

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
zur Erlangung des Dr. rer. nat.



**Systematische Analyse der Interaktionen von  
Proteinen des *Yersinia enterocolitica*  
pYV Virulenzplasmids**

vorgelegt von  
Ekaterina Edle von Dall'Armi  
aus Tbilisi

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Angelika Boettger
  2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ute C. Vothknecht
- Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas

Eingereicht am: 14 September 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 24 April 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2006 bis Juli 2011 am Max-von-Pettenkofer Institut in München angefertigt.

### **Im Verlauf der Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:**

**Ekaterina v. Dall'Armi**<sup>1</sup>, Manfred Kögl<sup>2</sup>, Caroline C. Friedel<sup>4,7</sup>, Thorsten Stellberger<sup>3</sup>, Susanne M. Bailer<sup>1</sup>, Konrad Trülsch<sup>1</sup>, Peter Uetz<sup>3</sup>, Ralf Zimmer<sup>4</sup>, Reinhard Hoffmann<sup>5</sup>, Jürgen Heesemann<sup>1</sup> and Jürgen Haas<sup>1,6</sup> Systematic analysis of protein interactions between *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid and human host proteins 2011. *In Review*.

Susanne Pfefferle<sup>1,2\*</sup>, Julia Schöpf<sup>3\*</sup>, Manfred Kögl<sup>4\*</sup>, Caroline Friedel<sup>5</sup>, Marcel A. Müller<sup>2</sup>, Thorsten Stellberger<sup>1</sup>, **Ekaterina von Dall'Armi**<sup>1</sup>, Petra Herzog<sup>2</sup>, Stefan Kallies<sup>2</sup>, Daniela Niemeyer<sup>2</sup>, Vanessa Ditt<sup>2</sup>, Thomas Kuri<sup>6</sup>, Roland Züst<sup>7</sup>, Frank Schwarz<sup>4</sup>, Ralf Zimmer<sup>5</sup>, Imke Steffen<sup>8</sup>, Friedemann Weber<sup>6,9</sup>, Volker Thiel<sup>7</sup>, Georg Herrler<sup>10</sup>, Heinz-Jürgen Thiel<sup>11</sup>, Christel Schwegmann-Weßels<sup>10</sup>, Stefan Pöhlmann<sup>8</sup>, Jürgen Haas<sup>3,12§</sup>, Christian Drosten<sup>2§</sup> and Albrecht von Brunn<sup>3§</sup> The SARS-Coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-Coronavirus inhibitors" 2011. *PLOS Pathogens*. *In Druck*.

### **Abstracts und Präsentationen:**

**E. von Dall'Armi**<sup>1</sup>, M. Kögl<sup>2</sup>, T. Stellberger<sup>3</sup>, C. C. Friedel<sup>4,7</sup>, S. M. Bailer<sup>1</sup>, K. Trülsch<sup>1</sup>, J. Heesemann<sup>1</sup>, P. Uetz<sup>3</sup>, R. Zimmer<sup>4</sup>, R. Hoffmann<sup>5</sup> and J. Haas<sup>1,6</sup> Systematic analysis of protein interactions between *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid and human host proteins" (Biospectrum, 2010, Abstractsband) 3. Gemeinsame Tagung von DGHM und VAAM, Hannover, Deutschland. *Vortrag*.

**E. von Dall'Armi**<sup>1</sup>, M. Kögl<sup>2</sup>, T. Stellberger<sup>3</sup>, C. C. Friedel<sup>4,7</sup>, S. M. Bailer<sup>1</sup>, K. Trülsch<sup>1</sup>, J. Heesemann<sup>1</sup>, P. Uetz<sup>3</sup>, R. Zimmer<sup>4</sup>, R. Hoffmann<sup>5</sup> and J. Haas<sup>1,6</sup> Systematic analysis of protein interactions between *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid and human host proteins" Genome-scale screening approaches towards bacterial effector proteins, Workshop 2010, The University of Edinburgh. *Vortrag*.

meinem Großvater gewidmet

ემღვნება შოთა ბაბუას

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µF	Mikrofahrenheit
µg	Mikrogramm
3-AT	3-Aminotriazol
Aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
A	Aktin-Bindedomäne
ATP	Adenosin-Triphosphat
BHI	Brain-Heart-Infusion
BSA	Rinderserumalbumin
CDC42	<i>cell division cycle 42 (GTP binding protein)</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ERK	<i>extracellular regulated MAP kinase</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
G	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GFP	green fluorescent protein
gr	Gramm
H	Stunde
IFN	Interferon
IFNAR	Typ 1 Interferon Rezeptor
IFNGR	Typ 2 Interferon Rezeptor
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukin
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISRE	<i>Interferon-stimulated response element</i>
IκB	Inhibitor von κB
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton

K	Kinasedomäne
KM	Kinaseausfallmutante ( <i>kinase dead mutant</i> )
LB	Luria Bertani
M	Meter
M	Milli
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein/ ERK kinase</i>
Mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Min	Minute
MKK	<i>mitogen-activated kinase kinase</i>
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger-RNA</i> )
n	nano
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
o.g	oben genannte
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
P	p-Wert (Signifikanzwert)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PP	Peyer'scher Plaque
PPI	Protein-Protein Interaktionen
Rac 1	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family,</i>
RA	Rac-und Aktinbindedomäne
RM	Rac-Bindungsmutante
RNA	Ribonucleinsäure
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
RNAi	<i>RNA interference</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle

TEMED	Tetramethyldiamin
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TTSS	<i>Type three secretion system</i>
Tyk2	<i>tyrosine kinase 2</i>
U	<i>Units</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
Ysc	<i>Yersinia secretion complex</i>
z. B.	Zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis:

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Die Gattung Yersinia</b>	<b>3</b>
1.1.1 <i>Yersinia pestis</i>	3
1.1.2 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> und <i>Yersinia enterocolitica</i>	4
1.1.3 <i>Yersinia enterocolitica</i>	4
1.1.3.1 Vorkommen und Verbreitung	5
1.1.3.2 Das Virulenz Plasmid von <i>Y. enterocolitica</i>	5
1.1.3.3 Das Proteom von <i>Y. enterocolitica</i>	6
1.1.3.4 Die Pathogenitätsfaktoren von <i>Y. enterocolitica</i>	9
1.1.3.4.1 Yad A und Inv für Adhärenz und Invasion	9
1.1.3.4.2 Das Typ III-Sekretionssystem von <i>Y. enterocolitica</i>	10
1.1.3.4.3 Die Yersinia Effektorproteine (Yops)	11
<b>1.2 Die zelluläre Immunabwehr nach Kontakt mit <i>Y. enterocolitica</i></b>	<b>14</b>
1.2.1 Interferone	14
1.2.2 Die Rolle von TBK1 in Produktion von Typ I Interferone	15
1.2.3 Signaltransduktion durch Typ I Interferone	16
1.2.4 NF-κB	17
1.2.5 Die Rolle von TBK1 in NF-κB Aktivierung	19
<b>1.3 Systembiologie</b>	<b>20</b>
1.3.1 Netzwerktopologie	20
1.3.2 Zufalls- und Scale free- Netzwerke	21
1.3.3 Die Erstellung Protein-Interaktionsnetzwerken mittels Hefe-Zwei-Hybrid System	23
1.3.4 Zelluläre Netzwerke	23
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>25</b>
2.1.1 Laborgeräte	25
2.1.2 Software	26
2.1.3 Chemikalien	26
2.1.4 Verbrauchsmaterial	28
2.1.5 Molekulargewicht-Standards	29
2.1.6 Kits	29
2.1.7 Enzyme	29
2.1.8 Oligonukleotide	30
2.1.9 Plasmide	38
2.1.10 Organismen und Säugerzellen	45
2.1.10.1 <i>E. coli</i> Stämme	45
2.1.10.2 Yersiniastämme	46
2.1.10.3 Hefestämme	46
2.1.10.4 Säugerzelllinien	47
<b>2.2 Methoden</b>	<b>47</b>
2.2.1 Nährmedien und Kultivierung	47
2.2.2 Kultivierung von Bakterien	47
2.2.3 Kultivierung von Yersinien	48
2.2.4 Anlegen einer Stammsammlung	48
2.2.5 Nährmedien zur Kultivierung von Hefe <i>S. cerevisiae</i>	48
2.2.6 Zellkultur	50
2.2.6.1 Nährmedien, Kultivierung und Kryo-Konservierung von eukaryotischen Zellen	50
2.2.7 Zellbiologische Methoden	50

2.2.7.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	50
2.2.7.2	Transformation von chemisch kompetenten Zellen	51
2.2.7.3	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> -Zellen	51
2.2.7.3.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	51
2.2.7.3.2	Transformation von elektrokompetenten Zellen	52
2.2.7.4	Herstellung transformationskompetenter Yersinien	52
2.2.7.4.1	Elektroporation	53
2.2.7.5	Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen	53
2.2.7.6	Einstellung der MOI	53
2.2.7.7	Bestimmung der Zellzahl von Säugerzellen	53
2.2.7.8	Transfektion von eukaryotischen Zellen	53
2.2.7.9	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
2.2.7.10	Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran: Western Blot Analyse	54
2.2.7.11	Detektion spezifischer Proteine mittels Immunoblotting	54
2.2.7.12	Modifizierter LUMIER Bindungsassay	56
2.2.8	DNA- und RNA-Techniken	57
2.2.8.1	Isolierung von Nukleinsäuren	57
2.2.8.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	57
2.2.8.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	57
2.2.8.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	57
2.2.8.3	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	57
2.2.8.4	Ligation	58
2.2.8.5 <sup>4</sup>	Dephosphorylierungsreaktion	58
2.2.8.6	TA-Klonierung von PCR-Produkten	58
2.2.8.7	Agarose-Gelelektrophorese	58
2.2.8.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	59
2.2.8.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	59
2.2.8.9.1	<i>Nested</i> Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für die Amplifikation von DNA zur Rekombinationsklonierung	59
2.2.8.10	Rekombinationsklonierung	60
2.2.8.11	Zielgerichtete Mutagenese	61
2.2.8.12	Sequenzierung von DNA	61
2.2.8.13	Realtime PCR-Quantifizierung von RNA-Transkripten mittels TaqMan™-PCR	61
2.2.9	Mikroskopische Methoden	62
2.2.9.1	Immunfluoreszenz- und DAPI-Färbung in Säugerzellen	62
2.2.10	Hefe-2-Hybrid-Methoden	63
2.2.10.1	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System	63
2.2.10.2	Herstellung von kompetenten Hefen	64
2.2.10.3	Transformation von Hefezellen	64
2.2.10.4	Die Durchführung des Y2H-Screens zwischen Yersinia-Proteinen	65
2.2.10.5	Die Durchführung des Y2H-Screens gegen cDNA Genbanken	66
2.2.10.5.1	Allgemeine Übersicht	66
2.2.10.5.2	<i>Mating</i> von Hefen	67
2.2.10.5.3	Screeningtiefe	68
2.2.10.5.4	Vorscreen (Prescreen)	68
2.2.10.5.5	Autoaktivierung	68
2.2.10.5.6	Biomek FX	68
2.2.10.5.7	Kolonie-PCR	69
2.2.10.5.8	Fragmentanalyse	70
2.2.10.5.9	Sequenzierung	71
2.2.10.5.10	Falsch-positive Interaktionen	71
2.2.11	Dual-Luziferase Assay	71
2.2.11.1	Dual-Luziferase Assay mit Yersinia-Mutanten	71
2.2.12	Isolierung von sezernierten Proteinen ( <i>released proteins</i> )	72
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>73</b>
3.1	Herstellung einer <i>Y. enterocolitica</i> Entryvektor Klonkollektion	74
3.2	Identifikation von intrabakteriellen PPI	74

<b>3.3</b>	<b>Erstellung eines Interaktionsnetzwerks zwischen pYV Plasmid Proteinen von <i>Y. enterocolitica</i></b>	<b>77</b>
<b>3.4</b>	<b>Identifikation und Charakterisierung von PPI zwischen <i>Yersinia</i> pYV und Wirtsproteinen</b>	<b>78</b>
<b>3.5</b>	<b>Validierung von Pathogen-Wirt Interaktionen mittels LUMIER Bindungsassays</b>	<b>83</b>
<b>3.6</b>	<b>Das <i>Yersinia</i> Effektorprotein YopM interagiert mit PKN1 und Zinkfinger-Proteinen</b>	<b>85</b>
<b>3.7</b>	<b>Die C-terminalen 32 Aminosäuren von YopM sind für die Interaktion mit PKN1 verantwortlich</b>	<b>87</b>
<b>3.8</b>	<b>Das <i>Yersinia</i> Effektorprotein YopO führt zur Aktivierung des IFN-<math>\beta</math> Promotors</b>	<b>88</b>
<b>3.9</b>	<b>Das <i>Yersinia</i> Effektorprotein YopO stimuliert den NF-kB Signalweg</b>	<b>92</b>
<b>3.10</b>	<b>YopO induziert IFN-<math>\beta</math>- und NF-kB-Signalwege</b>	<b>94</b>
<b>3.11</b>	<b>Die Infektion von J774 Zellen mit Wildtyp-<i>Yersinien</i> und der YopO Monosekretionsmutante verstärkt die Interferon-<math>\beta</math>-Expression</b>	<b>96</b>
<b>3.12</b>	<b>Nachweis der Sekretion von <i>Y. enterocolitica</i> Orf155, YscO, Orf73, YscY</b>	<b>97</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>99</b>
<b>4.1</b>	<b>Vorteile des Y2H Systems</b>	<b>99</b>
4.1.1	Vergleich der Ergebnisse des Y2H-Screens mit anderen Methoden zur Identifikation von PPI	100
<b>4.2</b>	<b>Einschränkungen und Nachteile des Y2H Systems</b>	<b>100</b>
4.2.1	Methoden und die statistische Kriterien zum Unterbinden von falsch-negativen und falsch-positiven Interaktionen	101
<b>4.3</b>	<b>Struktur von intrapathogenen- und Pathogen-Wirt Interaktionsnetzwerken</b>	<b>102</b>
4.3.1	Erkenntnisse aus der Interpretation von <i>Yersinia</i> -Interaktions-Daten	105
<b>4.4</b>	<b>Auf der Suche nach der Funktion von YopM</b>	<b>106</b>
<b>4.5</b>	<b>Die Rolle von YopO bei der Induktion von Typ 1 Interferonen und NF-kB Signalweg</b>	<b>108</b>
<b>4.6</b>	<b>Auf der Suche nach weiteren Effektorproteinen von <i>Y. enterocolitica</i></b>	<b>111</b>
<b>4.7</b>	<b>Perspektiven</b>	<b>111</b>
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>114</b>
	<b>Danksagungen</b>	<b>137</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>138</b>

## Zusammenfassung

*Yersinia enterocolitica* ist der Erreger von akuten gastrointestinalen Erkrankungen im Menschen. Mittels Injektion von Effektorproteinen in die Wirtszelle gelingt es *Yersinia* sehr effizient, der Immunantwort des Wirtsorganismus zu entkommen. Der Injektionsapparat, das sogenannte Typ 3 Sekretionssystem (TTSS), sowie die injizierten Effektorproteine sind auf dem pYV Virulenzplasmid (pYVa127/90) von *Yersinia enterocolitica* kodiert. Um die Rolle von bisher nicht charakterisierten *Yersinia* pYV Proteinen aufzuklären und damit ein besseres Verständnis der Pathogenese zu bekommen, wurde eine genomweite Analyse von Proteininteraktionen zwischen pYV Proteinen, sowie zwischen pYV und Wirtsproteinen durchgeführt. Dazu wurden die 72 offenen Leserahmen (ORFs) des prototypischen Virulenzplasmids pYV127/90, 23 ORF-Fragmente von Transmembran- und Effektorproteinen, sowie die ORFs von 2 zytotoxischen Proteinen mit einer Mutation in der katalytischen Domäne, in Hefe-2-Hybrid (Y2H) Vektoren kloniert (insgesamt 194 Konstrukte). Diese Klonkollektion wurde anschließend auf Protein-Protein-Interaktionen (PPI) zwischen (i) *Yersinia* pYV Proteinen und (ii) *Yersinia* pYV und Wirtsproteinen getestet und insgesamt 225 Interaktionen zwischen *Yersinia* pYV Proteinen und 157 Pathogen-Wirt Proteininteraktionen identifiziert. Ein Teil der Interaktionen wurde mittels LUMIER Bindungsassays getestet und etwa 30% davon bestätigt. Während eine Reihe von schon bekannten Interaktionen wiedergefunden wurden (z.B. YopO-RhoA), war die überwiegende Mehrzahl der identifizierten Proteininteraktionen bisher noch nicht beschrieben. Erwartungsgemäß interagierten Proteine des TTSS vorwiegend miteinander, während die sezernierten Effektorproteine YopE, H, O, M, P und T, eine starke Anreicherung für Interaktionen mit Wirtsproteinen zeigten. Anhand von Pathogen-Wirt Interaktionsnetzwerken konnte gezeigt werden, dass *Yersinia* ähnlich wie virale Erreger gezielt besonderes stark vernetzte humane Proteine, sogenannte Hubs, kontaktiert. Die funktionelle Analyse der zellulären Interaktionspartner zeigte, dass *Yersinia* pYV Proteine bevorzugt mit zellulären Proteinen interagieren, die an der Zytoskelett-Organisation, bei der Transkription, der posttranslationalen Modifikation und der Signaltransduktion beteiligt sind. Diese Funktionen reflektieren vermutlich zelluläre Prozesse, die bei der Infektion mit *Yersinia enterocolitica* besonders essentiell sind. Im weiteren Verlauf dieser Doktorarbeit wurde die biologische und funktionelle Signifikanz einiger Proteininteraktionen bestätigt und gezeigt, dass bakterielle Effektorproteine wahrscheinlich wesentlich mehr Funktionen haben, als bisher bekannt ist. Beispielsweise konnte eine neue Funktion des Effektors YopO aufgeklärt werden, die darauf basiert, dass YopO mit den zwei Signaltransduktionsproteinen TBK1 und NF- $\kappa$ B2 interagiert und dadurch sowohl Typ I Interferone induziert als auch den alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert. Die Resultate der Arbeit weisen darüber hinaus darauf hin, dass mehr *Yersinia* pYV Proteine sezerniert werden als bisher bekannt. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit vermuten, dass der Einfluss von *Yersinia* pYV Proteinen auf die Pathogenese wahrscheinlich wesentlich komplexer ist als bisher angenommen wurde.

## Abstract

*Yersinia enterocolitica* is a frequent cause of acute gastrointestinal disease. It evades the host's immune response by injecting, via a virulence-plasmid (pYV) encoded type three secretion system (TTSS), anti-host effector proteins (Yops) into the host cell cytoplasm. To gain a better understanding of *Yersinia* pathogenesis, we aimed at characterizing intrapathogen and pathogen-host protein interactions on a proteome-wide scale. We cloned 72 open reading frames (ORFs) of the prototypical virulence plasmid pYVa127/90 plus functional domains of 23 of these ORFs and 2 cytotoxic proteins with mutation in a catalytic domain into yeast-2-hybrid (Y2H) bait and prey vectors (194 plasmid constructs in total). This clone collection was subsequently (i) tested for protein interactions between *Yersinia* proteins, and (ii) screened for pathogen-host interactions using four human cDNA Libraries. We identified 225 interactions between *Yersinia* proteins, and 762 distinct pathogen-host protein interactions, 157 of which were high-confidence interactions. Subsets of interactions were validated by LUMIER pull-down assays and approximately 30% could be confirmed. Whereas a series of known interactions was found (e.g. YopO-RhoA), most of the protein interactions identified have not been described to date. As anticipated, proteins belonging to the type III secretion (TTSS) apparatus predominantly interacted with themselves, whereas the secreted effectors Yop E, H, O (YlpA), M, J/P and T showed a strong enrichment for interactions with host proteins. By connecting the *Yersinia* proteins into a human interactome network via the identified pathogen-host interactions, we were able to show that *Yersinia* proteins preferentially target highly connected human proteins (so-called Hubs) similar to viruses. Functional analysis using gene ontology annotations of cellular interaction partners revealed the preferential targeting of proteins involved in cytoskeletal reorganisation, transcription, posttranslational modification and signal transduction, suggesting that these cellular processes reflect core pathogenic events during infection. Specifically, we showed that YopO, in addition to its known interaction with Rho-family GTPases, binds to TBK1 and modulates signalling via the TBK1 pathway, and that YopM binds to PKN1, which causes YopM's retention in the cytoplasm. Our pathogen-host interaction data suggest that there are more secreted proteins than currently known and help to assign putative functions of previously uncharacterized proteins.

# 1 Einleitung

*Yersinia (Y.) enterocolitica* ist neben Shigellen, Salmonellen und Campilobacter die häufigste Ursache für eine akute, bakterielle Gastroenteritis. Yersinien, Salmonellen, Shigellen und Campilobacter haben unterschiedliche Infektionsstrategien entwickelt, was die Analyse der Erreger-Wirtszellinteraktionen besonders interessant macht. Während enteropathogene Yersinien sich extrazellulär vermehren, replizieren Salmonellen und Shigellen im Zytoplasma der Wirtszelle, wohin sie durch Makropinozytose gelangen. Salmonellen vermehren sich in einer speziellen Vakuole, und Shigellen bewirken ihre Freisetzung in das Zytosol, um sich dort zu vermehren. Campilobacter verfügt über ein Typ IV Sekretionssystem und produziert Proteine, die der Mikrotubuli-abhängigen Invasion in Epithelzellen dienen. Wie Salmonellen verbleiben sie in einer Vakuole bis zur Exozytose. Yersinien, Salmonellen und Shigellen verfügen über Typ III Sekretionssysteme (*type three secretion system*, TTSS), mit denen sie Effektorproteine in die Wirtszelle injizieren und somit die Zelle für ihre Zwecke manipulieren und umprogrammieren. Diese Vorgänge können zellbiologisch, biochemisch und mit den modernen Methoden der Proteom- und Transkriptomanalyse, sowie dem Hefe-Zwei-Hybrid System auf Proteininteraktionen untersucht werden.

## 1.1 Die Gattung *Yersinia*

Fast jeder Mensch infiziert sich im Laufe seines Lebens mit Yersinien. Yersinien sind benannt nach dem Schweizer Alexandre Yersin (1863-1943), dem Entdecker des Pest-Erregers *Yersinia (Y.) pestis*. Die stäbchenförmigen Stuhlbakterien kommen in zahlreichen Säugern und auch Vögeln vor. Die Massentierhaltung von Schweinen und Rindern begünstigt die Ausbreitung von Bakterien dieser Art. Yersinien sind gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchen, deren optimale Wachstumstemperatur bei 28°C-30°C liegt und die sich bei Temperaturen zwischen 4°C und 42°C vermehren. Die Gattung *Yersinia* umfasst 11 Arten: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. fredericksonii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. aldovae*, *Y. rhodei*, *Y. ruckeri*. Drei dieser Arten, nämlich der Pesterreger *Y. pestis* und die enteropathogenen Arten *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind humanpathogen<sup>1</sup>. *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* sind im Gegensatz zu *Y. pestis* monoflagellar begeißelt und deswegen beweglich. Bei einer Temperatur von 37°C werden jedoch keine Flagellen mehr synthetisiert.

### 1.1.1 *Yersinia pestis*

*Y. pestis* ist der Erreger der Pest. Die natürlichen Wirte von *Y. pestis* sind wildlebende Nagetiere. Die Bakterien können durch Flohbisse auf den Menschen übertragen werden. Dabei werden zuerst die Lymphknoten befallen, und von dort kommt es anschließend zur massiven abszedieren-

den Lymphadenopathie mit Bildung von Bubonen (Beulenpest). Von den Lymphknoten aus gelangen die Erreger in die Blutbahn und erzeugen ein septisches Krankheitsbild. Bei Befall der Lunge kann der Erreger Lungenpest verursachen und über Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch weitergegeben werden. Aufgrund der Ausbreitung antibiotikaresistenter Stämme (z.B. Madagaskar) und auch der hypothetischen Möglichkeit, als biologische Waffe einzusetzen, stellt *Y. pestis* eine anhaltende Bedrohung dar. Bis heute gibt es noch keinen zugelassenen Impfstoff, der Langzeitimmunität gegen die Pesterkrankung gewährt<sup>2, 3</sup>.

### **1.1.2 *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica***

*Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind enteropathogene Erreger, die Yersiniosen auslösen. Die Übertragung beider Erreger erfolgt über kontaminierte Nahrungsmittel (hauptsächlich Schweinefleisch und Milchprodukte)<sup>4</sup>. Zu den natürlichen Wirten zählen neben Nagern auch Schweine, Schafe, Ziegen, Rinder und Vögel<sup>5</sup>. Nach oraler Aufnahme durch kontaminierte Lebensmittel gelangen die Bakterien in den unteren Dünndarmabschnitt, und durch die in den Peyerschen Plaques (PP) der Mucosa befindlichen M-Zellen, die auf Pinocytose und Transcytose von Proteinen und Partikeln spezialisiert sind, werden sie in die Submukosa transloziert<sup>6 7 8</sup>. Dort vermehren sich die Yersinien extrazellulär und bilden Abszesse. Diese Abszesse entleeren sich entweder in das Darmlumen oder führen zur Streuung der Erreger in mesenteriale Lymphknoten, Milz, Leber und Blutbahn. Die von enteropathogenen Yersinien hervorgerufenen Krankheitsbilder sind Enteritis, Enterokolitis mit selbstlimitierenden Diarrhöe (*Y. enterocolitica*), mesenteriale Lymphadenitis, terminale Ileitis und Pseudoappendizitis (*Y. pseudotuberculosis*). Neben diesen selbstlimitierenden Formen der Yersiniose kann es jedoch, vor allem bei immunsupprimierten Patienten, Dialyse-Patienten, bei Erkrankung an Diabetes mellitus, hämolytischer Anämie und Leberzirrhose zu septischen Verlaufsformen kommen. Weitere Verlaufsformen der Yersiniose sind aseptische extraintestinale Folgeerkrankungen, wie z.B. HLA-B27-assoziierte reaktive Arthritis und Erythema nodosum<sup>9 10</sup>. Die Symptome, die durch eine Infektion ausgelöst werden, hängen vom Alter, dem Immunstatus und dem Geschlecht des Patienten ab<sup>11</sup>.

### **1.1.3 *Yersinia enterocolitica***

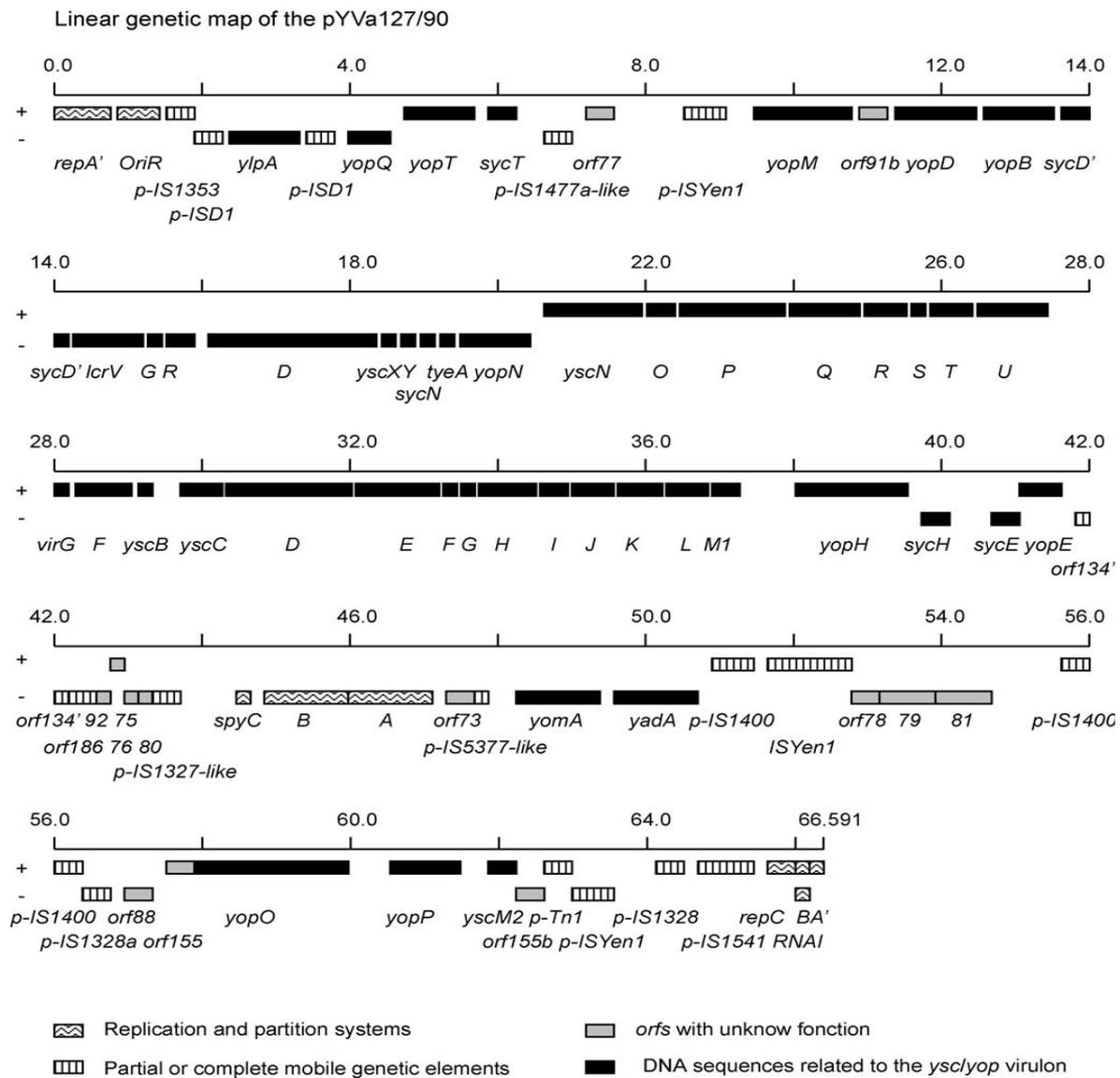
*Yersinia* ist mit der einzigartigen Fähigkeit ausgestattet, der Wirtszellattacke zu widerstehen. Dies erfolgt durch Injektion von Effektorproteinen in das Zytoplasma von professionellen Phagozyten mittels einer Typ III Sekretions/Translokations-Maschinerie (TTSS)<sup>12, 13</sup>. Bisher sind sechs Effektorproteine bekannt, die in die Wirtszelle injiziert werden und mit unterschiedlichen Signalwegen der Zelle interferieren, was zur Hemmung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen führt.

### 1.1.3.1 Vorkommen und Verbreitung

*Y. enterocolitica* ist ubiquitär verbreitet, eine Isolation ist aus unterschiedlichen Umweltquellen wie kontaminiertem Wasser oder Pflanzenoberflächen möglich. *Y. enterocolitica* wird aufgrund phänotypischer Charakteristika in 6 Biovare (1A, 1B, 2, 3, 4, und 5) unterteilt. Das Biovar 1B mit den medizinisch bedeutsamen Serotypen O:4, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 ist in Nordamerika vertreten, die Biovare 2 und 4 mit den Serotypen O:3, O:5,27 und O:9 sind in Europa verbreitet. Die Biovare 3 und 5 sind in der Regel tierpathogen (Chinchilla, Ziege, Hase).

### 1.1.3.2 Das Virulenz Plasmid von *Y. enterocolitica*

Die komplette Nukleotidsequenz und Organisation des Virulenzplasmids pYVa127/90 von *Y. enterocolitica* (Stamm A127/90 Serotyp O:8 Biotyp 1B) wurde bestimmt. Das Plasmid ist 70 kb groß und kodiert für 62 Proteine und 12 ORFs mit unbekanntem Funktionen. Das pYV Plasmid kodiert als erstes für das Ysc/Yop Typ III Sekretionssystem. Nach dem Kontakt mit eukaryotischen Zellen wird das Ysc Sekretionssystem aktiviert, das dann die Injektion von Yops in die Wirtszelle einleitet. Die Ysc Sekretionsmaschinerie ist von 4 angrenzenden Loci kodiert, die als virA, virB, virG und virC genannt werden. Der virA Locus enthält 7 Gene: yopN, tyeA, sycN, yscXY, yscV und lcrR. Das virB Operon enthält 8 Gene: yscN, yscO, yscP, yscQ, yscR, yscS, yscT, yscU. Das virC Operon beinhaltet 13 Gene: yscA, yscB, yscC, yscD, yscE, yscF, yscG, yscH, yscl, yscJ, yscK, yscl, yscM1. Der VirG Locus liegt zwischen dem virF und virB Loci. Das vor dem virA Locus lokalisierte LcrGVsycDyopBD Operon kodiert für Gene, die an der Translokation von *Yersinia outer proteins* (Yops) durch die Membran der eukaryotischen Zelle beteiligt sind. Das pYV Plasmid kodiert darüber hinaus für das YadA Adhesin, das Lipoprotein YlpA, das Yersinia Außenmembranprotein Yom A, dessen Rolle bisher nicht bekannt ist, und für einige andere Proteine. Auch die Funktion der neu identifizierten Orfs (77, 91b, 134, 92, 75, 73, 78, 79, 81, 76, 155 und 88) ist bisher unbekannt <sup>14</sup>.



**Abbildung 1: Das linearisierte pYV Plasmid von *Y. enterocolitica*.** Das Plasmid ist etwa 70 kb groß und kodiert für 62 Proteine und 12 neu identifizierte ORFs (Abbildung entnommen dem Foulter und Cornelis <sup>14</sup>).

### 1.1.3.3 Das Proteom von *Y. enterocolitica*

Die **Tabelle 1** gibt einen Überblick über die einzelnen pYV-Plasmid Proteine, die vom *Yersinia enterocolitica* (0:9) pYV Virulenz Plasmid kodiert werden, und ihren Funktionen. In **Tabelle 1** fett markierte ORFs (*open reading frames*) kodieren für die sechs bekannten Effektor Proteine.

**Tabelle 1: Das PyV-Proteom im Überblick** (Die Angaben in der Tabelle nach Cornelis, G.R. 2002; Cornelis, G.R. 2000, Mueller, C.A. et al 2005, Galan, J.E & Wolf-Watz, H 2006, Viboud, G.I, Bliska J.B. 2005)

Protein	Funktion
Ylp A	Lipoprotein YlpA
Yop Q	wird sezerniert / Funktion unbekannt
<b>Yop T</b>	Effektorprotein, Cystein Protease
SycT	Chaperon von YopT
Orf 77	Funktion unbekannt
<b>Yop M</b>	Effektorprotein (Funktion unbekannt)
Orf91b	Funktion unbekannt
Yop D	Translokationsapparat / Translokationspore
YopB	Translokationsapparat / Translokationspore
SycD	Chaperon von Yop D
LcrV	Nadelspitze des Translokationsapparats
LcrG	Kontrolle von Yop-Translokation
LcrR	Regulator von Typ III Sekretionssystem ( <i>low calcium response locus protein</i> )
LcrD	Bekannt als Protein der inneren Membran, besitzt eine hydrophobe, aminoterminal Region mit sechs oder sieben membranumspannenden Helices
Ysc Y	Erforderlich für Yop-Sekretion
Ysc X	Erforderlich für Yop-Sekretion
SycN	Chaperon von YopN
Tye A	Erforderlich für Yop-Sekretion, reguliert Abgabe von Effektorproteinen
YopN	Lokalisiert an der bakteriellen Oberfläche und hält die bakterielle Oberfläche geschlossen beim Vorhandensein von 1 mM Calcium und in Abwesenheit des Kontakts mit der Wirtszelloberfläche
YscN	ATPase, zytoplasmatisches Protein, interagiert mit membrangebundenen Komponenten des Typ III Sekretionssystems. Steuert die Sekretion an und stellt die Energie zur Verfügung für den Aufbau des Sekretionsapparats
YscO	Typ III Sekretionsprotein
YscP	Bestimmt die Länge der Sekretionsnadel
YscQ	Typ III Sekretionsprotein YscQ, spielt eine Rolle bei der Translokation von Yops, wird sezerniert
YscR	Basalkörper vom Typ III Sekretionssystem
YscS	Basalkörper vom Typ III Sekretionssystem
YscT	Basalkörper vom Typ III Sekretionssystem

Protein	Funktion
YscU	Basalkörper vom Typ III Sekretionssystem
VirG	Lipoprotein, Chaperon von Typ III Sekretionssystem. Erforderlich für die Lokalisation von YscC (auch bekannt als YscW)
VirF	Transkriptionsaktivator
YscA	Typ III Sekretionssystem
YscB	Chaperon Protein (CesT), interagiert mit YopN
YscC	Typ III Sekretionssystem. Distales Teil von basalem Körper
YscD	Basalkörper vom Typ III Sekretionssystem
YscE	Yop Sekretion
YscF	Nadel-Bildung
YscG	Typ III Sekretionssystem Protein, wurde im löslichen Teil und in der Membranfraktion gefunden
YscH	YopR (yhcH) stellt ein Chaperon dar und ist lokalisiert stromabwärts von yscEFG, YopR könnte an der Kontrolle von YscF-Sekretion und am Aufbau des Typ III Sekretionsapparat beteiligt sein
YscI	Sekretionsapparat
YscJ	YscJ besitzt die transmembrane Domäne, stellt eine Brücke dar, durch den periplasmatischen Raum und verknüpft Proteinsekretionskanäle in Innen- und Außenmembran
YscK	Translokationsprotein K
YscL	YscN and YscL von <i>Yersinia enterocolitica</i> , stellen die ATPase und Regulatoren der ATPase dar
YscM1	Typ III Sekretionsapparat, putatives Typ III Sekretionsregulatorprotein
<b>YopH</b>	Effektorprotein, Protein Tyrosin-Phosphatase (PTP), katalysiert die Dephosphorylierung von Phosphotyrosin Peptiden
SycH	Chaperon von YopH
SycE	Chaperon von YopE
<b>YopE</b>	Effektorprotein
Orf134	Wahrscheinlich Integrase
Orf186	Reverse Transkriptase-ähnliches Protein
Orf76	Homologie dem orf76 von <i>Y. pestis</i> (Plasmid pCD1)
Orf92	Homologie dem zytoplasmatischen Protein von <i>Salmonella enterica</i> ; hypothetisches Protein
Orf75	Homologie zum Protein ORF75 von <i>Y. enterocolitica</i> Plasmid (pYVe8081)
Orf80	Homologie dem orf75

Protein	Funktion
SpyB	Teilungssystem
SpyB2	Produkt="SpyA"
SpyA	Plasmidteilung
Orf73	Homologie zu dem Protein ORF73 Plasmid pYVe8081
YomA	Homologie dem integralen Membranprotein von <i>Salmonella typhimurium</i> Pa-gO oder stm1862
YadA	Adhäsion, Oberflächenprotein
Tnp 51	Transposase
Orf78	Homologie zu ORF78 von Plasmid pYVe8081
Orf79	Funktion unbekannt
Orf81	Homologie zur vermutlichen Rekombinase des F Plasmids
Orf88	Homologie zu dem Protein ORF86 Plasmid pYVe8081
Orf155	Homologie zu YopO (Chaperon)
<b>YopO</b>	Effektorprotein, Proteinkinase
<b>YopP</b>	Effektorprotein
YscM2	Regulatorisches Protein, wird sezerniert
Orf155b	Hypothetisches Protein
Tnp2	Transposase Tnp2
Tnp3	Transposase Tnp1
RepA	Wahrscheinlich Replikationsinitiatorprotein
RepC	Replikationsprotein
RepB	mögliches <i>leader peptide</i>

Die bekannten Effektorproteine sind fett markiert.

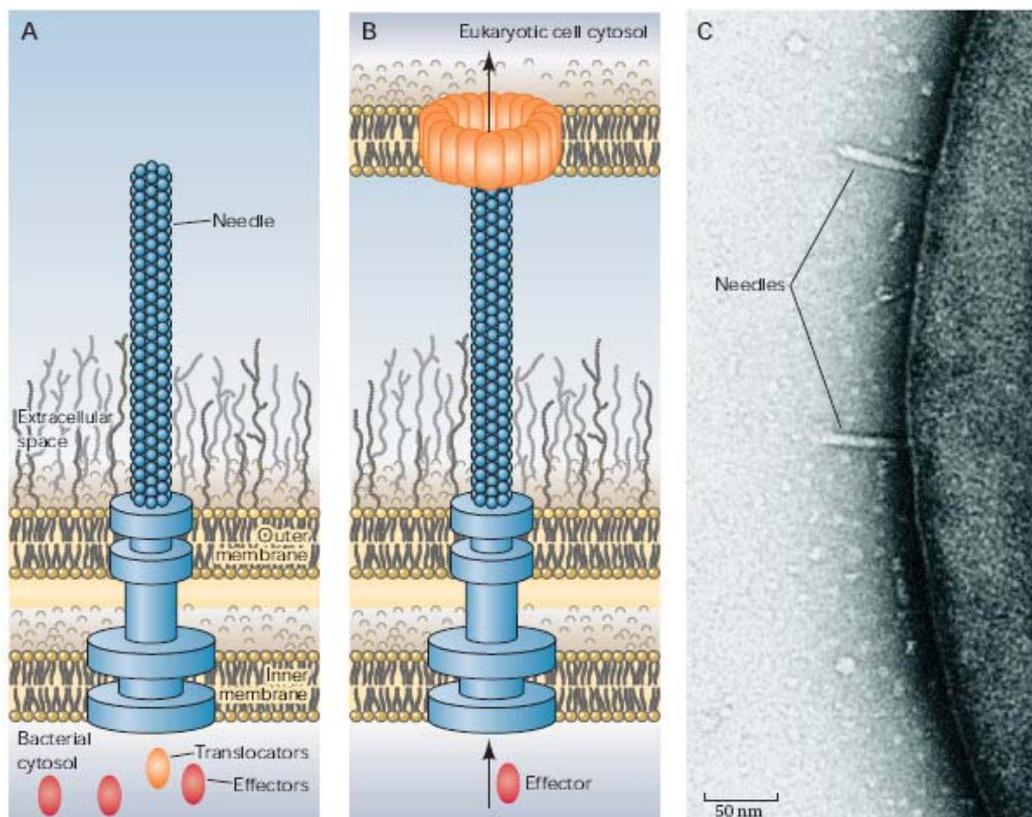
### 1.1.3.4 Die Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica*

#### 1.1.3.4.1 Yad A und Inv für Adhärenz und Invasion

Die Adhärenz und Invasion von *Y. enterocolitica* wird durch das Protein Invasin (130 kDa), welches an der äußeren Membran sitzt, und Adhäsion YadA (40 kDa) vermittelt. Invasin wird chromosomal und Yad A durch das pYV Plasmid kodiert. Nach der oralen Aufnahme gelangen die *Yersinien* in den unteren Dünndarmabschnitt und binden dort über das Invasin an den Peyer'schen Plaques (PP) der Mukosa gelegenen M-Zellen<sup>15</sup>. Die Bindung von Invasin erfolgt an das  $\beta$ 1-Integrin der M-Zellen. Nach erfolgter Adhärenz an die Wirtszellen werden die *Yersinien* in die Submukosa transloziert und vermehren sich dort extrazellulär<sup>16 17</sup>. Yad A vermittelt die Bindung an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen, Fibronectin und Laminin und kann über  $\beta$ 1-Integrine die Internalisierung von *Yersinia* ermöglichen<sup>18, 19, 20, 21</sup>.

### 1.1.3.4.2 Das Typ III-Sekretionssystem von *Y. enterocolitica*

Das TTSS von Yersinien wird von dem 70 kb Virulenzplasmid (pYV) kodiert. Es besteht aus über 25 verschiedenen Proteinen, die sich in der äußeren Membran, im Periplasma, oder im Zytoplasma der Bakterien befinden und dort verschiedene Funktionen ausführen. Der *Yersinia secretion* (Ysc) Injektionsapparat besteht aus einem Basalkörper, welcher die Peptidoglykanschicht und die innere und äußere Bakterienmembran durchspannt, und einer „molekularen Nadel“, die an der Bakterienoberfläche herausragt<sup>12, 22, 23</sup>. Dabei wird der proximale Bereich des Basalkörpers aus den *Yersinia secretion proteins* YscD, YscR, YscS, YscT, YscU und YscV gebildet, der distale Bereich ist eine oligomerisierte Matrix aus YscC. Die Nadel besteht aus einem YscF Polymer. YopN öffnet zusammen mit TyeA den Sekretionskanal. Die Translokationspore in der Wirtszellmembran wird durch die Translokatorproteine YopB und YopD gebildet. LcrV bildet an der Nadelspitze einen Komplex und damit ein Grundgerüst für den Aufbau der Pore<sup>24</sup> und ist für die korrekte Einlagerung von YopD und YopB in die Zellmembran wichtig<sup>22, 25-27</sup>



**Abbildung 2: Darstellung des Typ III Sekretionssystems.** (a) Aufbau des *Yersinia* Sekretionsapparates, welcher die innere Membran, Peptidoglykanschicht und äußere Membran durchspannt und an der Bakterienoberfläche herausragt (b) Der *Yersinia* Sekretionsapparat während der Translokation der Effektorproteine durch die Translokationspore in das Zytoplasma der Wirtszelle (c) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Injektionsnadeln des TTSS auf der Bakterienoberfläche (Abbildung aus Troisfontaines und Cornelis<sup>28</sup>)

### 1.1.3.4.3 Die Yersinia Effektorproteine (Yops)

Nach der Adhärenz an die Wirtszelle transloziert Yersinia mit Hilfe des TTSS über die Translokationsspore verschiedene Effektorproteine, die sogenannten *Yersinia outer proteins* (Yops), in das Zytosol der Wirtszelle. Für den Transport der Effektorproteine YopT, YopO, YopE und YopH sind Chaperone notwendig. Für die Effektoren YopP und YopM wurden noch keine Chaperone identifiziert. Es wird vermutet, dass Chaperone mit ihren zugehörigen Effektorproteinen einen Komplex bilden, sie zum TTSS rekrutieren und für die richtige Proteinstruktur bei der Translokation verantwortlich sind<sup>25, 26</sup>. Im Zytosol der Wirtszelle binden die Yops an verschiedene Zellkomponenten und interferieren mit unterschiedlichen Signalwegen. Im Folgenden werden die einzelnen Yops genauer beschrieben. Von den 6 bekannten Effektorproteinen greifen 3, YopE, YopT und YopO das Aktinzytoskelett der Wirtszelle an.

YopE (23 kDa) interagiert mit Rho, Rac und CDC42 und verursacht damit eine Resistenz der Yersinien gegen Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile Granulozyten. Es wurde gezeigt, dass YopE als GTPase aktivierendes Protein wirkt, und durch die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP die GTPasen RhoA, CDC42 und Rac inaktiviert. Dadurch kommt es zur Depolymerisierung von Aktin-Mikrofilamenten<sup>29</sup>. Nach Infektion von Epithelzellen mit YopE-translozierenden Yersinien kommt es zur Depolymerisierung von Aktin Mikrofilamenten. Schon einige Minuten nach der Infektion kommt es zum Abrunden der Zelle und zum Ablösen von der extrazellulären Matrix<sup>30</sup>.<sup>31</sup> Auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine und die Caspase-1 abhängige Reifung von Prointerleukin-1 $\beta$  wird durch die Deaktivierung von Rac1 durch YopE in Makrophagen inhibiert<sup>32,33</sup>.

YopT (35 kDa) ist eine Cysteinprotease und schneidet posttranslational Lipid-modifizierte und dadurch membrangebundene Rho GTPasen nahe ihrem Carboxylende, wodurch sich die GTPasen von der Zellmembran ablösen und inaktiviert werden. Dadurch wird Aktin in der Wirtszelle depolymerisiert, was zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts der Wirtszelle und zur Verhinderung der Phagozytose führt<sup>22, 34-37</sup>. Nach der Zerstörung des Aktinzytoskeletts runden sich die Zellen ab<sup>38</sup>. YopT interagiert *in vivo* mit Membran-gebundenem RhoA, wobei die GTPasen CDC42 und Rac von YopT unbeeinflusst bleiben<sup>39, 40</sup>.

YopO (*Y. enterocolitica*) bzw. YpkA (*Y. pseudotuberculosis*) (82 kDa) besteht aus multiplen funktionellen Domänen und enthält im N-terminalen Bereich eine autophosphorylierende Serin-Threonin-Kinasedomäne<sup>41</sup>. Weiterhin vermittelt der N-Terminus von YopO eine Interaktion mit der Wirtszellmembran. Im C-Terminus von YopO befindet sich eine Region, die Homologie zu Rac-Bindedomäne aufweist und die Bindung an Rac und Rho vermittelt. Durch die Bindung mit den GTPasen RhoA und Rac1 werden diese inaktiviert, es erfolgt eine Depolymerisierung des

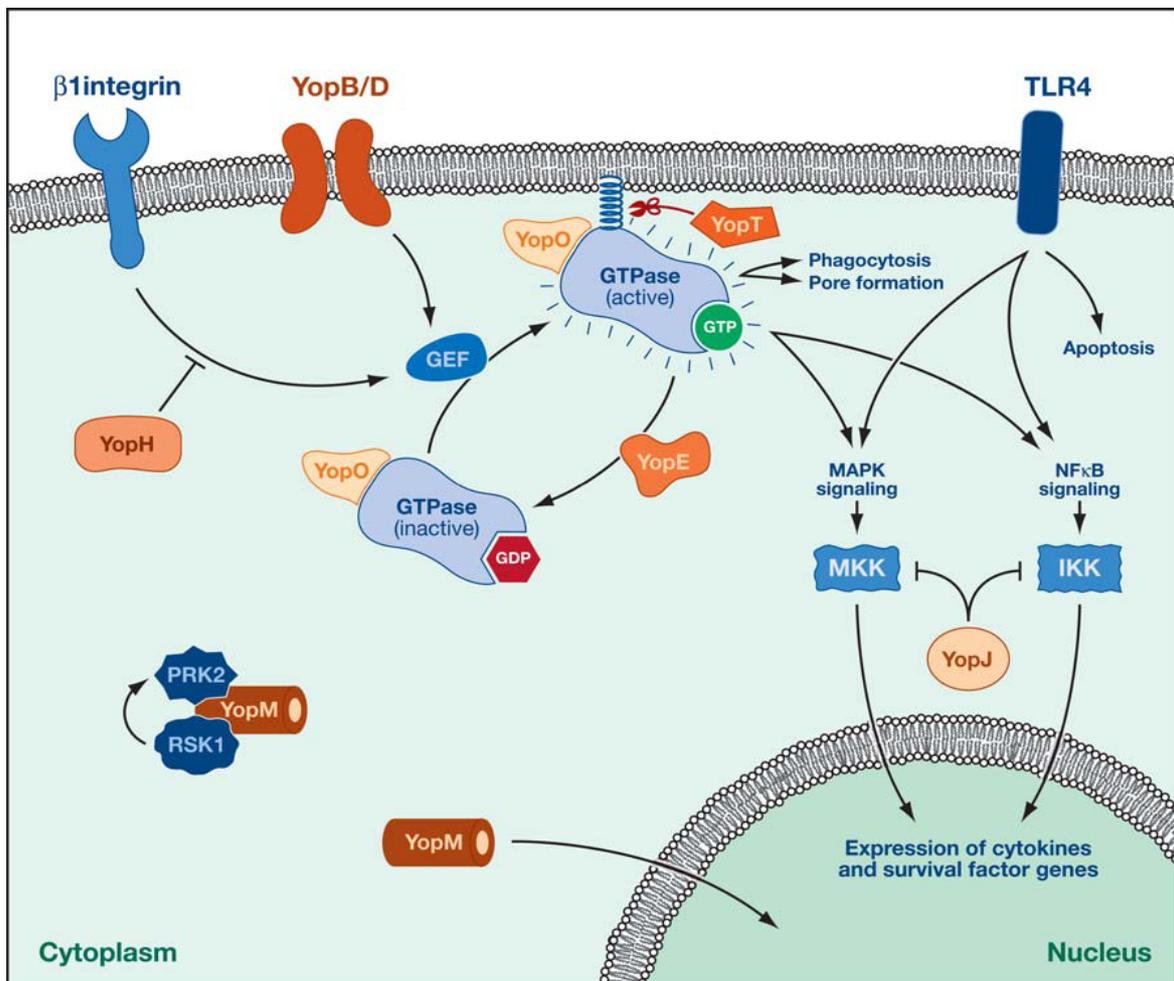
Aktinzytoskeletts und dadurch die Inhibition der Phagozytose<sup>42-44</sup>. Für die Aktivierung der YopO Kinase *in vitro* ist die Bindung des G-Aktins an die Aktin-Bindedomäne von YopO erforderlich<sup>45</sup>. Nach der Aktivierung phosphoryliert sich die Kinase selbst und kann anschließend basische Substrate einschließlich Aktin, phosphorylieren<sup>46</sup>.

YopP (von *Y. enterocolitica*) und das homologe Effektorprotein YopJ (von *Y. pseudotuberculosis*) (32,5 kDa) haben einen wichtigen immunmodulatorischen Effekt. YopP induziert Apoptose in Makrophagen<sup>47-51</sup> und dendritischen Zellen<sup>52, 53</sup>, hemmt intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, wie der *mitogen activated protein* Kinasen (MAPK: ERK, JNK, p38) und NF- $\kappa$ B,<sup>54-59</sup> und inhibiert die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  durch Makrophagen und IL8 durch Endothelzellen<sup>60-62</sup>. Die Inhibition der MAPK, welche die TNF- $\alpha$ -Produktion kontrollieren, wurde durch Hemmung der Phosphorylierung der MAPK-aktivierenden MAPK-Kinasen (MEK) durch YopP erklärt<sup>56, 63</sup>. Die *in vitro* Inaktivierung der MKKs erfolgt durch YopP-vermittelte Acetylierung<sup>64</sup>. YopP wirkt als Acetyltransferase und modifiziert mit Hilfe von CoA Serin- und Threonin-Resten in den Aktivierungsdomänen von MKKs. Diese Acetylierung verhindert wiederum die Phosphorylierung und somit eine Aktivierung der Kinasen. YopJ/YopP deubiquitiniert die NF- $\kappa$ B-aktivierende Kinase IKK $\beta$ , wodurch die NF- $\kappa$ B Translokation in den Zellkern verhindert und somit die NF- $\kappa$ B Signalkaskade gehemmt wird<sup>49, 59</sup>.

YopH (51 kDa) ist eine Tyrosinphosphatase und weist Homologien zu eukaryotischen Tyrosinphosphatasen auf<sup>65</sup>. YopH besitzt einen Bereich, welcher das Effektorprotein zu fokalen Komplexen leitet<sup>66</sup> und eine zweite *substrate targeting site*, welche direkt an Tyrosin-phosphorylierte Proteine bindet<sup>67</sup>. Es wurde gezeigt daß YopH Cas und Fyn bindende Proteine in Makrophagen dephosphoryliert<sup>68</sup>. Nach Infektion von HeLa Zellen und J774 Makrophagen mit YopH-translozierenden *Yersinien* kommt es zur Dephosphorylierung von Tyrosinresten, zur Zerstörung fokaler Adhäsionskomplexe (Paxillin, FAK, p130<sup>cas</sup>) und dadurch zur Inhibition der Phagozytose<sup>4, 69, 70</sup>. YopH hemmt den  $\beta$ 1-Integrin-Signalweg, welcher durch Interaktion von Invasin und YadA mit der Wirtszelle aktiviert wird. Zusätzlich unterdrückt YopH Ca<sup>2+</sup> *signaling* in Neutrophilen und verhindert auf diese Weise Degranulation und in der Folge Phagozytose der Bakterien<sup>66</sup>. Auch die Produktion von *macrophage chemoattractant protein-1* und die Fc- und Komplementrezeptor vermittelte Bildung bakterizider reaktiver Sauerstoffspezies bei Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wird durch YopH verhindert<sup>71-73</sup>.

YopM (42 kDa) ist überwiegend aus sogenannten *leucin-rich-repeats* aufgebaut (LRRs)<sup>74</sup> und ist essentiell für die volle Virulenz von *Yersinien* in Mäusen<sup>75</sup>. Die Funktion von YopM ist bis heute noch nicht geklärt. YopM wurde als zell-permeables Protein identifiziert, welches die Fähigkeit besitzt, ohne den Typ III Sekretionsapparat die Zellmembran von verschiedenen Zellen zu passieren und so in das Zytosol der Zellen zu gelangen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass YopM nach Ein-

tritt in die Zelle in der Lage ist, die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen effizient herunterzuregulieren<sup>76</sup>. YopM migriert in den Zellkern von HeLa Zellen und von Hefe *Saccharomyces cerevisiae* über einen vehikel-assoziierten Transportweg, obwohl das Protein keine klassische nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) enthält<sup>77-79</sup>. Zusätzlich bindet und aktiviert YopM die zwei multifunktionellen Proteinkinasen RSK1 und PRK2<sup>80</sup> und induziert eine anhaltende RSK-Aktivierung durch einen Eingriff in Dephosphorylierungsprozesse in der Zelle<sup>81</sup>. Die beiden Proteine sind Bestandteile von Signalkaskaden zur Regulation von Zellwachstum, Apoptose und Translationsvorgängen. Bei der Entstehung der Infektion bindet YopM an extrazelluläres Thrombin<sup>82</sup>. Dies hat aber eher eine untergeordnete Funktion. Microarray-Analysen infizierter Makrophagen lieferten divergierende Ergebnisse. Einerseits konnte gezeigt werden, dass YopM Gene für den Zellzyklus und Zellwachstum reguliert<sup>83</sup>, in einer anderen Arbeit dagegen wurde kein Anhaltspunkt einer YopM vermittelten Genregulation nachgewiesen<sup>84</sup>.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Modulation der Wirtszellsignalkaskade durch Yersinia Effektorproteine.** Die sechs Effektorproteine werden durch den Typ III Sekretionsapparat und die Translokationspore ins Zytosol der Wirtszelle transloziert. Dort interferieren die Yops mit verschiedenen Signalwegen, wodurch es zu Veränderungen des Zytoskeletts und zur Hemmung der Phagozytose kommt (Abbildung aus Vibound and Bliska<sup>85</sup>).

## 1.2 Die angeborene und adaptive Immunantwort bei der *Y. enterocolitica* Infektion

Zu den Aufgaben des Immunsystems gehört es, lebendes oder totes körperfremdes Material zu erkennen und zu beseitigen. Man unterscheidet zwischen angeborener und adaptiver (erworben) Immunabwehr. Dringen Pathogene in den menschlichen Körper ein, reagiert zunächst das angeborene Immunsystem, gefolgt von einer Aktivierung der humoralen und zellulären Immunantwort. Die angeborene Immunabwehr tritt ohne zeitliche Verzögerung ein und ist deshalb die erste Verteidigungslinie gegen Infektionen. Dem angeborenen Immunsystem stehen verschiedene Abwehrmechanismen zur Verfügung. Eine basieren auf professionellen Phagozyten (Fresszellen) wie Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen, sowie auf löslichen Botenstoffen (Mediatoren), wie z.B. Interferonen und Interleukinen. Dringen Erreger in den Körper ein, kommt es zur Freisetzung chemotaktischer Botenstoffe, die zum Einwandern von Zellen des angeborenen Immunsystems führen. Die Erreger werden anschließend von den Fresszellen phagozytiert und über die Präsentation mikrobieller Antigene auf MHC-Molekülen wird die adaptive Immunantwort initiiert. Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch eine bessere Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Die Zellen der adaptiven Immunantwort sind in der Lage, Antigene der Angreifer zu erkennen und gezielt zelluläre Abwehrmechanismen und molekulare Antikörper zu bilden. Zur adaptiven Immunabwehr gehören T-Lymphozyten, welche zum einen die zellvermittelte Immunantwort gewährleisten, zum anderen die B-Lymphozyten unterstützen. Man unterscheidet zwischen CD4 positiven (T-Helferzellen) und CD8 positiven Zellen (zytotoxische T-Zellen). Die B-Lymphozyten sind für die humorale Immunität verantwortlich. Die humorale Immunantwort findet im flüssigen Medium des Körpers statt, also im Blut oder in der Lymphe und dient der Bekämpfung von Viren und Bakterien im extrazellulären Raum. Nach der Infektion bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, um bei erneutem Kontakt mit dem Krankheitserreger innerhalb kurzer Zeit eine angemessene Abwehrreaktion zu ermöglichen.

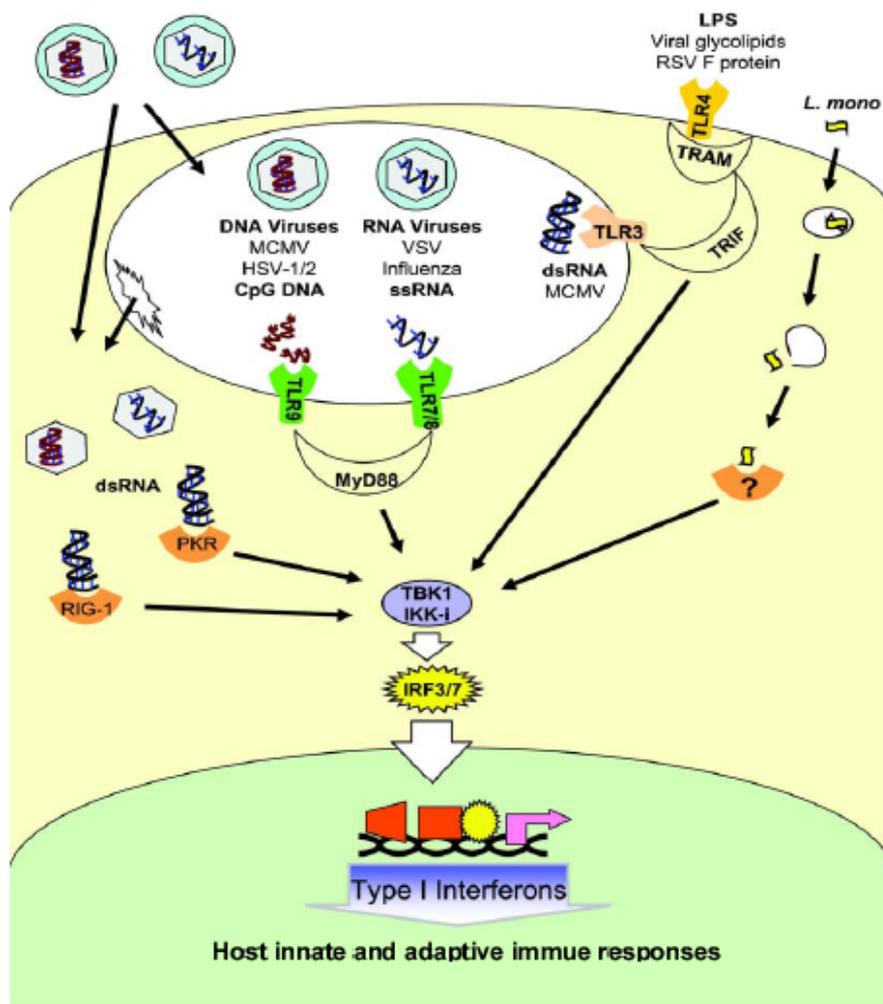
### 1.2.1 Interferone

Unter den Zytokinen, die durch die Zellen des angeborenen Immunsystems sezerniert werden, spielen die Interferone eine Schlüsselrolle beim Schutz gegen mikrobielle Eindringlinge. Interferone sind Proteine, die eine immunstimulierende und vor allem antivirale, antibakterielle, und antitumorale Wirkung entfalten. Sie werden als körpereigene Gewebshormone in menschlichen und tierischen Zellen gebildet. Man unterscheidet 3 Haupttypen: zu den Typ I Interferonen gehören Interferon- $\alpha$ , welches ein dutzend unterschiedliche Subtypen aufweist und Interferon- $\beta$ , welches nur einen Subtyp darstellt. Zum Typ II Interferon gehört Interferon- $\gamma$ . Typ I Interferone werden von Vielzahl ganz unterschiedlichen Zellen gebildet. Die Synthese von Interferon  $\gamma$  ist, im Gegensatz

dazu ausschließlich auf T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen beschränkt<sup>86</sup>. Zu den Typ III Interferonen gehören IFN- $\lambda$ 1 IFN- $\lambda$ 2 IFN- $\lambda$ 3. Diese werden von T-Helferzellen und fast allen zytotoxischen T-Zellen gebildet.

### 1.2.2 Die Rolle von TBK1 bei der Produktion von Typ I Interferonen

Die Serin–Threonin-Kinase *tank binding kinase1* (TBK1) wird in den Zellen ubiquitär gebildet und stellt eine wesentliche Komponente von *toll like receptor* (TLR) TLR-3 und TLR-4 vermittelten Induktion von Typ I IFN dar. TLR sind Strukturen des angeborenen Immunsystems und dienen der Erkennung von *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), das sind Strukturen, welche ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen. TBK1 phosphoryliert die Serin-Threoninreste von den Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-7 im Zytoplasma<sup>87</sup>. Diese zwei Transkriptionsfaktoren sind für die Expression von IFN- $\alpha/\beta$  essentiell: Der *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3), reguliert die Expression von IFN- $\beta$ <sup>87, 88, 89 90</sup>; und der *Interferon Regulatory Factor 7* (IRF7) reguliert die Expression von IFN- $\alpha$ <sup>91</sup>. Die phosphorylierten IRF 3 und IRF 7 bilden Hetero- und Homodimere und führen nach anschließender Translokation in den Zellkern zur Transkription von Typ I IFN Genen<sup>92</sup>

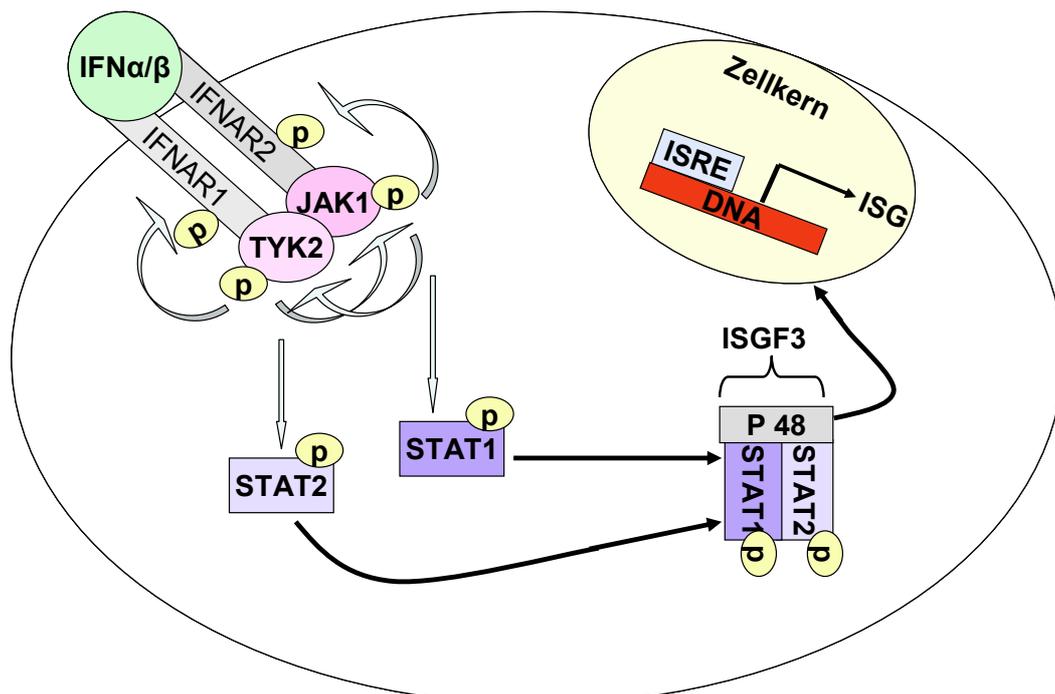


**Abbildung 4: Signalwege für die Aktivierung der Typ I IFN Produktion.** Nach dem Erkennen von viralen und bakteriellen Komponenten durch die Wirtszelle werden die Signalwege für die Induktion von Typ I IFN eingeschaltet. TLR erkennen unterschiedliche Strukturen von Viren im Endosom. Im Zytoplasma werden die viralen ds RNAs durch *retinoic acid inducible gene-1* (RIG1) und *dsRNA dependent protein kinase* (PKR) erkannt. TLR-4 auf der Zelloberfläche sind in der Lage, die LPS von gram-negativen Bakterien und die viralen Glykoproteine zu erkennen. *Listeria monocytogenes* gelangt durch die Phagozytose in das Zytoplasma der Wirtszelle und wird durch einen noch unbekanntem *pattern recognition particle* (PRP) erkannt<sup>93</sup> (Abbildung aus Perry et al 2005).

### 1.2.3 Signaltransduktion durch Typ I Interferone

Die Induktion von dem durch Interferon Typ I vermittelten Signalweg erfolgt über die Bindung von Typ I Interferon an den IFN  $\alpha/\beta$  Rezeptor (IFNAR). Dieser besteht aus zwei Untereinheiten, die als IFNAR1 und als IFNAR2<sup>94-96</sup> bezeichnet werden. Auf der zytoplasmatischen Seite enthält IFNAR1 eine Bindestelle für die Janus-Kinase Tyk2<sup>97, 98</sup> sowie für den Transkriptionsfaktor STAT2. An die IFNAR2 Untereinheit binden STAT1 und die Jak1 Kinase<sup>99</sup>. Die Bindung von Typ I Interferonen an IFNAR induziert die Dimerisierung der Untereinheiten des Rezeptors, sowie die Phosphorylierung

der Rezeptor-assoziierten Kinasen (Abb.5), wodurch Jak1 Kinase die Tyrosinkinase Tyk2 aktiviert<sup>100, 101</sup>. Durch Jak1 und Tyr2 werden die gebundenen Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 phosphoryliert, welche anschließend dimerisieren. STAT1 und STAT2 bilden mit p48 einen Transkriptionskomplex, welcher als ISGF3 (*Interferon stimulated gene factor 3*) bezeichnet wird, in den Zellkern gelangt und die Promotoren, die über ein *interferon stimulated response element* (ISRE-Element) verfügen, aktiviert. Das Protein p48 (IRF9) gehört zur Familie der *interferon regulatory factor* (IRF) und ist im ISGF3- Komplex die DNA-bindende Komponente und somit für die spezifische Bindung an das ISRE-Element verantwortlich<sup>102</sup>.

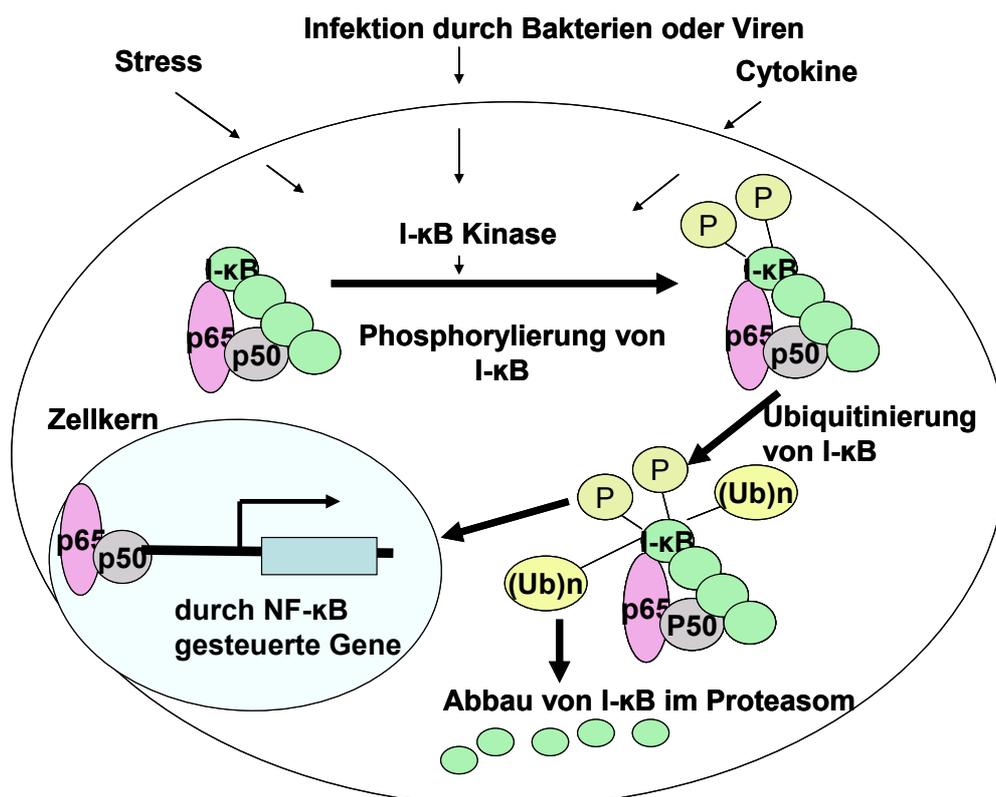


**Abbildung 5: Signaltransduktion der Typ I Interferone.** Die Bindung der Interferone an den Rezeptor induziert die Phosphorylierung der rezeptor-assoziierten Kinasen, die ihrerseits die Phosphorylierung der STAT-Proteine vermitteln. Die Phosphorylierung der STAT-Proteine bewirkt die Ausbildung des ISGF3 Komplexes, welcher in den Zellkern transloziert wird und die Induktion Interferon-spezifischer Gene verursacht (Abbildung nach Darnell et.al 1994<sup>103</sup>)

### 1.2.4 Die NF-κB Signaltransduktion

NF-κB ist ein ubiquitär vorkommender, induzierbarer inflammatorischer Transkriptionsfaktor, der an der Regulation einer Reihe von Zytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen beteiligt ist, insbesondere an der Expression von pro-inflammatorischen Molekülen. Er ist von großer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes<sup>104-106</sup>. Die NF-κB/Rel Proteinfamilie ist in Vertebraten konserviert<sup>106 107</sup>. In Säugern findet man insgesamt fünf Rel /NF-κB Transkriptionsfaktoren: NF-κB1 (p50 und dessen Vorstufe p105), NF-κB2 (p52 und dessen Vorstufe p100), c-Rel, Rel-a (p65) und Rel-b<sup>108-110</sup>. Diese Transkriptionsfaktoren werden durch eine Fülle von unterschiedlichen extrazellulären Signalen aktiviert, beispielsweise von TNFα,

IL-1, von Wachstumsfaktoren, durch bakterielle und virale Infektionen, sowie durch oxidativen Stress<sup>106</sup>. Die Aktivität dieser Proteine wird durch 2 Signalwege reguliert. Das erste ist der klassische Aktivierungsweg, in welchem hauptsächlich Rel-a p50 Dimere involviert sind. In dem zweiten sogenannten alternativen NF- $\kappa$ B Signalweg ist die NF- $\kappa$ B-induzierende Kinase (NIK) involviert<sup>108, 109</sup>. NF- $\kappa$ B ist ein Heterodimer aus zwei verwandten Proteinen (p65 und p50)<sup>111</sup>. Die beiden Proteine weisen an ihren N-Termini homologe Sequenzen auf, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung benötigt werden. In ruhenden Zellen wird NF- $\kappa$ B durch Assoziation mit inhibitorischen Proteinen wie I- $\kappa$ B, im Zytoplasma gehalten<sup>106, 107, 112</sup>. Bei Stimulation über die extrazellulären Signale wird I- $\kappa$ B durch einen großen zytoplasmatischen I- $\kappa$ B-Kinase-Komplex an zwei N-terminalen Serinresten phosphoryliert<sup>106, 113, 114</sup>. Der I- $\kappa$ B-Kinase-Komplex besteht aus zwei katalytischen Einheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO/IKK $\gamma$ . I- $\kappa$ B wird nach Phosphorylierung polyubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom degradiert<sup>106, 107, 110</sup>. Mit der Degradation von I- $\kappa$ B werden die Kernlokalisationssequenzen der beiden Untereinheiten von NF- $\kappa$ B zugänglich<sup>110</sup>. Das aktive NF- $\kappa$ B-Dimer kann nun in den Zellkern translozieren und dort die Transkription von Zielgenen anschalten<sup>107</sup>(Abb.6). Die Aktivierung der beiden klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B Signalwege hängt von der Phosphorylierung der inhibitorischen I- $\kappa$ B Proteine ab. Im klassischen Signalweg wird I- $\kappa$ B $\alpha$  phosphoryliert und im alternativen p100 Protein. Die Phosphorylierung erfolgt durch die Untereinheiten des IKK-Komplexes. IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  sind in der Aktivierung des klassischen und IKK $\alpha$  in der Aktivierung des alternativen Signalweges involviert<sup>108</sup>.



**Abbildung 6: Aktivierung von NF-κB.** Die extrazellulären Signale stimulieren erst einen I-κB-Kinase-Komplex, der I-κB phosphoryliert. Das phosphorylierte Protein wird ubiquitiniert und anschließend im Proteasom abgebaut. Durch die Entfernung von I-κB gelangt der Transkriptionsfaktor in den Zellkern, bindet an bestimmten DNA-Sequenzen und stimuliert anschließend die Genexpression (Abbildung verändert nach „Molekulare Zellbiologie“ Lodish 2001).

### 1.2.5 Die Rolle von TBK1 bei der NF-κB Aktivierung

*TRAF family member associated NF-κB activator TANK binding kinase-1* (TBK1), auch als *TRAF2 kinase* (T2K) und als *NF-κB activating kinase* (NAK) bekannt, wurde ursprünglich als NF-κB aktivierende Kinase identifiziert<sup>87, 115</sup>. TBK1 gehört zu der IKK-Kinase Familie und weist einige strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu IKKα und IKKβ auf. Nach Überexpression in HEK 293 Zellen ist TBK1 in der Lage die Phosphorylierung von I-κBα zu induzieren und NF-κB zu aktivieren<sup>87, 111</sup>. Im Unterschied zu IKKβ phosphoryliert TBK1 nur eine I-κBα Phosphorylierungsstelle (Serin 36)<sup>116</sup>. Eine andere Studie zeigt, dass TBK1 IKKβ phosphoryliert<sup>115</sup>. Die Phosphorylierung von I-κB durch den I-κB-Kinase Komplex (IKK) stellt den kritischen Schritt in der NF-κB-Aktivierung dar. Der IKK Komplex wird durch die Phosphorylierung der IKKβ-Untereinheit aktiviert<sup>117</sup>. TBK1 aktiviert die IKK-Kinase durch direkte Phosphorylierung dieser Untereinheit und führt dadurch zu einer Aktivierung von NF-κB<sup>115</sup>. Es gibt jedoch auch Hinweise dafür, dass TBK1 Rel-a phosphoryliert und dadurch den NF-κB-Signalweg aktiviert<sup>87, 109</sup>. Die Aktivierung von NF-κB durch TNFα und IL-1 wird durch die TRAF-Familie von Adaptorproteinen vermittelt. Die Bindung von TNFα oder IL-1 an Zelloberflächenrezeptoren verursacht deren Oligomerisierung, was zur Rekrutierung von TRAF an den Rezeptorkomplex führt. Dadurch erfolgt die Aktivierung der Kinase-Kaskade und

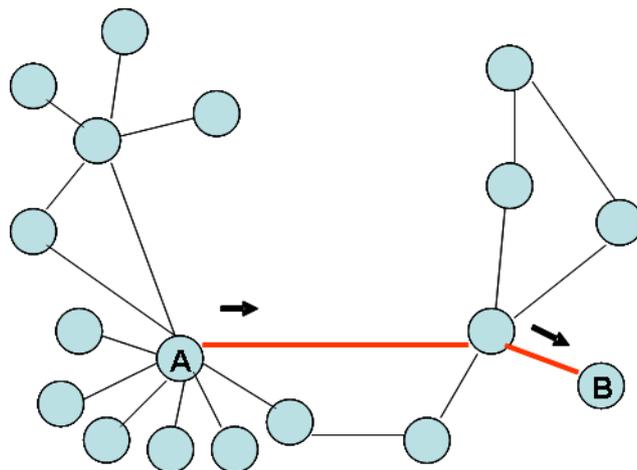
anschließende I $\kappa$ B-Phosphorylierung. TANK ist ein TRAF bindendes Protein, das einerseits die Bindung von TRAF an die Rezeptoren verhindert und andererseits die TRAF vermittelte NF- $\kappa$ B Aktivierung stimuliert. TBK1 formt einen Komplex mit TANK und TRAF2 und ist für die TANK abhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung erforderlich<sup>111</sup>. Obwohl TBK1 in der Lage ist, über unterschiedliche Wege, durch Phosphorylierung der I $\kappa$ B Kinase NF- $\kappa$ B zu aktivieren, liegt seine Hauptrolle in der Aktivierung von IRF3 und IRF7<sup>115, 118, 119</sup>.

## 1.3 Systembiologie

Systembiologie erforscht biologische Prozesse unter Einbeziehung sämtlicher Komponenten, vom Genom über das Proteom bis hin zur kompletten Zelle und dem vollständigen Organismus. Dabei werden die Daten über die einzelnen Bestandteile des untersuchten Systems gesammelt und mit Hilfe bioinformatischer Methoden in einen Gesamtzusammenhang gebracht. Dies ermöglicht weitere Simulationen und Vorhersagen über die Organisation des Systems und über den Verwandtschaftsgrad mit anderen Organismen. Auch wenn am Ende das gesamte System dargestellt werden soll, so beschränkt man sich in aktuellen Studien doch meist auf die Analyse einer Ebene, wie dem Genom (DNA), dem Transkriptom (RNA) oder, wie in der vorliegenden Arbeit, dem Proteom. Ein Hauptwerkzeug ist dabei die Erstellung von Interaktionsnetzwerken, um die komplexen Verbindungen zwischen den einzelnen Komponenten sichtbar zu machen.

### 1.3.1 Netzwerktopologie

Um die räumliche Struktur von Interaktionsnetzwerken genauer zu beschreiben, wurden verschiedene Begriffe und Symbole eingeführt. In einem Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk, wie in der Abbildung 7 dargestellt, werden die einzelnen Proteine als Kreise, die sogenannten Knoten (*nodes*), und die Protein-Protein Interaktionen (PPIs) als Verbindungslinien oder Kanten (*edges*) zwischen den jeweiligen Knoten dargestellt. Der Abstand zwischen zwei beliebigen Knoten A und B ist definiert als die Anzahl von Verbindungslinien, die man „passieren“ muss, wenn man sich innerhalb des Netzwerkes auf dem kürzesten Weg von Knoten A zu Knoten B bewegt (Abb.7).



**Abbildung 7: Netzwerk-Topologie.** Die Knoten (*nodes*) eines Netzwerks sind als Kreise dargestellt und stehen für die Proteine. Die Verbindungslinien oder Kanten (*edges*) symbolisieren eine Interaktion zwischen den durch sie verbundenen Knoten. Der Abstand zwischen Knoten A und B, also die minimal benötigte Anzahl an Verbindungslinien (s. schwarzen Pfeile), beträgt 2. Das Protein A interagiert mit 9 Proteinen, d. h. sein Grad ist 9. Da das Protein A im Vergleich zu den Anderen auffallend viele Wechselwirkungen eingeht, wird es auch als Knotenpunkt oder Hub bezeichnet (modifiziert nach Jeong et. al.<sup>120</sup>).

Zur Charakterisierung der Topologie der Netzwerke sind nun folgende Begriffe von Bedeutung:

Die Pfadlänge ist der Durchschnittswert der Abstände zwischen den Knoten in einem Netzwerk.

Der Grad (*degree*) eines Proteins gibt an, mit wie vielen anderen Proteinen es interagiert. Proteine, die auffallend viele Wechselwirkungen eingehen, werden als Knotenpunkte oder Hubs bezeichnet<sup>121</sup>.

#### Grad- Verteilung (*degree distribution*)

Knoten eines Netzwerks besitzen unterschiedliche Anzahl von Interaktionen (Grad, *degree*). Grad Verteilung  $P(k)$  gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass der gegebene Knoten exakt  $k$  Verbindungen (*links*) besitzt.  $P(k)$  wird errechnet, indem man die Anzahl der Knoten  $N(k)$  mit  $k = 1, 2, \dots, \text{links}$  auszählt und durch die Gesamtzahl der Knoten teilt<sup>121</sup>.

### 1.3.2 Zufalls- und Scale free- Netzwerke

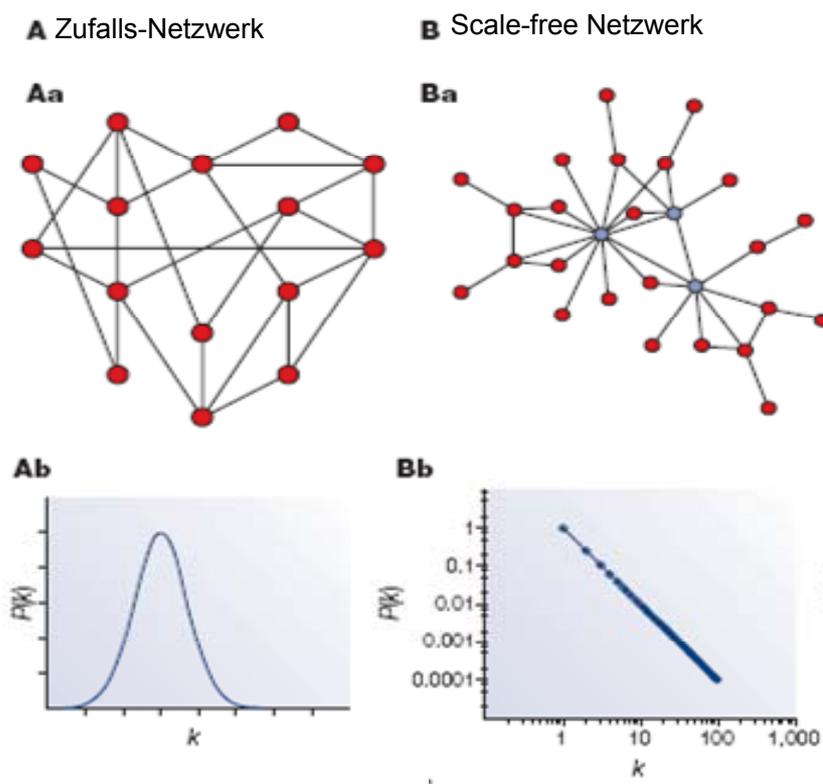
In der Netzwerkbiologie unterscheidet man zwischen Zufalls- und *scale-free* Netzwerken. Im Zufalls-Netzwerk haben alle Knoten etwa dieselbe Anzahl von Verbindungen, und die Knotengrad folgt der Poisson Verteilung. Folglich findet man in den Zufalls-Netzwerken keine Hubs. Zellulären Netzwerke und die meisten Netzwerke innerhalb der Zelle sind *scale-free* Netzwerke. *Scale-free* Netzwerke weisen im Gegensatz zu den Zufalls-Netzwerken (bei dem sich die Anzahl der *links* pro

Knoten nach Poisson Verteilung richtet) keine spezifische Anzahl von *links* pro Knoten auf. Sie folgen einem *power law* Gesetz <sup>121</sup>:

$$p \sim k^{-\gamma}$$

wobei die  $\gamma$  eine einheitslose Zahl ist.

Hat ein Netzwerk eine *power law* Verteilung, so bedeutet das, dass es viele Knoten gibt mit wenigen Verbindungen und wenige Knoten mit vielen Verbindungen, die dann als Hubs bezeichnet werden (Abb 8).



**Abbildung 8: Zufalls- und Scale-free Netzwerke.** (Aa) Im Zufalls-Netzwerk haben alle Knoten die gleiche Anzahl von Links (Ab) und deren Knotengrad folgt der Poissonverteilung. (Ba) In *scale-free* Netzwerken gibt es viele Knoten mit weniger Links und weniger Knoten mit vielen Links (Bb) und deren Knotengrad folgt dem *power law*-Gesetz (Abbildung entnommen aus Barabasi <sup>121</sup>).

### Clustering Koeffizient

Häufig geht ein Teil der Proteine in einem Netzwerk viel mehr Wechselwirkungen untereinander ein, als mit anderen Proteinen. Diese Proteine bilden eine Gruppe, welche als klar abgegrenztes *cluster* zu erkennen ist. Beispielsweise, wenn Knoten A mit Knoten B und Knoten B mit Knoten C verbunden ist, ist es wahrscheinlich dass Knoten A mit Knoten C verbunden ist. Diese Art der Gruppenbildung kann mit Hilfe von *Clustering* Koeffizient quantifiziert werden. Clustering Koeffizient ist ein Maß für den Grad der Verlinkung in einem Netzwerk. Der durchschnittliche Clustering Koeffizient  $C$  eines Knoten charakterisiert die durchschnittliche Tendenz von Knoten, *cluster* oder Gruppen zu bilden <sup>121</sup>.

### Anfälligkeit von Netzwerken (*attack tolerance*)

Das Hauptmerkmal vieler komplexer Systeme ist deren Robustheit. Die spezielle Struktur eines *Scale-free* Netzwerkes macht es robust gegen den zufälligen Ausfall von Interaktionen. Wird aber ein Hub gezielt ausgeschaltet, so zerfällt das Netzwerk schnell in einzelne Teilnetze. Das gezielte Ausschalten von Hubs führt zum Zusammenbruch des gesamten Netzwerks<sup>122</sup>.

### Grad und *betweenness* Zentralität

Grad und *betweenness* Zentralität sind die wichtigsten topologischen Parameter von Netzwerken. Der Begriff *betweenness* wurde eingeführt, um die Zentralität von Knoten in einem Netzwerk zu vermessen. Mittels *betweenness* wird die Anzahl von kürzesten Pfaden gemessen, die durch den bestimmten Knoten durchgehen. Definitionsgemäß geht durch die Knoten mit dem höchsten *betweenness* die höchste Anzahl der kürzesten Pfade. Deshalb sind diese Knoten zentrale Punkte im Netzwerk. Die Proteine, die in einem Netzwerk die höchsten *betweenness* aufweisen werden als *bottlenecks* genannt, während die Proteine mit höchsten Grad als Hubs genannt werden. Die Knoten eines Netzwerkes sind demnach durch hohen Grad gekennzeichnet und sehr interaktiv, während *bottlenecks*, die zentral an vielen Anschlusspunkten zwischen den Proteinen sind, durch eine hohe *betweenness* Zentralität gekennzeichnet sind, jedoch nicht unbedingt eine große Anzahl an Proteininteraktionen besitzen<sup>123, 124</sup>.

## 1.3.3 Die Erstellung von Protein Interaktionsnetzwerken mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Systems

Das Hefe-Zwei-Hybrid System (Y2H System) ist ein genetisches Screeningverfahren zur Identifikation von Proteininteraktionen. Das Protein X wird mit der DNA-Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors fusioniert und das Protein Y mit der Transkriptionsaktivierungsdomäne dieses Transkriptionsfaktors. Wenn die beiden X und Y Proteine miteinander interagieren, kommt es zu der funktionellen Rekonstruktion des Transkriptionsfaktors und anschließend zur Expression des Reportergens, welches durch die DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors erkannt wird. Im Y2H-Screening-Verfahren können in einem eher empirischen Ansatz mit einer cDNA Genbank mögliche Interaktionspartner identifiziert werden, oder aber es können bei dem sogenannten *direct mating* gezielt die Interaktion für bestimmten Proteinen überprüft werden.

## 1.3.4 Zelluläre Netzwerke

Genomweite Protein-Interaktionsnetzwerke wurden für *E.coli*<sup>121, 125</sup>, *S.cerevisiae*<sup>126, 127</sup>; *Helicobacter pylori*<sup>128</sup>, *Drosophila melanogaster*<sup>129</sup>, *Caenorhabditis elegans*<sup>130</sup>, *Plasmodium falciparum*<sup>131</sup>, *Mycoplasma pneumoniae*<sup>132</sup>, und *Homo sapiens*<sup>133, 134</sup> erstellt. Sie alle stellen *scale-free* Netzwerke dar. Zelluläre Netzwerke sind *scale-free* Netzwerke und besitzen viele Hubs, die Mehr-

heit der Knoten weist jedoch nur wenige Interaktionspartner auf und ist deswegen peripher angeordnet. Die Interaktionen zellulärer Netzwerke folgen einer *power law* Verteilung. Ein weiteres Merkmal zellulärer Netzwerke ist der hohe Clustering Koeffizient. Insgesamt zeigen zelluläre Netzwerke also ein Bild aus vielen untereinander stark vernetzten Modulen, wobei die verschiedenen Module eher gering miteinander vernetzt sind<sup>135</sup>.

### **1.3.5 Ziel der Arbeit**

Durch die Yersinia-Infektion setzt ein komplexes Wechselspiel zwischen bakteriellen und Wirtszellkomponenten ein, welches viele zelluläre Prozesse beeinflusst. Während eine Reihe von Mechanismen der Yersinia-Infektion bereits gut verstanden ist, ist das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen bakteriellen und zellulären Komponenten bisher weitgehend unbekannt. Das Ziel des vorliegenden Projekts war es deshalb, die Struktur und die Dynamik der komplexen intrapathogenen und Pathogen-Wirt Interaktionsnetzwerke zu verstehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

ABI Prism 7000	Applied Biosystems, Foster City, USA
Barcode Reader	ISC Barcode, Neuried, Deutschland
Biomek FX	Beckmann Coulter, Deutschland
Cryo 1 °C Einfriercontainer	Nalgene Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Dampfsterilisator, LTA 1x2x3	Zirbus Technology, Bad Grund/Harz, Deutschland
Digitalkamera LEICA DF C360 FX	Leica Mikrosystems, Wetzlar, Deutschland
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filmentwickler Optimax	TR MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
FLA300 Fluoimager	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop LEICA DM 400B	Leica Mikrosystems, Wetzlar, Deutschland
Fluostar Optima, BMG Labtech	BMG-Labtech, Offenburg, Deutschland
Geldokumentationssystem Eagle Eye und RH2	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Kammern für Agarosegelelektrophorese	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge 6K15	Sigma, München, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Mikrowelle	AEG, Berlin, Deutschland
Multi-Plattenlesegerät Fluostar	BMG-Labtech, Offenburg, Deutschland
Nasstransfersystem, Protean II	Biorad, Mannheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda, Deutschland
PCR Thermocycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
pH Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe, Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Polyacrylamidgelelektrophorese System, Protean II	Biorad, Mannheim, Deutschland
Real Time PCR-Gerät, Light Cycler II	Roche, Mannheim, Deutschland
Spannungsquelle für die Elektrophorese	Biorad, Mannheim, Deutschland
Spektrophotometer (Biochrom Libra S12)	Biochrom, Deutschland
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Tiefkühlschrank (-20°)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Tiefkühltruhe (-80°C)	Forma Scientific, Inc., Ohio, Marietta, USA

UV-Transilluminator  
 UV-VIS Photometer, Nanodrop ND-1000  
 Vortex Mixer  
 Wasserbad  
 Zellkulturinkubatoren Forma Scientific  
 Zentrifuge Heraeus Multifuge 1

LKB, Freiburg, Deutschland  
 Peqlab, Erlangen, Deutschland  
 IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland  
 Julabo, Selbach, Deutschland  
 Inc., Marietta Ohio, USA  
 Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

### 2.1.2 Software

AbiPrism7000 Software  
 AssayDesignCenter  
 (www.universalprobelibrary.com)  
 Cytoscape (www.cytoscape.org)  
 DAVID Datenbank,  
<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>  
 QuikChange® Primer Design Program  
<http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>  
 Software LEICA AF 6000  
 Fragment Analysis V1.2

Applied Biosystems, Foster City, USA  
 Roche, Mannheim, Deutschland  
  
 Frederick Institute, Frederick, USA  
  
 Stratagene, La Jolla, USA  
  
 Leica Mikrosystems, Wetzlar, Germany  
 Amersham Biosciences, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien

3-Amino-1,2,4-triazole  
 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)  
 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside  
 6xDNA Ladepuffer  
 Agarose für Elektrophorese  
 Ammoniumperoxodisulfat  
 Ampicillin Natriumsalz  
 Aqua ad injectabilia  
 Bacto Agar  
 Bacto Trypton  
 Bacto Yeast Extract  
 Bovines Serum Albumin (BSA)  
 Bromphenolblau  
 cDNA Genbank  
 ORF Clonkollektion  
 MGC Clonkollektion

Sigma-Aldrich, München, Deutschland  
 Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Sigma-Aldrich, München, Deutschland  
 Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland  
 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 Roth, Karlsruhe, Deutschland  
 Roth, Karlsruhe, Deutschland  
 Braun, Melsungen, Deutschland  
 Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland  
 Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland  
 Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland  
 Roth, Karlsruhe, Deutschland  
 Sigma Aldrich, München, Deutschland  
 Clontech Laboratories, USA  
 DKFZ, Heidelberg, Deutschland  
  
 Karolinska Institut, Stockholm, Schweden

Chloramphenicol	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R-250	Merck, Darmstadt, Deutschland
D(+)-Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dextrose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dialysiertes fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dimethylformamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Mix	Roche, Mannheim, Deutschland
Dodecylsulfat Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ECL Chemilumineszenz System	Pierce, Rockford, USA
Essigsäure, Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolute (EtOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd (37%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
FuGene6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim, Deutschland
Gelladepuffer, 10x	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hexanukleotid Random-Primer-Mix	Promega, Madison, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kalium Hydroxid Plätzchen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin Sulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin-Lösung (200mM)	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Serva, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA, 100x)	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland

PEG6000	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth Karlsruhe, Deutschland
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protease Inhibitor, Complete, Mini, EDTA-frei	Roche, Mannheim, Deutschland
Rotiphoresegel 30 (37,5:1) Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bicine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Sorbitol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Supplement-Stammlösungen	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
CSM-trp, CSM-leu, CSM-leu-trp, CSM-LWH	
YNB with Ammonium Sulfate	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Tris-HCL	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau, Färbelösung 0,4%	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin-EDTA (10x)	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Universal Probe Library, TaqMan Sonden	Roche, Mannheim, Deutschland
Zellkulturmedium D-MEM	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturmedium <i>Endothelial cell growth medium</i>	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturmedium Opti-MEM	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturmedium RPMI1640	Gibco- BRL, Karlsruhe, Deutschland

#### 2.1.4 Verbrauchsmaterial

Cryo-Röhrchen	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Glaswaren (Flaschen, Kolben u.s.w.) Duran	Schott, Mainz, Deutschland
Mikrotiterplatten	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Nitrocellulose	Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Bio One Frickenhausen, Deutschland
Pierce-Zentrifugenröhrchen	Fisher Scientific Schwerte, Deutschland
Pipettenspitzen	Fa Peske GmbH & Co.KG, Aindlingen,

Protein-G-Sepharose-Kügelchen	Deutschland
Reaktionsgefäße	GE Healthcare, München, Deutschland
Röntgenfilm SuperRX	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Sterilfilter 0,22 und 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen- / flaschen	Millipore, Billerica, USA
	Nunc, Langenselbold, Deutschland

### 2.1.5 Molekulargewicht-Standards

Benchmark prestained protein ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gene Ruler 1kb DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

### 2.1.6 Kits

Dual-Luciferase reporter assay system	Promega, Madison, USA
ECL western blotting detection system	Amersham, Freiburg, Deutschland
pGEM-T vector system	Promega, Madison, USA
Poly A tailing Kit	Ambion, Austin, USA
PureYield plasmid midiprep system	Promega, Madison, USA
Qiagen MinElute gel extraction kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen MinElute PCR purification kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin miniprep kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Nucleotide Removal kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis kit	Stratagene, La Jolla, USA

### 2.1.7 Enzyme

BP-Clonase Mix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNAseI	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Expand Long DNA Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
GoTaq Flexi DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
Intestinale Kälberphosphatase (CIP)	NEB, Beverly, USA
LR-Clonase Mix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pfu Polymerase	Promega, Madison, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Beverly, USA
SuperScriptII reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

## 2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) und der Firma Metabion (München) bezogen. Die Yersiniogene in diesem Projekt wurden unter Verwendung des Virulenzplasmids pYV127/90 von *Y. enterocolitica* O:8 mittels PCR amplifiziert.

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide**

Bezeichnung	Primer Sequenz 5'-3'	Start	Stop	Length	Strang For/Rev
YlpA for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGAAGATGATATGAAGAAA AAA-CATGAA	2607	3356	749	Rev
YlpA rev	AGAAAGCTGGGTCCTACAGGATATTGGCGATAGACTTC				
YopQ for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTTTATTAAGATGATTATAA-CATGCG	3826	4374	548	Rev
YopQ rev	AGAAAGCTGGGTCCTATCCCATAATACATTTTTGATCGC				
YopT for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGACAGTATTACGGACACTACCA	4887	5855	968	For
YopT rev	AGAAAGCTGGGTCCTAAACCTCCTTGAATCAAATGTA AAAA				
SycTfor	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCAGACAACCTTCACAGA ACT-TATGCA	5855	6247	392	For
SycTrev	AGAAAGCTGGGTCCTAGATGAATAATATGGGTGATGTCGAGT				
Orf77 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCAGACAACCTTCACAGA ACT-TATGCA	7555	7788	233	For
Orf77 rev	AGAAAGCTGGGTCCTAAGACAACGATAGCTCATGGGCATAAT				
YopM for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTATGGTTTTGTTTGAATGAAA-AACC	9260	10840	1580	Rev
YopM rev	AGAAAGCTGGGTCCTACTCAAAAACATCATCTTCAAGTTTGT				
Orf91b for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCCGCTATTTTTAGATTCTCGA-CAAA	10975	11205	230	For
Orf91b rev	AGAAAGCTGGGTCCTAATGATATTGCCGGTAAGTTGATTTT				
YopD for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACAATAAATATCAAGAC AGA-CAGCCC	11673	12593	920	Rev
YopD rev	AGAAAGCTGGGTCCTAGACAACACCAAAAAGCGGCTTTCA				
YopB for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGTTCGTTGATAACCCA	12612	13817	1205	Rev
YopB rev	AGAAAGCTGGGTCCTAAACAGTATGGGGTCTGCGG				
SycD for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCAACAAGAGACGACAGACT-CAAGA	13795	14301	506	Rev
SycD rev	AGAAAGCTGGGTCCTATGGGTTATCAACGA ACTCATGTTCCA				
LcrV for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATTGAGCCTACGAACAAAACC-CACA	14304	15305	1001	Rev
LcrV rev	AGAAAGCTGGGTCCTACCTCGTGCATCTAGCAGACGTT				

Bezeichnung	Primer Sequenz 5'-3'	Start	Stop	Length	Strang For/Rev
LcrG for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAATCTTCTCATTTTGATGAA-TATGA	15307	15594	287	Rev
LcrG rev	AGAAAGCTGGGTCCTAAATAATTTGCCCTCGCATCATC				
LcrR for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATGGAAGACCCTT-TAATTCCGTGGCT	15636	16076	440	Rev
LcrR rev	AGAAAGCTGGGTCCTAGGCAAAGCCGTTGTTTTGTCGCTTTT				
LcrD for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAATCCCCATGATCTTGA GTGGCTAAA	16073	18187	2114	Rev
LcrD rev	AGAAAGCTGGGTCCTATAAGCAAACCTCGTCCAAGTGGTTGGA				
YscY for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAATATTACTTTAACCAAACGA-CAACA	18174	18518	344	Rev
YscY rev	AGAAAGCTGGGTCCTATGGGGATTCAATTATGATCTTTCAACT				
YscX for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGTCGCATAATAACTGCCCCCA	18515	18883	368	Rev
YscX rev	AGAAAGCTGGGTCCTATACTTTGTGCAACAGGTTAAGGATTA				
SycN for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGTTGGATTGAACCCAT-CATTTCCA	18880	19251	371	Rev
YscN rev	AGAAAGCTGGGTCCTACGGCGCAAGCACCTCTTG				
TyeA for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACCAGGTTAAAGGATTTTGG-CAATTT	19238	19564	326	Rev
TyeA rev	AGAAAGCTGGGTCCTAATCCAACCTCACTCAATTCTTCTCTT				
TyeA1 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCGTACGACCTTCTGAGTT-TATGG	19238	19516	278	Rev
TyeA1 rev	AGAAAGCTGGGTCCTAATCCAACCTCACTCAATTCTTCTCTT				
YopN for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACGACGCTTCATAACATATCT-TATGG	19497	20378	881	Rev
YopN rev	AGAAAGCTGGGTCCTAGAAAGGTCGTACGCCATTAGTTTTAC				
YscN for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCTCTCACTAGATCAGATACCT-CATC	20576	21895	1319	For
YscN rev	AGAAAGCTGGGTCCTATTGGGTCAGCGTCTCCAATAAG				
YscO for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATACGCCGCTGCACCG	21892	22356	464	For
YscO rev	AGAAAGCTGGGTCCTAGGCGTTCCTGTGATGCTGTAG				
YscP for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAATAAAATCACCCTCGTTCCCC	22356	23717	1361	For
YscP rev	AGAAAGCTGGGTCCTATTCTCAGCCTCCCACTCC				
YscQ for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGTTTGTTAACCTTGCCA-CAAGCC	23714	24637	923	For
YscQ rev	AGAAAGCTGGGTCCTATGAAATCGTAACCTCTGTCAGGC				
YscR for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATCCAGTTACCGGATGAAAT-TAATC	24634	25287	653	For

Bezeichnung	Primer Sequenz 5'-3'	Start	Stop	Length	Strang For/Rev
YscR rev	AGAAAGCTGGGTCCTACCCTCCGTAAC TAATCACC				
YscS for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGTCAAGGTGACAAATTCAC TTC	25289	25555	266	For
YscS rev	AGAAAGCTGGGTCCTATCTTATGCCTTGTATCTTCATCATG				
YscT for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATAGCGGATTAATCCAAGACC	25552	26337	785	For
YscT rev	AGAAAGCTGGGTCCTACTTCTCCAAAACAGGGATCAG				
YscU for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGCGGAGAAAAGCAGAGCAAC	26337	27401	1064	For
YscU rev	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGCGGAGAAAAGACAGAGCAAC				
VirG for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGTCGTATTATAGCACTTAT- CATTTC	27977	28372	395	For
VirG rev	AGAAAGCTGGGTCCTATCTGGTATTAGGTGACTGC				
VirF for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCATCACTAGAGATATTAAATTAG	28496	29311	815	For
VirF rev	AGAAAGCTGGGTCCTAGCCTGTGGTTGCTATTTTAG				
YscA for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGCCAAATTACAACGAAACATA- TAAC	29390	29488	98	For
YscA rev	AGAAAGCTGGGTCCTAATAAGCCAGATAAGCTATCTTG				
YscB for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCAAAATTTACTAAAAAACTTGGC- TACC	29713	30126	413	For
YscB rev	AGAAAGCTGGGTCCTAATTCCACCCCACGGCGAG				
YscC for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCTTTTCCGCTACATTCTTTT	30132	31955	1823	For
YscC rev	AGAAAGCTGGGTCCTACAATACGCCACGCTTAGC				
YscD for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGTTGGGTCTGTCGTTTTTAT- CAAG	31952	33208	1256	For
YscD rev	AGAAAGCTGGGTCCTATTGAGGTTACCTCCATTGAGCTG				
YscE for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACACAATTAGAGGAGCAACTGC	33205	33408	203	For
YscE rev	AGAAAGCTGGGTCCTATTTTTTTAGGTCTCCTGTTACATAATG				
YscF for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGTAATTTCTCTGGGTTTGCAA- AAG	33405	33668	263	For
YscF rev	AGAAAGCTGGGTCCTATGGGAACTCTGTAGGATGCC				
YscG for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAATATAAACTCAACGTA CTGT- TAGC	33670	34017	347	For
YscG rev	AGAAAGCTGGGTCCTATGTTTTTAGTTGCTCCCTCATTC				
YscH for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACGGTACCCTTAATAGAGG TTC	34014	34511	497	For
YscH rev	AGAAAGCTGGGTCCTATGTATCCATATCAATTTGATGGCTG				

Bezeichnung	Primer Sequenz 5'-3'	Start	Stop	Length	Strang For/Rev
YscI for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTCGAACATAGAAATAGCTCAGGC	34512	34859	347	For
YscI rev	AGAAAGCTGGGTCTACCCCCCTTCGACAAGG				
YscJ for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAAGTTAAGACTTCACTGTCAA- CATTG	34866	35600	734	For
YscJ rev	AGAAAGCTGGGTCTACTTCTTGC GTTGTAAACAAAAATATTG				
YscK for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATGGAAAATTATAT- TACCTCTTTTC	35600	36229	629	For
YscK rev	AGAAAGCTGGGTCTATTTGAACAAATGGCTGCATGTAG				
YscL for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTCACAACTTGTCAAACAGGT- TATG	36175	36846	671	For
YscL rev	AGAAAGCTGGGTCTATTCTCTTCTATAACTTTTCATTTGTCC				
YscM1 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAATCAATACTCTTCAATCGT- TAAT	37064	37411	347	For
YscM1 rev	AGAAAGCTGGGTCTAGCCATCAGCCGCCGTAT				
YopH for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAACTTATCATTAAAGCGATCTT- CATCG	38085	39491	1406	For
YopH rev	AGAAAGCTGGGTCTAGCTATTTAATAATGGTCGCCCTTG				
SycH for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCGCACTTACAGTTCATTA CTTG AAG	39713	40138	425	Rev
SycH rev	AGAAAGCTGGGTCTAAACCAGTAAATGAGATGAAGAAAGAC				
SycE for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTATTCATTTGAACAAGCTAT- CACTC	40492	40884	392	Rev
SycE rev	AGAAAGCTGGGTCTAACTAAATGACCGTGGTGGTG				
YopE for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAATATCATCATTTATTTCTA- CATC	41077	41736	659	For
YopE rev	AGAAAGCTGGGTCTACATCAATGACAGTAATTGATGC				
Orf134 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACCGATGCCTGGTCGAG	41777	42181	404	Rev
Orf134rev	AGAAAGCTGGGTCTAAAACGCCTGATGAACTTCATCGG				
Orf186 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCTACGCAAGTTAATGACG- GATTTG	42307	42867	560	Rev
Orf186 rev	AGAAAGCTGGGTCTAAACGCTGGCGAACGCCATTG				
Orf76 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGATAAAAAACAAGGGGA- TAGTGTTTCCC	43064	43360	296	For
Orf76 rev	AGAAAGCTGGGTCTAGGGGCTGAGTGTAACTGGATTTG				
Orf92 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAACCAATATGTTAAACGCACG- CAAC	42735	43010	275	Rev
Orf92 rev	AGAAAGCTGGGTCTAGCGATGCGCGAAGTTTCTG				
Orf75 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTATAAACTATCTGAACTGGCT- GATG	43199	43501	302	Rev

Bezeichnung	Primer Sequenz 5'-3'	Start	Stop	Length	Strang For/Rev
Orf75 rev	AGAAAGCTGGGTCCTACTGCTCATACTCTGGAAAATCCTG				
Orf80 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCTCGCGTAACCAGCGTAAC	43494	43736	242	Rev
Orf80 rev	AGAAAGCTGGGTCCTATACACTAGTATCTTTCACCGCAGC				
SpyB for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAAAGGTCACCAGTGTTACG-TAATG	44953	45915	962	Rev
SpyB rev	AGAAAGCTGGGTCCTACAAAGAATGTTCCTTTGCATAGG				
SpyB2 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTTTTACTATAAAGACGCAAATTC	45915	47123	1208	Rev
SpyB2 rev	AGAAAGCTGGGTCCTATGCATTCTCCCAACGAG				
SpyA for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGATCTAAAGTCAACTCTT-GACCGCTG	45915	47081	1166	Rev
SpyA rev	AGAAAGCTGGGTCCTATGCATTCTCCCAACGAGGCTTAAC				
Orf73 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCACTCGTCACCTATGAACTGGC	47395	47610	215	Rev
Orf73 rev	AGAAAGCTGGGTCCTACCACTGAATCGCCACGGATAATC				
YomA for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCTAATGAAAAATTTTTAG-TAATTC	48131	49006	875	Rev
YomA rev	AGAAAGCTGGGTCCTATTTCTCAATGAGATCAAAGAAC				
YadA for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACTAAAGATTTTAAG AT-CAGTGTC	49076	50344	1268	Rev
YadA rev	AGAAAGCTGGGTCCTACCACTCGATATTAATGATGCATTGT				
Tnp for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTCCCAACCCTTCGATTTGAC	51637	52839	1202	For
Tnp rev	AGAAAGCTGGGTCCTACAACGTAATCACTTTATCGAGGC				
Orf78 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATTGTGGCAGACGTCAGTA-AATTG	52969	53277	308	Rev
Orf78 rev	AGAAAGCTGGGTCCTAGATATTATTTTTCTGCTTATATGCCTC				
Orf79 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCGTGGATAGTGGCATTATTT-CAC	53277	53906	629	Rev
Orf79 rev	AGAAAGCTGGGTCCTACCCTCCAATCTTGTTTATCAACGAC				
Orf81 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTTGAGTCTATCCCCACG	54081	54815	734	Rev
Orf81 rev	AGAAAGCTGGGTCCTACGGTAACAACAAGGCTCTGG				
Orf88 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGGCACACCACGTTTTACCCC	56900	57166	266	Rev
Orf88 rev	AGAAAGCTGGGTCCTACTCAGCCACCAACATGGAAAAAG				
Orf155 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATTAACCTCAACCTTTACTGAGC-TAC	57328	57759	431	For
Orf155 rev	AGAAAGCTGGGTCCTAATAACCGATTGAGTAGATTGAGTAAG				

Bezeichnung	Primer Sequenz 5'-3'	Start	Stop	Length	Strang For/Rev
YopO for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAAATCATGGAACTATGTCACC	57777	59966	2189	For
YopO rev	AGAAAGCTGGGTCCTACATCCATTCCCGCTCCAAC				
YopP for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATTGGACCAATATCACAAATAAA-CAGC	60333	61199	866	For
Yop P rev	AGAAAGCTGGGTCCTATACTTTGAGAAGTGTTTTATATTGAGC				
YscM2 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGGGAGCATTATGAAAATAAAC-GATC	61818	62168	350	For
YscM2 rev	AGAAAGCTGGGTCCTAAAGCTTTTGCATTTTCCGTGTCAC				
Orf155b for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAACGAACCAGCACTGAAGCC	62299	62766	467	Rev
Orf155b rev	AGAAAGCTGGGTCCTAGGGTGGCGTTGTAACACAC				
Tnp2 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTCCCAACCCTTCGATTTGAC	63026	63601	575	Rev
Tnp2 rev	AGAAAGCTGGGTCCTATGGAACACTATTGATATTGAGCGC				
Tnp3 for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGGGACGAAAAGAGCTTAGCG	65079	65537	458	For
Tnp3 rev	AGAAAGCTGGGTCCTACTTACGGCCCGTAAACGGG				
RepA for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGATAAGCAGAAATTCTC-TAATTTTTC	66295	726	1022	For
RepA rev	AGAAAGCTG0GGTCCTAGTGATAGGGTTCTGGCGG				
RepC for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATCGAAGGTGTGCATGAGCG	65739	65984	245	For
RepC rev	AGAAAGCTGGGTCCTACTATAGTGGATCTTTGAAGCCGCAG				
RepB for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGTACAATCCAAATCAA GCCTCCG	66246	66302	56	For
RepB rev	AGAAAGCTGGGTCCTATCCACCCACACTGCGC				
<b>Primer für Proteine mit Transmembrandomänen</b>					
Ylp A(aa33-216) out for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAAAACGTAATCTGGAAGTGA-AAAC	2707	3356	649	Rev
YscT(aa100-131) ins for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATTGTAGATAACCAAAGAGG	25847	25948	101	For
YscT(aa100-131) ins rev	AGAAAGCTGGGTCCTACGTTTGAGTCAAAGTAAACC				
YopB(aa189-401) out for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCCGTTGCCGGTGAATGAT-GATTG	13174	13817	643	For
YopB (aa1-165) ins rev	AGAAAGCTGGGTCCTACTTTGATGCCATGCCGG	12612	13108	496	For
LcrD (aa314-704) out for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGGCTGTGGTGGTTATATGCTCAG	17010	18187	1177	Rev
LcrD (aa132-200) ins for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATAACGAAAGGCTCAGAACGTG-TAG	16469	16673	204	Rev
LcrD (aa132-200) ins rev	AGAAAGCTGGGTCCTAATCCCCTTTGACGAACCTCATG				

Bezeichnung	Primer Sequenz 5'-3'	Start	Stop	Length	Strang For/Rev
YscD (aa1-129) ins rev	<b>AGAAAGCTGGGTCCTAAAGA</b> ACTCCAAGCCAATCCCAAG	31952	32339	387	For
YscD (aa153-424) out for	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCC</b> ATGGGACAACCTTGTGAGCAA- GAAGTAC	32411	33208	797	For
YscJ (aa1-217) out rev	<b>AGAAAGCTGGGTCCTAAC</b> GCCCTTTTACTCTTCACTCAC	34866	35517	651	For
YscR (aa32-50) out for	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCC</b> ATGAAATTTGCGGTGGTTTTTTCAC- TAC	24730	24784	66	For
YscR (aa32-50) out rev	<b>AGAAAGCTGGGTC</b> TAGGGGATTTGCTGTACCCC				
YscR (aa74-158) for	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCC</b> ATGACGCAAGACTATTTACAAGC	24886	25108	252	For
YscR (aa74-158) rev	<b>AGAAAGCTGGGTC</b> TAGCCTATCTCAAATGCTCG				
YscR (aa182-217) out for	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCC</b> ATGATGGTTTCCCCATGACTATTTTC	25180	25285	105	For
YscS (aa71-88) in for	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCC</b> ATGCTTGGAATGAATTGCAC	25501	25555	54	For
YscU (aa209-354) in for	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCC</b> CAATATATTAAGGAACCTAAAATGAG	26964	27348	384	For
YadA (aa1-201) rev	<b>AGAAAGCTGGGTCCTA</b> AGTGCCAGCCGCAAGATG	49076	49679	603	Rev
YadA (aa232-422) for	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCC</b> ATGAATACTATACTGATAGTAA- AAGTG	49772	50344	573	Rev

**Tabelle 3: Primer für Mutanten oder einzelne Domänen von cytotoxischen Proteinen**

Name	Primer Sequenz 5'-3'	Zielvektor
YopP (C172A) for	GATATTCAGCGAAGCTCATCTGAAGCTGGTATTTTTAGTTTGGCACTG	Entry / Y2H Vektoren
YopP (C172A) rev	CAGTGCCAAACTAAAATACCAGCTTCAGATGAGCTTCGCTGAAT ATC	Entry / Y2H Vektoren
YopE (R144A) for	GTTCCGCCACGGGCAGCGGCCCTCTTCTGCTGGCAGTATCACTCAATGC- CAAGGGC	Entry / Y2H Vektoren
YopE (R144A) rev	GCCCTTGGCATTGAGTGATACTGCCAGCAA- GAGGGCCGCTGCCCGTGCGGAAC	Entry / Y2H Vektoren
YopT (C139E) for	CAGACACCGCTAGGGGGGCCGAGGAGGCTTTATGTGCACATTGG	Entry / Y2H Vektoren
YopT (C139E) rev	CCAATGTGCACATAAAGCCTCCTCGGCCCCCTAGCGGTGTCTG	Entry / Y2H Vektoren
YopT (aa1-129) for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGACAGTATTCACGGACACTACC	Entry / Y2H Vektoren
YopT (aa1-129) rev	AGAAAGCTGGGTCCTATTATTATTTGATGAAGAAAAGCCCCTTTG	Entry / Y2H Vektoren
YopT (aa130-323) for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAACATTCAGACACCGCTAGGG	Entry / Y2H Vektoren
YopO (aa1-405) rev	AGAAAGCTGGGTCCTACAAGAACTCGTGGAGTCTGGC	Entry / Y2H Vektoren
YopO (aa406-730) for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAGCGACGGAACCTATCG	Entry / Y2H Vektoren
YopO (aa521-730) for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGACGGAAGTATCCCCCTATC	Entry / Y2H Vektoren

Name	Primer Sequenz 5'-3'	Zielvektor
YopE (aa1-140) for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGAAAATATCATCATTTATTCTACATC	Entry / Y2H Vektoren
YopE (aa1-140) rev	AGAAAGCTGGGTCTAGCTGCCCGTGGCGAACTGATC	Entry / Y2H Vektoren
YopE (aa96-220) for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCCAAGTCTACGTCTTTC	Entry / Y2H Vektoren
<b>Primer für Konstrukte, die im Sekretionsassay verwendet wurden</b>		
YscY for	GCCATATGAATATTACTTTAACCAAACGACAAC	pWS Pasmid
YscY rev	GCGTCGACTCAGGCGTAGTCGGGTACGTCGTAGGGGTATGGGATT-CATTATGATCTTT	
Orf73 for	GCCATATGCTACTCGTCACCTATGAACTGGCC	pWS Pasmid
Orf73 rev	GCGTCGACTCAGGCGTAGTCGGGTACGTCGTAGGGGTACCACT-GAATCGCCACGGATAATC	
Orf155 for	GCCATATG ATTAACCTCAACCTTACTGAG	pWS Pasmid
Orf155 rev	GCGTCGACTCAGGCGTAGTCGGGTACGTCGTAGGGGTAATAACC-GATTGAGTAGATTG	
YscO for	GCCATATG ATACGCCGCTGCACCG GGT	pWS Pasmid
YscO rev	GCGTCGACTCAGGCGTAGTCGGGTACGTCGTAGGGG-TAGGCGTTCTGTGATGCTGTAG	
YscE for	GCCATATGACACAATTAGAGGAGCAACTGC	pWS Pasmid
YscE rev	GCGTCGACTCAGGCGTAGTCGGGTACGTCGTAGGGGTATTTTT-TAGGTCTCCTGTTAC	
YscM2 for	GCCATATGGGGAGCATTATGAAAATAAAC	pWS Pasmid
YscM2rev	GCGTCGACTCAGGCGTAGTCGGGTACGTCGTAGGGGTA-AAGCTTTTGCATTTTCCGTG	
LcrD for	GCCATATG AATCCCATGATCTTGA GTGG	pWS Pasmid
LcrD rev	GCGTCGACTCAGGCGTAGTCGGGTACGTCGTAGGGGTAAGCA-AACTCGTCCAAGTG	
<b>Primer für Mutanten, die in Immunfluoreszenzstudien oder im Dual-Luziferase-Assay verwendet wurden</b>		
PKN1 K641E for (KDM)	GCTCACCTCAGAAGAGCTCGCGGG	pCR3 Plasmid
PKN1 K641E rev (KDM)	CCGGTGTCTG GAAACAGCCG AAGAG	pCR3 Plasmid
YopO D268A for (KDM)	ACCCCTTGCTAGTTCAAATAACG	pCR3 Plasmid
YopO D268A rev (KDM)	GATACCATGT AGAAGGGTTG ACACTAC	pCR3 Plasmid
YopO RBD1 (Y591A,N595A) for	CCGTGTCCTCTGAAACCGCCAGCTTCTGGCTCGATTAGCTGAGGC-TA	pCR3 Plasmid
YopO RBD1 (Y591A,N595A) rev	TTACCTCAGCTAATCGAGCCAGGAAGCTGGCGGTTTCAGAGGA-CACGG	pCR3 Plasmid
YopO RBD2(E599A)for	CTGGCTCGATTAGCTGCGGCTAAGGTCACCTTG	pCR3 Plasmid
YopO RBD2(E599A) rev	CAAGGTGACCTTAGCCGAGCTAATCGAGCCAG	pCR3 Plasmid

Name	Primer Sequenz 5'-3'	Zielvektor
YopM (aa1-170) rev	<b>AGAAAGCTGGGTC</b> CTAATTCCTCCA GCTGATTATT	pCR3 Plasmid
YopM (aa171-526) for	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCCCTCCGC</b> ATTAGAGAGGTT	pCR3 Plasmid
YopM (aa171-494) rev	<b>AGAAAGCTGGGTC</b> CCTACTCAGGTATATCGGGAAACTCT	pCR3 Plasmid
<b>Primer für Kolonie- und nested PCR</b>		
pACT 136	CTACAGGGATGTTTAATACCACTACAATGG	Kolonie-PCR, Primer für pACT Vektor, 1 PCR
pACT 137	GGTTACATGGCCAAGATTGAAACTTAGAGG	Kolonie-PCR, Primer für pACT Vektor, 1 PCR
pACT 81	CATAAAAGAAGGCAAAACGATG	Kolonie-PCR, Primer für pACT Vektor, 2 PCR
pACT 80	TGTTTAATACCACTACAATGGATGATG	Kolonie-PCR, Primer für pACT Vektor, 2 PCR
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Rekombinationssequenz
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Rekombinationssequenz
<b>Primer für RT-PCR</b>		
IFN- $\beta$ for	CTGGCTCCATCATGAACAA	
IFN- $\beta$ rev	AGAGGGCTGTGGTGGAGAA	
IFN $\gamma$ for	ATCTGGAGGAAGCTGGCAAAA	
IFN $\gamma$ rev	TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGGTA	
IFN $\lambda$ for	TCAGCCCTGACCACCATC	
IFN $\lambda$ rev	CTGTGGCCTGAAGCTGTGTA	
HPRT(Maus)for	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	
HPRT(Maus) rev	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	

## 2.1.9 Plasmide

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pDonR207	<i>Entryvektor</i>	Invitrogen
pGADT7-Dest	<i>Destinations-Vektor</i> mit Gateway B-Kassette von Invitrogen in pGADT7 Basisvektor (Nr 101)	C. Zerezke u. C. Atzer, AG Prof. J. Haas, LMU, München
pGBKT7-Dest	<i>Destinations-Vektor</i> mit Gateway B-Kassette von Invitrogen in pGBKT7Basisvektor (Nr 102)	C. Zerezke u. C. Atzer, AG Prof. J. Haas, LMU, München
pACT2	Enthält AD für Hefe-2-Hybrid-System	Clontech
pGADT7	Enthält AD für Hefe-2-Hybrid-System	Clontech

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pGBKT7	Enthält BD für Hefe-2-Hybrid-System	Clontech
pcDNA3+Rluc+GW Cass	pcDNA3 Vektor, in welchen das NdeI-XbaI Fragment aus pRluc-C2 eingefügt und die Gateway Kasette in den Polylinker von pcDNA3-Rluc-C2 kloniert wurde	Dr. M. Koegl, DKFZ Heidelberg
pTREX-dest30-ntPrA	In pTREX Vektor Protein A z-domäne fusions protein, Gateway kompatibel	Dr. M. Koegl, DKFZ Heidelberg
pWS	Expressionsvektor, Derivat von pMS470Δ8, über die Schnittstellen NdeI und Hind III wurde ein Linker eingefügt, der durch Hybridisierung der Oligonukleotide pWS Linker-5'-p und pWS-Linker kompl-5'-p entstanden ist, <i>oriV</i> , LacI <sup>R</sup> -Repressor P <sub>lac</sub> , <i>rmb</i> -Terminator, Amp <sup>r</sup>	Locher et al ( 2005)
pCR3-C-Myc	C-terminales Myc-Tag, CMV-Promotor, <i>Gateway-compatible mammalian expression Vector</i>	Dr. A. Baiker, AG Prof. J. Haas, LMU, München
pCR3-N-Myc	N-terminales Myc-Tag, CMV-Promotor; <i>Gateway-compatible mammalian expression vector</i>	Dr. A. Baiker, AG Prof. J. Haas, LMU, München
pCR3-N-HA	N-terminales-HA-Tag, CMV Promotor, <i>Gateway-compatible mammalian expression Vector</i>	Dr. A. Baiker, AG Prof. J. Haas, LMU, München
pCR3-YFP	N-terminales-YFP, <i>Gateway-compatible mammalian expression vector</i>	Prof. J. Haas, AG Prof. J. Haas, LMU, München
pCR3	<i>Gateway-compatible mammalian expression vector</i>	Prof. J. Haas, AG Prof. J. Haas, LMU, München
p125-Luc (IFN-β-Luc)	Reporterplasmid, IFN-β Promotor Luziferase (bp-125 bis +17)	Prof. Takashi Fujita (Department of Tumor Cell Biology, the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science Tokyo, Japan)
pNF-kB-Luc	Reporterplasmid, NF-kB Promotor Luziferase	Stratagene
pHRLO	Renilla Plasmid	Invitrogen

Tabelle 5: Entry- und Y2H-Vektoren, die in dieser Arbeit hergestellt wurden

Bezeichnung	Beschreibung	Länge	Funktion
YlpA	Entry / Y2H Vektoren	749	Lipoprotein
YopQ	Entry / Y2H Vektoren	548	Unbekannt
YopT	Entry / Y2H Vektoren	968	Cystein Protease
SycT	Entry / Y2H Vektoren	392	Chaperon
YopM	Entry / Y2H Vektoren	1580	Effektorprotein
Orf 91b	Entry / Y2H Vektoren	230	Unbekannt
YopD	Entry / Y2H Vektoren	920	Translokationspore
YopB	Entry / Y2H Vektoren	1205	Translokationspore
SycD	Entry / Y2H Vektoren	506	Chaperon
LcrV	Entry / Y2H Vektoren	1001	Nadelspitze des Translokationsapparats
LcrG	Entry / Y2H Vektoren	287	Kontrolle von Yop-Translokation
LcrR	Entry / Y2H Vektoren	440	Regulator von TTSS

Bezeichnung	Beschreibung	Länge	Funktion
LcrD	Entry / Y2H Vektoren	2114	Innenmembranprotein
Ysc Y	Entry / Y2H Vektoren	344	Erforderlich für Yop-Sekretion
Ysc X	Entry / Y2H Vektoren	368	Erforderlich für Yop-Sekretion
SycN	Entry / Y2H Vektoren	371	Chaperone
Tye A	Entry / Y2H Vektoren	326	reguliert Abgabe von Effektorproteinen
Tye A1	Entry / Y2H Vektoren	278	
YopN	Entry / Y2H Vektoren	881	hält die bakterielle Oberfläche geschlossen
YscN	Entry / Y2H Vektoren	1319	ATPase
YscO	Entry / Y2H Vektoren	464	Typ III Sekretionsprotein
YscP	Entry / Y2H Vektoren	1361	Bestimmt die Länge der Sekretionsnadel
YscQ	Entry / Y2H Vektoren	923	Typ III Sekretionsprotein
YscR	Entry / Y2H Vektoren	653	Basalkörper vom Typ III Sekretionssystem
YscS	Entry / Y2H Vektoren	266	Basalkörper vom Typ III Sekretionssystem
YscT	Entry / Y2H Vektoren	785	Basalkörper vom Typ III Sekretionssystem
YscU	Entry / Y2H Vektoren	1064	Basalkörper vom Typ III Sekretionssystem
VirG	Entry / Y2H Vektoren	395	Erforderlich für die Lokalisation von YscC
VirF	Entry / Y2H Vektoren	815	Transkriptionsaktivator
YscA	Entry / Y2H Vektoren	98	Typ III Sekretionssystem
YscB	Entry / Y2H Vektoren	413	interagiert mit YopN
YscC	Entry / Y2H Vektoren	1823	Distales Teil von basalem Körper
YscD	Entry / Y2H Vektoren	1256	Basalkörper vom Typ III Sekretionssystem
YscE	Entry / Y2H Vektoren	203	Benötigt für Yop Sekretion
YscF	Entry / Y2H Vektoren	263	Nadel-Bildung
YscG	Entry / Y2H Vektoren	347	Typ III Sekretionssystem
YscH	Entry / Y2H Vektoren	497	Chaperon
YscI	Entry / Y2H Vektoren	347	Ähnlich der Typ III Sekretionsnadel MxiH
YscJ	Entry / Y2H Vektoren	734	verknüpft Protein-Sekretions-Kanäle in Innen- und Aussenmembran
YscK	Entry / Y2H Vektoren	629	Translokationsprotein
YscL	Entry / Y2H Vektoren	671	Regulator der ATPase
YscM1	Entry / Y2H Vektoren	347	Typ III Sekretionsapparat
YopH	Entry / Y2H Vektoren	1406	Protein Tyrosine Phosphatase
SycH	Entry / Y2H Vektoren	425	Chaperon
SycE	Entry / Y2H Vektoren	392	Chaperon
YopE	Entry / Y2H Vektoren	659	Effektorprotein
Orf134	Entry / Y2H Vektoren	404	Unbekannt
Orf186	Entry / Y2H Vektoren	560	Unbekannt
Orf76	Entry / Y2H Vektoren	296	Unbekannt
Orf92	Entry / Y2H Vektoren	275	Unbekannt

Bezeichnung	Beschreibung	Länge	Funktion
Orf75	Entry / Y2H Vektoren	302	Unbekannt
Orf80	Entry / Y2H Vektoren	242	Unbekannt
SpyB	Entry / Y2H Vektoren	1208	Teilungssystem
SpyA	Entry / Y2H Vektoren	1166	Plasmid Teilung
Orf73	Entry / Y2H Vektoren	215	Unbekannt
YomA	Entry / Y2H Vektoren	875	Unbekannt
YadA	Entry / Y2H Vektoren	1268	Adhäsion
Orf78	Entry / Y2H Vektoren	308	Unbekannt
Orf79	Entry / Y2H Vektoren	629	Unbekannt
Orf81	Entry / Y2H Vektoren	734	Unbekannt
Orf88	Entry / Y2H Vektoren	266	Unbekannt
Orf155	Entry / Y2H Vektoren	431	Unbekannt
YopO	Entry / Y2H Vektoren	2189	Protein Kinase
YopP	Entry / Y2H Vektoren	866	Effektorprotein
YscM2	Entry / Y2H Vektoren	350	Regulatorisches Protein
Orf155b	Entry / Y2H Vektoren	467	Unbekannt
Tnp2	Entry / Y2H Vektoren	575	Transposase
Tnp3	Entry / Y2H Vektoren	458	Transposase
RepA	Entry / Y2H Vektoren	1022	Unbekannt
RepC	Entry / Y2H Vektoren	245	Replikationsprotein
<b>Mutanten oder einzelne Domänen von Zytotoxischen Proteinen</b>			
YopER144A	Entry / Y2H Vektoren		Mutation in katalytischen Domäne (GAP)
YopO(aa1-405)	Entry / Y2H Vektoren		Aktin-Bindedomäne
YopO(aa405-730)	Entry / Y2H Vektoren		Kinasedomäne
YopO(aa524-730)	Entry / Y2H Vektoren		Rac und Aktin Binde-domäne
YopE(aa1-140)	Entry / Y2H Vektoren		Sekretion und Translokation durch eukaryontische Membran
YopE(aa 96-220)	Entry / Y2H Vektoren		GAP-Domäne
YopPC172A	Entry / Y2H Vektoren		Mutation in katalytischen Domäne
YopT (aa 1-129)	Entry / Y2H Vektoren		N-terminale Domäne
YopT (aa130-323)	Entry / Y2H Vektoren		Cystein Protease Domäne
YopT (aa139-323)	Entry / Y2H Vektoren		
<b>Einzelne Domänen von Transmembranproteinen</b>			
YlpA (aa33-216) out for	Entry / Y2H Vektoren		
YscT(aa100-131)	Entry / Y2H Vektoren		
YopB (aa189-401)	Entry / Y2H Vektoren		
YopB (aa1-165)	Entry / Y2H Vektoren		
LcrD (aa314-704)	Entry / Y2H Vektoren		
LcrD (aa132-200)	Entry / Y2H Vektoren		
YscD (aa1-129)	Entry / Y2H Vektoren		
YscD (aa153-424)	Entry / Y2H Vektoren		
YscJ (aa1-217)	Entry / Y2H Vektoren		

Bezeichnung	Beschreibung	Länge	Funktion
YscR (aa32-50)	Entry / Y2H Vektoren		
YscR (aa74-158)	Entry / Y2H Vektoren		
YscR (aa182-217)	Entry / Y2H Vektoren		
YscS (aa71-88)	Entry / Y2H Vektoren		
YadA (aa1-201)	Entry / Y2H Vektoren		

**Tabelle 6: Plasmide für Bindungsassays**

Bezeichnung	Beschreibung
ALAS1	pcDNA3-Rluc-GW
ARPC3	pcDNA3-Rluc-GW
CA1	pcDNA3-Rluc-GW
CDK9	pcDNA3-Rluc-GW
HGS	pcDNA3-Rluc-GW
KRI15	pcDNA3-Rluc-GW
IcrD	pcDNA3-Rluc-GW
CD14	pcDNA3-Rluc-GW
NEK6	pcDNA3-Rluc-GW
orf92	pcDNA3-Rluc-GW
PKN1	pcDNA3-Rluc-GW
POP7	pcDNA3-Rluc-GW
PTPN6	pcDNA3-Rluc-GW
RAC1	pcDNA3-Rluc-GW
RHOC	pcDNA3-Rluc-GW
S100A3	pcDNA3-Rluc-GW
S100A8	pcDNA3-Rluc-GW
S100A9	pcDNA3-Rluc-GW
SAP18	pcDNA3-Rluc-GW
SILV	pcDNA3-Rluc-GW
SSFA2	pcDNA3-Rluc-GW
TBK1	pcDNA3-Rluc-GW
TCEAL8	pcDNA3-Rluc-GW
TyeA	pcDNA3-Rluc-GW
YomA	pcDNA3-Rluc-GW
YopB	pcDNA3-Rluc-GW
YopM	pcDNA3-Rluc-GW
YopN	pcDNA3-Rluc-GW
YopO wt	pcDNA3-Rluc-GW
YopO (aa 524-730)	pcDNA3-Rluc-GW
YopO (aa 1- 405)	pcDNA3-Rluc-GW
YopP	pcDNA3-Rluc-GW
YscX	pcDNA3-Rluc-GW
ZNF238	pcDNA3-Rluc-GW
ZNF7	pcDNA3-Rluc-GW

Bezeichnung	Beschreibung
YopN	pcDNA3-Rluc-GW
Orf 155	pcDNA3-Rluc-GW
PML	pcDNA3-Rluc-GW
YscO	pcDNA3-Rluc-GW
Orf 73	pcDNA3-Rluc-GW
MAT2B	pcDNA3-Rluc-GW
CCD121	pcDNA3-Rluc-GW
YopO RBM ( <i>rac binding site mutant</i> )	pcDNA3-Rluc-GW
YopO KDM ( <i>kinase inactive mutant</i> )	pcDNA3-Rluc-GW
PKN1 KDM ( <i>kinase dead mutant</i> )	pcDNA3-Rluc-GW
PKN1 KDM ( <i>kinase dead mutant</i> )	pTREX-dest30-ntPrA
YopN	pTREX-dest30-ntPrA
Orf 155	pTREX-dest30-ntPrA
PML	pTREX-dest30-ntPrA
YscO	pTREX-dest30-ntPrA
MARCO	pTREX-dest30-ntPrA
MAT2B	pTREX-dest30-ntPrA
CCD121	pTREX-dest30-ntPrA
SPZ1	pTREX-dest30-ntPrA
YopO RBM	pTREX-dest30-ntPrA
YopO (aa 524-730)	pTREX-dest30-ntPrA
YopB (aa 1-169)	pTREX-dest30-ntPrA
YopB (aa 189-401)	pTREX-dest30-ntPrA
YopN	pTREX-dest30-ntPrA
YscX	pTREX-dest30-ntPrA
YomA	pTREX-dest30-ntPrA
YopT	pTREX-dest30-ntPrA
KLK10	pTREX-dest30-ntPrA
SNW1	pTREX-dest30-ntPrA
YopE	pTREX-dest30-ntPrA
YopP	pTREX-dest30-ntPrA
PTPN6	pTREX-dest30-ntPrA
YopM	pTREX-dest30-ntPrA
YscO	pTREX-dest30-ntPrA
Orf92	pTREX-dest30-ntPrA
TyeA	pTREX-dest30-ntPrA
YscY	pTREX-dest30-ntPrA
YopO wt	pTREX-dest30-ntPrA
S100A11	pTREX-dest30-ntPrA
S100A3	pTREX-dest30-ntPrA
S100A6	pTREX-dest30-ntPrA
S100A8	pTREX-dest30-ntPrA
S100A9	pTREX-dest30-ntPrA
SILV	pTREX-dest30-ntPrA

Bezeichnung	Beschreibung
ARPC3	pTREX-dest30-ntPrA
PKN1	pTREX-dest30-ntPrA
ZNF238	pTREX-dest30-ntPrA
TCEAL8	pTREX-dest30-ntPrA
CA1	pTREX-dest30-ntPrA
SAP18	pTREX-dest30-ntPrA
ALAS1	pTREX-dest30-ntPrA
CDK9	pTREX-dest30-ntPrA
DCTN1	pTREX-dest30-ntPrA
RAC1	pTREX-dest30-ntPrA
RPGRIP1	pTREX-dest30-ntPrA
TBK1	pTREX-dest30-ntPrA
ECH1	pTREX-dest30-ntPrA
NEK6	pTREX-dest30-ntPrA
HGS	pTREX-dest30-ntPrA
CD14	pTREX-dest30-ntPrA
pWS-yscY-HA	pWS151 mit yscY-HA-NdeI-Sall PCR-Fragment
pWS-yscO-HA	pWS151 mit yscO-HA-NdeI-Sall PCR-Fragment
pWS-yscE-HA	pWS151 mit yscE-HA-NdeI-Sall PCR-Fragment
pWS-orf 155-HA	pWS151 mit orf155-HA-NdeI-Sall PCR-Fragment
pWS-orf73-HA	pWS151 mit orf73-HA-NdeI-Sall PCR-Fragment
pWS-lcrD-HA	pWS151 mit lcrD-HA-NdeI-Sall PCR-Fragment a
pCR3-YopO KDM	in pCR3
pCR3-PKN1 KDM	in pCR3
pCR3-YopO	in pCR3
PCR3-YopO	in pCR3
PCR3-TBK1	in pCR3
PCR3-YopO(aa 1-405)	in pCR3
PCR3-YopO(aa 524-730)	in pCR3
PCR3-YopO(aa 405-730)	in pCR3
PKN1	in pCR3-YFP
PKN1 KDM	in pCR3-N-Myc
YopM (aa 171-494)	in pCR3-YFP
YopM (aa 171-526)	in pCR3-YFP
YopM(aa 1-170)	in pCR3-YFP
YopM (aa 1-494)	in pCR3-YFP

**Tabelle 7: Primärantikörper und Seren**

Antikörper	Herkunft	Anwendung	Verdünnung	Quelle
Anti c-Myc	Maus	IF	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-HA	Maus	IF	1:1000	Invitrogen
Anti-SycD	Kaninchen	Western blot	1:5000	AG Heesemann
Anti-YopE	Kaninchen	Western blot	1:5000	AG Heesemann
Anti-HA	Ratte	Western blot	1:2000	Invitrogen

**Tabelle 8: Sekundärantikörper**

Antikörper	Herkunft	Anwendung	Verdünnung	Quelle
Anti Maus-Alexa488	Ziege	IF	1:1000	Invitrogen
Anti Maus-Alexa594	Ziege	IF	1:1000	Molecular Probes, Inc., Eugene, USA
Anti Pox-Ab	Kaninchen	Western blot	1:10000	Dianova
Anti Pox-Ab	Ratte	Western blot	1:10000	Dianova

## 2.1.10 Organismen und Säugerzellen

### 2.1.10.1 *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	F- ompT hsdSb (rb- mb-) gal dcm (DE3)	Novagen
DB 3.1	F- gyrA462 endA1 $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 $\lambda$ - leu	Invitrogen
DH5 $\alpha$	F $\phi$ 80d lacZ M15 -(lacZYA-argF)U169 deoR recA1endA1 hsdR17 (r k-, m k+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ -	Invitrogen

DH10B	mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80d lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lac X74 endA1 recA1 deoR $\Delta$ (ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL	Invitrogen
-------	---	------------

### 2.1.10.2 Yersiniastämme

Stamm	Beschreibung	Herkunft
WA(pYV)	Serotyp O:8 , enthält pYV –Plasmid, Wildtyp-Stamm WA-314	Heesemann et al., 1984
WAC	Plasmidloses ( <i>cured</i> ) Derivat von WA-314	Heesemann et al., 1984
WA(pTTS, p60)	WA-C-Derivat (i)pLCR-Plasmid enthält 25 kb Fragment des pYV-Plasmids, kodiert TTSS (ii) Plasmid enthält YopE 138-p60 ( <i>Listeria monocytogenes</i> ) Fusionsgen	Rüssmann et al., 2001
WA(pYV, $\Delta$ YopT)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von YopT	Trulzsch et al., 2004
WA(pYV, $\Delta$ YopE)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von YopE	Trulzsch et al., 2004
WA(pYV, $\Delta$ YopM)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von YopM	Trulzsch et al., 2004
WA(pYV, $\Delta$ YopO)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von YopO	Trulzsch et al., 2004
WA(pYV, $\Delta$ YopP)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von YopP	Trulzsch et al., 2004
WA(pYV, $\Delta$ YopH)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von YopH	Trulzsch et al., 2004
WA(pTTS, pYopT)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält YopT-Gen	Trulzsch et al., 2003
WA(pTTS, pYopE)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält YopE-Gen	Trulzsch et al., 2003
WA(pTTS, pYopM)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält YopM –Gen	Trulzsch et al., 2003
WA(pTTS, pYopO)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält YopO-Gen	Trulzsch et al., 2003
WA(pTTS, pYopP)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält YopP-Gen	Trulzsch et al., 2003
WA(pTTS, pYopH)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält YopH-Gen	Trulzsch et al., 2003

### 2.1.10.3 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Reporter	Referenz
AH109	MAT $\alpha$ , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS 3, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2 URA3::MEL1 <sub>UAS</sub> -Mel1 <sub>TATA</sub> -LacZ MEL1	HIS3, ADE2, MEL1, LacZ	Holtz, unveröffentlichte Daten
Y187	MAT $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , met <sup>-</sup> ,	MEL1, lacZ	Harper et al., 1993

	URA3::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -LacT MEL1		
CG1945	MAT $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh <sup>r</sup> 2, LYS2:: GAL1UASGAL1TATA-HIS3,URA3::GAL4 <sub>17mers(X3)</sub> -CYC1 <sub>TATA</sub> -lacZ	MEL1, lacZ	Harper et al., 1993

### 2.1.10.4 Säugerzelllinien

Zelllinie	Herkunft	Morphologie	Referenz
HeLa	Humane Cervix-Karzinom-Zellen	Epithelial, Monolayer	ATCC_Nr. CCL-2
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	Semi-adhärenz	ATCC_Nr. CCL-81
J774	Murine Makrophagen-Zelllinie	Adhärenz	ATCC, Rockville, MD, USA (TIB-67) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K. Truelzsch, München
Mono Mac 6	Monozytenzelllinie Blut: Monozytenleukämie	Leicht adhärenz	Ziegler-Heitbrock et al., 1988

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Nährmedien und Kultivierung

#### 2.2.2 Kultivierung von Bakterien

*E. coli* Bakterien wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und, im Fall von Flüssigkulturen, unter konstantem Schütteln.

#### LB-Medium pH 7,2 (1L):

Bacto Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Bacto Trypton	10 g
H <sub>2</sub> O bidest	Ad 1 L

**LB-Agarplatten:** zusätzlich 20 g Agar pro Liter LB-Medium

**Selektionsmedium** (LB-Medium mit Antibiotikum, je nach Resistenz):

Antibiotikum	Stocklösung	Arbeitslösung
Chloramphenicol (Cm)	20 mg/ml in Ethanol	20 µg/ml

Spectinomycin (Sp)	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Gentamicin (Gm)	15 µg/ml in H <sub>2</sub> O	150 µg/ml

### 2.2.3 Kultivierung von Yersinien

Die Anzucht der Yersinien erfolgte über Nacht im Schüttelinkubator in sterilem Medium (LB oder BHI), welchem bei Bedarf die entsprechenden Selektionsmarker zugesetzt wurden. Das Temperaturoptimum der Yersinien liegt bei 27 °C. Bei der Durchführung von *in vitro* Infektionen mit *Y. enterocolitica* wurde die Über-Nacht-Kultur 1:10 in LB oder BHI Medium verdünnt und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert.

#### BHI Medium:

Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium	3,7 % Hirn-Herz-Infusions-Extrakt (Schwein)
-----------------------------------	---

Yersinien können für etwa 4 Wochen auf LB-Agar Platten mit entsprechenden Selektionsmarker im Kühlschrank gelagert werden.

### 2.2.4 Anlegen einer Stammsammlung

Die Bakterien-Stämme wurden über Nacht in LB-Medium angezogen, in 10% Glycerol resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

#### Einfriermedium für die Stammsammlung:

LB-Medium
10% Glycerol

### 2.2.5 Nährmedien zur Kultivierung von Hefe *S. cerevisiae*

#### 3,33xYPD-Medium (1L):pH 5,5:

Hefeextrakt	33 g
Pepton	66 g
Glukose	66 g
H <sub>2</sub> O bidest	Ad 1 L

#### Wasseragar:

Agar	6 gr
------	------

H <sub>2</sub> O bidest	Ad 350 ml
-------------------------	-----------

**20% Glucose:**

Glucose	200 g
H <sub>2</sub> O bidest	Ad 1 l

**10x Yeast Nitrogen Base:**

YNB	67 g
H <sub>2</sub> O bidest	Ad 1 l

**Supplement-Stammlösungen:**

Substanz	Menge von Substanz	
100x L-Adenin	200 mg	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ad 100ml
10x CSM-Leu-Trp	6,4 g	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ad 1L
10x CSM-L-Leucin	6,9 g	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ad 1L
10x CSM-L-Tryptophan	7,4 g	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ad 1L
10xCSM-His-Leu-Trp	6,2 g	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ad 1L

**YPDA:**

Steriles Wasser	350 ml
3, 3 YPD	150 ml
100x Adenine	5 ml
Pen/Strep	2,5 ml

Um die gewünschte *Dropout*-Lösung zu erhalten, wurden dem Medium die jeweils benötigten 10-fach konzentrierten *Supplement*-Stammlösungen zugesetzt.

**SD-Medium:**

Steriles Wasser	350 ml
20% Glycose	50 ml
10x YNB	50 ml
10x CSM Dropout	50 ml
Pen/Strep	2,5 ml

Zur Herstellung von Festmedien wurden 20 g Agar und die Bestandteile des Mediums in jeweils 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eingewogen und die Lösungen nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55

°C vereinigt und in Petrischalen verteilt. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte nach der Aushärtung bei 4 °C.

## 2.2.6 Zellkultur

### 2.2.6.1 Nährmedien, Kultivierung und Kryo-Konservierung von eukaryotischen Zellen

HEK 293 und HeLa 229 Zellen wurden in D-MEM Medium, Mono Mac 6 und J774.A1 Zellen im RPMI 1640 Medium kultiviert. Die Medien wurden jeweils mit 10% (FCS) fötalem Kälberserum, 100 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin angereichert. Alle Zellen wurden bei 37 °C in feuchter, 5%-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Für die Kryo-Konservierung wurden die Zellen 5 min bei 300 x g sedimentiert und anschließend bei einer Konzentration von 0,5-1x10<sup>7</sup> Zellen pro ml in 1 ml FCS mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryo-Röhrchen überführt, in einen „Cryo 1 °C Einfrierbehälter“ gegeben und bei -80 °C für 24 h abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Zellen aufzutauen, wurden sie kurz bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, einmal mit 10 ml Zellkulturmedium gewaschen und anschließend in Zellkulturmedium bei 37 °C in feuchter, 5%-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert.

## 2.2.7 Zellbiologische Methoden

### 2.2.7.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde ein Einzelklon in 20 ml TYM-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur 1:10 in frischem 500 ml TYM-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde auf Eis abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C oder auf Eis. Die Bakterien wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 2500 x g zentrifugiert (Sigma 6K15). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 25 ml eiskaltem TFB I resuspendiert. Nach 45 min auf Eis wurden die Bakterien für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 25 ml eiskaltem TFB II resuspendiert. Aliquots von 400 µl wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

#### TYM:

MgSO <sub>4</sub>	10 mM
NaCl	100 mM
Bacto Trypton	20 g/L
Bacto Hefeextrakt	5 g/L
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Ad 1 L

**TFB I:**

KaCl	30 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM
KCl	100 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Glycerol	15 % (v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Ad 1 L

**TFB II:**

MOPS pH 7, 0	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	75 mM
KCl	10 mM
Glycerol	15 % (v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Ad 1 L

**2.2.7.2 Transformation von chemisch kompetenten Zellen**

5 µl einer Ligations- bzw. Rekombinationsreaktion wurden zu 50 µl kompetenten Bakterien gegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt (1 min, 42°C) und in 1 ml SOC Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Agarplatten mit einem passenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**2.2.7.3 Elektrotransformation von *E. coli*-Zellen****2.2.7.3.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen**

20 ml LB-Medium wurden mit den entsprechenden *E. coli* Zellen angeimpft und bei 37 °C und 240 Upm über Nacht geschüttelt. Diese Vorkultur wurde dann mit LB-Medium auf 500 ml verdünnt und weiter inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht war. Dann wurden die Bakterien zunächst für 30 sec auf Eis abgekühlt und anschließend 10 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 ml eiskaltem sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert, zentrifugiert, in 20 ml einer eiskalten 10%-igen Glycerinlösung aufgenommen und auf 2 50ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4000 x g und 4 °C wurde das Zellpellet schließlich in 1,5 ml einer eiskalten 10%-igen Glycerinlösung aufgenommen und in 50 µl-Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße. Die elektrokompenten Bakterienzellen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.7.3.2 Transformation von elektrokompetenten Zellen

Es wurden je 50 µl der auf Eis aufgetauten transformationskompetenten Bakterien mit 1 µl der zur transformierenden DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette gefüllt. Die Elektroporation wurde unter den in Tabelle 9 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Nach Ertönen des akustischen Signals wurden die Bakterien sofort in 750 µl Medium aufgenommen, 1 h bei 37 °C und 600 Upm inkubiert und anschließend auf die entsprechende Selektivplatte gegeben. Das Wachstum der Transformanten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

**Tabelle 9: Bedingungen zur Elektrotransformation von *E. coli*:**

Bedingungen	
Elektrodenabstand der Küvette	2 mm
Spannung	2,5 kV
Kapazität	2,5 µF
Widerstand	200 Ω
Medium	SOC/LB
Ausplattierte Menge	500 µl nach BP-Reaktion Je 150 µl LR-Reaktion auf jeweils eine Amp oder eine Kann-Platte

#### SOC-Medium:

Hefeextrakt	5 g
Trypton	20 g
NaCl	0,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	Ad 1L
Sterile Glukoselösung (1M), Zugabe nach dem Autoklavieren	20 ml

### 2.2.7.4 Herstellung transformationskompetenter Yersinien

Die Bakterien wurden über Nacht in LB-Medium bei 27 °C angezogen, in YT-Medium 1:100 verdünnt und bei 27 °C bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension für 10-15 min auf Eis abgekühlt, 10 min bei 4000 x g und 4 °C zentrifugiert, anschließend dreimal mit 50 ml eiskaltem sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st und einmal in 10% Glycerin gewaschen. Am Ende wurden die Bakterien in 10% Glycerin resuspendiert und als 50 µl Aliquots sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.7.4.1 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 100 µl kompetenter Yersinien mit 2 µl DNA-Lösung gemischt und in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette unter den in Tabelle 9 angegebenen Bedingungen transformiert. Danach wurde die Suspension mit 1 ml LB-Medium verdünnt und bei 27 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach 1 h wurde die Suspension auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

#### 2.2.7.5 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

Die optische Dichte von Bakteriensuspensionen wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) gegen das entsprechende Leermedium gemessen. 1 ml einer Bakteriensuspension mit einer  $OD_{600}$  von 0,6 enthält ca  $1,6 \times 10^9$  Bakterien.

#### 2.2.7.6 Einstellung der MOI

Für *in vitro* Infektionsversuche wurden die Bakterien mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 50:1 oder 5:1 eingesetzt. Die Bakteriensuspension wurde nach der Inkubation 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert, und das Pellet wurde in 2 ml PBS resuspendiert. Die  $OD_{600}$  einer 1:10 Verdünnung wurde gemessen und die Bakteriensuspension mit PBS verdünnt, so dass die  $OD_{600}$  der 1:10 Verdünnung 0,6 beträgt. Für eine MOI 50:1 gibt man zu  $10^6$  HEK 293 oder J774 Zellen 30 µl dieser Bakteriensuspension. Für eine MOI 5:1 verdünnt man die Suspension noch einmal mit PBS und gibt ebenfalls 30 µl zu  $10^6$  HEK 293 oder J774 Zellen.

#### 2.2.7.7 Bestimmung der Zellzahl von Säugerzellen

Zum Einsatz definierter MOIs wurde die Zellzahl vorliegender Zellkulturen bestimmt. Dazu wurden durch Trypsinisierung und Resuspendierung in entsprechenden Nährmedien Zellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden dann in Trypanblau 1:1 verdünnt und in die Neubauer-Kammer gegeben. Zur Auswertung wird die Zählkammer unter ein Mikroskop mit 10-40 fach vergrößertem Objektiv gelegt. Die Zellzahl wurde unter Anwendung der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl im Zellkammer} \times (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4$$

#### 2.2.7.8 Transfektion von eukaryotischen Zellen

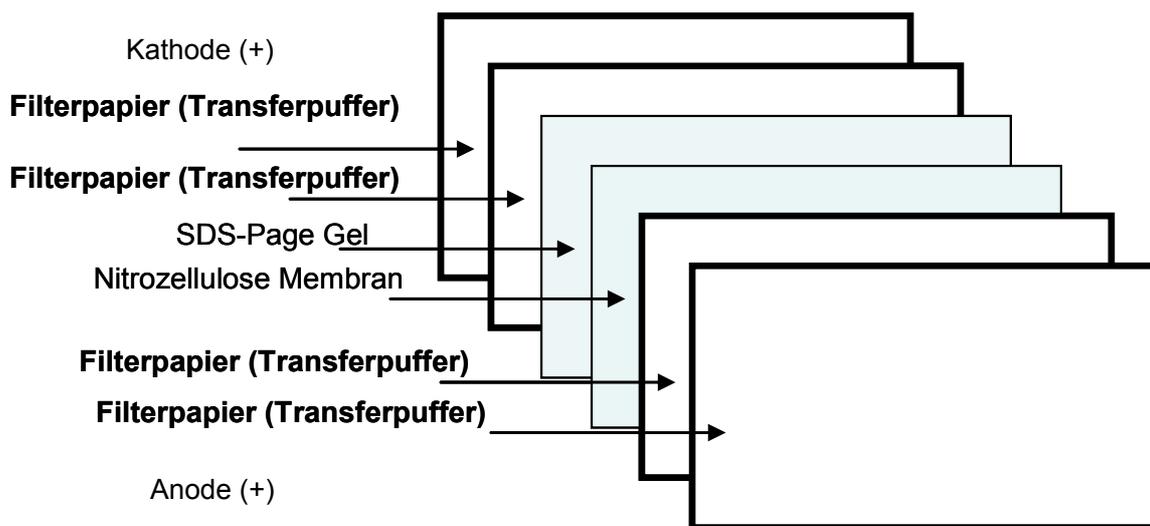
Für die Transfektion von eukaryotischen Zelllinien wurde FuGene HD Transfektionsreagenz (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.2.7.9 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse der zu untersuchenden Proteine wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C erhitzt. Die Gelelektrophorese wurde in 16%-igen Polyacrylamid-Trenngelen durchgeführt, welche mit einem 5%-igen Sammelgel überlagert waren. Die Auftrennung erfolgte in 1 x Laufpuffer bei 125 V für 90 min.

### 2.2.7.10 Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran: Western Blot Analyse

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurden Whatman-Filterpapier und die Membran in den entsprechenden Puffern befeuchtet und ein luftblasenfreies Sandwich (Abb.9) gebaut. Die Proteine wurden mit Hilfe des Protean II Systems (BioRad) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von Transferpuffer *Nass-Blot* bei 100V für 1 h auf die Nitrocellulose-Membran übertragen



**Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines *Nass-Blots* zum Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran**

Die Filter-Papiere und die Nitrozellulose- Membran wurden 5 min vor dem Zusammenbau des Sandwiches in Transferpuffer befeuchtet.

### 2.2.7.11 Detektion spezifischer Proteine mittels Immunoblotting

Um die unspezifische Bindung von Proteinen zu vermeiden, wurde die Nitrocellulose-Membran für 1 h mit Blockierlösung (PBS mit 5% Magermilchpulver) inkubiert. Anschließend wurde der Blot 3x mit PBS gewaschen, um überschüssige Blockierlösung zu entfernen. Die Proteindetektion wurde

mit einem indirekten System durchgeführt. Dabei reagierte der Primärantikörper spezifisch mit dem Zielprotein. Dafür wurde der Blot über Nacht mit der AK-Verdünnung der primären AKs bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag 3 x mit PBS gewaschen. An den Primärantikörper wurde ein peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper gebunden, indem der Blot mit der AK-Lösung des sekundären AKs für 1 h bei RT geschwenkt wurde. Reste der Antikörperlösung wurden durch dreimaliges Waschen für jeweils 10 min mit PBS entfernt. Nach Zugabe des Substrates für die Peroxidase (Western Blotting ECL Analysis Systems, GE Healthcare, nach Angaben des Herstellers) konnte das an die Membran gebundene Protein mittels Chemilumineszenz (ECL) detektiert und quantifiziert werden. Dabei wurde die chemische Reaktion eines zyklischen Diazylhydrazides (Luminol) mit Peroxidase und Wasserstoffperoxid ausgenutzt. Die sofortige Oxidation des Luminols durch die an das Protein gekoppelte Peroxidase bewirkte eine Lichtemission, die durch Exponieren eines Autoradiografiefilmes (Hyperfilm ECL-Filmen, Kodak) detektiert werden konnte. Die jeweiligen Antikörperverdünnungen wurden entsprechend den Herstellerangaben in PBS hergestellt.

**Trenngel 16%:**

Acrylamid/ Bisacrylamid (37, 5:1)	5,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
Wasser	2,01 ml
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl

**Sammelgel 5%:**

Acrylamid/ Bisacrylamid (37, 5:1)	1,35 ml
Tris (pH 6,8)	0,625 ml
10% SDS	25 µl
Wasser	1,53 ml
10% APS	12,5 µl
TEMED	2,5 µl

**SDS-Probenpuffer:**

0,5 M Tris 6, 8	62,5 g
Glycerol	10%
SDS	2%
Bromphenolblau	0,01%

**10xLaufpuffer:**

Glycin	288 g
Tris	60,6 g
SDS	20 g

**Transferpuffer:**

Tris Base	5,8 g
Glycin	2,9 g
SDS	0,37 g
Methanol	200 ml
Wasser	Ad 1L

**2.2.7.12 Modifizierter LUMIER Bindungsassay**

Die LUMIER-Experimente wurden nach dem Protokoll von Barrios-Rodiles<sup>136</sup> im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg in der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Koegl durchgeführt. Dabei wurde anstelle des Flag-Tags ein Protein A-Tag (zz-Domäne) verwendet. Die zu testenden Proteine wurden als Hybridproteine entweder an den Carboxyterminus des *Staphylococcus aureus* Protein A-Tag oder der *Renilla reniformis* Luziferase fusioniert, und in HEK 293 Zellen transient überexprimiert. Hierfür wurden jeweils 20 ng des jeweiligen Konstruktes in  $1 \times 10^4$  HEK 293 Zellen mittels 0,05  $\mu$ l Lipofektamine 2000 in 96 well-Platten transfiziert. Nach 40 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen auf Eis mit 10  $\mu$ l kaltem Lysepuffer [(20 mM Tris/HCl (pH=7,5), 250 mM NaCl, 1% TritonX-100, 10 mM EDTA, 10mM DTT) lysiert. Der Lysepuffer enthielt ausserdem Benzonase, Protease und Phosphatase Inhibitor Coctail (Stocklösung: 1 Tablette gelöst in 2 ml H<sub>2</sub>O; davon pro 10ml Puffer 100  $\mu$ l) sowie Schaf-anti-Kaninchen IgG-gekoppelte magnetische Kügelchen (2 mg/ml Endkonzentration). Nach Inkubation der Lysate für 15 min wurde 10% des verdünnten Lysats für die spätere Analyse der Luziferaseaktivität abgenommen und Anschließend pro well 100  $\mu$ l Waschpuffer (PBS, 1 mM DTT) zugegeben. Das übrige Lysat wurde mit Hilfe des Tecan Hydroflex *plate washers* sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität sowohl der entnommenen Lysate wie auch der gewaschenen Kügelchen gemessen. Als Negativkontrolle wurde jedes Luziferase-Hybridprotein auf Interaktion mit einem Protein A-Protein-A Hybridprotein getestet. Um die Daten auf die Transfektionseffizienz zu normalisieren, wurden die Luziferasewerte im logarithmischen Format dargestellt und das Signal der gewaschenen Kügelchen durch das Signal des 10%-igen Lysates geteilt. Um die Werte auf Hintergrund-Bindungen zu korrigieren, wurden von den normalisierten Werten jeder Probe die Werte der Negativkontrolle abgezogen. Die normalisierten und korrigierten Daten wurden an-

schließlich wie folgt z-transformiert: Mittelwert der Probe/Standard-Abweichung. LUMIER-Tests mit einem z-Faktor größer oder gleich 1,0 wurden als positiv gewertet.

## **2.2.8 DNA- und RNA-Techniken**

### **2.2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **2.2.8.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Plasmid-DNA wurde, je nach benötigter Menge, entweder mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Quiagen) oder mit dem *PureYield Plasmid Midiprep Kit* (Promega) isoliert. Beide Methoden basieren auf der alkalischen Lyse der Bakterien, gefolgt von Bindung, Reinigung und Elution der DNA an einer Silica-Matrix. Die Präparation erfolgte jeweils nach Anleitung des Herstellers.

#### **2.2.8.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen**

RNA aus kultivierten Zellen wurde mittels Trizol-Reagenz (Invitrogen) aufgereinigt. Die Methode basiert auf der *single step* nach Chomczynski and Sacchi<sup>137</sup>. Dabei wurde das Medium von den Zellen abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trizol pro  $1 \times 10^7$  Zellen lysiert (5 min RT), auf- und abpipettiert und in separate Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, die Proben 15 sec vorsichtig geschüttelt und für weitere 2-3 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden 10 min bei 12 000 x g und bei 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztes Volumen Trizol gefällt. Die RNA wurde anschließend 10 min inkubiert, durch Zentrifugation (15 min, 12 000 x g 4 °C) sedimentiert, mit 80% EtOH gewaschen, getrocknet und in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

#### **2.2.8.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde durch Messung der optischen Dichte in einem Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer (Peglab) bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die  $OD_{260}$  verwendet (1 $OD_{260}$  entspricht dabei 50 µg/ml ds DNA bzw. 40 µg/ml RNA). Die Reinheit wurde mit Hilfe des Verhältnisses  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt. Ein Wert von 1,6-2,0 war ein Hinweis auf nicht vorhandene bzw. schwache Kontamination mit Protein oder Phenol.

#### **2.2.8.3 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen**

Spaltungen von DNA mit Restriktionsenzymen wurden nach den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Falls nichts anders angegeben wurden 1,5 µg DNA bei der empfohlenen Temperatur mit 20

U Enzym für 2 h verdaut. Die Restriktionsspaltung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### 2.2.8.4 Ligation

Für die Ligation wurden 50 ng Vektor und die 3-fache molare Menge eines DNA-Fragmentes eingesetzt. Die Reaktion wurde in 1 x Reaktionspuffer (Fermentas) mit 5 U T4 DNA Ligase (Fermentas) durchgeführt. Nach Inkubation für mehrere Stunden wurde der Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert.

#### 2.2.8.5 5'-Dephosphorylierungsreaktion

Die 5'-Dephosphorylierungsreaktion von linearisierten Plasmiden wurde mit intestinaler Kälberphosphatase (CIP) durchgeführt. Dazu wurden 50 U CIP und 1,5 µg DNA gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Reinigung des Vektors erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Nucleotide Removal Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben.

#### 2.2.8.6 TA-Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, welche mittels Taq-Polymerase amplifiziert wurden, konnten durch TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T kloniert und mit Hilfe des Primers T7-for sequenziert werden. Dazu wurde das pGEM-T-easy-Vektorsystem (Promega) nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.2.8.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Fragmenten und Plasmiden erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese in 1 x TAE. Die Agarosekonzentration lag, je nach Anwendung, zwischen 0,8% und 1,5%. Den Gelen wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,25 µg/ml zugegeben. Den DNA-Proben wurde vor dem Lauf 0,17 Volumen DNA-Ladepuffer zugegeben. Die Ethidiumbromid-gefärbte DNA wurde anschließend mit UV Licht ( $\lambda=302$  nm) sichtbar gemacht.

##### 20x TAE pH 7,8 (mit Essigsäure):

Tris	242 g
Essigsäure 100%	57,1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
H <sub>2</sub> O bidest	Ad 1 L

### 2.2.8.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Qiagen *MinElute Gel extraction kit* nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.2.8.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 2.2.8.9.1 *Nested* Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für die Amplifikation von DNA zur Rekombinationsklonierung

Die PCR von einzelnen ORFs oder deren funktionellen Domänen wurde in 2 aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt. Die Sequenzen der in der ersten (internal) und der zweiten (external) PCR verwendeten Oligonukleotide überschneiden sich dabei um 12 bp. Durch diese Primer wurden die Rekombinationssequenzen (*attB-sites*) angefügt. Für diese PCR wurde die *Pfu* DNA Polymerase von Promega verwendet

**Tabelle 10:** Konstruktion der Primer für die *nested* PCR. Die fett markierten Basen repräsentieren die Sequenz der *att-sites*. Die sequenzspezifischen Nukleotide (20 Basen) für die Amplifikation spezifischer Gene sind durch X dargestellt.

attB1 internal for	<b>AAAAAGCAGGCTCCGCC</b> XXXXXXXXXX
attB2 internal rev	<b>AGAAAGCTGGGTC</b> XXXXXXXXXXXXXX
attB1 external for	GGGG <b>ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</b>
attB2 external rev	GGGG <b>ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</b>

Es wurden folgende PCR-Reaktionsansätze angesetzt:

#### 1. PCR-Reaktionsansatz:

10 x PCR Puffer (Promega)	5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
attB1 internal for 10 µM	1 µl
attB2 internal rev 10 µM	1 µl
<i>Pfu</i> Polymerase (Promega)	1 µl
Template DNA 200ng	8 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Ad 50 µl

#### 2. PCR-Reaktionsansatz:

10 x PCR Puffer (Promega)	5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
attB1 internal for 10µM	1 µl

attB2 internal rev 10µM	1 µl
<i>Pfu</i> Polymerase (Promega)	1 µl
Aus dem ersten PCR Ansatz	5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Ad 50 µl

Für die PCR wurden folgende Programme verwendet:

### 1. PCR

95 °C	2 min	
95 °C	30 sec	x15
52°C	30 sec	
72 °C	1 kb = 2 min	

### 2. PCR

95 °C	2 min	
95 °C	30 sec	x15
52°C	30 sec	
72 °C	1 kb = 2 min	

#### 2.2.8.10 Rekombinationsklonierung

DNA-Fragmente, die entsprechende Rekombinationssequenzen des Phagen  $\lambda$  (*att-sites*) enthielten, wurden mittels Rekombinationsklonierung mit Hilfe des *Gateway*-Systems (Invitrogen) kloniert. Diese erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde ein PCR-Produkt, welches *attB-sites* enthielt, mittels „BP-Reaktion“ in den *attP-sites* tragenden Vektor pDONR 207 rekombiniert. Dabei entstanden flankierende *att-sites*. Der entstandene Vektor wurde nach der Invitrogen-Nomenklatur pENTER genannt. Das Reaktionsprodukt wurde in *E. coli* Bakterien transformiert und das Plasmid anschließend mittels DNA Präparation isoliert. Die entstandenen pENTER (*Entry*) Klone wurden durch Sequenzierung mit dem Primer DONR-F überprüft. Im zweiten Schritt wurden die ORFs von *Y. enterocolitica* aus dem pENTER-Vektor mittels LR-Reaktion in einen *attR-site* tragenden Zielvektor (Destinations-Vektor, pDEST) rekombiniert und das Rekombinationsprodukt in *E. coli* Bakterien transformiert. Die Ansätze für beide Reaktionen wurden bei Raumtemperatur für 2,5 h inkubiert. Anschließend wurden die jeweiligen Klonasen mit 2 µl Proteinase K bei 37 °C für 10 min inaktiviert. Von den Reaktionsprodukten wurden jeweils 5 µl für die Transformation von kompetenten *E. coli* DH5α verwendet. Die Reaktionen setzen sich folgendermassen zusammen:

**BP-Reaktionsansatz:**

PCR-Produkt	200 ng
pDONR207	150 ng
BP-Clonase Mix	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Ad 5 µl

**LR-Reaktionsansatz:**

pENTER	150 ng
pDEST (Zielvektor)	150 ng
LR-Clonase Mix	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Ad 5 µl

**2.2.8.11 Zielgerichtete Mutagenese**

Um Punktmutationen oder den Austausch von wenigen Basenpaaren in DNA-Abschnitte einzufügen, wurde das *QuickChange Site directed mutagenesis Kit* (Stratagene) nach Herstellerangaben verwendet. Für den Entwurf der Primer wurde das *QuickChange Primer Design Programm* verwendet (<http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>). Für die Transformation nach der Mutagenese wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5α verwendet.

**2.2.8.12 Sequenzierung von DNA**

Um die klonierten Plasmide auf die Korrektheit ihrer Sequenz zu überprüfen, und zur Identifikation von Sequenzen, die mittels Y2H-Screen gegen cDNA Genbanken gefunden wurden, wurden durch folgende Einrichtungen Sequenzierungen durchgeführt:

AGOWA GmbH, Berlin

GATC GmbH, Konstanz

**2.2.8.13 Realtime PCR-Quantifizierung von RNA-Transkripten mittels TaqMan™-PCR**

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit Super-script II reverser Transkriptase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Es wurde jeweils 1 µg RNA und 250 ng Hexanukleotid Random-Primer-Mix (Promega) verwendet. Die cDNA wurde im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt. Die TaqMan-PCR wurde im ABI Prism 7000 *sequence detection system* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die TaqMan-Sonden wurden der *Universal Probe Library* (Roche) entnommen. Um die für die Detektion eines Genes jeweils optimale Kombination aus einem spezifischen Primerpaar und einer Sonde zu entwickeln, wurde die *Software Assay Design Center*

([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)) (Roche) verwendet. Die PCR wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:

94 °C	12 min	
95 °C	20 sec	X45
60°C	1 min	

Dabei wurde nach jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit der ABI Prism 7000 Software, welche einen Ct-Wert für jede Reaktion berechnet. Um die Unterschiede in den Transkriptmengen eines gegebenen Gens in unterschiedlichen Zelllinien oder unter unterschiedlichen Bedingungen zu berechnen, wurde pro Ct-Wert eine Verdoppelung der Transkriptmenge angenommen. Der Mengenfaktor (x) wurde also durch die Formel  $x=2^{-\Delta ct}$  angenähert. Für die RT-PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

cDNA	5 µl
TaqMan Universal Master Mix	12,5 µl
10 µM forward Primer	2 µl
10 µM reverse Primer	2 µl
TaqMan Sonde	0,25 µl
ROX Referenzfarbstoff ( Invitrogen)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2,75 µl

## 2.2.9 Mikroskopische Methoden

### 2.2.9.1 Immunfluoreszenz- und DAPI-Färbung in Säugerzellen

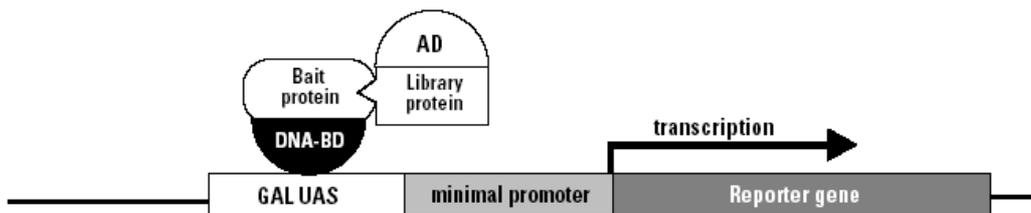
Die zu analysierenden Säugerzellen wurden in gewünschter Dichte auf Deckgläsern ausgesät und je nach Fragestellung behandelt (unbehandelt, DNA-Transfektion mit oder ohne Infektion mit Bakterien). Zur Fixierung wurden die Zellen 15 min lang bei RT in einer Lösung aus 2% Formaldehyd in PBS inkubiert. Das Entfernen der Fixierlösung erfolgte durch drei fünfminütige Waschschriffe mit PBS. Danach wurden die Zellen 5 min lang in eiskaltem PBS mit 0,5% TritonX-100 permeabilisiert und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die Markierung mit den Primärantikörpern (in PBS verdünnt) erfolgte anschließend über einen Zeitraum von 10 min. Nach Entfernung der Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS wurden die Zellen mit den in PBS verdünnten, Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Zur Darstellung der Zellkerne wurde ein Inkubationsschritt (5 min, bei RT) mit dem Fluorochrom DAPI durchgeführt, welches spezifisch DNA anfärbt. Die Deckgläser mit den Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen, dann einmal zur Entfernung von Salzen von den Deckgläsern vor-

sichtig in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  geschwenkt und schließlich mit der mit Zellen bewachsenen Seite nach unten in *Mounting Medium* (Dianova) auf Objektträger gebettet. Die Mikroskopie wurde am Fluoreszenzmikroskop LEICA DM 400B durchgeführt und die Ergebnisse mit Hilfe der zugehörigen Digitalkamera LEICA DF C360 FX und der Software LEICA AF 6000 dokumentiert.

## 2.2.10 Hefe-2-Hybrid-Methoden

### 2.2.10.1 Das Hefe-2-Hybrid-System

Das Hauptprojekt dieser Doktorarbeit war die Identifikation der PPI mittels des Y2H Systems. Aus diesem Grund wird das Y2H System in diesem Methodenteil näher beschrieben. Beim Y2H System handelt es sich um eine Technik der Molekularbiologie zur Aufklärung von PPI. Das Y2H System beruht auf der transkriptionsaktivierenden Wirkung des Gal4-Proteins aus *S. cerevisiae*, welches aus einer DNA-bindenden (BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) besteht. Diese beiden Domänen können nur dann eine Aktivierung der Transkription bewirken, wenn sie in räumliche Nähe zueinander kommen. Die für ein Yersinia-Protein kodierende DNA wurde in ein Gal4-BD kodierendes Fängerplasmid pGBKT7 kloniert, den sogenannten *Bait*-Vektor, so dass es anschließend als Gal4-BD Fusionsprotein exprimiert werden konnte. Für den intrabakteriellen Y2H-Screen wurden *Y. enterocolitica* Gene ausserdem in ein Prey-Plasmid pGADT7 kloniert und als Gal4-AD Fusionsprotein exprimiert. Im Falle des Pathogen-Wirt-Screens wurde als *Prey* eine Mischung von *Prey*-Plasmiden verwendet, die in pACT2 Vektor klonierte humane cDNAs enthielten: Das pACT2 Vektor kodiert für die Gal4-AD. Bei gemeinsamer Expression der beiden Fusionsproteine in Hefen, die ein pGAL4-Reporter-Gen-Konstrukt enthalten, werden die Gal4-AD und -BD im Falle einer Interaktion der zu testenden Proteine in räumliche Nähe zueinander gebracht, was zur Aktivierung des GAL4-Promotors und damit zur Expression des Reportergens führt. Als Reporter der Interaktion fungieren Gene, die entweder an der Biosynthese bestimmter Aminosäuren beteiligt sind (z.B. Histidin) oder eine optische Erkennung der Interaktion ermöglichen (z. B. ein nichtfluoreszierendes Substrat wird in ein fluoreszierendes Produkt umgewandelt). Im Y2H-Screen gegen cDNA Genbanken wurden Hefe-Stämme benutzt, denen das *HIS3* Gen fehlte und die deshalb keine Histidin-Synthase produzieren konnten. Als erstes Reporter-Gen wurde deshalb das *HIS3* Gen benutzt. Im Falle einer Interaktion zwischen *Prey* und *Bait* kam es zur Synthese der Histidin-Synthase in Hefezellen, was den Hefen das Wachstum auf Histidinmangelmedium ermöglichte. Als zweites Reporter-Gen fungierte *Mel 1*, welches für die  $\alpha$ -Galactosidase kodiert. Die ins Medium hinzugefügte fluorogene Substanz 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactosid wird durch die  $\alpha$ -Galactosidase in Galactase und 4-Methylumbelliferyl gespalten. Das dabei entstehende Fluoreszenz-Signal kann gemessen werden und erlaubt somit die quantitative Bestimmung der Interaktion.



**Abbildung 10: Prinzip des Y2H Systems.** Durch Interaktion von *Prey*- und *Bait*- Proteinen kommt es zur Näherung von DNA-Binde- und Aktivierungsdomäne, was die Reporter-genaktivierung zu Folge hat (Die Abbildung entnommen aus Clontech).

### 2.2.10.2 Herstellung von kompetenten Hefen

Für die Herstellung kompetenter Hefen wurde ein Einzelklon der Hefestämme AH109, Y187 oder GC1945 in 10 ml YEPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die über Nacht Kultur in 250 ml frisches YEPD-Medium überführt und bei 30 °C in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Die Hefesuspension wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 930 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in jeweils 12,5 ml SBEG-Lösung (Sorbitol-Bicine-Ethylenglycol-Lösung) resuspendiert, nochmals abzentrifugiert und anschließend in 1 ml SBEG-Lösung resuspendiert. Aliquots von 100 µl wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

#### YEPD Medium:

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Dextrose	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Ad 1 L

Autoklavieren

#### SBEG Solution:

Sorbitol	91,1 g
Bicine	1M pH 8,35
Ethylenglycol 3%	15 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Ad 500 ml

### 2.2.10.3 Transformation von Hefezellen

1 µg des Plasmids pGBKT7 oder pGADT7 wurde zu 100 µl kompetenten Hefen gegeben, gemischt, anschließend 750 µl von PEG/Bicine-Solution hinzugegeben und auf- und abpipettiert. Der Transformationsansatz wurde 1 h bei 30 °C inkubiert und anschließend einem Hitzeschock ausgesetzt (5 min, 45 °C). Der Ansatz wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in

1 ml NEB-Puffer aufgenommen. Zellen wurden nochmals abzentrifugiert, 800 µl Überstand verworfen und der Rest auf entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert. Transformierte Hefen wurden in 10% Glycerol bei -80 °C gelagert.

**PEG/Bicin-Lösung:**

Bicin: 1M Stock-Solution pH 8,35 mit NaOH, steril

PEG 1000	40%
Bicine	200 mM pH 8,35 steril

**NB-Puffer:**

(0,15M NaCl/10mM Bicine)

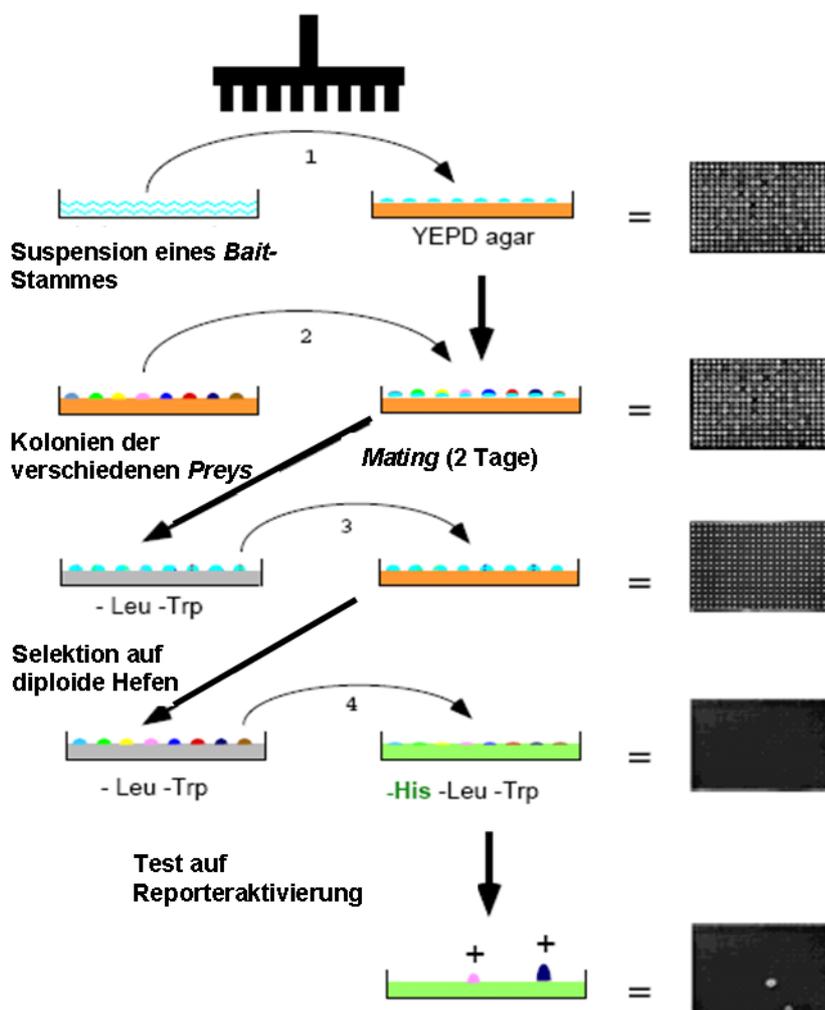
5M NaCl	3 ml
1M Bicine pH 8,35, steril	1 ml

Die Hefen wurden folgendermaßen ausplattiert:

SD-L	<i>Prey</i>
SD-W	<i>Bait</i>
SD-LW	Selektion von diploiden Klonen nach dem <i>Mating</i>
SD-LWH	Selektion von Interaktoren

**2.2.10.4 Die Durchführung des Y2H-Screens zwischen Yersinia-Proteinen**

Für den Screen auf intrabakterielle Proteininteraktionen wurden *Baits* in den Hefestamm Y187 und *Preys* in AH109 transformiert. Die Y2H Analysen wurden anschließend im Institut für Genetik am Forschungszentrum Karlsruhe von der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Uetz durchgeführt.



**Abbildung 11: Ablauf der groß angelegten Y2H Analyse:**

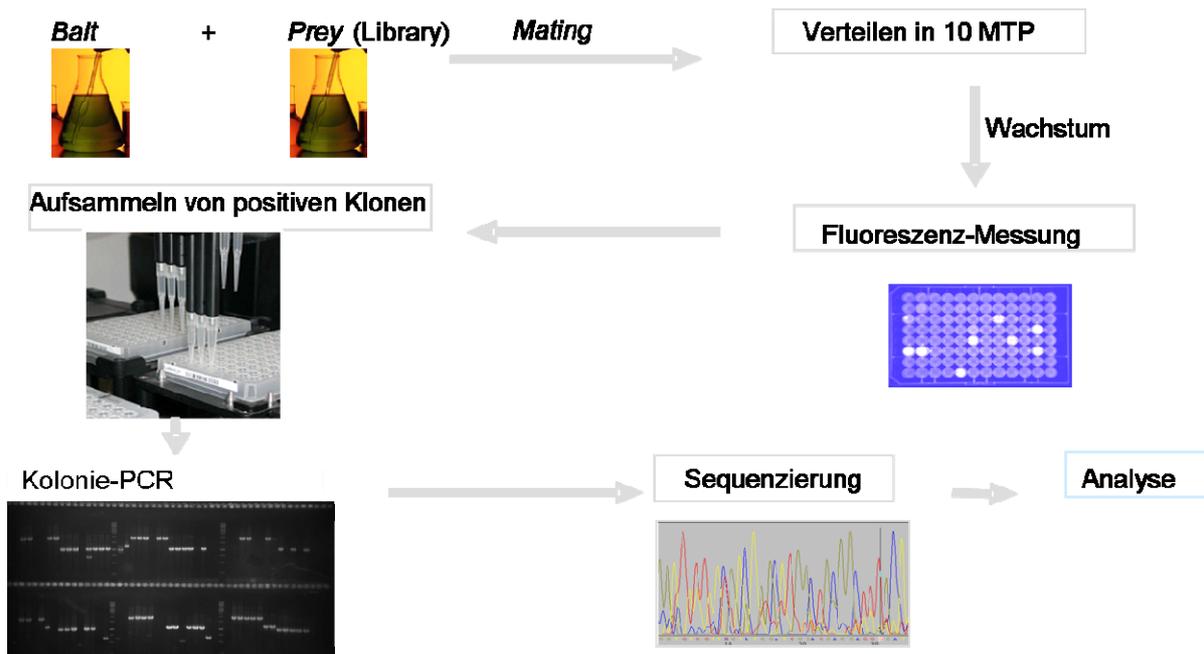
Mit einem Replika-Stempel wurde eine Suspension aus Hefen (Y187), die ein bestimmtes *Bait*-Plasmid (pGBKT7-ORF) enthalten, so auf eine YPD-Agarplatte aufgebracht, dass 96 x 4 Kolonien entstanden. Anschließend wurden je 4 Kolonien von maximal 97 verschiedenen *Prey* (AH109+pGADT7-ORF) tragenden Hefen auf die Platte mit den *Bait* gestempelt und inkubiert, um eine Verpaarung (*Mating*) der Hefen zu erreichen. Zwei Tage später wurden die Zellen auf SDC-Leu-Trp-Platten übertragen, auf denen nur noch die diploiden Hefen wachsen konnten, die sowohl ein *Bait*- als auch ein *Prey*-Plasmid enthielten. Die mehrstufige Selektion dauerte ca. 2 Tage. Die diploiden Hefen wurden dann ein bis drei Wochen lang auf SD-His-Leu-Trp-Selektivmedium kultiviert. Hier konnten nur Hefen wachsen, die das *His3*-Reporter-gen aktiviert hatten und somit selbst in der Lage waren, Histidin zu synthetisieren. Die Reporter-gen-Aktivierung zeigte die Interaktion des jeweils getesteten *Bait*- und *Prey* Fusionsproteins an.

## 2.2.10.5 Die Durchführung des Y2H-Screens gegen cDNA Genbanken

### 2.2.10.5.1 Allgemeine Übersicht

*Yersinia*-Wirtszell Interaktionen wurden mit Hilfe von Hochdurchsatz-Y2H-Screens untersucht. In unserem Fall wurden vier humane cDNA Genbanken benutzt, nämlich eine Testis cDNA Genbank (Clontech), eine Lymphknoten cDNA Genbank (Clontech), eine ORF Bank, die aus 5000 Volllänge cDNA-Klonen (DKFZ Heidelberg) besteht und eine MGC-Klonkollektion, bestehend aus 12.381

hauptsächlich Volllänge cDNA-Klonen. Die ORFs von *Y. enterocolitica*, die als *Bait* fungierten, wurden in den Hefestamm GC1945 transformiert und mit humaner cDNA Genbank enthaltendem Hefestamm Y187 (*Prey*) verpaart. Danach wurden die Zellen auf 10 Mikrotiterplatten (96 *wells*) verteilt und bei 30 °C inkubiert. Mit den entstandenen Kolonien wurden Kolonie-PCRs durchgeführt, die Fragmente wurden sequenziert, analysiert und die geeigneten ausgewählt und zur Sequenzierung gegeben. Durch die Sequenzierung wurde die Identität des *Prey*-Plasmids ermittelt (Abb.12).



**Abbildung 12: Die Durchführung von Y2H-Screens gegen cDNA Genbank.** Hefen mit *Prey*- und *Bait*-Plasmiden wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Tag im Flüssigmedium miteinander verpaart (*Mating*). Die Hefesuspension wurde auf 10 Mikrotiterplatten verteilt, kultiviert und anschließend, um die positiven Interaktionen zu identifizieren, die Fluoreszenz gemessen. Die positiven Interaktoren wurden gesammelt, *Preys* wurden mittels colony PCR amplifiziert und zur Identifikation sequenziert. Anschließend erfolgte die bioinformatische Analyse der gefundenen Protein-Protein Interaktionen.

#### 2.2.10.5.2 Mating von Hefen

Die *Bait*- bzw. *Prey*-Plasmide wurden zunächst in zwei verschiedene Hefestämme mit unterschiedlichem Paarungstyp (*mating type a* bzw.  $\alpha$ ) transformiert und entsprechend selektioniert. Dann wurden frische *Bait*- und cDNA Genbank tragende Zellen der beiden Hefestämme in 25 ml SD-Medium mit entsprechenden Selektionsmarkern angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 160 Upm geschüttelt. Die Hefekultur sollte am nächsten Tag eine OD<sub>600</sub> von 1,0 haben. OD<sub>12</sub> von *Bait*-Kultur wurde mit OD<sub>12</sub> der Hefen mit Plasmiden der cDNA Genbank in einem Falcon-Röhrchen vermischt, 2 min bei 3200 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50ml YPDA (20% PEG6000) resuspendiert und 3 h bei 30 °C und langsamem Schütteln inkubiert. Nach 3 h *Mating* wurden die Zellen 3 min bei 2000 Upm und Raumtemperatur ab-

zentrifugiert und mit 10 ml SD-LWH-Medium gewaschen. Danach wurde das Pellet in 10 ml SD-LWH aufgenommen, je 100 µl Hefesuspension in 10x 96 well-Platten verteilt und bei 30 °C inkubiert.

#### **2.2.10.5.3 Screeningtiefe**

Zur Bestimmung der Screeningtiefe macht man sich das Wachstum der Hefen auf Mangelmedien zu Nutze. Die Screeningtiefe ist die Anzahl der diploiden Zellen nach der Verpaarung. Bei zu geringer Screeningtiefe kann man davon ausgehen, dass einige Interaktionen ausfallen. Zum Messen der Screeningtiefe wurden nach dem *Mating* 10 µl der restlichen Hefesuspension in 990 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, gut gemischt und 100 µl davon auf SD-LW-Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C kultiviert. Die Anzahl von Kolonien auf der Platte x 200000 nach drei Tagen zeigt die Anzahl von diploiden Zellen nach der Verpaarung. Die erwartete Screeningtiefe ist 10-20 Millionen diploide Klone. Die optimale Konzentration von PEG 6000 kann von Stamm zu Stamm variieren und sollte nach Bedarf nochmals eingestellt werden.

#### **2.2.10.5.4 Vorscreen (*Prescreen*)**

Für die Bestimmung von für den Screen geeigneten 3-Aminotriazol (3-AT)-Konzentrationen wurden die *Bait*-Protein exprimierenden Hefen mit Aorta cDNA Genbank verpaart und die Hefen nach dem *Mating* in 7 Mikrotiterplatten bei unterschiedlichen 3-AT-Konzentrationen ausplattiert. Die 3-AT-Konzentration mit der optimalen Anzahl der Kolonien wurde für das Screeningverfahren weiterverwendet. Der Vorscreen wurde auch benutzt um festzustellen, ob ein bestimmtes *Bait*-Protein autoaktivierende Eigenschaften besitzt.

#### **2.2.10.5.5 Autoaktivierung**

Manche *Bait*-Proteine sind autoaktivierend, das heißt dass sie auch ohne *Prey* das Reporter gen aktivieren können. Dieses Phänomen kann an der durchgehend hohen Fluoreszenz bei unterschiedlichen 3-AT-Konzentrationen erkannt werden. Autoaktivierende *Bait*-Proteine wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Anschließend wurden die ORFs von *Y. enterocolitica* gegen die cDNA Genbank gescreent. Das Screeningverfahren wurde unter den im Prescreen bestimmten 3-AT Konzentrationen durchgeführt.

#### **2.2.10.5.6 Biomek FX**

Nach der Fluoreszenzmessung wurden Hefen die als positiv erachtete Interaktionen gezeigt hatten, mit Hilfe eines Pipettierroboters Biomek FX der Firma Beckman Coulter in neues Medium überführt. Nach der Kolonie-PCR wurden die geeigneten Fragmente entnommen und in eine neue

Mikrotiterplatte umgesetzt. Dieser Vorgang wird als *Rearranging* (Anreicherung) bezeichnet und wurde auch mit Hilfe des Pipettierroboters Biomek FX durchgeführt. Die Platten wurden in ein Cytomat Hotel (Tecan) platziert und von dort in eine Arbeitsstation des Pipettierroboters überführt. Die Identifikation von Platten erfolgte mittels eines *Barcode Readers* (ISC Barcode, TCCTTP245) und die Hits wurden mittels eines Pipettierarms von der Ausgangsplatte in die Zielplatte überführt.

### 2.2.10.5.7 Kolonie-PCR

Die positiven Klone wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters in 96 *well*-Mikrotiterplatten gesammelt. Dort wuchsen sie zunächst zwei Tage in SD-LWH bei 30 °C heran und wurden dann auf 15 cm Agarplatten mit SD-LWH überstempelt. Diese Agarplatten wurden weitere zwei Tage bei 30 °C inkubiert, die entstandenen Kolonien wurden dann für die Kolonie-PCR verwendet.

Die Kolonie-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- in 96 *well* PCR Platten 20 µl einer 0,25% SDS Lösung vorlegen
- die Hefekolonien mit einer 12-Kanal-Pipette picken und in SDS resuspendieren
- 5 min in 95 °C erhitzen
- 1 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- 5 µl von Überstand als Template benutzen
- Primer, dNTPs, Puffer, Wasser und Taq-Polymerase in einem Mastermix vorbereiten

	<b>1xAnsatz</b>	<b>100x</b>
Primer 3' pACT 136	0,3 µl	30 µl
Primer 3' pACT 137	0,3 µl	30 µl
dNTP-Mix	0,5 µl	50 µl
Reaktions Puffer	5 µl	500 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	40,7 µl	4070 µl
Bioline Red-Taq Polymerase	1 µl	100 µl
MgCl <sub>2</sub>	2 µl	200 µl
Total 50 µl		5000 µl

- vortexen, 250 µl aus 100x PCR Ansatz entfernen und 250µl 20% Triton hinzufügen
- in jedes *well* wurden 50 µl von Mastermix gegeben.
- die Platten wurden mit geeigneter hitzestabiler Folie abgeklebt.

Die 1 PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

<b>Einstellung I</b>		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	

55 °C	90 sec	26 x
72 °C	3:30 min	
<b>Einstellung II</b>		
72 °C	7 min	
4 °C	10 min	

-1 µl der Lösung in eine weitere PCR-Platte überführen

-Primer, dNTPs, Puffer, Wasser und Taq-Polymerase als Mastermix vorbereiten

	<b>1xAnsatz</b>	<b>100x</b>
Primer 3' pACT 80	0,3 µl	30 µl
Primer 3' pACT 80	0,3 µl	30 µl
dNTP-Mix	0,5 µl	50 µl
Reaktions-Puffer	5 µl	500 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	40,7 µl	4070 µl
Bioline Red –Taq Polymerase	1 µl	100 µl
MgCl <sub>2</sub>	2 µl	200 µl
Total 50µl		5000 µl

-die Platten mit geeigneter hitzestabiler Folie abkleben

Die 2 PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

<b>Einstellung I</b>		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	20 x
55 °C	90 sec	
72 °C	3:30 min	
<b>Einstellung II</b>		
72 °C	7 min	
4 °C	10 min	

### 2.2.10.5.8 Fragmentanalyse

Nach der PCR wurden je 10 µl des PCR-Ansatzes auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen. Dabei wurden jedem PCR-Produkt 2 µl Ladebuffer zugegeben. Die Auftragung erfolgte nach einem bestimmten Schema, das grundsätzlich eingehalten werden musste, um anschließend eine Fragmentanalyse machen zu können. Die Fragmentanalyse erfolgte mit dem Programm *Fragment*

*Analysis V1.2.* Die Banden konnten manuell markiert und ausgewählt werden. Über eine Verknüpfung zu einer Exceldatei wurden die Daten letztendlich an ein weiteres Makro überführt.

### 2.2.10.5.9 Sequenzierung

Nach der Fragmentanalyse wurden die geeigneten Fragmente mit dem Biomek FX aufgesammelt und an eine Sequenzierfirma (GATC, Konstanz) weitergegeben. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit vorhandenen Datenbanken abgeglichen, bewertet, und die Art und die Qualität der Interaktionspartner festgestellt.

### 2.2.10.5.10 Falsch-positive Interaktionen

Falsch-positive Interaktionen wirken meist als störender Hintergrund bei der Fluoreszenzmessung und können durch die Verwendung von 3-AT unterdrückt werden. Dieses wirkt als kompetitiver Inhibitor des *HIS3*-Genproduktes und verhindert das Wachstum bei geringer *HIS3*-Expression.

## 2.2.11 Dual-Luziferase Assay

HEK 293 Zellen wurden in 24 *well*-Zellkulturschalen in RPMI Medium mit 20% FCS ausgesät, über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und am nächsten Tag mit 500 ng DNA-Mischung (siehe Tab.10) nach Angaben der Hersteller transfiziert: Die Zellen wurden für 23 h inkubiert, anschließend mit *Passive Lysepuffer* (Promega) 15 min bei Raumtemperatur lysiert und auf Luziferaseaktivität getestet (Fluostar Optima, BMG Labtech).

**Tabelle 10: Transfektionsansatz:**

PHRLO (Renilla Plasmid/Invitrogen)	10 ng
pLuc125 oder pLucNF-kB	123 ng
pCR3 -TBK1	123 ng
pCR3-YopO (oder unterschiedliche YopO Konstrukte)	123 ng
PCR3-HA (Leervektor)	123 ng

### 2.2.11.1 Dual-Luziferase Assay mit *Yersinia*-Mutanten

HEK 293 Zellen wurden in 24-*well*-Zellkulturschalen in RPMI Medium mit 20% FCS nach Angaben des Fugene HD Protokolls ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturinkubator über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 500 ng Plasmidmischung (siehe Tab. 11) nach Angaben des Fugene Protokoll transfiziert und erneut für 18 h im Zellkulturinkubator inkubiert.

**Tabelle 11: Transfektionsansatz:**

PHRLO	10 ng
pLuc125 oder pLucNF-kB	123 ng
PCR3 -TBK1	123 ng
PCR3-HA	246 ng

Übernachtskulturen von *Yersinia*-Stämmen wurden 1:10 verdünnt, 2 h bei 37 °C geschüttelt, in PBS gelöst und mit einer MOI von 5 zu den HEK 293 Zellen hinzugefügt. Die infizierten Zellen wurden 10 min bei 3000 rpm und 37 °C abzentrifugiert, 1 h bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden *Yersinien* mit 150 µg/ml Gentamycin abgetötet. Nach weiteren 7 h Inkubation wurden die Zellen 15 min mit *Passive Lysisbuffer* (Promega) lysiert und anschließend die Luziferaseaktivität nach Angaben von Promega Dual Luziferase Kit gemessen. (Tecan Optima). Die Transfektions- und Infektionsversuche wurden in Triplikaten durchgeführt, die Mittelwerte und die Standardabweichungen wurden ermittelt.

### 2.2.12 Isolierung von sezernierten Proteinen (*released proteins*)

**Anzucht:** Die Vorkultur wurde über Nacht unter Schütteln bei 27 °C in BHI-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Vorkultur 1:40 in BHI-Medium verdünnt und 2 h bei 37 °C geschüttelt

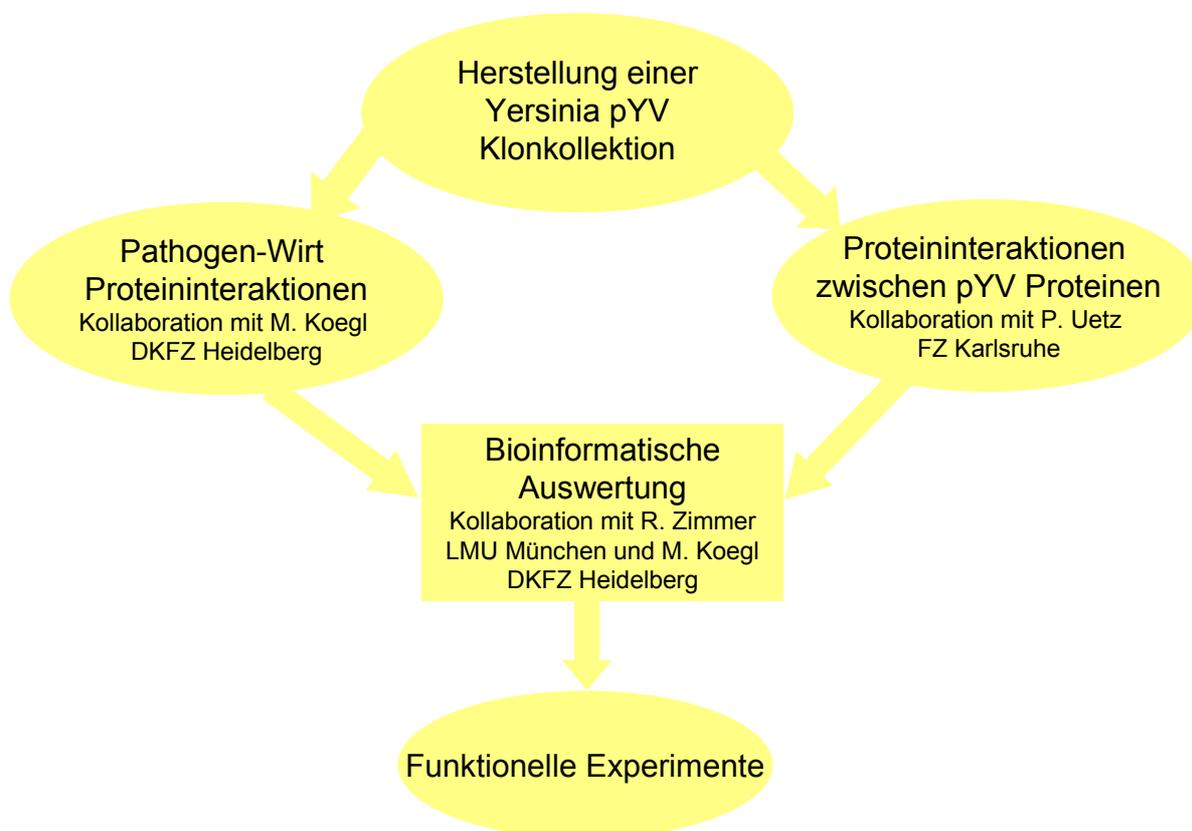
**Stimulation:** Nach 2 h wurden zur Hauptkultur jeweils 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Stammlösung: 1 M in H<sub>2</sub>O), 5 mM EGTA (Stammlösung: 500 mM in H<sub>2</sub>O, pH 8,0) und 0,2 % Glucose (Stammlösung: 20 % in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert) hinzugefügt und 3 h bei 37 °C weitergeschüttelt. Anschließend wurden die Bakterienkulturen 15 min bei 7500 Upm zentrifugiert. Die sezernierten Proteine befinden sich im Überstand, deshalb wurde mit Überstand weitergearbeitet. Um den Überstand zellfrei zu bekommen, sollten die Überstände sterilfiltriert werden. Die Pellets wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 99 °C gekocht.

**Proteinfällung:** Zum Überstand wurde 10 % Trichloressigsäure (Stammlösung: 100 %) hinzugegeben. Die Proben wurden über Nacht auf Eis inkubiert und am nächsten Tag 20 min bei 14000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 1 ml eiskaltem Aceton (-20 °C) aufgenommen, 20 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet 2 x mit eiskaltem Aceton (je 1 ml) und anschließend mit 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und das Pellet in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden dann 5 min bei 99 °C gekocht, abgekühlt und 15 µl davon auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### 3 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Funktion bisher nicht charakterisierter *Yersinia* pYV Proteine wurde zunächst eine Klonkollektion hergestellt, die aus *Entry*- und Y2H-Vektoren mit je einem *Y. enterocolitica* Gen oder einem Genfragment zusammengesetzt ist. Diese Klonkollektion wurde einerseits zur Identifikation von Wirtsproteinen, die bei der Infektion mit *Y. enterocolitica* eine Rolle spielen verwendet und andererseits zur Identifikation von PPI zwischen pYV Proteinen.

Die identifizierten PPI wurden anschließend bioinformatisch analysiert. Mit den im Y2H-Screen gewonnenen *Yersinia*-Wirts-Interaktionen wurde eine funktionelle Analyse durchgeführt. Anschließend erfolgte die Validierung einiger Interaktionspaare mittels LUMIER Bindungsassays. Die biologische und funktionelle Relevanz einiger identifizierter PPI wurde mittels funktionellen Assays weiter untersucht.



**Abbildung 13: Analyse der PPI von *Y. enterocolitica*.** Flussdiagramm zum Ablauf der durchgeführten Arbeiten.

### 3.1 Herstellung einer *Y. enterocolitica* Entryvektor Klonkollektion

Zur funktionellen Analyse der pYV Proteine von *Y. enterocolitica* wurde zunächst eine Klonkollektion hergestellt, die aus Vektoren mit je einem *Y. enterocolitica*-Gen oder einem Genfragment zusammengesetzt ist (Tab. 5). Dafür wurden die ORFs aus dem Virulenzplasmid von *Y. enterocolitica* pYVa127/90 mittels *nested* PCR amplifiziert und dabei *att sites* angefügt. Für Transmembranproteine wurden Proteinfragmente ohne Transmembrandomäne erstellt. Der Grund dafür war, dass Proteine mit hydrophoben Bereichen an Transmembrandomänen nicht in den Nukleus transloziert werden können und zu unspezifischen hydrophoben Wechselwirkungen führen können. Insgesamt wurden 74 ORFs und 23 Genfragmente, die im Virulenz-Plasmid von *Y. enterocolitica* kodiert sind, amplifiziert und kloniert. Die kodierende Sequenz für ORF77 und RepB konnte nicht in den *Entryvektor* kloniert werden. Ausgehend von der *Entryvektor* Klonkollektion wurden alle pYV Gene in Y2H *Bait* und *Prey*-Vektoren kloniert (Tab.5).

**Tabelle 12: Übersicht über die in den *Entryvektor* klonierten und Sequenzverifizierten *Y. enterocolitica* pYV ORFs**

Größe des Virulenz-Plasmids von <i>Y. enterocolitica</i> (O:9) pYVa127/90	70 kb
Anzahl der ORFs	74
In pDONR207 klonierte ORFs voller Länge	72
In pDONR207 klonierte ORF-Fragmente von Transmembran - und Effektorproteinen	23
In pDONR207 klonierte Proteine mit Mutation in der katalytischen Domäne	2
Summe	97

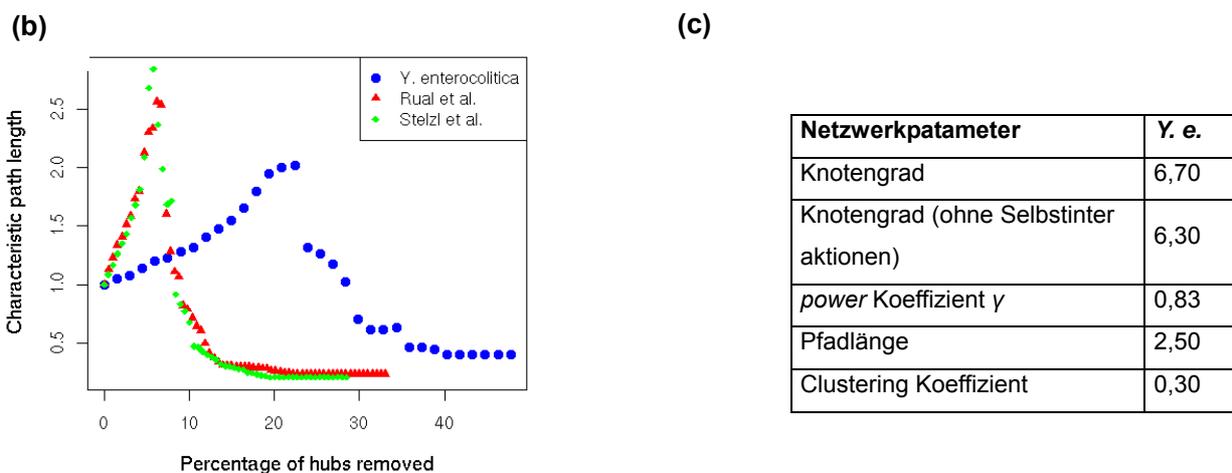
### 3.2 Identifikation von intrabakteriellen PPI

Zur Identifikation von Proteininteraktionen zwischen pYV Proteinen wurden in Tab. 5 aufgeführten *Bait*-Plasmide (pGBKT7) in den haploiden Hefestamm Y187 (*Mating type a*) und *Prey*-Plasmide in den Hefestamm AH109 (*Mating type α*) transformiert. Im Vorfeld des Screens wurde die Zahl der *Bait*-Interaktionen bestimmt, um dadurch autoaktivierende *Bait*-Proteine zu identifizieren. Die Zahl der *Bait*-Interaktionen zeigt, wie oft das jeweilige *Bait* Fusionsprotein insgesamt eine positive Interaktion eingeht. Um autoaktivierende *Bait*-Proteine zu identifizieren, wurden alle Hefen mit *Bait*-Plasmiden mit einem Hefestamm gepaart, der das leere *Prey*-Plasmid pGADT7 enthielt. Die diploiden Hefen wurden dann auf Reporterselektionsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen des

kompetitiven Histidin-Synthase-Inhibitors 3-AT kultiviert. *Baits* mit einer leichten Hintergrundaktivierung, die durch maximal 10mM 3-AT unterdrückt werden konnten, wurden anschließend unter entsprechenden Selektionsbedingungen im Y2H System untersucht. Im Falle von YscD (aa1-129) konnte die Selbstaktivierung erst bei einer 3-AT Konzentration von 25 mM unterdrückt werden. Dieses *Bait* wurde trotzdem für die weitere Y2H-Analyse verwendet. Im Falle des YopD Chaperons SycD konnte die Selbstaktivierung erst durch 75 mM 3-AT unterdrückt werden, weshalb dieses Protein vom weiteren Y2H-Screen ausgeschlossen wurde. Autoaktivierende *Prey*-Proteine wurden erst im Anschluss an den Screen identifiziert. Die Zahl der Preyinteraktionen wird als Maß für die Autoaktivierung durch bestimmte *Preys* verwendet und gibt an, wie oft das jeweilige *Prey*-Fusionsprotein insgesamt eine positive Interaktion gezeigt hat. Wenn ein *Prey*-Protein eine wesentlich höhere Zahl an Interaktionen hat als die Mehrheit der übrigen *Preys*, handelt es sich um eine unspezifische Aktivierung. In unseren Analysen war die höchste Zahl an Interaktionen mit dem *Bait* 13, und die höchste Zahl an Interaktionen mit dem *Prey* 25. Für den Screen wurden die verschiedenen *Bait*- und *Prey*-Plasmid tragenden Hefen gepaart und zum Test auf Interaktion der rekombinant-exprimierten *Y. enterocolitica* Fusionsproteine vierfach auf Reporterplatten aufgetragen. Das Wachstum der Hefen auf diesen Platten weist auf eine bestehende Interaktion zwischen den getesteten Proteinen hin. Eine Interaktion wurde dann als positiv bewertet, wenn mindestens 3 der jeweils vier ausplattierten Hefekolonien ein deutliches Wachstum zeigten. Die Ergebnisse des intrapathogenen Y2H-Screens sind in Anhang Tab.1 dargestellt. Von insgesamt 72 im Y2H System untersuchten *Y. enterocolitica* Proteinen waren 65 Proteine eine Wechselwirkung eingegangen. Es wurden 225 unterschiedliche Interaktionen zwischen 65 *Y. enterocolitica* Proteinen bzw. verschiedenen Fragmenten detektiert. Außerdem wurden 13 Selbstinteraktionen, nämlich von YscU, YscI, YscJ, YopD, YscR, YscX, SycH und Orf73 identifiziert. Eine Literaturrecherche nach bereits veröffentlichten PPI (<http://www.iimexconsortium.org>, NCBI Pubmed) ergab, dass von den publizierten 80 Interaktionen zwischen TTSS Proteinen 26 Interaktionen in unserem Y2H-Screen wiedergefunden wurden (Abb.14). 53 der in der Literatur beschriebenen Interaktionen konnten durch diese Methode allerdings nicht wiedergefunden werden. Besonders hervorzuheben ist, dass insgesamt 54 neue PPI zwischen TTSS Proteinen identifiziert werden konnten. Mit dem von uns durchgeführten Y2H-Screen konnte somit eine solide Grundlage als Ausgangspunkt für weitere Analysen und Erkenntnisse geschaffen werden. Es sind aber weitere Untersuchungen notwendig, um die einzelnen Interaktionen zu bestätigen und deren biologische Bedeutung aufzuklären.







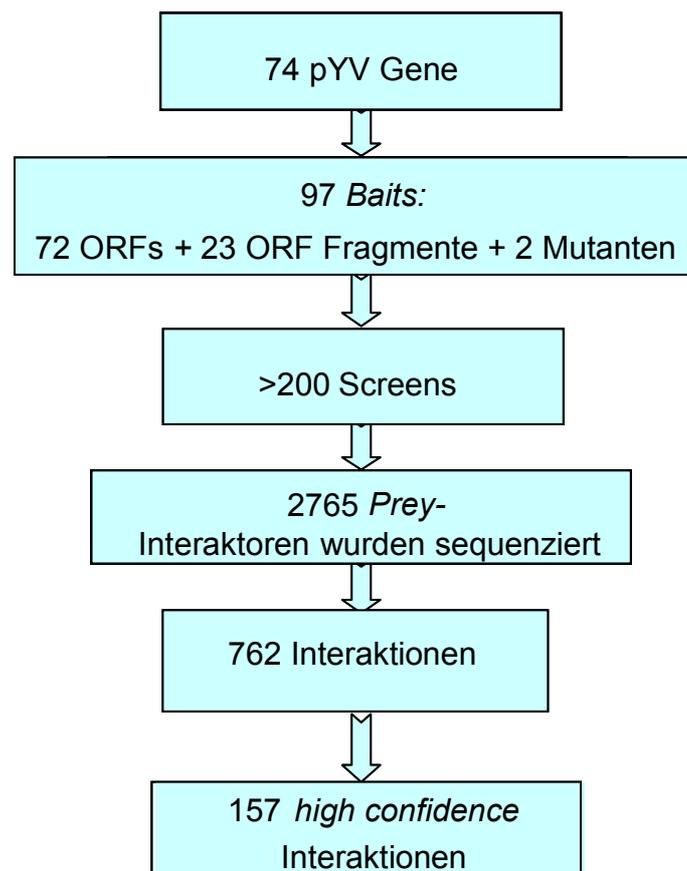
**Abbildung 15: Bioinformatische Analyse der PPI von *Y. enterocolitica*** (a) Die einzelnen Yersinia pYV Proteine werden durch Knoten und die Interaktionen zwischen den Proteinen im Netzwerk durch Verbindungslinien symbolisiert. Zur Darstellung des Interaktoms wurde die Software Cytoscape ([www.cytoscape.org](http://www.cytoscape.org)) verwendet<sup>138</sup> (b) Zur Bestimmung der Anfälligkeit des Netzwerks (*attack tolerance*) wurden nacheinander zufällig Knoten aus dem Yersinia-Interaktom entfernt und dabei die resultierende Pfadlänge nach der Eliminierung jedes Knotens neu berechnet. Die Daten wurden dann mit zwei humanen Netzwerken verglichen<sup>133, 134</sup>. Dem prozentualen Anteil von entfernten Hubs wird auf der y-Achse die entsprechende Pfadlänge zugeordnet. (c) Die Tabelle zeigt die wichtigsten Netzwerkparameter von *Y. enterocolitica* (*Y. e.*). Aufgeführt sind der Knotengrad, der *power* Koeffizient, die charakteristische Pfadlänge und der Clustering Koeffizient des Netzwerks.

Für die Charakterisierung des Netzwerks von *Y. enterocolitica* wurde der Knotengrad, der *power* Koeffizient, der die Steigung der *power law* Verteilung bestimmt, sowie die charakteristische Pfadlänge bestimmt. Zur Beurteilung der Gruppenbildung von Proteinen im Netzwerk wurde der Clustering Koeffizient des Netzwerks bestimmt. Um die Anfälligkeit des *Y. enterocolitica* Netzwerkes (*attack tolerance*) zu bestimmen, wurde ein gezielter Angriff auf das Yersinia-Interaktom simuliert, indem nacheinander die jeweils am stärksten vernetzten Knoten entfernt wurden. Dabei wurde die resultierende Pfadlänge (Durchschnittsabstand im Netzwerk) nach der Eliminierung jedes Knotens neu berechnet. Die Daten wurden dann mit zwei humanen Netzwerken verglichen<sup>133, 134</sup>. Diese Simulation zeigt, dass das *Y. enterocolitica* Interaktom eine gegenüber humanen Netzwerken erhöhte Robustheit und Angriffstoleranz besitzt, d. h. es ist weniger anfällig sowohl für zufällige Ausfälle einzelner Proteine (*hubs*), als auch für gezieltes Ausschalten bestimmter Proteine. Dies erkennt man daran, dass die Pfadlänge nach der gezielten Eliminierung stark vernetzter Knoten im *Y. enterocolitica* Interaktom weitaus weniger stark zunimmt, als im untersuchten humanen Netzwerk<sup>133, 134</sup>.

### 3.4 Identifikation und Charakterisierung von PPI zwischen *Yersinia* pYV und Wirtsproteinen

Zur Identifikation von Wirtsproteinen, die bei der Infektion mit *Y. enterocolitica* eine Rolle spielen, wurde ein Y2H-Screen durchgeführt. Um festzustellen, ob ein bestimmtes *Bait*-Protein autoaktivierende Eigenschaften besitzt und um die für den Screen geeignete 3-AT Konzentration zu bestimm-

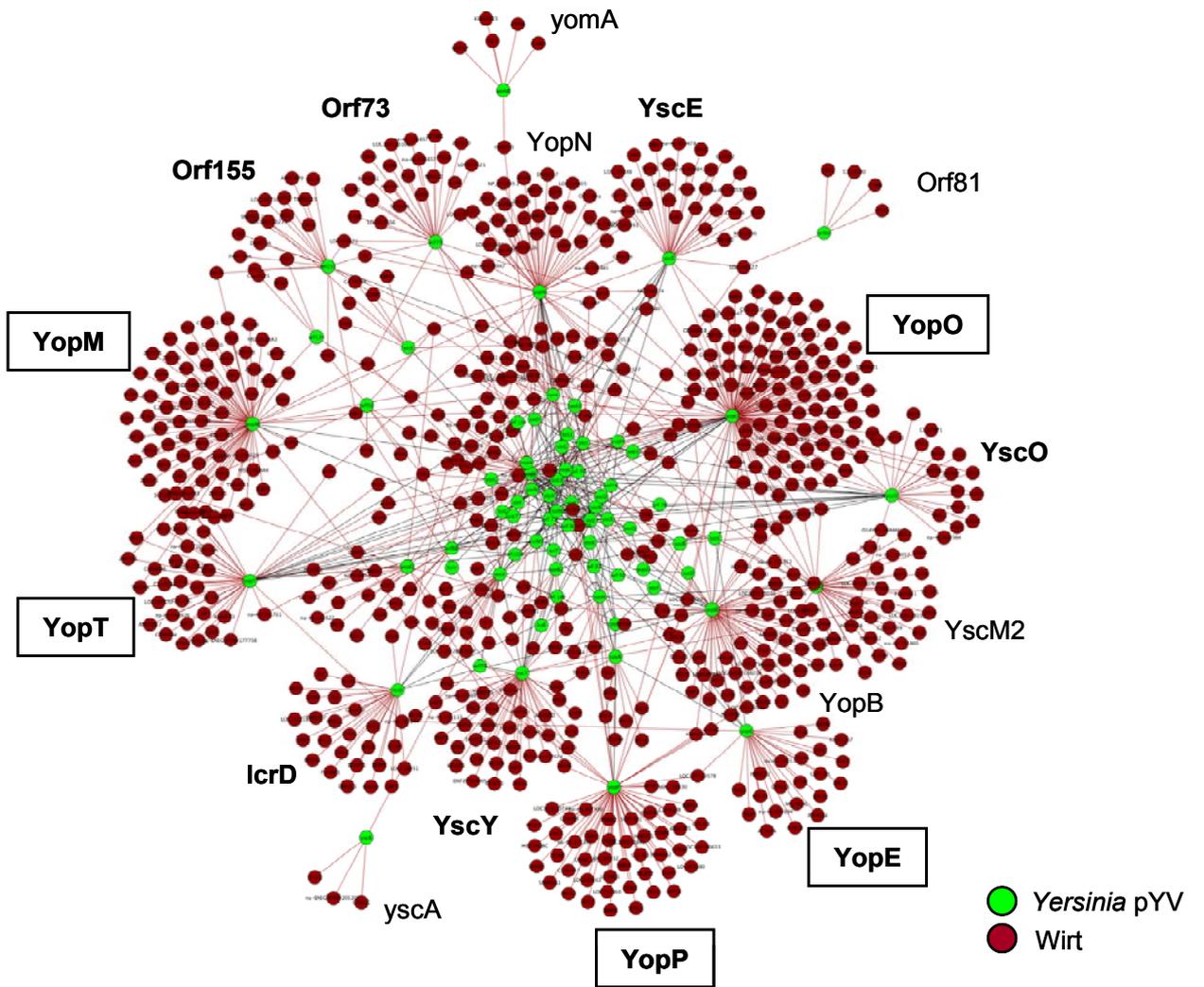
men, wurden zunächst Prescreens mit *Yersinia Baits* durchgeführt. Autoaktivierende *Baits*, wie etwa YscN, wurden im Prescreen-Verfahren erkannt und aus dem Screen ausgeschlossen. Für den eigentlichen Screen nach Pathogen-Wirt Interaktionen der 74 pYV-kodierten *Y. enterocolitica* Proteine, die als *Baits* vorlagen, wurden vier humane cDNA Genbanken verwendet: Dazu zählen eine Lymphknoten cDNA Genbank, eine Hoden cDNA Genbank sowie 2 Genbanken aus 5000 humanen und 12.381 cDNA Klonen. Mit Hilfe eines automatisierten Y2H Systems wurden mehr als 200 Screens durchgeführt und anschließend 2765 Preyinteraktionen sequenziert und analysiert (Abb.16). Um die potentiell relevanten Interaktionspaare zu selektieren, wurden aus den Interaktionsdaten zunächst alle Fragmente, die im 3' UTR anfangen, entfernt. Dasselbe galt für alle Interaktionen, die im 5' UTR Stopcodons enthielten. Promiskuitive *Preys*, die an mehr als 5 unterschiedliche *Baits* binden, wurden entfernt. Interaktionen, die mehr als einmal vorkamen, wurden als *high confidence* definiert. Die nur einmal gefundenen Interaktionen wurden als *low confidence* definiert. Im Screeningansatz wurden insgesamt 762 Interaktionen mit 40 unterschiedlichen pYV-kodierten Proteinen detektiert. 157 Interaktionen wurden als *high confidence* definiert. Die restlichen 605, nur einmal detektierten Interaktionen stellen das *low confidence* Set der Interaktionen dar.

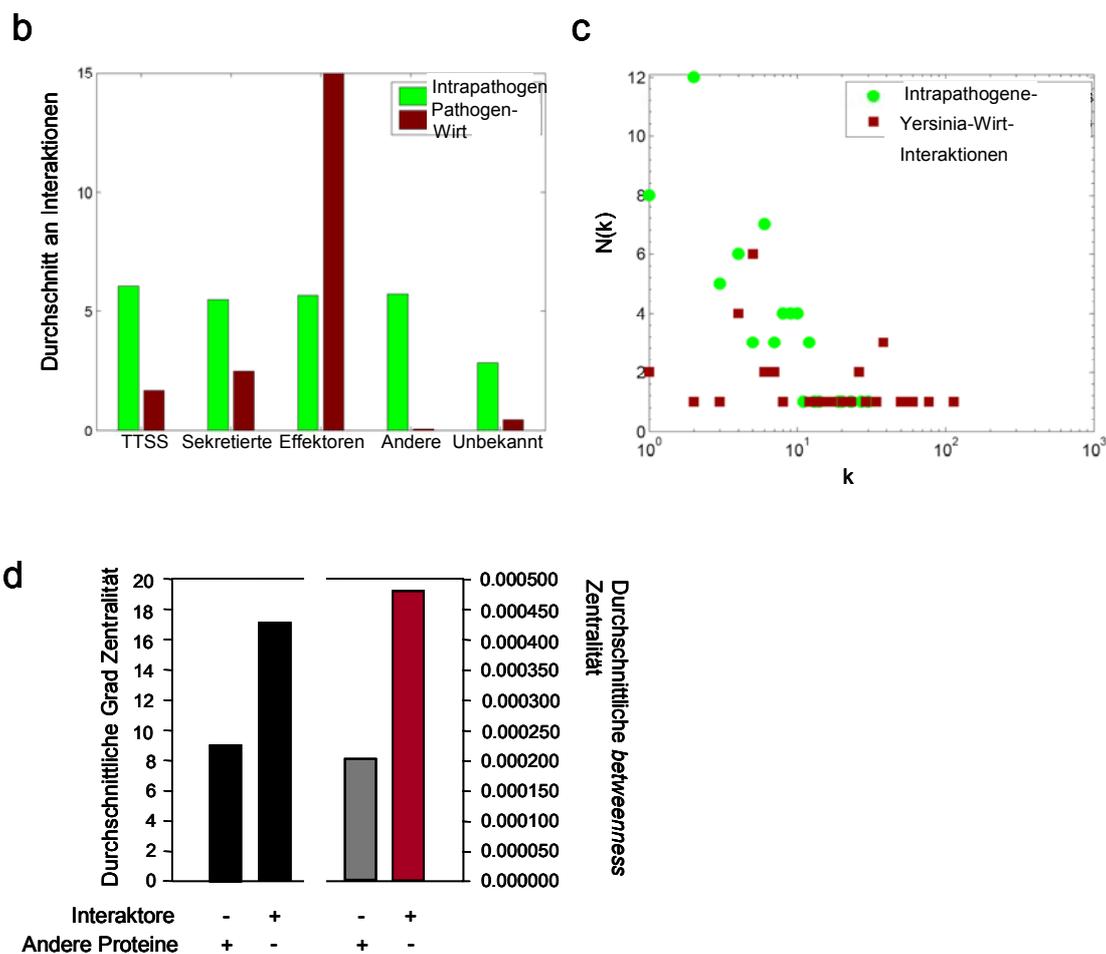


**Abbildung 16: Identifikation von PPI zwischen *Yersinia* pYV Proteinen und Wirtsproteinen mittels automatisiertem Y2H-Screen.** Das pYV-Plasmid von *Y. enterocolitica* kodiert für 74 ORFs. Mittels *Gateway* Klonierung wurden insgesamt 97 *Bait*-Plasmide hergestellt. Es wurden mehr als 200 Screens durchgeführt und anschließend 2.765 *Prey*-Interaktoren sequenziert und analysiert. Im Selektionsverfahren wurden insgesamt 762 unterschiedliche Interaktionen identifiziert. 157 Interaktionen wurden als hochkonfident definiert.

Die detektierten Pathogen-Wirt Interaktionen sind im Anhang in Tabelle 2 dargestellt. Yersinia Proteine, die hauptsächlich am Aufbau des TTSS beteiligt sind, beispielsweise YscP, YscQ, YscT, VirG, YscB, YscF, YscJ und YscK, haben keine Interaktionen mit Wirtsproteinen gezeigt, wogegen sezernierte Proteine eine Anreicherung an Wirtszell-Interaktionen zeigen. Um den Deckungsgrad des durchgeführten Y2H-Screens zu bestimmen, wurde eine *Text-Mining-Analyse* für Yersinia-Wirtszell-Interaktionen durchgeführt. Dazu wurden 6429 *Abstracts* von Publikationen auf das Auftreten von humanen *targets* von Yersinia Proteinen gescreent. Dies erfolgte mit Hilfe des *Text Mining* Programms Syngrep. Sowohl die im *high confidence* als auch die im kompletten Datenset identifizierte Proteine werden statistisch signifikant im PubMed Abstracts im Kontext von *Y. enterocolitica* genannt (*high confidence* Set 12/158=7,6%, kompletter Datenset 36/597=6%). Die gefundenen Pathogen-Wirt Interaktionen wurden mit Yersinia-Proteininteraktionen zu einem Netzwerk verknüpft, welches dann charakterisiert wurde (Abb.17). Das Yersinia-Wirt Interaktionsnetzwerk hat zwei entscheidende Eigenschaften: (i) Proteine des TTSS interagieren hauptsächlich miteinander, (ii) während sekretierte Yersinia Proteine eine Anreicherung für Interaktionen mit Wirtsproteinen zeigen (Abb.16b). Für Pathogen-Wirt und intrapathogene Interaktionen konnte keine Gradverteilung ermittelt werden. Der Grund dafür war der Mangel an Proteinen in den Protein-Protein-Interaktionsdaten<sup>135</sup>. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass pathogen-kodierte Proteine hauptsächlich mit Proteinen interagieren, die im Wirtszellinteraktom zentral angeordnet sind<sup>139</sup>. Die Ergebnisse des Yersinia-Screens zeigen, dass Grad und *betweenness* Zentralität für zelluläre Targets von *Y. enterocolitica* bedeutend ansteigen. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass *Y. enterocolitica* eng vernetzte und zentrale Proteine im zellulären Netzwerk angreift.

a

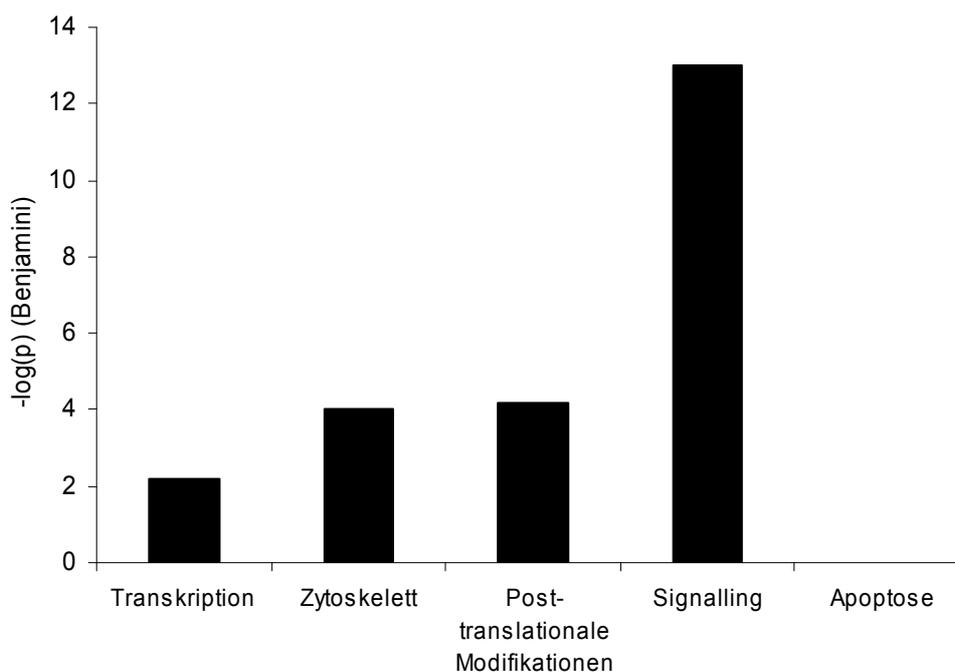




**Abbildung 17: Charakterisierung von PPI zwischen Yersinia pYV-kodierten und Wirtsproteinen** (a) Interaktionsnetzwerk zwischen Yersinia pYV und Wirtsproteinen. Die bakteriellen Proteine sind im vorliegenden Netzwerk grün und deren direkte Interaktionspartner rot dargestellt. (b) Proteine des TTSS, sezernierte Proteine, Effektorproteine, Proteine mit diversen Funktionen sowie Proteine mit unbekannter Funktion, die an intrapathogenen oder Pathogen-Wirt Interaktionen teilnehmen. (c) Gradverteilung der Knoten: Der Anzahl an Interaktionen, die ein Protein eingeht ( $k$ ), wird auf der y-Achse der entsprechende Anteil an Proteinen zugeordnet ( $N(k)$ ). (d) Grad und *betweenness* Zentralität von zellulären Interaktoren im Vergleich zu anderen Proteinen.

Mit den im Y2H-Screen gewonnenen Yersinia-Wirts-Interaktionen wurde eine *Gene Ontology* (GO) Term-Analyse unter Benutzung des *functional annotation tool* von David (Database for Annotation, Visualisation and Integration Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) durchgeführt. Ziel war es, mittels Anwendung der GO Term-Analyse, die gewonnenen Interaktoren bestimmten funktionellen Klassen zuzuordnen. Für die Analyse wurden als erstes die *high confidence* Y2H-Interaktionen verwendet. Um den auszuwertenden Datensatz zu vergrößern, wurden außer *high confidence* Interaktoren auch Wirtszellproteine verwendet, die mit einem *Bait* eine indirekte Interaktion eingingen, mit anderen Worten, Wirtszellproteine, die mit 2 *Preys* eines Yersinia-Baits interagieren und dieses damit funktionell verknüpfen. Diese PPI-Daten wurden dem BioGRID <http://www.thebiogrid.org/downloads.php> entnommen. Die GO Term-Analyse zeigte, dass die Pathogen-Wirt-Interaktionsdaten mit Proteinen angereichert sind, die an der Regulation der Transkrip-

tion, Signaltransduktion durch kleine GTPasen und Kinasen sowie der Organisation des Aktinzytoskeletts und posttranslationalen Modifikationen funktionell beteiligt sind (Abb.18). Eine Anreicherung an Interaktionen mit Wirtsproteinen, die mit den oben erwähnten Prozessen assoziiert sind, zeigten insbesondere die Yersinia Proteine YopO, YopM, YopP, YopN, YopB sowie YscE und YscM2. Aus den PPI-Daten wird ersichtlich, dass jeder Signalweg durch mehrere Yersinia-Proteine angegriffen werden kann (Anhang Tab.2).

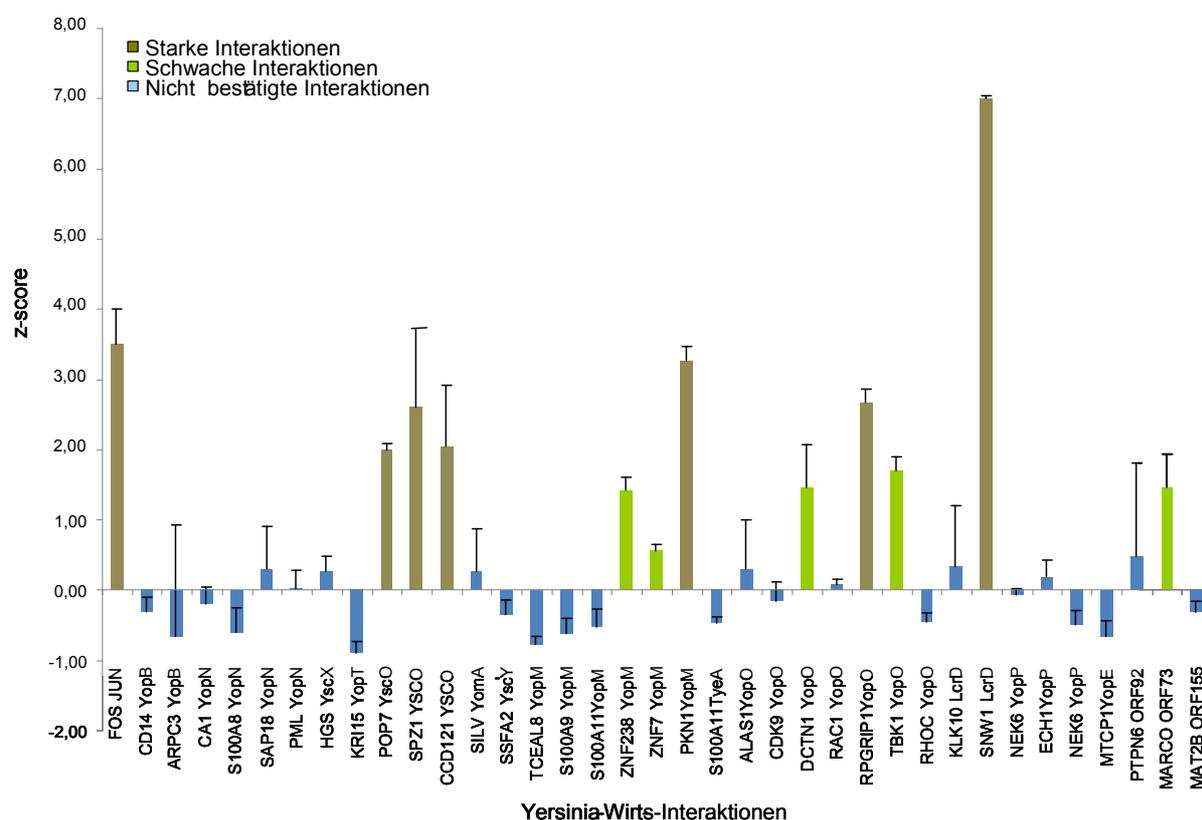


**Abbildung 18: Funktionelle Analyse der Pathogen-Wirt Interaktionen.** Die Pathogen-Wirt-Interaktionsdaten sind mit Proteinen angereichert, die an der Regulation der Transkription, Organisation des Zytoskeletts sowie an posttranslationalen Modifikationen und der Signaltransduktion funktionell beteiligt sind.

### 3.5 Validierung von Pathogen-Wirt Interaktionen mittels LUMIER Bindungsassays

Von den im Y2H-Screen entdeckten Interaktionen wurden 36 ausgewählte Interaktionspaare mittels LUMIER Bindungsassays validiert. Diese Methode zum Testen von PPI basiert auf der Affinitätsaufreinigung getaggtter Proteine mit potentiell interagierender Proteinen aus transient transfizierten Säugerzellen<sup>136</sup>. Dazu wurden die cDNAs der zu testenden Interaktoren in die Vektoren pTREX-dest30-ntPrA und pcDNA-Rluc kloniert, und als Hybridproteine mit C-terminal-fusioniertem Protein A-Tag bzw. der *Renilla reniformis* Luziferase exprimiert. Da die ORFs in beide Vektoren kloniert wurden, wurden insgesamt 104 Konstrukte hergestellt. Die zu testenden Interaktionspaare wurden in HEK 293 Zellen transient überexprimiert, die Zellen 40 h inkubiert und dann lysiert. Anschließend

wurde die Luziferaseaktivität der Zelllysate, wie in Material und Methoden beschrieben, gemessen. Von den getesteten Interaktionen konnten 30% bestätigt werden, dabei wurden 6 (16%) der Interaktionen ( $z\text{-score} > 2$ ) als stark positiv und 5 (14%) als schwach positiv bewertet ( $z\text{-score } 0,5\text{-}2$ ) (Abb 19). In Tab. 13 sind die mittels LUMIER Bindungsassays getesteten Interaktionen aufgeführt.



**Abbildung 19: Validierung der Y2H-Ergebnissen mittels LUMIER Bindungsassays.** 36 ausgewählte Y2H Interaktionspaare wurden mittels LUMIER Bindungsassay validiert. Die Interaktionspaare wurden in HEK 293 Zellen transient überexprimiert, die Zellen 40 h inkubiert und lysiert. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität der Zelllysate gemessen. Starke Interaktionen mit  $z\text{-score} > 2$  sind dunkelgrün, schwache Interaktionen mit  $z\text{-score } 0,5\text{-}2$  sind hellgrün, nicht bestätigte Interaktionen sind blau dargestellt. Die FOS-JUN-Interaktion stellt die Positivkontrolle dar.

**Tabelle 13: Mittels LUMIER Bindungsassays getestete Interaktionen**

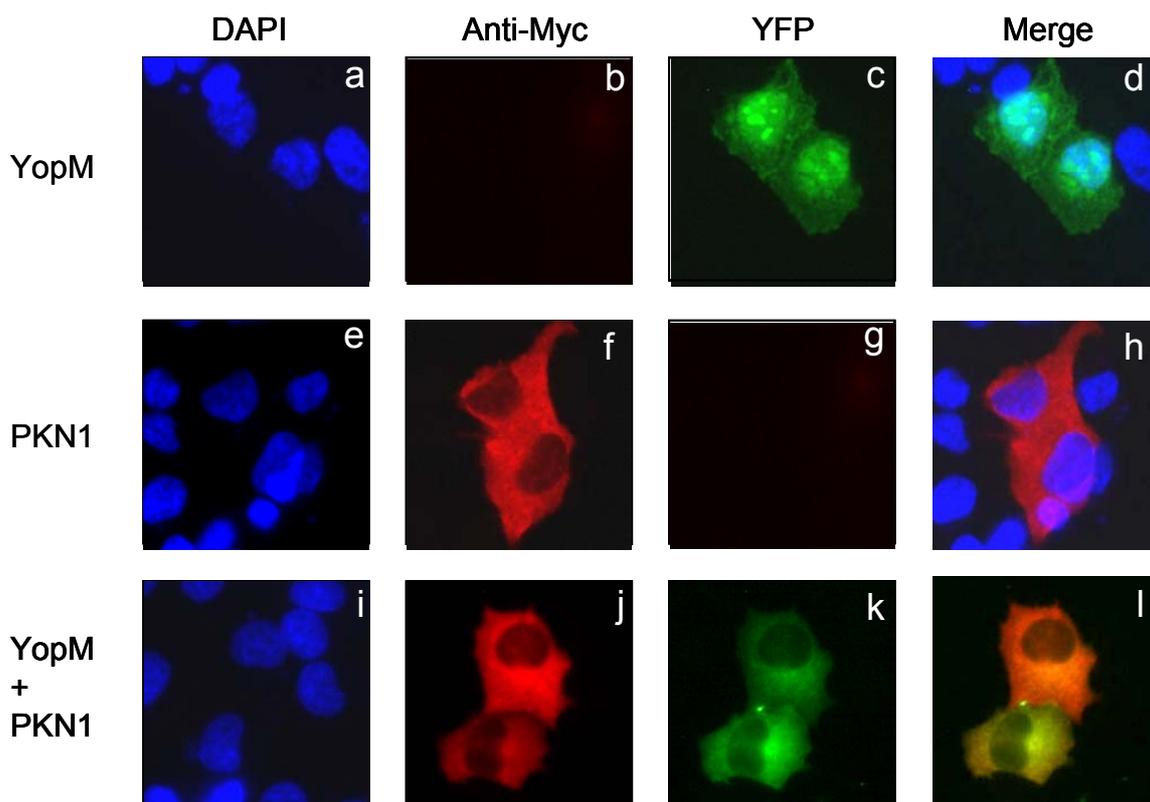
Interaktionspaare		z-score	Standard Abweichung
FOS	JUN	3,50	0,50
YopB	CD14	-0,31	0,21
YopB	ARPC3	-0,66	1,60
YopN	CA1	-0,19	0,24
YopN	S100A8	-0,60	0,34
YopN	SAP18	0,30	0,61
YopN	PML	0,02	0,26
YopM	TCEAL8	-0,77	0,11
YopM	S100A9	-0,62	0,23
YopM	S100A11	-0,52	0,25

Interaktionspaare		z-score	Standard Abweichung
YopM	ZNF238	1,43	0,18
YopM	ZNF7	0,56	0,08
YopM	PKN1	3,26	0,20
YopO	ALAS1	0,30	0,71
YopO	CDK9	-0,16	0,27
YopO	DCTN1	1,47	0,60
YopO	RAC1	0,07	0,08
YopO	RPGRIP1	2,69	0,18
YopO	TBK1	1,70	0,20
YopO	RHOC	-0,46	0,12
YopP	NEK6	-0,06	0,09
YopP	ECH1	0,20	0,23
YopP	NEK6	-0,49	0,20
YscO	POP7	1,99	0,10
YscO	SPZ1	2,60	1,13
YscO	CCD121	2,06	0,87
LcrD	KLK10	0,35	0,86
LcrD	SNW1	7,01	0,03
YopT	KRI15	-0,89	0,16
YopE	MTCP1	-0,66	0,22
YomA	SILV	0,27	0,61
YscY	SSFA2	-0,34	0,19
YscX	HGS	0,27	0,22
TyeA	S100A11	-0,47	0,10
ORF92	PTPN6	0,50	1,31
ORF73	MARCO	1,46	0,49
ORF155	MAT2B	-0,31	0,15

### 3.6 Interaktion des Yersinia Effektorproteins YopM mit PKN1 und Zinkfinger-Proteinen

Der Y2H-Screen von YopM gegen humane cDNA Genbanken identifizierte 76 neue Interaktionspartner dieses Effektorproteins. Sechszehn davon stellen *high confidence* Interaktionen dar. YopM zeigte eine Anreicherung an Interaktionen mit unterschiedlichen Zinkfinger-Proteinen, die klassische Zinkfinger-Domänen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> enthalten (ZNF142, ZNF408, ZNF12, ZNF181, ZNF544, ZNF223, ZNF7, ZNF276, ZNF232, ZNF225, ZNF44, ZNF470, ZNF83, ZNF79, ZNF714, ZNF671, ZNF588, ZNF268, ZNF155). Ein weiterer Interaktionspartner von YopM stellt PKN1 (Protein kinase C-like 1 oder PRKCL1) dar, eine Fettsäuren- und Rho-aktivierende Serin/Threonin Protein Kinase. PKN1 besitzt eine katalytische Domäne, die Homologie mit der Protein Kinase C (PKC) aufweist<sup>140</sup>. Drei der Interaktionen, nämlich die mit PKN1, ZNF7 und ZNF238 wurden im LUMIER Bindungsassay bestätigt. Das Yersinia Effektorprotein YopM besteht hauptsächlich aus *leucine rich repeats* (LRRs) und weist dadurch Ähnlichkeit zum Salmonella Effektorprotein SspH1 auf, welches ebenfalls LRRs enthält. Es wurde beschrieben, dass SspH1 einerseits mit PKN1 interagiert und andererseits die NF-

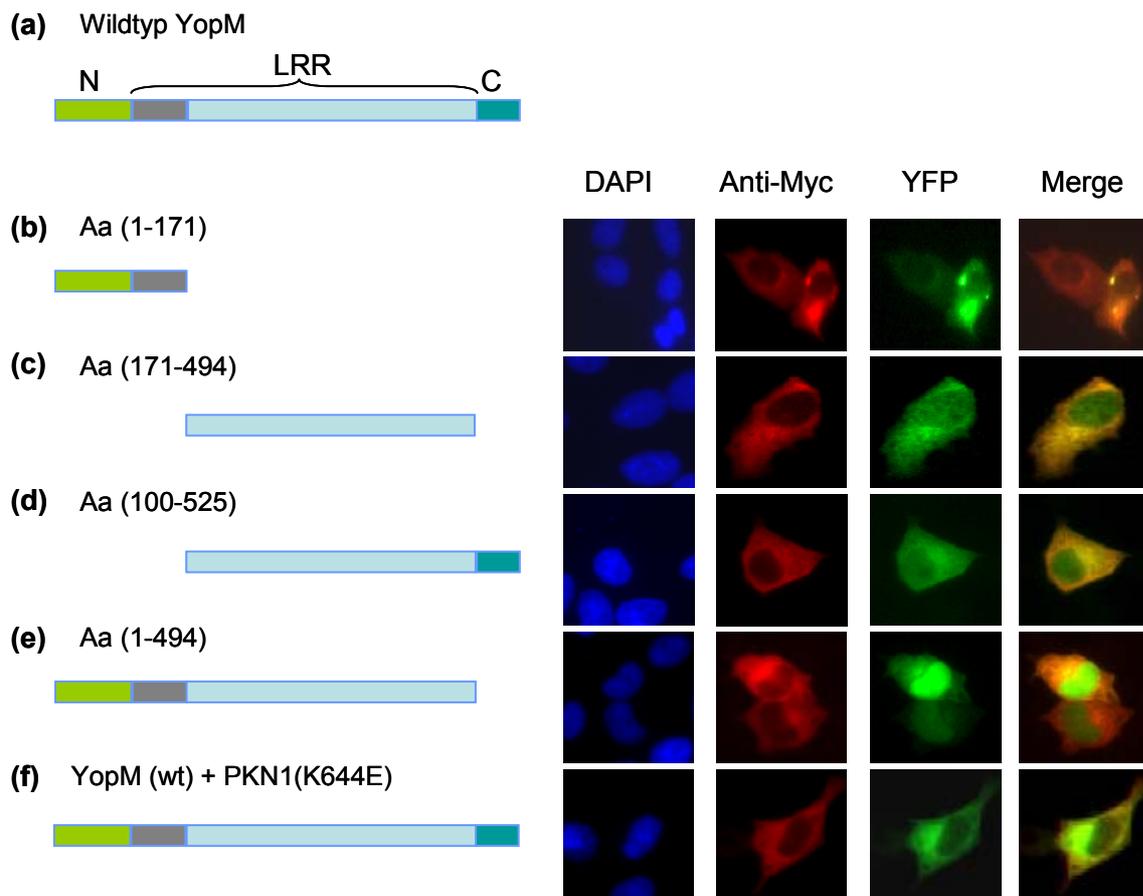
kB-abhängige Genexpression inhibiert<sup>141, 142</sup>. Um die funktionelle Bedeutung der YopM-PKN1 Interaktion bei der *Y. enterocolitica* Infektion zu untersuchen, wurden als erstes YFP-YopM und PKN1-Myc Fusionsproteine hergestellt. Dafür wurde die kodierende Sequenz von YopM in den Vektor pCR3-YFP, die von PKN1 in den Vektor pCR3-C-Myc kloniert. Diese Vektoren wurden dann zur Expression der Fusionsproteine in HeLa Zellen transfiziert. Die Lokalisation der Proteine erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abb 20). Die indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IF-Analyse) von PKN1 erfolgte mit primären Maus Anti c-Myc und sekundären Ziege Anti Maus-Alexa594-Antikörpern. Wenn YopM allein exprimiert wurde, befand der sich sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma von HeLa Zellen. Dieses Ergebnis stimmte mit den schon publizierten Daten über die zelluläre Lokalisation von YopM überein<sup>78</sup>. Das PKN1 Fusionsprotein dagegen lokalisierte bei alleiniger Expression im Zytoplasma von HeLa Zellen. Bei Koexpression beider Proteine in HeLa Zellen waren sowohl PKN1 als auch YopM ausschließlich im Zytoplasma zu finden und eine nukleäre Lokalisation von YopM konnte nicht mehr beobachtet werden. Die Überexpression von PKN1 ändert offensichtlich die Lokalisation von YopM durch Bindung an YopM.



**Abbildung 20: Subzelluläre Lokalisation von YopM und PKN1.** YFP-YopM (a-d), myc-PKN1 (e-h) oder beide Fusionsproteine (i-l) wurden transient in HeLa Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit Formaldehyd und Triton X-100 fixiert und permeabilisiert. YopM wurde direkt detektiert, PKN1 mit Maus Anti c-Myc und sekundären Ziege Anti Maus-Alexa594-Antikörpern. Die Anfärbung des Chromatins erfolgte mit DAPI.

### 3.7 Bestimmung der Bindedomäne von YopM mit PKN1

Um die an der Bindung beteiligten Domänen von YopM zu bestimmen wurden Deletionsmutanten von YopM in den Vektor pCR3-YFP kloniert (Abb 21). Diese YopM Fusionsproteine wurden mit PKN1 in HeLa Zellen koexprimiert und die Kolo­kalisierung getestet. Bei Koexpression waren alle YopM-Domänen mit Ausnahme von YopM, dem die letzten C-terminalen 32 Aminosäuren fehlten, im Zytoplasma mit PKN1 kolokalisiert. Nur die YopM-Mutante mit der Deletion der letzten C-terminalen 32 Aminosäuren war im Zellkern von HeLa Zellen zu sehen, wobei PKN1 weiterhin im Zytoplasma lokalisiert war. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die letzten C-terminalen 32 Aminosäuren von YopM für die Bindung an PKN1 und für die zytoplasmatische Lokalisation von YopM verantwortlich sind. Um zu bestimmen, ob die Kinasedomäne von PKN1 zur Lokalisationsänderung von YopM beiträgt, wurde eine PKN1-Mutante mit Wildtyp YopM in HeLa Zellen koexprimiert. Es wurde eine Kinaseausfallmutante von PKN1 hergestellt, bei der das zentrale Lysin K644 in der ATP Bindungsstelle durch Glutaminsäure (E) ersetzt wurde (K644E)<sup>143</sup>. Die Kinaseausfallmutante führte bei Koexpression mit YopM weiterhin zur ausschließlichen Lokalisation von YopM im Zytoplasma von HeLa Zellen. Die Ergebnisse zeigen folglich, dass die Kinasedomäne von PKN1 keinen Einfluss auf die Lokalisation von YopM hat.

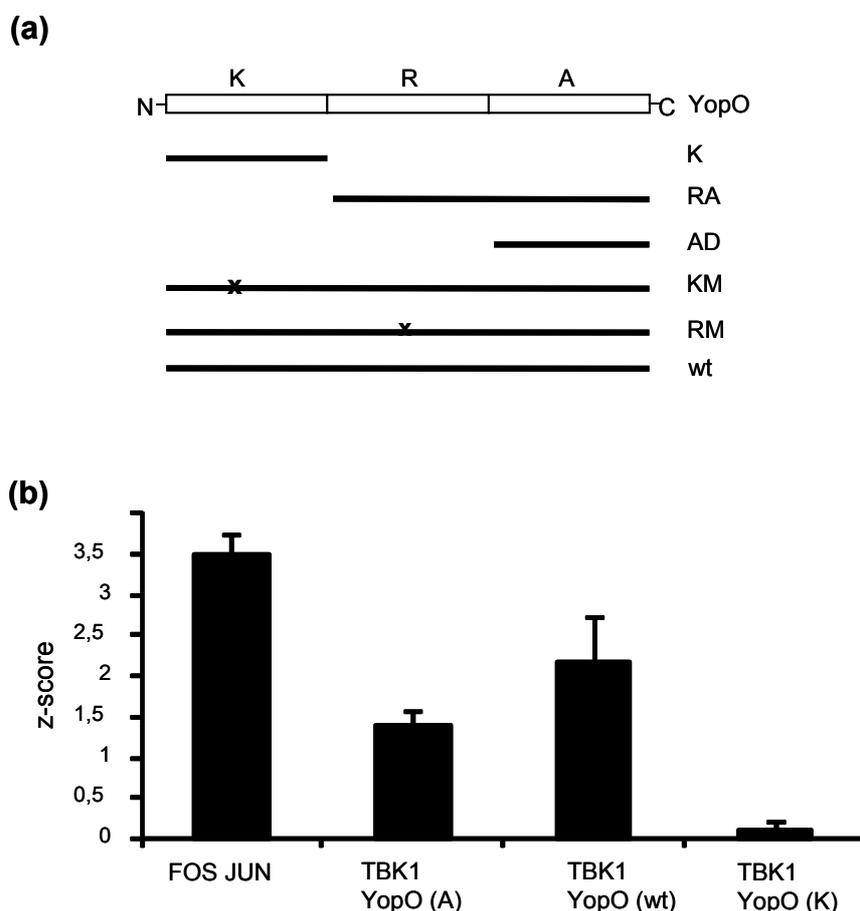


**Abbildung 21: Subzelluläre Lokalisation von verschiedenen YopM-Domänen und PKN1.** (a) Schematische Darstellung von Volllänge YopM. (b) YFP-YopM (aa1-171), (c) YFP-YopM (aa171-494), (d) YFP-YopM (aa100-525), sowie (e) YFP-YopM (aa1-494) wurden mit PKN1 (wt) transient in HeLa Zellen koexprimiert. (f) Alternativ dazu wurde Volllänge YopM mit der Kinaseausfallmutante PKN1(K644E) koexprimiert. Die Zellen wurden mit Formaldehyd und Triton X-100 fixiert und permeabilisiert. YopM wurde direkt detektiert, PKN1 mit Maus Anti c-Myc und sekundären Ziegen Anti Maus-Alexa594-Antikörpern. Die Anfärbung des Chromatins erfolgte mit DAPI.

### 3.8 Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors durch YopO

Das Yersinia Effektorprotein YopO ist eine Serin–Threonin-Kinase, die für die Virulenz von *Y. enterocolitica* eine wichtige Rolle spielt. Die Aktivierung von YopO erfolgt durch die Ausbildung eines 1:1 Komplexes mit G-Aktin<sup>144</sup>. Die Interaktionspartner von YopO, die im Y2H-Screen identifiziert wurden, schließen einige schon bekannte Interaktionen von YopO ein, wie zum Beispiel Interaktionen mit den kleinen GTPasen RhoA, RhoC, Rac1 und Rac2. Interessanterweise wurde im Pathogen-Wirt Y2H-Screen die *tank binding kinase 1* (TBK1) als YopO-Interaktionspartner identifiziert. TBK1 stellt eine wesentliche Komponente der TLR-3 und TLR-4 vermittelten Typ 1 Interferon Induktion durch bakterielle Lipopolysaccharide dar und ist somit ein zentraler Regulator der Interferon Expression. TBK1 phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-7 im Zytoplasma. Phosphorylierte IRFs translozieren in den Zellkern und führen zur IFN Produktion<sup>92</sup>. Die YopO-TBK1 Interaktion wurde auch mittels LUMIER Bindungsassay bestätigt. Dafür wurden die kodierenden Sequenzen

der Volllänge YopO, der Aktin-Bindedomäne (A) und Kinasedomäne (K) von YopO in die pTREX-dest30-ntPrA- und pcDNA-Rluc-Vektoren kloniert und zur transienten Expression in HEK 293 Zellen transfiziert. Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurde 40 h nach der Transfektion Zelllysate hergestellt und für den LUMIER Bindungsassay verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass das Volllänge YopO und dessen Aktin-Bindedomäne (A) im LUMIER Bindungsassay mit TBK1 interagierten. Die Bindung zwischen YopO (Aktin-Bindedomäne) und TBK1 ist jedoch schwächer als mit Volllänge YopO. Dessen Kinasedomäne (KD) zeigt dagegen keine Interaktion mit TBK1. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Y2H-Screens war also die Aktin-Bindedomäne von YopO (aa 524-730) für die Interaktion mit TBK1 im LUMIER Assay ausreichend (Abb. 22b). Die Y2H-Ergebnisse des Volllänge YopO und einzelner Domänen sind nicht im Detail aufgeführt, sondern unter YopO kollektiv zusammengefasst und im Anhang Tab.2 dargestellt.



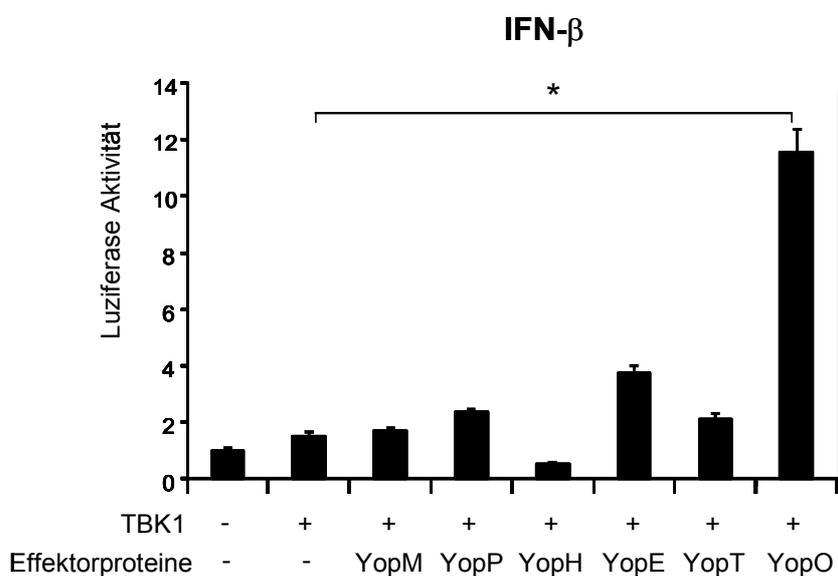
**Abbildung 22: YopO und die Aktin-Bindedomäne von YopO interagieren mit TBK1 im LUMIER Bindungsassay.** (a) Schematische Darstellung der Domänen, klonierten Bereiche und Mutanten von YopO. Kinasedomäne (K), Rac- und Aktin-Bindedomäne (RA), Aktin-Bindedomäne (A), Kinaseausfall- und Rac-Bindungsdomänenmutanten (KM) und (RM) und das Volllänge YopO wurden in LUMIER- bzw. in pCR3-Vektoren überexprimiert. (b) Die Interaktionen des Volllänge YopO und dessen Aktin-Bindedomäne bzw. Kinasedomäne mit TBK1 wurde mittels LUMIER Bindungsassay getestet. Die FOS-JUN Interaktion stellt eine Positivkontrolle dar.

Um die funktionelle Bedeutung der YopO-TBK1 Interaktion zu untersuchen, wurde der Einfluss beider Proteine auf die Aktivierung eines IRF3/IRF7-abhängigen Promotors untersucht. Dafür wurde p125luc als Reporterplasmid verwendet. Dabei handelt es sich um ein Plasmid, welches das Luziferase-Gen unter der Kontrolle des Interferon- $\beta$ -Promotors enthält. Die Aktivität des Genprodukts der Luziferase kann in einem Dual-Luziferase Assay gemessen werden. HEK 293 Zellen wurden mit den Plasmiden p125luc, YopO-pCR3 und TBK1-pCR3 kotransfiziert, 20 h inkubiert, und anschließend lysiert. Die Luziferaseaktivität des Zelllysats wurde dann mittels Dual-Luziferase Assay gemessen. Während beide Proteine allein einen schwach stimulierenden Effekt auf den IRF3/IRF7 abhängigen Promotor haben (Abb.23a,b) führt die Koexpression beider Proteine zu einer stark synergistischen Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors. Als nächstes wurde untersucht, ob die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors spezifisch für YopO war. Dafür wurden auch die anderen Yersinia Effektorproteine, nämlich YopM, YopH, YopP, YopE und YopT auf IFN- $\beta$ -Promotoraktivierung untersucht. Keiner der fünf Effektoren war in der Lage, den IFN- $\beta$ -Promotor annähernd so stark zu aktivieren wie YopO (Abb.23a). Diese Experimente zeigen, dass YopO der einzige Yersinia Effektor ist, der im Zusammenspiel mit TBK1 zur Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors führt.

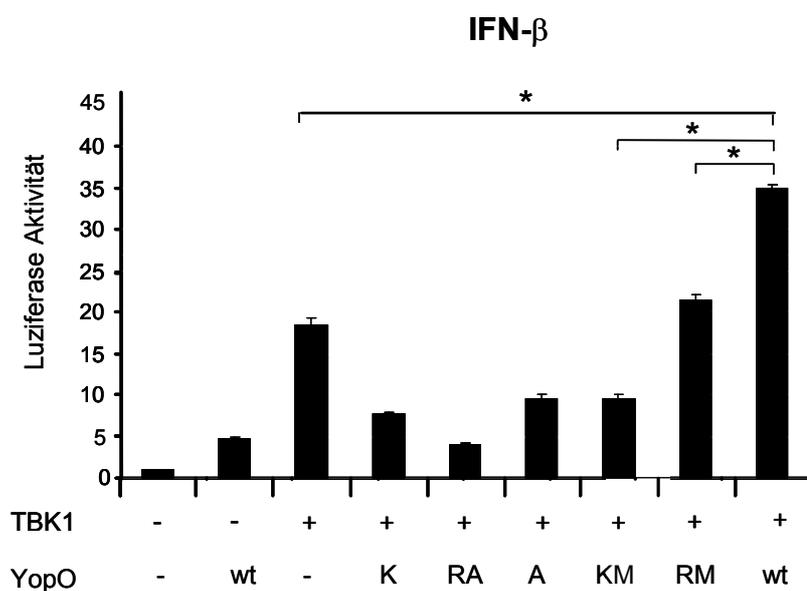
Um zu bestimmen, welche Domäne von YopO zur Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors beiträgt, wurden unterschiedliche pCR3-Vektoren generiert, die entweder die YopO Kinasedomäne (K), die Rac- und Aktin-Bindedomäne (RA) oder die Aktin-Bindedomäne (A) alleine kodierten. Diese Konstrukte wurden in HEK 293 Zellen mit dem TBK1-kodierenden Plasmid kotransfiziert und nach 20 h Inkubation die Aktivierung des IFN- $\beta$  Promotors mittels Dual-Luziferase Assay getestet. Die Abb.23b zeigt, dass die IFN- $\beta$ -Aktivierung verschwand, wenn ein nicht interagierendes Fragment von YopO, nämlich die Kinasedomäne mit TBK1 koexprimiert war, und stark attenuiert, wenn die Aktin-Bindedomäne in HEK 293 mit TBK1 koexprimiert war. Auch die Koexpression von Rac- und Aktin-Bindedomäne mit TBK1 konnte keine Aktivierung von IFN- $\beta$  hervorrufen. Die effektive Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors erfordert demnach das Zusammenwirken der einzelnen Domänen von YopO. Die nächsten Fragen waren, ob einerseits die Kinaseaktivität des YopO notwendig ist, um den IFN- $\beta$ -Promoter zu aktivieren, und andererseits, inwiefern die Rac1-Bindeaktivität die Aktivierung des IFN-Promotors beeinflusst. Dafür wurden pCR3-Vektoren generiert, die eine Kinaseausfallmutante (KM) (YopO/D268A/KDM)-*kinase death mutant*<sup>145</sup>, und eine Rac-Bindungsmutante (RM) mit den Mutationen Y591A, N595A, E599A in der Rac-Bindungsstelle<sup>146</sup> kodierten. Die Mutationen in der Rac-Bindungsstelle beeinträchtigen die Bildung eines Komplexes mit Rac1 und RhoA. Die Rac1-Bindedomäne von YopO imitiert den in Wirtszellen vorkommenden Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (GDI) der Rho-GTPasen und inhibiert dadurch den Nukleotid-Austausch in Rac1 und RhoA. Die Mutationen in der Rac-Bindedomäne heben deren Aktivität *in vitro* auf und beeinträchtigen dadurch die YopO-induzierte Zytoskelettzerstörung *in vivo*. *Y. pseudotuberculosis* Mutanten, denen die YpkA GDI-Aktivität fehlte, waren in ihrer Virulenz im Maus-Infektionsassay stark attenuiert<sup>146</sup>. Bei

der Koexpression der Kinaseausfallmutante von YopO mit TBK1 in HEK 293 Zellen kam es nicht zur Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kinaseaktivität von YopO und damit vermutlich die Phosphorylierung von TBK1 essentiell für die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors ist. Im Gegensatz zur Kinaseausfallmutante konnte Rac-Bindungsmutante den IFN- $\beta$ -Promotor aktivieren. Der Effekt der IFN- $\beta$ -Aktivierung durch Rac-Bindungsmutante war jedoch deutlich schwächer als beim Wildtyp YopO. Vermutlich trägt auch die Rac1-Bindeaktivität zur IFN- $\beta$ -Aktivierung bei, jedoch scheinen die Kinase- und Aktin-Bindeaktivität von YopO die entscheidende Rolle bei der IFN- $\beta$ -Aktivierung zu spielen.

(a)



(b)

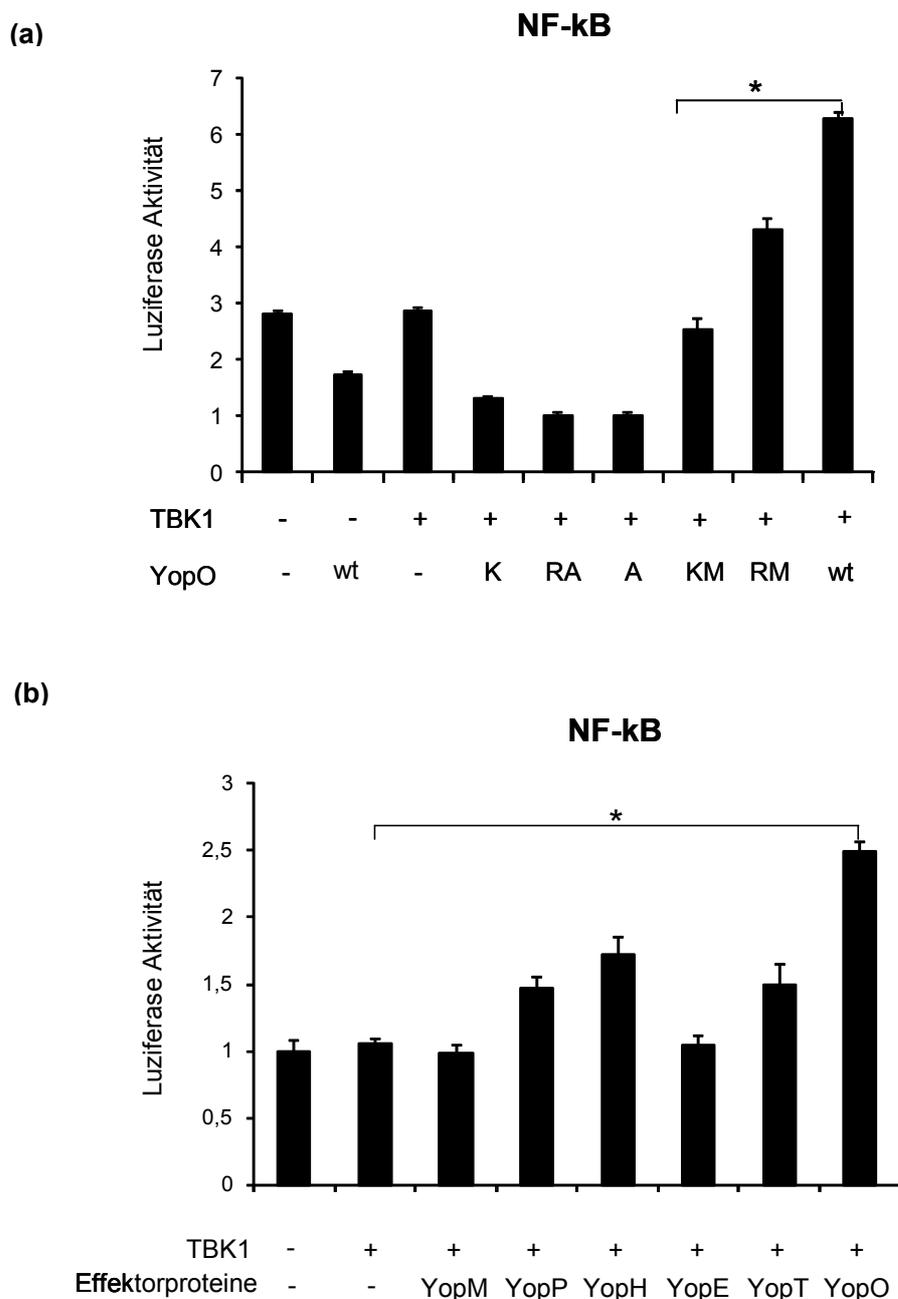


**Abbildung 23: Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors durch YopO.** (a) HEK 293 Zellen wurden mit dem Reporterplasmid p125luc, dem TBK1-kodierenden Plasmid sowie Plasmiden kotransfiziert, die die Yersinia Effektorproteine YopM, YopH, YopP, YopE, YopT und YopO kodierten (b) Alternativ wurden das Reporterplasmid p125luc, das TBK1-kodierende Plasmid sowie Plasmide, die das Volllänge YopO, die Kinasedomäne (K), die Rac- und Aktin-Bindedomänen (RA) bzw. die Aktin-Bindedomäne (A), oder die Kinaseausfallmutante (KM) bzw. die Rac-Bindungsmutante (RM) kodierten in HEK 293 Zellen kotransfiziert. Die Zellen wurden dann 20 h inkubiert, anschließend lysiert und die Luziferaseaktivität mittels Dual-Luziferase Assay gemessen. Y-Achse zeigt x-fache Aktivierung, normalisiert auf die Negativkontrolle.

\*  $p < 0,05$

### 3.9 Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B Signalwegs durch YopO

Die *TRAF family member associated NF- $\kappa$ B activator TANK binding kinase-1* (TBK1), auch als NAK (NF- $\kappa$ B activating kinase) bekannt, wurde ursprünglich als NF- $\kappa$ B aktivierende Kinase identifiziert<sup>87, 115</sup>. TBK1 aktiviert die IKK-Kinase durch direkte Phosphorylierung von IKK $\beta$  und trägt dadurch auch zur NF- $\kappa$ B Aktivierung bei<sup>115</sup>. Aus diesem Grund wurde der Effekt der YopO-TBK1-Interaktion auf den NF- $\kappa$ B-Promotor untersucht. Als Reporterplasmid wurde pNF- $\kappa$ B-luc verwendet. Das Plasmid enthält das Luziferase-Gen unter der Kontrolle des NF- $\kappa$ B-Promotors. HEK 293 Zellen wurden mit pNF- $\kappa$ B, pCR3-TBK1 und Plasmiden, die verschiedene YopO-Mutanten kodierten, kotransfiziert. Für die Transfektion wurden Plasmide verwendet, das Volllänge YopO, die Kinasedomäne (K), die Rac- und Aktin-Bindedomäne (RA), die Aktin-Bindedomäne (A) oder die Kinaseausfall- und Rac-Bindungsmutanten (KM und RM) kodierten. Nach der Transfektion wurden die Zellen 20 h inkubiert, und anschließend lysiert. Die Luziferaseaktivität des Zelllysats wurde mittels Dual-Luziferase Assay gemessen. Die Ergebnisse dieses Experiments sind ähnlich denen des IFN- $\beta$ -Promotors (Abb.24a). YopO oder TBK1 allein hatten keinen stimulierenden Effekt auf den NF- $\kappa$ B-Promotor. Dagegen bewirkte die Koexpression beider Proteine eine deutliche Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Promotors. Die Aktivierung erforderte ein intaktes Volllängeprotein, wogegen einzelne Domänen keinen aktivierenden Effekt hatten. Auch hier waren die Kinaseaktivität von YopO, sowie die Bindung von YopO an TBK1 für die volle Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Promotors notwendig. Es wurden auch andere Yersinia Effektoren, nämlich YopM, YopH, YopP, YopE und YopT auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B abhängigen Reporters untersucht. Wie in Abbildung 24b zu sehen ist, waren außer YopO auch YopH, YopP und YopT im Zusammenspiel mit TBK1 in der Lage, den NF- $\kappa$ B-Promotor zu aktivieren (Abb.24b). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass YopO durch die Interaktion mit TBK1 außer dem IFN- $\beta$ - auch den NF- $\kappa$ B-Promotor aktivieren kann, und dass für die volle Aktivierung beider Promotoren die einzelnen Domänen von YopO notwendig sind.



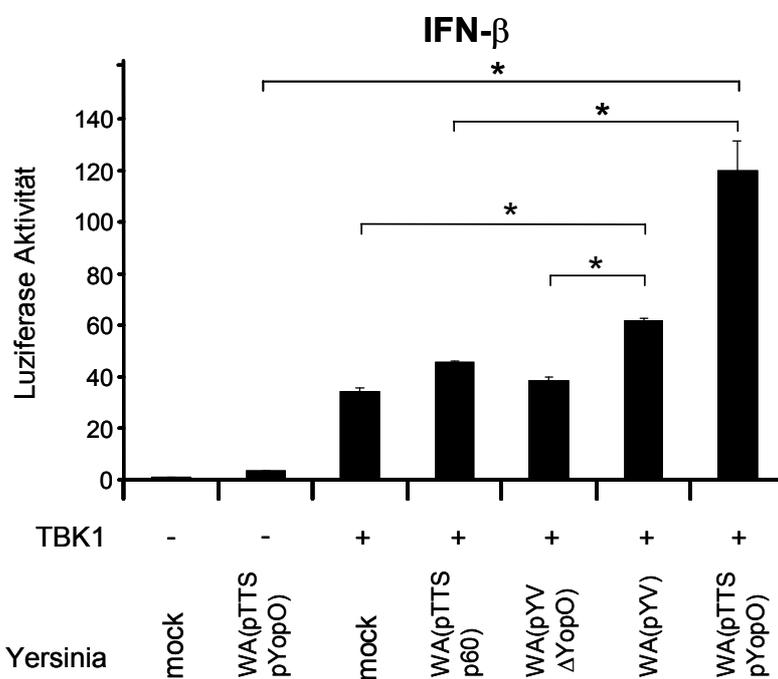
**Abbildung 24: Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Promotors mittels YopO und verschiedene Effektorproteine.** (a) HEK 293 Zellen wurden mit dem Reporterplasmid NF- $\kappa$ Bluc, dem TBK1-kodierenden Plasmid sowie Plasmiden kotransfiziert, die das Volllänge YopO, die Kinasedomäne (K), die Rac- und Aktin-Bindedomänen (RA) bzw. die Aktin-Bindedomäne (A), oder die Kinaseausfallmutante (KM) bzw. die Rac-Bindungsmutante (RM) kodierten. (b) Alternativ wurden das Reporterplasmid NF- $\kappa$ Bluc, das TBK1-kodierende Plasmid sowie Plasmide, die Yersinia Effektorproteine YopM, YopH, YopP, YopE, YopT und YopO kodierten, in HEK 293 Zellen kotransfiziert. Die Zellen wurden dann 20 h inkubiert, anschließend lysiert und die Luziferaseaktivität mittels Dual-Luziferase Assay gemessen. Y-Achse zeigt x-fache Aktivierung, normalisiert auf die Negativkontrolle.

\* $p < 0,05$

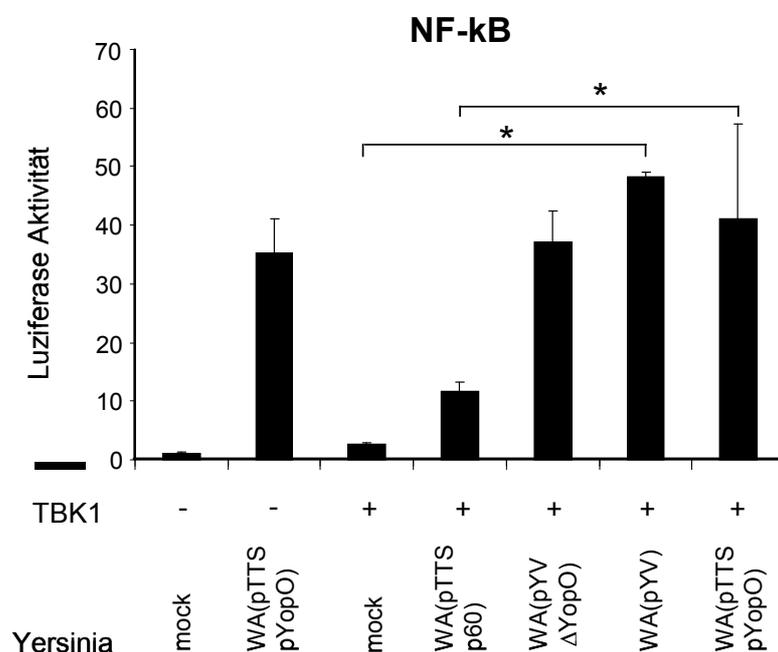
### 3.10 Untersuchung der Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors anhand von *Yersinia* Mutanten

Der Effekt von *Y. enterocolitica* auf IFN- $\beta$ - und NF- $\kappa$ B-abhängige Promotoren wurde bei der Infektion untersucht (Abb.25). HEK 293 Zellen wurden mit entsprechenden Reporterplasmiden und pCR3-TBK1 kotransfiziert, 18 h später mit unterschiedlichen *Yersinia*-Stämmen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 5 infiziert und weitere 9 h inkubiert. Für dieses Experiment wurden mehrere *Yersinia*-Stämme verwendet: der Wildtypstamm WA(pYV), die YopO Monosekretionsmutante WA(pTTTS, pYopO), die YopO Deletionsmutante WA(pYV $\Delta$ YopO) sowie die Mutante WA(pTTSp60), welche das TTSS ausbildet, aber keine Effektorproteine sekretieren kann. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität des Reporters untersucht (Abb.25a). Wenn HEK 293 Zellen mit *Y. enterocolitica* in Kontakt kamen, konnte man eine robuste Induktion beider Promotoren beobachten, welche in den YopO-Deletionsmutanten reduziert war. In Zellen, die kein TBK1-exprimierendes Plasmid enthielten, konnte die YopO-Monosekretionsmutante keine IFN- $\beta$ -Promotor Induktion verursachen. Eine starke Induktion des IFN- $\beta$ -Promotors konnte man aber bei der Infektion von TBK1 überexprimierenden Zellen mit der *Yersinia* YopO-Monosekretionsmutante beobachten. Bei der Infektion der Zellen mit der YopO Deletionsmutante war die Aktivierung im Vergleich zu den Infektionen mit der YopO Monosekretionsmutante und Wildtyp *Yersinia* schwächer. Im Falle des NF- $\kappa$ B-Promotors war die YopO-Monosekretionsmutante allein für die starke Aktivierung des NF- $\kappa$ B Promotors ausreichend. Da YopO direkt mit NF- $\kappa$ B2 interagiert (Anhang Tab. 2), ist das Protein vermutlich direkt an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B Promotors beteiligt, während es bei der IFN- $\beta$ -Induktion durch YopO zu einer direkten Interaktion mit TBK1 kommt.

(a)



(b)



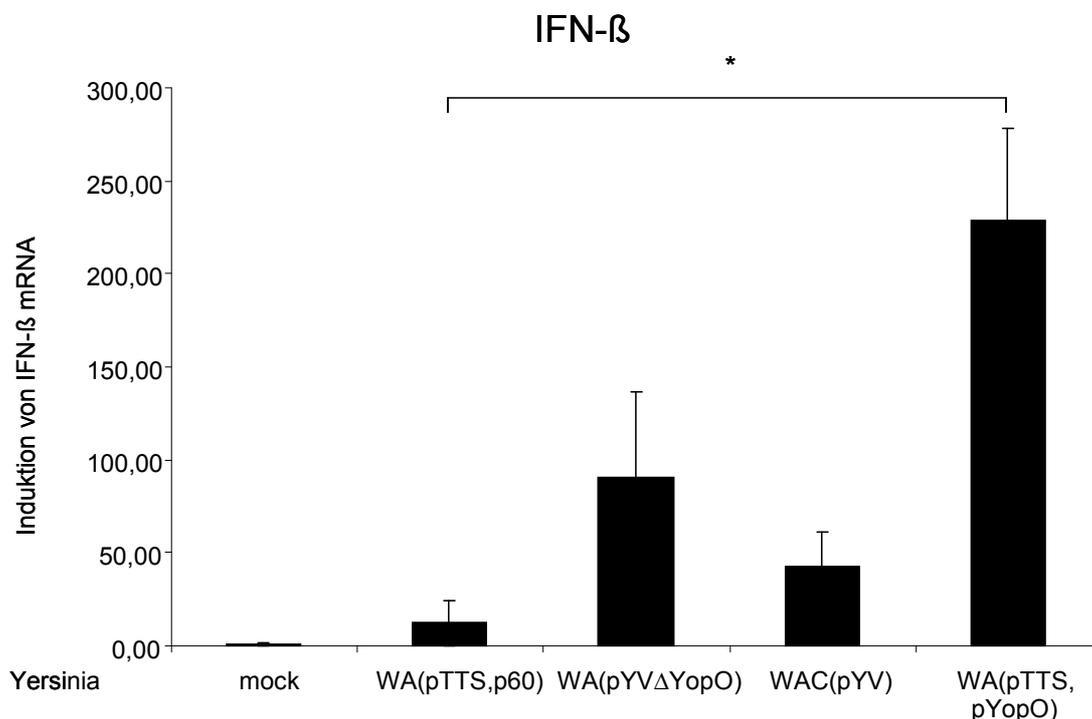
**Abbildung 25: Aktivierung der IFN- $\beta$ - und NF-kB-Promotoren während der Infektion.** HEK 293 Zellen wurden mit dem IFN- $\beta$ -Reporterplasmid (a), dem NF-kB-Reporterplasmid (b) und pCR3-TBK1 kotransfiziert, und anschließend mit verschiedenen Yersinia-Stämmen: WA(pTTS, pYopO), WA(pTTS p60), WA(pYV $\Delta$ YopO), und WA(pYV) mit einer MOI von 5 8 h lang infiziert, lysiert und anschließend die Luziferaseaktivität mittels Dual-Luziferase Assay gemessen. Y-Achse zeigt x-fache Aktivierung, normalisiert auf die Negativkontrolle.

\* p<0,05

### 3.11 Induktion von IFN- $\beta$ in J774 Zellen bei *Yersinia* Infektion

Der direkte Effekt der *Y. enterocolitica*-Infektion auf den endogenen IFN- $\beta$ -Promotor wurde mittels RT-PCR untersucht. Dafür wurden J774 Zellen mit den Stämmen WA(pYV), WA(pTTS, pYopO), WA(pYV $\Delta$ YopO) oder WA(pTTSp60) mit einer MOI von 50 infiziert. Als Negativkontrolle dienten mock-infizierte J744 Zellen. Nach 8 h Infektion wurde aus den jeweiligen Zellen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, welche dann für die quantitative PCR genutzt wurde. Die Expressionshöhe wurde jeweils auf die HPRT (Hypoxanthin Guanin Phosphorybosyltransferase) der Maus normalisiert. Bei HPRT handelt es sich um ein *house keeping gene*, welches häufig als Referenz für RT-PCR Analysen benutzt wird, da es sehr konstante Expressionsstärken in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen und Gewebe zeigt <sup>147</sup>.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei der Infektion mit WA(pYV) die IFN- $\beta$ -RNA 40 fach angereichert war. Nach Infektion mit der YopO Deletionsmutante kam es zu einer 100 fachen Anreicherung. Im Falle der YopO Monosekretionsmutante war die Anreicherung der mRNA sogar mehr als 200 fach (Abb.26). Unsere Studien zeigen somit, dass nach *Y. enterocolitica* Infektion von J774 Makrophagen die Expression von INF- $\beta$  induziert wird und dass dafür das Effektorprotein YopO verantwortlich ist.

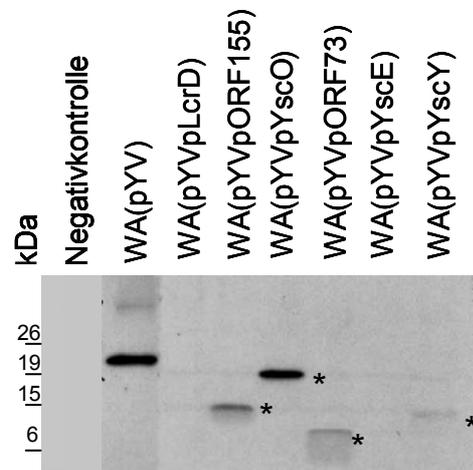


**Abbildung 26: Induktion von IFN- $\beta$  mRNA durch *Yersinia* Mutanten.** J774 Zellen wurden mit den *Yersinia*-Stämmen WA(pTTS, pYopO), WA(pTTSp60), WA(pYV $\Delta$ YopO) und WA(pYV) 8 h infiziert. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels RT-PCR auf IFN- $\beta$ -Genexpression untersucht. Als Negativkontrolle dienten mock-infizierte J744 Zellen. Y-Achse zeigt x-fache Aktivierung, normalisiert auf die Negativkontrolle.

\*  $p < 0,05$

### 3.12 Nachweis der Sekretion der *Y. enterocolitica* Orf155, YscO, Orf73 und YscY Proteine

Im Pathogen-Wirt Y2H-Screen hatten außer den bekannten Effektorproteinen mehrere andere *Y. enterocolitica* Proteine eine Anreicherung von Interaktionen mit Wirtsproteinen gezeigt (Anhang Tab.2). Außer den bekannten Yersinia Effektoren hatten auch die Yersinia Proteine LcrD, Orf155, YscO, Orf73, YscE, und YscY gehäuft mit Wirtsproteinen interagiert. LcrD ist ein Protein der inneren Membran mit 7 Transmembrandomänen. YscY und YscO sind als Bestandteile des TTSS bekannt, ihre Funktion ist aber nicht aufgeklärt. Orf155 und Orf73 sind hypothetische Proteine mit unbekannt Funktionen. Um herauszufinden, ob diese Proteine tatsächlich in die Wirtszelle injiziert werden, um dort mit Wirtsproteinen interagieren zu können, sollte in einem ersten Schritt untersucht werden, ob die genannten Proteine aus der Bakterienzelle sezerniert werden. Aus diesem Grunde wurden die kodierenden Sequenzen von LcrD, Orf155, YscO, Orf73, YscE und YscY in pWS Bakteriensexpressionsvektoren kloniert und dabei am C-terminalen Ende mit einem Hämagglutinin (HA)-tag versehen. Diese Plasmide wurden sowohl in den *Y. enterocolitica* Wildtypstamm WA(pYV) als auch in WA-C(pTTSS) Stamm transformiert, und anschließend durch EGTA zur Sekretion stimuliert. EGTA wird als  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator verwendet, weil die Sekretion erst stattfinden kann, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im extrazellulären Medium verringert wird<sup>148</sup>. Nach der EGTA-Behandlung wurden die Überstände von den Pellets getrennt. Die Überstände, welche sezernierte Proteine enthalten sollten, wurden vorsichtig abgenommen und darin enthaltene Proteine durch TCA/Aceton Fällung präzipitiert. Die Pellets wurden parallel zu den gefällten Proteinen in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Alle Proben wurden auf SDS-Gele aufgetragen. Als Kontrolle für die Proteinsekretion diente das Yersinia Effektorprotein YopE, als Negativkontrolle diente das SycD-Chaperon, welches in Yersinia-Zellen synthetisiert, aber nicht sekretiert wird. Wie in Abbildung 27 gezeigt ist, konnte die Sekretion von YscO, Orf155, Orf73 und YscY ins extrazelluläre Medium sowohl durch WA(PYV) *Y. enterocolitica* als auch durch die Monosekretionsmutanten nachgewiesen werden. YscE war jedoch nicht im Überstand zu finden. Alle Proteine, ausser LcrD, konnten im Yersinia Wildtypstamm WA(pYV) und WA-C(pTTSS) exprimiert werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *Y. enterocolitica* weitere Effektorproteine kodieren und ins extrazelluläre Medium sekretieren kann.



**Abbildung 27: Sekretion von Yersinia YopE, Orf155, YscO, Orf73 und YscY.** HA-getaggte LcrD, Orf155, YscO, Orf73, YscE und YscY wurden in Wildtyp Yersinien WA(pYV) transient überexprimiert. Die Proteinsekretion wurde anschließend mit EGTA stimuliert. Die Überstände wurden von den Pellets getrennt, die Proteine aus den Überständen durch TCA/Aceton Fällung präzipitiert. Alle Proben wurden auf 16% SDS-Gele aufgetragen und nach dem Transfer auf die Nitrozellulose Membran mit primären Ratte Anti-HA und sekundären Ratte Anti Pox-Antikörpern nachgewiesen. Als Kontrolle für die Proteinsekretion diente das Yersinia Effektorprotein YopE, als Negativkontrolle diente das SycD-Chaperon.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine umfassende Analyse von Protein-Protein Interaktionen (PPI) zwischen den Proteinen des pYV Virulenzplasmids von *Y. enterocolitica* und Wirtsproteinen durchgeführt. Durch die Yersinia-Infektion setzt ein komplexes Wechselspiel zwischen bakteriellen und Wirtszellkomponenten ein, welches viele zelluläre Prozesse beeinflusst. Während eine Reihe von Mechanismen der Yersinia-Infektion bereits gut verstanden ist, ist das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen bakteriellen und zellulären Komponenten bisher weitgehend unbekannt. Das Ziel des vorliegenden Projekts war es deshalb, die Struktur und die Dynamik der komplexen intrapathogenen und Pathogen-Wirt Interaktionsnetzwerke zu verstehen. Yersinia Stämme besitzen außer dem 4,6 Mbp Chromosom <sup>149</sup> auch ein Virulenzplasmid, auf dem fast alle für die Pathogenität von Yersinien entscheidenden Gene lokalisiert sind (ausgenommen Inv und Ail, die chromosomal kodiert sind). Aus diesem Grunde ist das pYV Plasmid von *Y. enterocolitica* ein idealer Kandidat für die Studie von PPI. Bakterielle Interaktome wurden bisher für *Escherichia coli* <sup>125</sup>, *Helicobacter pylori* <sup>128</sup>, *Mycoplasma pneumoniae* <sup>132</sup> und *Campylobacter jejuni* <sup>150</sup> beschrieben. Zur Identifikation dieser PPI wurde, wie auch in der vorliegenden Arbeit, das Y2H System verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein groß angelegter Y2H-Screen durchgeführt um (i) Interaktionen zwischen Proteinen des Virulenzplasmids von *Y. enterocolitica* pYVa127/90 und (ii) Interaktionen zwischen pYV Plasmid kodierten und Wirtsproteinen zu identifizieren. Ein solcher Y2H-Screen eröffnet die Möglichkeit, mit einem verhältnismäßig geringen Aufwand sehr viele Protein-Protein Interaktionen zu testen.

### 4.1 Vorteile des Y2H Systems

Das Y2H System ist die am häufigsten verwendete Technologie zur genetischen Identifikation von PPI. Es ermöglicht die Untersuchung von PPI in *in vivo*-ähnlichen Verhältnissen, im Milieu einer Zelle und mit in Eukaryonten vorkommenden posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung, Palmitoylierung, oder Faltung durch Chaperone. Im Gegensatz zu Kulturen mit Säugerzellen ist das Y2H System leicht automatisierbar, und eine große Anzahl von Protein-Protein Interaktionen können innerhalb kurzer Zeit getestet werden. Die Ergebnisse können statistisch ausgewertet, umfassend bewertet und mit Daten aus anderen Studien verglichen werden.

### 4.1.1 Vergleich des Hefe-2-Hybrid Systems mit anderen Methoden zur Identifikation von PPI

PPI können auch mittels Koimmunoprecipitation und Affinitätsreinigung mit anschließender massenspektrometischer Analyse identifiziert werden. Diese Methode ist jedoch zeitaufwendig und wird nicht in Hochdurchsatzverfahren eingesetzt. Die Affinitätsreinigung ist insbesondere geeignet, indirekte Proteininteraktionen innerhalb von Komplexen zu entdecken. Die im Y2H System identifizierten PPI sind dagegen fast immer direkt<sup>151, 152</sup>. Andererseits sind die durch Y2H identifizierten Interaktionen hilfreich im Vergleich mit anderen Methoden wie der Affinitätsaufreinigung mit anschließender massenspektrometrischen Analyse, die nur biochemisch stabile PPI erkennt. Das Y2H dagegen entdeckt oft auch schwache und temporäre Wechselwirkungen. Die Tabelle 14 zeigt eine kurze Zusammenfassung der Merkmale von beiden Methoden.

**Tabelle 14: Vergleich von Affinitätschromatographie mit dem Y2H System**

Methode	Affinitätsaufreinigung und Massenspektrometrie	Y2H System
<b>Vorteile</b>	auch indirekte PPI in Proteinkomplexen werden erkannt	auch schwache oder temporäre Interaktionen werden erkannt
<b>Nachteile</b>	nur stabile und langlebige Interaktionen werden identifiziert	nur binäre PPI werden identifiziert

## 4.2 Nachteile des Y2H Systems

Trotz einiger Einschränkungen findet die Y2H-Technologie breite Anwendung, was auf die enorme Effizienz dieser Methode zurückzuführen ist. Das System ermöglicht den Test einer großen Zahl von Protein-Protein Interaktionen innerhalb kurzer Zeit, und ist vergleichsweise kostengünstig, bringt jedoch zusätzlich falsch-positive und falsch-negative Interaktionen hervor. Falsch-positive Interaktionen können Auftreten wenn Proteine nur deshalb interagieren, weil sie im Y2H artifiziell in der gleichen Hefezelle koexprimiert werden, sie aber unter physiologischen Bedingungen nicht im gleichen Zellzyklus, Zellkompartiment oder im gleichen Zelltyp zusammen vorkommen, so dass eine Interaktion normalerweise nicht stattfinden kann. Die zweite Art der falsch-positiven Interaktionen wird durch hydrophobe Proteine, die klebrig (*sticky*) sind verursacht. Das Problem der falsch-positiven ist gering und kann durch Anwendung stringenter Selektionsmethoden und statistischer Verfahren reduziert werden. Das größere Problem ist die Sensitivität der Y2H-Technologie, i.e die falsch-negative Interaktionen. Es gibt einige Gründe für falsch negative Interaktionen im Y2H System: (i) Interaktionen benöti-

gen zusätzliche Bindungspartner, was häufig der Fall in Proteinkomplexen ist, (ii) falsche Faltung von Fusionsproteinen nach dem Fusionieren an die Aktivierungs- oder Bindedomäne (iii) posttranslationale Modifikationen, die für manche Interaktionen notwendig sind, in Hefe aber nicht vorkommen und (iiii) in einigen Proteinen vorkommenden transmembrane Domänen, die die PPI stören können. Die ersten 3 Punkte sind im Y2H-Verfahren nicht zu unterbinden, im Falle von Transmembrandomänen jedoch können die transmembranen Proteine zum Einen als Volllänge-Protein und zum Anderen separat als die intra- und extrazellulären Domänen exprimiert werden <sup>153</sup>. Zur Erhöhung der Sensitivität des Y2H-Screens werden verschiedene Methoden verwendet, welche im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

#### 4.2.1 Methoden zur Reduktion von falsch-negativen und falsch-positiven Interaktionen im Y2H System

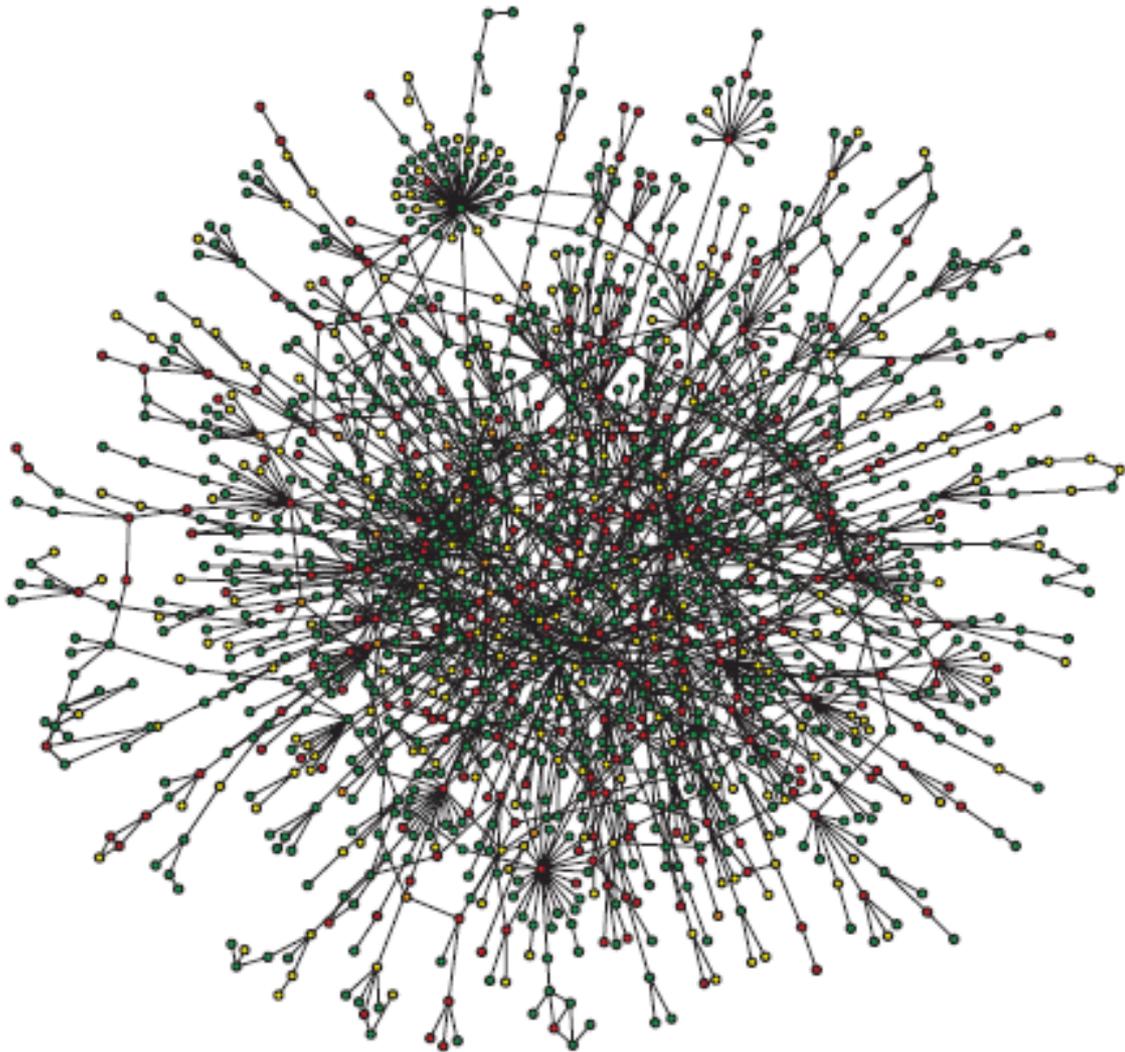
Obwohl die falsch-negativen Y2H-Interaktionen schwer zu verhindern sind, können falsch-positive Interaktionen besser kontrolliert und reduziert werden <sup>154-156</sup>. Eine Möglichkeit die falsch-negativen Interaktionen zu unterbinden ist, dass man Y2H-Vektoren verwendet, die die Gal4 DNA-Binde- und Aktivierungsdomänen nicht nur C-terminal kodieren, sondern auch N-terminal kodieren. Die Varicella-Zoster-Virus-Interaktomstudien haben gezeigt, dass die Permutationen von C- und N-terminalen Y2H-Vektoren die Anzahl von falsch-negativen Interaktionen signifikant reduzieren <sup>157</sup>. Diese Methode wurde in unserer Studie nicht angewendet. Eine andere Möglichkeit zur Vermeidung falsch-negativer Interaktionen ist, dass der gleiche Proteinsatz mehrmalig gegen unterschiedliche cDNA Genbanken gescreent wird. Dies erlaubt die Identifikation einer größeren Anzahl von Interaktionen, als ein Screen gegen nur eine cDNA Genbank. Zusätzlich tragen die Qualität und Komposition von cDNA Genbanken zum Erfolg und Ausbeute von Screening bei <sup>154</sup>. Aus diesem Grund benutzten wir im Y2H-Screen für Pathogen-Wirt Interaktionen vier humane cDNA Genbanken: (1) eine Lymphknoten cDNA Genbank, (2) eine Hoden cDNA Genbank, (3) eine Genbank aus ~5000 humanen Volllänge cDNA Klonen, und (4) Genbank aus 12.381 cDNA Klonen. Zur Erhöhung der Sensitivität, wurden sowohl für den intrapathogenen als auch für den Pathogen-Wirt Y2H-Screen die Transmembranproteine als Volllänge und separat als intra- und extrazelluläre Domänen getestet. Um die falsch-positiven Ergebnisse zu unterbinden, wurden in dieser Studie einige Maßnahmen und strenge statistische Kriterien verwendet. Zunächst wurden die *Bait* und *Prey* Plasmide vor dem Screen auf autoaktivierende Eigenschaften überprüft und die autoaktivierenden Proteine aus dem Screen ausgeschlossen. Durch die Verwendung von 3-AT wurden schwache Interaktionen unterdrückt und die promiskuitive *Preys* (mit mehr als 5 Interaktionspartnern) aus den Daten entfernt. Im *high confidence* Datensatz wurden nur die mehr als einmal vorkommenden Interaktionspaare aufgeführt. Im intrapathogenen Screen wurde eine Interaktion nur dann als positiv bewertet, wenn mindestens drei der jeweils vier ausplattierten Hefe-

kolonien ein deutliches Wachstum zeigten. Als erster bioinformatischer Ansatz für die Analyse von experimentellen Ergebnissen wurde eine *Text-Mining-Analyse* und eine Literaturrecherche durchgeführt, um die bekannten Interaktionen zwischen Yersinia pYV Plasmid Proteinen und zwischen pYV Plasmid und Wirtsproteinen zu identifizieren. Die publizierten Daten wurden dann mit den Y2H Daten verglichen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Y2H-Analyse zwischen 65 *Y. enterocolitica* Proteinen lieferte insgesamt 225 Interaktionen. Ein Vergleich mit der Literatur ergab, dass 26 von 80 bereits publizierten TTSS-Interaktionen im Y2H-Screen wiedergefunden wurden, was einer Wiederfindungsrate von 32,5% entspricht. Dies deckt mit Sicherheit nicht alle physiologisch vorkommenden Interaktionen ab, hat aber im Vergleich mit anderen Methoden (Y2H-Screen<sup>133</sup> 2,3%-8,4%, Affinitätsaufreinigung+MS<sup>151, 158</sup> ca. 10%) eine dreifach höhere Wiederfindungsrate und spricht für die Qualität dieses Y2H-Screens. Die *Text-Mining-Analyse* für Yersinia-Wirt-Interaktionen zeigte auch, dass in den Abstracts der Publikationen von *Y. enterocolitica* überzufällig viele Proteine genannt wurden, die sowohl in *high confidence* als auch im kompletten Datenset wiederzufinden waren und dass eine ganze Reihe von PPI schon in vorherigen Studien mit Yersinia-Infektion assoziiert worden waren. Im Falle von *high confidence* Daten war die Wiederfindungsrate 12/158=7,6%, und im kompletten Datenset waren es 36/597=6% der aus der Literatur bekannten Interaktionen, die im Y2H wiedergefunden werden konnten. Die geringe Wiederfindungsrate ist ein charakteristisches Phänomen von genomweiten *High-throughput* Studien. Die Mehrzahl publizierter Interaktionen kann weder mittels Y2H-Analyse<sup>133</sup> noch Affinitätsreinigung und anschließender Massenspektrometrie identifiziert werden<sup>151,158</sup>.

### 4.3 Struktur von intrapathogenen- und Pathogen-Wirt Interaktionsnetzwerken

Durch die bioinformatische Auswertung und die graphische Darstellung der Y2H Datensätze in Form von Interaktionsnetzwerken ist es möglich, charakteristische Eigenschaften und strukturelle Unterschiede zu erkennen. Hierzu dienen verschiedene Parameter wie Netzwerktopologie, Gradverteilung, Clustering Koeffizient, Anfälligkeit von Netzwerken und Grad und *betweenness* Zentralität. Zum Beispiel besitzen zelluläre und virale Protein-Protein Interaktionsnetzwerke unterschiedliche Netzwerkparameter und Topologien. Die zellulären Netzwerke setzen sich aus einzelnen stark vernetzten Submodulen zusammen, die viralen Netzwerke hingegen zeigen keine solche Untergliederung<sup>135, 159</sup>. Mittels Anwendung weiterer bioinformatischer Methoden wurden in unserer Studie aus den im Y2H-Screen gewonnenen Daten die Protein-Protein Interaktionsnetzwerke erstellt, kombiniert, und die o.g. Netzwerkparameter bestimmt. Bei der Herstellung und Charakterisierung des Pathogen-Wirt Interaktionsnetzwerks von *Y. enterocolitica* konnte beobachtet werden, dass die sezernierten Proteine überzufällig häufig Interaktionen mit zellulären Proteinen zeigen, und dass die Proteine des TTSS vor-

zugsweise miteinander interagieren. Durch die Bestimmung von Grad und *betweenness* Zentralität wurde gezeigt, dass *Y. enterocolitica* eng vernetzte und zentrale Proteine im zellulären PPI-Netzwerk angreift. Dieses Phänomen wurde auch bei Epstein-Barr Virus beobachtet<sup>160</sup>. Weiterhin wurde mittels funktioneller Auswertung gezeigt, dass die sezernierten Yersinia Proteine bevorzugt mit Wirtsproteinen interagieren, die an der Regulation der Transkription, Signaltransduktion, der Organisation des Aktinzytoskeletts und posttranslationalen Modifikationen funktionell beteiligt sind. Zusätzlich wurde aus unseren PPI-Daten ersichtlich, dass in der Regel jeweils mehrere Yersinia Proteine denselben Signalweg angreifen. Im intrapathogenen PPI-Netzwerk wurde die charakteristische Pfadlänge nach zufälliger Eliminierung von einzelnen Proteinen bestimmt und mit zwei humanen Netzwerken verglichen<sup>133, 134</sup>. Diese Simulation zeigte, dass das *Y. enterocolitica* Interaktom, wie auch virale Interaktome eine gegenüber humanen Netzwerken erhöhte Robustheit und Angriffstoleranz besitzt und weniger anfällig auf die Eliminierung bestimmter Proteine reagiert<sup>161</sup>. Die Netzwerkparameter können auch zur Aufdeckung von evolutionär konservierten Mechanismen benutzt werden. Mit Hilfe der Netzwerkdaten von fünf verschiedenen Herpesviren wurde ein Stammbaum erstellt, der die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den einzelnen Herpesvirus Spezies bestätigte<sup>129, 159</sup>. Die Netzwerkstudien können weitere Anwendung in der Medizin finden. Anhand der Netzwerke können wichtige Angriffsstellen für antibakterielle Therapien identifiziert werden. Die identifizierten Interaktionsknotenpunkte, sogenannte Hubs, sind häufig Expressionsprodukte essentieller Gene. Man könnte die wichtigen Interaktionen mit Hilfe von Antikörpern, Peptiden oder anderen Molekülen unterbinden, oder die Proteinexpression durch siRNA herunterregulieren<sup>162</sup>. Als Beispiel zeigt die Abbildung 28 ein zelluläres PPI-Netzwerk von *S. cerevisiae*. Die Interaktionsknotenpunkte im Netzwerk von *S. cerevisiae* wurden gezielt deletiert und anschließend die entstandenen Phänotypen beobachtet. Die Eliminierung von Hubs war letal bei *S. cerevisiae*, während die Deletion von schwach vernetzten Knoten zum verlangsamten Wachstum führte<sup>120, 134</sup>.



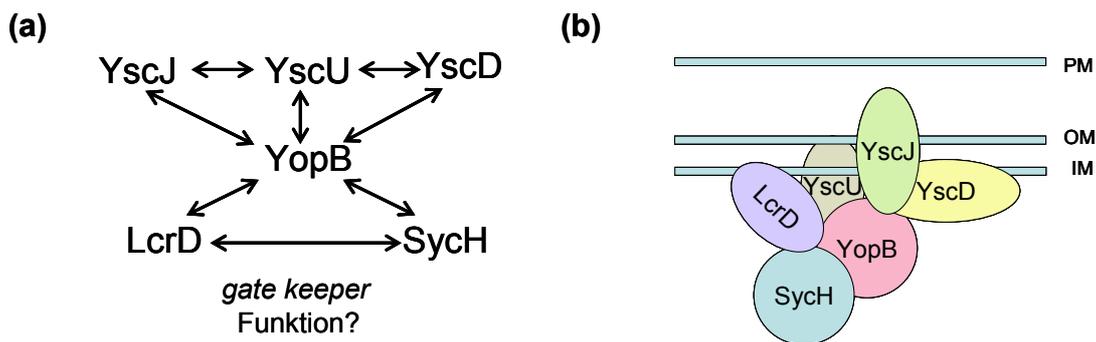
**Abbildung 28: Proteininteraktionen bei *S. cerevisiae*.** Proteine werden durch Kreise (Knoten), Interaktionen durch Verbindungslinien (Kanten) symbolisiert. Die Farbe der Knoten gibt den beobachteten Phänotyp nach Deletion des jeweiligen Proteins an. Die Eliminierung roter Knoten ist letal für die Hefe, der grünen Knoten dagegen nicht. Die Deletion orangefarbener Knoten führt zu verlangsamttem Wachstum der Hefen, der Ausfalleffekt der gelb dargestellten Proteine ist unbekannt<sup>120, 134</sup> (Die Abbildung wurde aus Jeong et.al. übernommen).

Da im Pathogen-Wirt Screen YopM eine Vielzahl von Interaktionen mit Wirtsproteinen hatte, kann es als Hub im Pathogen-Wirts-Netzwerk betrachtet werden. Durch das gezielte Ausschalten von YopM verliert *Y. enterocolitica* an Virulenz: Die YopM Deletionsmutante ist in Ihrer Virulenz stark attenuiert und nicht fähig, Leber und Milz von Mäusen zu besiedeln<sup>75</sup>. Weitere bioinformatische Analysen könnten zeigen, ob die Eliminierung von YopM ausreicht, damit sich die Pfadlänge im Pathogen-Wirt-PPI-Netzwerk verändert. Auch das Effektorprotein YopO ist sowohl im Pathogen-Wirt als auch im intrapathogenen Netzwerk ein Hub. YopO greift das Zytoskelett der Wirtszelle an und führt zur Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts. YopO verhindert Modifikationen des Zytoskeletts der Hefe und wirkt dadurch zytotoxisch<sup>163</sup>. Nichtsdestotrotz ist eine *Yersinia* YopO Deletionsmutante aber weiterhin im Mausmodell letal

<sup>75</sup>. Dies kann jedoch dadurch erklärt werden, dass 2 weitere Effektorproteine, YopT und YopE das Aktinzytoskelett der Wirtszelle angreifen und dadurch die Funktion von YopO komplementieren. Die anhand der Netzwerke ermittelten Daten können also helfen, Angriffsstellen für eine Therapie gegen *Y. enterocolitica* zu identifizieren.

### 4.3.1 Erkenntnisse aus der Interpretation von Yersinia-Interaktionsdaten

Im intrapathogenen Y2H-Screen wurden insgesamt 54 neue PPI von TTSS-Proteinen identifiziert. Die im Y2H-Screen gewonnene Daten, tragen dazu bei, die Struktur und den Aufbau des Yersinia TTSS besser zu verstehen, da die Bildung des Yersinia TTSS ein noch nicht vollständig untersuchter Prozess ist. Beispielsweise zeigen die intrapathogenen Y2H Daten, dass YopB, welches zusammen mit YopD und LcrV eine Translokationspore bildet <sup>23</sup>, mit dem Chaperon SycH, dem Protein der inneren Membran LcrD und den TTSS-Proteinen YscD, YscJ und YscU interagiert. Die C-terminale Domäne von LcrD bindet seinerseits an SycH, auch YscJ interagiert mit YscU, sowie YscU mit YscD (Abb.29a). Das TTSS Protein YscD bildet zusammen mit YscJ einen Ring in der inneren Membran des TTSS<sup>164</sup> (Abb.29b). Möglicherweise interagieren alle diese Proteine während der Bildung des TTSS miteinander. Eine weitere Hypothese die aufgrund dieser Daten aufgestellt werden könnte, ist, dass der SycH-LcrD Proteinkomplex in Yersinien eine *gate keeper* Funktion besitzt und darüber entscheidet, welche Proteine zum Aufbau von TTSS benutzt und ins extrazelluläre Medium sezerniert werden. Im intrapathogenen Y2H-Screen zeigte das hypothetische Protein ORF73 Interaktionen sowohl mit Volllänge YadA als auch mit dem N-terminalen und C-terminalen Bereichen von YadA. Auf dem pYV Plasmid sind die Chaperone der Effektorproteine in unmittelbarer Nähe zu den Effektorproteinen lokalisiert. Auch die kodierende Sequenz von ORF73 liegt in der Nähe von YadA. Man könnte deshalb die Hypothese aufstellen, dass ORF73 ein Chaperon von YadA ist. Die funktionelle Bedeutung dieser und anderen neuen Yersinia pYV Interaktionen können also in weiteren Assays näher untersucht werden.

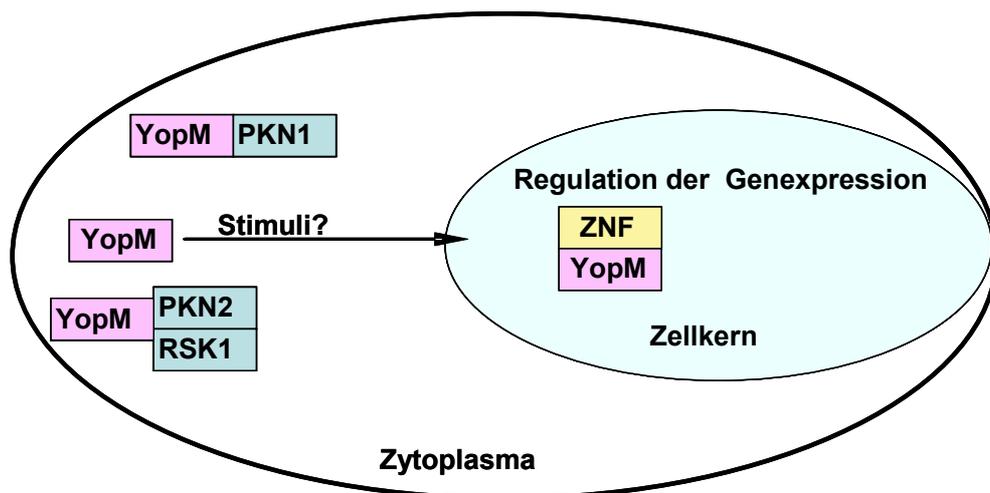


**Abbildung 29: Abgeleitete Hypothesen zur Struktur und Aufbau des Yersinia TTSS.** (a) Interaktionen der TTSS Proteine miteinander im intrapathogenen Y2H-Screen. (b) Das Modell der Interaktionen der TTSS Proteine miteinander bei der Bildung von TTSS. Das Modell basiert auf in Y2H gefundenen und durch Affinitätsreinigung detektierten Daten <sup>164</sup>

#### 4.4 Auf der Suche nach der Funktion von YopM

Das Yersinia Effektorprotein YopM spielt eine Schlüsselrolle in der Virulenz von *Y. enterocolitica* im Maus Infektionsmodell <sup>75</sup>. Die Funktion dieses Proteins ist jedoch bis heute noch nicht bekannt. Während YopM eine Funktion bei der Regulation von Zellzyklus- und Wachstums-Genen zugeschrieben wurde <sup>165</sup>, konnten andere Studien keine von YopM regulierten Gene identifizieren <sup>84</sup>. Die in dieser Arbeit im intrapathogenen Y2H-Screen gewonnenen Y2H Daten zeigen, dass YopM mit einem Replikationsinitiationsprotein RepA und einem Translokationsprotein YopB interagiert. Der Y2H-Screen für Pathogen-Wirt Interaktionen zeigte dagegen, dass YopM eine Vielzahl von Interaktionen mit unterschiedlichen Wirtsproteinen aufweist, die hauptsächlich an der Transkriptionsregulation beteiligt sind. So wurden als YopM Interaktionspartner 19 Zinkfinger-Proteine identifiziert, die eine für klassische Transkriptionsfaktoren charakteristische C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Domäne aufweisen. Zwei der Interaktionen, nämlich die mit ZNF238 und ZNF7, wurden in LUMIER Bindungsassay validiert und konnten damit bestätigt werden. Trotz der Abwesenheit einer klassischen Nuklearen-Lokalisations Signals (NLS) migriert YopM in den Zellkern von HeLa, HEK 293T und *S.cerevisiae* Zellen <sup>77, 78, 79</sup>. Die Funktion von YopM im Zellkern ist nicht bekannt, die Transkriptomanalysen <sup>165</sup>, und die Ergebnisse des Pathogen-Wirt Y2H-Screens weisen jedoch auf seine Rolle bei der Regulation der Genexpression hin. Weiterhin zeigten die Y2H- und LUMIER-Ergebnisse, dass YopM eine direkte Interaktion mit PKN1, dem homologen Protein von PKN2, eingeht. YopM bildet mit PKN2 und mit RSK1 einen Komplex aus <sup>80, 81</sup>. Dieses Yersinia Effektorprotein besteht hauptsächlich aus LRRs (*leucine rich repeats*) und weist dadurch die Ähnlichkeit zum Salmonella Effektorprotein SspH1 auf, welches ebenfalls LRRs enthält. Auch SspH1 interagiert mit PKN1 und inhibiert die NF-κB abhängige Genexpression <sup>141, 142</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die YopM-PKN1 Interaktion mittels indirekter Immunfluoreszenz näher untersucht. Sie zeigten eine Lokalisation

von YopM sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma von HeLa Zellen. Das PKN1 Fusionsprotein war dagegen nur im Zytoplasma von HeLa Zellen lokalisiert. Bei Koexpression beider Proteine waren jedoch sowohl YopM als auch PKN1 ausschließlich im Zytoplasma zu sehen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Anwesenheit von PKN1 die Nukleäre-Lokalisation von YopM unterbindet, durch Bindung an YopM. Anschließend wurde die Bindedomäne von YopM an PKN1 bestimmt. Das Effektorprotein YopM von *Y. pestis* besteht aus einem N-terminalen Sekretionssignal, dem die  $\alpha$ -Helices folgen. Die  $\alpha$ -Helices wirken bei der Faltung von LRRs mit <sup>74</sup> Der C-Terminus von YopM enthält ein 32 Aminosäuren langes konserviertes Teilstück. Das Protein enthält mehr als eine Kernlokalisationssequenz, da sowohl die N-terminale-Hälfte, nämlich die ersten 3 LRR-s (LRR1-LRR3), als auch die C-terminale-Hälfte von YopM in den Zellkern von *S. cerevisiae* und HEK 293T-Zellen migrieren <sup>77, 79</sup>. Die C-terminale Domäne von YopM ist sowohl für die Kernlokalisierung als auch für die Bindung an RSK1 notwendig. Die LRR3-LRR15 sind jedoch an die Bindung mit PKN2 beteiligt. <sup>166</sup>. Die Deletion dieser Domänen hebt die Virulenz von *Y. pseudotuberculosis* auf <sup>167</sup>. Unsere Immunfluoreszenz-Studien zeigten, dass verschiedene Bereiche von YopM, nämlich der N-terminale Bereich und die ersten drei LRRs (aa1-170) von YopM, sowie LRR 4-19 (aa 171-494) und das Protein mit N-terminaler Deletion (aa 100-525) mit PKN1 im Zytoplasma kolokalisierten. In den letzten beiden Fällen konnte die partielle Kern-Lokalisation von diesen Proteindomänen beobachtet werden. YopM, das die letzten C-terminalen 32 Aminosäuren deletiert hat, migriert in den Zellkern von HeLa Zellen und zeigt keine Kolokalisation mit PKN1 im Zytoplasma. Möglicherweise sind die letzten C-terminalen 32 Aminosäuren für die Bindung von YopM an PKN1 und dessen zytoplasmatische Lokalisation notwendig. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass durch die Deletion der letzten C-terminalen 32 Aminosäuren die tertiäre Struktur von YopM verändert wird. Die tertiäre Struktur von YopM wurde vor einigen Jahren aufgeklärt. Es besitzt eine Hufeisen-ähnliche Form, und im Inneren dieses Hufeisens liegt die Bindungsstelle für eukaryotische Proteine <sup>168 169</sup>. Möglicherweise verändert die C-terminale Deletion die tertiäre Struktur von YopM, was zur Verhinderung der YopM-PKN1-Interaktion führt. Zusätzlich wurde in unserer Studie festgestellt, dass die Kinasedomäne von PKN1 keinen Einfluss auf die Lokalisation von YopM hat. Die Konsequenzen der YopM-PKN1 Interaktion sind noch nicht bekannt und benötigen weitere Untersuchungen. Die Ergebnisse des Y2H-Screens und der IF-Analyse deuten jedoch auf eine mögliche Rolle von YopM im Zytoplasma durch die Interaktion mit PKN1 (Abb.30) hin.



**Abbildung 30: Mögliche Funktionen von YopM im Zytoplasma und im Zellkern von Wirtszellen.** YopM interagiert sowohl mit PKN1, PKN2 und RSK1 im Zytoplasma als auch mit Zinkfinger-Proteinen, die möglicherweise eine Rolle in der Regulation der Genexpression haben.

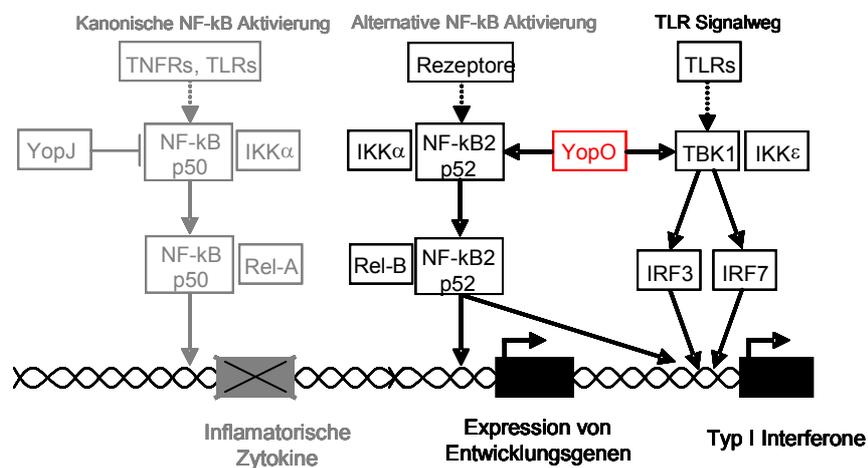
Um die Konsequenzen der YopM-PKN1 Interaktion näher zu untersuchen könnte man PKN1 in HeLa Zellen überexprimieren und die Zellen anschließend mit einer *Y enterocolitica* YopM Monosekretionsmutante infizieren, um die Lokalisation von YopM zu untersuchen. Anschließend könnte man durch Depletion von PKN1 mittels siRNA, untersuchen, ob sich die Lokalisation von YopM verändert.

#### 4.5 Die Rolle von YopO bei der Induktion von Typ 1 Interferonen

Das Yersinia Effektorprotein YopO verursacht eine Depolymerisation des Aktinzytoskeletts und dadurch die Inhibition der Phagozytose in Makrophagen und spielt deshalb für die Virulenz eine wichtige Rolle<sup>44, 58</sup>. Im N-terminalen Bereich enthält YopO eine autophosphorylierende Serin-Threonin Domäne. Im C-Terminus von YopO befindet sich eine Region, mit Homologie zu einer Rac-Bindedomäne die die Bindung an Rac und Rho vermittelt. Die Rac-Bindedomäne imitiert in Wirtszellen eine GDI Aktivität Rho-GTPasen, und inhibiert dadurch den Nucleotidaustausch in Rac1 und RhoA<sup>146</sup>. Für die Aktivierung der YopO Kinase *in vitro* ist die Bindung des G-Aktins an die Aktin-Bindedomäne von YopO erforderlich<sup>45</sup>. Im Y2H-Screen gegen cDNA Genbanken wurden einige schon bekannte Interaktionen von YopO, einschließlich der kleinen GTPasen RhoA, RhoC, Rac1 und Rac2, wiedergefunden. Interessanterweise wurde auch TBK1, der zentrale Regulator des Typ 1 Interferon-Signalweges und NF- $\kappa$ B als YopO-Interaktionspartner identifiziert. NF- $\kappa$ B ist ein induzierbarer inflammatorischer Transkriptionsfaktor und für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes von großer Bedeutung<sup>104, 105</sup>. Mittels einer Y2H-Analyse und mittels LUMIER Bindungsassays wurde gezeigt, dass für die Interaktion mit TBK1 die Aktin-Bindedomäne von

YopO ausreichend war. Kinasedomäne zeigte dagegen keine Interaktion mit TBK1. Als nächstes wurde mit Hilfe eines Reporterassays gezeigt, dass die Koexpression von YopO und TBK1 in HEK 293 Zellen zu einer stark synergistischen Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors führt. Die IFN- $\beta$ -Aktivierung verschwand, wenn ein nicht interagierendes Fragment von YopO, nämlich die Kinasedomäne, mit TBK1 koexprimiert war, und war stark attenuiert, wenn nur die Bindedomäne an TBK1, nämlich die Aktin-Bindedomäne, mit TBK1 koexprimiert wurde. Die Kinaseaktivität von YopO und damit vermutlich auch die Phosphorylierung von TBK1 scheinen essentiell für die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors zu sein, da die Kinaseausfallmutante von YopO den IFN- $\beta$ -Promotor nicht aktivieren konnte. Auch die Rac1-Bindeaktivität trägt zu der vollen IFN- $\beta$ -Aktivierung bei. Der Effekt der IFN- $\beta$ -Aktivierung durch die Rac-Bindungsmutante war im Dual-Luziferase Assay deutlich schwächer als beim Wildtyp YopO (Abb. 23b). Diese Ergebnisse zeigen, dass die effektive Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors das Zusammenwirken der einzelnen Domänen von YopO erfordert. Weiterhin wurde in unserer Studie gezeigt, dass keines der anderen Yersinia Effektorproteine in der Lage war, im Zusammenspiel mit TBK1, den IFN- $\beta$ -Promotor annähernd so stark zu aktivieren wie YopO. Die IFN- $\beta$ -Aktivierung durch YopO konnte auch in murinen J774 Makrophagen mit unterschiedlichen Yersinia-Stämmen mittels RT-PCR nachgewiesen werden. TBK1 gehört zur IKK-Kinase Familie und ist auch bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt<sup>115</sup>. Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Promotors durch YopO-TBK1 war jedoch deutlich schwächer. Auch in diesem Fall konnte gezeigt werden, dass für die volle Aktivierung des NF- $\kappa$ B Promotors die einzelnen Domänen von YopO notwendig sind. Im Unterschied zum IFN- $\beta$  konnte der NF- $\kappa$ B-Promotor auch durch andere Effektorproteine wie YopH, YopP und YopT im Zusammenspiel mit TBK1 aktiviert werden (Abb. 24b). Interessanterweise war die YopO Monosekretionsmutante bei der Infektion von HEK 293 Zellen, ohne TBK1, für die starke Aktivierung des NF- $\kappa$ B Promotors ausreichend. Da YopO im Y2H-Screen direkt mit NF- $\kappa$ B2 interagiert, ist es vermutlich direkt an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B Promotors beteiligt. Die Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch YopO, erscheint auf dem ersten Blick kontraintuitiv. Es wurde aber gezeigt, dass bei Infektion mit *Listeria (L.) monocytogenes* die Induktion von IFN- $\beta$  einen nachteiligen Effekt auf die Wirtszelle hat<sup>170</sup>. In Tiermodellen sind  $\alpha/\beta$ -Interferone in der Lage, Rezeptoren für Typ II Interferone (IFN $\gamma$ R) herunterzuregulieren und dadurch die Makrophagenaktivierung während einer *L. monocytogenes*-Infektion zu beeinträchtigen. Die Mäuse, denen die IFN $\gamma$ R-Expression fehlt, zeigen dagegen eine höhere Expressionsrate von IFN $\gamma$ R und eine erhöhte Resistenz für die *L. monocytogenes*-Infektion<sup>171,172, 173</sup>. Andere Studien zeigen, dass die Typ I Interferonantwort während einer *L. monocytogenes*-Infektion, unabhängig vom TLR4- und TLR2-Signalweg, mittels Aktivierung von IRF3 durch einen TBK1-abhängigen Mechanismus hervorgerufen wird. Dafür sprechen die Hinweise, dass die Induktion von Typ I Interferonen durch *L. monocytogenes* im Vergleich zum gramnegativen *E. coli* verzögert ist<sup>174</sup>. Bei der Infektion mit *Y. enterocolitica* kommt es aber zur Aktivierung von TLR2 und TLR4 Signalkaskaden<sup>175</sup>. Das LPS auf der Oberfläche von *Y. entero-*

*colitica* interagiert mit TLR4<sup>176</sup> und LcrV mit TLR2<sup>177, 178</sup>. Auch der gram-positive Tuberculose-Erreger *Mycobacterium (M.) tuberculosis* verursacht eine Induktion von Typ I Interferonen. Wie bei *L. monocytogenes* infiziert *M. tuberculosis* Makrophagen und persistiert in diesen Zellen. Die Infektion von unterschiedlichen Zelltypen mit *M. tuberculosis* führt zu einer Aktivierung von NF-κB und IRF3 und zur Induktion von IFN-β und IFN-α. Mäuse, deren Typ I IFNR fehlt, können einer *M. tuberculosis* Infektion besser widerstehen. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Produktion von diesem Zytokin nachteilig für die Zelle sein kann<sup>179</sup>. Die Induktion von Typ I Interferonen durch *M. tuberculosis* erfolgt nach einem TBK1 abhängigem Mechanismus und zeigt dadurch die Ähnlichkeit in Signalwegen, welche durch *L. monocytogenes* für die Induktion von IFN-β benutzt werden. In dieser Arbeit wurde mittels Y2H-Screens, LUMIER Bindungssassay, Reportergergen Assays, und die Infektionsversuche von HEK 293 und J774 Zellen mit verschiedenen Yersinia Mutanten gezeigt, dass *Y. enterocolitica* außer dem durch LPS-vermittelten auch den TBK1-abhängigen Mechanismus für die Aktivierung von IFN-β nutzt. Die Infektion von Makrophagen aus Wildtyp und TRIF-Knockout Mäusen mit *Y. enterocolitica* Mutanten können weitere Erkenntnisse darüber liefern. Anschließend könnte man die IFNAR-knockout Mäuse mit unterschiedlichen Yersinia-Stämmen infizieren und die physiologische Bedeutung der IFN-β-Aktivierung durch die Yersinien *in vivo* genauer untersuchen. Im Moment ist der *in vivo* Effekt der YopO-induzierten IFN-β Expression nicht bekannt, aber es wird die Hypothese aufgestellt, dass die Induktion von IFN-β eine ähnliche Rolle hat wie bei der Infektion mit der *L. monocytogenes* und *M. tuberculosis*.



**Abbildung 31: Die Wirkung von YopO auf die Wirtszelle.** YopO interagiert sowohl mit TBK1 als auch mit NF-κB2, was zur Induktion von Typ I Interferonen führt ohne gleichzeitig erhöhte Expression von inflammatorischen Zytokinen.

## 4.6 Auf der Suche nach weiteren Effektorproteinen von *Y. enterocolitica*

Das pYV Plasmid von *Y. enterocolitica* kodiert für 6 bekannte Effektorproteine: YopO, YopM, YopE, YopH, YopT und YopP, welche durch das TTSS in die Wirtszelle gelangen und deren Immunfunktion modulieren. Die ersten 15 Aminosäuren dieser Effektorproteinen sind für die Sekretion der fusionierten Reporterproteinen durch das TTSS wichtig<sup>180-182</sup>. Die anderen *Y. enterocolitica* Proteine wie YopN, YopQ, und YscM2 werden von *Yersinia* ins extrazelluläre Medium sezerniert<sup>183</sup>. YopN ist ein Regulatorprotein des TTSS, welches am N-terminalen Ende zwölf Aminosäuren besitzt, die als Sekretionssignal fungieren<sup>184</sup>. YopQ trägt ein minimales Sekretionssignal innerhalb der ersten 10 Kodons<sup>185, 186</sup>, und reguliert die Translokation von Effektorproteinen vom Wirtszellinneren in *Y. pestis*<sup>187, 188</sup>. Weiterhin wurde gezeigt, dass sowohl YopH als auch YscM1 sowie YscM2 in das Zytoplasma von HeLa Zellen gelangen und dass dafür SycH Chaperon benötigt wird<sup>189</sup>. Möglicherweise besitzt *Y. enterocolitica* mehr sezernierte und Effektorproteine als bisher bekannt sind. In der Tat sind die Funktionen einiger putativer Proteine des pYV Virulenzplasmides, die von Orf73, Orf55, Orf80, Orf77, Orf186, Orf88, Orf75, Orf76, Orf134 und Orf92 kodiert werden bisher unbekannt. Interessanterweise haben die 6 *Yersinia* Proteine Orf73, Orf155, YscO, YscE, LcrD und YscY im Pathogen-Wirt Y2H-Screen zahlreiche Interaktionen mit Wirtsproteinen gezeigt. Die Tab.15 zeigt einige interessante Interaktoren dieser Proteine.

**Tabelle 15: Proteininteraktionen von Orf73, Orf155, LcrD, YscY, YscE und YscO**

Yersinia Protein	Zellulärer Interaktionspartner	Funktion
ORF73	PTGDS	Katalysiert die Umwandlung von Prostaglandin H2 (PGH2) in Prostaglandin D2 (PGD2). PGD2 ist ein Neuromodulator und auch ein tropischer Faktor im zentralen Nervensystem und beeinflusst die Kontraktion von glatter Muskulatur.
ORF73	MARCO	Ist ein <i>scavenger receptor</i> auf der Makrophagenoberfläche. Bindet an gram-negative und gram-positive Bakterien mit extrazellulären C-terminalen Domäne.
ORF155	SMARCC2	Stellt einen Teil von großem ATP-abhängigen <i>chromatin remodeling complex</i> SNF/SW1 dar und enthält für die Transkriptionsfaktore charakteristisches <i>leucine zipper motif</i> .
ORF155	MAT2B	MAT katalysiert die Synthese von S-Adenosylmethionin von Methionin und ATP.
LcrD	SNW1	Codiert einen Co-aktivator, welches die Transkription einiger Pol II Promotoren verstärkt.
LcrD	ILK	Interagiert mit $\beta$ -1-Integrin. Die Transduktion von extrazellulären Matrixsignalen durch die Integrine beeinflusst intra- und extrazelluläre Funktionen.

YscY	SSFA2	Ist ein zytoskelett-assoziiertes Protein, und ist an der strukturellen Identität der Zelle und der Signaltransduktion beteiligt. Das Protein ist in der Membran lokalisiert, hat eine extrazelluläre Region, und könnte in der Regulation von filamentösem Aktin und dem <i>signaling</i> von der Außenseite der Zelle involviert sein.
YscE	IGFBP3	Bildet einen ternären Komplex mit IGFALS ( <i>insulin-like-growth factor acid labile subunit 1</i> ) und IGF ( <i>insulin growth factor I or II</i> ), zirkuliert in dieser Form im Plasma und verlängert die Lebensdauer von IGF. Zusätzlich verändert das IGFBP3 die Interaktionen von IGFALS und IGF mit den Zelloberflächenrezeptoren.
YscO	PIAS1	Proteininhibitor von aktiviertem STAT1. Enthält putativen <i>Zink-binding motif</i> und eine hochsaure Region. Inhibiert STAT1-vermittelte Genaktivierung und die DNA Bindeaktivität
YscO	SPZ1	Spermatogenes <i>leucine-zipper</i> Protein

Die Interaktionen SPZ1-YscO, CCD121-YscO, MARCO-ORF73, MAT2B-ORF155 wurden in LUMIER Bindungsassay validiert und alle außer MAT2B-ORF155 konnten bestätigt werden. Die Konsequenzen dieser Interaktionen sind noch nicht bekannt und benötigen weitere Untersuchungen. Der am häufigsten im Y2H-Screen gefundene Interaktor von LcrD ist SNW1, ein SKIP-Protein, der auch an Salmonella-Effektor SifA bindet und eine endosomale Turbulierung induziert <sup>190</sup>. Die N-terminale Hälfte von LcrD hat 7 Transmembrandomänen. In der C-terminalen Hälfte gibt es ein Peptidmotiv mit einer Länge von 23 aa, welches zwischen SNW1 und LcrD konserviert ist. In diesem Fall könnte man überprüfen, ob LcrD gespalten, die C-terminale-Hälfte des Proteins in das extrazelluläre Medium sezerniert oder in die Wirtszelle injiziert wird und dort wie im Falle von SifA einen Effekt auf die Wirtszelle ausübt. Leider war es in Rahmen dieser Doktorarbeit nicht möglich, LcrD zu exprimieren. Die in Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sekretionsexperimente haben gezeigt, dass ORF155, ORF 73, YscY und auch YscO von *Y. enterocolitica* in das extrazelluläre Medium sezerniert werden. Im Vergleich zu den anderen Proteinen wird YscO in relativ größerer Menge sezerniert. YscO wurde auch in *Y. pestis* als ein mobiles Element identifiziert, welches sowohl im extrazellulären Medium als auch in der Membranfraktion gefunden wurde <sup>191</sup>. Die Expressionssignale von ORF155 und ORF73 waren jedoch schwächer als von YscO. Die fünf Kandidaten, ausgenommen LcrD (78kDa) sind zwischen 6 und 16 kDa groß, deshalb könnte das schwache Expressionssignal von diesen Proteinen an der geringen Größe der Proteine liegen. Es könnte sein, dass diese Proteine aufgrund ihrer geringen Größe nicht an die Nitrozellulose Membran binden und somit im Blot nicht detektierbar sind. Die Detektion der sezernierten Proteine erfolgte mittels Anti-HA Antikörper. Ein Nachteil des Taggings könnte sein, dass dadurch die Struktur des Proteins beeinflusst, oder die Sekretion gestört wird. Dies war jedoch notwendig da keine spezifischen Antikörper gegen diese Proteine existieren. Für die sezernierten Protei-

ne YscO, ORF155, und ORF73 könnte man untersuchen, ob diese Proteine in die Wirtszelle injiziert werden, oder ihre Funktion durch Bindung an die Zelloberfläche der Wirtszelle ausüben. Der Interaktionspartner von ORF3, MARCO ist ein *scavenger* Rezeptor auf der Makrophagenoberfläche und die ORF73-MARCO-Interaktion könnte extrazellulär an der Zelloberfläche stattfinden.

## 4.7 Perspektiven

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels einer umfassenden Analyse von PPI zwischen den Proteinen des pYV Virulenzplasmids von *Y. enterocolitica* und der Wirtszelle das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen bakteriellen und zellulären Komponenten zu verstehen. Wie anhand der Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eröffnet die Verwendung von Hochdurchsatztechnologien (wie zum Beispiel des Y2H Systems) und die Integration von experimentellen und bioinformatischen Methoden tatsächlich die Möglichkeit, ein globaleres Verständnis des Wechselspiels zwischen bakteriellen Erregern und ihrem Wirt zu bekommen. Dieser Ansatz ist insbesondere durch die Identifikation von neuen, potentiellen Angriffsziele für die antibakterielle Therapie auch von medizinischer Bedeutung. Aufgrund der Identifikation einer Vielzahl von neuen und bisher nicht bekannten Proteininteraktionen wurde mit der vorliegenden Arbeit eine solide Grundlage für eine Vielzahl weiterer Projekte und Hypothesen geschaffen. Um valide, mehrdimensionale Modelle von infizierten Zellen oder Organismen zu bekommen, müssen in der Zukunft aber noch weitere Strategien entwickelt werden, damit die Datensätze unterschiedlicher experimenteller Methoden wie Y2H Screens, Strukturanalysen, funktionellen RNAi Screens, Genexpressions- und Proteomanalysen, Protein-Lokalisationsstudien und genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) integriert werden können.

## 5 Anhang

Tabelle 1: Interaktionen zwischen *Yersinia enterocolitica* pyV-Proteinen

Baitprotein	Preyprotein	Anzahl der Interaktionen des Preyproteins
yadA 232-ende	repC	25
yadA 232-ende	yscL	12
yadA 232-ende	orf 73	17
yadA 232-ende	yopN	4
yscR 74-ende	repC	25
yscR 74-ende	yadA(aa1-207)	16
yscR 74-ende	orf 73	17
yopB(aa1-165)	yscJ(aa1-207)	24
yopB(aa1-165)	yopD	4
yopB(aa1-165)	syc D	3
spyA	yopE(aa1-140)	1
spyA	orf 81	1
yscQ	yscJ(aa1-207)	24
yscQ	yscL	12
yscQ	yopD	4
yscQ	ysc K	6
yscO	repC	25
yscO	yscJ(aa1-207)	24
yscO	yadA(aa1-207)	16
yscO	orf 73	17
yscO	yscI	9
yscO	ysc K	6
yscO	yadA (aa232-ende)	9
yscO	Orf 78	2
yscO	tn63	22
yopQ	yadA(aa1-207)	16
yscJ	yscJ	6
sycN	yscB	1
sycN	repC	25
sycN	repA	9
sycN	yscJ(aa1-207)	24
sycN	Ysc X	10
sycN	yadA(aa1-207)	16
sycN	Orf88	6
sycN	tn 65	6
sycN	yscL	12
sycN	yscO	2
sycN	tn 65	6
sycN	ysc K	6
sycN	tn63	22
orf 80	yscY	3
orf 80	repC	25
orf 80	yscJ(aa1-207)	24
orf 80	orf 80	5
orf 80	orf 75	1
orf 80	orf 73	17
orf 80	tn63	22
yop H	repC	25
yop H	Syc H	4
yop H	orf 73	17
yop H	yadA(aa232-ende)	9
ysc D	yscJ	6
ysc D	yscU	7
ysc D	yadA(aa1-207)	16
ysc D	yopD	4
ysc D	yadA(aa232-ende)	9
ysc D	yscR	3
ysc D	ylp A	7
ysc D	tye A	6
orf 73	repC	25

Baitprotein	Preyprotein	Anzahl der Interaktionen des Preyproteins
orf 73	yscJ(aa1-207)	24
orf 73	yadA(aa1-207)	16
orf 73	orf 73	17
orf 73	yad A	1
orf 73	yscI	9
orf 73	yadA (aa232-ende)	9
orf 73	tn63	22
orf 92	yscJ(aa1-207)	24
orf 81	yscU	7
orf 81	yscL	12
orf 81	yscR	3
orf 81	ylp A	7
yop M	repA	9
yop M	yopB	5
ysc H	repC	25
ysc H	yscJ(aa1-207)	24
ysc H	orf 73	17
ysc H	yscI	9
ysc H	tyeA1	3
ysc H	tn63	22
ysc H	Tye A	6
LcrD(aa132-200)	orf 73	17
yscD(aa1-129)	repC	25
yscD(aa1-129)	yadA(aa1-207)	16
yscD(aa1-129)	yadA aa232-ende)	9
repC	repC	25
repC	yscJ(aa1-207)	24
repC	orf 80	5
repC	orf88	6
repC	yscL	12
repC	orf 73	17
yscM1	repC	25
yscM1	yscJ(aa1-207)	24
yscM1	Orf88	6
yscM1	yscL	12
yscM1	yscI	9
yscM1	tn63	22
orf155	yopO(aa1-405)	2
sycH	yscM1	1
sycH	yopH	1
sycH	ysc M2	1
sycH	syc H	4
sycH	yadA(aa1-207)	16
sycH	yopB	5
sycH	spyA	1
Ysc R	yscR	3
Ysc R	ylp A	7
lcr V	lcrG	1
Yop D	yopD	4
Yop D	Syc D	3
vir F	repC	25
vir F	orf88	6
vir F	yscI	9
vir F	yadA (232-ende)	9
vir F	tn63	22
Ysc S	ylp A	7
tn 63	yscJ (aa1-207)	24
Ysc I	repC	25
Ysc I	yscJ(aa1-207)	24
Ysc I	yadA(aa1-207)	16
Ysc I	orf 73	17
Ysc I	yscI	9
Ysc I	yadA(232-ende)	9
Ysc I	tn63	22
yopB(aa189-401)	yscU	7
ylpA	yscJ(aa1-207)	24

Baitprotein	Preyprotein	Anzahl der Interaktionen des Preyproteins
ylpA	yopO(aa1-405)	2
yopTC139S	tye A	6
yopTC139S	sycT	3
yopN	repC	25
yopN	yscJ(aa1-207)	24
yopN	yadA(aa1-207)	16
yopN	orf 73	17
yopN	yscI	9
yopN	tyeA1	3
yopN	tn63	22
yopN	Tye A	6
yscF	yscU	7
yadA	yscJ(aa1-207)	24
yadA	tn 51	2
yadA	orf 134	1
yadA	yscR(aa32-50)	1
yscG	repA	9
yscG	yscJ(aa1-207)	24
yscG	ysc X	10
yscG	ysc K	6
yscG	tn63	22
spyB2	lcrR	1
spyB2	repA	9
spyB2	yscJ(aa1-207)	24
spyB2	Ysc X	10
spyB2	yscO	2
spyB2	Ysc K	6
spyB2	tn63	22
lcrD	Ylp A	7
yscK	sycE	4
yscK	yadA(aa1-207)	16
orf 186	Ysc X	10
orf 186	Ysc K	6
lcrD(aa314-704)	Syc H	4
lcrD(aa314-704)	yopB	5
orf 134	yadA(aa1-207)	16
orf 134	yadA (aa232-ende)	9
orf 134	tye A	6
tyeA	repA	9
tyeA	yopN	4
tyeA	ylp A	7
yscM2	sycE	4
yscM2	syc H	4
repA	repA	9
repA	ysc X	10
repA	yscL	12
yopB	syc D	3
tn51	repA	9
tn51	tn 51	2
tn51	tn 65	6
tn51	tn 65	6
tn51	tn63	22
yscB	sycN	1
yscB	tn63	22
yscT(aa100-131)	repC	25
yscT(aa100-131)	yadA(aa1-207)	16
yscT(aa100-131)	orf 73	17
orf79	yscY	3
orf79	Ysc X	10
spyB	yscF	1
spyB	yscD	1
yscL	yscJ(aa1-207)	24
yscL	Ysc N	1
virG	ylp A	7
orf78	repC	25
orf78	yscJ(aa1-207)	24

Baitprotein	Preyprotein	Anzahl der Interaktionen des Preyproteins
orf78	yscL	12
orf78	yscI	9
orf78	orf 78	2
orf78	tn63	22
yscN	repC	25
yscN	yscL	12
yscN	orf 73	17
YopO (521-ende)	repC	25
YopO (521-ende)	repA	9
YopO (521-ende)	yscJ(aa1-207)	24
YopO (521-ende)	orf 80	5
YopO (521-ende)	Ysc X	10
YopO (521-ende)	tn 65	6
YopO (521-ende)	yscL	12
YopO (521-ende)	yopB	5
YopO (521-ende)	tn 65	6
YopO (521-ende)	yscI	9
YopO (521-ende)	tn63	22
yopE R144A	sycE	4
tyeA	repC	25
tyeA	yopN	4
tyeA1	repA	9
tyeA1	yscJ	6
tyeA1	yopN	4
tyeA1	tn63	22
lcrG	lcrV	1
lcrG	repC	25
lcrG	orf 73	17
lcrG	tn63	22
yscY	repC	25
yscY	yscJ(aa1-207)	24
yscY	orf 80	5
yscY	Ysc X	10
yscY	tn63	22
yscX	yscY	3
yscX	Ysc X	10
yscX	tn63	22
sycT	yopT(aa1-129)	1
sycT	yopB	5
sycT	yopT C139S	1
sycT	sycT	3
yscU	yscJ	6
yscU	yscU	7
yopE(aa1-140)	yscJ	6
yopE(aa1-140)	sycE	4
orf155b	orf88	6
orf155b	yscL	12
yscD(aa153-ende)	repC	25
yscD(aa153-ende)	yscJ(aa1-207)	24
yscD(aa153-ende)	yadA(aa1-207)	16
yscD(aa153-ende)	yadA(aa232-ende)	9
yscD(aa153-ende)	tn63	22
yscE	repC	25
yscE	yscJ(aa1-207)	24
yscE	yadA(aa1-207)	16
yscE	tyeA1	3
yscE	tn63	22
yscE	Tye A	6
yopP C172A	yscJ	6
yopP C172A	yscU	7
yopE(aa96-220)	orf 73	17
yopT(aa130-ende)	repC	25
yopT(aa130-ende)	yscJ(aa1-207)	24
yopT(aa130-ende)	orf 80	5
yopT(aa130-ende)	yadA(aa1-207)	16
yopT(aa130-ende)	orf88	6

Baitprotein	Preyprotein	Anzahl der Interaktionen des Preyproteins
yopT(aa130-ende)	orf 73	17
yopT(aa130-ende)	tn63	22
yopT(aa1-129)	repC	25
yopT(aa1-129)	yscL	12
yopT(aa1-129)	orf 73	17
yopT(aa1-129)	sycT	3
yopO(aa1-405)	ysc X	10

Tabelle 2: Interaktionen zwischen *Yersinia enterocolitica* pYV- und der Wirtsproteinen

Baitprotein	Preyprotein	Anzahl	Prey Promiskuität	Funktion	Anzahl von unterschiedlichen Screens	Anzahl von unterschiedlichen Genbanken	Anzahl von unterschiedlichen Varianten dieses Baits
yopO	RHOA	89	4	ras homolog gene family, member A	1	1	1
yscO	POP7	61	5	processing of precursor 7, ribonuclease P subunit ( <i>S. cerevisiae</i> )	4	3	1
yopO	RAC1	55	2	ras-related C3 botulinum toxin substrate	2	2	1
yopB	LN2	35	1	ligand of numb-protein X 2	3	1	1
yscY	SSFA2	29	3	sperm specific antigen 2	1	1	1
lcrD	SNW1	26	4	SNW domain containing 1	2	2	2
yopP	RFC2	20	2	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa	3	1	1
yopT	CUX1	18	1	cut-like homeobox 1	3	2	1
yscE	TALDO1	16	1	transaldolase 1	2	2	1
yscO	CCNBDP1	13	2	cyclin D-type binding-protein 1	1	1	1
yopM	RPLP2	12	2	ribosomal protein, large, P2	6	2	1
yopM	HOXC9	10	1	homeobox C9	2	2	1
yopB	N-PAC	9	3	cytokine-like nuclear factor n-pac	3	1	1
yopB	CCL21	8	1	chemokine (C-C motif) ligand 21	2	1	1
yopO	ALAS1	8	1	aminolevulinat, delta-, synthase 1	2	2	1
yopM	CGI-96	8	1	No description	3	2	1
yopT	PNMA2	8	5	Paraneoplastic antigen Ma2 (Onconeural antigen MA2)	1	1	1
yadA	PTPN6	8	5	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	2	1	2
yopN	CCDC5	7	1	coiled-coil domain containing 5 (spindle associated)	1	1	1
yopM	PKN1	7	1	protein kinase N1	4	2	1
yopO	FLJ23584	7	1	hypothetical protein FLJ23584	3	2	1
yopO	LOC100131872	7	1	LOC100131872 hypothetical protein LOC100131872	3	2	1
yopO	RAC2	7	2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	2	2	1
yscO	SPZ1	7	2	spermatogenic leucine zipper 1	1	1	1
yopM	TCEAL8	7	2	transcription elongation factor A (SII)-like 8	1	1	1
yopB	SDCBP	7	3	syndecan binding protein (syntenin)	2	1	1
yopB	ARPC3	7	3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa	2	1	1
yopN	FKBP2	7	4	FK506 binding protein 2, 13kDa	2	1	1

yopO	DCTN1	7	5	dynactin 1 (p150, glued homolog, Drosophila)	2	2	1
tyeA	NT5C3	6	1	5'-nucleotidase, cytosolic III	1	1	1
yopO	CCDC110	6	1	coiled-coil domain containing 110	1	1	1
yopT	SUGT1	6	1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)	1	1	1
yopO	EIF3F	6	2	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon,	2	2	1
yopP	NEK6	6	2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	3	2	1
yscX	HGS	6	3	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	1	1	1
lcrD	RPS2	6	4	ribosomal protein S2	2	1	2
Orf73	PTGDS	6	4	prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)	3	1	1
yopT	KRT15	5	1	keratin 15	1	1	1
Orf73	CLPTM1	5	1	Cleft lip and palate transmembrane protein 1.	1	1	1
yopB	TIMP1	5	1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	2	1	1
yopO	HADHA	5	2	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme	2	2	1
yomA	RAB3IP	5	2	RAB3A interacting protein (rabin3)	1	1	1
yopP	ECH1	5	3	enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	2	1	1
yopO	POMP	5	4	proteasome maturation protein	1	1	1
yopT	PCOLCE	5	4	procollagen C-endopeptidase enhancer	1	1	1
yopN	LOC440871	5	5	similar to Ig kappa chain V-III region VH precursor	2	1	1
yomA	SILV	4	1	silver homolog (mouse)	1	1	1
yomA	ICAM3	4	1	intercellular adhesion molecule 3	1	1	1
yopM	ZNF142	4	1	zinc finger protein 142	1	1	1
yopO	MAN2B1	4	1	mannosidase, alpha, class 2B, member 1	1	1	1
yopO	PMF1	4	2	polyamine-modulated factor 1	1	1	1
yopT	ALDOA	4	3	aldolase A, fructose-bisphosphate	2	1	1
yopO	SPATA22	4	4	spermatogenesis associated 22	1	1	1
lcrD	PCGF5	4	5	polycomb group ring finger 5	1	1	1
yopO	EIF3H	3	1	eukaryotic translation initiation factor 3	1	1	1
yopQ	ECHDC1	3	1	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1	1	1	1
yscO	FUCA1	3	1	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	1	1	1
lcrD	PRSSL1	3	1	protease, serine-like 1	2	1	2
yopM	USP20	3	1	ubiquitin specific peptidase 20	2	1	1
lcrD	ILK	3	1	integrin-linked kinase	2	1	2
yopT	naENSG000001738	3	1		1	1	1
yopM	ZNF408	3	1	zinc finger protein 408	2	2	1
yopO	CDK9	3	1	cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	1	1	1
yopO	RPGRIP1	3	1	retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1	1	1	1
yopO	na-Hs.704586	3	1		1	1	1
yopT	CEP68	3	1	Centrosomal protein of 68 kDa (Cep68 protein).	1	1	1
yopP	C1orf108	3	1	chromosome 1 open reading frame 108	3	2	1
yopN	OSTalpha	3	1	organic solute transporter alpha	1	1	1
yopO	ZNF506	3	1	zinc finger protein 506	1	1	1
yopM	CCDC33	3	1	coiled-coil domain containing 33	1	1	1
yscE	ELOF1	3	1	elongation factor 1 homolog (S. cerevisiae)	2	2	1

yadA	PLEKHO1	3	2	pleckstrin homology domain containing, family O member 1	1	1	1
yopO	PIK3R2	3	2	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (p85 beta)	2	2	1
lcrD	FLII	3	2	flightless I homolog (Drosophila)	2	1	2
yopN	C14orf159	3	3	chromosome 14 open reading frame 159	2	1	1
yopO	RHOC	3	4	ras homolog gene family, member C	1	1	1
Orf155	LOC440871	3	5	similar to Ig kappa chain V-III region VH precursor	2	1	1
Orf73	LOC440871	3	5	similar to Ig kappa chain V-III region VH precursor	3	1	1
yopM	ARHGAP15	3	5	Rho GTPase activating protein 15	2	1	1
yscM2	ARHGAP15	3	5	Rho GTPase activating protein 15	2	1	1
yopM	ZNF12	2	1	zinc finger protein 12	2	2	1
yopM	ZNF181	2	1	zinc finger protein 181	1	1	1
tyeA	S100A11	2	1	S100 calcium binding protein A11	2	1	1
yscE	IGFBP3	2	1	insulin-like growth factor binding protein 3	2	1	1
yscE	CFDP1	2	1	craniofacial development protein 1	1	1	1
yopM	ZNF544	2	1	zinc finger protein 544	1	1	1
yopN	LOC652346	2	1	similar to promyelocytic leukemia protein isoform 1	1	1	1
yopN	LOC652493	2	1	similar to Ig kappa chain V-I region HK102 precursor	1	1	1
yopN	LOC653226	2	1	hCG1781062	1	1	1
yopO	FMN1	2	1	formin 1	1	1	1
yopO	HOOK1	2	1	hook homolog 1 (Drosophila)	1	1	1
yopO	KIAA1370	2	1	KIAA1370	1	1	1
yopO	UACA	2	1	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	1	1	1
yopO	TBK1	2	1	TANK-binding kinase 1	1	1	1
tyeA	MYO18A	2	1	myosin XVIIIa	1	1	1
yopO	LOC732206	2	1	similar to testis specific protein, Ddc8	1	1	1
yopO	MLF1IP	2	1	MLF1 interacting protein	1	1	1
yopO	NF-KB2	2	1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	1	1	1
yopN	PML	2	1	promyelocytic leukemia	1	1	1
yopO	CCDC80	2	1	coiled-coil domain containing 80	1	1	1
yopO	CSRP2BP	2	1	CSRP2 binding protein	2	1	1
sycH	TXNRD2	2	1	thioredoxin reductase 2	1	1	1
lcrD	LOC728051	2	1	similar to GC-rich promoter binding protein 1	1	1	1
lcrD	LOC731218	2	1	similar to GC-rich promoter binding protein 1	1	1	1
Orf73	na-Hs.620837	2	1		1	1	1
lcrD	MBIP	2	1	MAP3K12 binding inhibitory protein 1	1	1	1
yscM2	C20orf199	2	1	chromosome 20 open reading frame 199	1	1	1
Orf73	MARCO	2	1	macrophage receptor with collagenous structure	1	1	1
yscO	TTF1	2	1	transcription termination factor, RNA polymerase I	1	1	1
yscl	na-Hs.652327	2	1	No description	1	1	1
yscE	TEX101	2	1	testis expressed 101	1	1	1
Orf155	ASXL1	2	1	additional sex combs like 1 (Drosophila)	1	1	1
yscO	CCDC121	2	1	coiled-coil domain containing 121	1	1	1
yopT	CDC25C	2	2	cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)	1	1	1

yopM	ZNF223	2	2	zinc finger protein 223	2	1	1
yopM	ZBTB22	2	2	zinc finger and BTB domain containing 22	1	1	1
yscE	LOC727880	2	2	hypothetical protein LOC727880	1	1	1
yopM	ZNF7	2	2	zinc finger protein 7	1	1	1
yopT	TARS	2	2	threonyl-tRNA synthetase	1	1	1
yopO	ZNF223	2	2	zinc finger protein 223	2	1	1
yopB	UROS	2	2	uroporphyrinogen III synthase	1	1	1
yopO	MGC88374	2	2	similar to CG32662-PA	1	1	1
yopO	LOC100128274	2	2	LOC100128274 hypothetical protein LOC100128274	1	1	1
yopO	C9orf156	2	2	chromosome 9 open reading frame 156	1	1	1
yopP	LOC100128274	2	2	LOC100128274 hypothetical protein LOC100128274	1	1	1
yopO	CENTB1	2	2	centaurin, beta 1	1	1	1
yopP	na-Hs.607490	2	2	No description	2	1	1
yopP	LOC283663	2	2	hypothetical protein LOC283663	1	1	1
yscI	CASP8AP2	2	2	CASP8 associated protein 2	1	1	1
Orf155	SMARCC2	2	2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin	2	1	1
Orf155	MAT2B	2	2	methionine adenosyltransferase II, beta	1	1	1
yopN	CA1	2	3	carbonic anhydrase I	1	1	1
yadA	na-Hs.591701	2	3		1	1	1
yopT	na-Hs.677105	2	3		1	1	1
yopP	LOC100129578	2	3	LOC100129578 similar to RING zinc finger LIM domain binding protein	2	1	1
yopO	RAP1A	2	3	RAP1A, member of RAS oncogene family	1	1	1
yopN	SRP9	2	3	signal recognition particle 9kDa	1	1	1
yopO	ALDOA	2	3	aldolase A, fructose-bisphosphate	1	1	1
IcrD	IIP45	2	3	invasion inhibitory protein 45	1	1	1
yscO	FLOT1	2	3	flotillin 1	2	2	1
yscO	PIAS1	2	3	protein inhibitor of activated STAT, 1	1	1	1
yopQ	FKBP2	2	4	FK506 binding protein 2, 13kDa	2	1	1
yopE	RPS6	2	4	ribosomal protein S6	1	1	1
yopB	CD14	2	4	CD14 molecule	1	1	1
yopN	SPATA22	2	4	spermatogenesis associated 22	1	1	1
yopB	RARRES2	2	4	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	2	1	1
yopB	GLUL	2	4	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	2	1	1
yscS	FKBP2	2	4	FK506 binding protein 2, 13kDa	1	1	1
yscO	SPATA22	2	4	spermatogenesis associated 22	1	1	1
Orf73	LOC653786	2	4	similar to otoancorin isoform 2	1	1	1
Orf92	PNMA2	2	5	Paraneoplastic antigen Ma2 (Onconeural antigen MA2)	1	1	1
Orf92	PTPN6	2	5	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	1	1	1
Orf155	HBA1	2	5	hemoglobin, alpha 1	1	1	1
yscY	C1QA	2	5	complement component 1, q subcomponent, A chain	2	1	1
yscO	GPS2	2	5	G protein pathway suppressor 2	1	1	1
yscM2	NPC2	2	5	Niemann-Pick disease, type C2	2	1	1

low confidence Interaktionen, die Interaktionen die in Y2H-Screen nur einmal gefunden wurden							
yopM	C9orf16	1	1	chromosome 9 open reading frame 16	1	1	1
yopM	C20orf142	1	1	Uncharacterized protein C20orf142 precursor	1	1	1
Orf73	IGHM	1	1	Immunoglobulin heavy chain C gene segment	1	1	1
yopM	C11orf51	1	1	chromosome 11 open reading frame 51	1	1	1
yopM	EPB42	1	1	erythrocyte membrane protein band 4.2	1	1	1
yopM	GTF2H4	1	1	general transcription factor IIH, polypeptide4,	1	1	1
yopM	GSPT1	1	1	G1 to S phase transition 1	1	1	1
yopM	EIF5	1	1	eukaryotic translation initiation factor 5	1	1	1
yopM	CHST4	1	1	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 4	1	1	1
yopE	RBM6	1	1	RNA binding motif protein 6	1	1	1
yopE	PHF7	1	1	PHD finger protein 7	1	1	1
Orf73	na-Hs.126857	1	1		1	1	1
yopE	na-Hs.638694	1	1		1	1	1
yopE	na-Hs.571518	1	1		1	1	1
yopE	MTCP1	1	1	mature T-cell proliferation 1	1	1	1
yopE	NDP	1	1	Norrie disease (pseudoglioma)	1	1	1
yopM	BEST1	1	1	Bestrophin-1 (Vitelliform macular dystrophy protein 2)	1	1	1
Orf73	LOC100130100	1	1	LOC100130100 similar to hCG26659	1	1	1
yopM	ARG2	1	1	arginase, type II	1	1	1
Orf73	LOC647121	1	1	similar to embigin homolog	1	1	1
yopM	AAMP	1	1	angio-associated, migratory cell protein	1	1	1
Orf73	LOC647506	1	1	similar to Ig kappa chain V-I region HK101 precursor	1	1	1
Orf73	KARS	1	1	lysyl-tRNA synthetase	1	1	1
yopH	LGALS8	1	1	Galectin-8 (Gal-8) (Prostate carcinoma tumor antigen 1)	1	1	1
yopE	TSHZ1	1	1	teashirt family zinc finger 1	1	1	1
yopM	ZNF236	1	1	zinc finger protein 236	1	1	1
yopM	ZNF232	1	1	zinc finger protein 232	1	1	1
yopM	ZNF225	1	1	zinc finger protein 225	1	1	1
lcrD	TMEM57	1	1	transmembrane protein 57	1	1	1
yopM	TLN1	1	1	talín 1	1	1	1
Orf134	C6orf125	1	1	chromosome 6 open reading frame 125	1	1	1
Orf155	TMEM115	1	1	transmembrane protein 115	1	1	1
lcrD	BCAP31	1	1	B-cell receptor-associated protein 31	1	1	1
yopN	C8orf59	1	1	chromosome 8 open reading frame 59	1	1	1
yopN	ASCC2	1	1	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	1	1	1
yopM	ZNF44	1	1	zinc finger protein 44	1	1	1
lcrD	DHX35	1	1	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 35	1	1	1
yopM	ZNF470	1	1	zinc finger protein 470	1	1	1
lcrD	DNAJC1	1	1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1	1	1	1
yopM	ZNF83	1	1	zinc finger protein 83	1	1	1
yopM	ZNF79	1	1	zinc finger protein 79	1	1	1

lcrD	FUNDC1	1	1	FUN14 domain containing 1	1	1	1
yopM	ZNF714	1	1	zinc finger protein 714	1	1	1
lcrD	GBP5	1	1	guanylate binding protein 5	1	1	1
lcrD	GTSE1	1	1	G-2 and S-phase expressed 1	1	1	1
yopM	ZNF671	1	1	zinc finger protein 671	1	1	1
yopM	ZNF588	1	1	zinc finger protein 588	1	1	1
yopM	NNMT	1	1	nicotinamide N-methyltransferase	1	1	1
yopM	na-Hs.666629	1	1		1	1	1
yopM	MS4A1	1	1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	1	1	1
Orf155	LOC283710	1	1	hypothetical LOC283710	1	1	1
yopM	LRRC8C	1	1	leucine rich repeat containing 8 family, member C	1	1	1
Orf134	CSDC2	1	1	cold shock domain containing C2, RNA binding	1	1	1
yopM	LRRC27	1	1	leucine rich repeat containing 27	1	1	1
yopE	DTNB	1	1	dystrobrevin, beta	1	1	1
yopM	LOC646057	1	1	similar to Ig heavy chain V-III region VH26 precursor	1	1	1
yopM	KIAA1949	1	1	KIAA1949	1	1	1
yopM	IGHA1	1	1	IGHA1 immunoglobulin heavy constant alpha 1	1	1	1
Orf155	UPF2	1	1	Regulator of nonsense transcripts 2	1	1	1
yopM	HLA-DRB1	1	1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	1	1	1
Orf155	ARHGAP9	1	1	Rho GTPase activating protein 9	1	1	1
yopM	SLFN5	1	1	schlafen family member 5	1	1	1
Orf134	RPS29	1	1	ribosomal protein S29	1	1	1
yopM	SETD5	1	1	SET domain containing 5	1	1	1
yopM	SCGB1A1	1	1	secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)	1	1	1
yopM	SAFB	1	1	scaffold attachment factor B	1	1	1
yopM	PECR	1	1	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	1	1	1
Orf155	DNMT3A	1	1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	1	1	1
spyA	EREG	1	1	epiregulin	1	1	1
yomA	ATP9B	1	1	ATPase, Class II, type 9B	1	1	1
spyA	MTA3	1	1	metastasis associated 1 family, member 3	1	1	1
yadA	TBXAS1	1	1	thromboxane A synthase 1	1	1	1
spyA	BACE2	1	1	beta-site APP-cleaving enzyme 2	1	1	1
yadA	PRM1	1	1	protamine 1	1	1	1
yopB	ATOH8	1	1	atonal homolog 8 (Drosophila)	1	1	1
yopB	CCDC70	1	1	coiled-coil domain containing 70	1	1	1
yopB	C6orf123	1	1	chromosome 6 open reading frame 123	1	1	1
yopB	ACSL6	1	1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	1	1	1
yomA	KIAA2013	1	1	KIAA2013	1	1	1
yadA	C1orf55	1	1	chromosome 1 open reading frame 55	1	1	1
yadA	AKR1B1	1	1	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	1	1	1
tyeA	FLJ45513	1	1	hypothetical protein LOC729220	1	1	1
tyeA	VASN	1	1	vasorin	1	1	1
tyeA	PRPF40A	1	1	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A	1	1	1

tyeA	LOC100130353	1	1	LOC100130353 hypothetical protein LOC100130353	1	1	1
tyeA	na-ENSG0000021	1	1	Immunoglobulin Lambda light chain C gene segment	1	1	1
spyB2	TUBG2	1	1	tubulin, gamma 2	1	1	1
yadA	naHs.572721	1	1		1	1	1
yadA	MEOX1	1	1	mesenchyme homeobox 1	1	1	1
yadA	LOC730410	1	1	similar to HLA class I histocompatibility antigen, B-18 alpha chain precursor	1	1	1
yadA	IFT81	1	1	intraflagellar transport 81 homolog (Chlamydomonas)	1	1	1
sych	SLC22A4	1	1	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4	1	1	1
yadA	EBF1	1	1	early B-cell factor 1	1	1	1
yopB	SEPT9	1	1	septin 9	1	1	1
yopB	TEX261	1	1	testis expressed 261	1	1	1
yopB	SLBP	1	1	stem-loop (histone) binding protein	1	1	1
Orf81	C1orf190	1	1	chromosome 1 open reading frame 190	1	1	1
yopB	RPL39L	1	1	ribosomal protein L39-like	1	1	1
yopB	RBM28	1	1	RNA binding motif protein 28	1	1	1
yopB	QPRT	1	1	quinolinate phosphoribosyltransferase	1	1	1
Orf73	ZNF350	1	1	zinc finger protein 350	1	1	1
Orf73	POGZ	1	1	pogo transposable element with ZNF domain	1	1	1
yopE	KIAA1267	1	1	KIAA1267	1	1	1
yopE	JRKL	1	1	jerky homolog-like (mouse)	1	1	1
yopE	HMGCS2	1	1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	1	1	1
Orf73	RARRES1	1	1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	1	1	1
yopB	ANKRD19	1	1	Ankyrin repeat domain-containing protein 19.	1	1	1
Orf73	SEMA4A	1	1	sema domain, immunoglobulin domain	1	1	1
yopE	ACTL7A	1	1	actin-like 7A	1	1	1
Orf73	RPS15	1	1	ribosomal protein S15	1	1	1
yopB	PIGF	1	1	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class F	1	1	1
yopB	LOC100133555	1	1	LOC100133555 similar to LOC440570 [ Homo sapiens ]	1	1	1
yopB	LOC100133056	1	1	LOC100133056 similar to HGC6.2 [ Homo sapiens ]	1	1	1
yopB	HOXD10	1	1	homeobox D10	1	1	1
Orf88	NIPSNAP3A	1	1	nipsnap homolog 3A (C. elegans)	1	1	1
yopB	GIMAP2	1	1	GTPase, IMAP family member 2	1	1	1
yopB	LOC651751	1	1	similar to Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 precursor	1	1	1
Orf88	PRPS1L1	1	1	phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1-like 1	1	1	1
yopB	LPAR4	1	1	lysophosphatidic acid receptor 4	1	1	1
yopB	FAM36A	1	1	Protein FAM36A.	1	1	1
yopB	FAM14A	1	1	family with sequence similarity 14, member A	1	1	1
Orf73	PHLDA1	1	1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	1	1	1
yopB	na-Hs.511952	1	1		1	1	1
yopB	DLD	1	1	dihydroipoamide dehydrogenase	1	1	1
Orf81	EPB41	1	1	Protein 4.1 (Band 4.1) (P4.1) (EPB4.1) (4.1R).	1	1	1
Orf81	TTMB	1	1	TTMB protein (TTMB), mRNA	1	1	1
Orf88	ACAT1	1	1	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	1	1	1

yopB	NDUFS3	1	1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein	1	1	1
yopB	LOC644634	1	1	hypothetical LOC644634	1	1	1
yopB	na-Hs.662937	1	1		1	1	1
yopB	POLR3D	1	1	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D, 44kDa	1	1	1
Orf88	BRDG1	1	1	BCR downstream signaling 1	1	1	1
yopB	na-ENSG000001882	1	1	Novel protein.	1	1	1
yopB	MTMR11	1	1	myotubularin related protein 11	1	1	1
yopB	MST150	1	1	MSTP150	1	1	1
yopB	MRPL47	1	1	mitochondrial ribosomal protein L47	1	1	1
yopB	MAP3K14	1	1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	1	1	1
yopB	LST1	1	1	leukocyte specific transcript 1	1	1	1
yscI	H2AFY	1	1	H2A histone family, member Y	1	1	1
yscM1	LOC641977	1	1	similar to cell division cycle 10 homolog	1	1	1
yscM1	NCBP1	1	1	nuclear cap binding protein subunit 1, 80kDa	1	1	1
yscM1	SHMT1	1	1	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)	1	1	1
yscE	ZNF490	1	1	zinc finger protein 490	1	1	1
yscG	MSRB2	1	1	methionine sulfoxide reductase B2	1	1	1
yscH	LOC645769	1	1	hypothetical LOC645769	1	1	1
yscG	TFR2	1	1	transferrin receptor 2	1	1	1
yscM2	LOC100128197	1	1	similar to mannosyl (alpha-1,3-)-glycoproteinbeta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	1	1	1
yscM2	HISPPD2A	1	1	histidine acid phosphatase domain containing 2A	1	1	1
yscM2	ITFG1	1	1	integrin alpha FG-GAP repeat containing 1	1	1	1
yscM2	ITIH5	1	1	inter-alpha (globulin) inhibitor H5	1	1	1
yscM2	LOC100130764	1	1	LOC100130764 hypothetical protein LOC100130764	1	1	1
yscM2	LAYN	1	1	layiin	1	1	1
yscM2	C9orf126	1	1	chromosome 9 open reading frame 126	1	1	1
yscM2	GSK3B	1	1	glycogen synthase kinase 3 beta	1	1	1
yscM2	FLJ41841	1	1	CDNA FLJ41841 fis, clone NT2RI3002842	1	1	1
yscM2	ELTD1	1	1	EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1	1	1	1
yscM2	ACADM	1	1	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	1	1	1
yscA	na-ENSG000002052	1	1	No description	1	1	1
yscD	CD248	1	1	CD248 molecule, endosialin	1	1	1
yopT	na-Hs.578297	1	1		1	1	1
yopT	na-Hs.688926	1	1		1	1	1
yopT	RNASET2	1	1	ribonuclease T2	1	1	1
yopT	NT5C	1	1	5', 3'-nucleotidase, cytosolic	1	1	1
yscE	LOC729348	1	1	similar to CG32662-PA	1	1	1
yscE	MGC7036	1	1	hypothetical protein MGC7036	1	1	1
yscE	na-Hs.620478	1	1		1	1	1
yscE	na-Hs.699841	1	1		1	1	1
yscE	RPS11	1	1	ribosomal protein S11	1	1	1
yscE	RPS5	1	1	ribosomal protein S5	1	1	1
yscE	THG1L	1	1	tRNA-histidine guanylyltransferase 1-like (S. cerevisiae)	1	1	1

yscE	na-Hs.703590	1	1		1	1	1
yscE	GLT8D2	1	1	glycosyltransferase 8 domain containing 2	1	1	1
yscM2	na-Hs.713860	1	1	MRNA; cDNA DKFZp667G0214	1	1	1
yscE	ATP2B1	1	1	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 1	1	1	1
yscE	C7orf24	1	1	chromosome 7 open reading frame 24	1	1	1
yscE	CCDC84	1	1	coiled-coil domain containing 84	1	1	1
yscE	EIF3G	1	1	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4 delta,	1	1	1
yscE	GRK4	1	1	G protein-coupled receptor kinase 4	1	1	1
yscD	CHIT1	1	1	chitinase 1 (chitotriosidase)	1	1	1
yscE	CEP152	1	1	centrosomal protein 152kDa	1	1	1
yscY	CCDC146	1	1	coiled-coil domain containing 146	1	1	1
yscY	CX3CL1	1	1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	1	1	1
yscY	FXD5	1	1	FXD domain containing ion transport regulator 5	1	1	1
yscY	IQGAP1	1	1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	1	1	1
yscX	TKT	1	1	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	1	1	1
yscY	ADAM32	1	1	ADAM metalloproteinase domain 32	1	1	1
yscY	NCSTN	1	1	nicastin	1	1	1
yscY	PGK1	1	1	phosphoglycerate kinase 1	1	1	1
yscY	PINX1	1	1	PIN2-interacting protein 1	1	1	1
yscY	na-Hs.591113	1	1	Uncharacterized protein C15orf34	1	1	1
yscY	SEMA6B	1	1	sema domain, transmembrane domain, and cytoplasmic domain	1	1	1
yscY	SMAD5	1	1	SMAD family member 5	1	1	1
yscY	PRG2	1	1	proteoglycan 2, bone marrow (natural killer cell activating)	1	1	1
yscY	na-Hs.677024	1	1	No description	1	1	1
yscY	na-Hs.659899	1	1	No description	1	1	1
yscY	MADD	1	1	MAP-kinase activating death domain	1	1	1
yscY	MEMO1	1	1	mediator of cell motility 1	1	1	1
yscY	MYO19	1	1	myosin XIX Homo sapiens	1	1	1
yscY	IAPP	1	1	islet amyloid polypeptide	1	1	1
yscY	LGALS9	1	1	lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)	1	1	1
yscO	na-Hs.610564	1	1		1	1	1
yscO	PLEK2	1	1	pleckstrin 2	1	1	1
yscO	RRP9	1	1	RRP9, small subunit (SSU) processome component, hom	1	1	1
yscX	LTF	1	1	lactotransferrin	1	1	1
yscM2	RNF7	1	1	ring finger protein 7	1	1	1
yopT	LOC729570	1	1	hypothetical protein LOC729570	1	1	1
yscM2	SLC16A3	1	1	Monocarboxylate transporter 4 (MCT 4) (MCT 3)	1	1	1
yscO	WWC1	1	1	WW and C2 domain containing 1	1	1	1
yscS	RNF40	1	1	ring finger protein 40	1	1	1
yscS	TANK	1	1	TRAF family member-associated NF-KB activator	1	1	1
yscU	PIPOX	1	1	pipecolic acid oxidase	1	1	1
yscX	CSAD	1	1	cysteine sulfinic acid decarboxylase	1	1	1
yscX	CTR9	1	1	Ctr9, Paf1/RNA polymerase II complex component, homoloq	1	1	1

yscX	EIF3S6IP	1	1	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein	1	1	1
yscM2	na-Hs.518057	1	1		1	1	1
yscO	ZNF451	1	1	zinc finger protein 451	1	1	1
yscR	FES	1	1	feline sarcoma oncogene	1	1	1
yscR	HIP2	1	1	huntingtin interacting protein 2	1	1	1
yscS	GOSR1	1	1	golgi SNAP receptor complex member 1	1	1	1
yscX	LOC728320	1	1	similar to lactotransferrin	1	1	1
yopO	HDCC2	1	1	HD domain containing 2	1	1	1
yopO	SH2D3C	1	1	SH2 domain containing 3C	1	1	1
yopO	G6PD	1	1	glucose-6-phosphate dehydrogenase	1	1	1
yopO	GRAMD1B	1	1	GRAM domain containing 1B	1	1	1
yopO	IL1RAP	1	1	interleukin 1 receptor accessory protein	1	1	1
yopO	LOC100131549	1	1	LOC100131549 hypothetical protein LOC100131549	1	1	1
yopO	LOC339047	1	1	hypothetical protein LOC339047	1	1	1
yopO	DEDD	1	1	death effector domain containing	1	1	1
yopO	MCM3AP	1	1	minichromosome maintenance complex component 3 associated	1	1	1
yopO	DLGAP3	1	1	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 3	1	1	1
yopO	DDX3X	1	1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	1	1	1
yopO	RAC3	1	1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	1	1	1
yopO	PSME1	1	1	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1	1	1	1
yopO	MAPKAPK5	1	1	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5	1	1	1
yopO	RAB5A	1	1	RAB5A, member RAS oncogene family	1	1	1
yopO	PANK4	1	1	pantothenate kinase 4	1	1	1
yopO	RASIP1	1	1	Ras interacting protein 1	1	1	1
yopO	na-Hs.670682	1	1		1	1	1
yopO	MED17	1	1	cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 6	1	1	1
yopO	MLH3	1	1	mutL homolog 3 (E. coli)	1	1	1
yopO	MORC2	1	1	MORC family CW-type zinc finger 2	1	1	1
yopO	na-Hs.669158	1	1		1	1	1
yopO	NSMCE4A	1	1	non-SMC element 4 homolog A (S. cerevisiae)	1	1	1
yopO	PA2G4	1	1	proliferation-associated 2G4, 38kDa	1	1	1
yopN	LARP2	1	1	La ribonucleoprotein domain family, member 2	1	1	1
yopN	na-Hs.692951	1	1		1	1	1
yopN	MTM1	1	1	myotubularin 1	1	1	1
yopN	na-Hs.638881	1	1		1	1	1
yopN	na-Hs.678947	1	1		1	1	1
yopN	LOC650405	1	1	similar to Ig kappa chain V-I region HK102 precursor	1	1	1
yopN	CIAPIN1	1	1	cytokine induced apoptosis inhibitor 1	1	1	1
yopN	CLC	1	1	Charcot-Leyden crystal protein	1	1	1
yopN	NP_872439.1	1	1	zinc finger protein 713	1	1	1
yopN	DNAJB8	1	1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 8	1	1	1
yopO	ANKRD12	1	1	ankyrin repeat domain 12	1	1	1
yopO	ANXA6	1	1	annexin A6	1	1	1

yopO	C4orf22	1	1	chromosome 4 open reading frame 22	1	1	1
yopO	CCT4	1	1	chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	1	1	1
yscY	ZNF521	1	1	zinc finger protein 521	1	1	1
yopN	SNHG6	1	1	small nucleolar RNA host gene (non-protein coding) 6	1	1	1
yopN	ZNF638	1	1	zinc finger protein 638	1	1	1
yopN	TROVE2	1	1	TROVE domain family, member 2	1	1	1
yopN	ZC3H7B	1	1	zinc finger CCCH-type containing 7B	1	1	1
yopO	SFRS2IP	1	1	splicing factor, arginine/serine-rich 2, interacting protein	1	1	1
yopP	TRIM5	1	1	tripartite motif-containing 5	1	1	1
yopP	TFAP4	1	1	transcription factor AP-4 (activating enhancer binding protein 4)	1	1	1
yopQ	FKBP1A	2	6	FK506 binding protein 1A, 12kDa	2	1	1
yopQ	LY75	1	1	lymphocyte antigen 75	1	1	1
yopQ	na-Hs.562622	1	1		1	1	1
yopQ	NOL14	1	1	nucleolar protein 14	1	1	1
yopP	SMYD2	1	1	SET and MYND domain containing 2	1	1	1
yopP	SNX12	1	1	sorting nexin 12	1	1	1
yopP	SPANXA1	1	1	sperm protein associated with the nucleus, X-linked, family member A1	1	1	1
yopP	SPANXA2	1	1	SPANX family, member A2	1	1	1
yopP	SUPT4H1	1	1	suppressor of Ty 4 homolog 1 (S. cerevisiae)	1	1	1
yopP	SEMG1	1	1	semenogelin I	1	1	1
yopT	COMMD4	1	1	COMM domain containing 4	1	1	1
yopT	ANKRD17	1	1	ankyrin repeat domain 17	1	1	1
yopT	EWSR1	1	1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	1	1	1
yopT	HNRNPH3	1	1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	1	1	1
yopQ	RPL32	1	1	ribosomal protein L32	1	1	1
yopQ	SLC35C2	1	1	solute carrier family 35, member C2	1	1	1
yopT	AIP	1	1	aryl hydrocarbon receptor interacting protein	1	1	1
yopP	C19orf47	1	1	chromosome 19 open reading frame 47	1	1	1
yopP	C2orf64	1	1	chromosome 2 open reading frame 64	1	1	1
yopP	CCL3L1	1	1	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	1	1	1
yopP	CCM2	1	1	cerebral cavernous malformation 2	1	1	1
yopP	ARHGEF5	1	1	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	1	1	1
yopP	CCL3L3	1	1	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	1	1	1
yopO	TEPP	1	1	testis/prostate/placenta-expressed protein	1	1	1
yopO	UBR1	1	1	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 1	1	1	1
yopP	BMP4	1	1	bone morphogenetic protein 4	1	1	1
yopO	ZNF277	1	1	zinc finger protein 277	1	1	1
yopP	AFF3	1	1	AF4/FMR2 family, member 3	1	1	1
yopO	VCP	1	1	valosin-containing protein	1	1	1
yopP	MGAT2	1	1	mannosyl(alpha-1,6-glycoproteinbeta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	1	1	1
yopP	LOC284912	1	1	hypothetical gene supported by BC001801	1	1	1
yopP	LOC653380	1	1	similar to USP6 N-terminal like	1	1	1
yopP	LOC728830	1	1	similar to C-C motif chemokine 3-like 1 precursor	1	1	1

yopP	LOC732360	1	1	similar to G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase	1	1	1
yopP	LOC100130633	1	1	similar to ZMYM6 protein	1	1	1
yopP	na-Hs.171397	1	1		1	1	1
yopP	NHEDC1	1	1	Na-H-exchanger protein	1	1	1
yopT	LSM7	1	1	LSM7 homolog, U6 small nuclear RNA associated	1	1	1
yopP	GPR84	1	1	G protein-coupled receptor 84	1	1	1
yopP	LOC100133749	1	1	LOC100133749 hypothetical protein LOC100133749	1	1	1
yopP	HIST1H2BC	1	1	histone cluster 1, H2bc	1	1	1
yopP	LOC100131845	1	1	similar to hCG1742309	1	1	1
yopP	HEATR2	1	1	HEAT repeat containing 2	1	1	1
yopM	GTPBP8	1	2	GTP-binding protein 8 (putative)	1	1	1
yopM	CRABP2	1	2	cellular retinoic acid binding protein 2	1	1	1
Orf73	C9orf71	1	2	chromosome 9 open reading frame 71	1	1	1
yopM	ENSA	1	2	endosulfine alpha	1	1	1
Orf73	EIF3F	1	2	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47kDa	1	1	1
yopH	RPL7A	1	2	ribosomal protein L7a	1	1	1
yopH	RAC2	1	2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	1	1	1
yopE	RPS10	1	2	ribosomal protein S10	1	1	1
lcrD	RAD50	1	2	RAD50 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1	1	1
lcrD	ITGB1	1	2	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29)	1	1	1
yopM	TXNDC11	1	2	thioredoxin domain containing 11	1	1	1
lcrD	USP4	1	2	ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene)	1	1	1
yopM	TIMM8A	1	2	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A	1	1	1
lcrD	C9orf39	1	2	chromosome 9 open reading frame 39	1	1	1
yopN	C8orf40	1	2	chromosome 8 open reading frame 40	1	1	1
Orf155	LOC100133233	1	2	LOC100133233 hypothetical protein LOC100133233	1	1	1
Orf155	SAT2	1	2	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 2	1	1	1
yopM	IGBP1	1	2	immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	1	1	1
yopM	SAFB2	1	2	scaffold attachment factor B2	1	1	1
yopM	ORC4L	1	2	origin recognition complex, subunit 4-like (yeast)	1	1	1
Orf155	CHD4	1	2	chromodomain helicase DNA binding protein 4	1	1	1
yopM	RBM25	1	2	RNA binding motif protein 25	1	1	1
Orf155	FAM136A	1	2	hypothetical protein FLJ14668	1	1	1
spyB2_yee	CDCA5	1	2	cell division cycle associated 5	1	1	1
spyA	NQO2	1	2	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	1	1	1
yadA	RPL13	1	2	ribosomal protein L13	1	1	1
spyB2_yee	MKI67	1	2	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	1	1	1
spyA	C9orf71	1	2	chromosome 9 open reading frame 71	1	1	1
Orf92	IKBKG	1	2	NF-kappa-B essential modulator (NEMO)	1	1	1
yopB	AKR1A1	1	2	aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)	1	1	1
Orf92	PTPRC	1	2	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	1	1	1
yadA	ARMET	1	2	arginine-rich, mutated in early stage tumors	1	1	1
tyeA	RPL34	1	2	ribosomal protein L34	1	1	1

tyeA	PFKL	1	2	phosphofruktokinase, liver	1	1	1
tyeA	LOC727880	1	2	hypothetical protein LOC727880	1	1	1
tyeA	MTRF1	1	2	mitochondrial translational release factor 1	1	1	1
yadA	MAGEA2	1	2	melanoma antigen family A, 2	1	1	1
sycH	AK3	1	2	adenylate kinase 3	1	1	1
tyeA	ANXA1	1	2	annexin A1	1	1	1
yopB	USP39	1	2	ubiquitin specific peptidase 39	1	1	1
Orf73	SIGIRR	1	2	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain	1	1	1
yopB	TGFBI	1	2	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	1	1	1
yopB	SUCLG1	1	2	succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha subunit	1	1	1
Orf79	MYOG	1	2	myogenin (myogenic factor 4)	1	1	1
yopB	RPL13	1	2	ribosomal protein L13	1	1	1
yopE	HTR5B	1	2	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B	1	1	1
yopE	ARL4A	1	2	ADP-ribosylation factor-like 4A	1	1	1
Orf88	PDZD8	1	2	PDZ domain containing 8	1	1	1
Orf81	YBX1	1	2	Y box binding protein 1	1	1	1
yscM1	HSP90B1	1	2	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	1	1	1
yscE	USP7	1	2	ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated)	1	1	1
yscI	SAP30BP	1	2	SAP30 binding protein	1	1	1
yscI	PPIG	1	2	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)	1	1	1
yscI	ARHGDIB	1	2	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	1	1	1
yscM2	HNRNPA3	1	2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	1	1	1
yscM2	LDHA	1	2	lactate dehydrogenase A	1	1	1
yscE	UROS	1	2	uroporphyrinogen III synthase (congenital erythropoietic porphyria)	1	1	1
yscM2	ASH2L	1	2	ash2 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)	1	1	1
yscM2	C2orf29	1	2	chromosome 2 open reading frame 29	1	1	1
yscM2	CYB5D2	1	2	cytochrome b5 domain containing 2	1	1	1
yscM2	EXT2	1	2	exostoses (multiple) 2	1	1	1
yscE	VIM	1	2	vimentin	1	1	1
yscA	CAMLG	1	2	calcium modulating ligand	1	1	1
yopT	ORC4L	1	2	origin recognition complex, subunit 4-like (yeast)	1	1	1
yopT	PLCD1	1	2	phospholipase C, delta 1	1	1	1
yopT	Q86U37	1	2	Volllänge cDNA clone CS0DF012YF04 of Fetal brain	1	1	1
yscE	na-Hs.688517	1	2		1	1	1
yscE	KLHL2	1	2	kelch-like 2, Mayven (Drosophila)	1	1	1
yscY	CNBP	1	2	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein	1	1	1
yscY	DKFZP564O0523	1	2	hypothetical protein DKFZp564O0523	1	1	1
yscY	CSNK1G2	1	2	casein kinase 1, gamma 2	1	1	1
yscX	SEPX1	1	2	selenoprotein X, 1	1	1	1
yscX	MAT2B	1	2	methionine adenosyltransferase II, beta	1	1	1
yscX	NAT5	1	2	N-acetyltransferase 5	1	1	1
yscX	RPS6KA1	1	2	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1	1	1	1
yscY	SPARCL1	1	2	SPARC-like 1 (mast9, hevyn)	1	1	1

yscY	KIF2C	1	2	kinesin family member 2C	1	1	1
yscO	CENPN	1	2	centromere protein N	1	1	1
yscO	BAZ1A	1	2	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	1	1	1
yscM2	PIK3R2	1	2	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (p85 beta)	1	1	1
yscM2	PTMA	1	2	prothymosin, alpha (gene sequence 28)	1	1	1
yscS	LOC100133233	1	2	LOC100133233 hypothetical protein LOC100133233	1	1	1
yscX	DPM1	1	2	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1	1	1	1
yscR	SPTBN1	1	2	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	1	1	1
yopO	GTPBP8	1	2	GTP-binding protein 8 (putative)	1	1	1
yopO	HAT1	1	2	histone acetyltransferase 1	1	1	1
yopO	LOC728944	1	2	similar to THAP domain-containing protein 4	1	1	1
yopO	HADHB	1	2	hydroxyacyl-CoenzymeA dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme	1	1	1
yopO	COL1A1	1	2	collagen, type I, alpha 1	1	1	1
yopO	CPT2	1	2	carnitine palmitoyltransferase II	1	1	1
yopO	CSNK1G2	1	2	casein kinase 1, gamma 2	1	1	1
yopO	CYB5D2	1	2	cytochrome b5 domain containing 2	1	1	1
yopO	EPS15L1	1	2	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1	1	1	1
yopO	FAAH	1	2	fatty acid amide hydrolase	1	1	1
yopO	FBXO42	1	2	F-box protein 42	1	1	1
yopO	POLR3F	1	2	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide F, 39 kDa	1	1	1
yopO	PPP2R5A	1	2	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', alpha isoform	1	1	1
yopO	RASSF8	1	2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 8	1	1	1
yopO	SERPINF1	1	2	serpin peptidase inhibitor, clade F	1	1	1
yopO	PFN1	1	2	profilin 1	1	1	1
yopN	GPX4	1	2	glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)	1	1	1
yopN	MED23	1	2	MED23 mediator complex subunit 23 [ Homo sapiens ]	1	1	1
yopN	MGC88374	1	2	similar to CG32662-PA	1	1	1
yopN	DNAJC17	1	2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 17	1	1	1
yopO	CAND1	1	2	cullin-associated and neddylation-dissociated 1	1	1	1
yopO	ATF5	1	2	activating transcription factor 5	1	1	1
yopN	na-Hs.688517	1	2		1	1	1
yopN	PLCD1	1	2	phospholipase C, delta 1	1	1	1
yopN	RAB33B	1	2	RAB33B, member RAS oncogene family	1	1	1
yopN	SDHA	1	2	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	1	1	1
yopO	CMPK1	1	2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1, cytosolic	1	1	1
yopN	SAP30BP	1	2	SAP30 binding protein	1	1	1
yopP	TCEAL8	1	2	transcription elongation factor A (SII)-like 8	1	1	1
yopP	SIGLEC14	1	2	sialic acid binding Ig-like lectin 14	1	1	1
yopP	RBMS3	1	2	RNA binding motif, single stranded interacting protein	1	1	1
yopT	C10orf104	1	2	chromosome 10 open reading frame 104	1	1	1
yopT	C1orf181	1	2	chromosome 1 open reading frame 181	1	1	1
yopT	CHST9	1	2	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 9	1	1	1
yopQ	SIGLEC14	1	2	sialic acid binding Ig-like lectin 14	1	1	1

yopP	CES7	1	2	carboxylesterase 7	1	1	1
yopO	THAP4	1	2	THAP domain containing 4	1	1	1
yopP	MGST3	1	2	microsomal glutathione S-transferase 3	1	1	1
Orf73	IGJ	1	3	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha	1	1	1
yopM	CDC2L2	1	3	cell division cycle 2-like 2 (PITSLRE proteins)	1	1	1
yopE	POLR2J4	1	3	POLR2J4 polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide	1	1	1
Orf73	MT-ND5	1	3	ND5 NADH dehydrogenase subunit 5 ;	1	1	1
yopE	LOC100129578	1	3	LOC100129578 similar to RING zinc finger LIM domain binding protein	1	1	1
yopM	HIST2H2AA3	1	3	histone cluster 2, H2aa3	1	1	1
yopM	ZNF268	1	3	zinc finger protein 268	1	1	1
yopM	ZNF155	1	3	zinc finger protein 155	1	1	1
lcrD	SRGN	1	3	serglycin	1	1	1
lcrD	RPL23	1	3	ribosomal protein L23	1	1	1
Orf134	MALAT1	1	3	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1	1	1	1
yopN	ARPC3	1	3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa	1	1	1
Orf155	IGJ	1	3	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha	1	1	1
yopM	SDHD	1	3	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	1	1	1
yopM	S100A10	1	3	S100 calcium binding protein A10	1	1	1
yopM	RPL18	1	3	ribosomal protein L18	1	1	1
yopM	HIST2H2AA4	1	3	histone cluster 2, H2aa4	1	1	1
yadA	RPL27A	1	3	ribosomal protein L27a	1	1	1
yopB	C6orf66	1	3	chromosome 6 open reading frame 66	1	1	1
yomA	HNRPH3	1	3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	1	1	1
yadA	NUCB2	1	3	nucleobindin 2	1	1	1
sych	NDUFA6	1	3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6	1	1	1
yadA	MALAT1	1	3	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1	1	1	1
yadA	FLJ44342	1	3	hypothetical LOC645460	1	1	1
Orf88	SRGN	1	3	serglycin	1	1	1
sych	SDCBP	1	3	syndecan binding protein (syntenin)	1	1	1
yopB	RSU1	1	3	Ras suppressor protein 1	1	1	1
yopB	RPS4X	1	3	ribosomal protein S4, X-linked	1	1	1
yopE	CEP170L	1	3	centrosomal protein 170kDa-like	1	1	1
yopB	FAM29A	1	3	family with sequence similarity 29, member A	1	1	1
yopB	PDXDC1	1	3	pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1	1	1	1
yopB	MT-ND5	1	3	ND5 NADH dehydrogenase subunit 5 ;	1	1	1
yscM1	CDC42SE1	1	3	CDC42 small effector 1	1	1	1
yscG	UBE2D2	1	3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2 (UBC4/5 homolog, yeast)	1	1	1
yscH	HNRPH3	1	3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	1	1	1
yscM2	BEX4	1	3	BEX family member 4 Homo sapiens	1	1	1
yscA	LAP3	1	3	leucine aminopeptidase 3	1	1	1
yopT	ZNF268	1	3	zinc finger protein 268	1	1	1
yscA	ST13	1	3	suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma)	1	1	1
yopT	na-Hs.591701	1	3		1	1	1

yopT	NR1H3	1	3	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	1	1	1
yopT	PUSL1	1	3	pseudouridylate synthase-like 1	1	1	1
yscE	OBSL1	1	3	obscurin-like 1	1	1	1
yscE	RPL18	1	3	ribosomal protein L18	1	1	1
yscD	PHB	1	3	prohibitin	1	1	1
yscE	GSN	1	3	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	1	1	1
yscM2	N4BP2L2	1	3	NEDD4 binding protein 2-like 2	1	1	1
yscX	RPS4X	1	3	ribosomal protein S4, X-linked	1	1	1
yscX	TSN	1	3	translin	1	1	1
yscY	NUCB2	1	3	nucleobindin 2	1	1	1
yscY	PRDX2	1	3	peroxiredoxin 2	1	1	1
yscY	RNPEPL1	1	3	arginylaminopeptidase (aminopeptidase B)-like 1	1	1	1
yscY	WDR61	1	3	WD repeat domain 61	1	1	1
yscX	LAP3	1	3	leucine aminopeptidase 3	1	1	1
yscY	LAP3	1	3	leucine aminopeptidase 3	1	1	1
yscY	M6PR	1	3	mannose-6-phosphate receptor (cation dependent)	1	1	1
yscO	WDR61	1	3	WD repeat domain 61	1	1	1
yscM2	SPOP	1	3	speckle-type POZ protein	1	1	1
yscM2	Q14Y83HUMAN	1	3	Mitochondrion: predicted : Cytochrome oxidase subunit III	1	1	1
yopO	FLOT1	1	3	flotillin 1	1	1	1
yopO	FBN1	1	3	fibrillin 1	1	1	1
yopO	PIAS4	1	3	protein inhibitor of activated STAT, 4	1	1	1
yopO	PUSL1	1	3	pseudouridylate synthase-like 1	1	1	1
yopO	RPL27A	1	3	ribosomal protein L27a	1	1	1
yopO	NR1H3	1	3	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	1	1	1
yopN	IGJ	1	3	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha	1	1	1
yopO	CNRIP1	1	3	chromosome 2 open reading frame 32	1	1	1
yopO	ACTN1	1	3	actinin, alpha 1	1	1	1
yopO	CAP1	1	3	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	1	1	1
yopP	PSMB2	1	3	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2	1	1	1
yopP	TMEM59	1	3	transmembrane protein 59	1	1	1
yopT	COMMD8	1	3	COMM domain containing 8	1	1	1
yopQ	TMEM59	1	3	transmembrane protein 59	1	1	1
yopT	ACTA2	1	3	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	1	1	1
yopP	CAP1	1	3	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	1	1	1
yopP	FAM29A	1	3	family with sequence similarity 29, member A	1	1	1
yopP	DNAJC13	1	3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13	1	1	1
yopO	UBE2E3	1	3	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	1	1	1
yopP	C14orf159	1	3	chromosome 14 open reading frame 159	1	1	1
yopP	N-PAC	1	3	cytokine-like nuclear factor n-pac	1	1	1
yopP	M6PR	1	3	mannose-6-phosphate receptor (cation dependent)	1	1	1
yopP	GCSH	1	3	glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)	1	1	1
yopP	LETMD1	1	3	LETM1 domain containing 1	1	1	1

yopP	NPHP3	1	3	nephronophthisis 3 (adolescent)	1	1	1
Orf73	HMOX1	1	4	heme oxygenase (decycling) 1	1	1	1
Orf73	ELMOD1	1	4	ELMO domain-containing protein 1.	1	1	1
Orf73	COX4I1	1	4	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	1	1	1
yopE	na-Hs.587644	1	4	No description	1	1	1
yopE	MT-ND4L	1	4	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4L	1	1	1
lcrD	RTN3	1	4	reticulon 3	1	1	1
yopM	ZXDC	1	4	ZXD family zinc finger C	1	1	1
yopM	HMOX1	1	4	heme oxygenase (decycling) 1	1	1	1
Orf155	CCT5	1	4	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	1	1	1
spyA	UQCRH	1	4	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	1	1	1
spyB2	CD14	1	4	CD14 molecule	1	1	1
yadA	PTTG2	1	4	pituitary tumor-transforming 2	1	1	1
Orf92	FKBP2	1	4	FK506 binding protein 2, 13kDa	1	1	1
yadA	CCT5	1	4	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	1	1	1
spyB2	MYC	1	4	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	1	1	1
spyB2	RPS7	1	4	ribosomal protein S7	1	1	1
yadA	MAGEA2B	1	4	melanoma antigen family A, 2B	1	1	1
yopE	DYNLL1	1	4	dynein, light chain, LC8-type 1	1	1	1
yopB	FUBP3	1	4	far upstream element (FUSE) binding protein 3	1	1	1
yopB	ELMOD1	1	4	ELMO domain-containing protein 1.	1	1	1
yopB	ND5	1	4	NADH dehydrogenase subunit 5	1	1	1
yscG	HMOX1	1	4	heme oxygenase (decycling) 1	1	1	1
yopT	TNRC6A	1	4	trinucleotide repeat containing 6A	1	1	1
yopT	na-Hs.587644	1	4	No description	1	1	1
yscE	HDLBP	1	4	high density lipoprotein binding protein (vigilin)	1	1	1
yscY	CCT5	1	4	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	1	1	1
yscO	CCT5	1	4	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	1	1	1
yscM2	SMARCB1	1	4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin	1	1	1
yscO	NEK2	1	4	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	1	1	1
yscM2	PSMA7	1	4	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	1	1	1
yscM2	RPL30	1	4	ribosomal protein L30	1	1	1
yscO	ZMYM2	1	4	zinc finger, MYM-type 2	1	1	1
yscS	GATAD2B	1	4	GATA zinc finger domain containing 2B	1	1	1
yopO	GLUL	1	4	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	1	1	1
yopO	DGCR6	1	4	DiGeorge syndrome critical region gene 6	1	1	1
yopO	RARRES2	1	4	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	1	1	1
yopO	RAB11A	1	4	RAB11A, member RAS oncogene family	1	1	1
yopO	NEK2	1	4	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	1	1	1
yopO	MBD4	1	4	methyl-CpG binding domain protein 4	1	1	1
yopN	HK1	1	4	hexokinase 1	1	1	1
yopN	LOC653786	1	4	similar to otoancorin isoform 2	1	1	1
yopN	ELMOD1	1	4	ELMO domain-containing protein 1	1	1	1

yopN	ZCRB1	1	4	zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1	1	1	1
yopO	SMARCB1	1	4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator	1	1	1
yopN	RPL11	1	4	ribosomal protein L11	1	1	1
yopP	ZCRB1	1	4	zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1	1	1	1
yopQ	ELMOD1	1	4	ELMO domain-containing protein 1.	1	1	1
yopP	RHOA	1	4	ras homolog gene family, member A	1	1	1
yopO	ZMYM2	1	4	zinc finger, MYM-type 2	1	1	1
yopM	FLNA	1	5	filamin A, alpha (actin binding protein 280)	1	1	1
Orf73	NCOR1	1	5	nuclear receptor co-repressor 1	1	1	1
yopM	ATP5O	1	5	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	1	1	1
yopE	RPL31	1	5	ribosomal protein L31	1	1	1
lcrD	REEP5	1	5	receptor accessory protein 5	1	1	1
lcrD	CD63	1	5	CD63 molecule	1	1	1
yopN	B2M	1	5	beta-2-microglobulin	1	1	1
Orf155	TPT1	1	5	tumor protein, translationally-controlled 1	1	1	1
Orf155	TXN2	1	5	thioredoxin 2	1	1	1
Orf134	PNMA2	1	5	Paraneoplastic antigen Ma2 (Onconeural antigen MA2)	1	1	1
Orf155	ARHGAP15	1	5	Rho GTPase activating protein 15	1	1	1
yopM	RPL38	1	5	ribosomal protein L38	1	1	1
spyB	TOX4	1	5	TOX high mobility group box family member 4	1	1	1
yopB	ARHGAP15	1	5	Rho GTPase activating protein 15	1	1	1
tyeA	na-Hs.615795	1	5	No description	1	1	1
yadA	HLA-B	1	5	major histocompatibility complex, class I, B	1	1	1
Orf88	PTPN6	1	5	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	1	1	1
Orf88	HLA-B	1	5	major histocompatibility complex, class I, B	1	1	1
Orf88	RPL9	1	5	ribosomal protein L9	1	1	1
yscI	na-Hs.615795	1	5	No description	1	1	1
yscH	OAZ1	1	5	ornithine decarboxylase antizyme 1	1	1	1
yscH	RPSA	1	5	ribosomal protein SA	1	1	1
yscD	B2M	1	5	beta-2-microglobulin	1	1	1
yscD	CENPC1	1	5	centromere protein C 1	1	1	1
yscE	GPS2	1	5	G protein pathway suppressor 2	1	1	1
yscY	DEFA3	1	5	defensin, alpha 3, neutrophil-specific	1	1	1
yscY	FCN1	1	5	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	1	1	1
yscX	na-Hs.615795	1	5	No description	1	1	1
yscX	RPSA	1	5	ribosomal protein SA	1	1	1
yscY	HBA1	1	5	hemoglobin, alpha 1	1	1	1
yopO	CENPC1	1	5	centromere protein C 1	1	1	1
yopN	EEF1D	1	5	eukaryotic translation elongation factor 1 delta	1	1	1
yopO	ARHGAP15	1	5	Rho GTPase activating protein 15	1	1	1
yopN	PCGF5	1	5	polycomb group ring finger 5	1	1	1
yopP	TCAP	1	5	titin-cap (telethonin)	1	1	1
yopT	CENPC1	1	5	centromere protein C 1	1	1	1

yopP	NPC2	1	5	Niemann-Pick disease, type C2	1	1	1
yopQ	PNMA2	1	5	Paraneoplastic antigen Ma2	1	1	1
yopP	FEZ1	1	5	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)	1	1	1

## Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas für die Überlassung des Themas, für die zahlreichen Anregungen und Ideen zu dieser Arbeit, seine Gesprächsbereitschaft und Motivierung, sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und seinen Mitarbeitern für die exzellente Betreuung und die Hilfe bei der Durchführung einer Reihe von Experimenten.

Ich danke Herrn Dr. Reinhard Hoffmann für die Mitbetreuung dieses Themas und für die Korrektur des Manuskriptes.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Manfred Koegl und seinen Mitarbeitern für die sehr gute Zusammenarbeit bei etlichen Experimenten und beim Erstellen der Publikation, sowie für die Diskussionsbereitschaft und die Durchsicht des Manuskripts.

Ich danke Herrn Dr. Thorsten Stellenberger und Herrn Dr. P Uetz für die Hilfe bei den Hefe-2-Hybridcreens und Frau Dr. Caroline Friedel und Herrn Prof. Ralf Zimmer für die bioinformatische Auswertung der Daten.

Bei Frau Prof. Dr. Angelika Böttger bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit, die kritische Durchsicht des Manuskriptes, und das Vertreten dieser Arbeit vor der Fakultät für Biologie der LMU.

Bei Frau Dr. Susanne M. Bailer bedanke ich mich für die Korrektur des Manuskriptes.

Ein besonderer Dank gilt auch insbesondere allen Kollegen im Labor, in der Arbeitsgruppe und am Max-von-Pettenkofer Institut für die gute Arbeitsatmosphäre und die tolle Zeit, auch außerhalb des Labors.

Meinen Freunden, insbesondere Arnulf Ritter und Edler von Dall'Armi möchte ich ganz besonderes danken für die unzählige Unterstützungen bei dieser Doktorarbeit und während all diesen Jahren in Deutschland.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, meinem Vater und meiner Schwester, danke ich ganz besonders für die gewährte Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit.

Ein ganz großes Dankeschön für alles geht natürlich an meinen Man Irakli, der mich den ganzen Weg als „Mitleidender“ begleitet hat.

**Lebenslauf:**

Geburtsdatum: 04.10.1976  
Geburtsort: Tbilisi/ Georgien

09/1982-06/1993 Mittelschule 161, Tbilisi  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

08/1993-08/1997 Georgische Technische Universität Tbilisi  
Fakultät für Chemische und Biologische Technologie

08/1997-08/1998 Au-Pair Aufenthalt in Deutschland/München

08/1998-06/1999 Sprachstudentin der Deutschkurse für Ausländer an der LMU München  
Deutsche Sprachprüfung für den Hochschulzugang Ausländischer Studienbewerber (DSH)

10/1999-bis 23/2006 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

02/2005-11/2005 Diplomarbeit:  
Prof. Dr. C.N. David, Ph. Dr. Angelika Böttger, Lehrstuhl für Zellbiologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Thema: „Der Einfluss des Notch-Signalweges auf die Zellproliferation und-Differenzierung in Hydra“.

02/2006-05/2006 Abschlussprüfungen in dem Fach Zoologie (Zellbiologische Richtung), und den Nebenfächern Biochemie, Humangenetik, Medizinische Mikrobiologie an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

07/2006-07/2011 Promotion bei Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas,  
am Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

## Literaturverzeichnis

1. Brubaker, R.R. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to Yersiniae: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect. Immun.* **71**, 3673-3681 (2003).
2. Perry, R.D. & Fetherston, J.D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in Yersinia pestis pathogenesis. *Microbes. Infect.* (2011).
3. Inglesby, T.V. *et al.* Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA* **283**, 2281-2290 (2000).
4. Black, R.E. *et al.* Epidemic Yersinia enterocolitica infection due to contaminated chocolate milk. *N. Engl. J Med* **298**, 76-79 (1978).
5. Shayegani, M., DeForge, I., McGlynn, D.M., & Root, T. Characteristics of Yersinia enterocolitica and related species isolated from human, animal, and environmental sources. *J Clin. Microbiol* **14**, 304-312 (1981).
6. Bliska, J.B., Copass, M.C., & Falkow, S. The Yersinia pseudotuberculosis adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infect. Immun.* **61**, 3914-3921 (1993).
7. Cornelis, G.R. The Yersinia deadly kiss. *J Bacteriol.* **180**, 5495-5504 (1998).
8. Leong, J.M., Fournier, R.S., & Isberg, R.R. Identification of the integrin binding domain of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein. *EMBO J* **9**, 1979-1989 (1990).
9. Dequeker, J., Jamar, R., & Walravens, M. HLA-B27, arthritis and Yersinia enterocolitica infection. *J Rheumatol.* **7**, 706-710 (1980).
10. Winblad, S. Erythema nodosum associated with infection with Yersinia enterocolitica. *Scand. J Infect. Dis.* **1**, 11-16 (1969).
11. Heesemann, J. [The typhus bacillus of the mouse and its importance for humans]. *Immun. Infekt.* **22**, 3 (1994).
12. Cornelis, G.R. Yersinia type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol.* **158**, 401-408 (2002).
13. Cornelis, G.R. The Yersinia Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol* **291**, 455-462 (2002).
14. Foulter, B. & Cornelis, G.R. DNA sequence and analysis of the pYVa127/90 virulence plasmid of Yersinia enterocolitica strain A127/90. *Res. Microbiol* **154**, 553-557 (2003).
15. Isberg, R.R. & Barnes, P. Subversion of integrins by enteropathogenic Yersinia. *J Cell Sci* **114**, 21-28 (2001).

16. Cornelis, G.R. The Yersinia Yop virulon, a bacterial system to subvert cells of the primary host defense. *Folia Microbiol (Praha)* **43**, 253-261 (1998).
17. Pujol, C. & Bliska, J.B. Turning Yersinia pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin. Immunol.* **114**, 216-226 (2005).
18. Tahir, Y.E., Kuusela, P., & Skurnik, M. Functional mapping of the Yersinia enterocolitica adhesin YadA. Identification Of eight NSV. *Mol. Microbiol* **37**, 192-206 (2000).
19. Flugel, A. *et al.* 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 (1994).
20. Deuretzbacher, A. *et al.* Beta1 integrin-dependent engulfment of Yersinia enterocolitica by macrophages is coupled to the activation of autophagy and suppressed by type III protein secretion. *J Immunol.* **183**, 5847-5860 (2009).
21. Schulze-Koops, H. *et al.* Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect. Immun.* **61**, 2513-2519 (1993).
22. Cornelis, G.R. The Yersinia Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 742-752 (2002).
23. Cornelis, G.R. The Yersinia Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol* **291**, 455-462 (2002).
24. Mueller, C.A. *et al.* The V-antigen of Yersinia forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* **310**, 674-676 (2005).
25. Cornelis, G.R. Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. *Philos. Trans. R Soc Lond B Biol. Sci* **355**, 681-693 (2000).
26. Cornelis, G.R. Molecular and cell biology aspects of plague. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **97**, 8778-8783 (2000).
27. Galan, J.E. & Wolf-Watz, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**, 567-573 (2006).
28. Troisfontaines, P. & Cornelis, G.R. Type III secretion: more systems than you think. *Physiology. (Bethesda. )* **20**, 326-339 (2005).
29. Sory, M.P. & Cornelis, G.R. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from Yersinia enterocolitica into HeLa cells. *Mol. Microbiol* **14**, 583-594 (1994).
30. Rosqvist, R., Forsberg, A., & Wolf-Watz, H. Intracellular targeting of the Yersinia YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* **59**, 4562-4569 (1991).

31. Rosqvist,R., Forsberg,A., & Wolf-Watz,H. Microinjection of the Yersinia YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Biochem. Soc Trans.* **19**, 1131-1132 (1991).
32. Viboud,G.I., So,S.S., Ryndak,M.B., & Bliska,J.B. Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with Yersinia pseudotuberculosis. *Mol. Microbiol* **47**, 1305-1315 (2003).
33. Schotte,P. *et al.* Targeting Rac1 by the Yersinia effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J Biol. Chem.* **279**, 25134-25142 (2004).
34. Cornelis,G.R. Yersinia type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol.* **158**, 401-408 (2002).
35. Cornelis,G.R. The Yersinia Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol* **291**, 455-462 (2002).
36. Shao,F. *et al.* Biochemical characterization of the Yersinia YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **100**, 904-909 (2003).
37. Shao,F. & Dixon,J.E. YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. *Adv. Exp. Med Biol.* **529**, 79-84 (2003).
38. Fueller,F., Bergo,M.O., Young,S.G., Aktories,K., & Schmidt,G. Endoproteolytic processing of RhoA by Rce1 is required for the cleavage of RhoA by Yersinia enterocolitica outer protein T. *Infect. Immun.* **74**, 1712-1717 (2006).
39. Aepfelbacher,M. Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of Yersinia. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* **152**, 65-77 (2004).
40. Aepfelbacher,M., Zumbihl,R., & Heesemann,J. Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by YopT of Yersinia. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* **291**, 167-175 (2005).
41. Fallman,M., Persson,C., & Wolf-Watz,H. Yersinia proteins that target host cell signaling pathways. *J Clin. Invest* **99**, 1153-1157 (1997).
42. Barz,C., Abahji,T.N., Trulzsch,K., & Heesemann,J. The Yersinia Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* **482**, 139-143 (2000).
43. Dukuzumuremyi,J.M. *et al.* The Yersinia protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol. Chem.* **275**, 35281-35290 (2000).
44. Juris,S.J., Rudolph,A.E., Huddler,D., Orth,K., & Dixon,J.E. A distinctive role for the Yersinia protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **97**, 9431-9436 (2000).

45. Trsak,C. *et al.* Yersinia protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process. *J Biol. Chem.* **282**, 2268-2277 (2007).
46. Juris,S.J., Shao,F., & Dixon,J.E. Yersinia effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol* **4**, 201-211 (2002).
47. Mills,S.D. *et al.* Yersinia enterocolitica induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **94**, 12638-12643 (1997).
48. Monack,D.M., Meccas,J., Ghori,N., & Falkow,S. Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **94**, 10385-10390 (1997).
49. Ruckdeschel,K. *et al.* Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp. Med* **187**, 1069-1079 (1998).
50. Zhang,Y., Ting,A.T., Marcu,K.B., & Bliska,J.B. Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with Yersinia. *J Immunol.* **174**, 7939-7949 (2005).
51. Zhang,Y. & Bliska,J.B. Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of Yersinia. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* **289**, 151-173 (2005).
52. Adkins,I. *et al.* Yersinia outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. *Int J Med Microbiol* **297**, 235-244 (2007).
53. Erfurth,S.E. *et al.* Yersinia enterocolitica induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect. Immun.* **72**, 7045-7054 (2004).
54. Boland,A. & Cornelis,G.R. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect. Immun.* **66**, 1878-1884 (1998).
55. Orth,K. *et al.* Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* **285**, 1920-1923 (1999).
56. Ruckdeschel,K. *et al.* Yersinia enterocolitica promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production. *J Biol. Chem.* **272**, 15920-15927 (1997).
57. Ruckdeschel,K. *et al.* Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp. Med* **187**, 1069-1079 (1998).

58. Viboud,G.I. & Bliska,J.B. Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol* **59**, 69-89 (2005).
59. Yoon,S., Liu,Z., Eyobo,Y., & Orth,K. Yersinia effector YopJ inhibits yeast MAPK signaling pathways by an evolutionarily conserved mechanism. *J Biol. Chem.* **278**, 2131-2135 (2003).
60. Orth,K. Function of the Yersinia effector YopJ. *Curr. Opin. Microbiol* **5**, 38-43 (2002).
61. Palmer,L.E., Hobbie,S., Galan,J.E., & Bliska,J.B. YopJ of Yersinia pseudotuberculosis is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol. Microbiol* **27**, 953-965 (1998).
62. Ruckdeschel,K., Mannel,O., & Schrottner,P. Divergence of apoptosis-inducing and preventing signals in bacteria-faced macrophages through myeloid differentiation factor 88 and IL-1 receptor-associated kinase members. *J Immunol.* **168**, 4601-4611 (2002).
63. Boland,A. & Cornelis,G.R. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect. Immun.* **66**, 1878-1884 (1998).
64. Mukherjee,S. *et al.* Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**, 1211-1214 (2006).
65. Guan,K.L. & Dixon,J.E. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in Yersinia. *Science* **249**, 553-556 (1990).
66. Persson,C. *et al.* Localization of the Yersinia PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. *Mol. Microbiol* **33**, 828-838 (1999).
67. Ivanov,M.I., Stuckey,J.A., Schubert,H.L., Saper,M.A., & Bliska,J.B. Two substrate-targeting sites in the Yersinia protein tyrosine phosphatase co-operate to promote bacterial virulence. *Mol. Microbiol* **55**, 1346-1356 (2005).
68. Hamid,N. *et al.* YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb. Pathog* **27**, 231-242 (1999).
69. Black,D.S. & Bliska,J.B. Identification of p130Cas as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J* **16**, 2730-2744 (1997).
70. Persson,C., Carballeira,N., Wolf-Watz,H., & Fallman,M. The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* **16**, 2307-2318 (1997).
71. Bolin,I. & Wolf-Watz,H. The plasmid-encoded Yop2b protein of Yersinia pseudotuberculosis is a virulence determinant regulated by calcium and temperature at the level of transcription. *Mol. Microbiol* **2**, 237-245 (1988).

72. Rosqvist,R., Bolin,I., & Wolf-Watz,H. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infect. Immun.* **56**, 2139-2143 (1988).
73. Sauvonnet,N., Lambermont,I., van der,B.P., & Cornelis,G.R. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol. Microbiol* **45**, 805-815 (2002).
74. Evdokimov,A.G., Anderson,D.E., Routzahn,K.M., & Waugh,D.S. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J Mol. Biol.* **312**, 807-821 (2001).
75. Trulzsch,K., Sporleder,T., Igwe,E.I., Russmann,H., & Heesemann,J. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect. Immun.* **72**, 5227-5234 (2004).
76. Ruter,C., Buss,C., Scharnert,J., Heusipp,G., & Schmidt,M.A. A newly identified bacterial cell-penetrating peptide that reduces the transcription of pro-inflammatory cytokines. *J Cell Sci* **123**, 2190-2198 (2010).
77. Benabdillah,R., Mota,L.J., Lutzelschwab,S., Demoinet,E., & Cornelis,G.R. Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. *Microb. Pathog* **36**, 247-261 (2004).
78. Skrzypek,E., Cowan,C., & Straley,S.C. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol. Microbiol* **30**, 1051-1065 (1998).
79. Skrzypek,E., Myers-Morales,T., Whiteheart,S.W., & Straley,S.C. Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eucaryotic cells. *Infect. Immun.* **71**, 937-947 (2003).
80. McDonald,C., Vacratsis,P.O., Bliska,J.B., & Dixon,J.E. The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol. Chem.* **278**, 18514-18523 (2003).
81. Hentschke,M. *et al.* *Yersinia* virulence factor YopM induces sustained RSK activation by interfering with dephosphorylation. *PLoS One.* **5**, (2010).
82. Reisner,B.S. & Straley,S.C. *Yersinia pestis* YopM: thrombin binding and overexpression. *Infect. Immun.* **60**, 5242-5252 (1992).
83. Sauvonnet,N., Pradet-Balade,B., Garcia-Sanz,J.A., & Cornelis,G.R. Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J Biol. Chem.* **277**, 25133-25142 (2002).
84. Hoffmann,R., van,E.K., Trulzsch,K., & Heesemann,J. Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol* **6**, 377-390 (2004).
85. Viboud,G.I. & Bliska,J.B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol* **59**, 69-89 (2005).

86. Kalvakolanu,D.V. & Borden,E.C. An overview of the interferon system: signal transduction and mechanisms of action. *Cancer Invest* **14**, 25-53 (1996).
87. Hacker,H. & Karin,M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. **2006**, re13 (2006).
88. Yoneyama,M. *et al.* Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* **17**, 1087-1095 (1998).
89. Lin,R., Heylbroeck,C., Pitha,P.M., & Hiscott,J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell Biol.* **18**, 2986-2996 (1998).
90. Schafer,S.L., Lin,R., Moore,P.A., Hiscott,J., & Pitha,P.M. Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3. *J Biol. Chem.* **273**, 2714-2720 (1998).
91. Marie,I., Durbin,J.E., & Levy,D.E. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* **17**, 6660-6669 (1998).
92. Doyle,S. *et al.* IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity*. **17**, 251-263 (2002).
93. Perry,A.K., Chen,G., Zheng,D., Tang,H., & Cheng,G. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res.* **15**, 407-422 (2005).
94. Uze,G., Lutfalla,G., & Gresser,I. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* **60**, 225-234 (1990).
95. Domanski,P. *et al.* Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *J Biol. Chem.* **270**, 21606-21611 (1995).
96. Uze,G., Lutfalla,G., & Gresser,I. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* **60**, 225-234 (1990).
97. Colamonici,O.R., Uyttendaele,H., Domanski,P., Yan,H., & Krolewski,J.J. p135tyk2, an interferon-alpha-activated tyrosine kinase, is physically associated with an interferon-alpha receptor. *J Biol. Chem.* **269**, 3518-3522 (1994).
98. Yan,H., Krishnan,K., Lim,J.T., Contillo,L.G., & Krolewski,J.J. Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFNaR1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2074-2082 (1996).
99. Domanski,P. *et al.* A region of the beta subunit of the interferon alpha receptor different from box 1 interacts with Jak1 and is sufficient to activate the Jak-Stat pathway and induce an antiviral state. *J Biol. Chem.* **272**, 26388-26393 (1997).

100. Briscoe, J. *et al.* JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines. *Philos. Trans. R Soc Lond B Biol. Sci* **351**, 167-171 (1996).
101. Gauzzi, M.C. *et al.* Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol. Chem.* **271**, 20494-20500 (1996).
102. Veals, S.A. *et al.* Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3315-3324 (1992).
103. Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., & Stark, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421 (1994).
104. Jeschke, M.G. *et al.* Cell proliferation, apoptosis, NF-kappaB expression, enzyme, protein, and weight changes in livers of burned rats. *Am. J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **280**, G1314-G1320 (2001).
105. Kim, G.M. *et al.* Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci.* **21**, 6617-6625 (2001).
106. Baeuerle, P.A. & Baltimore, D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**, 13-20 (1996).
107. Brivanlou, A.H. & Darnell, J.E., Jr. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* **295**, 813-818 (2002).
108. Baud, V. & Karin, M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 33-40 (2009).
109. Fujita, F. *et al.* Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7780-7793 (2003).
110. Ghosh, S., May, M.J., & Kopp, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-260 (1998).
111. Pomerantz, J.L. & Baltimore, D. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J* **18**, 6694-6704 (1999).
112. Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 621-663 (2000).
113. Burke, J.R. Targeting I kappa B kinase for the treatment of inflammatory and other disorders. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **6**, 720-728 (2003).

114. Fan, C. *et al.* IkappaBalpha and IkappaBbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-kappaB induction and inflammation. *J Clin. Invest* **113**, 746-755 (2004).
115. Tojima, Y. *et al.* NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* **404**, 778-782 (2000).
116. Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., & Siebenlist, U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* **267**, 1485-1488 (1995).
117. Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., & Karin, M. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* **284**, 309-313 (1999).
118. Kishore, N. *et al.* IKK-i and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2: comparative analysis of recombinant human IKK-i, TBK-1, and IKK-2. *J Biol. Chem.* **277**, 13840-13847 (2002).
119. Fitzgerald, K.A. *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp. Med* **198**, 1043-1055 (2003).
120. Jeong, H., Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z.N., & Barabasi, A.L. The large-scale organization of metabolic networks. *Nature* **407**, 651-654 (2000).
121. Barabasi, A.L. & Oltvai, Z.N. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 101-113 (2004).
122. Albert, R., Jeong, H., & Barabasi, A.L. Error and attack tolerance of complex networks. *Nature* **406**, 378-382 (2000).
123. Yu, H., Kim, P.M., Sprecher, E., Trifonov, V., & Gerstein, M. The importance of bottlenecks in protein networks: correlation with gene essentiality and expression dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e59 (2007).
124. Girvan, M. & Newman, M.E. Community structure in social and biological networks. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **99**, 7821-7826 (2002).
125. Butland, G. *et al.* Interaction network containing conserved and essential protein complexes in Escherichia coli. *Nature* **433**, 531-537 (2005).
126. Uetz, P. *et al.* A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae. *Nature* **403**, 623-627 (2000).
127. Ito, T., Tashiro, K., & Kuhara, T. [Systematic analysis of Saccharomyces cerevisiae genome: gene network and protein-protein interaction network]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **46**, 2407-2413 (2001).
128. Rain, J.C. *et al.* The protein-protein interaction map of Helicobacter pylori. *Nature* **409**, 211-215 (2001).
129. Giot, L. *et al.* A protein interaction map of Drosophila melanogaster. *Science* **302**, 1727-1736 (2003).

130. Li, S. *et al.* A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* **303**, 540-543 (2004).
131. LaCount, D.J. *et al.* A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **438**, 103-107 (2005).
132. Kuhner, S. *et al.* Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science* **326**, 1235-1240 (2009).
133. Rual, J.F. *et al.* Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**, 1173-1178 (2005).
134. Stelzl, U. *et al.* A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**, 957-968 (2005).
135. Uetz, P. *et al.* Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* **311**, 239-242 (2006).
136. Barrios-Rodiles, M. *et al.* High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* **307**, 1621-1625 (2005).
137. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
138. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498-2504 (2003).
139. Dyer, M.D., Murali, T.M., & Sobral, B.W. The landscape of human proteins interacting with viruses and other pathogens. *PLoS Pathog* **4**, e32 (2008).
140. Mukai, H. The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. *J Biochem.* **133**, 17-27 (2003).
141. Haraga, A. & Miller, S.I. A *Salmonella enterica* serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect. Immun.* **71**, 4052-4058 (2003).
142. Haraga, A. & Miller, S.I. A *Salmonella* type III secretion effector interacts with the mammalian serine/threonine protein kinase PKN1. *Cell Microbiol* **8**, 837-846 (2006).
143. Gao, Q. *et al.* PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein. *J Biol. Chem.* **275**, 14824-14830 (2000).
144. Trasak, C. *et al.* *Yersinia* protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process. *J Biol. Chem.* **282**, 2268-2277 (2007).
145. Wiley, D.J. *et al.* The Ser/Thr kinase activity of the *Yersinia* protein kinase A (YpkA) is necessary for full virulence in the mouse, mollifying phagocytes, and disrupting the eukaryotic cytoskeleton. *Microb. Pathog* **40**, 234-243 (2006).

146. Prehna,G., Ivanov,M.I., Bliska,J.B., & Stebbins,C.E. Yersinia virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* **126**, 869-880 (2006).
147. Fu,L.Y. *et al.* Suitable reference genes for real-time PCR in human HBV-related hepatocellular carcinoma with different clinical prognoses. *BMC. Cancer* **9**, 49 (2009).
148. Cornelis,G.R. *et al.* The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **62**, 1315-1352 (1998).
149. Thomson,N.R. *et al.* The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity Yersinia enterocolitica strain 8081. *PLoS Genet.* **2**, e206 (2006).
150. Parrish,J.R. *et al.* A proteome-wide protein interaction map for Campylobacter jejuni. *Genome Biol.* **8**, R130 (2007).
151. Gavin,A.C. *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147 (2002).
152. Ho,Y. *et al.* Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-183 (2002).
153. Boxem,M. *et al.* A protein domain-based interactome network for C. elegans early embryogenesis. *Cell* **134**, 534-545 (2008).
154. Bailer,S.M. & Haas,J. Connecting viral with cellular interactomes. *Curr. Opin. Microbiol* **12**, 453-459 (2009).
155. Braun,P. *et al.* An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions. *Nat. Methods* **6**, 91-97 (2009).
156. Stellberger,T. *et al.* Improving the yeast two-hybrid system with permuted fusions proteins: the Varicella Zoster Virus interactome. *Proteome. Sci* **8**, 8 (2010).
157. Stellberger,T. *et al.* Improving the yeast two-hybrid system with permuted fusions proteins: the Varicella Zoster Virus interactome. *Proteome. Sci* **8**, 8 (2010).
158. Ho,Y. *et al.* Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-183 (2002).
159. Fossum,E. *et al.* Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. *PLoS Pathog* **5**, e1000570 (2009).
160. Calderwood,M.A. *et al.* Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **104**, 7606-7611 (2007).
161. Uetz,P. *et al.* Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* **311**, 239-242 (2006).

162. Loregian,A. & Palu,G. Disruption of protein-protein interactions: towards new targets for chemotherapy. *J Cell Physiol* **204**, 750-762 (2005).
163. Nejedlik,L., Pierfelice,T., & Geiser,J.R. Actin distribution is disrupted upon expression of Yersinia YopO/YpkA in yeast. *Yeast* **21**, 759-768 (2004).
164. Diepold,A. *et al.* Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome. *EMBO J* **29**, 1928-1940 (2010).
165. Sauvonnet,N., Pradet-Balade,B., Garcia-Sanz,J.A., & Cornelis,G.R. Regulation of mRNA expression in macrophages after Yersinia enterocolitica infection. Role of different Yop effectors. *J Biol. Chem.* **277**, 25133-25142 (2002).
166. McCoy,M.W., Marre,M.L., Lesser,C.F., & Meccas,J. The C-terminal tail of Yersinia pseudotuberculosis YopM is critical for interacting with RSK1 and for virulence. *Infect. Immun.* **78**, 2584-2598 (2010).
167. McPhee,J.B., Mena,P., & Bliska,J.B. Delineation of regions of the Yersinia YopM protein required for interaction with the RSK1 and PRK2 host kinases and their requirement for interleukin-10 production and virulence. *Infect. Immun.* **78**, 3529-3539 (2010).
168. Kim,H.M. *et al.* Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* **130**, 906-917 (2007).
169. Uff,S., Clemetson,J.M., Harrison,T., Clemetson,K.J., & Emsley,J. Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib(alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation. *J Biol. Chem.* **277**, 35657-35663 (2002).
170. Auerbuch,V., Brockstedt,D.G., Meyer-Morse,N., O'Riordan,M., & Portnoy,D.A. Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. *J Exp. Med* **200**, 527-533 (2004).
171. Stanley,S.A., Johndrow,J.E., Manzanillo,P., & Cox,J.S. The Type I IFN response to infection with *Mycobacterium tuberculosis* requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis. *J Immunol.* **178**, 3143-3152 (2007).
172. Rayamajhi,M., Humann,J., Kearney,S., Hill,K.K., & Lenz,L.L. Antagonistic crosstalk between type I and II interferons and increased host susceptibility to bacterial infections. *Virulence.* **1**, 418-422 (2010).
173. Rayamajhi,M., Humann,J., Penheiter,K., Andreasen,K., & Lenz,L.L. Induction of IFN- $\alpha$  enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- $\gamma$ . *J Exp. Med* **207**, 327-337 (2010).
174. O'connell,R.M. *et al.* Immune activation of type I IFNs by *Listeria monocytogenes* occurs independently of TLR4, TLR2, and receptor interacting protein 2 but involves TNFR-associated NF kappa B kinase-binding kinase 1. *J Immunol.* **174**, 1602-1607 (2005).
175. Zhang,Y. & Bliska,J.B. Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to Yersinia infection. *Infect. Immun.* **71**, 1513-1519 (2003).

176. Haase,R. *et al.* A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J Immunol.* **171**, 4294-4303 (2003).
177. Sing,A. *et al.* Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp. Med* **196**, 1017-1024 (2002).
178. Brubaker,R.R. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to Yersiniae: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect. Immun.* **71**, 3673-3681 (2003).
179. Stanley,S.A., Johndrow,J.E., Manzanillo,P., & Cox,J.S. The Type I IFN response to infection with Mycobacterium tuberculosis requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis. *J Immunol.* **178**, 3143-3152 (2007).
180. Cheng,L.W., Anderson,D.M., & Schneewind,O. Two independent type III secretion mechanisms for YopE in Yersinia enterocolitica. *Mol. Microbiol* **24**, 757-765 (1997).
181. Michiels,T. & Cornelis,G.R. Secretion of hybrid proteins by the Yersinia Yop export system. *J Bacteriol.* **173**, 1677-1685 (1991).
182. Sory,M.P., Boland,A., Lambermont,I., & Cornelis,G.R. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **92**, 11998-12002 (1995).
183. Trcek,J., Wilharm,G., Jacobi,C.A., & Heesemann,J. Yersinia enterocolitica YopQ: strain-dependent cytosolic accumulation and post-translational secretion. *Microbiology* **148**, 1457-1465 (2002).
184. Goss,J.W., Sorg,J.A., Ramamurthi,K.S., Ton-That,H., & Schneewind,O. The secretion signal of YopN, a regulatory protein of the Yersinia enterocolitica type III secretion pathway. *J Bacteriol.* **186**, 6320-6324 (2004).
185. Ramamurthi,K.S. & Schneewind,O. Yersinia enterocolitica type III secretion: mutational analysis of the yopQ secretion signal. *J Bacteriol.* **184**, 3321-3328 (2002).
186. Ramamurthi,K.S. & Schneewind,O. Yersinia yopQ mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. *Mol. Microbiol* **50**, 1189-1198 (2003).
187. Dewoody,R., Merritt,P.M., Houppert,A.S., & Marketon,M.M. YopK regulates the Yersinia pestis type III secretion system from within host cells. *Mol. Microbiol* **79**, 1445-1461 (2011).
188. Dewoody,R., Merritt,P.M., Houppert,A.S., & Marketon,M.M. YopK regulates the Yersinia pestis type III secretion system from within host cells. *Mol. Microbiol* **79**, 1445-1461 (2011).
189. Cambronne,E.D., Sorg,J.A., & Schneewind,O. Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector yop expression in Yersinia enterocolitica. *J Bacteriol.* **186**, 829-841 (2004).

190. Ohlson, M.B. *et al.* Structure and function of Salmonella SifA indicate that its interactions with SKIP, SseJ, and RhoA family GTPases induce endosomal tubulation. *Cell Host. Microbe* **4**, 434-446 (2008).
191. Payne, P.L. & Straley, S.C. YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *J Bacteriol.* **180**, 3882-3890 (1998).

## Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

München den

Erklärung

Hiermit erkläre ich,

-dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

-dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München den