

| | |
|-----------------------------------|---------------------|
| 10 x ClonedPfu-Puffer | 5 μl |
| 2 mM dNTP-Mix | 5 μl |
| 100 μM Primer A-Cla-f | 0,5 μl |
| Für YadA-X-Neck und YadA-X-Stalk: | |
| 100 μM Primer A-1134-r | 0,5 μl |
| Für YadA-X-Loop: | |
| 100 μM Primer A-Sph-r | 0,5 μl |
| ClonedPfu-Polymerase | 0,25 μl |
| PCR-Produkt 1 + PCR-Produkt 2 | 2,5 μl |
| Für YadA-X-Neck: | |
| Cla-591X + 603X-1134 | |
| Für YadA-X-Stalk: | |
| Cla-1011X + 1021X-1134 | |
| Für YadA-X-Loop: | |
| Cla-1153X + 1134X-Sph | |
| Aqua _{bidest} | ad 50 μl |

Der PCR-Cycler wurde wie vorher programmiert, und die resultierenden PCR-Produkte wiederum im NucleoSpin Extrakt Kit (Macherey-Nagel) in 30 μl eluiert.

a) YadA-X-Neck: Basenpaarsequenz 571-624, Aminosäuresequenz 191-208
mutierter Bereich: bp 592-603, as 198-201

3' CG GTT AAC TGT GTA GAA CGC **TAA CTC CCA GCT** CTG T^{5'} reverse Overlap-Primer A-591Xr
5' CGC CAA TTG ACA CAT CTT GCG **GCT GGC ACT AAA** GAC ACT GAT GCA GTG AAT GTC^{3'}
¹⁹¹R Q L T H L A **A/I G/E T/G K/R** D T D A V N V²⁰⁸
3' GCG GTT AAC TGT GTA GAA CGC **CGA CCG TGA TTT** CTG TGA CTA CGT CAC TTA CAG^{5'}
forward Overlap-Primer A-603Xf 5' TT GCG **ATT GAG GGT CGA** GAC ACT GAT GCA GTG AAT GT^{3'}

b) YadA-X-Stalk: Basenpaarsequenz 988-1047, Aminosäuresequenz 330-347
mutierter Bereich: bp 1012-1023, as 338-341

3' ATG TGT CTA GTA TTT AAG GTA GTT **TAA CTC CCG GCA**^{5'} reverse Overlap-Primer A-1011Xr
5' TAC ACA GAT CAT AAA TTC CAT CAA **CTT GAC AAC CGT** TTA GAT AAA CTT GAC ACA^{3'}
³³⁰Y T D H K F H Q **L/I D/E N/G R/R** L D K L D T³⁴⁷
3' ATG TGT CTA GTA TTT AAG GTA GTT **GAA CTG TTG GCA** AAT CTA TTT GAA CTG TGT^{5'}
forward Overlap-Primer A-1021Xf 5' TC CAT CAA **ATT GAG GGC CGT** TTA GAT AAA CTT GAC ACA^{3'}

c) YadA-X-Loop: Basenpaarsequenz 1117-1170, Aminosäuresequenz 373-390
mutierter Bereich: bp 1138-1149, as 380-383

3' GA CGT CCA CAG CCC CCT **TAA CTC CCA TCT** GTC C^{5'} reverse Overlap-Primer A-1153Xr
5' TTT CCT GCA GGT GTC GGG GGA **TAT CGC TCT AGT** CAG GCA TTA GCA ATT GGT TCT^{3'}
³⁷³F P A G V G G **Y/I R/E S/G S/R** Q A L A I G S³⁹⁰
3' AAA GGA CGT CCA CAG CCC CCT **ATA GCG AGA TCA** GTC CGT AAT CGT TAA CCA AGA^{5'}
forward Overlap-Primer A-1134Xf 5' G GGA **ATT GAG GGT AGA** CAG GCA TTA GCA ATT GG^{3'}

Abb. 6: Diese Abbildung zeigt jeweils den Bereich des YadA-Gens, der für die Konstruktion der drei Faktor Xa-Mutanten bedeutend war. In der Mitte ist jeweils die doppelsträngige YadA-DNA-Sequenz mit der korrespondierenden Aminosäuresequenz dazwischen dargestellt. Die beiden konstruierten Overlap-Primer sind entsprechend ihrer komplementären Basenfolge jeweils ober- und unterhalb des Sequenzabschnittes aufgeführt. Die zu mutierenden Basenpaare bzw. Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben. **Grau** markiert sind die in den Primern für die Mutation verwendeten Nukleotide und die daraus resultierende neue Aminosäuresequenz.

Abb. 7: Skizzierung der Overlap-Extension-PCR-Mutagenese-Methode:

(S.38) Zur Herstellung der erwünschten Mutation sind zwei PCRs erforderlich.

In der ersten werden unter Verwendung der mutationstragenden Overlap-Primer zwei Ansätze erstellt. Als Matritze dient dabei das *yadA*-Wildtyp-Gen auf pUC-A-1. In Ansatz 1 wird dabei mit den Primern A.1 (A-Cla-f) und einem reversen Overlap-Primer PCR-Produkt 1 synthetisiert. In Ansatz 2 wird der zu dem jeweiligen reversen Overlap-Primer passende forward Overlap-Primer mit Primer B.2 (A-1134-r bzw. A-Sph-r, siehe Text) zur Synthese von PCR-Produkt 2 zusammengeführt. In der zweiten PCR dienen diese beiden PCR-Produkt 1 und 2 als Matritze. Bei geeigneter gewählter Temperatur überlappen sie sich. Nur in diesem Overlap-Zustand kann dann mit Hilfe der Primer A.1 und B.2 die entsprechend mutierte DNA synthetisiert werden.

Matrize für die 1. PCR-Reaktion = pUC-A-1 (trägt das Wildtyp-YadA-Gen, siehe Plasmide)

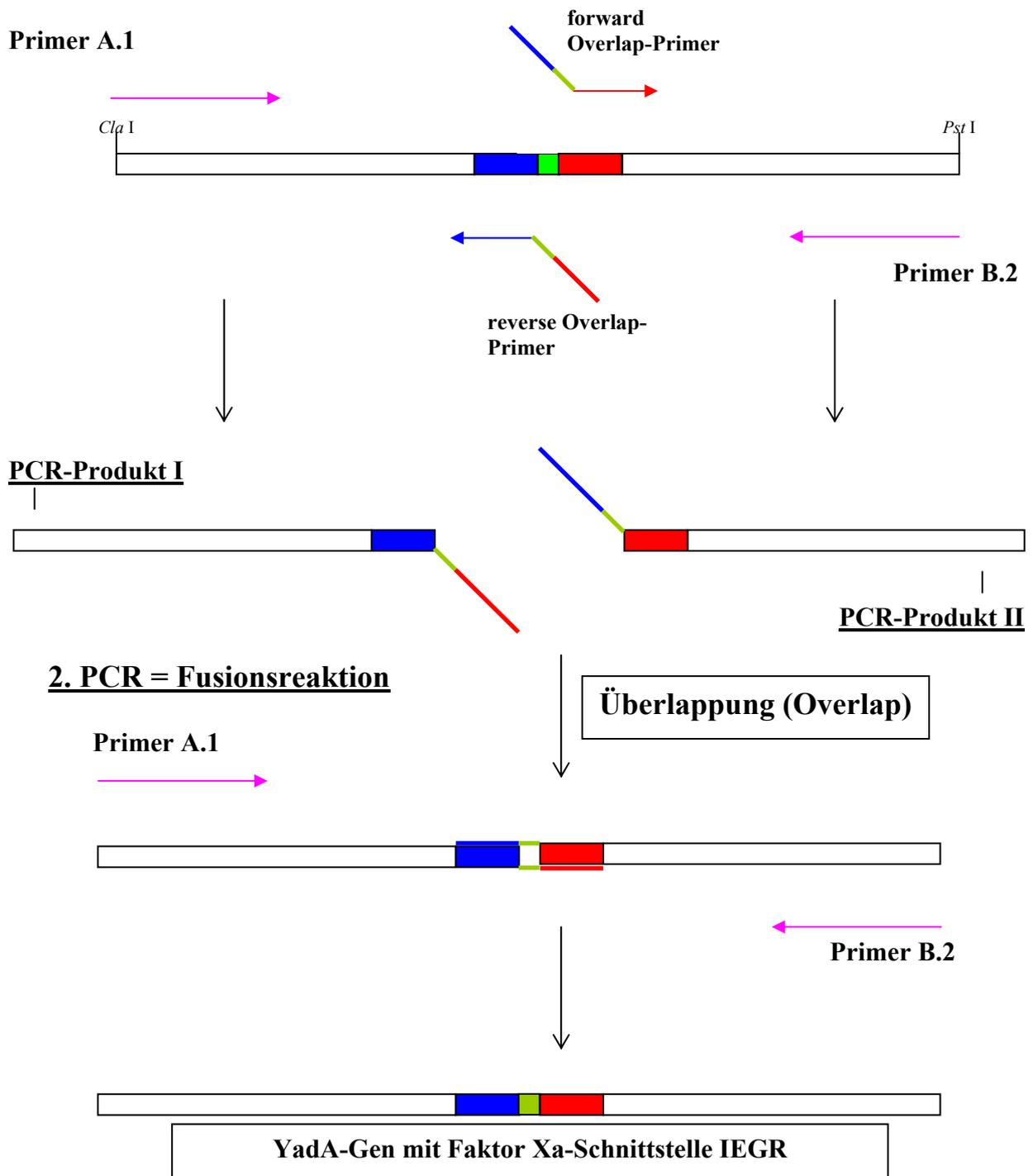
1. PCR : 2 Ansätze :

1. Primer A.1 + reverse Overlap-Primer
2. forward Overlap-Primer + Primer B.2

+ = komplementäre Bereiche

— = IEGR-Mutation

■ = die vier auszutauschenden Aminosäuren



2.2.11 Herstellung der FLAG-Oligonukleotid-Inserts

Wie auch sämtliche Primer wurden die FLAG-Oligonukleotide (mit Kodierung der FLAG-Peptidsequenz DYKDDDDK) bei der Firma metabion (Martinsried, München) bestellt, jedoch in 5'-phosphoriliertem Zustand, um sie für eine Ligation sofort einsatzbereit zu machen.

Dafür war es auch vorher nötig, die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide zu einem doppelsträngigen Molekül zusammenzuführen.

Dieses Annealing erreicht man durch folgende Prozedur:

Man löst die Oligonukleotide hochkonzentriert (10 OD₂₆₀-Einheiten/100 µl) in STE-Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA), führt sie dann in äquimolaren Mengen zusammen und erhitzt den Ansatz auf 94°C im Thermoblock. Nach 2 Minuten schaltet man den Thermoblock ab und lässt das Gemisch auf Zimmertemperatur abkühlen.

Danach hat das Annealing stattgefunden und man kann die Probe bei -20°C im Gefrierschrank bis zur Ligation aufbewahren.

2.2.12 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden für analytische und präparative Zwecke nach ihrem Molekulargewicht in Agarosegelen aufgetrennt. Dabei hing die Konzentration des Gels von der Größe der Fragmente ab.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird die entsprechende Menge an Agarose (Sigma) in TAE-Puffer (0,4M Tris, 0,2 M NaAcetat, 20 mM EDTA pH 7,4) durch kurzes Aufkochen gelöst, lässt sie auf ca. 50°C abkühlen und gießt sie in eine Flachbett-Gelelektrophoresekammer (BioRad). Nach etwa 1 Stunde wird die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt. Die zu analysierenden Proben werden mit einem zehntel Volumen DNA-Stopmix (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % Glycerin) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt mit einer Feldstärke von 10 V/cm. Danach wird das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) für 20 Minuten gefärbt. Anschließend bestrahlt man das Gel mit UV-Licht macht somit die aufgetrennten Nukleinsäuren durch das darin interkalierte Ethidiumbromid sichtbar, welches bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 254 nm oder 300 nm im sichtbaren Bereich rot-orange (590 nm) fluoresziert. Die Fragmentgrößen der einzelnen Banden können dabei anhand eines geeigneten DNA-Längenstandards (MBI

Fermentas) bestimmt werden. Die Dokumentation der Gele erfolgt mit dem Image Master Video Documentation System der Firma Pharmacia Biotech.

2.2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung aller neu klonierten Produkte erfolgte mit dem 373A DNA-Sequencer von Applied Biosystems und der entsprechenden Software 373A-Sequencer-Data-Analysis-Program. Die Proben wurden unter Verwendung der TaqDyeDideoxy-Terminationsmethode vorbereitet. Für diese Methode pipettiert man 1 µg der zu sequenzierenden DNA mit 5 pmol des passenden Primers zusammen mit dem Big-Dye-Terminator-Mix, der die Taq-Polymerase, die Deoxy-Nukleotide und die Dideoxy-Nukleotide enthält, in ein Reaktionsgefäß und stellt den Ansatz für 25 Zyklen (96°C: 10 sec, 55°C: 15 sec, 60°C: 4 min) in den PCR-Thermocycler. Das dadurch synthetisierte Oligonukleotid-Gemisch präzipitiert man daraufhin mit 50 µl 96%-igem Ethanol und 2 µl 3 M NaAcetat, pH 4,6 für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgt ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 15°C und 14000 rpm in der Tischzentrifuge, das Abpipettieren des Überstandes, die Zugabe von 400 µl 70%-igem eiskaltem Ethanol zur Reinigung und eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 14000 rpm. Danach kippt man den Alkohol ab und lässt die nun sequenzierbereiten Proben bei Raumtemperatur trocknen.

2.2.14 DNA-Konstruktion von *YadA*-Mutanten und *FimH*-*YadA*-Hybriden mit dem Multicopy-Plasmid pUC-A-1 in *E. coli* DH5α

Die verschiedenen Mutationen im *yadA* Gen wurden weitgehend nach einem einheitlichen System durchgeführt. Dabei verwendete man für die Klonierungen den *E. coli* Stamm DH5α mit dem Multicopy-Plasmid pUC-A-1 als Vektor, das die komplette 1266 Basenpaare umfassende Gensequenz des Adhäsins-Wildtyps mit angrenzenden Bereichen als ein 5-kb großes *EcoRI*-*HindIII*-Fragment (aus dem Ursprungsvektor pYVO:8) enthält. In diesem Fragment liegen 150 bp bzw. 167 bp vor dem *yadA* Gen nah nebeneinander zwei *ClaI*-Schnittstellen (Basenpaarpositionen (BPP) 177 und 194, GenBank accession no. X13881) und 569 bp hinter dem *yadA* Stopcodon eine *SphI*-Site (BPP 2185). Somit ist es möglich, mit Hilfe der beiden Restriktionsenzyme *ClaI* und *SphI* das gesamte *yadA* Gen aus seinem Vektor pUC-A-1 herauszuschneiden, und den übriggebliebenen Rest des Vektors als Backbone für sämtliche Klonierungen zu verwenden. Die verschiedenen *YadA*-Gen-Konstrukte werden nun

in Form zweier separater PCR-Fragmente in diesen Backbone eingebracht. Dafür müssen diese zuerst in PCRs mit Hilfe geeigneter Primerpaare (siehe S. 20-21), die speziell für die gewünschten Mutationen erstellt wurden, mit *YadA*-Wildtyp-DNA als Matrize synthetisiert werden. Von den beiden PCR-Produkten ist jeweils eines ein *ClaI-SacI*-Fragment und das andere ein *SacI-SphI*-Fragment. Zur bildlichen Darstellung des Verfahrens siehe Abb.8.

Die Kombination aus den beiden Fragmenten ergibt dann jeweils die gewünschte *yadA*-Mutation. Abb.10 auf Seite 57 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit erstellten Gen-Konstrukte.

So musste sich das *ClaI-SacI*-PCR-Produkt zum Erstellen der kopflosen A-H- und der A-HNS-Mutanten immer von BPP 195 bis 438 erstrecken, so dass es von *yadA* nur die Signalsequenz beinhaltete. Somit wurde dieses Fragment mit dem Primerpaar A-Cla-f + A-87-r erstellt. Je nach beabsichtigter Deletion wurde dieses PCR-Produkt nun mit einem unterschiedlich langen *SacI-SphI*-Fragment kombiniert. Dafür wurde der obere Primer variiert (A-565-f für A-H, A-733-f für A-HNS1, A-778-f für A-HNS2, A-868-f für A-HNS3, A-991-f für A-HNS4 und A-1057-f für A-HNS5) und der untere Primer A-Sph-r konstant gehalten.

Die A-S-Mutanten entsprechen den A-HNS-Mutanten mit jeweils aufgesetzter *YadA*-Head-Neck-Region. Für ihre Konstruktion musste darum lediglich das *ClaI-SacI*-Fragment verändert werden, so dass es nicht nur die Signalsequenz, sondern zusätzlich die gesamte *YadA*-Head-Neck-Region kodierte. Folglich wählte man dafür das Primerpaar A-Cla-f + A-684-r aus, damit sich dieses Fragment von BPP 195 bis 1035 erstreckte. Die fünf *SacI-SphI*-Fragmente von der Konstruktion der A-HNS-Mutanten konnten dabei wiederverwendet werden.

Um die A-N-Mutante zu erstellen, bei der in *yadA* nur die Neck-Region fehlen sollte, wurde mit dem Primerpaar A-Cla-f + A-567-r ein *ClaI-SacI*-Produkt hergestellt, dass von BPP 195 bis 918 reichte. Das *SacI-SphI*-Fragment, welches sich dafür von BPP 997 bis 2185 erstrecken musste, synthetisierte man mit dem Primerpaar A-646-f + A-Sph-r.

Die Deletion der drei 7mere in dem A-L1-Konstrukt wurde mit Hilfe des Primerpaares A-Cla-f + A-990-r für die Erstellung des *ClaI-SacI*-Fragments (BPP 195 bis 1341) und mit A-1057-f + A-Sph-r zur Produktion des *SacI-SphI*-Fragments (BPP 1408 bis 2185) bewerkstelligt.

Zur Herstellung der Mutante A-L2 mit fehlender Linking-Region bediente man sich der Primer A-Cla-f + A-1056-r für das *ClaI-SacI*-Produkt (BPP 195 bis 1407) und A-1108-f + A-Sph-r zur Synthese des von BPP 1459 bis 2108 laufenden *SacI-SphI*-Fragments.

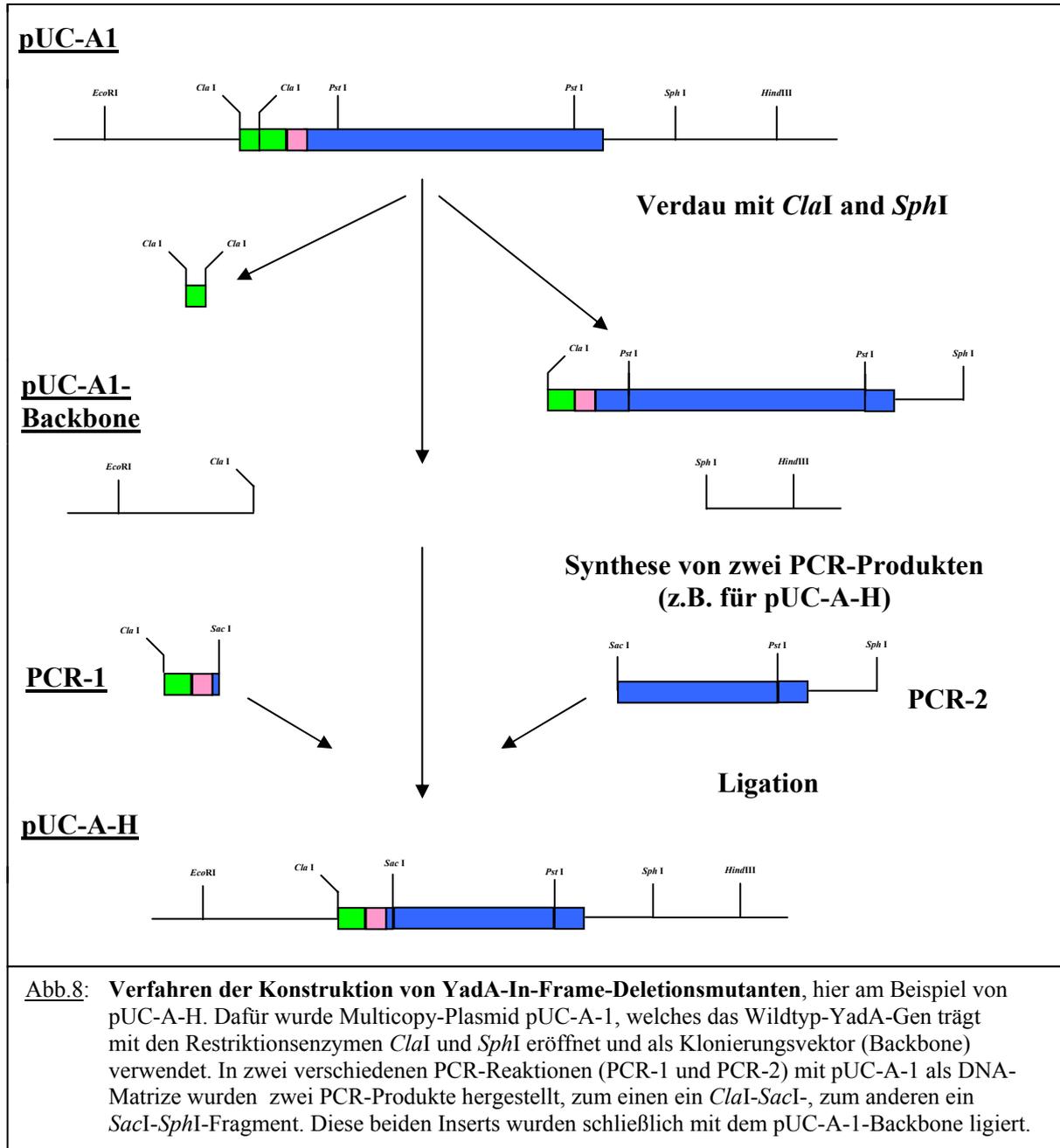


Abb.8: Verfahren der Konstruktion von YadA-In-Frame-Deletionsmutanten, hier am Beispiel von pUC-A-H. Dafür wurde Multicopy-Plasmid pUC-A-1, welches das Wildtyp-YadA-Gen trägt mit den Restriktionsenzymen *Cla*I und *Sph*I eröffnet und als Klonierungsvektor (Backbone) verwendet. In zwei verschiedenen PCR-Reaktionen (PCR-1 und PCR-2) mit pUC-A-1 als DNA-Matrize wurden zwei PCR-Produkte hergestellt, zum einen ein *Cla*I-*Sac*I-, zum anderen ein *Sac*I-*Sph*I-Fragment. Diese beiden Inserts wurden schließlich mit dem pUC-A-1-Backbone ligiert.

Für die Klonierung der drei YadA-Mutanten mit eingebauter Faktor Xa-Schnittstelle wurde im Fall von A-X-Loop ebenfalls ein mit *ClaI* und *SphI* verdauter pUC-A1-Vektor als Backbone verwendet. Eine Ausnahme stellten A-X-Neck und A-X-Stalk dar, bei denen anstelle der *SphI*-Schnittstelle die noch im *yadA*-Gen liegende *PstI*-Schnittstelle an BPP 1485 verwendet wurde. Die PCR-Produkte für die drei Faktor Xa-Mutanten wurden wie bereits beschrieben mit einer speziellen PCR-Mutagenese-Technik synthetisiert (Overlap-Extension-PCR). Dabei ergab sich jeweils ein von der *ClaI*-Position bis zur *SphI*- bzw. *PstI*-Position reichendes PCR-Fragment, so dass diese Klonierung mit nur einem Insert zu erfolgen hatte.

Als Genträger für die FimH-PCR wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet. Das *fimH*-Gen besteht aus 900 bp, von denen die ersten 69 bp die Signalsequenz, bp 70 bis 537 die Lektin-Domäne und bp 538 bis 900 die Pilin-Domäne kodieren (GenBank accession no. X05672.1). Dabei erfolgte die Klonierung der FimH-YadA-Hybridkonstrukte mit nur einem PCR-Insert. Man bediente sich des kopflosen YadA-Konstrukt-Vektors pUC-A-H und eröffnete ihn an seiner *SacI*-Schnittstelle. Ein *SacI*-*SacI*-Produkt wurde mit den Primern Fim-3-f und Fim-158-r synthetisiert und dann mit dem in *SacI* eröffneten Vektor pUC-A-H ligiert. Ebenso verfuhr man mit einem zweiten *SacI*-*SacI*-Produkt aus den Primern Fim-3-f und Fim-217-r.

2.2.15 Transfer der YadA-Mutanten von *E. coli* DH5 α über *E. coli* SM10 λ pir in *Y. enterocolitica* und Konstruktion zusätzlicher Mutanten in *E. coli* SM10 λ pir

Zur Expression der verschiedenen YadA-Mutanten in *Y. enterocolitica* mussten alle Konstrukte von dem Multicopy-Plasmid pUC-A-1 in den Suizidvektor pGP704 überführt werden, da letzterer die Fähigkeit besitzt, sich bei einer Konjugation in das Yersinien-Virulenzplasmid pYVO:8 zu integrieren. Von einem Suizidvektor spricht man, wenn ein Vektor sich nur unter bestimmten Bedingungen in einem Bakterium halten kann. So benötigt dafür pGP704 einen Träger, der das *pir*-Gen besitzt. In dieser Arbeit wurde dieser Vektor darum in *E. coli* SM10 λ pir gehalten und vermehrt. Weiterhin ist pGP704 ein mobilisierbares Plasmid, da es eine *mob*-Site enthält. Jedoch ist es selbst nicht konjugierbar, da ihm die dafür benötigten *tra*-Gene fehlen (siehe Konjugation). In SM10 λ pir sind allerdings auch diese Gene chromosomal enthalten. Wird nun also das Plasmid pGP704 in ein Bakterium ohne *pir*-Gen mit Hilfe von SM10 λ pir transferiert, verliert es dort seine Ringform und kann nicht weiter repliziert werden. Allerdings besteht nun die Möglichkeit, dass sich bei evtl. vorhandenen homologen Gensequenzen die DNA des Suizidvektors in die des Rezipienten integriert.

Dieses Phänomen wurde bei der Überführung der YadA-Genkonstrukte von *E. coli* in *Y. enterocolitica* ausgenutzt.

Zuerst mussten dafür die auf pUC-Multicopy-Plasmiden liegenden mutierten YadA-Gene mit *EcoRI* und *SphI* herausgeschnitten und mit einem pGP704-Backbone verbunden werden, der mit den selben Restriktionsenzymen eröffnet wurde. Um eine zusätzliche Antibiotika-Selektionsmöglichkeit zu erhalten, wurde in die *EcoRI*-Site von pGP704 ein 1,8 kb großes Sm^r Spc^r Ω -Fragment einkloniert. Ein mit dieser Spectinomycin-Resistenz ausgestatteter Suizidvektor wurde als pGPS704 bezeichnet und folglich die nach der Ligation entstandenen Konstrukte als pGPS-A-H, pGPS-A-HNS1 bis -HNS-5, pGPS-A-S1 bis -S4, pGPS-A-N, pGPS-A-L1, pGPS-A-L2, pGPS-A-X-Neck, pGPS-A-X-Stalk, pGPS-A-X-Loop, pGPS-A-FimH158 und pGPS-A-FimH217.

Mit Hilfe einiger dieser Suizidvektor-Konstrukte wurden noch weitere YadA-Mutationen erstellt. Die Neck-Domäne wurde auf die verkürzten YadA-Stiele der Mutanten pGPS-A-HNS1 bis -HNS4 gesetzt. Dazu wurde in einer PCR mit pUC-A-H-DNA als Matrize ein *Clal-SacI*-Fragment mit den Primern A-Clal-f und A-684-r synthetisiert, das in jeden der mit *Clal* und *SacI* aufgeschnittenen Suizidvektoren pGPS-A-HNS1 bis -HNS4 einkloniert wurde. Die dabei entstandenen Mutanten wurden folglich pGPS-A-N1 bis -N4 benannt.

Weiterhin wurde das beidseits mit *SacI* endende FLAG-Oligonukleotid in die Plasmide pGPS-A-HNS-2 bis -HNS-5 ligiert, die vorher mit *SacI* eröffnet und mit CIAP dephosphoryliert (siehe „Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA“) worden waren.

2.2.16 Isolation von bakteriellen Außenmembranproteinen

Das Yersinia-Adhäsins A wird bei 37°C auf der Außenmembran von *Y. enterocolitica* exprimiert. Um YadA zu konzentrieren und störende Innenmembran- und Debrisproteine zu entfernen, hat sich eine Präparation der äußeren Zellmembran der Yersinien als hilfreich erwiesen. Dabei werden durch physikalische und chemische Trennschritte die Außenmembranen und aus diesen wiederum die Außenmembranproteine (outer membrane proteins, OMPs) isoliert. Man setzt die pelletierten Bakterien einer milden Zellwanddestruktion mit Lysozym aus, welches die Stäbchenform vermittelnde Murein angreift. Zusätzlich destabilisiert man die bakteriellen Zellmembranen mit EDTA und Sucrose, von denen ersteres die in der Membran enthaltenen Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen entzieht und sie damit brüchiger macht, und letzteres eine Hyperosmolarität bewirkt, die den Yersinien Flüssigkeit entzieht. Das Zusammenwirken dieser drei Reagenzien lässt die Bakterien zu

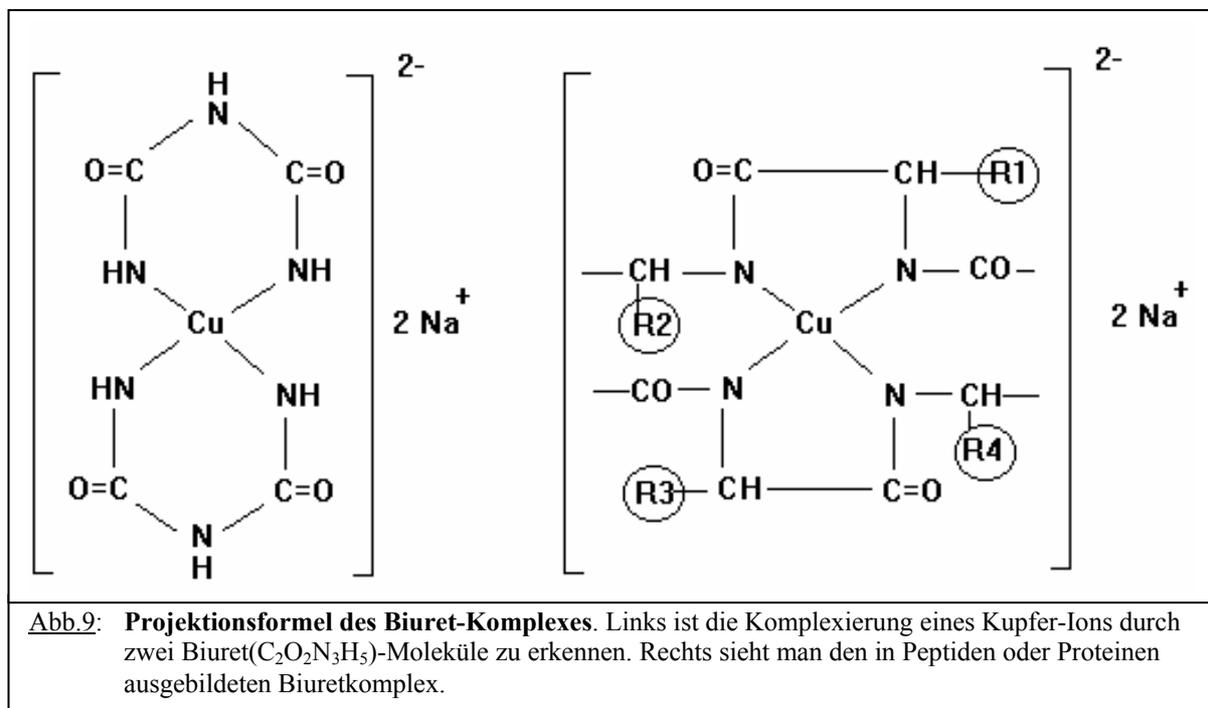
kugelförmigen und instabilen Sphärozyten schrumpfen, welche leicht durch Ultraschall zerkleinert werden können. Drei Zentrifugationsschritte führen dann zu einer reinen Außenmembranpräparation. Mit dem ersten zentrifugiert man langsam sämtlichen Zelldebris ab. Der Überstand wird eine Stunde lang ultrazentrifugiert. Das dabei entstehende Pellet entspricht der Gesamtmembran. Davon entfernt man die lipidreiche Innenmembran durch Zugabe des Detergens Triton X-100 und fällt die Außenmembran durch Zusatz von $MgCl_2$ aus, so dass diese nach einer weiteren Ultrazentrifugation am Boden des Probengefäßes ein Pellet bildet. Dieses kann dann in Aqua_{bidest} resuspendiert und nach Bestimmung des Proteingehalts in einer SDS-PAGE aufgetrennt werden.

Zur Isolierung der Außenmembran von *Y. enterocolitica* wird eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes über Nacht in 1 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika-Schema bei 27°C angezchtet. Am nächsten Morgen setzt man die Hauptkultur im Verhältnis 1:40 in RPMI-Medium an und lässt sie für 6 Stunden bei 37°C unter starkem Schwenken anwachsen. Daraufhin werden die Bakterien 15 Minuten bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 50 mM Tris-1mM $MgCl_2$ -Lösung zweimal gewaschen und danach auf Eis in 0,5 ml 200 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Lyse-Puffer, 100 µl Lysozym-Lösung und 3,2 ml Aqua_{bidest} lässt man den Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Bei der darauf folgenden Ultraschallbehandlung wird das Lysat 4 mal 45 Sekunden lang unter Eiskühlung beschallt. Zwischen jeder Beschallung erfolgt eine Kühlpause von 15 Sekunden. Danach zentrifugiert man die Probe für 30 Minuten bei 3000 rpm und 4°C. Man verwirft das Pellet, welches bakteriellen Debris enthält und führt den Überstand in frische Eppendorf-Gefäßchen. Diese werden in der Ultrazentrifuge (UZ) für 45 Minuten bei 19000 rpm und 4°C belassen. Das danach entstandene Sediment entspricht der Gesamtmembran des Yersinien-Stammes. Diese kann nun in 200 µl Aqua_{bidest} resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt werden, oder man behandelt sie zur Trennung von Außen- und Innenmembran sofort weiter. Dafür resuspendiert man das Pellet in 5 ml Extraktionspuffer und inkubiert den Ansatz 20 Minuten bei Raumtemperatur unter mehrfachem Schwenken. Danach folgt eine weitere 45-minütige Ultrazentrifugation bei 19000 rpm und 4°C, wodurch die Außenmembran sedimentiert wird. Zweimaliges Waschen des Pellets mit jeweils 5 ml Aqua_{bidest} für je 30 Minuten in der UZ (19000 rpm, 4°C) führt zu einer besonders reinen Präparation, die danach in 200 µl Aqua_{bidest} aufgenommen werden kann. Danach folgt die Bestimmung der in der Suspension enthaltenen Proteinkonzentration mit Hilfe der Methode von Lowry (s.u.) und eine Kontroll-SDS-PAGE mit je 5 µg Protein pro Spur.

2.2.17 Proteinmengenbestimmung nach Lowry

Um die Proteinkonzentration in den Außenmembranpräparationen der YadA-Varianten tragenden Yersinien zu bestimmen, wurde eine modifizierte Form der 1951 von Lowry, Rosebrough, Farr und Randall etablierte Methode verwendet (Markwell et al., 1978).

Grundsätzlich ermöglicht Lowrys Protokoll eine einfache und zuverlässige Bestimmung der Konzentration löslicher sowie unlöslicher Proteine. Dabei gehen die Proteine zunächst mit einem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz eine Verbindung ein, die dem Biuret-Komplex ähnelt (siehe Abb.9).



Im darauf folgenden Reaktionsschritt reduzieren die mit dem Cu^{2+} komplexierten Proteine das Folin-Ciocalteu-Reagenz. Dabei wird das im Folin-Reagenz enthaltene Wolframat und Molybdat, welches in Form von Heteropolyphosphorsäuren vorliegt, durch den Kupfer-Protein-Komplex von der Wertigkeitsstufe VI zur Wertigkeitsstufe IV reduziert. Es entstehen Mischoxide zwischen jeweils VI- und IV-wertigem Molybdän (Molybdänblau-Reaktion) bzw. Wolfram. Die Reduktion des Folin-Reagenzes erfolgt, nachdem vermutlich Cu^{2+} im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu^+ reduziert wird. Zusätzlich reduzieren die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan das Folin-Reagenz direkt ohne vorherige Komplexbildung mit dem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz. Die Reduktion führt im Folin-Reagenz zu einem Farbumschlag von gelb nach blau. Die resultierende Blaufärbung wird zur

quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt. Dazu wird für mehrere Proben mit bekannter Proteinkonzentration die Extinktion des blauen Farbstoffs ermittelt, der bei der Reaktion mit dem Folin-Reagenz entsteht.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt:

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

E_{λ} - Extinktion bei der Wellenlänge λ

ϵ_{λ} - molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

c - Konzentration

d - Schichtdicke

Die gemessene Extinktion kann somit als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt und der molare Extinktionskoeffizient aus dem Anstieg der resultierenden Geraden ermittelt werden. Unter Verwendung des so erhaltenen molaren Extinktionskoeffizienten lässt sich nun für eine beliebige Proteinprobe wiederum unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration bestimmen.

Da die Proteinbestimmung nach Lowry durch Tris, Ammoniumsulfat, EDTA, Saccharose, Citrat und Phenole verfälscht werden kann, wurde in dieser Arbeit eine modifizierte Version verwendet (Markwell et al., 1978). Dabei wird in das alkalische Cu^{2+} -Reagenz zusätzlich Natriumdodecylsulfat (SDS) gegeben und die Gesamtmenge an Kupfer-Tartrat-Reagenz erhöht. Diese Änderungen ermöglichen nicht nur, die Membranpräparationen trotz darin enthaltener Saccharose und EDTA zu analysieren, sondern erübrigen auch eine normalerweise vorher notwendige Solubilisation oder Lipid-Extraktion.

Folgende Reagenzien werden für den Versuch benötigt:

Reagenz A: 2 % Na_2CO_3
0,4 % NaOH
0,16 % KNaTartrat
1 % SDS

Reagenz C: 100 ml Reagenz A
1 ml Reagenz B
(kurz vor Gebrauch mischen)

Reagenz B: 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

50 %-Folin-Reagenz in H_2O

Zur Proteinbestimmung werden 10 mg Rinderserumalbumin (BSA) in 100 ml Aqua_{dest} gelöst, um eine Albumin-Stammlösung in einer Konzentration von 100 µg/ml zu erhalten.

Folgende Verdünnungsreihe wird davon in Reagenzgläsern vorbereitet (jeweils 1 ml), um eine Eichproteinlösung zu erhalten: 10 µg/ml – 20 µg/ml – 30 µg/ml – 50 µg/ml – 90 µg/ml.

Zusätzlich wird noch ein Reagenzglas mit 1 ml H₂O zur Bestimmung des Leerwertes befüllt.

Es folgen dann die eigentlichen Membranpräparationsproben, von denen jeweils 20 µl in 980 µl H₂O verdünnt werden.

Grundsätzlich werden immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zu allen Ansätzen pipettiert man nun jeweils 3 ml von Reagenz C, mischt gründlich und wartet 10 min bei Raumtemperatur. Danach addiert man zu jeder Probe 300 µl einer 50%-igen Folin-Lösung, mischt durch kräftiges Schütteln und wartet 45 min bei Raumtemperatur. Danach wird die Extinktion des gebildeten blauen Farbstoffs bei 750 nm am Absorptionsspektralphotometer gemessen. Man trägt die ermittelten Extinktionen als Funktion der Konzentration der Eichproteinlösungen auf und bestimmt den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{λ} . Mit diesem kann man nun die Proteinkonzentration der Membranproteine nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnen.

2.2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli beschrieb 1970 die Methode, Proteine in einem diskontinuierlichen Puffersystem entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Voraussetzung dafür ist eine vollständige Denaturierung und Ladungsangleichung der Proteine. Während die Denaturierung durch ein zehnmütiges Aufkochen der Substrate und durch Einwirkung von beta-Mercaptoethanol zur Spaltung von Protein-Disulfidbrücken bewirkt wird, erreicht man die Gleichschaltung der Proteinladungen durch Inkubation mit Natriumdodecylsulfat, kurz SDS, welches die Eigenladungen der Proteine mit seiner negativen Ladung überdeckt.

Die so behandelten Proben können nun auf ein Gel aufgetragen werden, in dem die Proteine unter einer Stromstärke von 15 mA nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Um schärfere und deutlichere Banden zu erhalten, hat es sich bewährt, zwei unterschiedliche Gele zu kombinieren. So gießt man in einer vertikalen Kammer zuerst das etwa 6 cm hohe Trenngel, welches als das eigentliche Laufgel zu betrachten ist und danach darauf ein 1 cm hohes Sammelgel, in welches der Gelkamm mit seinen Zähnen eingebracht wird. In die dabei entstandenen Vertiefungen werden nun die Proteinproben, aufgenommen in Stopmix mit Bromphenolblau und beta-Mercaptoethanol, einpipettiert. Die Bromphenolblau-Front macht

den Lauf der Banden zur Anode hin sichtbar. Als Marker verwendet man einen Proteinmix mit fest definierten Molekulargewichten im Bereich von 14 bis 97 kDa. Das Gel läuft dabei in einem diskontinuierlichen Puffersystem, einem Tris-Glycin-Puffer. Der Gellauf ist beendet, wenn die Farbfront das untere Ende des Gels erreicht hat, was bei 15 mA etwa 90 bis 120 Minuten dauert.

Nun besteht grundsätzlich die Möglichkeit, sämtliche im Gel vorhandenen Proteine in einer Coomassie-Färbung darzustellen, oder anhand eines Immunoblots gezielt bestimmte Proteine mit einem gegen sie gerichteten Antikörper enzymatisch sichtbar zu machen.

2.2.19 Coomassie-Färbung eines Proteingels

Um alle sichtbaren Proteinbanden im Gel anzufärben, inkubiert man es für 30 Minuten in der tiefblauen Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln und entfärbt es dann für 15 Minuten mit Destain-Puffer. Danach kann man das Gel fotografieren und bei Wunsch getrocknet aufbewahren.

2.2.20 Immunoblot/Westernblot eines Proteingels

Zur selektiven Darstellung bestimmter Proteine aus einem Gemisch hat sich der Immunoblot, auch bekannt als Westernblot, bewährt. Mit dieser Methode stellt man Proteine mit Hilfe von gegen ihre Epitope gerichteten Antikörpern dar. Dabei ist es von der Vorgehensweise her gleichgültig, ob man sich für ein polyklonales Gemisch aus verschiedenen Antikörpern entscheidet oder für ein monoklonales, in dem nur ein ganz bestimmter Typ enthalten ist.

Um die Proteine von dem Gel auf einen festen Trägerstoff zu überführen, legt man nach einer abgeschlossenen SDS-PAGE das Proteingel luftblasenfrei auf eine Nitrozellulose-Membran (BA85; Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland). Dies erreicht man am besten, indem man ein wenig Westernblot-Pufferlösung darauf kippt, und danach versucht, eventuell entstehende Luftblasen seitlich wegzudrücken. Das Gel auf der Membran wird in ein Kunststoffmodul mit Schaumstoff und Pappe in folgender Reihenfolge eingespannt:

Anodenseite des Kunststoffs
Schaumstoff
Whatman-Pappe
Nitrozellulose-Membran
Proteingel
Whatman-Pappe
Schaumstoff
Kathodenseite des Kunststoffs

Zusammen mit einem Kühlaggregat erfolgt nun in einer mit Westernblot-Puffer gefüllten vertikalen Kammer die Elektrophorese bei 0,3 A für 1 Stunde.

Danach entfernt man das Gel von der Nitrozellulose und reinigt sämtliche Materialien für zukünftige Verwendungen gründlich. Von der Nitrozellulose schneidet man den Streifen ab, auf dem das Marker-Proteingemisch gelaufen ist und färbt diesen sofort mit Amidoschwarz (0,8 % w/v in 10 % Essigsäure, 5 % Methanol) ein. Damit hat man sofort die Kontrolle, ob die Proteine effizient auf die Nitrozellulose übertragen wurden. Den Rest der Membran blockiert man nun über Nacht bei 4 °C in 20 % fetalem Kälberserum (FKS) mit 0,5 % Tween20 in PBS, um zu verhindern, dass später unspezifische Bindungen der Antikörper entstehen.

Am nächsten Morgen wird dann das FKS abgekippt und die Nitrozellulose dreimal 10 Minuten mit PBS-Tween unter leichtem Schütteln gewaschen.

Danach gießt man den spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper für das gesuchte Protein, in diesem Fall gegen YadA, in einer Verdünnung von 1:1000 in 10 ml PBS-Tween auf die Membran und lässt ihn unter Schütteln 90 Minuten lang einwirken. Für die Darstellung des gesamten YadA wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper wie P10:8 und das 70er Serum verwendet, für die Untersuchung bestimmter Regionen des Proteins monoklonale Maus-Antikörper wie 8D1, 9A6, 9H7 oder 9H11 mit bekannten Epitopen.

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wäscht man die Nitrozellulose erneut dreimal für jeweils 10 Minuten und gibt dann in einer Verdünnung von 1:5000 den zweiten Antikörper, einen Detektions-Antikörper, wiederum in 10 ml PBS-Tween verdünnt, für 60 Minuten darauf. Dieser ist ein kommerziell (Sigma) erhältlicher Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (für polyklonale Erstantikörper) bzw. Anti-Maus-IgG-Antikörper (für monoklonale Erstantikörper), der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, einem Enzym, das eine Farbstoffreaktion auslösen kann. Er bindet an den Fc-Teil des Erstantikörpers und kann nun dessen Bindungsort gezielt nachweisen. Noch einmal folgt ein dreimaliger Waschgang, der dann in der Entwicklung des Blots mit der Färbelösung endet. In der Färbereaktion wandelt die alkalische Phosphatase des zweiten Antikörpers das Nitroblautetrazolium in das rote Diformazan und das 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in ein blaues Produkt um, so dass sich die Antikörper-Antikörper-Protein-Komplexe als violette Banden auf der Nitrozellulose-Membran darstellen.

Die Reaktion wird erst dann mit Leitungswasser gestoppt, wenn die Proteinbanden deutlich sichtbar sind.

2.2.21 Faktor Xa-Verdau

Die bei 37°C hochspezifische Serinprotease Faktor Xa spaltet Proteinsequenzen nach der Aminosäureabfolge IEGR. Um YadA-Moleküle auf der Außenmembran von *Y. enterocolitica* mit Hilfe dieser Protease in bestimmten Bereichen des Proteins zu durchtrennen, und die abgetrennten Molekülteile weiter untersuchen zu können, wurden mit Hilfe von „site-directed mutagenesis“ (OE-PCR, siehe vorher) Faktor Xa-Schnittstellen in YadA eingebaut. Die Inkubation der „YadA-X“-exprimierenden Bakterien mit Faktor Xa erfolgte für 4 Stunden in einem speziellen Faktor Xa-Puffer bei 37°C. Von jedem Ansatz wurde zusätzlich eine Negativkontrolle ohne Faktor Xa unter gleichen Bedingungen angesetzt. Danach wurden Puffer-Überstand und Bakterien-Sediment voneinander getrennt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit geeigneten Antikörpern im Westernblot inkubiert.

2.2.22 Immunfluoreszenztests

Um festzustellen, ob die unterschiedlichen YadA-Konstrukte auf der Oberfläche der Yersinien exprimiert werden, ist die Fluoreszenzmikroskopie eine geeignete Methode. Man inkubiert dafür die Bakterien mit einem geeigneten YadA-Antikörper, den man dann mit einem kommerziell erhältlichen, an Fluoreszein gekoppelten Detektionsantikörper nachweist. Gründliches Waschen des Präparates entfernt alle nicht adhärenen Antikörper, so dass man das Vorhandensein von YadA auf der Oberfläche einer Yersinie durch das grüne Fluoreszieren des Zweitantikörpers indirekt im Mikroskop darstellen kann.

Für diesen Versuch lässt man jeweils eine Kolonie der zu untersuchenden Yersinien-Stämme für 6 Stunden bei 37°C unter dem geeigneten Antibiotika-Schema in 1 ml BHI-Medium anwachsen. Danach folgt ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm und 4°C. Das Pellet wird in PBS-0,1%-Tween20-Lösung gewaschen und genau wie vorher abzentrifugiert. Danach resuspendiert man das Bakterien-Sediment in 50 µl einer 1:300 Verdünnung des YadA-Antikörpers (8D1 oder a-FLAG Mab (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)) und inkubiert den Ansatz für 30 Minuten bei 37°C. Es folgt dreimaliges Waschen mit PBS-0,1%-Tween20-Lösung und Zentrifugieren. Nun wird das Pellet in 50 µl einer 1:50 Verdünnung des (FITC)-konjugierten Anti-Maus-Immunglobulins (Sigma-Aldrich) aufgenommen und weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Wiederum wird danach dreimal gewaschen und zentrifugiert. Schließlich wird jedes Bakterien-Pellet in 200 µl PBS gelöst und 1 µl dieser Suspension auf einen Objektträger pipettiert. Man lässt den Tropfen eintrocknen und fixiert

das Präparat für 10 Minuten in eiskaltem Methanol. Nun können die Bakterien im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht und ausgewertet werden.

2.2.23 ELISA zum Nachweis der Kollagenbindung von Yersinien

Der ELISA, kurz für „enzyme-linked immunosorbent assay“, ist grundsätzlich ein Test, bei dem ein Antigen oder Antikörper mit einem Enzym verkoppelt ist, um eine Kompatibilität von Antigen und Antikörper nachzuweisen.

In dieser Arbeit wurde ein mit einem Enzym gekoppelter Antikörper zum Nachweis eines Yersinien-Antikörpers verwendet. Der Test wird positiv, wenn eine enzymatische Farbstoffreaktion erfolgt, was bedeutet, dass einerseits der Yersinien-Antikörper an den Bakterien haftet, und andererseits die Yersinien trotz der wiederholten Waschvorgänge an mit Kollagen besetzten Mikrotiterplatten hängen bleiben. Somit markiert das Verfahren nur Yersinien, die eine Adhäsionsfähigkeit an Kollagen besitzen.

Bei dem Versuch werden zuerst 96-Well-Platten des Typs Microlon 600 der Firma Greiner (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) mit je 50 µl unterschiedlich konzentrierter Kollagen-Typ II-Lösungen (z.B. 20 µg Kollagen Typ II pro ml PBS) 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert und danach ausgekippt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Mikrotiterplatten zu verhindern, folgt darauf eine einstündige Blockade mit je 200 µl einer 0,5%-igen Rinderserumalbumin(BSA)-PBS-Lösung pro Well bei 37°C. Danach wird jeder Ansatz fünfmal mit je 200 µl einer 0,1%-igen Tween20-PBS-Lösung gewaschen.

Es folgt die einstündige Inkubation der Wells bei 37°C mit den zuvor 20 Minuten bei 60°C inaktivierten unterschiedlichen Yersinien-Stämmen, die in einer 0,01%-igen Natriumazid-PBS-Lösung bei einer OD₆₀₀ von 0,5 vorbereitet wurden. Anschließend werden die Ansätze wiederum fünfmal gewaschen.

Der Yersinien-Antikörper Anti-WA-C, gewonnen aus Kaninchen-Serum, wird 1:10000 in PBS verdünnt und auf jeden Ansatz pipettiert. Eine Inkubation der so beimpften Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C hat sich bewährt.

Nach einem erneuten fünfmaligen Waschgang am nächsten Morgen folgt die Beimpfung der einzelnen Wells mit je 50 µl einer 1:5000-Verdünnung des Detektionsantikörpers, eines Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers von der Ziege, der an eine Peroxidase als enzymatischem Reaktionspartner gekoppelt ist, und wiederum eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C.

Wiederum werden die Ansätze fünfmal gewaschen und danach die enzymatische Farbstoffreaktion durch Zugabe von je 100 µl einer pNPP-Lösung gestartet. Bis zur deutlich

sichtbaren Gelbfärbung wird die Mikrotiterplatte bei 37°C inkubiert. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von jeweils 100 µl einer 0,5N NaOH-Lösung gestoppt.

Die Absorption der einzelnen Proben wird daraufhin im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen eine ohne den ersten Antikörper verarbeitete Probe ermittelt.

2.2.24 Antikörperagglutinations- und Autoagglutinationstest

Um die YadA-Mutanten auf der Oberfläche von *E. coli* und Yersinien nachzuweisen, macht man sich das Phänomen der Agglutination der Bakterien bei Zugabe von Anti-YadA-Serum zunutze (Sory et al., 1990). Ebenso ist die Feststellung der Autoagglutination der Erreger ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein von YadA auf der Außenmembran (Skurnik et al., 1984).

Die verschiedenen Stämme werden über Nacht auf Blutagarplatten bei 27°C angezüchtet und anschließend 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Jeweils eine Kolonie wird entnommen, auf zwei Objektträger verteilt und einerseits mit 10 µl NaCl-Lösung zum Nachweis der Autoagglutination, andererseits mit 10 µl Anti-YadA-Kaninchenserum Anti-P108 zum Nachweis der Antikörperagglutination verrieben. Dabei erkennt man das Auftreten von Agglutination als eine mit bloßem Auge erkennbare Bildung kleiner scholliger Aggregate in einer vorher homogenen Bakteriensuspension. Die Bewertung erfolgt durch drei unabhängige Untersucher. Als Positivkontrolle dient WA-314, als Negativkontrolle WA-C.

2.2.25 Hefezellagglutinationstest

Die Yersinien-Stämme mit den FimH-YadA-Hybridkonstrukten wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit Hefezellen zu agglutinieren. Dafür wurde kommerziell erhältliche Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in PBS gelöst. Die Yersinien wurden über Nacht bei 37°C angezüchtet, am nächsten Tag abzentrifugiert, ihr Pellet in PBS gewaschen und auf eine optische Dichte bei 550 nm (OD₅₅₀) von 0,5 verdünnt. Ein Tropfen der Hefezellsuspension wurde zusammen mit einem Tropfen der Bakteriensuspension auf einen Objektträger pipettiert und vermischt. Danach wurde die Agglutination von drei unabhängigen Untersuchern bewertet. Positivkontrolle war der FimH-exprimierende *E. coli*-Stamm ORN115, Negativkontrolle der FimH-negative ORN172.

2.2.26 Zelladhärenztest

Um die Adhärenz von YadA-tragenden Yersinien an menschlichen Epithelzellen zu untersuchen, wurden Versuche mit HeLa-Zellen (aus der Arbeitsgruppe Aepfelbacher) durchgeführt.

Dafür werden diese als Monolayer auf Deckgläschen in 24-Well-ELISA-Platten kultiviert. Als Zellkultur-Medium dient Click RPMI 1640 Medium (Biochrom KG, Berlin, Deutschland). Die Zellen werden vorsichtig vom Rand her mit 37°C warmem Click-Medium gewaschen. Yersinien werden in vorgewärmtem BHI-Medium bei 37°C auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt, was einer Zahl von 5×10^7 Bakterien pro ml entspricht. Für den Test werden je 500 µl der Bakteriensuspension auf die Zellen pipettiert. Danach wird der Ansatz bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Erwärmtes PBS-Medium dient zum folgenden zweimaligen Waschen. Eine 45-minütige Nachinkubation wird mit 500 µl Click-Medium bei 37°C durchgeführt. Noch zweimal wäscht man daraufhin die Zellen mit PBS und fixiert sie dann 10 Minuten lang mit eiskaltem Methanol. Nach einem letzten Waschgang mit PBS lässt man die Deckgläschen lufttrocknen.

Um Zellen und Bakterien anzufärben führt man nun eine Giemsa-Färbung durch. Giemsa-Lösung wird im Verhältnis von 1:10 mit Wasser verdünnt, filtriert, in Mengen von jeweils 500 µl auf die Präparate pipettiert und darauf für 20 Minuten belassen. Danach kippt man die Lösung ab, wäscht die Proben einmal mit Wasser und lässt sie erneut lufttrocknen. Das Mikroskopieren ist dann in 1000-facher Vergrößerung mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv ohne Eindecken möglich.

Um die Zelladhärenz quantitativ zu ermitteln wurde die Anzahl der an Zellen haftenden Bakterien pro Gesichtsfeld bestimmt und in die Gruppen 0, 1-10 und >10 eingeteilt.

2.2.27 Serumresistenztest

Gramnegative Bakterien, die in der Lage sind, im Komplementsystem ihres Wirtes zu überleben, bezeichnet man als serumresistent. Deshalb wurden in dieser Arbeit Yersinien-Stämme mit unterschiedlichen YadA-Mutanten bezüglich ihrer Resistenz gegen menschliches Serum, also gegen die komplement-vermittelte bakterielle Lyse, untersucht.

Dafür werden die Stämme über Nacht bei 37°C in 1 ml RPMI-Medium angezüchtet und am nächsten Morgen in der Tischzentrifuge 2 Minuten lang bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Zum Waschen und zur Vorbereitung der Bakterien auf das Puffermilieu

werden die Pellets in 1 ml PBS-5 mM MgCl₂-Puffer aufgenommen und wiederum auf dieselbe Art zentrifugiert. Noch einmal nimmt man sie in 1 ml PBS-5 mM MgCl₂-Lösung auf und stellt sie dann in in sterilen Küvetten am Photometer auf eine OD₆₀₀ von 0,3 ein, was einer Zellzahl von 5×10^7 Bakterien pro ml entspricht. Man verdünnt die Kulturen daraufhin 1: 50 im PBS-5 mM MgCl₂-Puffer und pipettiert davon 100 µl auf 100 µl menschlichen Serums. (Dafür wurde das Blut von 10 gesunden Blutspendern aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut München gewonnen, die im Blut keine Antikörper gegen Yersinien nachwiesen, und gepoolt, man ließ es über Nacht im Kühlschrank gerinnen und dann zentrifugierte man es bei 3000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Der Überstand, das eigentliche Serum, wurde abpipettiert und bei -80°C aufbewahrt.)

100 µl dieses Gemischs werden sofort in einer 1:100 und in einer 1:1000 Verdünnung auf LB-Agar-Platten ausgespatelt. Die restlichen 100 µl werden bei 37°C im Thermoblock ohne Schütteln für 90 Minuten inkubiert und danach in einer 1:10 und einer 1:1000 Verdünnung ausplattiert. Die Agar-Platten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Am nächsten Morgen folgt die Auszählung der Kolonien auf den Platten.

3. Ergebnisse

3.1 Konstruktion von YadA-Mutanten und –Hybriden

Das Yersinia Adhäsın A besitzt eine Kopf-, Neck-, Stalk-, Linker- und Membranankerdomäne. Diese wurden einzeln oder kombiniert deletiert.

Zur Herstellung von YadA-Mutanten kam eine PCR-Strategie zur Anwendung, bei der grundsätzlich ein PCR-Produkt vom 5'-Ende und ein anderes vom 3'-Ende des *yadA*-Gens synthetisiert wurde. Je nachdem, wieviel von dem Gen deletiert werden sollte, variierte man die Länge dieser beiden Fragmente. Um die zwei PCR-Produkte miteinander verbinden zu können, wurde jeweils an ihr komplementäres Ende eine *SacI*-Schnittstelle durch die Primer eingeführt. Beide Fragmente wurden über geeignete Restriktionsenzym-Schnittstellen (meist *ClaI* und *SphI*) in den entsprechenden Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Für Expressionsstudien und Funktionsanalysen wurden alle mutierten Gene über einen Suizidvektor in den *yadA*-negativen Stamm WA(pYVO8-A-0) transferiert. Eine Übersicht über alle in dieser Arbeit erstellten YadA-Mutationen bietet Abb.10 auf Seite 57.

Es wurden N-terminale und *in-frame* Deletionen erstellt, weiterhin wurden die Head-Neck- bzw. Neck-Region oder das FLAG-Epitop auf die N-terminalen Deletionsmutanten gesetzt, FaktorXa-Protease-Schnittstellen eingeführt und FimH-YadA-Hybridproteine konstruiert.

3.1.1 N-terminale Deletionen

Die fünf A-HNS-Mutationen entsprachen YadA-Molekülen ohne Head- und Neck-Region mit unterschiedlich verkürzten Stalk-Regionen. Dabei wurden die Deletionen im Stiel so gesetzt, dass sukzessive eine zunehmende Zahl der für die *coiled-coil* Bildung verantwortlichen sieben 15mere entfernt wurde.

3.1.2 Aufsetzen der Head-Neck-Region

Auf die unterschiedlich langen Stiele der A-HNS1 bis A-HNS4-Mutanten wurde in einem anderen Klonierungsschritt jeweils die komplette Head-Neck-Region aufgesetzt, was in den YadA-Mutanten A-S1, A-S2, A-S3 und A-S4 resultierte.

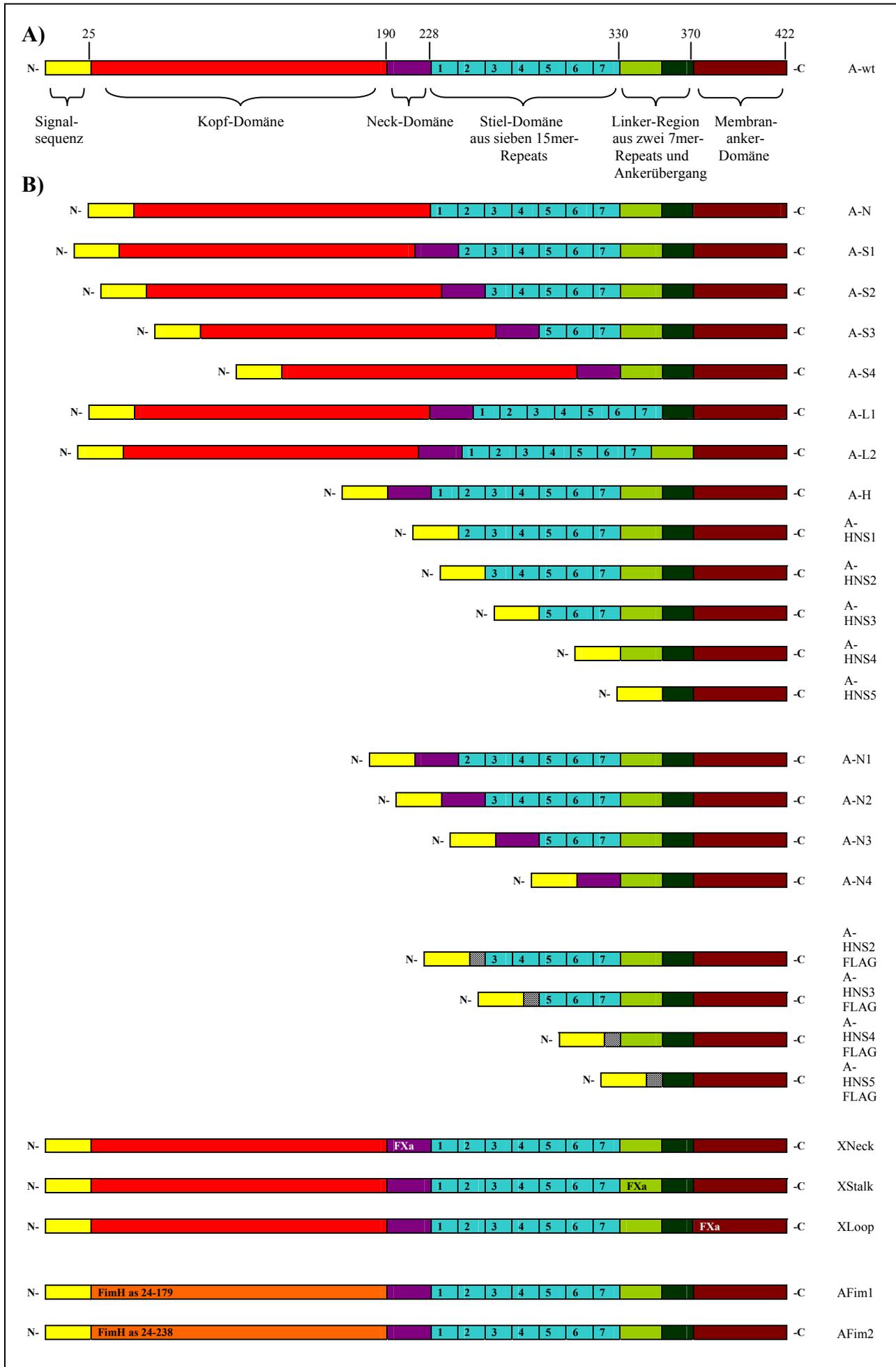


Abb.10: A) Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des YadA von *Y. enterocolitica* O8 mit (S. 57) Abgrenzung der von Hoiczyk et al., 2000 beschriebenen Domänen. Mit den Zahlen 1 bis 7 sind die 15mer Repeats der Stiel-Region hervorgehoben.

B) **Übersicht über alle in dieser Arbeit erstellten YadA-Konstrukte.** Die karierte Fläche bei den A-HNS-FLAG-Mutanten stellt das 8 as große FLAG-Peptid dar. Die FaktorXa-Proteaseschnittstellen sind bei den Mutanten XNeck, XStalk und XLoop mit FXa markiert. Bei den FimH-YadA-Hybridkonstrukten AFim1 und AFim2 ist in Orange der für die Fusion verwendete FimH-Abschnitt unter Angabe des Aminosäurebereiches hervorgehoben.

3.1.3 Aufsetzen der Neck-Region

In einer weiteren Klonierung wurde auf A-HNS1 bis A-HNS4 nur die Neck-Domäne addiert, womit die Mutanten A-N1, A-N2, A-N3 und A-N4 entstanden.

3.1.4 FLAG-Konstrukten

In die Mutanten A-HNS2 bis A-HNS5 wurde eine 30 bp lange Antikörpererkennungssequenz vom Typ FLAG vorne eingefügt, so dass sich daraus die Mutanten A-HNS2-FLAG bis A-HNS5-FLAG ergaben.

3.1.5 In-frame Deletionen

Weiterhin wurde vom YadA-Wildtyp ausgehend eine Mutation erstellt, bei der nur die Head-Region (A-H) und eine andere, bei der nur die Neck-Region fehlte (A-N). Zusätzlich wurden zwei Deletionen in der Region durchgeführt, die den Übergang der Stalk-Region in die Membrananker-Region darstellt und darum in dieser Arbeit als Linking-Region bezeichnet wurde. In der einen Mutante entfernte man den aus drei Heptamer-Repeats bestehenden proximalen Teil (A-L1), in der anderen den 17 as langen distalen Abschnitt, der die drei 7mer-Repeats mit der eigentlichen Membrananker-Region verbindet (A-L2).

3.1.6 Konstrukte mit FaktorXa-Protease-Schnittstelle

In verschiedene Bereiche des YadA-Proteins wurden FaktorXa-Protease-Schnittstellen eingebracht. Dafür wurden jeweils vier aufeinanderfolgende Aminosäuren durch die FaktorXa-Spaltsequenz IEGR ersetzt. Auf diese Weise entstanden mit Hilfe einer speziellen PCR-Mutagenese-Technik (Overlap-Extension-PCR) drei YadA-X-Mutanten: So besitzt A-X-Neck eine Schnittstelle in der Neck-Region, A-X-Stalk eine im ersten Heptamer-Repeat

der Linking-Region und A-X-Loop eine an einer hydrophilen Region des Membranankers, die vermutlich aus der äußeren Zellmembran ragt.

3.1.7 FimH-YadA-Hybridkonstrukte

Um die Kopfregion des YadA-Proteins (as 30-188) durch die N-terminale Adhäsionsregion von FimH zu ersetzen, wurden zwei YadA-Hybridproteine konstruiert. Dafür klonierte man mit Hilfe von *SacI* in die kopflose YadA-Mutante A-H einmal die as 24-179 und ein anderes Mal die as 24-238 von FimH ein. Neben der üblichen Transformation dieser beiden Konstrukte über einen Suizidvektor in den *yadA*-negativen Stamm WA(pYVO8-A-0) wurden sie zusätzlich im pUC-A1-Vektor in den FimH-negativen *E. coli*-Stamm ORN172 eingebracht.

3.2 Expression der YadA-Konstrukte

Um die Expression der verschiedenen YadA-Konstrukte in *Y. enterocolitica* O8 festzustellen, wurden die Zellysate von mittlogarithmisch angewachsenen Bakterienkulturen im Westernblot verglichen. Zur Markierung dienten dabei YadA-spezifische polyklonale Kaninchenantisera oder monoklonale Antikörper der Maus. Wie Abb.11 zeigt, war die Expression der *in-frame* deletierten YadA-Mutanten mit der von Wildtyp-YadA vergleichbar, bis auf folgende Ausnahme: Die zwei Deletionen im Bereich der Linking-Region (A-L1 und A-L2) wurden überhaupt nicht exprimiert. Weder in der SDS-PAGE noch im Westernblot konnten diese dargestellt werden.

Dies weist darauf hin, dass die Linking-Region im Gegensatz zur Head-, Neck-, oder Stalk-Region für eine stabile YadA-Produktion zwingend notwendig ist.

Die drei YadAX-Mutanten zeigten, wie in Abb.14 erkennbar, eine mit Wildtyp-YadA vergleichbare Expression.

Die beiden FimH-YadA-Hybride jedoch waren nur als ganz schwache Banden auf SDS-PAGE und Westernblot erkennbar (Abb.11).

Während also der Austausch von 4 as in den YadAX-Mutanten keinen Einfluss auf die Produktion der YadA-Moleküle hatte, führte der komplette Ersatz des YadA-Kopfes durch Teile von FimH zu einer stark eingeschränkten Expression. Damit war eine korrekte Synthese, Faltung und Insertion der FimH-YadA-Hybrid-Proteine in die bakterielle Außenmembran nicht mehr wahrscheinlich.

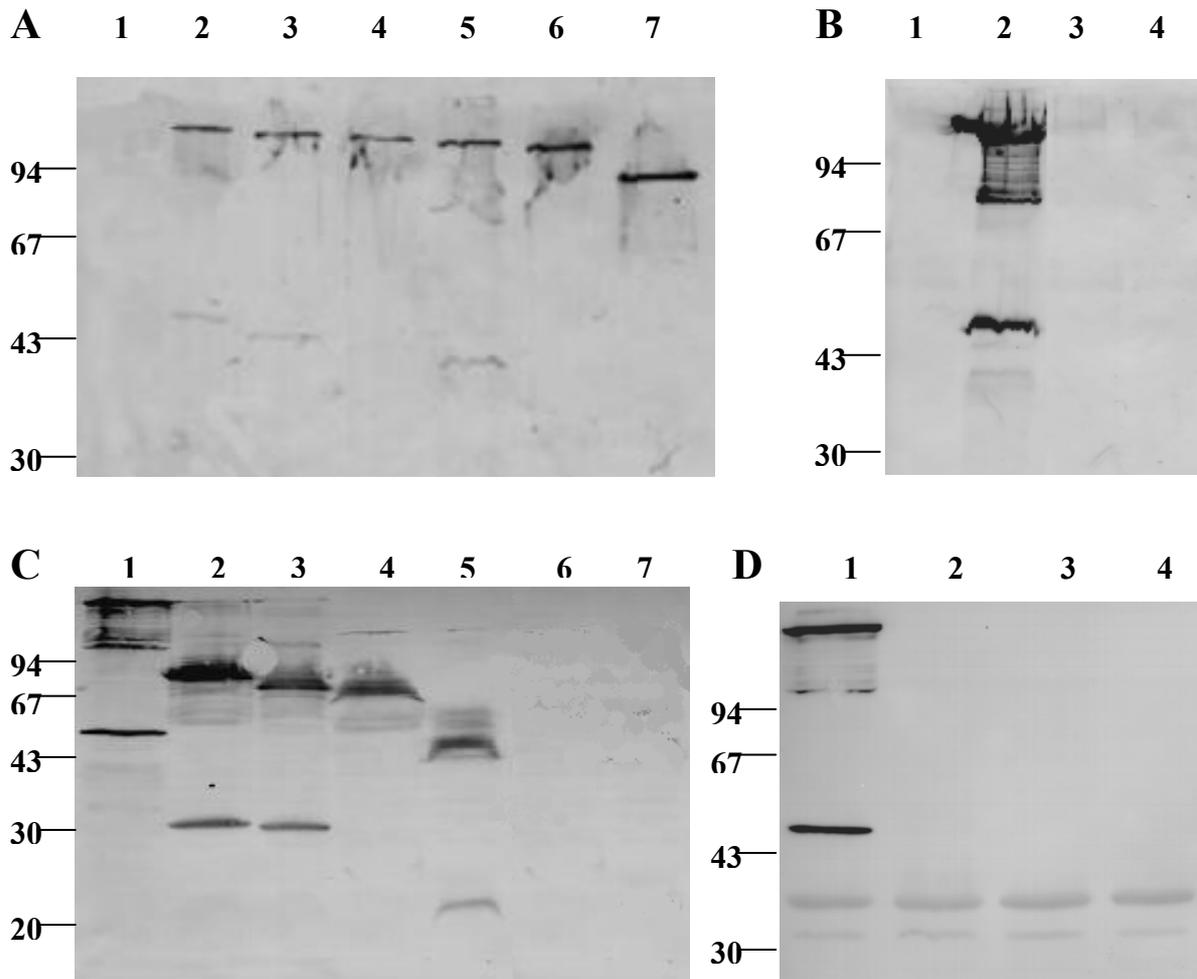


Abb.11: Westernblots bakterieller Gesamtzelllysate

Vor dem Auftragen auf das Proteingel wurden alle Gesamtzelllysate 5 min bei 100°C erhitzt; Erstantikörper: polyklonaler P108 1:1000; Zweitantikörper: AP conj. Goat-Anti-Rabbit-IgG 1:5000; Molekulargewicht der Markerproteine in kDa. (Neg.K=Negativkontrolle, Pos.K=Positivkontrolle).

| | | | | | |
|----------------|----------|-------------------------|----------------|----------|----------------------|
| Blot A: | 1 | WA-C (Neg.K) | Blot C: | 1 | WA(pYVO8-A-1)(Pos.K) |
| | 2 | WA(pYVO8-A-1)(Pos.K) | | 2 | WA(pYVO8-A-H) |
| | 3 | WA(pYVO8-A-N) | | 3 | WA(pYVO8-A-HNS1) |
| | 4 | WA(pYVO8-A-S1) | | 4 | WA(pYVO8-A-HNS2) |
| | 5 | WA(pYVO8-A-S2) | | 5 | WA(pYVO8-A-HNS3) |
| | 6 | WA(pYVO8-A-S3) | | 6 | WA(pYVO8-A-HNS4) |
| | 7 | WA(pYVO8-A-S4) | | 7 | WA(pYVO8-A-HNS5) |
| Blot B: | 1 | WA-C (Negativkontrolle) | Blot D: | 1 | WA(pYVO8-A-1)(Pos.K) |
| | 2 | WA(pYVO8-A-1)(Wildtyp) | | 2 | WA-C (Neg.K) |
| | 3 | WA(pYVO8-A-FimH158) | | 3 | WA(pYVO8-A-L1) |
| | 4 | WA(pYVO8-A-FimH217) | | 4 | WA(pYVO8-A-L2) |

3.3 Nachweis der YadA-Konstrukte auf der Oberfläche der Außenmembran von *Y. enterocolitica*

Um die Exposition der verschiedenen YadA-Mutanten auf der Außenmembran von *Y. enterocolitica* O8 nachzuweisen, wurden einerseits Außenmembranpräparationen der Mutanten erstellt, andererseits Immunfluoreszenztests und Agglutinationsversuche durchgeführt.

3.3.1 Außenmembranpräparation

Im Westernblot der Außenmembranpräparationen zeigte sich (Abb.12), dass bis auf die Mutanten mit der verkürzten Linking-Region (A-L1 und A-L2) alle YadA-Konstrukte nachweisbar und somit in der Außenmembran lokalisiert waren. (Auf eine Außenmembranpräparation der FimH-YadA-Hybridproteine (A-Fim158 und A-Fim217) wurde verzichtet, da diese bereits in der SDS-PAGE und dem Westernblot der Gesamtzelllysate fast keine Banden zeigten (siehe oben) und für die Frage der Translokation von YadA durch die Außenmembran nicht wichtig waren.) Da spezifische Antikörper für den Membrananker weiterhin fehlten, waren aber die zwei kürzesten Mutanten A-HNS4 und A-HNS5 im Blot nur sehr schwach angedeutet zu erkennen, die Verwendung der später konstruierten, FLAG-markierten Varianten A-HNS4-FLAG und A-HNS5-FLAG ließ sie dann aber auch deutlich sichtbar werden (siehe Abb.13).

3.3.2 Agglutinationsversuche und Immunfluoreszenztest

Tabelle 3 zeigt das Verhalten der Yersinien mit ihren unterschiedlichen YadA-Mutanten im Objektträger-Agglutinationsversuch und in der Immunfluoreszenz.

Die Agglutination der Bakterien, entweder in Form von Autoagglutination oder von Agglutination mit einem Antikörper (P1O8), ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein des YadA-Konstruktes auf der Bakterienoberfläche. Die kopflose Mutante A-H, die neck-deletierte A-N, die im Stalkbereich sukzessive verkürzten A-S1 bis -S4, die kopflosen und stalkverkürzten mit umgesetzter Neckregion A-N1 bis -N4 und die drei FaktorXa-Mutanten waren dabei in mindestens einem der beiden Agglutinationsversuche positiv.

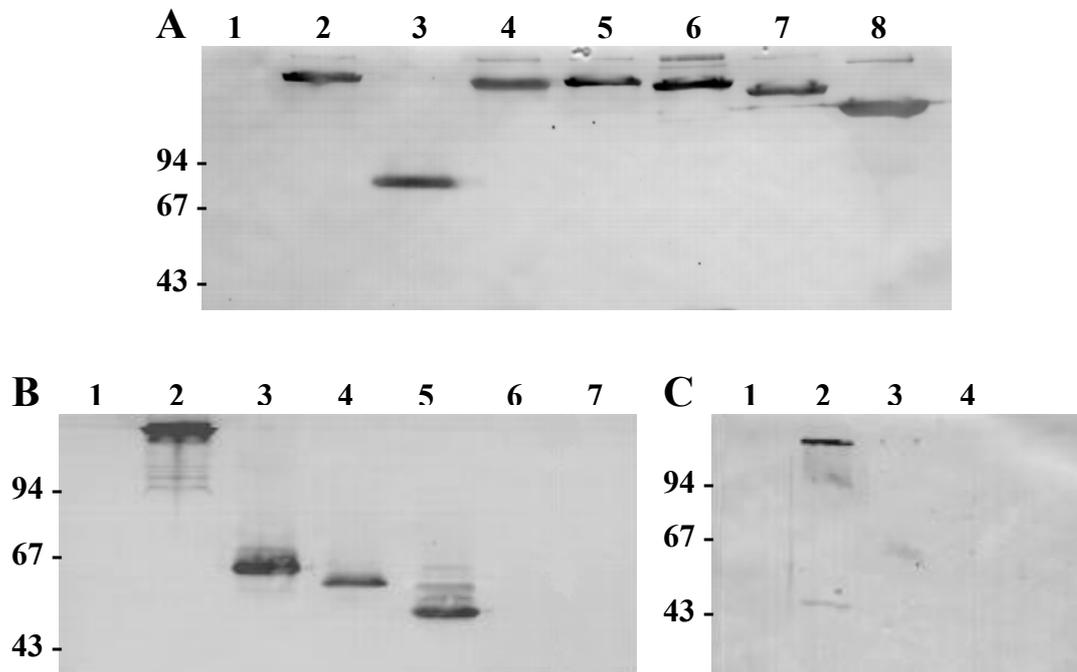


Abb.12: Westernblots der Außenmembranpräparationen

Zur Präparation der Außenmembran wurden alle Stämme für 6 h bei 37°C angezüchtet und je 8 µg von jedem Ansatz für 2 h bei 37°C in Probenpuffer solubilisiert.

Erstantikörper: polyklonaler P1O8 1:1000; Zweitantikörper: AP conj.Goat-Anti-Rabbit-IgG 1:5000; Molekulargewicht der Markerproteine in kDa. (Neg.K=Negativkontrolle, Pos.K=Positivkontrolle).

| | | | | | |
|----------------|---|-------------------------|----------------|---|----------------------|
| Blot A: | 1 | WA-C (Neg.K) | Blot B: | 1 | WA-C (Neg.K) |
| | 2 | WA(pYVO8-A-1)(Pos.K) | | 2 | WA(pYVO8-A-1)(Pos.K) |
| | 3 | WA(pYVO8-A-H) | | 3 | WA(pYVO8-A-HNS1) |
| | 4 | WA(pYVO8-A-N) | | 4 | WA(pYVO8-A-HNS2) |
| | 5 | WA(pYVO8-A-S1) | | 5 | WA(pYVO8-A-HNS3) |
| | 6 | WA(pYVO8-A-S2) | | 6 | WA(pYVO8-A-HNS4) |
| | 7 | WA(pYVO8-A-S3) | | 7 | WA(pYVO8-A-HNS5) |
| | 8 | WA(pYVO8-A-S4) | | | |
| Blot C: | 1 | WA-C (Negativkontrolle) | | | |
| | 2 | WA(pYVO8-A-1)(Wildtyp) | | | |
| | 3 | WA(pYVO8-A-L1) | | | |
| | 4 | WA(pYVO8-A-L2) | | | |

Nur die Mutante ohne Neck-Region (A-N) zeigte Autoagglutination, aber gleichzeitig keine Agglutination mit dem Kaninchenserum. Dies weist darauf hin, dass die agglutinogenen oberflächenexponierten Epitope für P108 in der Neck-Domäne (as 190-228) liegen müssen.

Genau gegensätzlich verhielten sich die Mutanten A-H, A-N1, A-N2, A-N3 und A-N4: Einer deutlichen Antikörperagglutination mit P108 stand eine nicht vorhandene Autoagglutinationsfähigkeit gegenüber, was den für dieses Phänomen verantwortlichen Bereich auf die Kopf-Region (as 29-181) eingrenzen lässt.

| <u>Stamm</u> | <u>Agglutination mit P108</u> | <u>Autoagglutination</u> | <u>Immunfluoreszenz mit 8D1</u> |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| WA-314 (Positivkontrolle) | +++ | ++ | ++ |
| WA-C (Negativkontrolle) | - | - | - |
| WA(pYVO8-A-H) | +++ | - | ++ |
| WA(pYVO8-A-HNS1) | - | - | ++ |
| WA(pYVO8-A-HNS2) | - | - | ++ |
| WA(pYVO8-A-HNS3) | - | - | ++ |
| WA(pYVO8-A-HNS4) | - | - | - |
| WA(pYVO8-A-HNS5) | - | - | - |
| WA(pYVO8-A-N) | - | ++ | ++ |
| WA(pYVO8-A-S1) | +++ | ++ | ++ |
| WA(pYVO8-A-S2) | +++ | ++ | ++ |
| WA(pYVO8-A-S3) | +++ | ++ | ++ |
| WA(pYVO8-A-S4) | +++ | ++ | - |
| WA(pYVO8-A-N1) | +++ | - | n.t. |
| WA(pYVO8-A-N2) | +++ | - | n.t. |
| WA(pYVO8-A-N3) | +++ | - | n.t. |
| WA(pYVO8-A-N4) | +++ | - | n.t. |
| WA(pYVO8-A-L1) | - | - | - |
| WA(pYVO8-A-L2) | - | - | - |
| WA(pYVO8-A-X-Neck) | +++ | ++ | n.t. |
| WA(pYVO8-A-X-Stalk) | +++ | ++ | n.t. |
| WA(pYVO8-A-X-Loop) | +++ | ++ | n.t. |
| WA(pYVO8-A-FimH158) | - | - | - |
| WA(pYVO8-A-FimH217) | - | - | - |

Tabelle 3: Vergleich von P108-Antikörperagglutination, Autoagglutination und Immunfluoreszenz

Die verschiedenen Stämme wurden für Antikörper- und Autoagglutination über Nacht auf Blutagarplatten bei 27°C angezchtet und anschließend 5 h bei 37°C inkubiert. Jeweils eine Kolonie wurde entnommen, auf zwei Objektträger verteilt und einerseits mit 10 µl NaCl-Lösung zum Nachweis der Autoagglutination, andererseits mit 10 µl Anti-YadA-Kaninchenserum Anti-P108 zum Nachweis der Antikörperagglutination verrieben. Für die Immunfluoreszenz wurden die Stämme für 6 h bei 37°C in BHI-Medium angezchtet, gewaschen und mit dem monoklonalen Antikörper 8D1 30 min bei 37°C inkubiert. Als Zweitantikörper diente FITC-conjug. Goat-Anti-Mouse-IgG. Die so markierten Bakterien wurden im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Alle Ergebnisse wurden von drei unabhängigen Untersuchern bestätigt.

+++ = sehr deutliche Agglutination; ++ = deutliche Agglutination bzw. deutlich sichtbare Immunfluoreszenz, - = keine Agglutination bzw. keine Immunfluoreszenz, n.t. = Stamm nicht untersucht.

Die Mutanten A-S1 bis -S4 und die drei Faktor Xa-Mutanten, die alle sowohl Kopf- als auch Neck-Domäne besitzen, zeigten ein mit der Positivkontrolle WA-314 (YadA-Wildtyp) vergleichbares Agglutinationsverhalten.

Überhaupt keine Agglutinationsfähigkeit war bei den kopf- und necklosen A-HNS1 bis -5 und den beiden in der Linking-Region deletierten A-L1 und A-L2-Mutanten festzustellen, was deren Oberflächenexposition aufgrund des Fehlens beider Agglutinationsbereiche (Kopf- und Neck-Region) zwar nicht ausschloss, aber zusätzliche Untersuchungen erforderlich machte.

Auch die FimH-YadA-Konstrukte zeigten trotz vorhandener Neck-Domäne keinerlei Agglutinationsfähigkeit, was einen weiteren Hinweis für deren mangelhafte Expression auf der Bakterienoberfläche darstellte.

Präziser wurde die Feststellung der korrekten Oberflächenexposition der Konstrukte durch die Durchführung eines Immunfluoreszenztests der unfixierten Yersinien mit dem monoklonalen Antikörper 8D1. So war deutlich zu erkennen, dass die Mutanten A-H, A-N, A-S1 bis -S3 und A-HNS1 bis -HNS3 auf der Oberfläche exprimiert waren. Das in den Agglutinationsversuchen stets positive Konstrukt A-S4 leuchtete nicht in der Immunfluoreszenz, was sich durch die Epitopspezifität von 8D1 erklären ließ: So fehlen diesem Konstrukt, wie auch den ebenfalls negativen A-HNS4 und -HNS5, die zur Erkennung notwendigen aa 290-330 von YadA.

Wie auch schon in der Agglutination waren die A-L-Mutanten und FimH-Hybridkonstrukte vollkommen negativ, obwohl sie das 8D1-Epitop besaßen. Dies bestätigte die vorher festgestellte mangelhafte Expression dieser Mutanten im Gesamtzelllysat.

Somit wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz die bereits in den Agglutinationsversuchen positiven Konstrukte A-H, A-N, A-S1 bis -S3 bestätigt und zusätzlich die Oberflächenexposition der A-HNS-Mutanten 1, 2 und 3 belegt.

A-S4, A-HNS4 und -5, die beiden Varianten mit mutierter Linker-Region (A-L1 und A-L2), sowie die FimH-Hybride ließen sich mit dieser Methode nicht detektieren.

Die Deletion einzelner Domänen wie Head- oder Neck-Region, sowie die Deletion von Teilen des Stalk führte somit nicht zu einem Verlust der Oberflächenlokalisation des mutierten YadA-Proteins.

Diese Resultate zeigen, dass weder für den Transport von YadA über die Innenmembran, noch für seine Insertion in die Außenmembran oder für die Exposition seines N-terminalen Teiles an der Oberfläche die Head-, Neck- oder Stalk-Region wichtig sind.

3.4 Die Linking-Region als Vermittler der Translokation von YadA durch die Außenmembran

In den bereits erwähnten Westernblots und Immunfluoreszenztests hatte sich gezeigt, dass Head-, Neck- und Stalk-Region von YadA für eine korrekte Durchschleusung des Proteins durch die äußere Zellmembran nicht notwendig waren. Alle Mutanten mit Deletionen in diesen drei Domänen wurden auf der bakteriellen Oberfläche exprimiert. Da weiterhin festgestellt wurde, dass die beiden Mutanten A-L1 und A-L2 mit Deletionen in der Linking-Region überhaupt nicht exprimiert wurden, führte dies zu der Vermutung, dass für die Translokation des N-terminalen Teils von YadA die Linking-Region, also der vordere Bereich des Membranankers, absolut erforderlich sein könnte.

Um dies zu bestätigen, wurden mit vorgeschalteten Antikörpererkennungssequenzen vom Typ FLAG versehene A-HNS2-, A-HNS3-, A-HNS4- und A-HNS5-Mutanten konstruiert und in YadA einmutierte FaktorXa-Proteaseschnittstellen in Neck (A-X-Neck), Linking-Region (A-X-Stalk) und Membrananker (A-X-Loop) auf ihre Zugänglichkeit hin überprüft.

3.4.1 Die A-HNS-FLAG-Konstrukte

Die Außenmembranpräparation der A-HNS-FLAG-Konstrukte zeigt der Westernblot in Abb.13: Alle FLAG-Mutanten, auch A-HNS4-FLAG und A-HNS5-FLAG wurden produziert und bildeten Oligomere, die im Laufverhalten auf Trimere hindeuten. Damit befanden sich alle Konstrukte in der bakteriellen Außenmembran, jedoch war noch nicht sicher, welche von ihnen auch auf der Oberfläche lokalisiert waren.

Um dies festzustellen, wurden unfixierte, FLAG-Mutanten exprimierende Yersinien in einem weiteren Immunfluoreszenztest mit Anti-FLAG-Mab markiert. Dabei zeigte sich interessanterweise, dass bis auf A-HNS5 alle FLAG-Konstrukte sichtbar waren. Da A-HNS4 die komplette Linking-Region ab as 330, A-HNS5 aber nur noch ihren distalen Teil ab as 352 synthetisiert, muss der proximale Bereich (as 330 bis 351) dieser Domäne noch detektierbar sein, während der hintere (ab as 352) undetektierbar entweder in der Außenmembran steckt oder in den periplasmatischen Raum ragt.

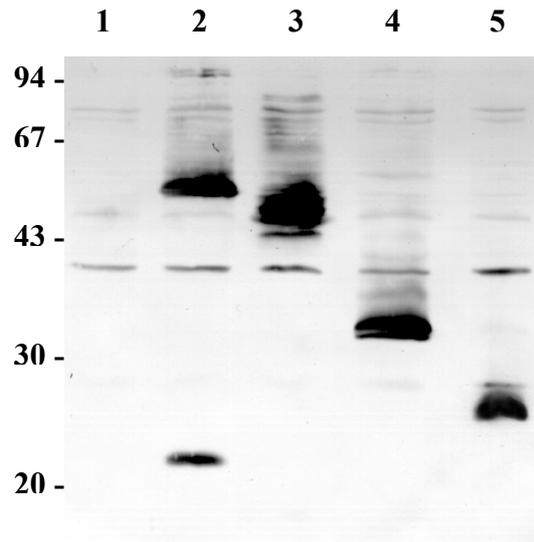


Abb. 13: Westernblot der Außenmembranpräparation der YadA-FLAG-Konstrukte

Zur Präparation der Außenmembran wurden alle Stämme für 6 h bei 37°C angezchtet und je 8 µg von jedem Ansatz für 2 h bei 37°C in Probenpuffer solubilisiert.

Erstantikörper: anti-FLAG Mab 1:1000; Zweitantikörper: AP conj. Goat-Anti-Mouse-IgG 1:5000; Molekulargewicht der Markerproteine in kDa. (Neg.K=Negativkontrolle).

| | | |
|--------------|----------|-----------------------|
| Spur: | 1 | WA(pYVO8-A-1)(Neg.K) |
| | 2 | WA(pYVO8-A-HNS2-FLAG) |
| | 3 | WA(pYVO8-A-HNS3-FLAG) |
| | 4 | WA(pYVO8-A-HNS4-FLAG) |
| | 5 | WA(pYVO8-A-HNS5-FLAG) |

3.4.2 Die YadA-FaktorXa-Mutanten

Die drei Yersinienstämme WA(pYVO8-A-X-Neck), WA(pYVO8-A-X-Stalk) und WA(pYVO8-A-X-Loop) wurden mit Faktor Xa verdaut und über SDS-PAGE im Westernblot mit P108 entwickelt (Abb.14).

Man erkennt im Blot der Pellets, dass alle drei Konstrukte ohne FaktorXa-Verdau wie der Wildtyp A-1 auf gleicher Höhe typische Oligomere ausbilden. Bei den proteasebehandelten Chargen sieht man, dass nur A-X-Neck sein typisches Laufmuster verloren hat, während A-X-Stalk und A-X-Loop unverändert blieben. So zeigt A-X-Neck nach FaktorXa-Verdau im Pellet-Blot einen deutlichen Verlust der oligomeren Banden und stattdessen ein nach Proteaseverdau typisches Muster multipler Banden.

Im Überstand-Blot ist in allen Proben ein leichter Hintergrund zu erkennen, was durch eine leichte Verunreinigung mit den Pellets aufgrund nicht vollständiger Trennung zu erklären ist. Klar sichtbar ist allerdings, dass in der mit Faktor Xa verdauten Probe von A-X-Neck drei Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 15, 21 bzw. 31 kDa auftauchen.

Daraus resultierte, dass nur die einmutierte Schnittstelle von A-X-Neck von der Protease Faktor Xa erkannt wurde. Somit waren die Proteaseschnittstellen in der Linking-Region und im Membrananker für das Enzym nicht zugänglich.

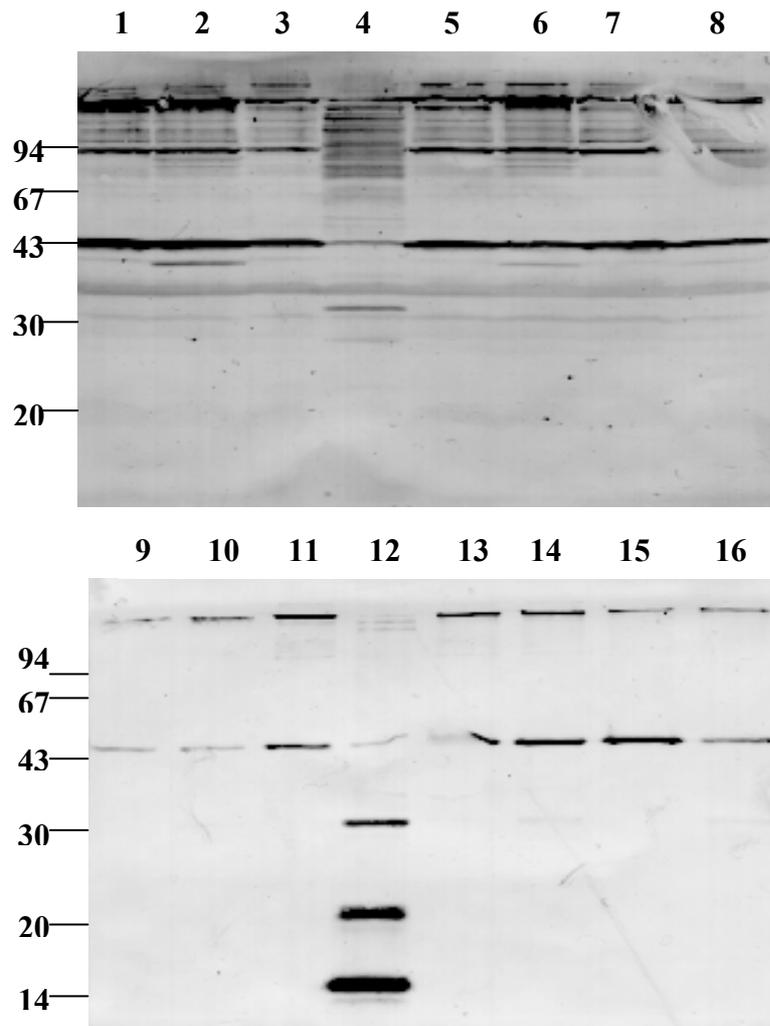


Abb.14: Faktor Xa-Verdau von A-X-Neck, A-X-Stalk und A-X-Loop

Vor dem Auftragen auf das Proteingel wurden die Bakterienpellets und -überstände 5 min bei 100°C erhitzt; Erstantikörper: polyklonales Serum 70 1:1000; Zweitantikörper: AP conj. Goat-Anti-Rabbit-IgG 1:5000; Molekulargewicht der Markerproteine in kDa.

Spur 1-8: Bakterienpellets

| | | |
|---|-------------------------|-----------------------|
| 1 | WA(pYVO8-A-1)(=Wildtyp) | ohne Faktor Xa-Verdau |
| 2 | WA(pYVO8-A-1)(=Wildtyp) | mit Faktor Xa-Verdau |
| 3 | WA(pYVO8-A-X-Neck) | ohne Faktor Xa-Verdau |
| 4 | WA(pYVO8-A-X-Neck) | mit Faktor Xa-Verdau |
| 5 | WA(pYVO8-A-X-Stalk) | ohne Faktor Xa-Verdau |
| 6 | WA(pYVO8-A-X-Stalk) | mit Faktor Xa-Verdau |
| 7 | WA(pYVO8-A-X-Loop) | ohne Faktor Xa-Verdau |
| 8 | WA(pYVO8-A-X-Loop) | mit Faktor Xa-Verdau |

Spur 9-16: Bakterienüberstände

| | | |
|----|-------------------------|-----------------------|
| 9 | WA(pYVO8-A-1)(=Wildtyp) | ohne Faktor Xa-Verdau |
| 10 | WA(pYVO8-A-1)(=Wildtyp) | mit Faktor Xa-Verdau |
| 11 | WA(pYVO8-A-X-Neck) | ohne Faktor Xa-Verdau |
| 12 | WA(pYVO8-A-X-Neck) | mit Faktor Xa-Verdau |
| 13 | WA(pYVO8-A-X-Stalk) | ohne Faktor Xa-Verdau |
| 14 | WA(pYVO8-A-X-Stalk) | mit Faktor Xa-Verdau |
| 15 | WA(pYVO8-A-X-Loop) | ohne Faktor Xa-Verdau |
| 16 | WA(pYVO8-A-X-Loop) | mit Faktor Xa-Verdau |

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit den FLAG-Konstrukten und den FaktorXa-Mutanten zeigten, dass die Linking-Region den Übergang vom extrazellulär exponierten zum membranspannenden, intrazellulären C-terminalen Proteinteil bildet. Dies spricht für ihre Beteiligung an der Translokation des N-Terminus durch die Außenmembran.

3.5 Der Membrananker als Vermittler der Oligomerisierung von YadA

In der SDS-PAGE zeigt YadA nicht nur seine monomere Bande bei 46 kDa, sondern immer zusätzlich eine Bande im 150 bis 200 kDa-Bereich. Diese höheren Molekulargewichtskomplexe entstehen durch YadA-Oligomere. Im Westernblot konnte nun das Oligomerisierungsverhalten der verschiedenen YadA-Konstrukte verglichen werden. Wie aus Abb.12 ersichtlich, zeigte sich dabei, dass eine Deletion von Head-, Neck- oder Stalk-Region keinen Einfluss auf die Oligomerisierungsfähigkeit der YadA-Mutanten hatte. Obwohl bekannt ist, dass Proteine mit *coiled-coil* Strukturen dazu tendieren, Aggregate in der SDS-PAGE zu bilden, ist für die Oligomerisierung von YadA der aus *coiled-coils* bestehende Stiel nicht notwendig, da man erkennt, dass selbst die kürzesten YadA-Mutanten A-HNS4-FLAG und A-HNS5-FLAG höhere Molekulargewichtskomplexe bilden (Abb.13).

Da sogar A-HNS5-FLAG noch in der Außenmembranpräparation oligomere Banden zeigte, kann man überdies feststellen, dass die letzten 70 aa für die Oligomerisierung von YadA ausreichen.

Somit ist der Membrananker (aa 331 bis 422) der für die Oligomerisierung eigentlich entscheidende Teil. Eine möglicherweise durch die *coiled-coils* bewirkte zusätzliche Stabilisierung der oligomeren Struktur ist dadurch aber keineswegs ausgeschlossen. Diese Stabilisierungsfunktion der Stalk-Region ließ sich jedoch in einem 3 M Harnstoff-Polyacrylamidgel nicht nachweisen, da darin, wie in Abb.15 ersichtlich, alle Deletionsmutanten in Monomere dissoziierten.

3.6 Koexpression zum Nachweis der Trimer-Bildung von YadA

Um festzustellen, wie viele Monomere das oligomere YadA-Protein bilden, wurde das Wildtyp-YadA-Gen zusammen mit dem kopflosen YadA-H-Gen auf einem Yersinien-Virulenzplasmid exprimiert. Abb.16 erklärt das zugrundeliegende Prinzip.

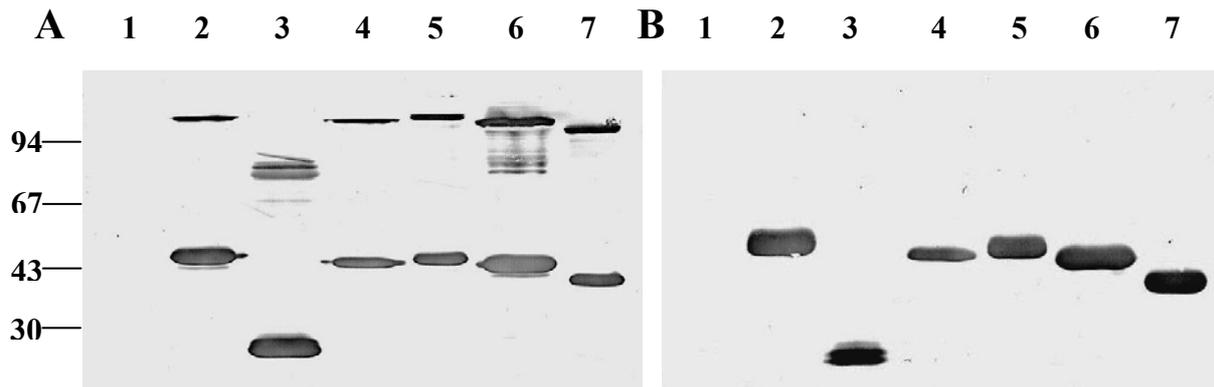
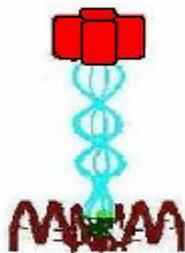


Abb.15: Darstellung der Dissoziation der Deletionsmutanten in Monomere unter 3 M Harnstoff

Vor dem Auftragen auf das Proteingel wurden die Außenmembranpräparationen 5 min bei 100°C ohne (**Blot A**) oder mit 3 M Harnstoff (**Blot B**) erhitzt; Erstantikörper: 8D1 1:1000; Zweitantikörper: AP conj.Goat-Anti-Mouse-IgG 1:5000; Molekulargewicht der Markerproteine in kDa.

| | | |
|--------------|----------|----------------------|
| Spur: | 1 | WA-C (Neg.K) |
| | 2 | WA(pYVO8-A-1)(Pos.K) |
| | 3 | WA(pYVO8-A-H) |
| | 4 | WA(pYVO8-A-N) |
| | 5 | WA(pYVO8-A-S1) |
| | 6 | WA(pYVO8-A-S2) |
| | 7 | WA(pYVO8-A-S3) |

YadA-Tetramer



YadA-Trimer

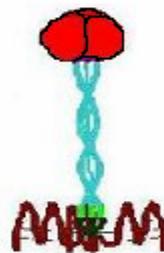


Abb. 16: Die Koexpression eines Wildtyp-YadA-Gens und eines kopflosen YadA-Gens ermöglicht die Ermittlung der Zahl von YadA-Monomeren, die ein YadA-Oligomer bilden

Auf der linken Seite sind die Kombinationsmöglichkeiten von YadA-Monomeren zu einem YadA-Tetramer, auf der rechten Seite zu einem YadA-Trimer skizziert. Man erkennt, dass bei einem YadA-Tetramer fünf Kombinationsmöglichkeiten der beiden verschiedenen, koexprimierten YadA-Monomeren möglich sind und folglich fünf Banden in unterschiedlicher Laufhöhe sichtbar wären, bei einem YadA-Trimer dagegen vier.

Demnach müssten im Blot fünf Oligomeren-Banden zu sehen sein, falls YadA ein Tetramer, vier falls YadA ein Trimer wäre. Im Westernblot der Koexpressionsmutante (siehe Abb.17A) erkannte man vier Banden in den Höhen 84 kDa, 102 kDa, 120 kDa und 138 kDa, von denen die unterste der oligomeren Bande des kopflosen A-H entsprach und die oberste der oligomeren Bande des Wildtyp YadA. Folglich mussten die untere der dazwischen liegenden Banden aus einer Aggregation von zwei kopflosen und einem Wildtyp-Monomer, die obere aus einer Kombination von einem kopflosen und zwei Wildtyp-Monomeren stammen. Somit ließ sich nachweisen, dass YadA ein Trimer ist.

Mit der Methode der Koexpression konnten die Testergebnisse zur Oligomerisierung von YadA noch einmal unterstützt werden. Abb.17B zeigt den Westernblot von Koexpressionsmutanten, die neben dem Wildtyp-Gen jeweils eines der fünf kopf- und necklosen und sukzessiv stielverkürzten YadA-HNS-Gene A-HNS1 bis A-HNS5 besitzen. Wie zu erkennen, bildet jede von ihnen, auch noch die Wildtyp-YadA+A-HNS5-Mutante, alle vier oligomeren Banden aus. Damit wird zusätzlich bestätigt, dass allein der Membrananker von YadA ausreicht, um die Oligomerisierung zu ermöglichen.

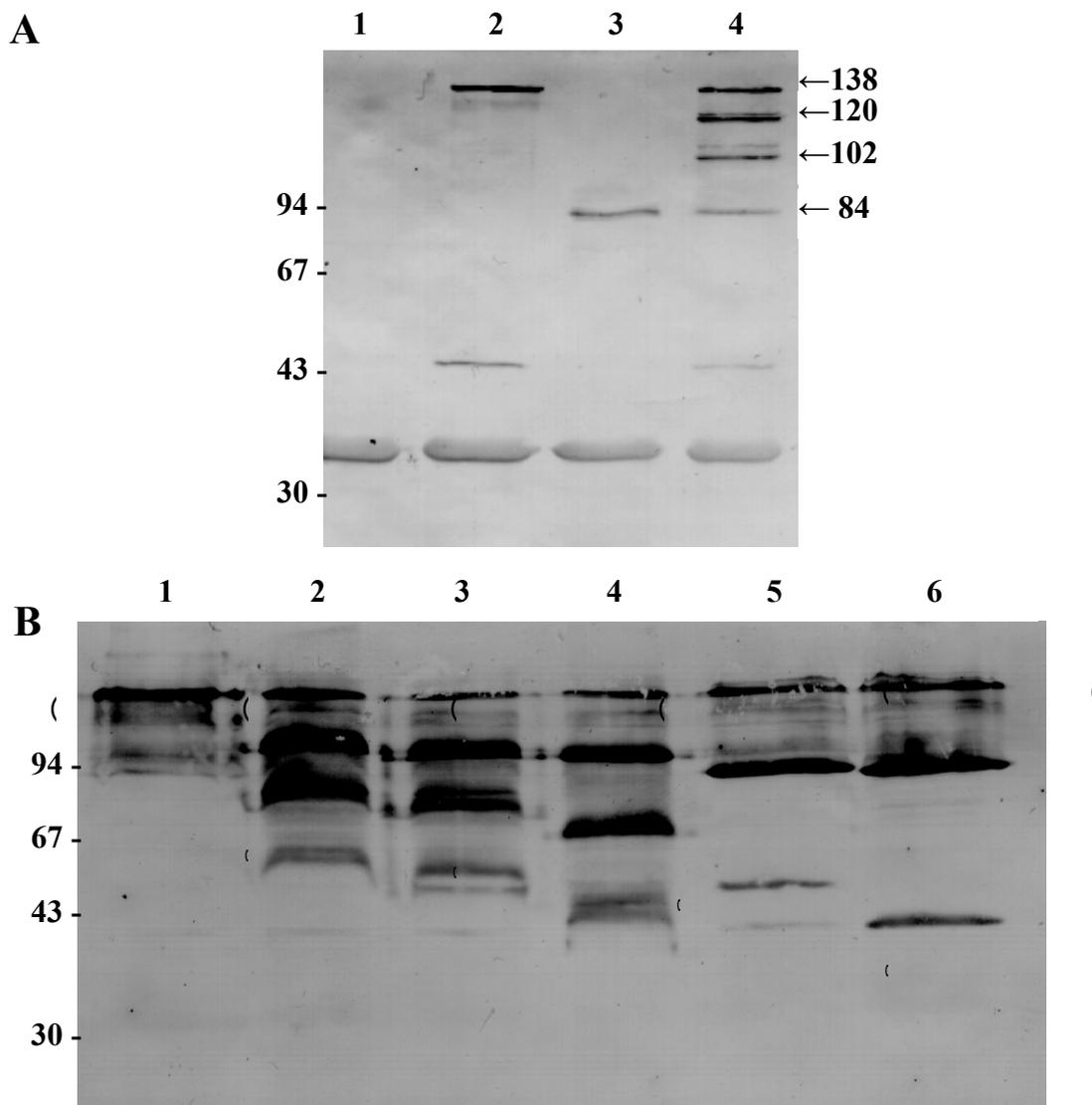


Abb. 17: Westernblot der Koexpressionsmutanten zur Darstellung der Heterooligomerenbildung

Vor dem Auftragen auf das Proteingel wurden alle Gesamtzelllysate 5 min bei 100°C erhitzt; Erstantikörper: monoklonaler 8D1 1:1000; Zweitantikörper: AP conj.Goat-Anti-Mouse-IgG 1:5000; Molekulargewicht der Markerproteine in kDa. (Neg.K=Negativkontrolle, Pos.K=Positivkontrolle).

Blot A: Heterooligomerenbildung bei Koexpression von Wildtyp-YadA und kopflosem YadA-H

- 1 WA-C(Neg.K)
- 2 WA(pYVO8-A-1)(Pos.K)
- 3 WA(pYVO8-A-H)
- 4 WA(pYVO8-A-1+H)

Gekennzeichnet sind die vier heterooligomeren Banden bei 138 kDa (3x Wildtyp-YadA-Monomer), 120 kDa (2x Wildtyp-YadA-Monomer + 1x YadA-H-Monomer), 102 kDa (1x Wildtyp-YadA-Monomer + 2x YadA-H-Monomer) und 84 kDa (3x YadA-H-Monomer).

Blot B: Heterooligomerenbildung bei Koexpression von Wildtyp-YadA und Yada-HNS-Mutanten

- 1 WA(pYVO8-A-1)(Pos.K)
- 2 WA(pYVO8-A-1+HNS1)
- 3 WA(pYVO8-A-1+HNS2)
- 4 WA(pYVO8-A-1+HNS3)
- 5 WA(pYVO8-A-1+HNS4)
- 6 WA(pYVO8-A-1+HNS5)

Auch hier erkennt man die Bildung heterooligomerer Banden. Zu beachten ist dabei, dass die oligomeren Banden aus 3 A-HNS4-Monomeren und 3 A-HNS5-Monomeren mangels Detektierbarkeit mit dem Antikörper 8D1 nicht dargestellt sind.

3.7 Adhärenzverhalten der YadA-Mutanten

3.7.1 Adhärenzverhalten der YadA-Mutanten mit Kollagen und HeLa-Zellen

Dass die Kopf-Region von YadA die Adhärenz an Kollagen und HeLa-Zellen vermittelt, ist bereits bekannt. Um zu analysieren, inwieweit andere Domänen zusätzlich die Bindungsfähigkeit des Adhäsins beeinflussen, wurden die YadA-Mutanten auf ihr Adhärenzverhalten mit Typ-II-Kollagen und HeLa-Zellen untersucht. Abb.18 zeigt die Ergebnisse des Kollagen-ELISA, Tabelle 4 die des Zelladhärenztests. Dabei zeigten sich in beiden Versuchen übereinstimmende Ergebnisse:

Die kopflose A-H-Mutante, wie auch die kopflosen und variabel stiel-verkürzten A-HNS-Mutanten besaßen keine Adhärenzfähigkeit. Dies war zu erwarten, da bereits in Mutationen aus vorherigen Arbeiten Veränderungen in der Head-Region von YadA zu fehlender Adhäsion geführt hatten. Interessanterweise verloren auch die Konstrukte ohne oder mit veränderter Neck-Region, also A-N und ebenso die Faktor Xa-Mutante A-X-Neck, ihre Bindungsfähigkeit.

Im Gegensatz dazu war die Bindung der nur im Stiel verkürzten A-S-Mutanten immer mit der von Wildtyp YadA vergleichbar. Sogar die kürzeste Mutante A-S4, bei der auf die Head-Neck-Region direkt die Linking-Region folgt, zeigte eine völlig normale Adhäsionspotenz. Die beiden Faktor Xa-Mutanten A-X-Stalk und A-X-Loop wiesen ebenfalls keinen bedeutenden Unterschied zum Wildtyp auf.

Diese Resultate lassen darauf schließen, dass weder Kopf- noch Neck-Region alleine für die Bindung an Kollagen und Epithelzellen ausreichen. Vielmehr sind beide zusammen als komplexes Bindungsmodul für die Adhärenzeigenschaften des Proteins zwingend notwendig. Es genügt der Austausch von 4 as in der Neck-Region, um die Adhäsion an Kollagen und Epithelzellen zu verhindern. Dagegen hat die Länge der Stalk-Region keinerlei Einfluss auf die Bindungsfähigkeit.

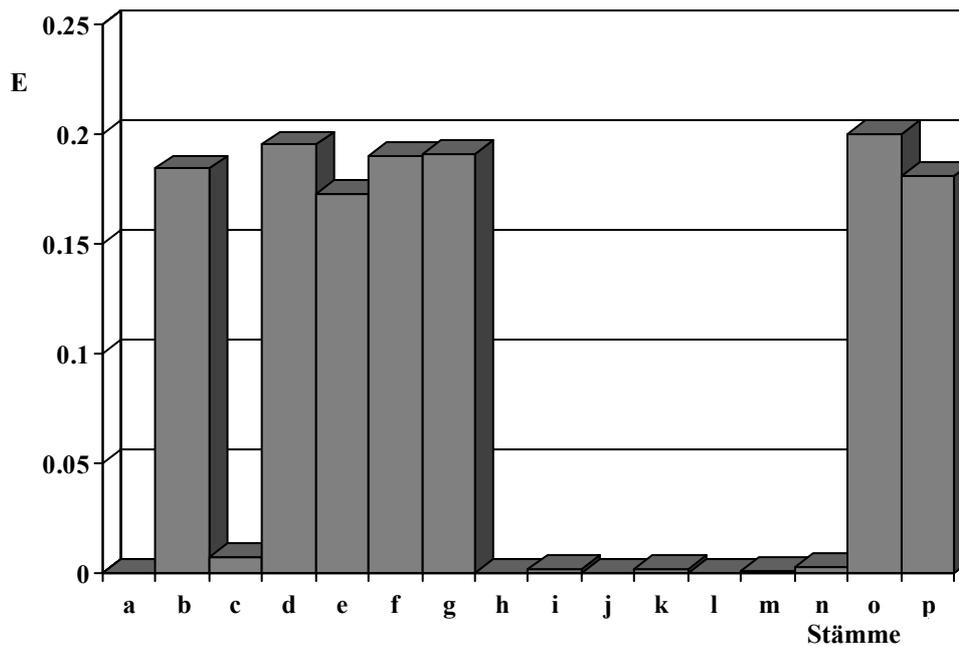


Abb. 18: Bindung der YadA-Mutanten an Kollagen (Typ II) im ELISA

Dafür wurden mit Kollagen Typ II inkubierte 96-Well-Platten mit BSA blockiert und danach die inaktivierten Yersinien-Stämme addiert. Erstantikörper: Anti-WA-C (1:10000), Zweitantikörper: AP-conj. Goat-Anti-Rabbit-IgG (1:5000). Entwicklung mit pNPP und Messung der Extinktion bei 405 nm im Photometer gegen einen Leerwert.

Proben: **a:** WA(pYVO8-A-0) = Negativkontrolle
b: WA(pYVO8-A-1) = Positivkontrolle
c: WA(pYVO8-A-N), **d:** WA(pYVO8-A-S1), **e:** WA(pYVO8-A-S2),
f: WA(pYVO8-A-S3), **g:** WA(pYVO8-A-S4), **h:** WA(pYVO8-A-H),
i: WA(pYVO8-A-HNS1), **j:** WA(pYVO8-A-HNS2),
k: WA(pYVO8-A-HNS3), **l:** WA(pYVO8-A-HNS4),
m: WA(pYVO8-A-HNS5), **n:** WA(pYVO8-A-X-Neck),
o: WA(pYVO8-A-X-Stalk), **p:** WA(pYVO8-A-X-Loop)

| <u>Stamm</u> | <u>Zelladhärenz</u> |
|---------------------------|---------------------|
| WA-314 (Positivkontrolle) | +++ |
| WA-C (Negativkontrolle) | - |
| WA(pYVO8-A-H) | - |
| WA(pYVO8-A-HNS1) | - |
| WA(pYVO8-A-HNS2) | - |
| WA(pYVO8-A-HNS3) | - |
| WA(pYVO8-A-HNS4) | - |
| WA(pYVO8-A-HNS5) | - |
| WA(pYVO8-A-N) | - |
| WA(pYVO8-A-S1) | +++ |
| WA(pYVO8-A-S2) | +++ |
| WA(pYVO8-A-S3) | +++ |
| WA(pYVO8-A-S4) | +++ |
| WA(pYVO8-A-X-Neck) | - |
| WA(pYVO8-A-X-Stalk) | +++ |
| WA(pYVO8-A-X-Loop) | + |

Tabelle 4: Zelladhärenztest

Die Zahl von an Zellen haftenden Yersinien pro Gesichtsfeld wurde jeweils bestimmt. Der errechnete Mittelwert der Zellzahl aus drei Versuchen wurde für die Auswertung verwendet. Die Zellen wurden von drei unabhängigen Untersuchern mikroskopisch gezählt.
 +++ => 10 Bakterien pro Gesichtsfeld
 + = 1-10 Bakterien pro Gesichtsfeld
 - = keine Zelladhärenz

3.7.2 Adhärenzverhalten der FimH-YadA-Hybride mit Hefezellen

Die Westernblots der Gesamtzelllysate (siehe Abb.11, Blot B), sowie die Agglutinations- und Immunfluoreszenztests (siehe Tabelle 3) machten eine Oberflächenexpression der FimH-YadA-Hybride bereits unwahrscheinlich. Um zu untersuchen, ob sich dies auch in einem Funktionstest der FimH-Komponente widerspiegeln sollte, wurde deren Bindungsfähigkeit an Hefezellen analysiert. Zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens der FimH-YadA-Konstrukte mit Hefezellen wurden die Hybridproteine in den *yadA*-negativen Yersinienstamm WA(pYVO8-A-0) und zusätzlich in den FimH negativen *E. coli*-Stamm ORN172 transformiert. Sowohl Yersinien als auch *E. coli* wurden daraufhin mit einer Hefezellsuspension vermischt. Tabelle 5 zeigt das Resultat des Versuchs. Danach war keines der beiden Hybridkonstrukte, gleich ob in Yersinien oder *E. coli*, in der Lage, mit Hefezellen zu agglutinieren.

Somit lässt sich feststellen, dass die mannosebindende Funktion von FimH im Hybridprotein nicht nachgewiesen werden konnte.

Da also bei den FimH-YadA-Hybriden weder eine Expression und Oberflächenlokalisierung, noch die FimH-Funktion der Mannosebindung nachgewiesen werden konnte, wurde bei ihnen auf weitere Funktionsuntersuchungen verzichtet.

| Stamm | Hefezellagglutination |
|---|------------------------------|
| ORN115 (Positivkontrolle) | +++ |
| ORN172 (Negativkontrolle für <i>E. coli</i>) | - |
| WA-C (Negativkontrolle für Yersinien) | - |
| ORN172(pUC-A-FimH158) | - |
| ORN172(pUC-A-FimH217) | - |
| WA(pYVO8-A-FimH158) | - |
| WA(pYVO8-A-FimH217) | - |

Tabelle 5: Hefezellagglutinationstest der FimH-YadA-Hybride

Über Nacht bei 37°C angezüchtete Stämme wurden auf eine OD₅₅₀ von 0,5 in PBS verdünnt und auf Objektträgern mit einer 1%-igen Hefezellsuspension vermischt. Die Agglutinationsfähigkeit der Stämme wurde von 3 unabhängigen Untersuchern bewertet.

+++ = sehr deutliche Agglutination

- = keine erkennbare Agglutination

3.8 Serumresistenz der YadA-Mutanten

Dass YadA die Serumresistenz von *Y. enterocolitica* verursacht, ist schon lange bekannt. Der zugrundeliegende Mechanismus ist allerdings bis heute unklar. Zur Durchführung des Serumresistenztests wurde ein 50%iger Serumpool von gesunden menschlichen Blutspendern mit Yersinien, die die YadA-Konstrukte exprimierten, zusammengebracht. Tabelle 6 zeigt die verschiedenen Überlebensraten der Bakterien mit der entsprechenden YadA-Mutation nach 90 Minuten Serumkontakt. Eine dreimalige Wiederholung des Versuchs führte zu leichten Schwankungen in den Überlebensraten, veränderte dabei aber nicht die Relation der Ergebnisse zueinander.

| Stamm | Durchschnittlich Überlebende in Prozent ± ±Standardabweichung nach 90 min |
|----------------------------------|--|
| WA(pYVO8-A-1) (Positivkontrolle) | 82 ± 41 |
| WA(pYVO8-A-0) (Negativkontrolle) | 7 ± 26 |
| WA(pYVO8-A-N) | 102 ± 41 |
| WA(pYVO8-A-S1) | 164 ± 43 |
| WA(pYVO8-A-S2) | 90 ± 38 |
| WA(pYVO8-A-S3) | 111 ± 43 |
| WA(pYVO8-A-S4) | 1 ± 1 |
| WA(pYVO8-A-H) | 104 ± 11 |
| WA(pYVO8-A-HNS1) | 81 ± 56 |
| WA(pYVO8-A-HNS2) | 0,084 ± 0,176 |
| WA(pYVO8-A-HNS3) | 0,08 ± 0,186 |
| WA(pYVO8-A-HNS4) | 6 ± 24 |
| WA(pYVO8-A-HNS5) | 2 ± 3 |
| WA(pYVO8-A-N1) | 112 ± 7 |
| WA(pYVO8-A-N2) | 0,086 ± 0,134 |
| WA(pYVO8-A-N3) | 6 ± 5 |
| WA(pYVO8-A-N4) | 5 ± 5 |
| WA(pYVO8-A-X-Neck) | 60 ± 30 |

Tabelle 6: Überlebensraten der Yersinien-Stämme WA im 50% Human-Serumpool bei 37°C
Die Anzahl der überlebenden Bakterien wurde durch Zählen von ausplattierten Kolonien bestimmt. Ein Wert von 100 % entspricht 5×10^5 Bakterien pro ml. Die Ergebnisse sind Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Bei dem Versuch auch der Wildtyp nicht ganz unversehrt: Durchschnittlich 82 % der wt-YadA-Yersinien überlebten die Inkubation, während von den YadA-negativen nur noch 7 % der ursprünglichen Yersinien vorhanden waren.

Die Neck-Region hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Überlebensrate: So waren weder die A-N-Mutanten mit völliger Deletion des Necks noch die Variante A-X-Neck mit einer FaktorXa-Schnittstelle in dieser Region gegenüber den Wildtypbakterien benachteiligt.

Ebensowenig ist die Kopfreion für das Überleben der Bakterien im menschlichen Serum notwendig, denn sowohl die kopflosen A-H-Mutanten als auch der A-HNS1-Stamm, dem der Kopf sowie das erste 15mer Repeat des Stiel fehlt, blieben im Serumresistenztest unversehrt. Eine weitere Verkürzung des Stalks in den Mutanten A-HNS2 bis A-HNS5 führte jedoch zu einer Reduktion der Überlebensrate auf ein Niveau, das mit dem YadA-negativer Yersinien vergleichbar war.

Dass jedoch auch die Stalk-Region nicht allein für die Serumresistenz verantwortlich sein kann, belegen die Testergebnisse der A-S Stämme, die zwar Kopf- und Neck-Region besitzen, deren Stalks jedoch ebenfalls verkürzt sind: Die Länge des Stiels von A-S2 entspricht exakt der des Stiels in A-HNS-2 (jeweils Repeats 3-7). Auch die Stalks von A-S3 und A-HNS-3 entsprechen einander (jeweils Repeats 5-7). Trotzdem überlebten die Mutanten A-S2 und A-S3 die Seruminkubation, nicht aber die entsprechenden A-HNS-Varianten. Nur A-S4, bei dem direkt auf die Linking-Domäne die Head-Neck-Region folgt und somit der Stalk völlig fehlt, überlebte den 90-minütigen Kontakt mit dem Serumpool nicht.

Auch die Möglichkeit, dass die Neck-Region einen stabilisierenden Einfluss auf das YadA-Molekül besitzt und somit die Serumresistenz begünstigt, konnte ausgeschlossen werden: Dazu wurden die vier Mutanten A-N1 bis A-N4 konstruiert, die den vier A-HNS-Mutanten mit jeweils aufgesetzter Neck-Domäne entsprachen. diese verhielten sich aber identisch zu den A-HNS-Konstrukten.

Somit lassen die Versuchsergebnisse keine YadA-Domäne als Verursacher der Serumresistenz erkennen.

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit durch Deletionsmutagene, FLAG-Fusionen und Einfügen von Proteaseschnittstellen erstellten YadA-Mutanten führten zu neuen Erkenntnissen über strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Adhäsins.

Im Hinblick auf die Struktur von YadA wurden neue Einblicke in die Translokation des Proteins durch die Außenmembran und seine dabei erfolgende Oligomerisierung gewonnen. Zusätzlich wurde versucht, Proteaseschnittstellen in das Adhäsins einzubauen und FimH-YadA-Chimären zu erstellen, um Hinweise über die Struktur und deren Beeinflussungsmöglichkeit zu erlangen.

Auch die Virulenzfunktionen des Adhäsins, wie Kollagen- und Zelladhärenz, sowie Serumresistenz, konnten anhand der Konstrukte neu beurteilt werden.

Head-, Neck- und Stalk-Domäne wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von *in-frame*-Deletionsmutanten näher untersucht.

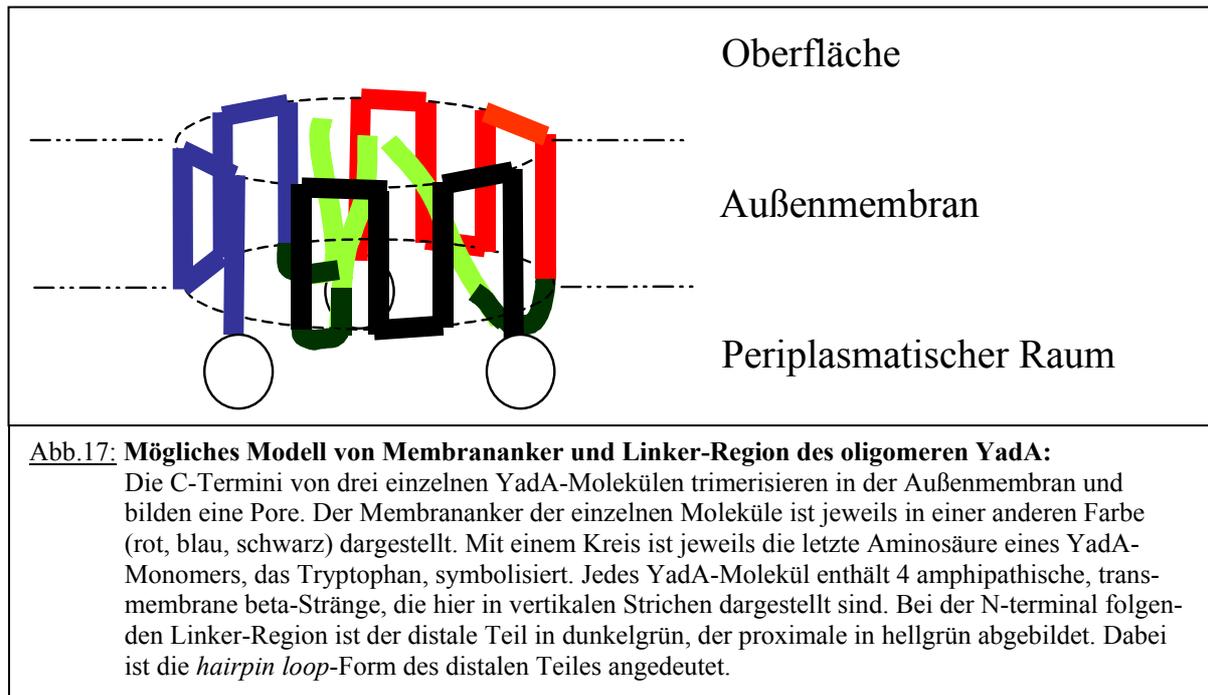
Es zeigte sich, dass eine Deletion des Kopfes, der Neck-Region oder einzelner oder mehrerer Repeats des *coiled-coil*-Stiels die Expression des Proteins, seine Translokation durch die Außenmembran und Oberflächenlokalisierung, sowie seine Oligomerisierung nicht beeinflusste. Es konnte auch eine von Hoiczky et al. 2000 postulierte Stabilisierung der Multimere durch die *coiled-coils* des Stiels nicht nachgewiesen werden, da alle Mutanten, auch die ohne Stiel-Region, wie der Wildtyp gleichermaßen bei 100°C ab einer 3-molaren Harnstoffkonzentration in Monomere dissoziierten und auch sonst in keinem Blot eines Zellysats oder einer Außenmembranpräparation unterschiedlich oligomerisierten.

Die zwei *in-frame*-Deletionen (L1 und L2) in der Linker-Region, dem Übergang vom Stiel zum Membrananker, konnten nicht exprimiert werden. Vermutlich wurden diese Konstrukte von periplasmatischen Proteasen zerstört, womit die Linker-Region einen essentiellen Bereich für die Membraninsertion von YadA darstellt. So müssen beide Bereiche dieser Region unentbehrlich sein: Einerseits der in L1 deletierte proximale Teil mit den zwei bis drei Heptamer-Repeats, die ein linkshändiges *coiled-coil* bilden sollen (Hoiczky et al., 2000), welches nach dem rechtshändigen *coiled-coil* der Stiel-Region folgt, zum anderen auch der distale Bereich als Verbindungsstück zum Membrananker. Anhand der Immunfluoreszenzuntersuchung von A-HNS4-FLAG und A-HNS5-FLAG konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das linkshändige *coiled-coil*-Segment vermutlich oberflächenexponiert ist, während sich das distale Verbindungsstück undetektierbar im Barrel befindet.

Betrachtete man in diesem Zusammenhang die Zugänglichkeit der Proteaseschnittstelle in den drei Faktor Xa-Mutanten, so stellte sich heraus, dass nur A-X-Neck mit einer Schnittstelle in der oberflächenexponierten Neck-Region von der Protease erkannt und gespalten wurde. Die anderen beiden Mutanten, mit Schnittstellen unterhalb des Stiels im proximalen Teil der Linker-Region (A-X-Stalk) und in einer hydrophilen und darum vermutlich extrazellulär gelegenen Schleife des Membranankers (A-X-Loop), ließen sich nicht durch Faktor Xa spalten. Somit waren diese beiden Schnittstellen für die Protease auf der Oberfläche der Bakterien schlecht zugänglich. Folglich war, wie man es erwarten würde, die Funktionsfähigkeit der Protease von dem ausgewählten Mutationsort abhängig. Auch die spaltbare A-X-Neck-Mutante warf weitere Fragen auf. Im Westernblot des Faktor Xa-Verdau-Überstandes erkannte man deutlich drei Banden bei ca. 15, 25 und 35 kDa. Vermutlich handelte es sich bei der untersten Bande um das abgetrennte monomere YadA-Kopf-Fragment, dessen Größe rechnerisch etwa 17 kDa betragen sollte. Ob die beiden oberen Fragmente jedoch Multimere dieses Fragments darstellen, ist unklar. So könnte das 35-kDa-Fragment evtl. ein Dimer aus zwei monomeren Kopffragmenten sein, für ein Trimer wäre das geoelektrophoretische Laufverhalten zu hoch. Andererseits findet man bei nativem YadA niemals Banden, die für YadA-Dimere sprechen würden. So lässt sich nur spekulieren, wie die beiden oberen Banden entstanden sind. Eventuell ist diese ungewöhnliche Dreierbande ein Zeichen für die ohne Membrananker- und Linker-Region gestörte Polymerisierung des abgetrennten YadA-Kopfes.

Wenn man wie bei allen anderen Außenmembranproteinen davon ausgeht, dass sich die letzte Aminosäure des Proteins, im Fall von YadA das Tryptophan, an der Innenseite der Außenmembran verankert, so muss N-terminal betrachtet das erste der vier amphipathischen β -Faltblätter von innen nach außen verlaufen und somit über eine Schleife mit dem linkshändigen *coiled-coil*-Segment verbunden sein. Damit lässt sich vermuten, dass das distale Verbindungsstück der Linker-Region eine kurze *hairpin loop* ausbildet. So trägt diese kleine Schlinge, möglicherweise zusammen mit dem linkshändigen *coiled-coil*-Segment, dazu bei, den oberflächenexponierten N-terminalen Teil des Proteins, folglich Head-, Neck- und Stalk-Region, durch die Pore zu translozieren. Abb.17 zeigt ein mögliches Modell für die Position der Linker-Region.

Nicht nur bei YadA wurde eine für die Translokation des externen Proteinteiles wichtige Linker-Region entdeckt, auch im AIDA-I-Autotransporter enteropathogener *E. coli* wurde ein derartiger Bereich charakterisiert (Maurer et al., 1999).



Auch dort fehlten bei Deletion dieser Region jegliche Zeichen einer Expression des Proteins im Westernblot. So bezeichneten Maurer et al. die Kombination aus Linker-Region und Membrananker als Translokationseinheit, die für die effektive Durchschleusung der Passenger-Domäne vorhanden sein musste. Große Sequenzhomologien konnten allerdings zwischen der Linker-Region von YadA und AIDA-I nicht festgestellt werden. Der Grund dafür liegt möglicherweise in dem unterschiedlichen Strukturaufbau der beiden Proteine, da AIDA-I kein Homooligomer, sondern ein Monomer ist.

Tamm et al. zeigten bereits 1993, dass eine Deletion der C-terminalen Region von YadA zu einem Fehlen des Proteins in der Außenmembran führte und folgerten daraus, dass sich das Protein von seinem C-Terminus aus in die Membran einbaute. Darüber hinaus vermuteten sie einen Einfluss der Membranankerregion auf die Oligomerisierung. Diese Resultate wurden durch die in dieser Arbeit durchgeführten *in-frame*-Deletionen, die Bildung von Heterooligomeren und YadA-FLAG-Fusionen unterstützt. Weder die Deletion von Kopf-, Neck- oder Stiel-Region führte nämlich zu einer herabgesetzten Expression oder gestörten Oligomerisierung der Mutanten in der Außenmembran, womit diese Regionen für die Insertion und Multimerenbildung von YadA unwichtig erschienen.

Heterooligomere aus A-HNS4 und dem Wildtyp A-1 bildeten deutliche Banden aus und stellten damit exprimierbare und polymerisierte Kombinationen aus Membrananker- und Wildtypmonomeren dar. Sogar das Konstrukt A-HNS5-FLAG, welches ein YadA-Molekül

exprimierte, das nur noch den Membrananker einschließlich seiner distalen Linker-Region besaß, konnte in der Außenmembranpräparation klar als Oligomer nachgewiesen werden.

Der YadA-Membrananker alleine wurde also problemlos in die Außenmembran eingebaut und war damit der für Insertion und Oligomerisierung entscheidende Bereich.

Allerdings war die Anzahl der Monomere, die ein vollständiges YadA-Molekül bilden, bislang umstritten. So vermuteten Skurnik & Wolf-Watz 1989 aufgrund des Laufverhaltens in der SDS-PAGE vier bis fünf Monomere, Mack et al. 1994 und Gripenberg-Lerche et al. 1995 dagegen drei. 2000 errechneten Hoiczky et al. mit Hilfe der Proteindichte und des Molekularvolumens der YadA-Kopfdomäne eine vermutete Anzahl von vier Monomeren. Die Ergebnisse dieser Arbeit und der darauf beruhenden Veröffentlichung (Roggenkamp et al., 2003) zeigten jedoch mit der Methode der Koexpression eines Wildtyp-YadA-Genes und eines kopflosen YadA-Genes eindeutig vier Banden im Westernblot, welche als die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten eines trimeren YadA-Proteins gedeutet werden mussten, was somit Mack et al. und Gripenberg-Lerche et al. bestätigte. Somit bilden dreimal vier amphipathische β -Faltblätter der Membrananker-Region eine in der Außenmembran gelegene Pore, durch die der N-terminale Teil des Proteins treten kann (siehe Abb.17).

Die Untersuchung der einzelnen Domänen ließ folglich erkennen, dass YadA eine für Autotransporter typische Struktur zeigt: Eine N-terminale Sec-abhängige Signalsequenz (as 1-25), mit der sich das Protein durch den Sec-Apparat der Innenmembran schleust, eine darauf folgende Passenger-Domäne (Kopf-, Neck- und *coiled-coil*-Stielregion (as 26-330)), die bemerkenswerterweise auch nach der Translokation kovalent gebunden bleibt und nicht, wie beim größten Teil der Autotransporter, abgespalten wird, eine Linker-Region (as 331-369), die für die Durchschleusung der Passenger-Domäne durch die Außenmembran notwendig ist, und eine C-terminale membranspannende Region aus vier amphipathischen β -Faltblättern (as 370-422), mit der die Insertion des Proteins in die Außenmembran erfolgt. Dieser Membrananker ist besonders interessant, da er bei regulären Autotransportern eine β -Barrel-Pore bildet, durch die sich die Passenger-Domäne fädelt und in den Extrazellulärraum tritt. Allerdings sind solche Poren fast immer erst bei einer Anzahl von mehr als 12 amphipathischen β -Faltblättern zu erwarten, wie zahlreiche kristallisierte β -Barrel-Proteine gezeigt haben (Schulz, 2002). Die bislang einzige Ausnahme stellt das Außenmembranprotein TolC dar, das aus drei identischen Monomeren mit je 4 amphipathischen β -Faltblättern einen homotrimeren Kanal mit einem Durchmesser von 3,5 nm bildet (Koronakis et al., 2000). Dass das Yersinia-Adhäsins A ein Oligomer aus mehreren identischen Untereinheiten darstellt, ist schon lange bekannt. Somit ist eine mit TolC vergleichbare Porenbildung zu vermuten. Diese

Besonderheit der Oligomerenbildung zusammen mit dem Auftreten von *coiled-coils* hat dazu geführt, YadA zum Prototyp einer neuen Unterfamilie von Nicht-Fimbrien-Adhäsinen zuzuordnen und dieser den Namen Oca (oligomere *coiled-coil*-Adhäsine) zu geben (Roggenkamp et al., 2003).

Berücksichtigt man die Resultate zur Bedeutung des Membranankers für Insertion und Oligomerisierung und die Ergebnisse zum Einfluss der Linker-Region auf die Oberflächenexposition, so könnte man für die letzten 91 Aminosäuren von YadA (Linker-Region und Membrananker aus 4 amphipathischen β -Faltblättern) ebenfalls den Begriff der Translokationseinheit einführen. Bemerkenswerterweise ist gerade diese Domäne in der Klasse der Oca-Proteine am höchsten konserviert. Auch die Datenbank für konservierte Domänen in Proteinen Pfam definiert die Klasse der YadA-homologen Oca-Proteine anhand ihrer Homologie in der Membranankerregion und vermerkt, dass vermutlich alle Mitglieder der Oca-Familie oligomere Autotransporter in der Außenmembran darstellen, so u.a. UspA2 von *M. catarrhalis*, DsrA von *H. ducreyi* und die IgG und IgA bindenden Eib-Proteine von *E. coli* (pfam03895). Auch Hia von *H. influenzae* ließ sich vor kurzem eindeutig zur Gruppe der Oca-Proteine zuordnen. So stellten St. Geme & Cutter im Jahr 2000 dar, dass Hia zur Gruppe der Autotransporter zu zählen ist und forderten, dass die C-terminalen 319 Aminosäuren eines einzigen Hia-Moleküls ein β -Barrel aus 14 antiparallelen amphipathischen β -Faltblattstrukturen aufbauten. Dies widersprach der Vorstellung, dass alle Oca-Proteine ein oligomeres β -Barrel aufgrund ihrer konservierten Translokationseinheit bilden würden. Auch die Bildung hoher Molekulargewichtskomplexe im SDS-PAGE durch Hia, die ein Hinweis auf Hia-Oligomere war, ließ sich durch diesen Ansatz nicht erklären. Vor kurzem wurde nun aber dieses Adhäsins einer gründlichen Analyse in Hinsicht auf Außenmembraninsertion, Translokation und Oligomerisierung unterzogen (Surana et al., 2004). Dabei stellte sich heraus, dass die letzten 76 Aminosäuren von Hia, folglich 4 transmembranale amphipathische β -Faltblattstrukturen (as 1047-1098) und eine Linker-Region (as 1023-1047), ausreichten, um seine Passenger-Domäne zu translozieren. Aufgrund ihrer Ergebnisse schlossen Surana et al., dass auch Hia zu der Oca-Unterfamilie gehört, die sich durch oligomere Proteine und eine kleine Translokationseinheit auszeichnet.

Die Expression von *fimH-yadA*-Fusionsgenen war nicht nachweisbar. Sie ließen sich im Gesamtzelllysat nicht darstellen und waren in der Immunfluoreszenz nicht detektierbar, so dass auf eine Außenmembranpräparation verzichtet wurde. So verwunderte es auch nicht, dass eine Bindung des FimH-YadA an Mannosereste im Hefezellagglutinationstest nicht nachweisbar war. Man kann davon ausgehen, dass diese Fusionsproteine bereits im

Periplasma durch Proteasen stark zerstört wurden. Die Ursachen dafür könnten vielfältig sein. So wäre es möglich, dass YadA eine sehr auf seine Passenger-Domäne spezialisierte β -Barrel-Pore besitzt. Andererseits könnte die Ursache des Problems auch bei FimH liegen, denn dieses Protein benötigt in seiner nativen Form das Chaperon FimC, um seine funktionale Struktur zu erhalten und nicht im periplasmatischen Raum zerstört zu werden (Tewari et al., 1993). Darum könnte der Mangel an FimC auch bei den FimH-YadA-Hybridproteinen zu einer Beeinträchtigung des FimH-Anteils führen. Weiterhin bemerkenswert ist die Tatsache, dass in dem gesamten nativen YadA-Molekül kein einziges Cystein vorkommt, während in FimH Cysteine an den Positionen 24, 65, 182 und 208 stehen. FimH könnte im Periplasma Disulfidbrücken ausbilden, die möglicherweise die Translokation der Passenger-Domäne durch die Pore stark behindern. Dagegen konnte bei einem anderen monomeren Autotransporter, Ag43, gezeigt werden, dass sein β -Barrel trotz Disulfidbrücken die Lektin-Domäne von FimH problemlos translozierte (Kjaergaard et al., 2002). Es handelte sich dabei aber nicht um einen trimeren Autotransporter, so dass sich die Frage stellt, ob ein multimeres Protein nicht ganz speziell abgestimmte Monomere benötigt. Ein in nativer Form monomeres Adhäsion wie FimH in das trimere System von YadA hineinzuzwängen, könnte darum Schwierigkeiten bereiten. Es ist durchaus vorstellbar, dass die drei YadA-Monomere zur Bildung der adhäsiven Kopffregion genauso ineinander verwoben sind wie in der *coiled-coil*-Region des Stiels und somit eine äußerst komplexe Quartärstruktur vorherrscht. Nummelin et al. bestätigten vor kurzem (2004) durch eine Darstellung der Kristallstruktur der Kollagenbindenden Domäne von YadA (Kopf- und Neck-Region) den komplexen und verwobenen Aufbau dieser Region. So sind demnach die drei Monomere fest miteinander verbunden und durch eine N-terminale (entspricht as 41-50 der Kopf-Region) und eine C-terminale Windung (entspricht der Neck-Region) gleichsam ineinander verschraubt. Somit ist diese komplexe Quartärstruktur durch den Austausch des Trimer-Kopfes mit drei FimH-Lektindomänen erheblich beeinträchtigt. Darum erscheint es für zukünftige Fusionsexperimente eher sinnvoll, kleinere Bereiche von YadA mit kurzen Fremdpeptidsequenzen zu ersetzen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die Fusion mit einer acht Aminosäuren langen FLAG-Epitopsequenz oder auch der Austausch von vier Aminosäuren zur Konstruktion von Faktor Xa-Proteaseschnittstellen zu keiner eingeschränkten Expression der Mutanten führte. Auch die Oligomerisierung war in diesen Konstrukten nicht beeinträchtigt.

Ein besonders interessanter Bereich in der Passenger-Domäne ist die zwischen Kopf und Stiel gelegene Neck-Region. Diese Sequenz aus ca. 20 Aminosäuren findet sich gut konserviert auch in anderen Mitgliedern der Oca-Familie. In manchen YadA-homologen Genen tritt diese

Region sogar in vielfacher Kopienzahl auf, so z.B. zehnmal in einem Gen, das alle vier *Salmonella*-Spezies besitzen oder auch fünfzehnmal in einem Gen von *Xylella fastidiosa* (Hoiczky et al., 2000). Deshalb könnte dieser Region eine besondere Aufgabe in der Funktion von YadA zukommen. Da die Serumresistenz eine häufige Eigenschaft von Mitgliedern aus der Oca-Familie ist, konnte man vermuten, dass die gut konservierte Neck-Region dazu auf irgendeine Weise beiträgt. Diese Hypothese ließ sich aber nicht bestätigen. Die Deletion der Neck-Region führte nicht zum Verlust der Eigenschaft „Serumresistenz“. Es war ebenso wenig möglich, durch Übertragung der Neck-Region auf die serumsensitiven YadA-Mutanten A-HNS2 bis -4 diese resistenter gegen Komplementlyse zu machen. Es konnte kein Einfluss der Domäne auf die Serumresistenz festgestellt werden.

Interessant war jedoch das Verhalten der Neck-negativen Mutante A-N und der Faktor Xa-Mutante A-X-Neck im Kollagen- und Zelladhärenztest. Beide wiesen keine Bindungsfähigkeit mehr auf, sondern verhielten sich wie ein YadA-negativer Kontrollstamm. Dies erweitert die bisherigen Erkenntnisse über die Kollagenbindungsregion von YadA. 1995 zeigten Roggenkamp et al. die Wichtigkeit der beiden Histidine an den Positionen 156 und 159 für die Kollagenadhäsion. Im Jahr 2000 beschrieben Tahir et al. ein repetitives Aminosäuremotiv (NSVAIG-S) in der Kopfdomäne, das für die Kollagenbindung von Bedeutung war. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Neck-Region ein wichtiger Bestandteil der Adhärenzfähigkeit von YadA an Kollagen und Epithelzellen ist. So stellte sich die Frage, ob diese Domäne direkt an der Adhärenz mitwirkt oder nur eine Art stabilisierender Plattform für die Bindungsdomänen im Kopf darstellt. Da sie aber recht konserviert auch bei anderen verwandten Proteinen auftritt, die keine Kollagenbindungsfähigkeit aufweisen, ist sie vermutlich eher ein Stabilisator von verschiedenen Adhäsionsdomänen. Diese Vermutung wurde nun durch die Analyse der Kristallstruktur der Kollagenbindungsdomäne von YadA durch Nummelin et al. (2004) bestätigt. Demnach wirkt die Neck-Region wie eine Kontermutter, verschraubt die drei Monomere ineinander und stabilisiert so die kollagenbindende Kopfreion. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im *Yersinia*-Adhäsins A die Adhärenz an Kollagen und epitheliale Zellen über ein Bindungsmodul aus Kopf- und Neck-Domäne vermittelt wird.

Die Deletion der Kopf-Region von YadA führte zu einer erstaunlichen Feststellung im Hinblick auf ihre Funktion bei der Serumresistenz. Die „kopfloose“ Mutante A-H erwies sich nämlich gegenüber dem menschlichen Serum als stark resistent und zeigte Überlebenszahlen wie der Wildtyp. Dieses Resultat führte dazu, noch weitere Deletionsmutanten auf ihre Serumresistenz zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass nicht nur die gesamte Kopfreion für

ein Überleben im Serum unnötig war, sondern zusätzlich, wie bei der Mutante A-HNS1, auch noch die Neck-Region und das erste Repeat der Stiel-Domäne. Die um ein weiteres Repeat verkürzte A-HNS2-Mutante überlebte dagegen nicht mehr, aber nach Fusion dieses Konstruktes mit der Kopf- und Neck-Region zu A-S2 war die Mutante ebenfalls wieder serumresistent. Dies stellte die 2000 von Hoiczky et al. formulierte Hypothese in Frage, nach der die Yersinie zum Schutz vor Antikörpern und Komplementsystem des Serums YadA in großer Menge produziere, um auf der gesamten Bakterienoberfläche die Köpfe der Moleküle miteinander zur Aggregation zu bringen und dadurch gleichsam eine zweite protektive Außenmembran zu errichten. Auf diese Weise würden sich die Lipopolysacchariden (LPS) der Bakterienmembran verdecken lassen, die ein häufiges Ziel von Komplement und Defensinen darstellten (Skurnik et al., 1999). Erstaunlicherweise ist aber das YadA-Molekül auch ohne Kopf und in verkürzter Länge fähig, einen ausreichenden Schutz vor den Attacken des humoralen Immunsystems zu gewährleisten. Gegen einen „Schutzpanzer“ aus YadA-Molekülen sprechen zusätzlich neuere Ergebnisse, nach denen YadA auch bei maximaler Expression in Minimalmedium bei 37°C das Bakterium nicht vollständig bedeckt und kleinere Proteine wie das Invasin Inv auch in Gegenwart des Adhäsins noch ihre Funktion erfüllen können (Eitel & Dersch, 2002). So scheint YadA also seinen Schutz vor menschlichem Serum auf andere, bisher noch ungeklärte Weise zu vermitteln. Die Vermessungsdaten aus den elektronenmikroskopischen Studien von Hoiczky et al. 2000 könnten vermuten lassen, dass eine bestimmte Länge des YadA-Moleküls notwendig ist, um die Eigenschaft der Serumresistenz zu ermöglichen. So hat ein Wildtyp-YadA-Molekül eine berechnete Länge von ca. 23 nm. Davon entfallen etwa 5 nm auf die Head-Neck-Region und 18 nm auf die Stiel-Region. Der verkürzte Stalk von A-HNS1 hat eine Länge von etwas mehr als 15 nm, da ihm das erste der sieben 15mer Repeats fehlt (rechnerisch: $18/7 \times 6$ nm). A-S3 als kleinste der resistenzvermittelnden YadA-Mutanten hat eine errechnete Gesamtlänge von 5 nm für die Head-Neck-Region plus knapp 8 nm für die um die ersten vier N-terminalen 15mer Repeats verkürzte Stalk-Region ($18/7 \times 3$). Der nicht mehr serumresistente A-HNS2 ist ebenfalls etwas weniger als 13 nm lang ($18/7 \times 5$). Somit könnte also eine Länge des Moleküls von etwa 13 nm als die für Serumresistenz notwendige Mindestlänge betrachtet werden. Vielleicht muss dieser sterische Abstand von der Bakterienoberfläche gegeben sein, um eine Insertion des terminalen lytischen Komplexes verhindern zu können. Zusätzlich wäre auch die Annahme von Hoiczky et al. möglich, dass YadA, wenn auch nicht als Kapsel, dennoch erfolgreich ab einer bestimmten Länge immunogene Lipopolysaccharide auf der Bakterienmembran maskieren könnte. So führten sie auch die unterschiedliche Größe des

Stalks bei Serotyp O3- und O8-Stämmen von *Y. enterocolitica* auf Serotyp-Variationen in der LPS-Länge zurück.

Es gelang in dieser Arbeit jedoch nicht, die Fähigkeit der Serumresistenz einer speziellen Domäne von YadA zuzuordnen. Nach durchgehender Analyse der Deletionsmutanten ist keine Domäne des Adhäsins für die Resistenz gegenüber der Komplementlyse entscheidend.

5. Zusammenfassung

Die humanpathogenen Bakterien *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* sind die Verursacher von Darminfekten wie Enteritis und Enterokolitis. Oftmals treten später langwierige immunologische Begleiterkrankungen in Form von Arthritiden auf. Auf einem 70-kb großen Virulenzplasmid sind zahlreiche Pathogenitätsfaktoren dieser Erreger kodiert. Einer von ihnen ist das äußere Membranprotein YadA, das bei *Y. enterocolitica* einen essentiellen Pathogenitätsfaktor darstellt. Seine virulenzassoziierten Eigenschaften sind die Fähigkeit zur Autoagglutination, die Bindung an Moleküle der extrazellulären Matrix, an Epithelzellen und Granulozyten, und die Vermittlung von Serumresistenz. Elektronenmikroskopische Untersuchungen und Sequenzvergleiche haben dazu beigetragen, mehr über die Struktur des Adhäsins zu erfahren.

Danach handelt es sich bei YadA um ein oligomeres lollipopförmiges Außenmembranprotein mit sechs verschiedenen Domänen:

N-terminaler Signalsequenz, Kopf, Neck, Stiel, Linker-Region und C-terminalem Membrananker.

Homologievergleiche zeigten, dass YadA den Prototyp einer in vielen Bakterienarten vertretenen Klasse von Nicht-Fimbrien-Adhäsinen darstellt.

Welchen Teil die verschiedenen Domänen des Proteins zur Struktur und Funktion beitragen, war bisher kaum bekannt. Auch der Versuch, dem Adhäsins durch einen Domänenaustausch völlig neue Bindungs- oder Reaktionseigenschaften zu vermitteln, war bislang nicht unternommen worden.

Darum wurden *in-frame*-Deletionsmutanten, mit FLAG-Epitopen oder FaktorXa-Proteaseschnittstellen versehene YadA-Mutanten erstellt und FimH-YadA-Hybridproteine konstruiert.

Die verschiedenen YadA-Mutanten wurden strukturell auf ihre Außenmembranlokation, Oberflächenexposition und Oligomerisierung untersucht, funktionell auf ihre Adhäsionseigenschaften und Serumresistenz.

Dabei konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

Kopf- und Stieldomäne bilden zusammen mit der interponierten, stark konservierten Neck-Region die translozierte, oberflächenexponierte Passenger-Domäne.

Die C-terminale Membranankerregion (aa 353-422) ist ausreichend für Insertion in die Außenmembran und Bildung eines trimeren YadA.

Die Linker-Region vermittelt die Translokation der Passenger-Domäne durch die Außenmembran.

Somit zeigte sich, dass YadA alle Kriterien für einen Autotransporter erfüllt.

Der Versuch, ein Hybridadhäsion mit Mannosebindungsfähigkeit durch Austausch der Kopfdomäne mit der Lektin-Domäne von FimH zu erzeugen, schlug fehl. Dies zeigt, wie empfindlich Passenger-Domäne und Membrananker von YadA aufeinander abgestimmt sind.

Die funktionelle Untersuchung der Mutanten ergab, dass die hochkonservierte Neck-Domäne zusammen mit der Kopfregion ein Bindungsmodul für Kollagen und Epithelzellen darstellt.

Im Serumresistenztest erwiesen sich Kopf-, Neck- und auch Teile der Stiel-Region für ein Überleben entbehrlich. Es zeigte sich, dass keine Domäne für die Serumresistenz von YadA entscheidend ist.

6. Literaturnachweise

Aleksic, S., Bockemühl, J. (1990): Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. *Immun. Infekt.*, 18, 178-185

Autenrieth, I. B., Firsching, R. (1996): Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J. Med. Microbiol.* 44:285-294.

Baddour, L. M., Christensen, G. D., Simpson, W. A., Beachey, E. H. (1990): Microbial adherence. In: Bennet, J. E. (Hrsg.) *Principles and practice of infectious disease*. 3. Aufl., Bd. 2, S. 9-25, Churchill Livingstone, New York.

Barenkamp, S. J., Leininger, E. (1992): Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 60,1302-1313.

Benz, I., Schmidt, M. A. (1992): AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol. Microbiol.*, 6, 1539-1546.

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.

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

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

Carter, P. B. (1975): Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect. Immun.*, 11, 164-170.

Choudhury, D., Thompson, A., Stojanoff, V., Langermann, S., Pinkner, J., Hultgren, S. J., Knight, S. D. (1999): X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 285, 1061-1066.

Comanducci, M., Bambini, S., Brunelli, B., Adu-Bobie, J., Arico, B., Capecchi, B., Giuliani, M. M., Masignani, V., Santini, L., Savino, S., Granoff, D. M., Caugant, D. A., Pizza, M., Rappuoli, R., Mora, M. (2002): NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med.*, 195, 1445-1454.

Cornelis, G. R. (2002): *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.*, 2002, 158, 401-408.

Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M. P., Stainier, I. (1998): The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 1315-1352.

Cover, T. L., Aber, R. C. (1989): *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.*, 321, 16-24.

Delor, I., Cornelis, G. R. (1992): Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect. Immun.*, 60, 4269-4277.

Desvaux, M., Parham, N. J., Henderson, I. R. (2003): The autotransporter secretion system. In Druck. <http://pasteur.fontismedia.com/infiles/out/res031162.pdf>

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

Emödy, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skurnik, M., Kapperud, G., O'Toole, P., Wadstrom, T. (1989): Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for YopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J. Bacteriol.*, 171, 6674-6679.

Elkins, C., Morrow, K. J., Jr., Olsen, B. (2000): Serum resistance in *Haemophilus ducreyi* requires outer membrane protein DsrA. *Infect. Immun.*, 68, 1608–1619.

Fink, D. L., Cope, L. D., Hansen, E. J., St. Geme, J. W., III (2001): The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter is a chymotrypsin clan serine protease and undergoes autoproteolysis via an intermolecular mechanism. *J. Biol. Chem.*, 276, 39492-39500.

Flügel, A., Schulze-Koops, H., Heesemann, J., Kuhn, K., Sorokin, L., Burkhardt, H., von der Mark, K., Emmrich, F. (1994): Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J. Biol. Chem.*, 269, 29732-29738.

Gbarah, A., Gahmberg, C. G., Ofek, I., Jacobi, U., Sharon, N. (1991): Identification of the leukocyte adhesion molecules CD11 and CD18 as receptors for type 1-fimbriated (mannose-specific) *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 59, 4524-4530.

Gemski, P., Lazere, J. R., Casey, T., Wohlhieter, J. A. (1980): Presence of a virulence-associated plasmid in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*, 28:1044-1047.

Giampapa, C. S., Abraham, S. N., Chiang, T. M., Beachey, E.H. (1988): Isolation and characterization of a receptor for type 1 fimbriae of *Escherichia coli* from guinea pig erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 263, 5362-5367.

Gripenberg-Lerche, C., Skurnik, M., Toivanen, P. (1995): Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: experimental studies with rats. *Infect Immun.*, 63, 3222-3226.

Hamburger, Z. A., Brown, M. S., Isberg, R. R., Bjorkman, P. J. (1999): Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science*, 286, 291-295.

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

Hanski, C. U., Kutschka, U., Schmoranz, H. P., Naumann, M., Stallmach, A., Hahn, H., Menge, H., Riecken, E. O. (1989): Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect. Immun.*, 57, 673-678.

Heesemann, J. (1991): [Diagnosis of infections with gene technology methods: an increased value of miasmata?]. *Immun. Infekt.*, 19, 137.

Heesemann, J., Keller, C., Morawa, R., Schmidt, N., Siemens, H. J., Laufs, R. (1983): Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J. Infect. Dis.*, 147:107-115.

Heesemann, J., Grüter L. (1987): Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 40, 37-41.

Henderson, I. R., Nataro, J. P. (2001): Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun.*, 69, 1231-1243.

Henderson, I. R., Nataro, J. P., Kaper, J. B., Meyer, T. F., Farrand, S. K., Burns, D. L., Finlay, B. B., St. Geme, J. W., III. (2000): Renaming protein secretion in the gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.*, 8, 352.

Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Nataro, J. P. (1998): The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.*, 6, 370-378.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., Pease, L. R. (1989): Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77, 51-59.

Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., Heesemann, J. (2000): Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.*, 19, 5989-5999.

Hoogkamp-Korstanje, J. A., de-Koning, J. (1990): Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia enterocolitica*-Infektionen. *Immun. Infekt.*, 18, 192-197.

Iriarte, M., Vanooteghem, J. C., Delor, I., Diaz, R., Knutton, S., Cornelis, G. R. (1993): The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.*, 9, 507-520.

Isberg, R. R., Swain, A., and Falkow, S. (1988): Analysis of expression and thermoregulation of *Yersinia pseudotuberculosis* inv gene with hybrid proteins. *Infect. Immun.*, 59, 2133-2138.

Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., Antoine, R. (2001): Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.*, 40, 306-313.

Jones, C. H., Pinkner, J. S., Nicholes, A. V., Slonim, L. N., Abraham, S. N., Hultgren, S. J. (1993): FimC is a periplasmic PapD-like chaperone that directs assembly of type 1 pili in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 8397-8401.

Jones, C. H., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Nicholes, A. V., Abraham, S. N., Hultgren, S. J. (1995): FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 2081-2085.

Kapperud, G., Namork, E., Skarpeid, H. J. (1985): Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*, 47, 561-566.

Kapperud, G., Namork, E. (1987): Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. Correlation with outer membrane protein YOP1, autoagglutination, and hemagglutination. *Contrib. Microbiol. Immunol.*, 9, 165-172.

Kjaergaard, K., Hasman, H., Schembri, M. A., Klemm, P. (2002): Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *J. Bacteriol.*, 184, 4197-4204.

Klemm, P. (Hrsg.) (1994): Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis and vaccines. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Klemm, P., Christiansen, G. (1990): The fimD gene required for cell surface localization of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. Mol. Gen. Genet., 220, 334-338.

Klemm, P., Jorgensen, B. J., van Die, I., de Ree, H., Bergmans, H. (1985): The fim genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*, cloning and genetic organization. Mol. Gen. Genet., 199, 410-414.

Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., Hughes, C. (2000): Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. Nature, 405, 914-919.

Kukkonen, M., Raunio, T., Virkola, R., Lahteenmaki, K., Makela, P. H., Klemm, P., Clegg, S., Korhonen, T. K. (1993): Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. Mol. Microbiol., 7, 229-237.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

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

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 19, 265-275.

Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, J. (1991): Predicting coiled coils from protein sequences. Science, 252, 1162-1164.

Mack, D., Heesemann, J., Laufs, R. (1994): Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA. *Med. Microbiol. Immunol.*, 183, 217-227.

Mantle, M., Basaraba, L., Peacock, S. C., Gall, D. G. (1989): Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect. Immun.*, 57, 3292-3299.

Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., Tolbert, N. E. (1978): A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, 87, 206-210.

Maurer, J., Jose, J., Meyer, T. F. (1999): Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J. Bacteriol.*, 181, 7014-7020.

Mikulskis, A. V., Delor, I., Thi, V. H., Cornelis, G. R. (1994): Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol. Microbiol.*, 14, 905-915.

Miller, V. L., Beer, K. B., Heusipp, G., Young, B. M., Wachtel, M. R. (2001): Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol. Microbiol.*, 41, 1053-1062.

Miller, V. L., Mekalanos, J. J. (1988): A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J. Bacteriol.*, 170, 2575-2583.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51, 263-273.

Nummelin, H., Merckel, M. C., Leo, J. C., Lankinen, H., Skurnik, M., Goldman, A. (2004): The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J.*, 23, 701-711.

Paerregaard, A., Espersen, F., Jensen, O. M., Skurnik, M. (1991): Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect. Immun.*, 59, 253-260.

Pepe, J. C., Miller, V. L. (1993): *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 6473-6477.

Pepe, J. C., Badger, J. L., Miller, V. L. (1994): Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* inv gene. *Mol. Microbiol.*, 11, 123-135.

Pepe, J. C., Wachtel, M. R., Wagar, E., Miller, V. L. (1995): Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect. Immun.*, 63, 4837-4848.

Perry, R. D., Balbo, P. B., Jones, H. A., Fetherston, J. D., DeMoll, E. (1999): Yersiniabactin from *Yersinia pestis* : biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology*, 145, 1181-1190.

Pilz, D., Wachter, E., Heesemann, J., Brade, V. (1991): Evasion of *Yersinia enterocolitica* serotype 03 from complement-mediated killing. *Behring Inst Mitt.*, 88, 183-193.

Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., Meyer, T. F. (1987): Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*; 325; 458-462.

Portnoy, D. A., Martinez, R. J. (1985): Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 118, 29-51.

Ray, S. K., Rajeshwari, R., Sharma, Y., Sonti, R. V. (2002): A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. *Mol. Microbiol.*, 46, 637-647.

Relman, D. A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R., Falkow, S. (1989): Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2637-2641.

Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C. A., Truelzsch, K., Hoffmann, H., Heesemann, J. (2003): Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J. Bacteriol.*, 185, 3735-3744.

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

Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R., Heesemann, J. (1996): Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect. Immun.*, 64, 2506-2514.

Rosqvist, R., Skurnik, M., Wolf-Watz, H. (1988): Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature*, 334, 522-524.

Sandt, C. H., Hill, C. W. (2001): Nonimmune binding of human immunoglobulin A (IgA) and IgG Fc by distinct sequence segments of the EibF cell surface protein of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 69, 7293-7303.

Schembri, M. A., Sokurenko, E. V., Klemm, P. (2000): Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. *Infect. Immun.*, 68, 2638-2646.

Schiemann, D. A. (1979): Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can. J. Microbiol.*, 25, 1298-1304.

Schulz, G. E. (2002): The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1565, 308-317.

Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., Kirsch, T., Swoboda, B., Bull, C., Goodman, S., Emmrich, F. (1993): Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect. Immun.*, 61, 2513-2519.

Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., von der Mark, K., Emmrich, F. (1992): Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect. Immun.*, 60, 2153-2159.

Skurnik, M., Bolin, I., Heikkinen, H., Piha, S., Wolf-Watz, H. (1984): Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J. Bacteriol.*, 158, 1033-1036.

Skurnik, M., Toivanen, P. (1992): LcrF is the temperature-regulated activator of the YadA gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 174, 2047-2051.

Skurnik, M., Venho, R., Bengoechea, J. A., Moriyon, I. (1999): The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. *Mol Microbiol.*, 31, 1443-1462.

Skurnik, M., Wolf-Watz, H. (1989): Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol. Microbiol.*, 3, 517-529.

Sokurenko, E. V., Courtney, H. S., Ohman, D. E., Klemm, P., Hasty, D. L. (1994): FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *J. Bacteriol.*, 176, 748-755.

Sory, M. P., Tollenaere, J., Laszlo, C., Biot, T., Cornelis, G. R., Wauters, G. (1990): Detection of pYV+ *Yersinia enterocolitica* isolates by P1 slide agglutination. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 2403-2408.

Spears, P. A., Schauer, D., Orndorff, P. E. (1986): Metastable regulation of type 1 piliation in *Escherichia coli* and isolation and characterization of a phenotypically stable mutant. *J. Bacteriol.*, 168, 179-185.

St. Geme, J. W., III, Cutter, D. (2000): The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J. Bacteriol.*, 182, 6005-6013.

Surana, N. K., Cutter, D., Barenkamp, S. J., St. Geme, J. W., III. (2004): The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short, trimeric translocator domain. *J. Biol. Chem.*, im Druck

Svanborg, C., Ørskov, F., Ørskov, I. (1994): Fimbriae and disease. In: Klemm, P. (Hrsg.) *Fimbriae, adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines*. S. 239-254. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Tahir, Y. E., Kuusela, P., Skurnik, M. (2000): Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification of eight NSVAIG - S motifs in the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. *Mol. Microbiol.*, 37, 192-206.

Tahir, Y. E., Skurnik, M. (2001): YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, 209-18.

Tamm, A., Tarkkanen, A., Korhonen, P. K., Toivanen, P., Skurnik, M. (1993): Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.*, 10, 995-1011.

Tertti, R., Skurnik, M., Vartio, T., Kuusela, P. (1992): Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect. Immun.*, 60, 3021-3024.

Tewari, R., MacGregor, J. I., Ikeda, T., Little, J. R., Hultgren, S. J., Abraham, S. N. (1993): Neutrophil activation by nascent FimH subunits of type 1 fimbriae purified from the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 268, 3009-3015.

Tran Van Nhieu, G., Isberg, R. R. (1993): Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *EMBO J.*, 12, 1887-1895.

Visser, L. G., Hiemstra, P. S., van den Barselaar, M. T., Ballieux, P. A., van Furth, R. (1996): Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect Immun.*, 64, 1653-1658.

Vogel, U., Autenrieth, I. B., Berner, R., Heesemann, J. (1993): Role of plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* in humoral immunity against secondary *Y. enterocolitica* infection in mice. *Microb. Pathog.*, 15, 23-36.

Wachtel, M. R., Miller, V. L. (1995): In vitro and in vivo characterization of an ail mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 63, 2541-2548.

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

Woodall, L. D., Russell, P. W., Harris, S. L., Orndorff, P. E. (1993): Rapid, synchronous, and stable induction of type 1 piliation in *Escherichia coli* by using a chromosomal lacUV5 promoter. *J. Bacteriol.*, 175, 2770-2778.

Lebenslauf

Nikolaus Konrad Maria Ackermann

Geburtsdatum: 4. September 1976
Geburtsort: München
Familienstand: ledig

Berufserfahrung

Ab Oktober 2004 Assistenzarzt an der Abteilung für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums Heidelberg bei Prof. Dr. W. Stremmel

Oktober 2002 bis September 2003 Praktisches Jahr in der Inneren Medizin - Abteilung Kardiologie am Klinikum Großhadern München der Ludwig-Maximilians-Universität, in der Chirurgie am Lehr-Krankenhaus München-Schwabing und in der Neuropathologie am Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Februar bis März 2002 Famulatur in der dermatologischen Praxis von Dr. Stefan Emme, München

August bis Oktober 2001 Famulatur in der Radiologie am Institut für klinische Radiologie im Klinikum Großhadern München

März bis April 2001 Famulatur in der mikrobiologischen Labordiagnostik und Antibiotikatestung am Max von Pettenkofer-Institut München

April 2000 bis Oktober 2002 Experimentelle Doktorarbeit in der Mikrobiologie am Max von Pettenkofer-Institut München; Mitglied des Graduiertenkollegs für Infektion und Immunität; Thema „Strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Yersinia Adhäsins YadA“

Veröffentlichung

Juli 2003 Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C. A., Truelzsch, K., Hoffmann, H., Heesemann, J. (2003): Molecular analysis of transport and oligomerization of the Yersinia enterocolitica adhesin YadA. J. Bacteriol., 185, 3735-3744.

Ausbildung

April 2004 Drittes Staatsexamen

September 2002 Zweites Staatsexamen

April 2000 Erstes Staatsexamen

April 1999 Physikum

Mai 1997 Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Juli 1996 bis April 1997 Zehnmonatiger Grundwehrdienst bei der Luftwaffe der Bundeswehr

Juni 1996 Abitur am Augustinus-Gymnasium in Weiden in der Oberpfalz

München, den 20.09.2004



Nikolaus Ackermann