

Max von Pettenkofer Institut München

**Identifizierung und Funktionsanalyse
des hochkonservierten Virulenzfaktors
SopE2 aus *S. typhimurium***

Silke Stender

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer
2. Univ.-Prof. Dr. W.-D. Hardt, Eidgenössische
Technische Hochschule Zürich/Schweiz

Die Dissertation wurde am 29. Mai 2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 17. Juni 2002 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Nomenklatur	1
1.2	Pathogenese	2
1.3	Virulenzmechanismen	3
1.3.1	Typ III Sekretionssysteme (TSS)	4
1.3.2	Effektorproteine des TSS1	6
1.4	Signaltransduktionsprozesse der Zelle	7
1.4.1	Regulation zellulärer Prozesse durch kleine GTP-bindende Proteine	7
1.4.2	Invasionsmechanismen von <i>S. typhimurium</i>	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Geräte	13
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	14
2.3	Antikörper	15
2.3.1	Antikörper	15
2.3.2	Herstellung eines polyklonalen Antiserums in Kaninchen	15
2.4	Verwendete Zell-Linien, Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	16
2.5	Medien und Zusätze	19
2.6	Kulturbedingungen	20
2.6.1	Anzuchtbedingungen für bakterielle Kulturen	20
2.6.2	Herstellung elektrokompenter Bakterien	21
2.6.3	Nachweis von <i>S. typhimurium</i>	21
2.7	Molekularbiologische Methoden	21
2.7.1	Isolierung von Plasmid-DNS	21
2.7.2	Isolierung von chromosomaler DNS	22
2.7.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)	22
2.7.4	Restriktion von DNS und Klenow-Reaktion	22
2.7.5	DNS-Reinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation	23
2.7.6	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNS (CIP)	23
2.7.7	Agarose-Gel-Elektrophorese	23

2.7.8	Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen	24
2.7.9	Klonierung von DNS Fragmenten	24
2.7.10	DNS-Hybridisierungstechnik nach <i>Southern</i> (Southern, 1975)	24
2.7.11	Kolonie-Lift	25
2.7.12	Herstellung von Fluoreszein-markierten DNS-Sonden	25
2.7.13	Wiederverwendung von <i>Southern Blots</i>	26
2.7.14	Konjugation (Achtman et al., 1978)	26
2.7.15	DNS-Sequenzierung	26
2.8	Protein-Biochemische Methoden	27
2.8.1	Proteinfällungen	27
2.8.2	Zellaufschluß aus Rindermilz	27
2.8.3	Aufschluß von Bakterien	28
2.8.4	Aufreinigung rekombinanter Proteine	28
2.8.5	Aufreinigung nativer Proteine aus Rindermilz	29
2.8.6	Entfernung niedermolekularer Proteine durch Dialyse	29
2.8.7	Isolation SopE- und SopE2-bindender Proteine	30
2.8.8	Filterbindungsversuch	30
2.8.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.8.10	Protein-Färbungen	32
2.8.11	Quantitative Proteinbestimmung	33
2.8.12	Proteindetektion durch <i>Western Blot</i> -Analyse (Towbin et al., 1979)	33
2.8.13	Isoelektrische Fokussierung	33
2.8.14	Proteinspaltung mit Trypsin	34
2.8.15	Identifikation von Peptiden durch MALDI MS	35
2.9	Zellbiologische Methoden	35
2.9.1	Anzucht von Zellkulturzellen	35
2.9.2	Transfektion	36
2.9.3	Immunfluoreszenzfärbungen	36
2.9.4	Gentamicin Protektionsversuch	39
2.9.5	Passive Invasion von <i>S. typhimurium</i> SB161	39
2.9.6	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	39
2.9.7	Nachweis der Zytotoxizität in Makrophagen	40
2.10	Tierversuche	40
2.10.1	Infektionsversuche an Balb/c Mäusen	40
2.11	Bioinformatische Methoden	41

3	ERGEBNISSE	42
3.1	Das <i>sopE</i> homologe Virulenzgen <i>sopE2</i>	42
3.1.1	Identifizierung von <i>sopE2</i>	42
3.1.2	SopE2 ist im Gegensatz zu SopE in <i>S. typhimurium</i> -Stämmen stark konserviert	46
3.2	SopE2 ist ein Typ III sekretiertes und transloziertes Protein	50
3.2.1	Sekretion ins Kulturmedium	51
3.2.2	Translokation in Zytosol und Nukleus von COS7-Zellen	52
3.3	SopE2 ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für Cdc42	54
3.4	SopE- und SopE2-vermittelte Invasivität	55
3.4.1	<i>SopE2</i> Mutanten sind in ihrer Invasionseffizienz in Epithelzellen attenuiert	55
3.4.2	Ein SopE <i>SopE2</i> defizienter <i>S. typhimurium</i> Stamm ist <i>in vivo</i> noch infektiös.	57
3.5	Morphologische Auswirkung von SopE2 auf die Wirtszelle	59
3.5.1	SopE2 induziert Aktinzytoskelettwandlungen	59
3.5.2	SopE2 und SopE rekrutieren Arp2/3 Komplexe in Membranausstülpungen	61
3.5.3	SopE2 induziert elektronenmikroskopisch detektierbare Membranausstülpungen	62
3.5.4	SopE2 ist hinreichend, um in COS7-Epithelzellen Zytoskelettlagerungen und die Rekrutierung von Arp2/3 Komplexen zu induzieren	64
3.6	Der Einfluß von SopE2 auf die passive Internalisierung invasionsdefizienter Mutanten	66
3.6.1	SopE2 vermittelt die passive Internalisierung der invasions-defizienten <i>invG</i> Mutante	66
3.6.2	SopE2 ist hinreichend für die Internalisierung der invasions-defizienten <i>invG</i> Mutante	67
3.7	Zytotoxische Effekte von SopE und SopE2	70
3.8	Untersuchung des G-Nukleotid-Austauschs durch SopE und SopE2 an Rab GTPasen	70
3.9	<i>S. typhimurium</i> rekrutiert Arf6-Vesikel	72
3.10	Isolation und Identifizierung SopE2 bindender Proteine	76
3.10.1	Aus Rindermilz isolierte Bindungspartner von SopE2	76
3.10.2	Identifikation SopE2 bindender Proteine	78
4	DISKUSSION	80
4.1	Konservierung der homologen Effektorproteine SopE2 und SopE	80
4.2	Invasivität	82
4.3	Spezifität von SopE und SopE2 bei der Induktion von Signalwegen	85

4.4	Weitere identifizierte Bindungspartner von SopE und SopE2	90
4.5	<i>S. typhimurium</i> induziert die Rekrutierung von Arf6-Vesikeln	93
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	ANHANG	96
6.1	Peptidmassen aus MALDI-MS	96
6.2	<i>Salmonella</i> spp. Referenzsammlungen	102
7	ABKÜRZUNGEN	108
8	LITERATUR	109
9	PUBLIKATIONSLISTE	125
10	DANKSAGUNG	126
11	LEBENS LAUF	127

1 Einleitung

1.1 Nomenklatur

Salmonella spp. gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und wurden erstmals 1880 von Eberth beschrieben und 1884 von Gaffky kultiviert (Burrows 1959). Die Gattung *Salmonella* hat sich vor 100-160 Millionen Jahren von *Escherichia* und *Shigella* spp. abgespalten und hat in dieser Zeit die für die Virulenz wichtige *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (SPI1) aufgenommen. *Salmonella* spp. werden heute in zwei Spezies eingeteilt - *S. enterica* und *S. bongori* -, die sich u.a. durch die An- bzw. Abwesenheit der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 2 (SPI2) unterscheiden und sich vor ca. 35-40 Millionen Jahren voneinander abgespalten haben (Bäumler, 1997, Bäumler et al., 1998, Cotter and DiRita, 2000). Die weitere Unterteilung der Spezies *S. enterica* in die Subspezies I - VII (ohne V) folgt der Wirtsspezifität. Während die Subspezies I, zu der die Serovare Typhimurium (*S. typhimurium*) und Typhi (*S. typhi*) gehören, für Warmblüter pathogen sind, infizieren Vertreter der Subspezies II-VII vornehmlich Kaltblüter. Bisher sind 2400 Serovare bekannt, die nach dem Kaufmann-White-Schema durch serologische Identifizierung von O (Lipopolysaccharid)- und H (Flagellen)- Antigenen klassifiziert werden (Brenner et al., 2000). Aufgrund dieser verschiedenen Eigenschaften wurden sie ursprünglich als eigene Spezies bezeichnet (Popoff und Le Minor 1997).

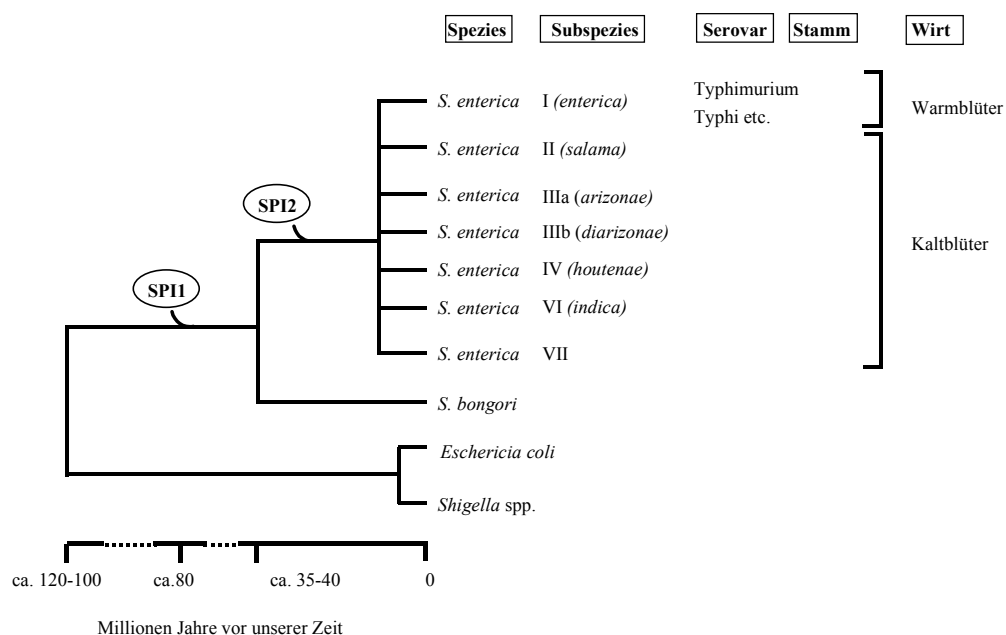


Abb. 1: Dendrogramm von *Salmonella* spp. (nach Cotter and DiRita, 2000).

Die Darstellung zeigt die phylogenetische Entwicklung der Gattung *Salmonella* und der Spezies *S. bongori* und *S. enterica*, sowie den Erwerb der für die Virulenz wichtigen Pathogenitätsinseln SPI1 und SPI2. Die Unterteilung in Subspezies und Serovare sowie ihre Wirtsspezifität sind dargestellt.

Die in dieser Arbeit verwendete Speziesbezeichnung *S. typhimurium* und *S. typhi* entsprechen daher strenggenommen nicht mehr den Regeln der Nomenklatur, da es sich bei diesen Bezeichnungen nicht um die Klassifizierung in eine Spezies sondern um eine detailliertere Bezeichnung von Serovaren einer Subspezies handelt. Zur Verbesserung der Lesbarkeit wurde in dieser Arbeit dennoch die auch in der Wissenschaft gebräuchliche Bezeichnung *S. typhimurium* bzw. *S. typhi* der korrekteren Schreibweise *S. enterica* Subspezies I Serovar Typhimurium bzw. Typhi vorgezogen. Zur Verdeutlichung der phylogenetischen Einordnung ist in Abb. 1 ein Dendrogramm der Gattung *Salmonella* dargestellt.

1.2 Pathogenese

Salmonella spp. gehören weltweit zu den häufigsten Verursachern gastrointestinaler Infektionen und fieberhafter Erkrankungen. Die WHO schätzte im Jahr 1996 die Zahl der an akuter Gastroenteritis erkrankten Menschen auf jährlich 1,3 Milliarden. Etwa 3 Millionen Menschen sterben jährlich an Gastroenteritis, 600 000 in Folge einer Infektion mit *S. typhi* (Pang et al., 1995, Pang et al., 1998). In den Industrieländern haben *Salmonella* spp. (insbesondere *S. typhimurium* und *S. enteritidis*) als häufigste Erreger gastrointestinaler Erkrankungen vor allem sozioökonomische Bedeutung (Mead et al., 1999). Die in der Maus durch *S. typhimurium* verursachte Pathogenese ähnelt stark dem Krankheitsbild des obligat humanpathogenen Erregers *S. typhi*. Daher wird in der experimentellen Infektionsbiologie für die Untersuchung der Pathogenese des Typhus *S. typhimurium* als Modellorganismus verwendet.

Die Infektion mit *S. typhimurium* erfolgt hauptsächlich über die orale Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln oder Wasser. Im Milieu des Darmes wird die Synthese von Virulenzfaktoren induziert, die das Überleben ermöglichen. *Salmonella* spp. invadieren im Verlauf der Infektion abhängig vom Wirtsorganismus in unterschiedliche Zellen. So wurde für *S. typhimurium* die Invasion in M-Zellen der Peyerschen Plaques, Enterocyten sowie auch in dendritische Zellen beschrieben (Jones et al., 1994, Frost et al., 1997, Bolton et al., 1999, Hopkins et al., 2000). Es wird vermutet, daß die intrazellulär lokalisierten Bakterien anschließend passiv von Makrophagen und dendritischen Zellen in Leber, Milz und andere lymphatische Gewebe transportiert werden. Bei dieser systemischen Infektion persistiert und repliziert *S. typhimurium* in den Phagozyten in diesen Organen.

1.3 Virulenzmechanismen

Bakterien nutzen eine Vielzahl von Mechanismen, um die komplexe Regulation der Wirtszelle zu manipulieren (siehe Tabelle 1). Voraussetzung z. B. für die Invasion vieler Bakterien in eukaryontische Zellen ist die Reorganisation des Zytoskeletts, die schließlich zur Makropinozytose oder rezeptorvermittelten Invasion des Prokaryonten führt (Tabelle 1). In diesem Zusammenhang werden zwei Mechanismen unterschieden: der Auslöse- (Trigger-) und der Reißverschluß- (Zipper-) Mechanismus. Für die Aufnahme durch den Auslöse-Mechanismus ist der permanente enge Kontakt der Bakterien mit der Wirtszelle nicht notwendig, stattdessen werden sogenannte Effektorproteine sekretiert bzw. in die Wirtszelle transloziert. In Folge bilden sich große faltenförmige Membranausstülpungen und die Bakterien werden internalisiert. Ein solcher Mechanismus der Invasion wurde außer bei *Salmonella* spp. z. B. auch bei *Shigella* spp. und enteropathogenen *E. coli* beobachtet. Beim Reißverschluß-Mechanismus stellen Oberflächenproteine der Bakterien dagegen einen engen Kontakt mit den Rezeptoren der Wirtszelle her und werden dabei sukzessive immer mehr von der Wirtszellmembran umschlossen. Ein solcher Mechanismus wurde für *Listeria monocytogenes* und *Yersinia* spp. beobachtet.

S. typhimurium synthetisiert unterschiedliche Virulenzfaktoren, die das Überleben während der einzelnen Phasen der Infektion sichern. Im Chromosom von *Salmonella* spp. kodieren ca. 4 % der Gene für Virulenzfaktoren (Bowe et al., 1998). Diese Gene sind einzeln, in Clustern und auf einem Virulenzplasmid organisiert. Letzteres spielt vor allem bei der systemischen Infektion eine Rolle (Groisman and Ochman, 1997; Hacker et al., 1997; Salama and Falkow, 1999; McClelland et al., 2001).

In der initialen Phase vermitteln Fimbrien und Flagellen den ersten Kontakt mit der Wirtszelle (Dibb-Fuller et al., 1999). In *S. typhi* spielt darüber hinaus auch LPS bei der rezeptorvermittelten Adhäsion eine Rolle (Lyczak et al., 2001). Zwei Typ III Sekretionssysteme (TSS1 und TSS2) sind für den weiteren Verlauf der Infektion von herausragender Bedeutung. Während TSS1 vor allem bei der Etablierung der Enteritis induziert ist, ist das TSS2 für die systemische Manifestation zwingend erforderlich.

Die Modulation des Zytoskeletts hat sowohl für die TSS1-vermittelte Invasion (SPI1), als auch für die systemische Ausbreitung und intrazelluläre Replikation (TSS2) von *S. typhimurium* eine große Bedeutung. Zusätzlich wird die Aktinpolymerisation auch durch das auf dem Virulenzplasmid kodierte ADP-ribosylierende Toxin SpvB verhindert (Tezcan-Merdol et al., 2001). Zytoskelettveränderungen werden auch durch das auf SPI2-kodierte Protein SifA induziert (Stein et al., 1996). Die Koordination der unterschiedlichen, zum Teil

entgegengesetzten Prozesse im Infektionsverlauf ist noch ungeklärt.

Tabelle 1: Auswahl einiger Virulenzmechanismen durch Bakterien. *S. typhimurium* wird gesondert in Tabelle 2 beschrieben. Modifiziert nach Steele-Mortimer et al., 2000.

Aktivität	Bakterien (Beispiele)	Zielproteine	Effekte in der Zelle
Aktivitäten von internalisierten Toxinen			
Adenylatcyclasen	<i>B. anthracis</i> , <i>B. pertussis</i>	ATP	Erhöhung der cAMP Konzentration
ADP-Ribosylierung	<i>B. cereus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. difficile</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i>	EF2, NAD - Rho, B, C und/oder G- Aktin	Inaktivierung von Rho-induzierten Signalen, z. B. Inhibierung von Aktinfilamenten; Flüssigkeitssekretion...
Aktinnukleation	<i>L. monocytogenes</i>	VASP, Mena	G-Aktin-Polymerisation und Motilität
Deamidierung	<i>Bordetella</i> spp. oder EPEC (enteropathogene <i>E. coli</i>)	RhoA bzw. RhoA und Cdc42	Permanente Aktivierung von RhoA, Aktivierung von Stressfasern, Cdc42 auch Membranausstülpungen
GAP (GTPase aktivierendes Protein	<i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S.typhimurium</i>	Rac1, Cdc42 ?	Inaktivierung von Rac1, Cdc42 Inhibierung von Membranausstülpungen
N-Glykosidasen (Shiga- Toxin)	<i>S. dysenteriae</i> , <i>E. coli</i> .	28S-ribosomale RNA	Hemmung der Proteinsynthese
Glykosyltransferase	<i>C. sordelli</i>	Rac, Ras, Ral, Rap	Inaktivierung von Proteinen der Rho/Ras -Unterfamilie
Metalloproteasen	<i>C. tetani</i> , <i>C. botulinum</i>	Vesikelprotein (Synaptobrevin)	Neurotoxisch, Hemmung der Wirkung von GABA und Glycin oder Acetylcholin
Monoglukosylierung	<i>C. sordelli</i>	Rho, Rac, Cdc42	Inaktivierung von Proteinen der Rho- Unterfamilie
Phosphoinositol-3- Kinase Agonist	<i>L. monocytogenes</i> (InIB)	Oberflächen- rezeptor?	Stimuliert Tyrosinphosphorylierung, Induktion von Membranausstülpungen
Tyrosinphosphatase	<i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>S. typhimurium</i>	P130cas, FAK	Disruption des Zytoskeletts, Inhibierung der Phagozytose durch Makrophagen
rezeptormodulierende Toxine			
Verknüpfung v. Immun- zellen d. Superantigene	<i>S. aureus</i> , <i>S. poygenes</i>	MHCII-Rezeptor T-Zell-Rezeptor	Zytokinausschüttung, STSS (<i>Streptococcus toxic shock syndrome</i>)
Rezeptoraktivierung d. hitzestabile Proteine	<i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i> , <i>Y. enterocolitica</i>	Guanylatcyclase- rezeptor (Darm)	Aktivierung von Proteinkinasen durch Erhöhung von cGMP, Diarrhö

1.3.1 Typ III Sekretionssysteme (TSS)

Der Typ III Sekretionsapparat ist strukturell mit dem Flagellenapparat gramnegativer und grampositiver Bakterien verwandt (Macnab, 1992). Er durchspannt die innere und äußere Membran der Bakterien und transloziert über einen nadelartigen Fortsatz Effektorproteine in die Wirtszelle (Abb. 2). Die TSS umfassen neben dem eigentlichen Sekretionsapparat auch eine Vielzahl von Effektorproteinen, die nur zum Teil auf einem gemeinsamen Gencluster mit den Apparatsproteinen kodiert sind. TSS sind in einer Vielzahl gramnegativer pathogener

und symbiotischer Bakterien hoch konserviert: in darmpathogenen *Yersinia*, *Salmonella* und *Shigella* bis hin zu phytopathogenen Bakterien wie z. B. *Erwinia* spp. oder *Xanthomonas* spp. Für die Gattungen *Salmonella* und *Yersinia* konnten zwei TSS nachgewiesen werden, die durch unterschiedliche Umweltbedingungen reguliert werden. Bei *S. typhimurium* sind die Apparatsproteine und ein Teil der Effektorproteine von TSS1 und TSS2 respektive auf den Pathogenitätsinseln SPI1 bei Centisom 63 und SPI2 bei Centisom 30 kodiert.

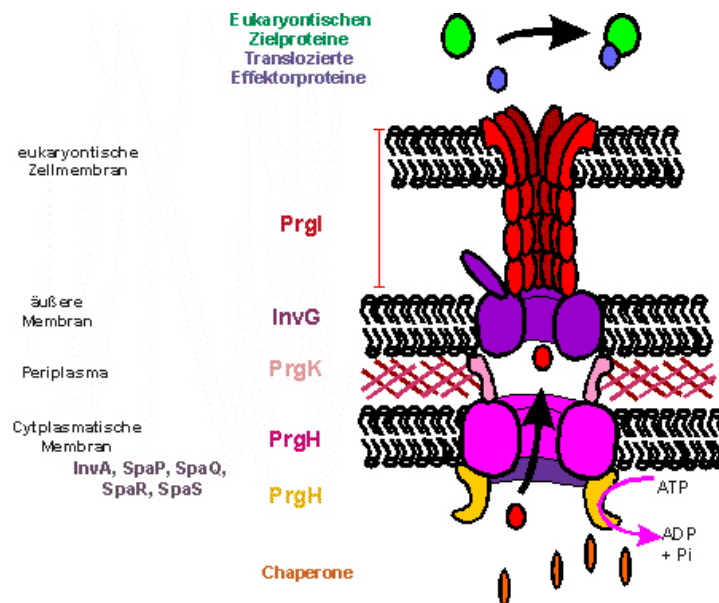


Abb. 2: Der auf SPI1 kodierte Typ III Sekretionsapparat.

Schematische Darstellung der molekularen Komponenten des Typ III Sekretionsapparats von *Salmonella* spp. aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen und biochemischer Analysen.

Durch den initialen Kontakt zur Wirtszelle oder durch ein geeignetes Nährmedium wird die Sekretion von Effektorproteinen induziert (Zierler and Galan, 1995). Diese werden über einen Typ III Sekretionsapparat sekretiert bzw. in die Wirtszelle transloziert (Rosqvist et al., 1994). In *S. typhimurium* ist dies in der frühen Phase der Infektion das TSS1. Die translozierten Effektorproteine rufen verschiedene zelluläre Reaktionen hervor. Eine dieser Reaktionen stellt die Ausbildung von Membranausstülpungen dar, die die Invasion von *Salmonella* in nicht-phagozytierende Zellen ermöglicht. Weiterhin werden Immunreaktionen stimuliert, die die Induktion von Apoptose, die Ausschüttung von Zytokinen, die Migration von Immunzellen und die Flüssigkeitssekretion umfassen. Nach der Internalisierung ins Phagosom sind einige auf SPI1 lokalisierte Gene reprimiert (Pegues et al., 1995). Durch das zweite TSS (TSS2) werden dann die Phagosomenreifung, die Replikation intrazellulärer *S. typhimurium* und der systemische Verlauf der Erkrankung bestimmt (Hueck, 1998, Hansen-Wester and Hensel, 2001, Gorvel and Meresse, 2001). Einige Effektorproteine (z. B. SspH1) werden möglicherweise über beide TSS sekretiert (Miao and Miller, 2000).

1.3.2 Effektorproteine des TSS1

Während die Proteine des Sekretionsapparats in verschiedenen Bakterien konserviert sind, sind die Effektorproteine entsprechend ihrer spezifischen Funktionen in verschiedenen Bakterien sehr heterolog. Für die Sekretion der Effektorproteine sind N-terminal ca. 20 Aminosäuren notwendig. Eine einheitliche Konsensussequenz oder eine strukturelle Ähnlichkeit, die die Sekretion bzw. Translokation vermittelt, wurde bisher jedoch nicht identifiziert. Häufig wird die vorzeitige Faltung und Aktivierung von Effektorproteinen durch Bindung an spezifische Chaperone verhindert (Wattiau et al., 1996, Tucker and Galan, 2000).

Tabelle 2: Über den SPI-1 kodierten Typ III Sekretionsapparat translozierte Effektorproteine.

Auflistung aller bisher identifizierten Effektorproteine des TSS1 mit ihren Funktionen bzw. Homologien sowie Literaturangaben.

Effektorprotein	Funktion/Homologien	Referenz
Auf SPI-1 kodierte Effektorproteine		
AvrA	Homolog zu YopJ (<i>Yersinia</i> spp.), Funktion unbekannt	Hardt and Galan, 1997, Schesser et al., 2000
SipA	Entzündungsreaktion (Einwanderung von Neutrophilen), Inhibierung der Aktinfilamentdepolymerisation, Rekrutierung von Arf6-Vesikeln?	Zhou et al., 1999a, Zhou et al., 1999b, Lee et al., 2000, Criss et al., 2001
SipB	Translokation von Effektorproteinen, Induktion der Makrophagenapoptose durch Bindung an Caspase-1, heterotypische Membranfusionen	Collazo and Galan, 1997, Hersh et al., 1999, Hayward et al., 2000
SipC	Translokation von Effektorproteinen, Aktinnukleation	Hayward and Koronakis, 1999
SipD	Translokation von Effektorproteinen, eigene Effektorfunktion?	Collazo and Galan, 1997
SptP	GTPase aktivierendes Protein; Modulation des Aktinzytoskeletts, wirkt antagonistisch zu SopE und SopE2, Tyrosinphosphatase-Aktivität	Fu and Galan, 1999, Kaniga et al., 1996, Stebbins and Galan, 2000, Murli et al., 2001
Außerhalb von SPI-1 kodierte Effektorproteine		
SopA	Entzündungsreaktion (Einwanderung von Neutrophilen)	Wood et al., 2000
SopB	Entzündungsreaktion, Flüssigkeitssekretion ins Darmlumen, Invasion	Norris et al., 1998, Zhou et al., 2001, Miroid et al., 2001
SopD	Entzündungsreaktion, Flüssigkeitssekretion ins Darmlumen,	Jones et al., 1998
SopE	G-Nukleotid-Austauschfaktor, Induktion der bakteriellen Invasion durch Membranaustülpungen, Transkriptionsaktivierung	Wood et al., 1996, Hardt et al., 1998a, Hardt et al., 1998b
SopE2	G-Nukleotid-Austauschfaktor, Induktion der bakteriellen Invasion durch Membranaustülpungen, Transkriptionsaktivierung	diese Arbeit, Bakshi et al., 2000
SlrP	Maus-Virulenz (homolog zu IpaH (<i>S. flexneri</i>) und YopM (<i>Y. pestis</i>))	Tsolis et al., 1999
SspH1	Rinder-Virulenz	Tsolis et al., 1999, Figueroa-Bossi et al., 2001

14 translozierte Effektorproteine des TSS1 wurden bisher in *Salmonella* spp. identifiziert, ihre Funktionen während der Infektion sind in Tabelle 2 aufgeführt. Viele dieser Effektorproteine interagieren mit Proteinen der Wirtszelle, die Schlüsselfunktionen in Signaltransduktionskaskaden haben und manipulieren direkt oder indirekt wichtige Funktionen der Zelle. Für einige Effektorproteine wie z. B. SipA, SipB oder SptP wurden mehrere Funktionen gezeigt oder postuliert (siehe Tabelle 2)

1.4 Signaltransduktionsprozesse der Zelle

Entsprechend ihren Funktionen manipulieren Typ III sekretierte Effektorproteine spezifische Funktionen der Zelle auf unterschiedlichen Wegen. Effektorproteine interagieren häufig mit regulatorischen Proteinen wie GTPasen, Kinasen, Phosphatasen sowie Adaptor-Proteinen (z. B. Cofilin, Talin etc.), die Steuerungselemente der Zelle darstellen (siehe auch Tabelle 1 und Tabelle 2, Boguski and McCormick, 1993, Pelech, 1996, Fauman and Saper, 1996, Geyer and Wittinghofer, 1997). Durch die ähnliche Wirkung verschiedener Effektoren hat eine Mutation in einem der Effektorproteine häufig nur geringe Auswirkungen auf die Virulenz (Jones et al., 1998). Eine der wichtigsten Schaltstationen für die Wachstumsregulation stellen die regulatorischen G-Nukleotid bindenden Proteine dar.

1.4.1 Regulation zellulärer Prozesse durch kleine GTP-bindende Proteine

Gemeinsam mit 4 weiteren Gruppen gehören die kleinen GTP bindenden Proteine zu den G-Nukleotid bindenden Proteinen, die in der eukaryontischen Zelle regulatorische Funktionen ausüben. Über 100 verschiedene dieser 20-40 kDa großen Proteine wurden in der Zelle bisher identifiziert. Man unterscheidet mindestens fünf Unterfamilien, die im Allgemeinen unterschiedliche, teilweise jedoch auch sich überschneidende Funktionen ausüben (Tabelle 3, Matozaki et al., 2000, Takai et al., 2001).

Tabelle 3: Unterfamilien kleiner GTP-bindender Proteine.

Kleine GTP-bindende Proteine	Funktionen
Ras-Familie (inklusive Raf-Proteine)	Genexpression
Rho-Familie	Genexpression und Zytoskelettorganisation
Arf/Sar1-Familie	intrazellulärer Vesikeltransport
Rab-Familie	intrazellulärer Vesikeltransport
Ran-Familie	Nukleozytoplasmatischer Transport und Mikrotubuliorganisation

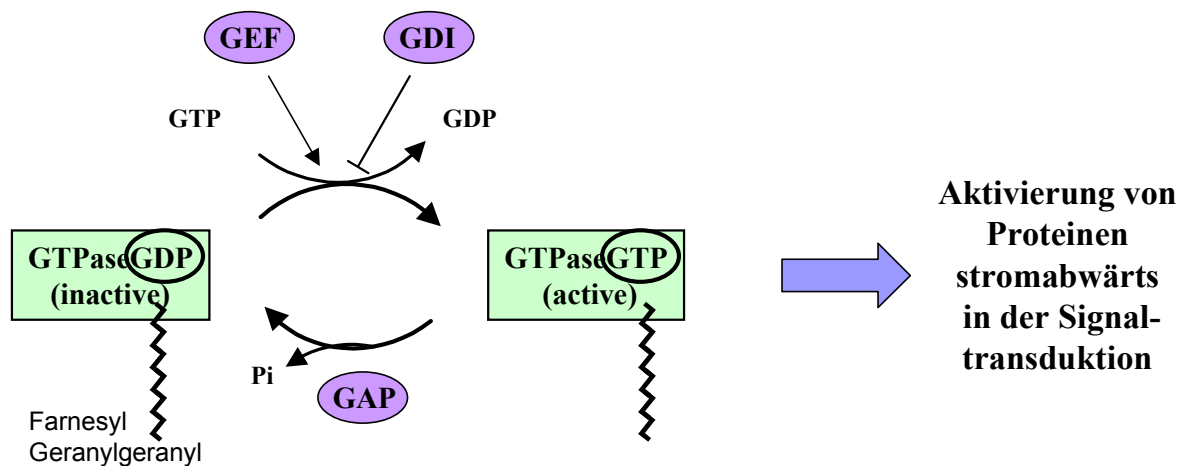


Abb. 3: Regulation der Aktivierung kleiner GTPasen.

GTPasen sind in GDP gebundenen Form inaktiv und in der GTP gebundenen Form aktiv. Die Aktivierung ermöglicht die Signalübertragung auf ein interagierendes Protein, das seinerseits weitere Prozesse in der Zelle aktiviert. G-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) beschleunigen diese Aktivierung durch Katalyse des Austauschs von GDP gegen GTP. GTPase aktivierende Proteine (GAPs) erhöhen die intrinsische GTPase-Aktivität. G-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) stabilisieren den inaktiven GDP-GTPase-Komplex. Lipidmodifikationen ermöglichen die Lokalisation der GTPasen in der Membran. GDIs maskieren diesen Lipidanker und halten den Komplex in Lösung im Zytosol.

Alle GTP bindenden Proteine fungieren als Schalter in molekularen Signaltransduktionsprozessen (Abb. 3). Sie können als inaktive GDP-gebundene Form (meist im Zytosol) vorliegen oder als GTP-gebundene aktive Form (meist membrangebunden). Nach der Aktivierung (in der GTP-gebundenen Konformation) ändern sie ihrerseits die Aktivität von Proteinen stromabwärts der Signalkette (Boguski and McCormick, 1993). Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP ist diese Aktivierung zeitlich begrenzt. GAPs (*GTPase aktivierende Proteine*) katalysieren diese Reaktion. Die Dissoziation von GDP ist der zeitlich-limitierende Schritt in diesem Zyklus und wird durch G-Nukleotid-Austauschfaktoren GEFs (*G-nucleotide exchange factor*) beschleunigt. GEFs binden an den GDP-GTPase-Komplex, ermöglichen die Dissoziation von GDP und lösen sich nach Bindung von GTP oder GDP von der GTPase. GTP liegt in der Zelle in ca. 10x höherer Konzentration vor als GDP und der Austausch von GTP gegen GDP ist daher favorisiert (Lenzen et al., 1998). Diese Aktivierung der GTPasen wird in der Rho-Familie und der Rab-Familie durch GDIs (*G-nucleotide dissociation inhibitor*) verlangsamt, die die Dissoziation von GDP nach der Hydrolyse inhibiert (Sasaki and Takai, 1998). GEFs konkurrieren mit GDIs. Die zeitliche und räumliche Assoziation und Konzentration dieser für verschiedene GTPasen unterschiedlich spezifischen Proteine (GAP, GDI, GEF) regulieren daher die zelluläre Programmierung. Die posttranslationale Modifikation mancher GTPasen mit Lipiden (z. B. Rho-Familie, Rab-Familie) vermittelt die Lokalisation aktivierter GTPasen in

der Membran. Die Bindung an GDIs maskiert diesen Lipidanker und hält den Komplex in Lösung. Manche GEFs zeigen eine Präferenz für lipidmodifizierte GTPasen und manche GTPasen können nur in der GTP gebundenen Form an die Membran binden (Takai et al., 2001).

Für die Signalweiterleitung ist häufig, aber nicht immer, die zyklische Aktivierung und Deaktivierung von kleinen GTP bindenden Proteine notwendig. Die Transfektion von mutierten GTPasen, die in diesem Zyklus gestört sind, ermöglicht die Untersuchung von nicht aktivierbaren dominant negativen GTPasen (permanent GDP-gebunden) und konstitutiv aktiven GTPasen (GTP-gebunden). Hierdurch kann untersucht werden, inwieweit der Aktivierungszustand dieser GTPasen für die Invasivität oder die Induktion von Membranausstülpungen durch *S. typhimurium* von Bedeutung ist.

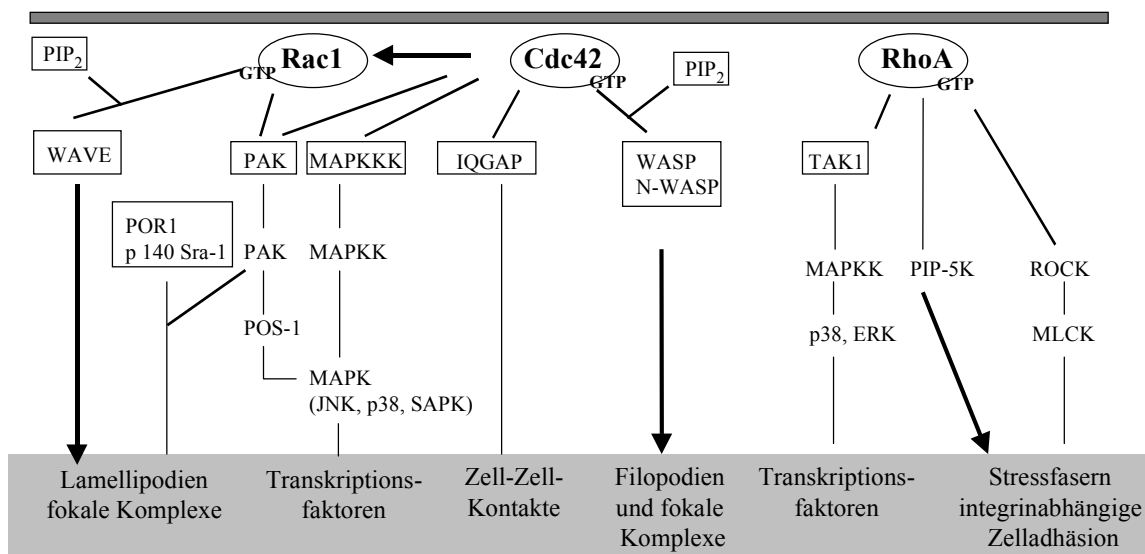


Abb. 4: Ausschnitt von Signaltransduktionswegen, die über GTPasen der Rho-Familie induziert werden.

Bildung von morphologisch verschiedenen Aktinzytoskelettstrukturen (Lamellipodien, Filopodien, Stressfasern und fokale Adhäsionskomplexe) durch Rho GTPasen. Die wichtigsten Signaltransduktionswege zur Aktivierung des Zytoskeletts sind mit dicken Pfeilen markiert, weitere aktivierte Signalwege, die z. B. auch zur Transkriptionsaktivierung und zur Bildung von fokalen Komplexen (basale Kontakte von Zellen) führen, sind in dünnen dünnen Strichen dargestellt.

Die Rho-Familie

Zu der Rho-Familie (*Ras-homologous*) gehören in Säugetieren mindestens 14 Proteine mit ihren jeweiligen Isoformen: RhoA-C; Rho6-8; Rac1-2, RhoG und RCO; TTF; Cdc42 G25B, Cdc42 G25P und TC10 (Garcia-Ranea and Valencia, 1998, Takai et al., 2001). Rho, Rac und Cdc42 aktivieren durch die Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen eine Vielzahl von Signalprozessen, wie zum Beispiel die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und die Genexpression (Abb. 4, Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Hierbei führt die

Aktivierung von einzelnen GTPasen zu phänotypisch unterschiedlichen Umstrukturierungen wie Lamellipodien durch Rac1, Filopodien durch Cdc42 und Stressfasern durch RhoA. Zell-Zell-Kontakte werden durch RhoA und Cdc42 vermittelt. In der Zelle sind diese morphologisch unterschiedlichen Membranausstülpungen zumeist in Mischformen zu finden, was in der Kreuzregulation dieser GTPasen untereinander begründet liegt (Nobes and Hall, 1995).

Die Rab-Familie

Die Rab-Familie ist mit über 50 Vertretern in Säugern die größte Gruppe kleiner GTP bindender Proteine und reguliert den Vesikeltransport und Vesikelfusionen in der Zelle (Novick and Zerial, 1997, Olkkonen and Stenmark, 1997, Schimmoller et al., 1998). Rab-Proteine zirkulieren zwischen einer aktiven membrangebundenen und einer inaktiven zytosolischen Konformation. Durchschnittlich liegen ca. 10-50 % einer Rab-GTPase in der inaktiven GDI gebundenen Form im Zytosol vor (Takai et al., 2001). Auf welche Weise die Trennung vom GDI und der Transfer zum spezifischen Kompartiment erfolgt, ist noch unklar. Rab-Proteine spielen bei wichtigen Transportprozessen eine Rolle: Endozytose, Exozytose und das Recycling in verschiedenen Membrankompartimenten (Abb. 5). Bestimmend für den zielgerichteten Transport ist die spezifische Lokalisation der Rab-Proteine. Von den bisher identifizierten GEFs für Rab-Proteine weisen einige nur eine schwache Austauschaktivität auf (z. B. schwache Austauschaktivität von MSS4, gegenüber starker Austauschaktivität von Rabex-5). Man nimmt an, daß dieser Austausch unter physiologischen Bedingungen nicht relevant ist (Takai et al., 2001). Rab-Proteine spielen auch bei der Prozessierung von Phagosomen eine Rolle.

Kürzlich wurde gezeigt, daß *S. typhimurium* die sie umgebende Vakuole zu einem spezifischen Kompartiment modifizieren (SCV = *Salmonella containing vacuole*) und so den degradativen Abbauweg umgehen. *S. typhimurium* fusioniert mit frühen Endosomen und nimmt sequentiell, vermittelt durch Rab7, lysosomale Glykoproteine auf ohne mit Lysosomen zu fusionieren (Buchmeier and Heffron, 1991, Meresse et al., 1999, Steele-Mortimer et al., 1999).

Die Arf-Familie

Bisher sind 6 Arf Proteine identifiziert worden, die drei Gruppen zugeordnet worden sind: Arf1-3 (I), Arf4-5 (II) und Arf6 (III), sowie einige Arf-ähnliche Proteine (ARDs und ARLs). Während Arf-Proteine im allgemeinen im Golgi-Apparat und auf Endosomen lokalisiert sind, wurde Arf6 auch in der Plasmamembran und auf Endosomen nachgewiesen (D'Souza-Schorey et al., 1995, Peters et al., 1995). Die Arf-Proteine spielen ebenfalls bei

Vesikeltransport und Vesikelfusionen eine Rolle (siehe Abb. 5). Zusätzlich induziert Arf6 Veränderungen am Zytoskelett und ist für die Rac1 abhängige Phagozytose notwendig (Zhang et al., 1998). Ob Arf6 stromabwärts oder parallel zu Rac1 die cortikale Aktinumlagerungen und Lamellipodien induziert, wird noch diskutiert (Zhang et al., 1999, Boshans et al., 2000, Radhakrishna et al., 1999). Arfaptin, ein an Rac1 und Arf6 bindendes Protein, verknüpft möglicherweise die Signalwege dieser beiden unterschiedlichen GTPasen (Tarricone et al., 2001).

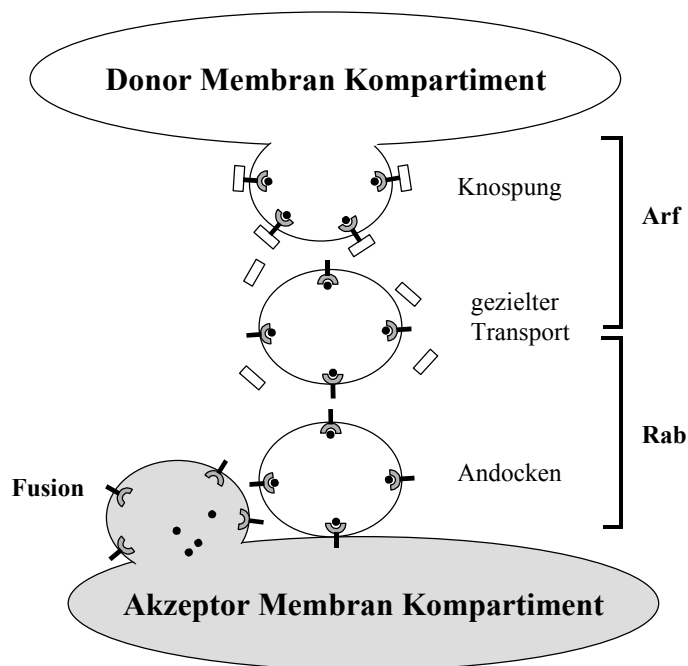


Abb. 5: Schematische Darstellung des Vesikeltransports nach (Takai et al., 2001).

Arf und Rab vermitteln die Knospung von Vesikeln, den zielgerichteten Vesikeltransport, das Andocken und die Fusion mit der Zielmembran

1.4.2 Invasionsmechanismen von *S. typhimurium*

Für *S. typhimurium*, wie auch für andere Bakterien (Tabelle 1), ist die Induktion der Restrukturierung des Aktinzytoskeletts eine wichtige Voraussetzung für die Invasion. Hierbei werden häufig zentrale Steuerungselemente, wie die kleinen Rho GTPasen manipuliert (Hall, 1998).

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß *S. typhimurium* den G-Nukleotid-Austauschfaktor SopE in die eukaryontische Zelle transloziert und dieser dort analog zu wirtseigenen GEFs Rho GTPasen aktiviert (Hardt et al., 1998a, Rudolph et al., 1999). Erste Untersuchungen hatten aber bereits ergeben, daß *sopE* nur in wenigen Stämmen zu finden ist. Ferner war eine *sopE* Mutante nur in geringem Maße in ihrer Fähigkeit zur Bildung von Membranausstülpungen und in ihrer Invasivität attenuiert (Hardt et al., 1998a). Eine SPI1 Mutante, die durch Mutation in *invG* keine Effektorproteine mehr sekretiert, ist dagegen weder invasiv, noch induziert sie Membranausstülpungen. Eine passive Invasion dieser Mutante kann durch Mikroinjektion von SopE erreicht werden. Diese Daten deuteten darauf hin, daß das TSS1 weitere Faktoren sekretiert, die für den Invasionsphänotyp von *Salmonella* verantwortlich sind. In dieser Arbeit sollten deshalb weitere invasionsvermittelnde Effektoren des TSS1 identifiziert werden. Diese sollten anschließend sowohl biochemisch als auch in Zellkultur- und Mausmodell charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Analysenwaagen:

R 160P und Pt1200

AE50

Blotapparatur Semi-Dry Elektroblotter HEP-1

Brutschränke:

für Bakterien:

für Zellkultur:

Chromatographie GradiFrac

Computerprogramme allgemein

Microsoft Word 98, Power Point 97, Excel 97, Corel Draw 6

Adobe Photoshop

Elektrophorese:

Horizontale Elektrophoresekammer Easy Cast

Flachbettelektrophorese Multiphor II

Vertikale Elektrophoresekammer Protean

und mini Protean III Zelle

Elektroporationsgerät Genepulser II

French-Press Spectronic Instruments K 40 Kolben

Homogenisator Ultra Turrax T25

Immobiline DryStrip Reswelling Tray

Kühlfalle RT 100

Magnetrührer RET basic

Mikroskope:

Axiovert 25

DM RBE

PCR-Gerät GeneAmp 2400

pH-Meter Modell 320

Photometer Spectronic 20

Schüttelinkubator Roller drum Tc-7

Schwenkmischer Duomax 1030

Spannungsquellen:

Power Pac 1000

E862 Consort

Speedvac SC110

Sterilwerkbank Herasafe HS12

Szintillationszähler 1450 TriLux MicroBeta

Sartorius

Mettler

Peqlab

Kendro

Revco Ultima

Pharmacia

Peqlab

Pharmacia

BioRad

BioRad

SLM-Instruments Rochester

IKA Labortechnik

Pharmacia

Savant

IKA Labortechnik

Zeiss

Leica

Perkin Elmer

Mettler

Bausch & Lomb,

New Brunswick Scientific

Heidolf

BioRad

Savant

Kendro

Wallac

Tischinkubator Heizblock Digi-Block	Laboratory Devices
Ultrazentrifuge TGA65	Beckmann
Videophotoanlage E.A.S.Y (Enhanced Analysis System)	Herolab
Wasserbad Typ 1013	New Brunswick Scientific
Vakuumfiltrierer 1225 Sampling Manifold	Millipore
Zentrifugen:	
Megafuge 3.0 R	Kendro
C/R	Eppendorf
Centrifuge 5417	Eppendorf
Sorvall RC-5B, Rotoren SS34, SLA 3000	Du Pont
Universal 16 A	Hettich

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien im Reinheitsgrad zur Analyse "p.A." von den Firmen Merck, Serva, Sigma, Biomol, Pharmacia, Roth bezogen. Zellkulturflaschen, sowie Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden bei Nalgene Nunc International, BioRad, Falcon/Becton Dickinson, Eppendorf, Greiner und Schleicher & Schüll erworben. Enzyme stammen von MBI Fermentas, New England Biolabs und von Invitrogen Life Technologies.

Alle Firmenadressen und regionale Vertreter sind dem Internet zu entnehmen.

Radioaktiv markierte Substanzen

8- ³ H-] Guanosin 5'-Diphosphat 250 µCi	Pharmacia
--	-----------

2.3 Antikörper

2.3.1 Antikörper

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antikörper und Farbstoffe zum Proteinnachweis. Die eingesetzte Verdünnung für *Western Blot* (WB) und Immunofluoreszenz (IF) ist angegeben. Abkürzungen: 7-Amino-4-Methylcumarin-3-Acetat (AMCA), Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Horseradish-Peroxidase (HRP), Indocarbocyanin (Cy3), Tetramethylrhodamin-5,6-isothiocyanat (TRITC). *A. phalloides* = *Amanita phalloides*

	aus	Verdünnung	Herkunft
Polyklonale Antikörper			
α -p41-Arc Antiserum	Kaninchen	WB: 1:100	H. Higgs, New Hampshire, USA
IM1 SopE ₇₈₋₂₄₀	Kaninchen	WB: 1:30000	Mirold et al., 1999
IM2 SopE ₆₉₋₂₄₀	Kaninchen	WB: 1:20000	diese Arbeit
α -Salmonella O-1,4,5,12 (8)	Kaninchen	IF 1:250	Becton Dickinson
α -SipC	Kaninchen	WB 1:10000	J.E. Galan, New Haven, USA
Monoklonale Antikörper			
α -M45 gegen M45-Epitop	Maus	WB 1:200, IF 1:2	P. Hearing, New York, USA
α -Cdc42 (human)	Maus	WB: 1:500	Santa Cruz
sekundäre Antikörper			
α -Kaninchen HRP	Ziege	WB 1:5000	Dianova
α -Kaninchen TRITC	Ziege	IF 1:250	Sigma
α -Kaninchen FITC	Ziege	IF 1:400	Dianova
α -Kaninchen AMCA	Ziege	IF 1:100	Dianova
α -Kaninchen Cy5	Ziege	IF 1:100	Dianova
α -Maus HRP	Ziege	WB 1:5000	Sigma
α -Maus TRITC	Ziege	IF 1:100	Dianova
α -Maus FITC	Ziege	IF 1:100	Dianova
α -Maus Cy3	Ziege	IF 1:1000	Dianova
α -Maus Cy5	Ziege	IF 1:1000	Dianova
direkte Färbemethoden			
DAPI		IF 1:10000	Sigma
Phalloidin-TRITC		IF: 1:1000	Sigma
Phalloidin-FITC		IF 1:1000	Sigma
Human-IgG-Epitop-FITC	Ziege	IF 1:200	Sigma

2.3.2 Herstellung eines polyklonalen Antiserums in Kaninchen

Zum Nachweis von SopE2 wurde ein polyklonales Antiserum IM2 aus Kaninchen gewonnen. In Abständen von einem Monat wurde das Kaninchen mit 1 mg rekombinantem SopE₆₉₋₂₄₀ immunisiert, wobei eine 1:1 Emulsion von Freund's Adjuvans und Antigen in PBS subkutan appliziert wurde. Die erste Immunisierung wurde mit komplettem Adjuvans, die weiteren

Booster-Immunsierungen mit inkomplettem Adjuvans durchgeführt. Nach viermaliger Immunsierung wurde das Blut 1 h bei 37 °C und anschließend üN bei 4 °C inkubiert. Das Serum wurde abgenommen und der Überstand nach zehnmütiger Zentrifugation bei 10000 UpM und 4 °C aliquotiert und bei -20 C gelagert. Durch *Western Blot*-Analyse wurde die optimale Arbeitsverdünnung des Serums bestimmt. Der Antikörper reagierte mit SopE2 und SopE ungefähr gleich gut und zusätzlich mit einigen intrazellulären Proteinen und wurde für *Western Blot*-Analysen in einer Verdünnung von 1:20000 eingesetzt.

2.4 Verwendete Zell-Linien, Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Zell-Linien bezogen von DSMZ.

Zelllinie	Gewebetyp	Referenz
COS7	Epithelzellen aus Affennieren	Gluzman, 1981
HeLa	Epithelzellen aus humanen Gebärmutterhalskarzinom	Puck, 1955
J774.1	murine Makrophagen	Ralph et al., 1976

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Stämme von *E. coli*, *S. typhimurium* und *S. typhi*.

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
<i>Escherischia coli</i>		
χ6060	<i>araD139 Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA20 galK galE recA1 rpsE</i>	Manoil and Beckwith, 1985
MOSBlue	<i>endA1 hsdR17(r_{k12}⁻m_{k12}⁺)supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proA⁺B⁺lac⁴ZΔM15:Tn10(TC^R)]</i>	Pharmacia
XL-1 blue	<i>supE44 hsdR17 endA1 recA1 gyrA46 thi-1 relA1 lac⁻ F' [proA⁺B⁺lac¹⁹ lacZΔM15 Tn10]</i>	Bullock, 1987
BL21 /DE3	<i>F ompT hsdS (r_B-m_B⁻) gal λDE3</i>	Studier and Moffatt, 1986
CC118λpir	<i>araD139 Δ(ara leu) ΔlacY74 phoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE(Am) recA1</i>	Manoil and Beckwith, 1985
SM10λpir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km</i> (Donor für Konjugation)	Miller and Mekalanos, 1988
<i>Salmonella typhimurium</i>		
SL1344 (Wildtyp)	<i>rpsL hisG</i>	Hoiseth and Stocker, 1981
SB856	SL1344, <i>sopE::aphT</i>	Hardt et al., 1998b
M200	SL1344, <i>sopE2::tet</i>	diese Arbeit, siehe Tabelle 8
M202	SL1344, <i>sopE::aphT sopE2::tet</i>	diese Arbeit, siehe Tabelle 8
SB161	SL1344; <i>ΔinvG</i>	Kaniga et al., 1994
SB220	SL1344; <i>ΔsipC</i>	K. Kaniga und G.E. Galan
SB225	SL1344; <i>ΔsipA::aphT</i>	Kaniga et al., 1995a
SB241	SL1344; <i>ΔsipD</i>	Kaniga et al., 1995a

SB245	SL1344; $\Delta sipABCD$, $sptP::aphT$	K. Kaniga und G.E. Galan
SB302	SL1344; $\Delta invJ$	Collazo et al., 1995
SB729	SL1344; $\Delta invG$, $sipABCD$, $sptP::aphT$	W.-D. Hardt und G.E. Galan
S. typhi		
CT18	Patientenisolat	Datenbank Sanger Center, AL513382
X3744	Patienten- bzw. Feldisolat	Galan, Stony Brook

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Plasmide (alphabetisch geordnet). Alle *sopE*- und *sopE2*- Sequenzen stammen, soweit nicht anders angegeben, aus *S. typhimurium*.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pACYC184	Expressionsvektor (niedrige Kopienzahl)	Chang and Cohen, 1978
pArf6IgG	Arf6IgG (human, Wildtyp) in pRK5	W. Kolanus, München
pArf6Arf6 _{T27N} IgG	Arf6Arf6 _{T27N} IgG (human, dominant negativ) in pRK5	W. Kolanus, München
pBAD24 und Derivate	Klonierungsvektor mit Arabinose-induzierbaren Promotor	Guzman et al., 1995
pCdc42 _{N17}	Cdc42 _{N17} (human, dominant negativ) in pCDNA3	Chen et al., 1996
pCDNA3	<i>shuttle</i> -Vektor (für Transfektionen)	Invitrogen
pGEX-KG und Derivate	Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine	Guan and Dixon, 1991
pHa-Ras	GST-HaRas (human) in pGEX-KG Derivat	Crespo et al., 1997
pM136	SopE _{M45} unter nativem Promotor in pBAD24-Derivat	Stender et al., 2000
pM148	GST-SopE2 ₆₉₋₂₄₀ in pGEX-KG	Stender et al., 2000
pM149	SopE2 in pACYC184	Stender et al., 2000
pM150	GFP und SopE2 in pSG5	Stender et al., 2000
pM200	<i>sopE2</i> aus <i>S. typhi</i> X3744 in pMos	diese Arbeit, siehe Tabelle 9
pM211	<i>sopE2</i> aus <i>S. typhimurium</i> SL1344 in pMos	diese Arbeit, siehe Tabelle 9
pM226	<i>sopE2</i> _{m45} aus <i>S. typhimurium</i> unter nativem Promotor in pBAD24-Derivat	diese Arbeit, siehe Tabelle 9
pM236	GST-rab15 (Ratte) in pCDNA3	diese Arbeit, siehe Tabelle 9.
pM237	GST-rab15 (Ratte) in pGEX-KG	diese Arbeit, siehe Tabelle 9
pM329	GST-Arf6 in pGEX	M. Barthel und W.-D. Hardt
pMosBlue	Klonierungsvektor	Stratagene
pGEX-rab4	<i>rab4</i> in pGEX-Derivat	M. Zerial, Dresden
pGEX-rab5	<i>rab5</i> in pGEX-Derivat	M. Zerial, Dresden
pQE-rab7	<i>rab7</i> in pQE30 (His-Expressionsvektor)	M. Zerial, Dresden
pQE-rab11	<i>rab11</i> in pQE30 (His-Expressionsvektor)	M. Zerial, Dresden
pRK5IgG	humanes IgG-Epitop im Transfektionsvektor pRK5	W. Kolanus, München
pSB965	GFP in Transfektionsvektor pSG5	Chen et al., 1996

pSB1039	pSB377 Derivat (Suizidvektor)	D. Zhou und G.E. Galan
pSB1130	<i>sopE</i> in pACYC184	Hardt et al., 1998a
pSB1174	SopE und GFP in pSG5 Derivat	Hardt et al., 1998a
pSB1188	GST-SopE ₇₈₋₂₄₀ in pGEX Derivat	Hardt et al., 1998a
pWKS30	Amp ^r Resistenzplasmid	Wang and Kushner, 1991

Tabelle 8: In dieser Arbeit konstruierte Stämme.

Stamm	Genotyp und Konstruktion	Resistenz
M200	<i>sopE2</i> ::pM218 in SB300	Sm ^r , Tet ^r
M202	<i>sopE2</i> ::pM218, <i>sopE</i> ::aphT	Sm ^r , Kan ^r , Tet ^r

Tabelle 9: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide. (Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide sind mit S und einer Nummer bezeichnet, siehe Tabelle 10).

Plasmid	Genotyp bzw. Konstruktion	Resistenz
pM200	<i>sopE2</i> ; 756 Bp-Fragment von <i>sopE2</i> (nt 26-722) aus X3744 (PCR mit S3 und S9) in pMos (<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>)	Amp ^r
pM202	<i>sopE2</i> ; 639 Bp-Fragment von <i>sopE2</i> aus SB856 (PCR mit S1, S2) in pMos (<i>EcoRI</i> , <i>XbaI</i>)	Amp ^r
pM211	<i>sopE2</i> ; 1972 Bp-Fragment von <i>sopE2</i> und flankierender Sequenz aus SB856 (PCR mit Oligonukleotid S12, S8) in pMos (<i>EcoRV</i> , <i>XhoI</i>)	Amp ^r
pM218	<i>sopE2</i> ; 639 Bp <i>sopE2</i> -Fragment aus pM202 (<i>EcoRI</i> , <i>XbaI</i>) in pSB1039 (<i>SmaI</i> , <i>XbaI</i>)	Tet ^r
pM221	<i>sopE2</i> ; aus pM211 (PCR mit S14, S28) in pMos (<i>EcoRV</i> , <i>SmaI</i>)	Amp ^r
pM223	<i>sopE2</i> ; aus pM211 (PCR mit S3, S27) in pMos (<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>)	Amp ^r
pM224	<i>sopE2</i> ; pM221 (<i>EcoRV/XmaI</i>) in pM211 (<i>EcoRV/XmaI</i>)	Amp ^r
pM225	<i>sopE2</i> aus pM211 (<i>EcoRV</i> , <i>XhoI</i>) und pM223 (<i>EcoRV</i> , <i>XhoI</i>)	Amp ^r
pM226	<i>sopE2</i> ; ca. 1520 Bp-Fragment <i>sopE</i> und flankierender Sequenz stromaufwärts (enthält nativen Promotor) aus pM224 (<i>XbaI</i> , <i>SmaI</i>) in pSB1136 (<i>NheI</i> , <i>SmaI</i>), der die M45-Epitop-Sequenz MDRSRDRLPPFETETRIL kodiert	Amp ^r
pM227	<i>sopE2</i> ; aus pM225 (<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>) in pGEX-KG (<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>)	Amp ^r
pM228	<i>sopE2</i> (nt 1-723); <i>sopE2</i> ATGKassette aus Oligonukleotid S29 in pM227 (<i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i>)	Amp ^r
pM236	HA-rab15 (Ratte) (Fusionen aus dem HA-Epitop(<i>HindIII/BamHI</i>) und den PCR Produkten der Klone IRAKp961/205Q2 (mit den Primern S69, S70, geschnitten <i>BamHI/Eco47III</i>) und IMAGp998F208870Q2 (S71, S66, geschnitten mit <i>Eco47III/EcoRI</i>) vom RZPD, Berlin) in pCDNA3 (<i>HindIII/EcoRI</i>)	Amp ^r
pM237	GST-rab15 (Ratte) aus pM236 in pGEX-KG (<i>BamHI/XhoI</i>)	Amp ^r

Tabelle 10: Oligonukleotide. Übersicht über verwendete Oligonukleotide, bestellt bei Metabion, München-Martinsried.

Primer	5'-.....3'	Verwendung
S1	GAGAATTCTATCCACCCAGCACTACAGAA	Klonierung <i>sopE2</i>
S2	GCTCTAGACGGCATCGTCCCCTTATT	Klonierung <i>sopE2</i>
S3	CGGAATTCTTGTGACTAACATAAACTATCCACCC	Klonierung <i>sopE2</i>
S8	CTCGAGACATAAACACATCACCTCAGC	Klonierung <i>sopE2</i>
S9	CTCGAGCGTCGCCATAAAAAATGAATATA	Klonierung <i>sopE2</i>
S12	TTTTCACATCACCGNTAGCAA	Klonierung <i>sopE2</i>
S14	CGTTGAACCAAGTAAAAGAAAA	Klonierung <i>sopE2</i>
S26	CGGAATTCTTGGGAACGCTTCTGAGGGTA	Klonierung <i>sopE2</i>
S27	CCGCTCGAGTCAGGAGGCATTCTGAAGATAC	Klonierung <i>sopE2</i>
S28	TCCCCCGGGGAGGCATTCTGAAGATACTTATT	Klonierung <i>sopE2</i>
S66	GGAATTCTCAGCACCAGCAGGTCTTTGAAG	Klonierung <i>rab15</i>
S69	CGGGATCCGCGAAACAGTACGATGTGCTGTTCC	Klonierung <i>rab15</i>
S70	GATATGCTGATAGGAGCGCTCACTG	Klonierung <i>rab15</i>
S71	CAGTGAGCGCTCCTATCAGCATATC	Klonierung <i>rab15</i>

2.5 Medien und Zusätze

Medien wurden durch Autoklavieren (A) (121°C, 3 bar, 20 min) oder 0,2 µm-Filtration (F) sterilisiert.

- **LB (Luria-Bertani):** 5 g NaCl, 5 g Bacto Hefeextrakt, 10 g Bacto Trypton gelöst in 1 l H₂O_{dd} (A) (Miller, 1972), für LB-Platten wurden dem Medium 15 g Bacto Agar pro Liter H₂O_{dd} zugesetzt (A).
- **LB 0,3 M (Luria-Bertani):** 17,5 g NaCl, 5g Bacto Hefeextrakt, 10 g Bacto Trypton auf 1 l H₂O_{dd} (A).
- **Pepton-Medium:** 20 g Pepton, 50 ml Glycerol auf 1 l H₂O_{dd} (A)
- **2x TY-Medium:** 5 g NaCl, 10 g Bacto Hefeextrakt, 16 g Bacto Pepton auf 1 l H₂O_{dd} (A)
- 10x PBS** 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 2,4 g KH₂PO₄ auf 1 l H₂O_{dd} (A)
- 50 x TAE-Puffer:** 242 g Tris, 57,1 g Eisessigsäure, 100 ml EDTA, 0,5 M pH8 auf 1 l H₂O_{dd}
- TE Puffer:** 20 mM TRIS, 2 mM EDTA, pH 6,8
- 20x SSC:** 175,3 g NaCl, 88,2 g Natriumcitrat auf 1 l H₂O_{dd}, pH 7

Tabelle 11: Medienzusätze. Medienzusätze stammen von Merck oder Sigma.

Medienzusätze	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100µg/ml
Carbenicillin (Carb)	50 µg/ml
Chloramphenicol (Chl)	30 µg/ml
Gentamicin (Gen)	100-400 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml
Streptomycin (Str)	50 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	12,5 µg/ml
Isopropyl-D-thiogalactoside (IPTG)	200 µM

2.6 Kulturbedingungen

2.6.1 Anzuchtbedingungen für bakterielle Kulturen

Anzucht von Kulturen in stationärer Phase

Bakterielle Stämme wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen, bei 37 °C üN inkubiert und waren derart eine Woche bei 4 °C haltbar.

Dauerkulturen von *Salmonella* ssp. und *E. coli* wurden nach Animpfen von Einzelkolonien in LB mit entsprechenden Antibiotika unter schwach aeroben Bedingungen in der Rolltrommel über Nacht bei 37 °C angezogen. Diese Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet und für verschiedene Präparationen, z. B. von DNS, verwendet. Zur Lagerung wurden 3 ml der Bakteriensuspension sedimentiert, in 500 µl Pepton-Medium aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

Zellzahlbestimmung von Bakterien

Die Zellzahl wurde durch Bestimmung der optischen Dichte ($OD_{600} = 1$ entspricht ca. 5×10^8 *S. typhimurium*) ermittelt. Eine genauere Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung von Bakterien auf LB-Agar (supplementiert mit entsprechenden Antibiotika). Nach Inkubation bei 37 °C üN wurde die Zahl der Kolonien bestimmt.

Anzucht unter SPI1-induzierenden Bedingungen

Um die Expression der SPI1 und dessen Effektoren in *Salmonella* spp. optimal zu induzieren, wurden diese in 3 ml LB 0,3 M, ggf. supplementiert mit Antibiotika, 12 h auf einer Rolltrommel bei 37 °C unter schwacher Belüftung angezogen und anschließend 1:20 verdünnt in 2 ml LB 0,3 M Medium ohne Antibiotika für 4 h unter gleichen Bedingungen subkultiviert.

Anzucht für die Überexpression rekombinanter Proteine

Bei der Überexpression rekombinanter Proteine wurden die *E.coli* Stämme ca. 16 h bei 37 °C in 2x TY-Medium mit entsprechenden Antibiotika kultiviert und dann 1:33 verdünnt in 1 l 2x TY-Medium ohne Antibiotika bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 weiter inkubiert. Die Genexpression unter einem lactoseinduzierbaren Promotor wurde bei 30 °C mit 0,2 mM IPTG (Isopropyl-D-Thiogalactosid) induziert. Nach 3 h wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Aufschluß bei -80 °C gelagert.

2.6.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Lösungen, Geräte und Gefäße wurden auf 4 °C vorgekühlt.

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* oder *Salmonella* spp. wurden 150 ml LB mit einer Kultur in der stationären Phase 1:50 angeimpft. Die Kultur wurde in Schikanekolben (200 Upm) bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,7 inkubiert und dann 15 min auf Eis gekühlt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Bakterien mit 2 x 10 ml eiskaltem H₂O_{dd} und mit 2x 20 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin gewaschen. Das Sediment wurde in 700 µl eiskaltem 10%igem Glyzerin resuspendiert und in Aliquots à 70 µl bei -80 °C eingefroren. Bei Bedarf konnte das Volumen der Aliquots mit eiskaltem 10 %igem Glycerin kurz vor Gebrauch dieser kompetenten Zellen verdoppelt werden.

2.6.3 Nachweis von *S. typhimurium*

Durch Zugabe des polyklonalen Antiserums α -*Salmonella* O-1,4,5,12 (8) zu einem Tropfen einer Bakteriensuspension konnte *S. typhimurium* in dieser Suspension auf einem Objektträger nachgewiesen werden.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Bei dieser Isolationsmethode (Birnboim and Doly, 1979) werden die Bakterien im alkalischen Milieu lysiert. Die nachfolgende Neutralisation der Suspension führt zu einer Renaturierung der zirkulären Plasmid-DNS, nicht jedoch der chromosomalen DNS, die sich in den nachfolgenden Schritten abzentrifugieren läßt. Die DNS wird durch Fällung mit 70% Ethanol von den Salzen getrennt.

Alternativ wurde zur Gewinnung von Plasmid-DNS wurde das Kit "miniprep Express Matrix" (Bio101, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Wurde reinere DNS benötigt, wurde die DNS

mittels Anionenaustauschchromatographie, wie im Quiagen Plasmid Präparationskit (Mini- oder Maxi- (Quiagen, Hilden)) beschrieben, präpariert. Für LPS-freie DNS-Präparation für Transfektionen wurde das "Endofree Plasmid Maxi Kit" (Quiagen, Hilden) verwendet.

2.7.2 Isolierung von chromosomaler DNS

Die Isolierung chromosomaler DNS für *Southern Blot*-Analysen wurde, wie im "QIAamp DNA mini Kit" (Quiagen, Hilden) beschrieben, durchgeführt.

2.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)

Diese Methode dient der Amplifikation bestimmter DNS-Abschnitte, die anschließend als Sonde dienen oder kloniert werden können. Als Matrize zur Amplifikation diente Gesamtzell-Lysat von Bakterien, 1:10 verdünnt in H₂O_{dd}, oder isolierte DNS.

Für einen PCR-Ansatz von 50 µl wurden 15 µl Bakterienlysat (1:20 verdünnt) 10 – 15 min bei 98 °C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Respektive wurde Plasmid-DNS 1:50, chromosomale DNS 1:20 mit H₂O_{dd} verdünnt eingesetzt. Es wurden 5 µl 10x Puffer 10x Niedrigsalzpuffer (200 mM Tris/HCl pH 8,75; 100 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM MgSO₄; 1% Triton X-100; 1 mg/ml BSA) oder Hochsalzpuffer (200 mM Tris/HCl pH 9,2; 600 mM KCl; 20 mM MgCl₂), 2 µl dNTP (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 2,5 µl der beiden Primer (10 pmol) und 0,5-1 µl der thermostabilen Taq Polymerase (TaqPlus Long PCR System, Stratagene) zu der denaturierten DNS hinzugefügt, mit H₂O_{dd} auf 50 µl aufgefüllt und kurz zentrifugiert. Nach der Denaturierung der DNS bei 95 °C für 1 min ("hot start") folgten 30 – 35 Zyklen der folgenden 3 Inkubationsschritte:

1. Denaturierung der DNS bei 95 °C für 30 s.
2. Bindung der Primer bei den berechneten Schmelztemperaturen für 30 s – 1 min
3. Elongation bei 72 °C in Abhängigkeit von der Länge der zu amplifizierenden DNS zwischen 0,5 – 10 min

Am Ende des letzten Zyklus folgte ein finaler Polymerisationsschritt bei 72 °C für 5 – 10 min. Der PCR Ansatz konnte dann für weitere Versuche (z. B. zur Sequenzierung oder als Sonde) eingesetzt werden.

2.7.4 Restriktion von DNS und Klenow-Reaktion

Jede Restriktionsendonuklease erkennt spezifisch eine bestimmte Basensequenz (meist ein Palindrom) auf einer doppelsträngigen DNS und ist in der Lage, dort die DNS hydrolytisch zu spalten. Nach diesem Schnitt ist eine zirkuläre Plasmid-DNS linearisiert und eine Ligation mit einem weiteren restringierten DNS-Fragment mit passenden Schnittstellen kann in einem späteren Schritt folgen. Die Endonukleasen können glatte bzw. 5'- oder 3'-Überhänge

erzeugen, wobei anschließend nur zwei passende Überhänge oder zwei glatte Bruchstellen miteinander ligiert werden können. Eine Schnittstelle mit Überhängen kann mit Hilfe des Klenow Enzyms und einem Nukleotidgemisch dNTP der 4 Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zu einem glatten Ende aufgefüllt werden. Plasmide und PCR-Produkte wurden mit Restriktionsendonukleasen angegeben in entsprechendem Puffer wie unter den geeigneten Bedingungen gespalten. Hierbei wurde jeweils 1 µg DNS mit 2-5 U Restriktionsenzym inkubiert. Für die Klenow-Reaktion wurde dem Restriktionsansatz 2,5 mM dNTP und 1-3 U Klenow-Enzym zugefügt und für mindestens 30 min bei 30 °C inkubiert.

2.7.5 DNS-Reinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion kann die DNS von Proteinen getrennt und nach einer anschließenden Fällung in der gewünschten Konzentration in H₂O_{dd} resuspendiert werden. Hierfür wurden 100 µl Probe mit 200 µl eines Phenol-Chloroform Gemisches im Verhältnis 1:1 (TAE gesättigt) ausgeschüttelt und 1 min zentrifugiert, die obere wässrige Phase wurde zur Präzipitation der DNS zunächst mit dem 2,5fachen Volumen (250 µl) eines Gemisches von Ethanol (100%) mit 3 M Natriumacetat im Verhältnis (40:1) gemischt und anschließend 30 min bei 10 000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die präzipitierte DNS mit 75 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in H₂O_{dd} gelöst.

2.7.6 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNS (CIP)

Die Dephosphorylierung einer linearisierten Vektor-DNS erhöht die Effizienz der Ligation von Fremd-DNS in den Vektor, indem sie die intramolekulare Religation verhindert. Die nach der Restriktion linearisierte, aufgereinigte DNS (gelöst in 90 µl H₂O_{dd}), wurde mit 9 µl CIP-Puffer (100 mM Tris-Acetate; 100 mM Magnesiumacetat, 500 mM Kaliumacetat; pH 7,5) und zweimal mit 1 µl alkalischer Phosphatase versetzt, wobei beide Male je 15 min zuerst bei 37 °C und dann bei 50 °C inkubiert wurde. Der Ansatz wurde anschließend entweder bei -20 °C gelagert oder zur Aufreinigung direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

2.7.7 Agarose-Gel-Elektrophorese

Bei der Gel-Elektrophorese wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Größe in unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Anode. Die DNS wurde mit 1/10 Volumen DNS-Probenpuffer (25 % FICOLL, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol) versetzt und in einem Agarose-Gel (0,7-1 % Agarose in 1x TAE Puffer, s.o.) bei einer Spannung von ca. 5 V/cm in 1x TAE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion der DNS unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) wurden die Agarose-Gele vor dem Gießen mit 100 µg/l Ethidiumbromid versetzt. Als Längenstandard wurden ein 1 kB Marker (Gene

Ruler™ 1kB DNA Ladder , MBI Fermentas) und der λ HindIII- Standard (Gibco) verwendet.

2.7.8 Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Elution von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde die Bande mit entsprechendem Molekulargewicht unter UV-Licht ausgeschnitten. Danach wurde die DNA mit dem "GeneClean III Kit" (Bio101) entsprechend der Anleitung isoliert. Anschließend wurde die DNS in H₂O_{dd} aufgenommen.

2.7.9 Klonierung von DNS Fragmenten

Amplifizierte DNS-Fragmente aus PCR oder restringierte DNS, die in Bakterien übertragen werden sollen, müssen zunächst in einen Vektor ligiert werden. Die Vektoren tragen in der Regel einen Marker, wodurch sich nach der Transformation unter entsprechenden selektiven Bedingungen Klone isolieren lassen, die das rekombinante Plasmid besitzen.

Die zu ligierenden Fragmente wurden mit einem oder zwei Restriktionsenzymen geschnitten und im molaren Verhältnis Vektor : inseriertes Fragment 1:4 mit 5x Ligationspuffer (enthält 250 mM Tris/HCl (pH 7,6), 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% Polyethylenglycol) und 1 U T4 Ligase über Nacht (mindestens aber 3 h) inkubiert. Die T4-DNS-Ligase verknüpft kompatible überhängende oder glatte Enden hierbei kovalent. Für die Ligation wurde die Probe im Wasserbad von RT langsam im Kühlraum in einer Isolierbox auf 4 °C gekühlt. Für die Transformation wurden 70 µl elektrokompente Zellen mit 1 µl Ligationsansatz vermischt und bei U = 1,8 kV, C = 25 µF, R = 200 Ohm entsprechend dem Protokoll (Elektroporator, BioRad) transformiert. Die Bakterien wurden in 1 ml LB Medium resuspendiert und nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C in einer Rolltrommel auf LB-Platten, die mit geeigneten Antibiotika versetzt worden waren, ausgestrichen.

2.7.10 DNS-Hybridisierungstechnik nach Southern (Southern, 1975)

Mit dieser Methode können DNS-Fragmente bestimmter Länge spezifisch durch Hybridisierung mit einer komplementären Sonde detektiert werden.

Restringierte chromosomale DNS wurde auf einem Agarose-Gel (0,6-0,8 %) bei 30 kV üN aufgetrennt. Sie war unter UV-Licht als kontinuierlicher Streifen detektierbar. Die DNS wurde im Gel depuriniert (10 min in 0,5 % HCl), dann 30 min denaturiert (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl) und nach der Neutralisation (in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris pH7,6) auf eine Nylonmembran übertragen ("geblottet"). Bei dem angewendeten Verfahren wurde das Gel auf mit Puffer (10x SSC) befeuchtete Filterpapiere gelegt, die in Verbindung mit der Puffer-Lösung standen. Auf das Gel wurde eine ebenso befeuchtete Nylonmembran und ein Stapel trockenes

Filterpapier gelegt. Die Filterpapiere saugen sich hierbei durch die Kapillarwirkung mit Puffer voll und transferieren dabei die DNS auf die Membran. Auf der Nylon-Membran wurden nach dem Blotten die zuvor markierten Marker-Banden eines 1 kB Markers (MBI Fermentas) eingezeichnet und die DNS wurde mit 0,4 M NaOH denaturiert. Nach dem Waschen mit 2x SSC wurde die Membran getrocknet und durch UV-Bestrahlung (0,12 J/cm²) fixiert.

Mit Hilfe des "Enhanced Chemiluminescence Random-Primed Markierungs- und Detektionskits" wurde die Membran nach Anweisung des Herstellers (Pharmacia, Freiburg) mit Heringssperma 1 h bei 56 °C prähybridisiert (5x SSC, 5 % Blockierungsreagenz, 0,1 % SDS, 2,5 % Dextransulfat, 100 µg/ml Ultraschall-behandeltes hitzedenaturiertes Heringssperma). Anschließend wurde mit Fluoreszein-markierten DNS-Sonden (siehe 2.7.12) für mindestens 4-5 h bei 56 °C hybridisiert. Die Membran wurde gewaschen (zuerst 1x SSC, 0,1 % SDS 15 min, 63 °C, dann 0,5x SSC, 0,1 % SDS 15 min, 63 °C und für 1 min bei RT mit Waschpuffer A (100 mM Tris/Cl, 600 mM NaCl, pH7,5). Nach 30 min Blockieren (75 ml Blockierungsreagenz und Waschpuffer A im Verhältnis 1:20) wurde für 30 min mit Antikörperlösung (Waschpuffer A versetzt mit 0,5 % BSA und α-Fluoreszein-HRP (1:1000) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (Waschpuffer A mit 0,1 % Tween 20) wurde der Blot entwickelt (1 min mit Reagenz 1 und 2 aus ECL Kit) und die Chemilumineszenz mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert.

2.7.11 Kolonie-Lift

Mit dieser Methode kann gleichzeitig eine große Anzahl verschiedener Isolate mit einer Sonde auf die Präsenz eines DNA-Abschnitts überprüft werden. Eine Agarplatte wurde hierfür in ca. 75 Planquadrate geteilt und mit einem Zahnstocher wurde je ein Isolat auf ein Quadrat überimpft. Nach Inkubation der Platte üN bei 37 °C wurden die Kolonien auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Kolonie-Lift). Die Bakterien wurden mit 0,4 N NaOH lysiert und die UV-fixierte DNS (0,12 J/cm²) wurde nach Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde (siehe *Southern Blot-Analyse*, 2.7.10) detektiert.

2.7.12 Herstellung von Fluoreszein-markierten DNS-Sonden

Fluoreszein-markierte DNS-Sonden wurden nach der "random primed" Methode (nach Feinberg and Vogelstein, 1983) hergestellt. Hierbei wird in einer Polymerasekettenreaktion dem Klenow-Enzym neben dATP, dCTP, dGTP und cTTP auch dNTP Fluoreszein-11-dUTP (FI-dUTP) zur Verfügung gestellt. Dieses ersetzt teilweise dTTP, so daß eine Markierung der Sonde mit Fluoreszein erfolgt. Die Durchführung erfolgte wie im Protokoll des Herstellers des "Enhanced Chemiluminescence Random-Primed Markierungs- und Detektionskit" (Pharmacia, Freiburg) beschrieben.

Tabelle 12: Sonden. Herstellung von fluoreszenzmarkierten Sonden.

DNS-Abschnitt	Herstellung
<i>sopE</i>	723 nt von <i>sopE</i> in pSB1167 <i>S. typhimurium</i> <i>Acc65I/XbaI</i>
<i>orfG</i>	2,6 kB C-Terminus von <i>orfG</i> und stromabwärts in <i>S. typhimurium</i> <i>SacII/NdeI</i>
<i>sopE2</i>	723 nt von <i>sopE2</i> in pM202 <i>S. typhimurium</i> <i>EcoRI/XbaI</i>

2.7.13 Wiederverwendung von *Southern Blots*

Um Blots mit einer weiteren Sonde hybridisieren zu können, wurden diese bei 37 °C kurz in 0,1 % SSC, 0,1 % SDS gewaschen, anschließend 30 min in 0,2 N NaOH, 0,1 % SDS inkubiert und zuletzt 2x 30 s in 2x SSC gewaschen. Danach konnten die Blots getrocknet und aufbewahrt werden.

2.7.14 Konjugation (Achtman et al., 1978)

Mittels Konjugation erfolgte eine Übertragung eines Suizidplasmids mit dem π -abhängigen *oriR6K* und *mobRP4*-Region vom Donor *E. coli* SM10 λ pir auf den Rezipienten (verschiedene *S. typhimurium*-Stämme). *E. coli* SM10 λ pir trägt die Gene *tra* (kodiert für den konjugativen Apparat) und *pir* (kodiert für das Protein π , das essentiell für die Replikation des Suizidplasmids ist). Die anschließende homologe Rekombination führte zur Integration des Suizidplasmids in das entsprechende Gen auf dem Chromosom des Empfängerstammes.

Die Bakterien wurden in LB gegebenenfalls supplementiert mit Antibiotika üN angezogen. Nach dem Waschen der Bakterien mit HBSS liegen diese ohne Antibiotika in HBSS vor. Von den beiden Stämmen wurden jeweils 70 μ l des Donors mit 70 μ l des Rezipienten in 500 μ l LB gemischt. 100 μ l der Suspension wurde auf einer LB-Platte ohne Antibiotika ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit HBSS abgewaschen und in geeigneten Verdünnungen auf LB-Platten, supplementiert mit entsprechenden Antibiotika, ausgestrichen. Einzelklone wurden mit Hilfe einer *Southern Blot*-Analyse (siehe 2.7.10) auf erfolgreiche Konjugation getestet.

2.7.15 DNS-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNS und PCR-Produkten wurde das "Ready Reactions Dye Deoxy Terminator Cycle"-Sequenzierungskit (Perkin Elmer, Rodgau-Jüdingheim) und ein automatischer Sequenzierer "Applied Biosystems Model 377XL" verwendet oder die DNS wurde zur Analyse mit den entsprechenden Oligonukleotiden an MWG Biotech geschickt.

2.8 Protein-Biochemische Methoden

2.8.1 Proteinfällungen

a) Proteinfällung mit TCA und Aceton

Eine unter sekretionsinduzierenden Bedingungen angezogenen Kultur von *Salmonella* spp. wurde nach dem Kühlen auf Eis für 20 min bei 4 °C und 10000 g sedimentiert und der Überstand wurde mit Filtern (0,22 µm Porengröße) sterilfiltriert. Durch Zugabe von 10 % v/v kalter Trichloressigsäure (TCA) und Inkubation für mindestens 1 h bei 4 °C wurden die Proteine präzipitiert und mittels Zentrifugation (10000 g, 4°C, 30 min) sedimentiert. Nach vollständiger Abnahme des TCA wurde das Präzipitat in 1 ml eiskaltem Aceton suspendiert und für mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert. Hierbei wurde 1M Tris pH 8 zugefügt, um Rückstände der Trichloressigsäure zu neutralisieren. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment zweimal mit je 500 µl Aceton gewaschen, zentrifugiert (10000 g, 4°C, 5 min), getrocknet und in 1x PBS (1/1000 des Volumens der Kultur) aufgenommen. Falls nötig wurde der pH der Probe mit 1M Tris pH 8 neutralisiert. Die Probe wurde bei -20 °C gelagert.

b) Proteinfällung (nach Wessel and Flugge, 1984)

Für die isoelektrische Fokussierung (siehe 2.8.13) wurden in der Affinitätschromatographie isolierte native Proteine (siehe 2.8.5) zunächst unter Verwendung von Zentrifugalfiltern aufkonzentriert (Millipore) und anschließend wurden die Proben durch die von Wessel und Flügge (Wessel and Flugge, 1984) beschriebenen Methode mit Methanol, Chloroform und H₂O_{dd} gefällt. Hierfür wurden die Probe mit dem vierfachen Volumen Methanol gemischt und 10 s bei 9000 g zentrifugiert. Nach dem Mischen mit dem einfachen Probenvolumen Chloroform und anschließender Zentrifugation (9000 g, 10 s), wurden die Phasen durch Ausschütteln mit dem vierfachen Probenvolumen H₂O_{dd} und durch anschließende Zentrifugation (10 min 9000 g) getrennt. Nach Entfernen der wässrigen Phase wird das Protein in der Interphase durch Zugabe des dreifachen Probenvolumens Methanol und zweiminütige Zentrifugation bei 9000 g gefällt. Die 20 min unter Vakuum getrockneten Proteine können dann in einem geeigneten Volumen Probenauftragspuffer aufgenommen und bei -80 °C gelagert werden.

2.8.2 Zellaufschluß aus Rindermilz

Um Proteine aus Rindermilz zu aufzureinigen, wurde diese weitgehend von Fett- und Bindegewebe befreit und ca. im gleichen Gewichtsvolumen Puffer X (siehe 2.8.3), supplementiert mit 1 mM PMSF, homogenisiert. Für ein präparatives Coomassie gefärbtes Gel wurden ca. 300 g Ausgangsmaterial verwendet.

2.8.3 Aufschluß von Bakterien

Zum Aufschluß von Proteinen aus 1 l Bakterienkultur (Kulturbedingungen, siehe 2.6.1) wurden die Bakterien durch Anlegen von hohem Druck und anschließendem raschen Druckabfall in der "French Press" aufgeschlossen. Bei dieser Methode wurden die sedimentierten eingefrorenen Bakterien zunächst auf Eis in 30 ml kaltem Puffer X, supplementiert mit 1 mM PMSF aufgenommen und in der eiskalten "French Press Zelle" mindestens 3 Mal durch Druckaufbau auf 1200 N/m² aufgeschlossen.

Anschließend wurden die groben Zelltrümmer und ganze Zellen durch zweimalige Zentrifugation bei 4000 g, 4°C, 10 min entfernt.

Puffer X 100 mM NaCl
 50 mM Tris/HCl pH 7,6
 1 mM MgCl₂
 2 mM DTT

2.8.4 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Abtrennung von kleineren Zellbruchstücken wurde der Überstand aus dem Zellaufschluß durch Membranfiltration (0,45 µm Porengröße) gereinigt.

a) Rekombinante GST-Fusions-Proteine.

Die Expressionsplasmide sind Derivate von pBR322 (pGEX-Serie, Pharmacia) und exprimieren Gene unter der Kontrolle des lac-Promotors. Die N-terminale Fusion mit dem offenen Leseraster für GST ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins GST-X. Durch Bindung des GST-Anteils an eine Glutathion-Sepharose-Matrix kann ein fusioniertes Protein isoliert werden. Bei Bedarf kann es anschließend durch enzymatischen Verdau von GST getrennt werden.

Die löslichen GST-Fusionsproteine aus dem Überstand nach dem "French Press"-Aufschluß wurden durch Bindung an die Glutathion-Sepharose-Matrix (Glutathion-Sepharose 4B, Pharmacia) isoliert. Dies erfolgte im "batch" - Verfahren laut Anleitung des Herstellers (Pharmacia). Anschließend wurde das gebundene GST-Fusionsprotein entweder mit 20 mM Glutathion von der Glutathion-Sepharose-Matrix abgetrennt oder je nach klonierter Spaltsequenz im Vektor (Guan und Dixon, 1991) mit 20 U/ml Thrombin in Puffer T (Cdc42, SopE, SopE2) oder mit 20 U/ml Faktor Xa in Puffer Xa (Rac1, Rab5) vom GST abgespalten. Das Volumen des Spaltansatzes entspricht dem doppelten Gelbettvolumen. Die Spaltung erfolgte für mindestens 3 h bei 4 °C auf dem Rollinkubator. Die Überstände wurden nochmal mit Puffer T oder Puffer Xa gewaschen und die Serinprotease (Thrombin bzw. Faktor Xa) wurde anschließend durch Bindung an eine p-

Aminobenzamidin-Sepharose-Matrix entfernt (30 min Inkubation) und der Überstand nach Zentrifugation weiterverarbeitet.

Puffer T	150 mM NaCl	Puffer Xa	100 mM NaCl
	50 mM Tris/HCl pH 7,6		50 mM Tris/HCl pH 9
	5 mM MgCl ₂		3 mM MgCl ₂
	2,5 mM CaCl ₂		1 mM CaCl ₂
	2 mM DTT		1 mM DTT

b) Rekombinante His₆-Fusions-Proteine

Die Proteine wurden nach der "French Press" nach dem Protokoll QIAexpressionist™ (Qiagen, Hilden) über eine Nickel-Chelat-Chromatographie isoliert. Die Histidinreste bilden hierbei einen Komplex mit den Ni²⁺-Ionen der Ni²⁺-NTA-Agarose. Für den Aufschluß der bakteriellen Zellen wurde Puffer X, wie in 2.8.3 beschrieben, ohne DTT verwendet. Der Puffer wurde mit 10 mM Imidazol versetzt. Die Elution des Fusionsproteins von der Nickelsäule erfolgte bei einer Konzentration von 250 mM Imidazol in Puffer X.

2.8.5 Aufreinigung nativer Proteine aus Rindermilz

Nach dem Zellaufschluß (siehe 2.8.2) wurde der Überstand in durch Ultrazentrifugation bei 100000 g für 1 h in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt. Auf diese Weise können membrangebundene und zytosolische Proteine teilweise getrennt werden (Harris und Angal, 1990). Die unlösliche Fraktion wurde durch 0,1 % Triton X-100 solubilisiert und anschließend erneut ultrazentrifugiert (1 h bei 100000 g). Unspezifisch an eine Glutathion-Sepharose-Matrix bindende Proteine aus den Überständen beider Fraktionen wurden mit Hilfe einer Glutathion-Leersäule entfernt.

2.8.6 Entfernung niedermolekularer Proteine durch Dialyse

Nach der Aufreinigung rekombinanter Proteine (siehe 2.8.4) oder nativer Proteine (siehe 2.8.5) wurden niedermolekulare Proteine durch ein Dialyseverfahren entfernt. Hierfür wurde mit einer Porengröße für Partikel < 8 kDa (Roth) mindestens für je 3 h 3 x gegen 2l Puffer X bei 4 °C dialysiert, so daß kleine Moleküle wie Glutathion, G-Nukleotide usw. entfernt wurden. Die Dialyse wurde wie im Katalog 2000 von Roth beschrieben durchgeführt. Proteinlösungen rekombinanter Proteine (aus a und b) wurden mittels Ultrafiltrationseinheiten (Millipore) nach Anleitung des Herstellers konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.8.7 Isolation SopE- und SopE2-bindender Proteine

GST-Fusionsproteine (SopE, SopE2, Arf6, Rab4, Rab5, Rab15) wurden nicht, wie in 2.8.4 beschrieben, mit Glutathion von der Glutathion-Sepharose-Matrix getrennt, sondern für eine Säulenchromatographie verwendet. An die Matrix gebundene Glutathion-Sepharose-Fusionsproteine wurden in eine Säule gepackt, wobei die Höhe des Säulenmaterials mindestens dem 1,5fachen Durchmesser der Säule entsprach. Nach dem Waschen mit dem 20fachen Volumen des Matrixvolumens wurden Arf6, Rab4, Rab5, SopE oder SopE2 auf die Säule gegeben. Nach dem Waschen konnten spezifisch gebundene Proteine mit Hilfe von 1 mM GDP eluiert und durch *Western Blot*-Analyse (siehe 2.8.12) oder Färbung (Coomassie oder Silber, siehe 2.8.10) des Gels nachgewiesen werden.

2.8.8 Filterbindungsversuch

In den Filterbindungsversuchen wurde der durch die G-Nukleotid-Austauschfaktoren SopE bzw. SopE2 vermittelte G-Nukleotid-Austausch für verschiedene kleine GTPasen gemessen. 2 µg der entsprechenden GTPase wurden bei 28 °C für 12 min in einem Gesamtvolumen von 100 µl Puffer F* mit 8 µCi [³H]GDP beladen. Durch Erhöhung der MgCl₂ Konzentration auf 10 mM und Zugabe von 3 Volumina kaltem Puffer F, wurde der Komplex von GTPase und GDP stabilisiert und der Nukleotid-Austausch von [³H]GDP gestoppt. 1 mM GDP und 5 mM DTT wurden ohne Zusatz bzw. mit verschiedenen Mengen GST, SopE₇₈₋₂₄₀, SopE2₆₉₋₂₄₀ bzw. EDTA in Puffer F (Gesamtvolumen 400 µl) zu der [³H]GDP-beladenen GTPase gegeben, um die Austauschreaktion zu starten. Der Austausch wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten (15 s - 60 min) gestoppt, indem 100 µl Aliquots jeweils mit 800 µl eiskaltem Puffer F versetzt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert wurden. Diese Membran wurde 3 x mit 2 ml eiskaltem Puffer F gewaschen und getrocknet. Der radioaktive Zerfall von dem auf der Membran verbliebenen proteingebundenen [³H]GDP wurde nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (OpitPhase Supermix, Wallac/Perkin Elmer) in einem Wallac 1450 Micro Beta Trilux Szintillationszähler gemessen.

Puffer F*	50 mM NaCl	Puffer F	50 mM NaCl
	50 mM Tris/HCl pH 7,6		50 mM Tris/HCl pH 7,6
	5 mM MgCl ₂		5 mM MgCl ₂
	5 mM DTT		
	10 mM EDTA		

2.8.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % (Tabelle 13). Für die verbesserte Auftrennung von Proteinen kleineren Molekulargewichts, insbesondere nach isoelektrischer Fokussierung, wurde das Gel-System nach (Schägger und von Jagow, 1987) mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % verwendet (Tabelle 14). Bei dieser Methode findet durch die Einführung eines Folge-Ions mit einer höheren Mobilität (Trizin) und durch Verwendung von Gelen mit höherer Quervernetzung eine verbesserte Trennung der SDS-Micellen von den Protein-SDS-Micellen statt. Die Proben wurden in denaturierendem, reduzierendem Lysispuffer (5x Lämmli) resuspendiert, 5 min gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die "BenchMark Protein ladder" (Invitrogen) verwendet.

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden große Trizingele (20 cm x 20 cm x 1 mm) verwendet und folgende Spannungsreihe angelegt: 1 h 30 V, 1 h 80 V, 2 h 100 V, 2 h 120 V, 12 h 150 V bei 4

Tabelle 13: Zusammensetzung der Gele für eine SDS-PAGE nach Lämmli (Laemmli, 1970). Die finalen Konzentrationen sind in Klammern angegeben.

Trenngel nach Lämmli	Sammelgel nach Lämmli
3,3 ml Protogel (10 % T / 2,6 % C)	0,65 ml Protogel (3,9 % T / 2,6 % C)
4,06 ml H ₂ O	1,25 ml 0,5 M Tris/ pH 6,8 (125 mM)
2,5 ml 1,5 M Tris /HCl pH8,8 (375 mM);	3 ml H ₂ O _{dd}
50 µl 20 % SDS (0,1 %)	25 µl 20 % SDS
50 µl 10 % APS	25 µl 10 % APS
5 µl TEMED (0,05 %)	5 µl TEMED (0,05 %)

Tabelle 14: Zusammensetzung der Gele für eine SDS-PAGE nach Schägger (Schägger und von Jagow, 1987). Die finalen Konzentrationen sind in Klammern angegeben.

Trenngel nach Schägger	Sammelgel nach Schägger
3 ml Accugel (12 % T / 3,3 % C)	0,65 ml Protogel (3,9 % T / 2,6 % C)
1,3 g Glycerol (13 % m/v)	
3,3 ml Gelpuffer (1 M Tris/HCl pH 8,45; 0,03 % SDS)	1,24 ml Gelpuffer (0,74 M Tris/HCl pH 8,45; 0,1 % SDS)
ad 10 ml mit H ₂ O _{dd} auffüllen	3 ml H ₂ O _{dd}
50 µl 10 % APS; (0,05 %)	25 µl 10 % APS
5 µl Temed (0,05 %)	5 µl Temed

2.8.10 Protein-Färbungen

a) Coomassie-Färbung

Durch Färbung mit Coomassie Brilliant-Blau R250 können Proteinmengen von 0,1-1 µg oder mehr pro Spur im Polyacrylamidgel (siehe 2.8.9) detektiert werden.

Nach der Elektrophorese wurden die 2-D-Gele an einer Ecke markiert und zur Entfernung von überschüssigem SDS und Ionen für 10 min in H₂O_{dd} gewaschen. Um die aufgetrennten Proteine im Gel zu immobilisieren und um Nicht-Protein-Komponenten zu entfernen, die mit der nachfolgenden Färbung interferieren könnten (Gorg et al., 1998), wurden nach der Auftrennung in der zweiten Dimension die Gele für 1 h oder über Nacht in Fixierlösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 50 % H₂O_{dd} (v/v) geschwenkt.

Bei eindimensionalen Gelen erfolgte die Fixierung der Gele gleichzeitig mit der Färbung. Gele wurden in der ca. 200 ml Färbelösung (0,1 % Coomassie Brillant Blue R 250; 40 % Methanol; 10 % Eisessig in H₂O_{dd}) für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert, und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Entfärbelösung (40 % Methanol; 10 % Eisessig in H₂O_{dd}) entfärbt. Für eine anschließende Silberfärbung oder *Western Blot*-Analyse konnten Gele mit der Entfärbelösung vollständig entfärbt werden.

b) Silber-Färbung

Mit der Silberfärbung (nach Blum, 1987) können relativ geringe Proteinmengen von ca. 10-100 ng pro Spur im Polyacrylamidgel (siehe 2.8.9) nachgewiesen werden. Eine Korrelation der Färbeintensität mit der Menge an detektierten Proteinen ist bei dieser Methode nicht möglich.

Nacheinander wurden die Gele jeweils in einem Volumen von 200 ml der folgenden Lösungen inkubiert:

1 h in Fixierlösung	40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 50 % H ₂ O _{dd} (v/v)
3 x 20 min in H ₂ O _{dd}	
1 min in Thiosulfatlösung	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat in H ₂ O _{dd}
3 x 20 s in H ₂ O _{dd}	
20 min in Silbernitratlösung	0,2 % (w/v) Silbernitrat; 0,02 % (v/v) Formaldehydlösung (37 %ig) in H ₂ O _{dd}
2 x 20 s in H ₂ O _{dd}	
5 min in Entwicklerlösung	3 % (w/v) Natriumcarbonat; 0,05 % (v/v) Formaldehyd-lösung (37 %ig); 0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat in H ₂ O _{dd} .
2 x 1 min in H ₂ O _{dd}	
5 min in Stop-Lösung	0,5 % Glycin (w/v) in H ₂ O _{dd}
> 30 min in H ₂ O _{dd}	

2.8.11 Quantitative Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden in einer SDS-PAGE (siehe 2.8.9) im Vergleich zu einer standardisierten BSA-Lösung bekannter Konzentration bestimmt. Alternativ wurde das kolorimetrische Verfahren mit dem Protein-Microassay (BioRad) nach Angaben des Herstellers angewandt.

2.8.12 Proteindetektion durch *Western Blot*-Analyse (Towbin et al., 1979)

Mit Hilfe von *Western Blot*-Analysen (Immunoblot) können Proteine spezifisch mit Hilfe eines Antikörpers auf einer Membran detektiert werden.

Nach der Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE (siehe 2.8.9) wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dieser Transfer erfolgte in 1x *Western Blot* Puffer unter Anlegen einer konstanten Stromstärke von 300 mA für 1 h bzw. für große Gele 2 h im halbtrockenen Elektroblobverfahren. Unbesetzte Bindungsstellen wurden durch 1stündige Inkubation in Blockierungslösung aus 5 % BSA oder Magermilchpulver (w/v) in Waschpuffer (0,1 % Tween 20 (v/v) in 1xPBS) gesättigt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit einem in Blockierungslösung verdünnten Antikörper gegen das zu detektierende Protein inkubiert. Die eingesetzte Konzentration des jeweiligen Antikörpers (AK) ist der Tabelle 4 zu entnehmen. Zur Detektion wurde ein gegen den ersten AK gerichteter Peroxidasegekoppelter Antikörper (HRP = *horseradisch peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase, Tabelle 4) verwendet. Nach jeder Antikörperinkubation wurde drei Mal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion wurde das ECL-System (Pharmacia) und Röntgenfilme verwendet.

<i>Western Blot</i> Puffer (1x)	Tris	3,03 g
	Glycin	14,4 g
	ad H ₂ O _{dd}	800 ml
	Methanol	200 ml

2.8.13 Isoelektrische Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) erlaubt die Trennung von Proteinen entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt in einem pH-Gradienten. Um die zeitabhängige Veränderung dieses Gradienten zu verhindern (O'Farrell, 1975), wurden immobilisierte pH-Gradienten verwendet (Gorg, 1993). Diese werden durch Kopolymerisation eines Acrylamidgels mit sauren und basischen Acrylamidderivaten hergestellt (Pharmacia). Die Variation des pH-Bereiches erlaubt hierbei eine auf bestimmte pH-Bereiche optimierte Trennung. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Auftrennung in der ersten Dimension (IEF) ausschließlich

Fokussierstreifen mit einem nichtlinearen pH-Gradienten von 3-10 (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Anschließend wurden die Proteine in einer Trizin-SDS-PAGE in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (hochauflösende Zwei-dimensionale Gelelektrophorese, 2-D-Gel-Elektrophorese, siehe SDS-PAGE 2.8.9).

Die gefällte Proteinprobe (ca. 100 µg) wurde in 100 µl Lysispuffer resuspendiert und 30 min bei RT zur vollständigen Solubilisierung auf einem Drehrad inkubiert. Ungelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 22000 x upm, 30 min, 4 °C abgetrennt. Bei präparativen Gelen wurden 85 µl, bei analytischen Gelen 10 µl von der gelösten Probe mit 4 µl Ampholyten (3 µl pH 3-10 und 1 µl pH 4-7) versetzt, mit Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff, 4 % CHAPS) auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt und mit 2 mM Tributylphosphin (in 2-Propanol) versetzt. Die Probe wurde nach zwanzigminütiger Zentrifugation in die Vertiefung des *reswelling tray* (Pharmacia, Freiburg) gleichmäßig aufgetragen und das 18 cm Acrylamidgel, mit der Gelseite der Probe zugewandt, blasenfrei aufgelegt. Nach Überschichten der Gele mit Flüssigparaffin (DryStrip Cover Fluid, Pharmacia, Freiburg) wurde die Probe für ca. 7 h bei RT inkubiert, damit die Proteine in das Gel einwandern. Die rehydrierten Streifen wurden nach Abspülen mit H₂O_{dd} zwischen zwei angefeuchteten Blotpapieren weitgehend von der überschüssigen Flüssigkeit befreit. Die Flachbettkammer wurde mit flüssigem gereinigtem Paraffin benetzt, eine Plastikschaale mit Vertiefungen für die Gelstreifen möglichst blasenfrei aufgelegt und die gequollenen Streifen mit der Gelseite nach oben möglichst blasenfrei aufgelegt ("saures" Ende des Gradienten zur Anode, entspricht dem spitzen Ende). Um einen Stromfluß zu ermöglichen wurden 3 mm dicke mit deionisiertem Wasser angefeuchtete Blotpapierstreifen an den äußeren Enden auf die Gelstreifen gelegt. H₂O_{dd} darf nicht verwendet werden, da für den Stromfluß sonst nicht genügend Ionen vorhanden sind. Die Elektroden wurden über die Pufferstreifen gelegt und die gesamte Plastikschaale mit Paraffin überschicht. Es wurden Tücher mit 5 M NaOH getränkt und in die Kammer gelegt, um eine Reduktion der CO₂-Konzentration zu bewirken. Die Kammer wurde anschließend verschlossen.

Die Fokussierung wurde wie folgt bei schrittweise erhöhter Spannung durchgeführt: 30 min 0,5 kV, 30 min 1,0 kV, 30 min, 1,5 kV, 30 min 2,0 kV, 30 min 2,5 kV, 30 min 3,0 kV, 8 h 30 min 3,5 kV.

2.8.14 Proteinspaltung mit Trypsin

Mit Hilfe der Endoproteinase Trypsin (Schwein) können Peptidbindungen C-terminal der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin gespalten werden.

Im Coomassie Gel angefärbte Proteinbanden werden unter möglichst sterilen und sauberen Bedingungen ausgeschnitten (Verunreinigung mit Keratinen vermeiden). Die Gelstücke

werden mit 500 µl Wasch- und Schrumpfpuffer (100mM Tris/HCl pH 8,5 in 50 % Acetonitril) 20 min bei 30 °C geschüttelt. Der Puffer wurde entfernt und mit 500 µl Äquilibrationpuffer (50 mM Ammoniumbicarbonat Puffer pH 7,8 in 5 % Acetonitril) wurde durch 30minütiges Schütteln bei 30 °C der pH neutralisiert. Nach dem Entfernen des Puffers, wurden die Gelstücke angetrocknet, 10-30 µl Spaltpuffer (Äquilibrationpuffer mit 0,1-0,5 µg methyliertes Trypsin (Promega) hinzugegeben und die Gelstücke bei 37 °C üN unter Schütteln inkubiert.

2.8.15 Identifikation von Peptiden durch MALDI MS

Peptide wurden mit Hilfe der ZIPTIP (C-18 Micro-Säule, Promega) für MALDI MS vorbereitet. Nach dem Trypsinverdau wurde die im Volumen des Spaltpuffers mit 0,1 % TFA versetzt um den Acetonitrilgehalt zu senken. Die ZIPTIP Aufarbeitung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgte angepaßt an die Proteinmenge. 2 µl Probe wurden mit 2 µl Matrix (20 mg/ml Cyano-4-hydroxy cinnamic acid , 50 % Acetonitril, 0,3 % TFA) versetzt. Ca. die Hälfte wurde für eine MALDI MS Messung eingesetzt.

2.9 Zellbiologische Methoden

2.9.1 Anzucht von Zellkulturzellen

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden bei Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) bezogen. Zellen wurden unter 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung bei 37 °C in Dulbecco's modifiziertem Medium nach Eagle (DMEM) mit Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) und den für die einzelnen Zell-Linien hier aufgeführten Zusätze angezogen und alle 3-4 Tage passagiert.

Die in kleinen Flaschen kultivierten adhärenenten Zellen (außer J774 Makrophagen) wurden nach dem Waschen mit 5 ml PBS ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbicarbonat zum Ablösen für ca. 5-10 min mit 1,5 ml Trypsin-EDTA inkubiert, anschließend wurde die Reaktion mit 7 ml Medium gestoppt. J774 Zellen wurden in ca. 3 ml PBS mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst und in 5 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden 5 min bei RT und 500 Upm zentrifugiert und in 5 ml Medium resuspendiert. Ungefähr 1/5 einer voll bewachsenen Flasche wurde in 6 ml Medium zum Animpfen einer neuen (kleinen) Flasche verwendet.

Medium für COS7-Zellen und HeLa-Zellen:

DMEM mit L-Glutamin, 4500 mg/L D-Glukose ohne Natriumpyruvat, versetzt mit 5 % (FBS) (bovines Kälberserum).

Medium für J774 Makrophagen:

DMEM mit L-Glutamin, 1000 mg/L D-Glukose und Natriumpyruvat wurde mit 10% (FBS) und 2 mM L-Glutamin versetzt.

2.9.2 Transfektion

Für die transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen mit Plamid-DNA können verschiedenen Methoden angewandt werden. Bei der Kalziumphosphat-Methode kopräzipitieren Kalziumphosphat und DNA bei einem kontrollierten pH auf den Zellen (Chen und Okayama, 1987, Chen und Okayama, 1988).

Bei der Liposomen-vermittelten Transfektion bildet die negativ geladene DNA (Phosphatgruppen) einen Komplex mit den kationischen und neutralen Lipiden in den Liposomen (z. B. Lipofectamine, Invitrogen). Dieser Komplex ist positiv geladen und reagiert mit der negativ geladenen Oberfläche der Zelle. Bei dieser Transfektionsmethoden darf nur serumfreies Medium verwendet werden. Zugabe von Lipofectamin Plus Reagenz erhöht die Transfektionseffizienz.

In einer weiteren Methode wird ein aktiviertes Dendrimer (PolyFect Reagent, Quiagen, Hilden) als Transfektionsreagenz verwendet. Die Struktur dieses Reagenz mit den nach außen gerichteten geladenen Aminogruppen ermöglicht zusammen mit der DNA die Bildung eines kompakten Komplexes, der ebenfalls positiv geladen ist. Eine zweite Funktion des Polyfect Reagenz besteht in seiner puffernden Wirkung, nachdem komplexhaltige Endosomen und Lysosomen fusioniert haben. Hierbei werden die lysosomalen Nukleasen inhibiert und die DNA kann intakt in den Zellkern gelangen. FBS stört bei dieser Methode nicht.

Die Kalzium-Phosphat-Methode wurde wie in (Anonymous 1989) beschrieben angewendet. Für die Transfektion mit den beiden anderen Methoden wurde die vom Hersteller empfohlene Prozedur angewendet. In jedem Fall wurde LPS-freie DNA verwendet, die mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers präpariert worden war.

2.9.3 Immunfluoreszenzfärbungen**a) Translokation sekretierter Proteine**

Der Nachweis der Translokation SPI-TyplII sekretionsabhängigen Effektorproteine in die Wirtszelle erfolgte durch indirekte Fluoreszenzmikroskopie. Plasmidal kodierte Proteine mit einem M45-Epitop wurden mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen diesen M45-C-Terminus detektiert.

Hierzu wurden Zellkultur-Zellen zu einer Konfluenz von ca. 60 % zwei Tage auf

Deckgläschen angezogen. Bakterien wurden unter SPI1- induzierenden Bedingungen angezogen. Die Zellen wurden mit einer MOI (= "multiplicity of infection", Bakterienzahl / Zellzahl bei Infektionsversuchen) von 20 in einem Gesamtvolumen von 500 µl HBSS pro 12 mm Deckgläschen infiziert. Die Infektion wurde nach 40 min abgestoppt, indem die Zellen zunächst mit HBSS gewaschen und anschließend für 10 min mit 3,7 % Formaldehyd fixiert wurden. Nach dem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen 5 min mit 0,1 % Triton permeabilisiert, 3x mit 1x PBS gewaschen und für 1 h mit Blockierungspuffer (3 % BSA in 1xPBS) inkubiert. Zur Detektion der M45 "getaggtten" Proteine wurde zunächst 1 h mit einem monoklonalen Antikörper gegen M45 (1:2 verdünnt in Blockierungspuffer) und anschließend 1 h mit einem sekundären Antikörper gegen das humane IgG-Epitop konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (1:100) oder Cy3 (1:1000), inkubiert.

Neben der Färbung der translozierten Proteine erfolgte immer auch eine Färbung der Nukleinsäuren mit DAPI (1 mg/ml 1:2000 - 1:10000 verdünnt). Bakterien wurden wie für den Invasionsassay nach der Triton-Permeabilisierung beschrieben detektiert. Als sekundärer Antikörper wurde hierfür ein mit einem anderen Farbstoff gekoppeltes Konjugat verwendet. Wurde für die Detektion des M45-Epitops FITC (grün) verwendet, so wurde für die Bakterien z. B. TRITC (rot) oder AMCA (blau) verwendet. Nach jedem Inkubationsschritt mit einem Antikörper wurde 3x mit je 500 µl 1x PBS gewaschen.

b) Nachweis von Arp2/3-Komplex- und Aktinumlagerungen

Bakterien wurden unter sekretierenden Bedingungen angezogen und die Zellen zwei Tage vor Versuchsbeginn zu einer Konfluenz von 80 % auf Deckgläsern ausgesät. Die Infektion erfolgte bei einer MOI von 10 für 12 min, wenn nicht anders angegeben. Nach der anschließenden Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd und Zellpermeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 (wie bereits unter a beschrieben) wurde Aktin direkt durch Phalloidin-TRITC oder Phalloidin-FITC angefärbt, während die Arp2/3 Komplexe durch α -p41-Arc Antiserum und α -Kaninchen-FITC bzw. -Cy5 Antikörper detektiert wurde (Tabelle 4). Sowohl zelluläre als auch bakterielle DNA wurde durch Färbung mit DAPI nachgewiesen .

Bei gleichzeitiger Färbung von extra- und intrazellulären *S. typhimurium* wurden diese wie in der differentiellen Färbung beschrieben (siehe 2.9.3c) detektiert. Hierfür wurden wiederum andere Farbstoffe verwendet, als die für die Färbung von Arp2/3 verwendeten. (Antikörper, siehe Tabelle 4). Die Detektion erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Analyse.

c) Differenzielles Färbeprotokoll

Für den Nachweis der invadierter *S. typhimurium* mittels Immunfluoreszenz wurde wie

folgt vorgegangen (innen/außen - Färbung):

COS7-Zellen wurden zwei Tage vor Infektion mit *Salmonella* spp. wie bereits beschrieben in 24-Kammer-Platten auf Glasplättchen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % angezogen. Kurz vor Zugabe der Bakterien wurde das Medium gegen HBSS ausgetauscht und die unter SPI1-induzierenden Bedingungen angezogenen *Salmonella* spp. wurden (wenn nicht anders beschrieben) mit einer MOI von 10 auf die Zellen gegeben.

Nach einer Inkubation von 45 min bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen und anschließend mit 3,7 % Formaldehyd in 1x PBS fixiert. Um unspezifische Signale zu reduzieren wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für 1 h blockiert (3 % BSA in 1x PBS). Extrazelluläre Salmonellen wurden mit einem α -Salmonella O-1,4,5,12 (8) polyklonalen Antiserum (1:400 in PBS, 3 % BSA) gegen Oberflächen-Lipopolysaccharide markiert, überschüssiges Antiserum durch dreimaliges Waschen entfernt und die markierten Bakterien mit einem α -Kaninchen FITC-Konjugat (1:100 in PBS, 3 % BSA) gefärbt. Nach Permeabilisierung der COS7-Zellmembranen (4 min in 1x PBS, 0,1 % Triton x-100) und dreimaligem Waschen wurden extra- und intrazelluläre Bakterien mit demselben α -Salmonella Antiserum aber mit α -Kaninchen TRITC-Konjugat (1:100 in PBS, 3 % BSA) gefärbt. Im Mischfilter für beide Fluoreszenzfarbstoffe konnten innen liegende Bakterien als rote (nur TRITC gefärbte) Stäbchen identifiziert werden, während der FITC-Farbstoff den TRITC-Farbstoff der außen gefärbten Bakterien überstrahlte und diese grün erscheinen ließ. DNS von Zellen und Bakterien wurde mit 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) blau gefärbt. Nach dem Waschen wurden die Glasplättchen mit "Vecta Shield" auf einem Glasobjektträger eingedeckelt. Diese Substanz verlangsamt das Ausbleichen des lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs. Um die Invasivität verschiedener Bakterienstämme zu bestimmen wurden die rot gefärbten invadierten Bakterien in den Zellen, die mehr als eine Bakterie enthielten, gezählt. Die relative Invasivität eines Stammes wurde wie folgt ermittelt:

Invasivität (%) = $\frac{\text{gemittelte Zahl internalisierter Bakterien pro infizierter Zelle}}{\text{gemittelte Zahl internalisierter } S. \text{ typhimurium (SL1344) aus Kontrolle}}$

Um den Einfluß eines nach Transfektion exprimierten Gens zu testen, wurde dieselbe Färbemethode wie beim Invasionsversuch beschrieben verwendet. In diesem Fall wurde die Zahl invadierter Zellen, also Zellen, die mehr als ein Bakterium internalisiert hatten, bestimmt, und in Bezug zur Gesamtzahl transfizierter Zellen gesetzt:

Invasivität (%) = $\frac{\text{Zahl invadierter transfizierter Zellen}}{\text{Gesamtzahl transfizierter Zellen}}$.

2.9.4 Gentamicin Protektionsversuch

Für den Vergleich der Invasivität unterschiedlicher *S. typhimurium*-Stämme wurden die Zahl internalisierter Bakterien durch den Gentamicin-Protektionsversuch bestimmt:

Zellkulturzellen wurden in 24-Kammer-Platten zu einer Konfluenz von 80 % nach zwei Tagen Wachstum kultiviert und nach Austausch des Mediums gegen 500 µl HBSS mit Bakterien bei einer MOI von 10 infiziert. Die genaue Zellzahl wurde durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen auf LB-Platten (ggf. supplementiert mit Antibiotika) und anschließendes Zählen der Kolonien bestimmt. Nach 45 min Infektionsdauer wurden nicht internalisierte Bakterien durch Waschen mit HBSS und anschließende 2-stündige Behandlung mit gentamicinsupplementiertem Medium (100 µg/ml Gentamicin in Nährmedium für COS7-Zellen) abgetötet. Nach dieser Zeitspanne wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und mit 500 µl 0,1 % Natriumdeoxycolat in 1x PBS lysiert. Hierbei wurden die Zellen aufgeschlossen und die invadierten überlebenden Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen zur Bestimmung der Zellzahl ausplattiert.

Für die Auswertung wurde die relative Invasivität (%) gegenüber dem Wildtyp wie folgt bestimmt:

$$100 \times \frac{\text{Zahl invadierter Mutanten pro Zahl infizierter Mutanten/}}{\text{Zahl invadierter Wildtyp SB300 pro Zahl infizierter Wildtyp SB300}}$$

2.9.5 Passive Invasion von *S. typhimurium* SB161

Für die passive Invasion wurde eine sekretionsdefiziente *S. typhimurium* Mutante (SB161; $\Delta invG$ (pWKS30, Amp^r; Wang und Kushner, 1991) verwendet, wie beschrieben in Hardt et al., 1998a. COS7-Zellen wurden für 45 min mit einer 1:1 Mischung von SB161 (pWKS30; Amp^r) und der zu testenden *S. typhimurium* Mutante (Amp^s) infiziert (MOI = 4). Die Zahl passiv internalisierter SB161 Bakterien wurde, wie im Gentamicin Protektionsversuch beschrieben (siehe 2.9.4), durch Ausstreichen auf LB-Platten (supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin) bestimmt.

2.9.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Infektion erfolgte wie zuvor für Invasionsversuche (siehe z. B. in 2.9.3c) beschrieben bei einer MOI = 10. Die Proben wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten (20 und 30 min) in 5 % Formaldehyd und 3 % Glutaraldehyd in PBS für 1 h auf Eis fixiert und anschließend 3 x mit 500 µl PBS und TE Puffer gewaschen. Die Proben wurden im weiteren von Dr. Manfred Rhode GBF, Braunschweig elektronenmikroskopisch analysiert. Nach der graduellen Dehydrierung mit Aceton wurden die Proben mit CO₂ bis zum kritischen Punkt weiter getrocknet. Schließlich wurden die Proben mit einem 10 nm dicken Goldfilm überzogen und

im Zeiss Emissionsfeld Rasterelektronenmikroskop DSM982 Gemini bei 5 kV mit einem SE-Detektor und einem Everhart-Thornlex SE-Detektor im Verhältnis 50:50 untersucht.

2.9.7 Nachweis der Zytotoxizität in Makrophagen

Bei Anzucht von *S. typhimurium* unter SPI1-induzierten Bedingungen sind diese für Makrophagen toxisch. Zur Überprüfung der Zytotoxizität wurden J774 Makrophagen mit *S. typhimurium* Wildtyp bzw. Mutanten infiziert und die Zahl der abgetöteten Makrophagen bestimmt. Zur Identifizierung permeabilisierter Makrophagen wurde Ethidiumhomodimer-1 verwendet, eine Substanz, die an Nukleinsäuren bindet. Da Zellen mit intakter Membran impermeabel für Ethidiumhomodimere sind, können diese nur in die Nukleinsäuren permeabilisierter Zellen eingelagert werden. Bei einer Wellenlänge von 617 nm fluoresziert das DNA-gebundene Ethidiumhomodimer-1 rot.

Nachdem J774 Makrophagen zu einer Konfluenz von ca. 80 % gewachsen waren, wurden diese mit HBSS gewaschen und für 45 min mit *S. typhimurium* SL1344 und Mutanten in einer MOI von 10 infiziert. Nach dem Waschen mit HBSS wurde für 25 min bei 37 °C mit Ethidiumhomodimer-1 (2 µM) gefärbt. Die Zellen wurden gewaschen und auf einem Tropfen HBSS gelegt, versiegelt und die Zahl permeabilisierter Makrophagen bestimmt und in % der Gesamtzahl an Makrophagen angegeben.

2.10 Tierversuche

2.10.1 Infektionsversuche an Balb/c Mäusen

Infektionen von Balb/c Mäusen mit *S. typhimurium* dienen als Tiermodell für die Infektion von *S. typhi* beim Menschen, da der Krankheitsverlauf relativ ähnlich ist. Typ III Sekretionsmutanten sind in Balb/c Mäusen weniger virulent (LD₅₀ um das 20fache reduziert, Organbefall ebenfalls reduziert).

Der Tierversuch diente daher der Überprüfung des in Zellkultur Experimenten gefundenen Phänotyps *in vivo*. Um eine ausreichende statistische Darstellung zu erreichen, wurde für jede Infektion eine Gruppengröße von mindestens 5 weiblichen Balb/c Mäusen für jeden *S. typhimurium* Stamm gewählt.

Bakterien wurden unter SPI1-induzierenden Bedingungen angezogen und auf ca. 5×10^6 Bakterien in 50 µl 1x PBS verdünnt. Die genaue Zellzahl wurde durch Ausplattieren bestimmt. Nachdem den Mäusen 4 h vor Versuchsbeginn die Nahrung und das Wasser entzogen worden war, wurden die Mäuse mit je 50 µl oral infiziert. Direkt danach wurde Wasser wieder zur Verfügung gestellt und 1 h 30 min später wurden sie gefüttert.

Nach 2 bzw. 4 Tagen wurden die Mäuse mit CO₂ getötet und Peyerschen Plaques (4), Milz

und Leber entnommen. Die Organe wurden jeweils in 1 ml bzw. die Leber in 5 ml Puffer (1xPBS, 0,5 % Tergitol, 0,5 % BSA) homogenisiert und je 100 µl in geeigneten Verdünnungen ausplattiert.

2.11 Bioinformatische Methoden

Für Sequenzanalysen wurden DNASTar Programme (DNASTar Inc.) oder das Programm DNA Strider (Version 1.2, marck@jonas.saclay.cea.fr) verwendet.

Proteinsequenzvergleiche wurden mit dem Clustal-Paket (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSAHLP/npsahlp_alignclustalw.html) durchgeführt. Zur Darstellung dieser Sequenzvergleiche wurde außerdem das Boxshade-Programm (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) verwendet und zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft wurde das Phylip software Paket mit den Programmen FITCH und DRAWTREE (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) genutzt.

Die Auswertung der Massenspektrometrisch ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes m/z von Proteometrics, LLC.

Für die Proteinidentifizierung wurden folgende Programme verwendet:

- MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0u/msfit>)
- ProFound (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)

Folgende Datenbanken wurden verwendet:

- Datenbank des Sanger Zentrums (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_typhi)
- NCBI Datenbank (<http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>)

3 Ergebnisse

3.1 Das *sopE* homologe Virulenzgen *sopE2*

3.1.1 Identifizierung von *sopE2*

Salmonella spp. translozieren Effektorproteine, wie z. B. den Invasionsfaktor SopE, über ein Typ III Sekretionssystem (TSS) in die Wirtszelle. Eine Mutation in *sopE* reduziert die Fähigkeit, Membranumlagerungen zu induzieren und die Invasivität um den Faktor 2 (Wood et al., 1996, Hardt et al., 1998b). Eine solche Mutante ist jedoch in COS Zellen immer noch ca. 500 x invasiver als eine sekretionsdefiziente Apparatsmutante ($\Delta invG$, SB161). Aus diesem Grund wurde nach weiteren Effektorproteinen mit ergänzender oder redundanter Funktion gesucht. In einer *Western Blot*-Analyse des Kulturüberstands der *sopE*-negativen *S. typhimurium* Mutante SB856 (=SL1344, *sopE::aphT*, Tab1, *Material und Methoden*) wurde mit einem polyklonalen α -SopE Antiserum (IM1, Miold et al., 1999) eine schwache aber spezifische Bande von etwas geringerem Molekulargewicht als SopE detektiert (Abb. 6).

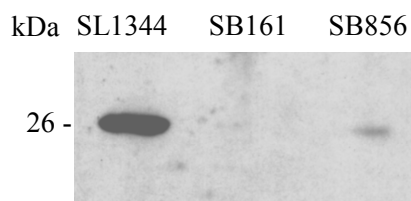


Abb. 6: Der SopE-negative-Stamm SB856 sekretiert ein SopE-ähnliches Protein.

Kulturüberstände von verschiedenen *S. typhimurium*-Stämmen wurden in einer *Western Blot*-Analyse mit einem α -SopE Antikörper (IM1; Lloyd et al., 2001a) untersucht. 1: SL1344 ; 2: SB161 ($\Delta invG$); 3: SB856 (SL1344; *sopE::aphT*).

Bei der Suche nach einer *sopE*-homologen Sequenz in *S. typhi* CT18 in der Datenbank des Sanger Zentrums (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_typhi) wurde eine Nukleotidsequenz von 722 bp gefunden (Abb. 7). Diese Sequenz ist zu 70 % identisch mit der von *sopE* aus *S. typhimurium* SL1344 (NCBI Kennummer AF043239) und *S. typhi* X3744 (NCBI Kennummer AF153829). Daher wurde das Gen *sopE2* genannt. Eine Deletion des Nukleotids 73 in der Sequenz von *sopE2* aus *S. typhi* CT18 im Vergleich mit *sopE* aus *S. typhimurium* resultiert allerdings in einer Verschiebung des Leserasters (Abb. 7). Um zu beweisen, daß diese Deletion nicht auf eine ausschließlich in dem Stamm *S. typhi* CT18 vorkommenden Mutation oder einen Sequenzierfehler zurückzuführen ist, wurde die korrespondierende Region in einem weiteren Stamm, *S. typhi* X3744, durch PCR und anschließende Sequenzierung überprüft (pM200, siehe Tabelle 9 in *Material und Methoden*). Diese Sequenz ist 100 % identisch mit der von *S. typhi* CT18 aus der Datenbank und weist ebenfalls die Deletion von Nukleotid 73 auf. Aus diesem Grund ist anzunehmen, daß das *sopE2*-Gen in *S. typhi* nicht funktional ist.

```

Sty1 1 GTGACAAAAATAACTTTATCTCCCCAGAATTTTAGAATCCAAAAACAGGAAACCACACTA
Stm1 1 .....
Sty2 1 .....T..C.....AC....CA.....C.C.AC.....T.G.AGT..CGTTGA..C.

Sty1 61 CTAAAAGAAAAATCAACCGAGAAAAATCTTTTAGCAAAAAGTATTCTCGCAGTAAAAAAT
Stm1 61 .....
Sty2 61 G.....G.....GG.CAT...T.....ACT..C..T.G....

Sty1 121 CACTTCATCGAATTAAGGTCAAAATTATCGGAACGTTTATTTCGCATAAGAACACTGAG
Stm1 121 .....
Sty2 120 AG...T...AGCC.GTC.A.G.GTC.G..A..T.....GCCT....C.AC.A..A..C

Sty1 181 TCTTCTGCAACACACTTTCACCGAGGAAGCGCATCTGAGGGCCGGGCAGTGTGACAAAT
Stm1 181 .....
Sty2 180 ATAC.GA.T..C..T....T..T..G....C.....TA.....A..A..C.G.

Sty1 241 AAAGTCGTTAAAGATTTTATGCTTCAAACGCTCAATGATATAGATATTAGAGGTAGTGCG
Stm1 241 .....
Sty2 240 ...ACT.....G....A.....AGCC.G....C.A....A....

Sty1 301 AGTAAAGACCCCGCATAACGCCAGCCAGACCCGTAAGCTATACTATCGGCAGTTTACAGC
Stm1 301 .....
Sty2 300 .....T..G..C..T..TC.T....AT.C....C...T...A..C..G....T

Sty1 361 AAGAATAAAGATCAGTGTGTAATTTGCTCATCAGCAAAGGGATCAACATAGCGCCTTTT
Stm1 361 .....
Sty2 360 ..T.....C.....A..A.....T.....G...GT..TA.C..C...

Sty1 421 CTTCAGGAAATTGGCGAAGCAGCGAAAAATGCAGGTCTGCCCGGAACAACCAAAAATGAC
Stm1 421 .....
Sty2 420 ..GA.A..G..A..A..G..T...C.G....G..G..A..T..GGAG.TA.....GT

Sty1 481 GTTTTTACGCCAAGCGGCGCAGGGGCCAATCCTTTTATAAATCCGTTGATTTTCATCAGCA
Stm1 481 .....
Sty2 480 ..A....T..G.T..G.....G.....G..CGTC..CC.C...G.TG...G

Sty1 541 AACAGTAAGTATCCACGTATGTTTATCAATCAACATCAGCAGGCATCCTTTAAAAATCTAT
Stm1 541 .....
Sty2 540 .G..T..A....G.A.....A....TA.....TG..T.....GCG...

Sty1 601 GCGGAGAAGATCATTATGACAGAAGTTGCACCACTGTTTAAATGAGTGTGCTATGCCGACT
Stm1 601 .....
Sty2 600 ..T....A..G.....A..G..A.G..G.....A..G.GA.G.....G

Sty1 661 CCACAGCAATTCCAACTGATACTAGAAAAACATTGCTAATAAATATATACAATACTACTCCC
Stm1 661 .....A.....
Sty2 660 .....A....T..GT.A.CTA.....T....G....GC..C.T..GA.TG.CT..

Sty1 721 TGA
Stm1 721 ...
Sty2 720 ....

```

Abb. 7: Sequenzvergleich zwischen *sopE* und *sopE2* Genen von *S. typhi* und *S. typhimurium*.

Sequenzvergleich der *sopE* ORFs von *S. typhimurium* SL1344 (Stm1; NCBI Kennnummer AF043239; Hardt et al., 1998b) und *S. typhi* X3744 (Sty1; NCBI Kennnummer AF153829; Miroid et al., 1999) mit der homologen *sopE2* Sequenz aus *S. typhi* CT18 (Sty2) aus der Datenbank des Sanger Zentrums (später veröffentlicht in NCBI Kennnummer AL627272). Für den Sequenzabgleich wurde der Algorithmus Clustal 1.7 verwendet.

In *S. typhi* ist diese *sopE2* Sequenz ca. 7 kB stromaufwärts von dem PhoP/Q regulierten Locus *pagO* lokalisiert (Gunn et al., 1998). Weitere Homologien der *sopE2* Region aus *S. typhi* CT18 mit bereits identifizierten Genen oder hypothetischen ORFs sind in Abb. 8 A dargestellt.

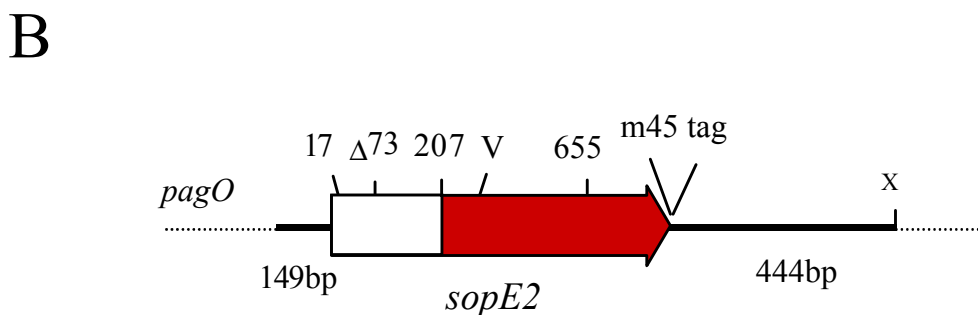
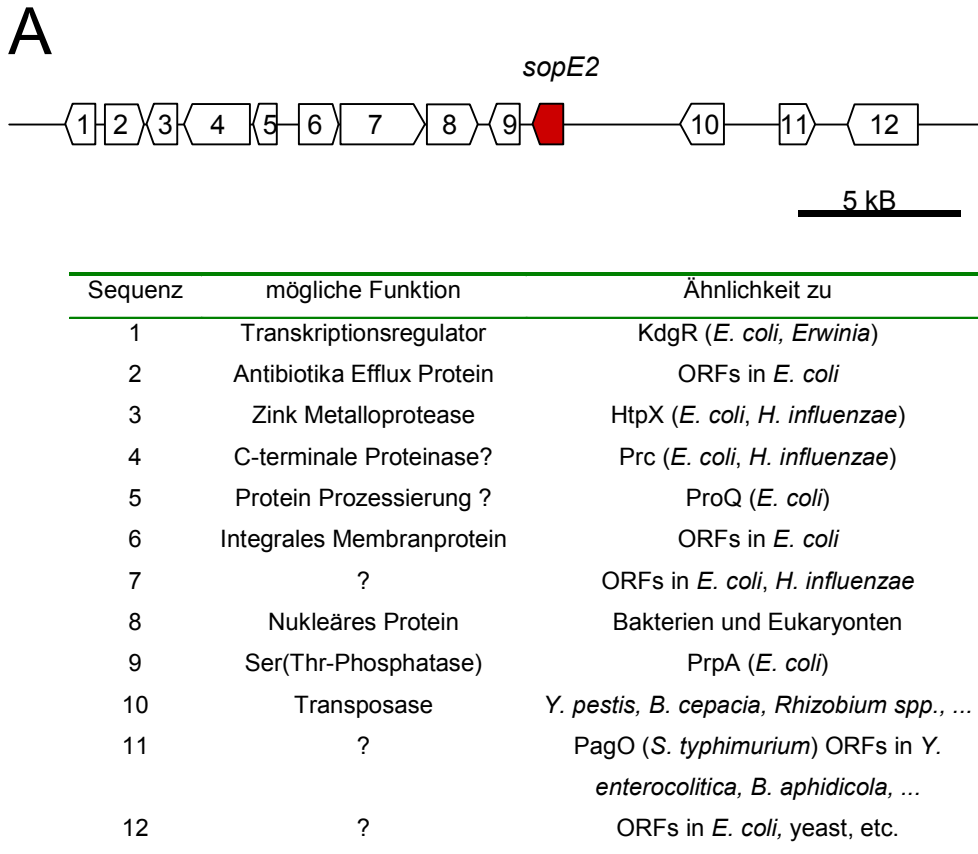


Abb. 8: Der *sopE2* Locus von *S. typhi* CT18 und *S. typhimurium* SL1344.

A. Genkarte von *S. typhi* CT18. Die Lokalisation von *sopE2* (schwarz ausgefüllter Pfeil) innerhalb des Genoms ist durch die Gene *pagO* (*S. typhimurium* NCBI Kennnummer O30646) und *prp1* (NCBI Kennnummer P55798), einer Ser/Thr-Phosphatase in *E. coli*, definiert. Die Deletion von Nukleotid 73 in *sopE2* ist eingetragen. Der Balken indiziert die Länge der Sequenzen. Durch Suche mit Blast-X in der NCBI Datenbank konnten den ORFs (weiße Pfeile) Gene und ORFs mit mehr als 50 % Homologie zugeordnet werden. B. Das *sopE2* Gen in *S. typhimurium* SL1344. Die dicke Linie markiert das 1316 Bp umfassende sequenzierte DNA Fragment von *S. typhimurium* SL1344. Die Position des Epitops in SopE2_{M45} und die vorhergesagte katalytisch aktive Domäne, die für den G-Nukleotid-Austausch von SopE2 (in grau: AS 69-240) *in vitro* hinreichend ist, sind angegeben.

Aus der abgeleiteten Peptidsequenz, ohne Berücksichtigung der Deletion ergibt sich eine Sequenzidentität von SopE2 aus *S. typhi* gegenüber SopE aus *S. typhimurium* von 70% (Abb. 9).

A

```

Sty1  1  MTKITLSPQNFRIQKQETTLLKEKSTEKNSLAKSILAVKNHFIELRSKLSERFISHKNT
Stm1  1  MTKITLSPQNFRIQKQETTLLKEKSTEKNSLAKSILAVKNHFIELRSKLSERFISHKNT
Sdu1  1  MTKITLFPNFRIOKQEATPLKEKSTEKNSLAKSILAVKNHFIKLNSKLSERFISHKNT
Stm2  1  MTNITLSTQHYRIHRS DVEPVKKEKTEKDIFAKSITAVRNSFISLSTSLSDRFSLSHQQTD
Sty2  "1" -----KRKTTTEKDIFAKSITAVRNSFISLSTSLSDRFSLSHQQTD

Sty1  61 SSATHFHGRSASEGRAVLTKNVKDFMLQTLNDIDIRGSASKDPAYASQTREAILSAVYS
Stm1  61 SSATHFHGRSASEGRAVLTKNVKDFMLQTLNDIDIRGSASKDPAYASQTREAILSAVYS
Sdu1  61 SSATHFHGRSASEGRAVLTKNVKDFMLQTLHDIDIRGSASKDPAYASQTREAILSAVYS
Stm2  61 IPTTHFHGRNASEGRAVLTSKTVKDFMLQKLNSLDIKGNASKDPAYARQTCEAILSAVYS
Sty2  61 "IPTTHFHGRSASEGRAVLTSKTVKDFMLQKLNSLDIKGNASKDPAYARQTCEAILSAVYS

Sty1  211 KNKDQCCNLLISKGINIAPFLQEI EGEAAKNAGLPGTTKNDVFTPSGAGANPFITPLISSA
Stm1  211 KNKDQCCNLLISKGINIAPFLQEI EGEAAKNAGLPGTTKNDVFTPSGAGANPFITPLISSA
Sdu1  211 KYKDQYCNLLISKGIDIA PFLKEIGEAAQNAGLPGATKNDVFSPSGAGANPFITPLITSA
Stm2  211 NNKDQCC KLLISKGVSI TPFLKEIGEAAQNAGLPG EIKNGVFTPGGAGANPFV VPLIASA
Sty2  "121" NNKDHCC KLLISKGVSI TPFLKEIGEAAQNAGLPG EIKNGVFTPGGAGANPFV VPLIAAA

Sty1  811 NSKYPRMFINHQHQASFKIYA EKIMTEVAPLFNECAMPTPQQFOLI LENIANKYIQYTP
Stm1  811 NSKYPRMFINHQHQASFKIYA EKIMTEVAPLFNECAMPTPQQFOLI LENIANKYIQNTP
Sdu1  811 YSKYPHMF TSOHQKASFN IYA EKIMTEV VPLFNECAMPTPQQFQOLI LENIANKYIQNTP
Stm2  811 SIKYPHMF INHNQQV SFKAYA EKIVMKEV TPLFNKGTMP TPQQFOLI LENIANKYIQNAS
Sty2  "181" SIKYPHMF INHNQQV SFKAYA EKIVMKEV TPLFNKGTMP TPQQFOLI LENIANKYIQNAS
    
```

B

	SopE Stm	SopE Sty	SopE Sdu	SopE2 Stm	SopE2 Sty
SopE Stm	100 %				
SopE Sty	99.5 %	100 %			
SopE Sdu	90 %	90 %	100 %		
SopE2 Stm	69 %	69 %	66 %	100 %	
SopE2 Sty	70 %	70 %	67 %	97 %	100 %

C

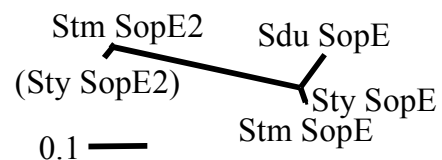


Abb. 9: Sequenzvergleich von SopE und SopE2 in unterschiedlichen Serovaren.

Vergleich der Aminosäuresequenzen von SopE Proteinen von *S. typhimurium* (Stm1; NCBI Kennnummer AF043239.1), *S. dublin* (Sdu1; NCBI Kennnummer L78932) und *S. typhi* (Sty1; Kennnummer AF153829) mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz von SopE2 aus *S. typhimurium* (pStm2; pM211 NCBI Kennnummer AF217274) und der Polypeptidsequenz abgeleitet vom Pseudogen *sopE2* aus *S. typhi* (Sty2, pM200 NCBI Kennnummer AL627272). A. Sequenzunterschiede in den Aminosäureresten. Schwarze Boxen zeigen die konservierten Aminosäurereste, graue Boxen synonyme Aminosäurereste und weiße Boxen symbolisieren unähnliche Aminosäurereste. B. Sequenzunterschiede in den Aminosäureresten in % Ähnlichkeit. C. Verwandtschaftsbeziehungen von SopE und SopE2. Die in Abbildung A und B mit Hilfe der clustal 1.7 software dargestellte Sequenzähnlichkeit wurde verwendet, um die genetischen Distanzen zu bestimmen (Phylip software Paket; <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Der Stammbaum wurde mit Hilfe von FITCH (Phylip) berechnet und mit dem "drawtree" Programm (Phylip) dargestellt. Der Balken zeigt die Differenz von 0,1 und dient als Vergleichsmaßstab für die Länge der Verzweigungen, respektive den Verwandtschaftsgrad.

Um die Präsenz eines Proteins mit hoher Homologie zu SopE auch in *S. typhimurium* nachzuweisen, wurden Primer entsprechend der *sopE2* Sequenz aus *S. typhi* generiert und die korrespondierende Region in *S. typhimurium* SB856 mit PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Der GC-Gehalt für *S. typhimurium* beträgt bei *sopE* 40 % und bei *sopE2* 42 %, während der GC-Gehalt der des übrigen Chromosoms ca. 52 % beträgt. Die analysierte DNA-Sequenz ist 97 % identisch mit der von *sopE2* aus *S. typhi* mit dem Unterschied, daß es sich um einen 723 Bp umfassenden kompletten offenen Leserahmen handelt (Abb. 7, Tabelle 15). Die bei *S. typhi* gefundene Deletion fehlte. In Zusammenarbeit mit Dr. Susanne Mirolid konnte außerdem gezeigt werden, daß *sopE2* in *S. typhimurium* in der gleichen Region kodiert ist wie in *S. typhi*, 7 kB stromaufwärts von *pagO* in Centisom 40-42 (Abb. 8 B). Im Gegensatz zu *sopE* ist das *sopE2* Gen nicht von der Sequenz des Bakteriophagen SopE ϕ flankiert. Die abgeleitete Proteinsequenz von SopE2 aus *S. typhimurium* ist zu 69 % identisch mit SopE von *S. typhimurium* oder *S. typhi* (Abb. 9). Das berechnete Molekulargewicht von SopE2 beträgt ca. 26 kDa. Die Ähnlichkeit in den Sequenzen von *sopE2* und *sopE* ließ eine ähnliche Funktion dieser beiden Proteine vermuten, die im Folgenden untersucht wurde.

Tabelle 15: Vergleich von *sopE* in *S. typhimurium* mit *sopE2* in *S. typhimurium* und *S. typhi*.

	SopE (<i>S. typhimurium</i>)	SopE2 (<i>S. typhi</i>)	SopE2 (<i>S. typhimurium</i>)
Länge	723 nt	722 nt	723
GC Gehalt	40 %	42 %	42 %
Identität (vs. SopE)	100 %	70 %	70%
Phagen kodiert	ja	nein	nein

3.1.2 SopE2 ist im Gegensatz zu SopE in *S. typhimurium*-Stämmen stark konserviert

Zur Überprüfung der genetischen Konservierung von *sopE* und *sopE2* in *Salmonella* spp. wurden in einer Kooperation mit Susanne Mirolid Stämme verschiedener Referenzsammlungen untersucht. Die phylogenetischen Beziehungen der Stämme dieser Kollektionen sind gut charakterisiert. Aus der Referenzsammlung SARB wurden 72 *S. enterica* Stämme aus 37 unterschiedlichen Serovaren der Subspezies I (siehe *Anhang*, Boyd et al., 1993) und aus der SARA Sammlung 68 Stämme von 5 eng verwandte Serovaren von *S. enterica* Subspezies I (siehe *Anhang*, Beltran et al., 1991) im Kolonielift-Verfahren (siehe 2.7.11 in *Material und Methoden*) auf die Präsenz von *sopE* hin überprüft. Die Konservierung von *sopE* wurde außerdem in einigen dieser Stämme und in einigen Isolaten aus einer

deutschen Sammlung des Robert Koch Instituts, die durch Phagentypsierung epidemiologisch charakterisiert worden war (Miold et al., 1999), in *Southern Blot* und *Western Blot*-Analysen (siehe 2.8.12 in *Material und Methoden*) untersucht.

Durch Hybridisierung mit einer *sopE* Sonde konnte im Kolonielift-Verfahren gezeigt werden, daß *sopE* in 33 % der getesteten *S. enterica* Subspezies I Serovare (in 24 von 72 Isolaten) vorhanden war (Abb. 10 B). Es war keine Übereinstimmung in der Verbreitung von *sopE* und der phylogenetischen Verwandtschaft dieser Stämme zu erkennen.

Analoge Hybridisierungsversuche mit Stämmen der Serovare Typhimurium (Tm), Saintpaul (SP), Heidelberg (He), Paratyphi B (Pb) und Muenchen (Mu) der SARA Kollektion ergaben ebenfalls keine Übereinstimmung in der Verbreitung von *sopE* und der phylogenetischen Verwandtschaft dieser Stämme. (Abb. 10 A). Von 21 untersuchten Stämmen des Serovars Typhimurium der SARA Sammlung wurde nur in einem Isolat das *sopE* Gen nachgewiesen. Dieses Isolat (SARA4) kodierte als einziges von vier Isolaten aus der Tm1-Gruppe des Serovars Typhimurium das *sopE* Gen. (Abb. 10 A, Abb. 13). Dies wurde durch *Southern Blot*-Analysen bestätigt, die darüber hinaus zeigten, daß *sopE* auf demselben Fragment wie *orfG* lokalisiert ist (Abb. 11 a und b).

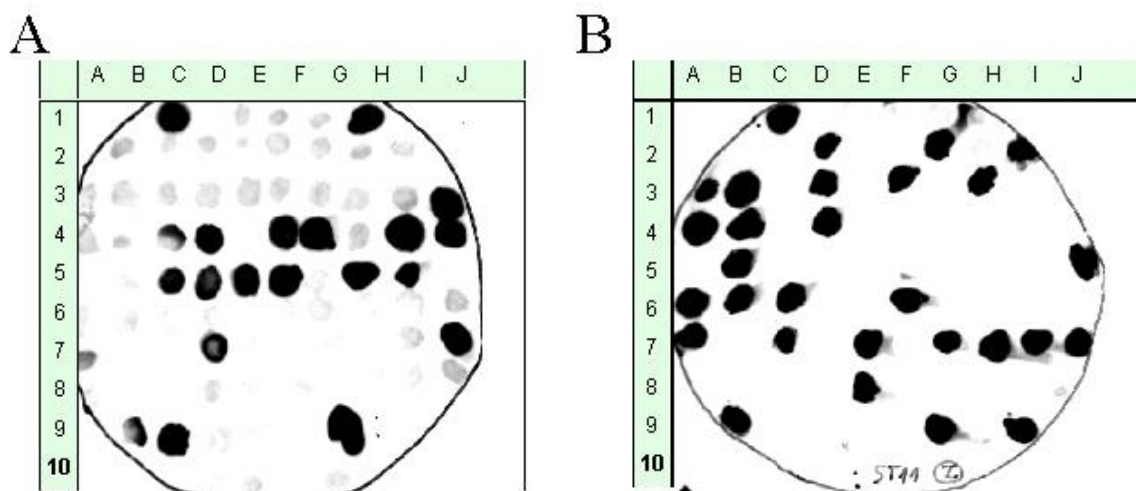


Abb. 10: *SopE* ist nur in wenigen *Salmonella*-Isolaten der SARA und SARB Sammlung kodiert. A: Prävalenz von *sopE* in verschiedenen Serovaren von *S. enterica*. Kolonielift Analyse verschiedener Isolate von *S. enterica* Subspezies I Serovare Typhimurium (Tm), Saintpaul (SP), Heidelberg (He), Paratyphi B (Pb) und Muenchen (Mu) der SARA Sammlung (Beltran et al., 1991) durch Hybridisierung mit einer Sonde gegen den *sopE*-ORF. B: Prävalenz von *sopE* in verschiedenen Serovaren von *S. enterica* Subspezies I. Hybridisierung von Isolaten der SARB Sammlung (Boyd et al., 1993) mit einer *sopE* Sonde im Kolonielift-Verfahren. Für A und B verwendete Kontrollen stammten aus einer Sammlung des Robert Koch Instituts (Nähere Beschreibung zu allen Kollektionen im *Anhang*).

In einigen phagentypisierten *S. typhimurium*-Isolaten aus der Kollektion des Robert Koch Instituts und in *S. typhimurium* SARA4 wurde *sopE* in *Southern Blot*-Analysen nachgewiesen. Während in den *S. typhimurium*-Stämmen DT68 und DT175 in der *Southern Blot*-Analyse sowohl *sopE*-negative als auch *sopE*-positive Isolate zu finden waren, waren alle getesteten Vertreter der Phagentypen DT49, DT204 und DT204c *sopE*-positiv (Abb. 11 a) Diese drei Phagentypen DT49, DT204 und DT204c zeigten sich in den letzten Jahren für einen hohen Prozentsatz an humanen und tierischen Infektionen verantwortlich (Kühn H, et al., 1982, Threlfall et al., 1978b, Threlfall et al., 1978a, Wray et al., 1998). Infektionen mit *S. typhimurium* des Phagentyps DT175 wurden in den letzten 30 Jahren nicht ganz so häufig festgestellt, während *S. typhimurium* des Phagentyps DT68 erst kürzlich in Deutschland isoliert wurden (Wolfgang Rabsch, unveröffentlichte Daten, Robert Koch Institut, Wernigerode).

Das *sopE* Gen liegt jeweils in demselben chromosomalen Fragment in Nachbarschaft zu *orfG* lokalisiert. Wie die *Southern Blot*-Analyse zeigte, ist dieser ORF bei allen *sopE*-positiven Stämmen konserviert (Abb. 11 b). Weitere Untersuchungen von Dr. Susanne Mirolid zeigten, daß in *sopE*-positiven *S. typhimurium*-Stämmen *sopE* immer von P2 ähnlicher Phagensequenz flankiert ist (Mirolid et al., 1999). SopE wird in den untersuchten *sopE*-positiven Isolaten auch sekretiert, wie die Analyse mit dem α -SopE Antikörper IM1 im *Western Blot* zeigte (Abb. 11 c).



Abb. 11: Konservierung von *sopE* Loci in verschiedenen *S. typhimurium*-Isolaten.

EcoRV verdaute chromosomale DNA verschiedener *S. typhimurium*-Stämme wurde im *Southern Blot* analysiert. Detektion der Fragmente erfolgte (a) mit einer *sopE*-Sonde, und (b) mit einer Sonde gegen den 3'-Bereich von *orfG*. (c) Sekretion von SopE in den Kulturüberstand (100 μ l) in *Western Blot*-Analyse mit α -SopE Antiserum (IM1) nachgewiesen. 1: 839/88_{DT49}; 2: 408/88_{DT49}; 3: 838/88_{DT49}; 4: 11635/98_{DT68}; 5: 1061/97_{DT68}; 6: 624/96_{DT68}; 9: 1/82_{DT175}; 10: 198/82_{DT175}; 11: 1646/85_{DT175}; 12: 305/70_{DT175}; 14: 93/80_{DT204}; 15: 1690/75_{DT204}; 16: 74/80_{DT204}; 17: 646/96_{DT204c}; 18: 660/96_{DT204c}; 19: 6203/97_{DT204c}; 21 SARA4.

Im Gegensatz zu *sopE* ist *sopE2* in allen 21 getesteten *S. typhimurium*-Stämmen der SARA Sammlung nicht nur vorhanden, sondern ist auch immer an der gleichen chromosomalen Stelle kodiert (siehe auch Miroid et al., 2001). In einer *Southern Blot*-Analyse wurden mit einer Sonde gegen *sopE2* in jedem Isolat Fragmente identischer Größen von 1,5 und 3,5 kB detektiert (Abb. 13; Abb. 12 A). Als Kontrolle dienten *S. typhimurium* SL1344 und die Mutante M202. Die zusätzliche Bande der *sopE2*-negativen Mutante M202 (siehe Tabelle 8 in *Material und Methoden*) läßt sich durch Integration eines Suizidvektors in den *sopE2* Locus erklären. In allen 21 *S. typhimurium*-Stämmen der SARA Kollektion, in SL1344 und in SB856 wurde SopE2 und in SARA4 und SL1344 zusätzlich SopE synthetisiert, keines dieser beiden Proteine wurde dagegen in der *sopE2*-negativen Kontrolle M202 produziert. Dies konnte mit *Western Blot*-Analysen von Zell-Lysaten mit einem polyklonalen gegen SopE2₆₉₋₂₄₀ generierten Antiserum aus Kaninchen (IM2, *Material und Methoden*) gezeigt werden (Abb. 12 B). Dieses Antiserum erkennt sowohl SopE2 als auch SopE, sowie ein weiteres unbekanntes intrazelluläres Protein bei ca. 25 kDa.

Darüber hinaus ergab auch die Untersuchung einiger Isolate der Sammlung des Robert Koch Instituts in jedem Fall eine Expression von *sopE2* (Daten nicht gezeigt).

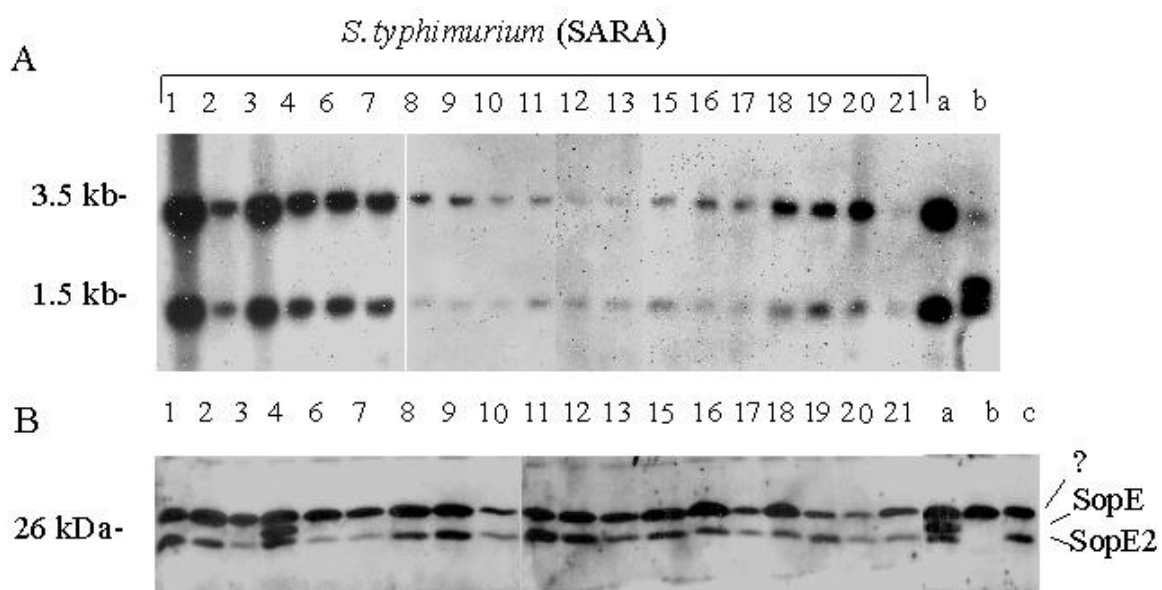


Abb. 12: *SopE* und *sopE2* Konservierung.

A: *SopE2* ist in *S. typhimurium*-Stämmen der SARA Sammlung hoch konserviert. A *Southern Blot*-Analyse. *EcoRV* verdaute chromosomale DNA von 21 *S. typhimurium*-Stämmen der SARA Kollektion (1-21), SL1344^{E+E2+} (a) und M202^{E-E2-} (b) wurde mit einer Sonde gegen den *sopE2* ORF hybridisiert (in Zusammenarbeit mit Dr. S. Miroid). B: Expression von *sopE* und *sopE2*. *Western Blot*-Analyse von je 60 µl Zell-Lysaten von 21 Stämmen der SARA Kollektion (1-21), SL1344^{E+E2+} (a), M202^{E-E2-} (b) und SB856^{E-E2+} (c) mit einem α-SopE2 Antiserum (IM2), das sowohl SopE als auch SopE2 detektiert. Zusätzlich wird von diesem Antiserum ein weiteres unbekanntes intrazelluläres Protein erkannt.

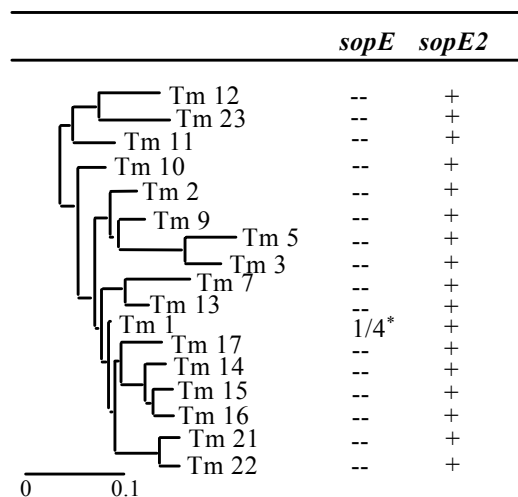


Abb. 13: *SopE2* ist im Gegensatz zu *sopE* in *S. typhimurium*-Isolaten der SARA Sammlung hoch konserviert.

Phylogenetischer Stammbaum adaptiert aus (Beltran et al., 1991) und Konservierung von *sopE* und *sopE2*, wie in Abb. 10 und Abb. 12 gezeigt. 1/4* = Eines von vier getesteten Isolaten der Gruppe kodiert das entsprechende Gen. + = alle getesteten Isolate der Gruppe kodieren das entsprechende Gen. Der Balken zeigt den relativen phylogenetischen Abstand.

Da das *sopE*-homologe *sopE2* im Gegensatz zu *sopE* in allen getesteten *S. typhimurium*-Stämmen vorhanden ist und auch exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, daß *SopE2* eigentlich der primäre "SopE2-ähnliche Virulenzfaktor von *Salmonella* spp. ist. Dagegen könnte *SopE* eher ein akzessorischer Virulenzfaktor sein, der möglicherweise mit besonderen Virulenzcharakteristika assoziiert ist.

3.2 *SopE2* ist ein Typ III sekretiertes und transloziertes Protein

SopE wird vom SPI1 kodierten Typ III Sekretionssystem über die eukaryontische Zellmembran hinweg in die Wirtszelle transloziert und interagiert dort mit Proteinen der Wirtszelle. Für *Yersinia* spp. wurde gezeigt, daß an der Erkennung und Sekretion von Effektorproteinen ein Signal im N-Terminus beteiligt ist. Eine Konsensussequenz für ein solches Typ III Sekretionssignal wurde aber nicht gefunden (Sory et al., 1995, Lloyd et al., 2001b). Unterschiede in der Sequenz von *sopE* und *sopE2* erforderten die Überprüfung von Sekretion und Translokation von *SopE2*. Unter bestimmten Anzuchtbedingungen konnten Effektorproteine, die über das TSS1 sekretiert werden, von *S. typhimurium* im Kulturmedium nachgewiesen werden (Hueck et al., 1995, Kaniga et al., 1995a, Kaniga et al., 1995b, Collazo und Galan, 1996). Zum Nachweis der Sekretion und Translokation von *SopE2* wurde das *low copy* Plasmid pM226 konstruiert. Hierfür wurde *SopE2* mit einem 13 Aminosäuren (AS) langen Epitop M45 am C-Terminus fusioniert. Dieses Konstrukt wird unter der Kontrolle des nativen *sopE2* Promotors exprimiert (*SopE2*_{M45}; pM226, Tabelle 9 in *Material und Methoden*). Das Protein *SopE2*_{M45} kann mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das M45-Epitop detektiert werden.

3.2.1 Sekretion ins Kulturmedium

Die Sekretion dieses Fusionsproteins in den Kulturüberstand wurde in verschiedenen Mutanten und in *S. typhimurium* SL1344 durch *Western Blot*-Analyse mit einem monoklonalen α -m45-Antikörper getestet. Das Protein wurde von den Stämmen *S. typhimurium* SL1344, *S. typhimurium* SB225 (*sipA::aphT*) und von SB856, einer *sopE* Mutante, in gleicher Menge sekretiert (Abb. 14 a: 1, 6 und 2). Von den Mutanten SB245 (*sipABCDsptP::aphT*), und SB241 (*sipD::aphT*) war bekannt, daß sie, verglichen mit dem Wildtyp-Stamm, putative Effektorproteine im Übermaß sekretieren (siehe auch Tabelle 6 in *Material und Methoden*, (Kaniga et al., 1995a, Wood et al., 1996, Hardt und Galan, 1997, Hardt et al., 1998b). Eine solche erhöhte Sekretion zeigt sich auch für SopE_{M45} in diesen Mutanten (Abb. 14 a: 3 und 5). Keine Sekretion von SopE_{M45} konnte in SB161 (Δ *invG*), SB729 (*sipA-sptP::aphT*; Δ *invG*) und SB302 (Δ *invJ*) nachgewiesen werden (Abb. 14a: 4, 7, 8). Die beiden Ersteren sind durch Deletion des *invG* Gens sekretionsdefizient. In letzterem ist *invJ* inaktiviert, das für die Sekretion anderer Proteine mit putativer Effektorfunktion notwendig ist (Collazo und Galan, 1996). Zur Kontrolle wurde ferner die Sekretion des Effektorproteins SipC in den einzelnen Mutanten mit einem polyklonalen Antikörper überprüft (Abb. 14b).

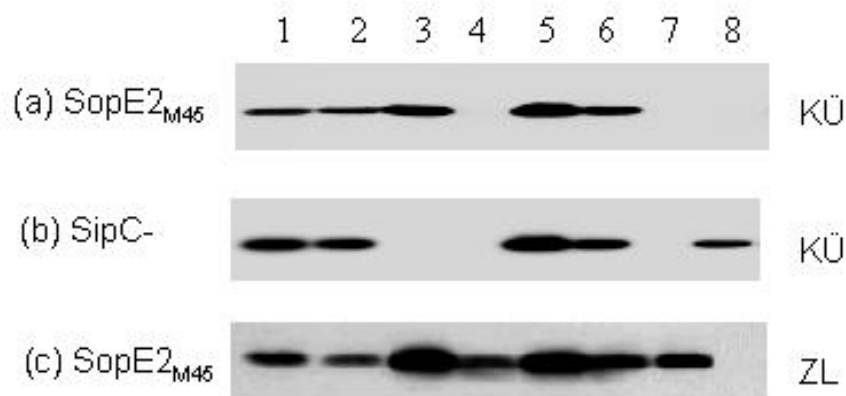


Abb. 14: SopE2 wird über das Typ III Sekretionssystem sekretiert.

A: Sekretion von SopE_{2M45}. *Western Blot*-Analyse der Kulturüberstände (100 μ l) von *S. typhimurium*-Stämmen (a) mit einem polyklonalen α -SipC-Antikörper bzw. (b) mit dem monoklonalen α -M45-Maus-Antikörper gegen SopE_{2M45}, das auf dem Expressionsvektor pM226 kodiert ist. (c) Zell-Lysaten (60 μ l) von denselben Stämmen wurden ebenfalls mit dem monoklonalen α -m45-Maus-Antikörper untersucht (*Material und Methoden*). Die Kulturüberstände (KÜ) und Zell-Lysate (ZL) sind 1: SL1344 (pM226); 2: SB856 (pM226); 3: SB245 (pM226); 4: SB161 (pM226); 5: SB241 (pM226); 6: SB225 (pM226); 7: SB302 (pM226); 8: SL1344.

Die Proteinsynthese von SopE_{M45} und SopE_{2M45} konnte in allen Stämmen, die die

entsprechenden Plasmide trugen, im Zell-Lysat nachgewiesen werden (nur für SopE_{M45} gezeigt, Abb. 14c). Um auszuschließen, daß das in den Kulturüberständen detektierte SopE_{M45} aus lysierten Zellen stammte, wurden Kulturüberstände und Zell-Lysat mit dem Antikörper IM1, der mit SopE und dem intrazellulären Protein DnaK reagiert, getestet. Intrazelluläres DnaK war im Zell-Lysat, nicht aber im Kulturüberstand nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Translokation in Zytosol und Nukleus von COS7-Zellen

Zum Nachweis, daß SopE_{M45} (pM226) von verschiedenen *S. typhimurium*-Stämmen nicht nur synthetisiert und sekretiert, sondern auch in die Wirtszelle transloziert wurde, wurden COS7 Zellkultur-Zellen jeweils mit einer MOI von 20 infiziert. Nach 40 min wurden die Zellen fixiert und die Translokation wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das M45-Epitop durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie überprüft. Nach Infektionen mit Wildtyp *S. typhimurium* SL1344 transformiert mit pM226 (SopE_{M45}) konnte ein starkes Fluoreszenzsignal in der Wirtszelle detektiert werden. Die Signalstärke war vergleichbar mit der, die bei der Infektion von *S. typhimurium*, komplementiert mit einem Vektor (pM136), der *sopE_{m45}* exprimiert, gemessen worden war (Abb. 15 A3 und A2 respektive). Im Unterschied zur gleichmäßigen Verteilung von SopE_{M45} im Zytosol und Zellkern ist SopE_{M45} besonders ausgeprägt in den Regionen der Membranausstülpungen zu finden und kaum im Nukleus der Wirtszelle. Diese Verteilung des markierten Proteins konnte zusätzlich durch konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie verifiziert werden (Abb. 15B).

Im Gegensatz dazu wurden von der sekretionsdefizienten *invG* Mutante SB161 weder SopE_{M45} noch SopE_{M45} transloziert (Abb. 15 A4 und A5). Bei Infektion mit der *invG* Mutante sind weniger Bakterien mit Zellen assoziiert als bei der Infektion mit *S. typhimurium* SL1344, was auf eine Beeinträchtigung in der Adhäsion zurückzuführen ist (Clark et al., 1996). Werden die Bakterien auf die Zellen zentrifugiert, läßt sich dennoch keine Translokation z. B. für SopE_{M45} oder SopE_{M45} feststellen (Hardt unveröffentlicht und eigene Beobachtungen). Als Kontrolle diente außerdem die Infektion mit *S. typhimurium* SL1344 ohne Expressionsvektor, bei der keine Translokation des M45-Epitops detektiert wurde (Abb. 15 A1). Diese Daten zeigen, daß SopE₂ mit Hilfe des TSS1 sekretiert und in Wirtszellen transloziert wird.

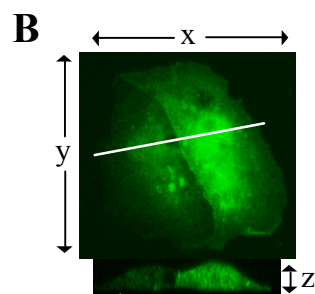
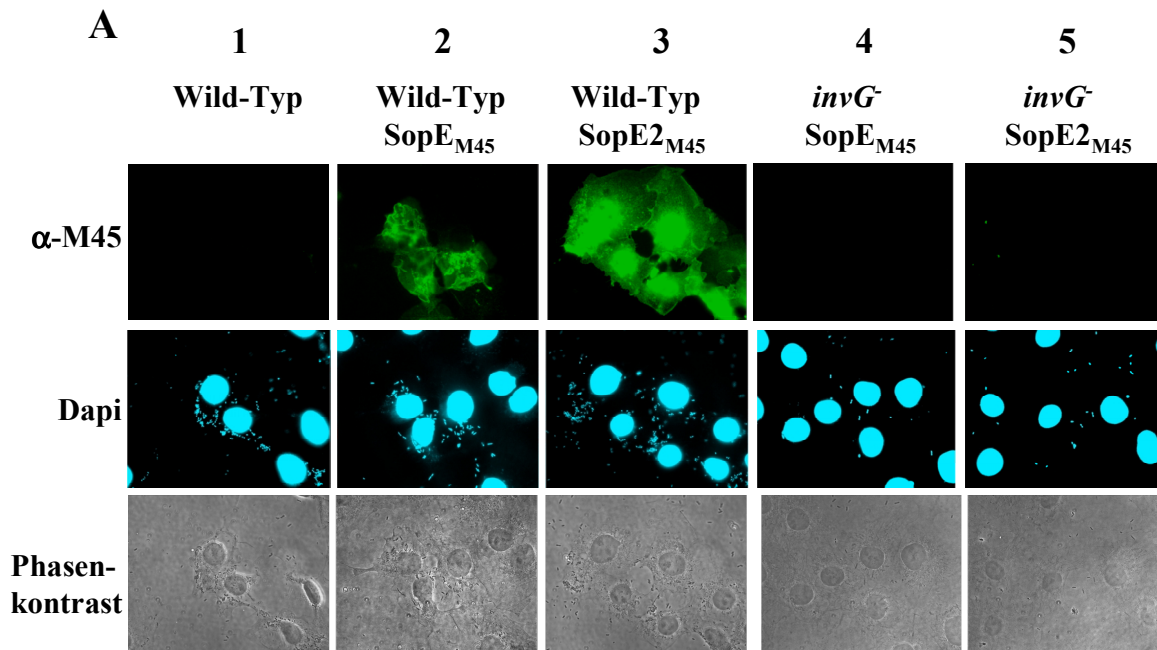


Abb. 15: Transloziertes SopE2 ist gleichmäßig in der Wirtszelle verteilt.

A. Translokation von SopE2_{M45} in Wirtszellen. COS7-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit verschiedenen *S. typhimurium*-Stämmen, die entweder den Expressionsvektor für SopE_{M45} (pM136) oder für SopE2_{M45} (pM226) trugen, für 40 min (MOI = 20) infiziert. Reihen: (a) M45 Fusionsproteine wurden mit dem α -M45-Antikörper und einem α -Maus FITC-Konjugat mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie detektiert. (b) DNA wurde mit DAPI gefärbt. (c): Phasenkontrast. Folgende Stämme wurden verwendet (Spalten): 1: SL1344; 2: SL1344 (pM136); 3: SL1344 (pM226); 4: SB161 (pM136); 5: SB161 (pM226). B: Konfokale Mikroskopie der Translokation von SopE2_{M45}. Die intrazelluläre Lokalisation von SopE2_{M45} in zwei mit SL1344 (pM226) infizierten COS7-Zellen wurden analysiert, indem 16 sequentielle konfokale Bilder von ca. 0,5 μ m dicken Querschnitten in der xy - Achse aufgenommen wurden. Oberes Bild : Summe der FITC Fluoreszenz von allen 16 Schnitten dieser Ebene. Unteres Bild: Blick auf die Z - Ebene der zwei infizierten Zellen durch Bearbeitung aller 16 Bilder der xy - Achse mit Hilfe des "NIH image software package" und Berechnung der Verteilung der FITC-Fluoreszenz entlang der z - Achse, die im oberen Bildausschnitt gezeigt ist.

3.3 SopE2 ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für Cdc42

SopE ist ein effizienter Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für Rho GTPasen, wie z. B. Cdc42 *in vitro* (Rudolph et al., 1999). Die ersten 77 Aminosäuren am N-Terminus sind für die katalytische Aktivität nicht notwendig (Hardt et al., 1998a). Um zu testen, ob ein solches N-terminal verkürztes SopE2 eine ähnliche biochemische Aktivität aufweist, wurde ein rekombinantes SopE2-Fragment *in vitro* an rekombinantem Cdc42 getestet. Hierfür wurde das Plasmid pM148 verwendet, das die Synthese des rekombinanten SopE2 Fragmentes mit den Aminosäure 69-240 ermöglichte (SopE2₆₉₋₂₄₀; pM148; Tabelle 7 in *Material und Methoden*). Um die Austauschrate im Filterbindungsversuch bestimmen zu können, wurde rekombinantes Cdc42 mit [³H]-GDP beladen. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in Anwesenheit eines Überschusses von 1 mM unmarkiertem GDP wurde der Austausch im Szintillationszähler bestimmt. In Zusammenarbeit mit Andrea Friebel konnte gezeigt werden, daß die Austauschaktivität von SopE2 an Cdc42 der von SopE vergleichbar ist (Abb. 11). Die intrinsische Guanin-Nukleotid-Austauschrate von Cdc42 in Anwesenheit von 5 mM Mg²⁺ war sehr langsam (Abb. 16 A und B). In Anwesenheit von SopE2₆₉₋₂₄₀ dagegen waren die Guanin-Nukleotid-Austauschraten sehr viel höher (Abb. 16 4A). Die Zeit, in der die Hälfte des Austauschs stattgefunden hatte, war in Anwesenheit von 0,05 µM SopE2₆₉₋₂₄₀ (entspricht nicht gesättigten Bedingungen) mit ca. 40 s ungefähr gleich schnell wie bei Zugabe von 0,05 µM SopE₇₈₋₂₄₀ (Abb. 16 A und B). In Anwesenheit von 1 µM SopE2₆₉₋₂₄₀ oder SopE₇₈₋₂₄₀ war die Austauschreaktion bereits bei Entnahme des ersten Aliquots nach 10 s vollständig abgeschlossen (Abb. 16 A und B). Im Gegensatz dazu war der [³H]-GDP-Austausch an Ha-Ras, einem kleinen G-Protein der Ras Familie, durch die Anwesenheit sowohl von SopE2₆₉₋₂₄₀ als auch SopE₇₈₋₂₄₀ vollkommen unbeeinflusst (Abb. 16 C).

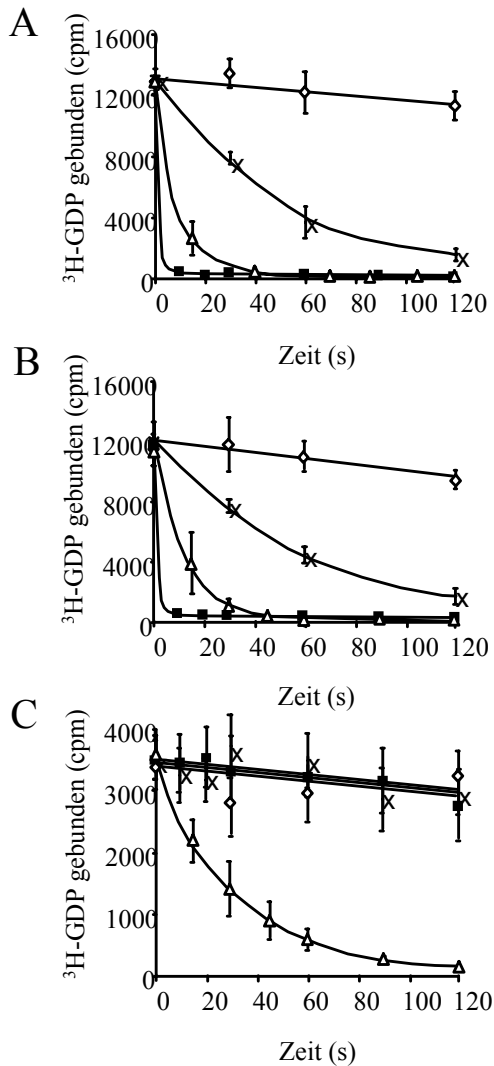


Abb. 16: SopE2 aus *S. typhimurium* ist ein G-Nukleotid-Austauschfaktor für die Rho GTPase Cdc42.

Cdc42 (A und B) oder HaRas (C) wurden mit $^3\text{H-GDP}$ beladen und die Austauschrate von $^3\text{H-GDP}$ gegen einen großen Überschuss nicht markierten GDP wurde in Filterbindungsversuchen analysiert. G-Nukleotid-Austauschraten wurden in Anwesenheit bestimmt von A. 1 μM SopE2₆₉₋₂₄₀ (Quadrat); 0,05 μM SopE2₆₉₋₂₄₀ (Kreuz); 10 mM EDTA (Dreieck); 1 μM GST (Raute); B. 1 μM SopE₇₈₋₂₄₀ (Quadrat); 0,05 μM SopE₇₈₋₂₄₀ (Kreuz); 10 mM EDTA (Dreieck); 1 μM GST (Raute); C. 1 μM SopE2₆₉₋₂₄₀ (Quadrat); 1 μM SopE₇₈₋₂₄₀ (Kreuz); 10 mM EDTA (Dreieck); 1 μM GST (Raute). Die hier gezeigten Daten sind in drei unabhängigen Versuchen von Andrea Friebe ermittelt worden. Die Balken zeigen die Standardabweichung.

Diese Ergebnisse zeigen, daß eine ähnlich hohe biochemische Aktivität für den Guanin-Nukleotid-Austausch von SopE2 und SopE an Cdc42, nicht aber an Ha-Ras besteht.

3.4 SopE- und SopE2-vermittelte Invasivität

3.4.1 SopE2 Mutanten sind in ihrer Invasioneffizienz in Epithelzellen attenuiert

Das TSS1 von *S. typhimurium* vermittelt die Internalisierung in kultivierte Epithelzellen (Ginocchio et al., 1992). Dieses Eindringen wird durch Effektorproteine, die über das TSS1 transloziert werden, vermittelt. Transfektions- und Mikroinjektionsexperimente haben gezeigt, daß die Anwesenheit von SopE alleine ausreicht, um die bakterielle Invasion auszulösen, indem es Cdc42 und Rac1 im Zytosol der Wirtszelle aktiviert (Hardt et al., 1998a, Galan, 1999). Allerdings führte die Inaktivierung des *sopE* Gens des Bakteriums SB856 (= SL1344, *sopE::aphT*) nur zu einer zwei- bis dreifachen Reduktion in der Invasivität gegenüber dem

Wildtyp *S. typhimurium* SL1344. Dies konnte anhand eines differenziellen Färbeprotokolls gezeigt werden (Hardt et al., 1998a). Zur besseren Verständlichkeit werden die *S. typhimurium* Mutanten im Folgenden mit E^+ (funktionelles *sopE* Gen) und E^{2+} (funktionelles *sopE2* Gen) indiziert. Um zu testen, inwieweit SopE2 zur verbleibenden Invasivität beiträgt, wurden zwei isogene *sopE2* Mutanten konstruiert. Hierzu wurde ein Suizidvektor in die *sopE2* Gene von SL1344 E^{+E2+} und in SB856 E^{-E2+} integriert. So wurden die Stämme M200 E^{+E2-} und M202 E^{-E2-} erhalten (Tabelle 8 und Tabelle 9, *Material und Methoden*). Diese Stämme wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, COS7-Epithelzellen zu invadieren. Hierzu wurde die Zahl internalisierter Bakterien mit Hilfe des differenziellen Färbeprotokolls bestimmt (*Material und Methoden*). In Übereinstimmung mit früheren Resultaten führte die Inaktivierung von *sopE* (SB856 E^{-E2+}) zu einer zwei- bis dreifach verringerten Invasivität (Abb. 17). Die Attenuierung der Invasivität für die *sopE2* Einzelmutante (M200 E^{+E2-}) war weniger ausgeprägt als bei SB856 E^{-E2+} . Dagegen war die *sopEsopE2* Doppelmutante fünfmal weniger invasiv als der isogene Wildtyp Stamm SL1344 (Abb. 17). In Gentamicin Protektionsversuchen (siehe *Material und Methoden*) konnten diese Ergebnisse mit geringerem Effekt bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede in den beiden Experimenten lassen sich durch eine unzureichende Eliminierung extrazellulärer Bakterien erklären. Diese Vermutung konnte später von Kristin Ehrbar bestätigt werden. Der Invasionsdefekt der *sopEsopE2* Doppelmutante (M202 E^{-E2-}) konnte mit *sopE2* (pM149, Abb. 17) oder *sopE* (pSB1130 Abb. 17) exprimierenden Plasmiden komplementiert werden. Allerdings war die nach differenzieller Färbung ermittelte Komplementation mit pSB1130 nur teilweise möglich (Abb. 17, Vergleich Säulen 3 und 5). Der Grund hierfür könnte ein toxischer Effekt durch die Expression eines Komplementationsvektors mit mittlerer Kopienzahl sein. Die sekretionsdefiziente Mutante SB161 ($\Delta invG$) war noch ca. 100 Mal weniger invasiv als die *sopEsopE2* Mutante (M202 E^{-E2-}). Wird diese Mutante auf die Zellen zentrifugiert, erhöhte sich die Invasivität nicht (Hardt et al., 1998a). Die Ergebnisse stellen eindeutig dar, daß SopE und SopE2 beide in additiver Weise in die Induktion einer effizienten Internalisierung in COS7-Zellen involviert sind. Es ist zu vermuten, daß mindestens ein weiterer vom TSS1 abhängiger Effektor zur Invasivität von *S. typhimurium* in Epithelzellen beiträgt.

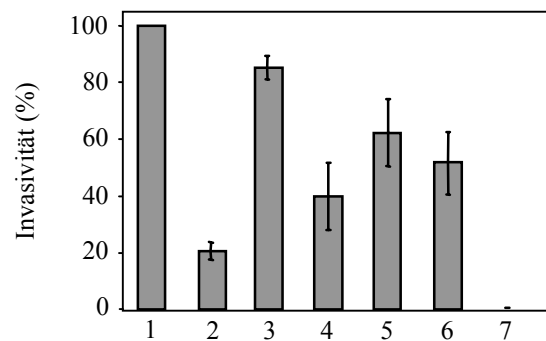


Abb. 17: Attenuierte Invasionseffizienz in Epithelzellen nach Infektion mit *sopE2* Mutanten.

Bestimmung der Zahl internalisierter Bakterien in COS7-Zellen nach differenzieller Färbung. COS7-Zellen wurden für 45 min mit *S. typhimurium*-Stämmen (MOI = 10) infiziert. Nach der Fluoreszenzfärbung extra- und intrazellulärer Bakterien wurde die Zahl internalisierter Bakterien durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestimmt (Material und Methoden). Auf jedem Deckglas waren 83 +/- 8 % der COS7-Zellen infiziert. Es wurden jeweils mindestens 250 infizierte Zellen ausgewertet. Eine Ausnahme war die Infektion mit SB161 ($\Delta invG$), bei der nur ca. 0,1 % der Zellen infiziert waren. 1: SL1344^{E+E2+}; 2: M202^{E-E2-}; 3: M200^{E+E2-}; 4: SB856^{E-E2+}; 5: M202^{E-E2-} (pSB1130, sopE); 6: M202^{E-E2-} (pM149, sopE2); 7: SB161 ($\Delta invG$). Die Invasionseffizienz wurde wie folgt ermittelt: Invasivität (%) = [gemittelte Zahl mutierter *Salmonellae*, die pro infizierter Zelle internalisiert wurden] / [gemittelte Zahl von SL1344^{E+E2+} *Salmonellae* pro infizierter Zelle im Kontrollexperiment]. Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen Versuchen für jeden Stamm gemittelt. Die Balken zeigen die Standardabweichung.

3.4.2 Ein SopESopE2 defizienter *S. typhimurium* Stamm ist *in vivo* noch infektiös.

Stämme mit einer Mutation in einem Gen des Sekretionsapparats (z. B. in *invA* oder *invG*), die im Zellkulturmodell eine 1000-fach herabgesetzte Invasivität zeigten, sind nach oraler Infektion von Balb/c Mäusen in ihrer Fähigkeit zur Besiedlung von Darm, Milz und Leber ca. um das 100-fache attenuiert (Murray und Lee, 2000). Ob die verminderte Invasivität einer *S. typhimurium* *sopEsopE2* Doppelmutante M202^{E-E2-} in Epithelzellen einer Verringerung der Invasivität *in vivo* entspricht, wurde an weiblichen Balb/c Mäuse untersucht. Hierfür wurde zwei bzw. vier Tage nach oraler Infektion die Besiedlung mit *S. typhimurium* in Peyer Plaques, Milz und Leber untersucht (*Material und Methoden*).

In zwei Versuchen wurden nach Infektion mit SL1344^{E+E2+} oder mit M202^{E-E2-} die Keimzahlen in den Organen bestimmt (Abb. 18). Die Keimzahlen von M202^{E-E2-} und SL1344 wurden auf die Zahl inokulierter Bakterien bezogen und in % des Inokulums angegeben. Nach Infektion von M202^{E-E2-} wurden gegenüber SL1344^{E+E2+} eine geringere Keimzahl festgestellt, die allerdings statistisch nicht signifikant war. Ein Grund für die geringe Reproduzierbarkeit ist die unterschiedliche individuelle Empfindlichkeit der Tiere. Eine solche Problematik wurde bereits früher in der Literatur beschrieben (Bäumler et al., 1997). Es läßt sich demnach bei eine *sopEsopE2* Doppelmutante *in vivo* keine deutliche Attenuierung der Virulenz feststellen.

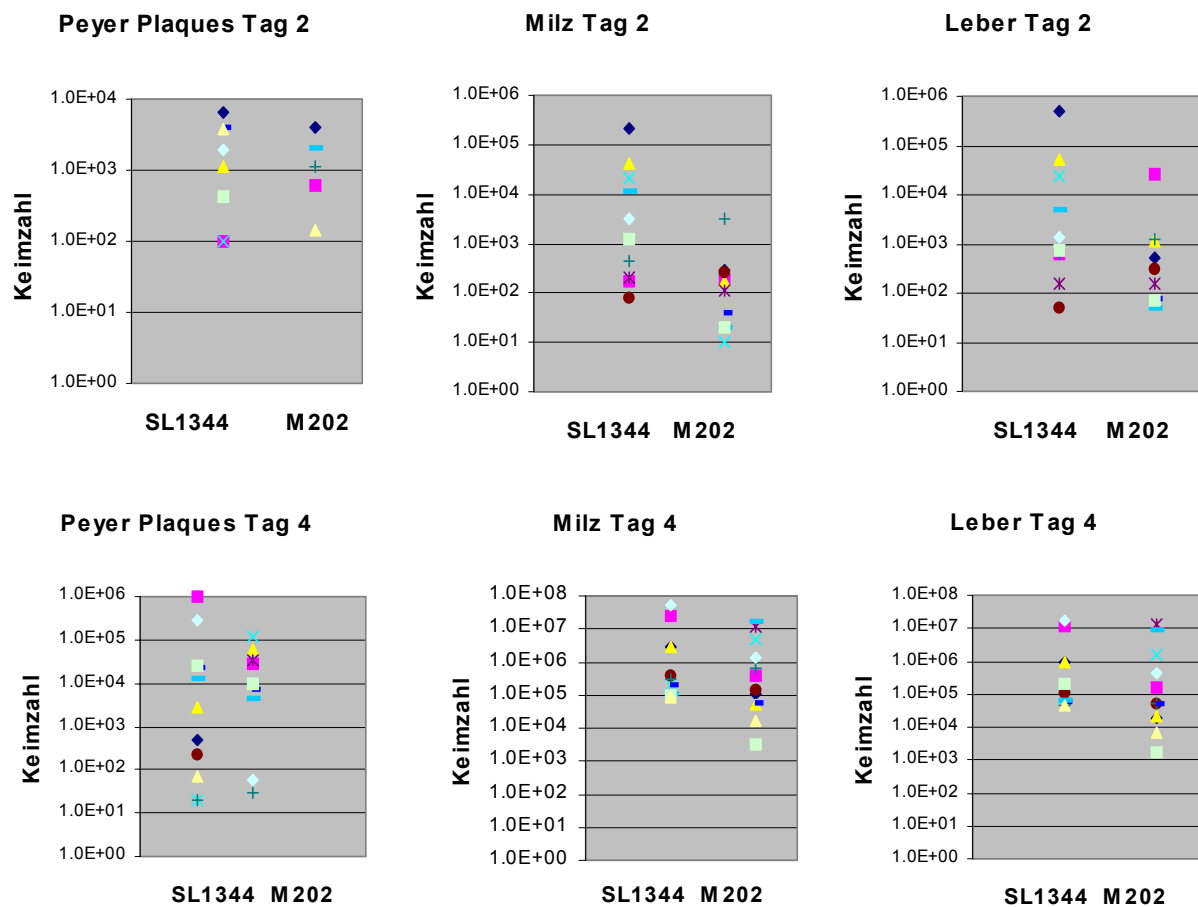


Abb. 18: Virulenz der *sopEsopE2* *S. typhimurium* Mutanten M202^{E-E2-} in Balb/c Mäusen.

Bestimmung der Keimzahlen in Homogenisaten von Peyerschen Plaques, Leber und Milz 2 bzw. 4 Tage nach oraler Infektion mit 10^6 - 5×10^6 SL1344^{E+E2+} oder M202^{E-E2-}. Das Verhältnis der Keimzahlen zum Inokulum (Inokulum = 100%) ist angegeben. Die Meßwerte aus 2 unabhängigen Versuchen wurden für jede einzelne Maus ermittelt und dargestellt (insgesamt je 12 Tiere, Keimzahlen = 0 wurden nicht in die Grafik aufgenommen).

3.5 Morphologische Auswirkung von SopE2 auf die Wirtszelle

3.5.1 SopE2 induziert Aktinzytoskelettwandlungen

Die Infektion mit *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+} führt in Henle oder COS7-Epithelzellen nach ca. 10 min zur Bildung von Membranausstülpungen, die den Veränderungen der intestinalen M-Zellen nach Infektion ähneln (Clark et al., 1994, Jones et al., 1994, Kohbata et al., 1986). Diese Umgestaltung des Zytoskeletts ist abhängig von einem funktionsfähigen TSS1 (Ginocchio et al., 1992). Um die Rolle des translozierten SopE2 in diesem Prozeß zu untersuchen, wurde die Restrukturierung des Aktinzytoskeletts an COS7-Epithelzellen 12 min nach Infektion mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht (*Material und Methoden*). Färbung von F-Aktin mit Phalloidin-FITC zeigte, daß Wildtyp *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+} effizient auffällige Zytoskelettlagerungen induzierten, die an Stellen an denen die Bakterien adhärten besonders ausgeprägt waren (Abb. 19). Entsprechend früheren Ergebnissen führte die Inaktivierung von des *sopE* Gens (SB856^{E-E2+}) zu weniger ausgeprägten F-Aktin Umlagerungen, die an den Kontaktstellen von Bakterien mit der Zelle nicht so stark fokussiert waren (Abb. 19 A2). Die Inaktivierung des *sopE2* Gens (Infektion mit M200^{E+E2-}) hingegen führte zwar auch zu einer weniger starken Polymerisation von F-Aktin, aber nicht zu einer Veränderung in der Morphologie dieser Zytoskelettlagerungen (Abb. 19 A3). Die *sopE**sopE2* Doppelmutante (M202^{E-E2-}) induzierte nur noch sehr schwache Zytoskelettlagerungen der Wirtszelle (Abb. 19 A; Vergleich A1 und A4). Dieser Defekt konnte durch Transformation eines *sopE* bzw. *sopE2* Plasmids komplementiert werden (Abb. 19 A5 und 6). Infektionen mit der nicht-invasiven *S. typhimurium* Mutante (SB161) führten zu keinerlei Umlagerungen des Zytoskeletts (Abb. 19 A7). Hier wurde ein Bereich ausgewählt, in dem einige Bakterien mit Zellen assoziiert sind, um zu zeigen, daß es zu keinerlei Veränderungen des Zytoskeletts kommt. Demnach bewirken SopE2 und SopE in leicht unterschiedlicher Form Veränderungen in der Struktur des Zytoskeletts und ihr Fehlen unterbindet solche Veränderungen fast vollständig.

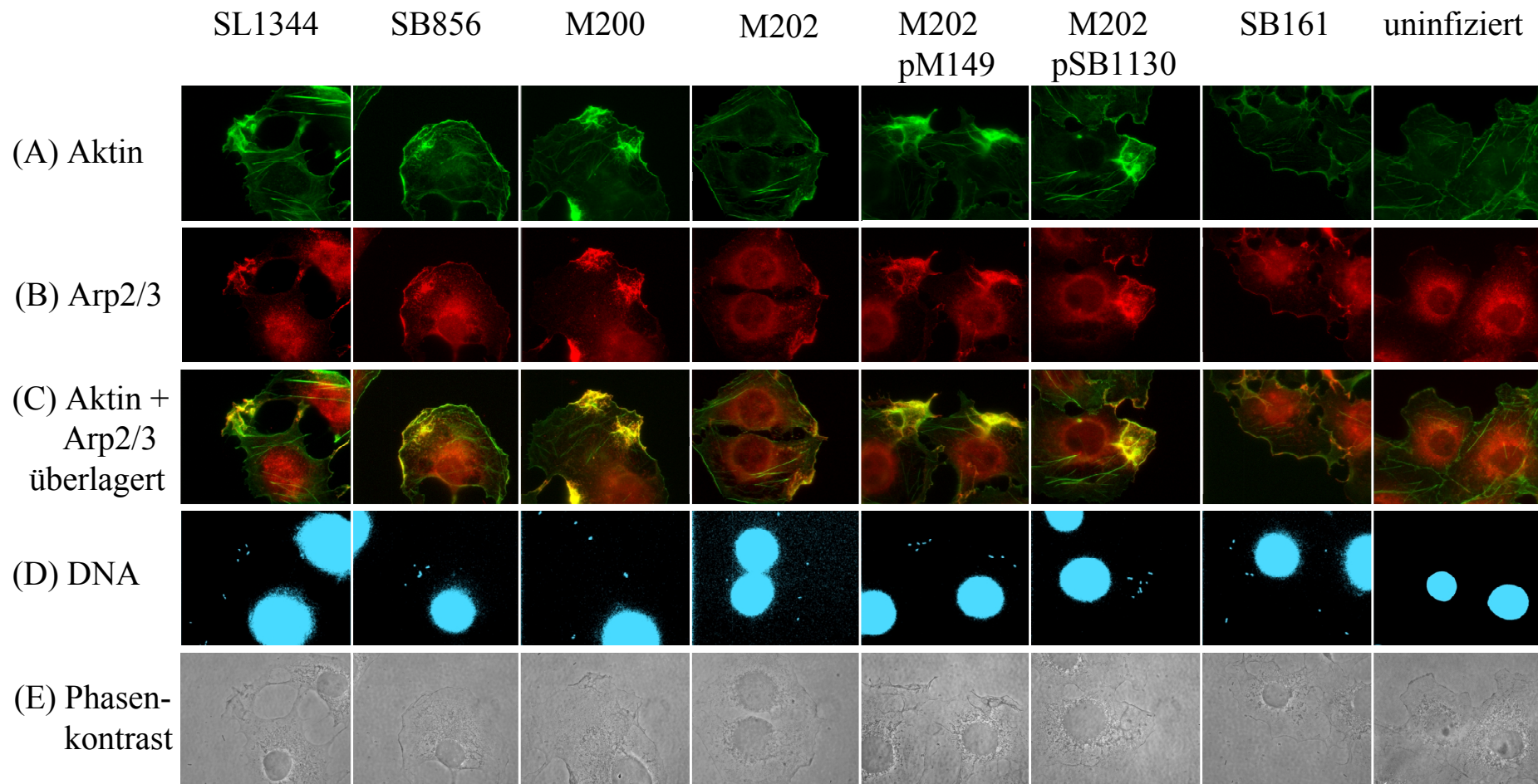


Abb. 19: Strukturelle Veränderungen der Zelle induziert durch Infektion mit *sopE2* Mutanten.

Induktion von Aktinzytoskelettlagerungen und Rekrutierung der Arp2/3 Komplexe. COS7-Zellen wurden für 12 min mit verschiedenen *S. typhimurium* Mutanten bei einer MOI = 10 infiziert, fixiert und permeabilisiert. F-Aktin wurde mit einem Phalloidin FITC-Konjugat gefärbt (A) und die Arp2/3 Komplexe mit dem polyklonalen α -p41-Arc-Antiserum und einem α -Kaninchen TRITC-Konjugat (B). C: Überlagerung der Bilder A und B. Die DNA von COS7-Zellen und Bakterien wurde mit DAPI gefärbt (D). Phasenkontrast (E). Für diesen Versuch verwendete *S. typhimurium*-Stämme: 1: SL1344^{E+E2+}; 2: SB856^{E-E2+}; 3: M200^{E+E2-}; 4: M202^{E-E2-}; 5: M202^{E-E2-} (pM149 *sopE2*); 6: M202^{E-E2-} (pSB1130 *sopE*); 7: SB161 ($\Delta invG$); 8: nicht infiziert.

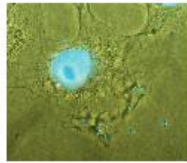
3.5.2 SopE2 und SopE rekrutieren Arp2/3 Komplexe in Membranausstülpungen

Der Mechanismus, mit dem *S. typhimurium* die Reorganisation des Zytoskeletts manipuliert, ist noch unzureichend geklärt. Für SipC wurde eine Katalyse der *de novo* Aktinpolymerisation *in vitro* gezeigt (Hayward und Koronakis, 1999). SipA bindet an Aktin und senkt dadurch die kritische Konzentration von F-Aktin, die für die spontane Polymerisation notwendig ist und inhibiert die Depolymerisation von Aktinfilamenten (Zhou et al., 1999a). SopE und SopE2 induzieren die Reorganisation des Aktinzytoskeletts *in vivo* (Abb. 19). Es wurde untersucht, inwieweit die Aktinpolymerisation indirekt durch Manipulation der vorhandenen Signalwege der Wirtszelle induziert werden kann. Der Arp2/3 Komplex spielt während der dynamischen Reorganisation der Zell-Architektur bei der *de novo* Aktinpolymerisation in der eukaryontischen Zelle eine zentrale Rolle (Machesky und Gould, 1999). Die Aktivität des Arp2/3 Komplexes wird über Cdc42 reguliert (Rohatgi et al., 1999, Welch, 1999). Um die Fähigkeit von *S. typhimurium* zu analysieren, diesen Cdc42-Arp2/3-Signalweg der Wirtszelle zu nutzen, wurde nach der Infektion mit *S. typhimurium* die zelluläre Verteilung der Arp2/3 Komplexe mit einem polyklonalen Antikörper gegen die p41-Arc Untereinheit mikroskopisch untersucht (*Material und Methoden*). Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Linder und Prof. Martin Äpfelbacher durchgeführt. In uninfizierten COS7-Zellen sind die Arp2/3 Komplexe bis auf geringe Akkumulationen an den Zellrändern gleichmäßig im Zytoplasma verteilt (Abb. 19 B8). 12 min nach Infektion mit Wildtyp *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+} war eine deutliche Umverteilung der Arp2/3 Komplexe zu beobachten. Gleichzeitiges Anfärben des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-FITC und der DNA mit DAPI zeigte, daß Arp2/3 Komplexe in die von *S. typhimurium* induzierten Membranausstülpungen rekrutiert wurden (Abb. 19 B1 und C1). Dies konnte durch konfokale Mikroskopie bestätigt werden (Abb. 20). Auch bei Infektion mit der *sopE2* Mutante (M200^{E+E2-}) war eine Rekrutierung der Arp2/3 Komplexe in die Membranausstülpungen zu sehen. Diese war bei Infektion mit der *sopE* Mutante (SB856^{E-E2+}) weniger ausgeprägt (Abb. 19 B3, und B2). Eine Infektion von COS7-Zellen mit der *sopE**sopE2* Doppelmutante (M202^{E-E2-}) rief nur noch eine geringe Rekrutierung der Arp2/3 Komplexe in die schwach ausgeprägten aktin gefärbten Membranausstülpungen hervor (Abb. 19 B4). Auch hier lokalisierten die Umlagerungen des Zytoskeletts mit dem rekrutierten Arp2/3 Komplex an den Stellen, an denen *S. typhimurium* M202^{E-E2-} adhärte. Die Fähigkeit dieser Mutante bei einer Infektion diese deutliche Arp2/3 Komplex Rekrutierung zu induzieren, konnte durch Transformation von *S. typhimurium* M202^{E-E2-} sowohl mit dem SopE2- (pM149) als auch mit dem SopE-Expressionsvektor (pSB1130) komplementiert werden (Abb. 19 B5 und B6). Diese Daten verdeutlichen, daß Arp2/3 in die von *S. typhimurium* induzierten

Membranausstülpungen rekrutiert wird und daß dies durch SopE und SopE2 ausgelöst werden kann.

A Phasenkontrast

Phasenkontrast
+ DAPI



B konfokale Aufnahme

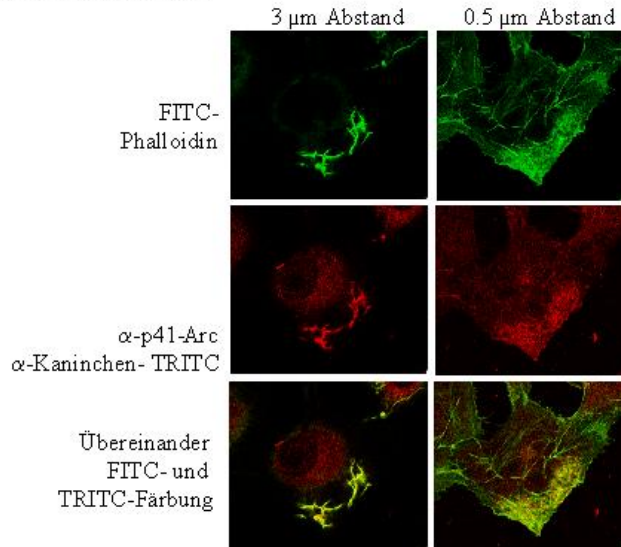


Abb. 20: Rekrutierung von Aktin und Arp2/3 Komplexen in die Membranausstülpungen.

COS7-Zellen wurden mit *S. typhimurium* Wildtyp SL1344 12 min (MOI = 10) infiziert und fixiert (*Material und Methoden*). A. Analyse durch Phasenkontrast- und Fluoreszenz - Mikroskopie. Überlagerung der Phasenkontrast - Abbildung mit der Darstellung der DAPI-Fluoreszenz. B. konfokale Mikroskopie. Färbung mit Phalloidin FITC-Konjugat (obere Bildreihe) und polyklonalem α-p41-Arc Antiserum (zur Verfügung gestellt von Prof. Higgs, *Material und Methoden*) detektiert mit α-Kaninchen TRITC-Konjugat (mittlere Bildreihe). In der unteren Bildreihe sind die Aufnahmen der beiden Färbungen übereinandergelegt. Die Schnitte von 0,5 µm Dicke in der xy-Ebene wurden 0,5 µm (rechte Bildreihe) bzw. 3 µm (linke Bildreihe) oberhalb der Oberfläche des Deckgläschens aufgenommen.

3.5.3 SopE2 induziert elektronenmikroskopisch detektierbare Membranausstülpungen

Die von den *sopE* und *sopE2* Mutanten induzierten Veränderungen in der Morphologie der Membranen wurden mit Hilfe des Elektronenrastermikroskops in Zusammenarbeit mit Dr. Manfred Rohde untersucht. COS7-Epithelzellen, die 20 min mit Wildtyp *S. typhimurium* (SL1344^{E+E2+} MOI = 10) infiziert wurden, bildeten ausgeprägte, Bakterien umschließende Membranausstülpungen (Abb. 21 A). Ähnliche Membranausstülpungen waren auch nach Infektion mit der *sopE2* Mutante (M200^{E+E2-}; Abb. 21 C) zu sehen, wohingegen nach Infektion mit der *sopE* Mutante (SB856^{E-E2+}) morphologisch wesentlich kleinere

Membranausstülpungen zu detektieren waren (Abb. 21 D). Eine *sopEsopE2* Doppelmutante (M202^{E-E2-}; Abb. 21 B) induzierte keine Membranausstülpungen. Stattdessen waren viele Bakterien in kleinen Invaginationen der Wirtszellmembran lokalisiert. Dieses Einhüllen von Bakterien war besonders zu späteren Zeitpunkten der Infektion gut zu sehen; 30 min nach der initialen Infektion waren viele Bakterien (M202^{E-E2-}) von dünnen Ummantelungen der Wirtszellmembran bedeckt und umschlossen (Abb. 21 H). Eine solche morphologische Interaktion von *S. typhimurium* und Wirtszelle war in seltenen Fällen auch bei Infektion mit Wildtyp *S. typhimurium* zu finden. Die Fähigkeit dieser Doppelmutante das Ausstülpen von Membranen zu induzieren, ließ sich durch *sopE* und *sopE2* exprimierende Vektoren (respektive pSB1130 und pM149) komplementieren (Abb. 21 E und F). Infektionen mit einer nicht-invasiven Sekretionsapparaturmutante *S. typhimurium* SB161 ($\Delta invG$; Abb. 21 G) induzierte keine Veränderungen in der Morphologie der Wirtszellmembran von COS7-Epithelzellen. Das Bild zeigt eine der wenigen Regionen, in denen diese Mutante überhaupt mit der Wirtszelle assoziiert ist, um zu zeigen, daß keine Veränderungen der Membran detektierbar sind. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen belegen eine Beteiligung von SopE und SopE2 an der Induktion von Membranausstülpungen.

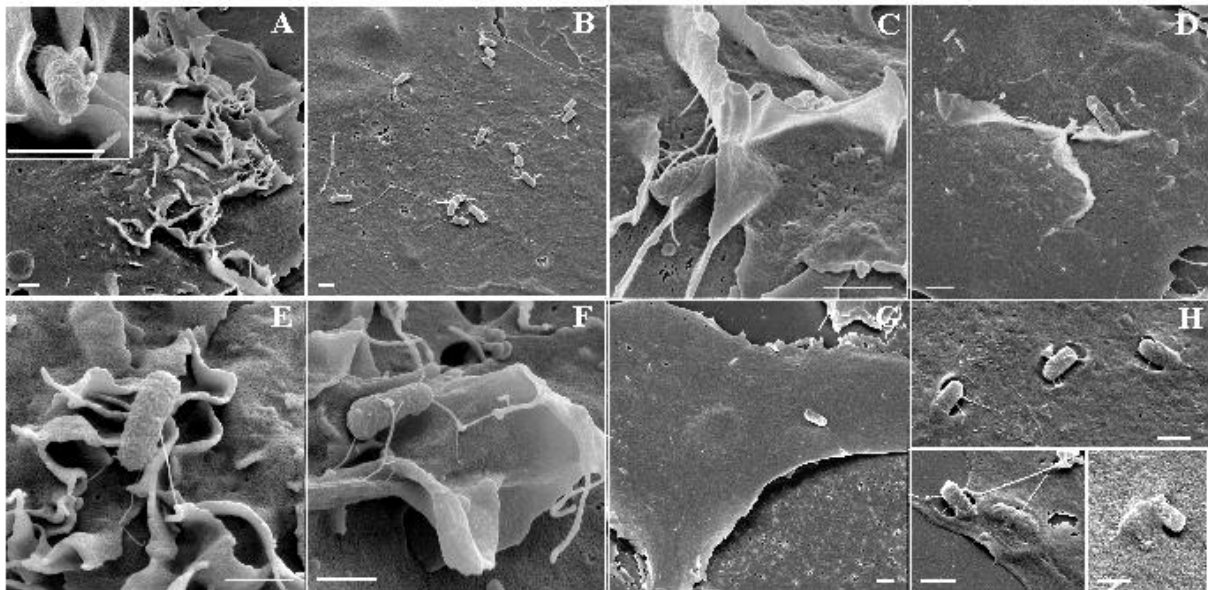


Abb. 21: Rolle von SopE2 in der Induktion von Membranausstülpungen.

COS7-Zellen wurden für 20 min (MOI = 20) mit verschiedenen *S. typhimurium*-Stämmen infiziert, gewaschen, fixiert und für elektronenmikroskopische Untersuchungen mit einem 10 nm dicken Goldfilm überzogen (*Material und Methoden*). Bakterienstämme waren : A: 1: SL1344^{E+E2+}; 2: M202^{E-E2-}; 3: M200^{E+E2-}; 4: SB856^{E-E2+}; 5: M202^{E-E2-} (pM149, *sopE2*); 6: M202^{E-E2-} (pSB1130, *sopE*); 7: SB161 ($\Delta invG$). Tafel H: 30 min nach Infektion lassen sich *S. typhimurium* M202^{E-E2-} in kleinen Einbuchtungen der Wirtszellmembran oder zum Teil eng umschlossen von einem "Mantel" aus Wirtszellmembran detektieren. Größenvergleich: der Balken zeigt eine Abmessung von 1 μ M.

3.5.4 SopE2 ist hinreichend, um in COS7-Epithelzellen Zytoskelettlagerungen und die Rekrutierung von Arp2/3 Komplexen zu induzieren

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Präsenz von SopE2 alleine hinreichend ist, um in COS7-Epithelzellen Zytoskelettlagerungen und Arp2/3 Rekrutierung zu induzieren. Für die Transfektion wurde ein bicistronischer Vektor verwendet, der *sopE2* und grün fluoreszierendes Protein (*gfp*) von demselben mRNA Transkript gleichzeitig exprimierte (Tabelle 7 pM150, *Material und Methoden*). Nach einer Transfektionszeit von 48 h zeigten die transfizierten Zellen (GFP+) deutliche Veränderungen im Aktinzytoskelett; die Verteilung von F-Aktin und die der p41-Arc Untereinheiten der Arp2/3 Komplexe stimmten überein (Abb. 22 A1, B1 und C1). Nach Transfektion mit einem SopE-Expressionsvektor (Tabelle 7 pSB1174, *Material und Methoden*) war eine ähnliche Veränderung am Zytoskelett und Umverteilung der Arp2/3 Komplexes zu beobachten (Abb. 9 A4, B4 und C4). Eine Transfektion mit dem Kontrollvektor pSB965, der ausschließlich GFP exprimierte, führte dagegen weder zu Veränderungen am Aktinzytoskelett noch zu einer Rekrutierung der Arp2/3 Komplexe (Abb. 22 A5, B5 und C5). Die Spezifität von SopE2 für Cdc42 wurde durch Ko-Transfektion in kultivierten Epithelzellen untersucht. Hierfür wurden Expressionsvektoren dominant negativer Konstrukte der kleinen GTPasen Cdc42 (Cdc42_{N17}) bzw. Ha-Ras (Ha-Ras_{N17}) (Tabelle 7 in *Material und Methoden*) gemeinsam entweder mit SopE2 oder mit SopE exprimierenden Vektoren in COS7-Zellen ko-transfiziert. Bei gleichzeitiger Transfektion der Expressionsvektoren pM150 (SopE2, *Material und Methoden*) und Cdc42_{N17} war eine SopE2-vermittelte Induktion der Aktinzytoskelettlagerung und der Rekrutierung von Arp2/3 Komplexen unterbunden (Abb. 22 Vergleich A1 mit A2 und B1 mit B2). Im Gegensatz dazu hatte die Ko-Transfektion mit dem dominant negativen Allel Ha-Ras_{N17} keinen Einfluß auf die SopE2-vermittelte Verteilung von Aktin oder der Arp2/3 Komplexe (Abb. 22 A3 und B3). SopE2 hat demnach eine ähnliche Funktion wie SopE: beide zeigen Spezifität für den Guanin-Nukleotid-Austausch an der Rho GTPase Cdc42 aber nicht an der Ras GTPase Ha-Ras (Hardt et al., 1998a) und sind hinreichend für die Induktion des Cdc42-Arp2/3-Komplex-Signalweges und somit für die Umlagerungen des Aktinzytoskeletts.

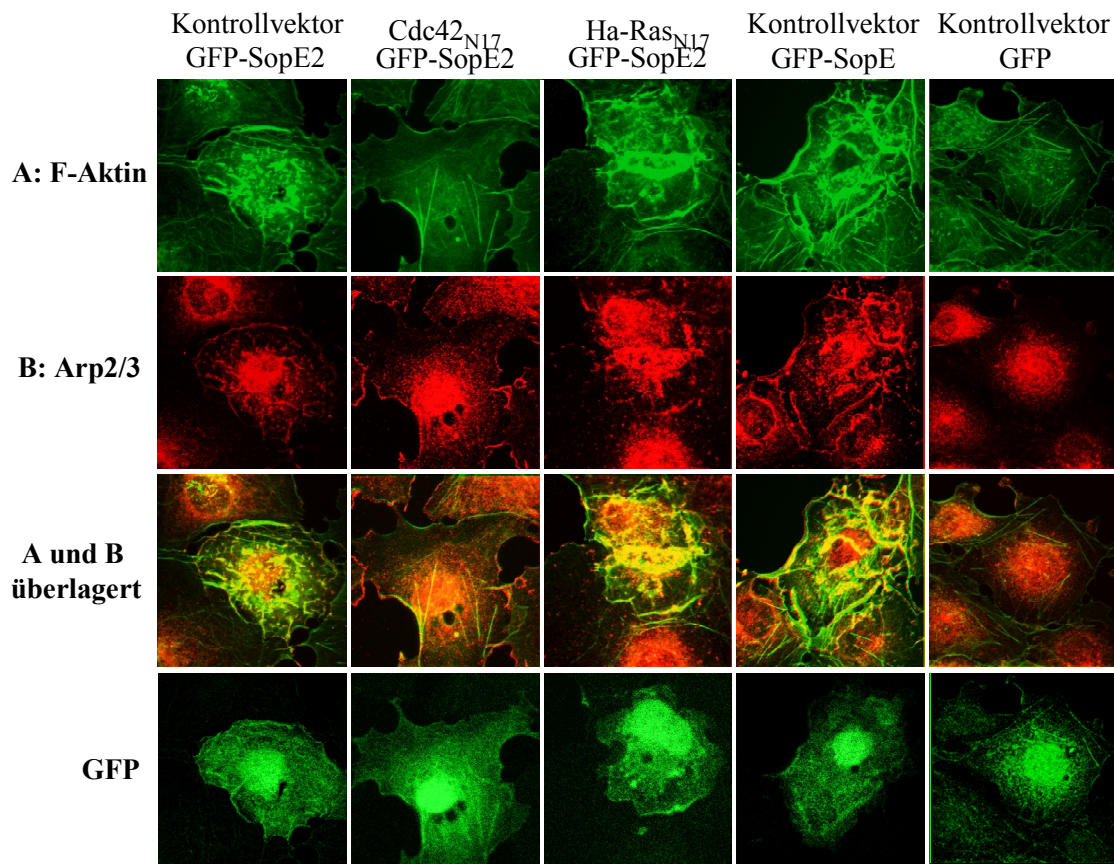


Abb. 22: SopE2 ist hinreichend für die Induktion von Arp2/3 Komplexen und Aktinpolymerisation.

COS7-Zellen wurden mit 0,25 µg pM150 (SopE2+GFP Expression; Spalte 1, 2, 3) oder pSB1174 (SopE+GFP Expression; Spalte 4) oder pSB965 (leerer GFP Kontrollvektor, Spalte 5) und mit 0,75 µg pcDNA3 (leerer Kontrollvektor, Spalte 1, 4, 5) oder Cdc42_{N17} (Expression von dominant negativem Cdc42, Spalte 2) oder mit Ha-Ras_{N17} (Expression von dominant negativem Ha-Ras_{N17}, Spalte 3) ko-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Reihen von oben nach unten: F-Aktin wurde mit Phalloidin FITC-Konjugat gefärbt. Arp2/3 Komplexe wurden mit polyklonalem α-p41-Arc Antiserum und α-Kaninchen Cy5-Konjugat gefärbt; C: A und B übereinander gelegt; D: GFP Fluoreszenz. Alle verwendeten Vektoren sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 in *Material und Methoden* beschrieben.

3.6 Der Einfluß von SopE2 auf die passive Internalisierung invasionsdefizienter Mutanten

3.6.1 SopE2 vermittelt die passive Internalisierung der invasions-defizienten *invG* Mutante

Die Inaktivierung des TSS1 von *S. typhimurium* unterbindet die Fähigkeit der Bakterien in kultivierte Henle407 oder COS7-Epithelzellen zu invadieren fast vollständig (Kaniga et al., 1994). Wenn eine Infektion allerdings in Anwesenheit von Wildtyp *S. typhimurium* durchgeführt wird, werden Proteine in die Wirtszelle transloziert und induzieren dort eine zelluläre Antwort, die zur Internalisierung von Partikeln führen kann. Der Invasionsdefekt von *S. typhimurium* SB161 ($\Delta invG$) kann deshalb bei Koinfektion mit einem solchen "Helferstamm" zumindest teilweise aufgehoben werden (Galan et al., 1992); (Ginocchio et al., 1992, Francis et al., 1993, Hardt et al., 1998a). Ein solcher "passiver Invasionsversuch" (siehe 2.9.5 *Material und Methoden*) kann dazu dienen, die Kapazität in der Internalisierung und Ausbildung von Membranausstülpungen bestimmter *S. typhimurium*-Stämme und Mutanten quantitativ zu vergleichen (Hardt et al., 1998a). Koinfektion von ampicillinresistenten *S. typhimurium* SB161 ($\Delta invG$ pWKS30 (Amp^r), Tabelle 6 und Tabelle 7, *Material und Methoden*) mit einer *sopE* Mutante (SB856^{E-E2+}) führte gegenüber der Koinfektion mit Wildtyp *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+} zu einer zwei- bis dreifach verringerten Effektivität in der passiven Invasion (Abb. 23 A; Hardt et al., 1998a). Der leichte Invasionsdefekt, der bei Infektion mit der *sopE2* Mutante (M200^{E+E2-}) festgestellt wurde, ist statistisch nicht signifikant. Dagegen war die *sopEsopE2* Doppelmutante (M202^{E-E2-}) in der Vermittlung der passiven Invasion von *S. typhimurium* SB161 sieben- bis achtfach weniger effektiv als Wildtyp *S. typhimurium* SL1344 (Abb. 23 A, Vergleich 2 und 1). Diese Attenuierung konnte komplementiert werden, wenn die *sopEsopE2* Doppelmutante (M202^{E-E2-}) mit einem SopE2- oder SopE-Expressionsvektor vor der Infektion transformiert wurde (Abb. 23 A 5 und 6).

Die Mechanismen der Invasion können sich in verschiedenen Zelltypen unterscheiden (Bliska und Galan, 1993). Analog durchgeführte passive Invasionsversuche in HeLa-Zellen ergaben ebenfalls eine sieben- bis achtfach verringerte Invasivität der *sopEsopE2* Doppelmutante (M202^{E-E2-}) gegenüber Wildtyp, die jedoch immer noch ca. 100 Mal höher war als in der *invG* Mutante SB161 (Abb. 23 B).

Diese Daten bestätigen und verdeutlichen die additiven Effekte von SopE und SopE2 in der Vermittlung von Zytoskelettlagerungen bei Infektion mit *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+}.

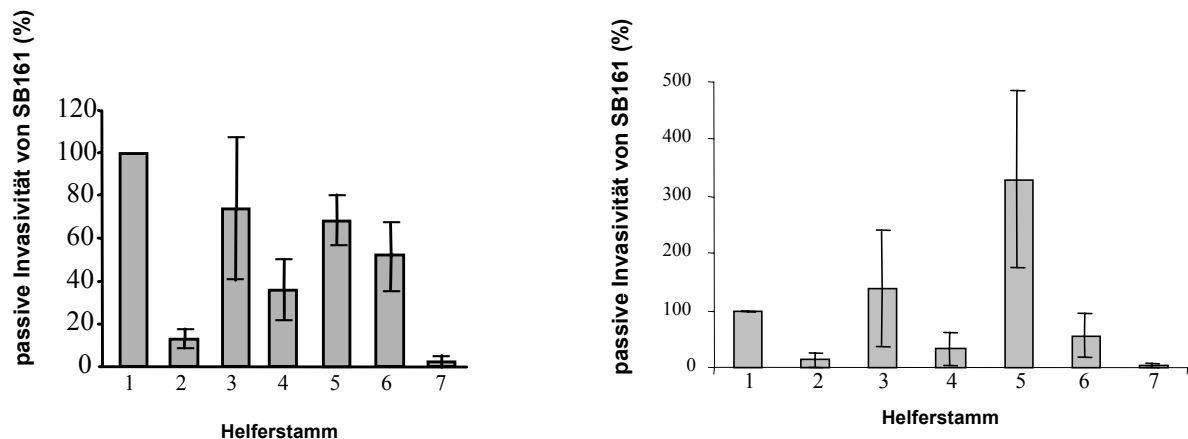


Abb. 23: SopE2 und SopE sind für eine effiziente passive Invasion von nicht-invasiven *S. typhimurium* Mutanten notwendig.

A: Koninfektion von COS7-Epithelzellen. B: Koinfektion von HeLa-Epithelzellen. Zellen wurden mit *S. typhimurium* SB161 ($\Delta invG$; amp^r) und zu testende *S. typhimurium*-Stämme und Mutanten (amp^s) in einer Mischung 1:1 für 50 min (jeweils MOI = 4) infiziert. Passive Invasion von SB161 wurde wie im Gentamicin Protektionsversuch mit anschließendem Ausplattieren der internalisierten Bakterien auf LB (50 μ g/ml Ampicillin) gemessen (siehe *Material und Methoden*). Die Fähigkeit der Helferstämmen, die passive Invasion der nicht-invasiven Mutante SB161 ($\Delta invG$; amp^r) zu vermitteln, wurde in 8 (bzw. für HeLa-Zellen in 4) unabhängigen Versuchen bestimmt. Die Daten wurden in Bezug zu der *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+}-vermittelten passiven Invasion gesetzt. Fehlerbalken = Standardabweichungen. 1: SL1344^{E+E2+}; 2: M202^{E-E2-}; 3: M200^{E+E2-}; 4: SB856^{E-E2+}; 5: M202^{E-E2-} (pM149, *sopE2*); 6: M202^{E-E2-} (pSB1130, *sopE*); 7: SB161 ($\Delta invG$).

3.6.2 SopE2 ist hinreichend für die Internalisierung der invasions-defizienten *invG* Mutante

Weiterführend wurde untersucht, ob die durch SopE2 induzierten Zytoskelettlagerungen in der Wirtszelle für die Internalisierung von *S. typhimurium* ausreichen. Zu diesem Zweck wurden COS7-Epithelzellen mit Expressionsvektoren pM150 (SopE2), pSB1174 (SopE) oder mit dem leeren Kontrollvektor pSB965 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend für 40 min mit der nicht-invasiven *S. typhimurium* Mutante SB161 (Tabelle 6, MOI = 10, *Material und Methoden*) infiziert. Die Zellen wurden fixiert und die intra- und extrazellulären Bakterien wurden nach dem differentiellen Färbeprotokoll gefärbt (siehe *Material und Methoden*). Transfizierte Zellen konnten anhand der GFP-Expression detektiert werden (Abb. 24 A). Transfektion mit dem SopE2-Expressionsvektor (pM150) führte zur Aufnahme von nicht-invasiven *S. typhimurium* SB161 (Abb. 24 A 3). Wurde statt des SopE2-Vektors ein Vektor verwendet, der *sopE* exprimiert (pSB1174), war ebenfalls eine solche Internalisierung zu beobachten (Abb. 24 A 2; Hardt et al., 1998a). Dagegen führte die Transfektion mit dem *gfp* exprimierenden Transfektionsvektor pSB965 nicht zur

Internalisierung von *S. typhimurium* SB161 (Abb. 24 A 1). Um zu bestimmen, ob SopE2-vermittelte Internalisierung von *S. typhimurium* SB161 durch COS7-Zellen abhängig von funktionellem Cdc42 ist, wurden Ko-Transfektionsexperimente mit Expressionsvektoren für die dominant negativen Allele von Cdc42 (Cdc42_{N17}) und Ha-Ras (Ha-Ras_{N17}) durchgeführt. Zum Vergleich wurden parallel entsprechende Kontrollexperimente mit dem SopE-Expressionsvektor (pSB1174) durchgeführt. Ko-Transfektion des SopE2-Vektors (pM150) mit dem Expressionsvektor Cdc42_{N17} reduzierte die Effizienz der Internalisierung von *S. typhimurium* SB161 um das Vierfache (Abb. 24 B, Vergleich 1 und 2). Unter Verwendung des Ha-Ras_{N17} Expressionsvektors war dagegen keine Änderung in der Aufnahme von *S. typhimurium* SB161 zu beobachten (Abb. 24 B3). Wurde statt des SopE2- ein SopE-Vektor verwendet, zeigten sich ähnliche Effekte in der gleichen Intensität (Abb. 24 B 5 - 7 und Hardt et al., 1998a). Bei Ko-Transfektion mit der Kontrolle, dem GFP-Expressionsvektor (pSB965), mit einem Transfektionsvektor ohne Insertion (pcDNA3), war die Zahl internalisierter Bakterien ungefähr genauso niedrig wie bei den Ko-Transfektionen der Expressionsvektoren SopE2 bzw. SopE mit Cdc42_{N17} (Abb. 24 B Vergleich 4 mit 2 und 6).

Es wird deutlich, daß SopE2 hinreichend ist, Internalisierung über Cdc42 zu induzieren. SopE2 leitet über die direkte Bindung an Cdc42 die Rekrutierung des Arp2/3 Komplexes und in Folge Aktinpolymerisation und Zytoskelettlagerungen ein, die schließlich zur Ausbildung von Membranausstülpungen und Internalisierung von *S. typhimurium* führen.

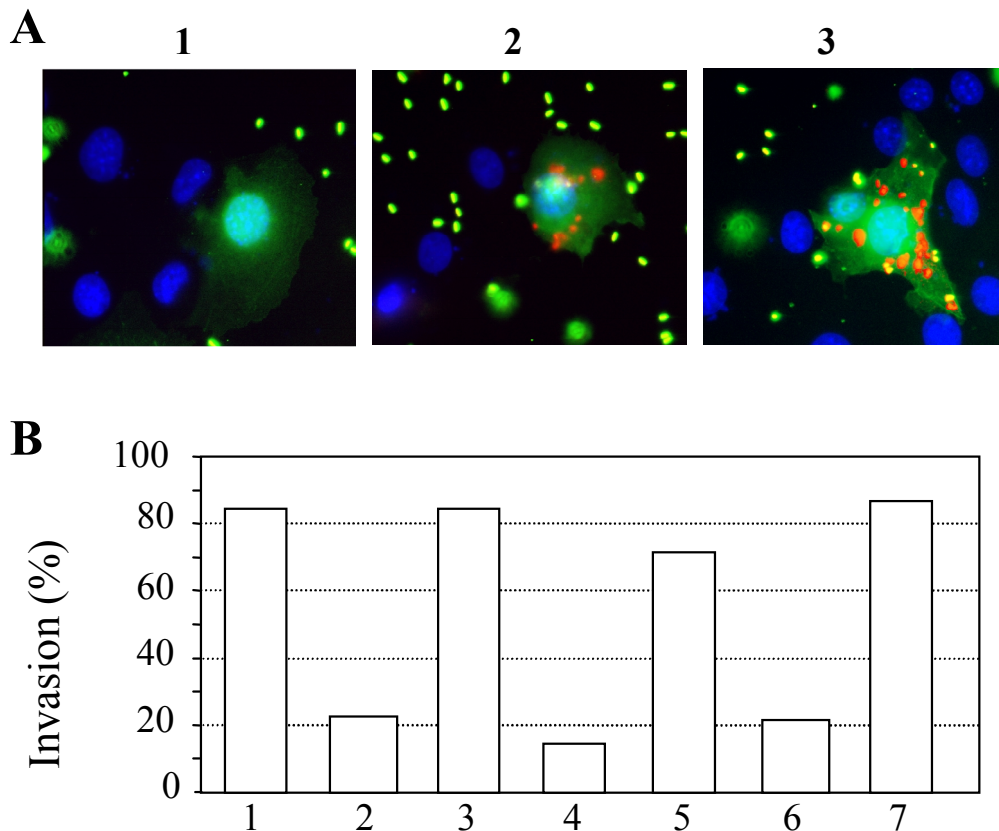


Abb. 24: SopE2 vermittelt Internalisierung von SB161 ($\Delta invG$).

A. Identifikation von internalisierten *S. typhimurium* SB161 durch differenzielle Immunfluoreszenzfärbung. COS7-Epithelzellen wurden mit 1 μg pSB965 (1, leerer Kontrollvektor), pSB1174 (2, SopE) oder pM150 (3, SopE2) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für 45 min mit *S. typhimurium* SB161 (MOI = 15) infiziert. Internalisierte Bakterien (TRITC⁺ und FITC⁻) wurden nach Färbung (diffentielles Färbeprotokoll, *Material und Methoden*) mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert. Die Abbildungen zeigen typische Ausschnitte, die durch Übereinanderlegen der Fluoreszenzsignale von FITC (extrazelluläre Bakterien), TRITC (intra- und extrazelluläre Bakterien), DAPI (COS7 Zellkerne und bakterielle DNA) und GFP (transfizierte Zellen) dargestellt sind. B. Analyse der Spezifität von SopE2. COS7-Zellen wurden mit 0,25 μg pM150 (SopE2-GFP), pSB1174 (SopE+GFP) oder pSB965 (GFP Kontrolle) gemeinsam mit 0,75 μg pcDNA3 oder einem Derivat für die dominant negative Expression von Cdc42_{N17} oder Ha-Ras_{N17} ko-transfiziert. Die Zahl internalisierter *S. typhimurium* SB161 in transfizierten (GFP-positiven) COS7-Zellen wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt (siehe Abbildungen in A). GFP-positive Zellen, die zwei oder mehr Bakterien enthielten wurden als "invadiert" angesehen. Die passive Invasion wurde wie folgt dargestellt Invasion (%) = [Zahl "invadierter" Zellen] / [Zahl aller GFP-positiven Zellen]. Die Zahlen repräsentieren den Mittelwert nach Bewertung von mindestens 100 transfizierten Zellen. COS7-Zellen wurden ko-transfiziert mit: 1: pM150 + pcDNA3; 2: pM150 + Cdc42_{N17}; 3: pM150 + HaRas_{N17}; 4: pSB965 + pcDNA3; 5: pSB1174 + pcDNA3; 6: pSB1174 + Cdc42_{N17}; 7: pSB1174 + HaRas_{N17}.

3.7 Zytotoxische Effekte von SopE und SopE2

Nach Infektion mit *S. typhimurium* lassen sich in Makrophagen auch zytotoxische Effekte, die zur Apoptose oder Nekrose führen können, beobachten (Knodler et al., 2001). Die Anfärbung apoptotischer bzw. nekrotischer J774 Makrophagen mit der DNA interkalierenden Substanz Ethidiumhomodimer-1 zeigte für *S. typhimurium* SL1344 ebenso wie für die *sopEsopE2* Doppelmutante einen schnellen Zelltod. Von den mit *S. typhimurium* Wildtyp infizierten Zellen waren 86 % permeabilisiert, was mit früheren Untersuchungen übereinstimmt (Jesenberger et al., 2000). Auch nach Infektion mit der *sopEsopE2* Doppelmutante war die Zahl permeabilisierter Zellen mit 77 % sehr hoch. Dagegen ist die sekretionsdefiziente Apparatsmutante SB161 mit 8,6 % permeabilisierten Makrophagen viel weniger zytotoxisch.

Tabelle 16: *S. typhimurium* vermittelt Zytotoxizität in Makrophagen unabhängig von SopE und SopE2.

Stamm	SB161	SL1344	SB856	M202	M200	M202 +pM226	M202 +pM136
tote Zellen	8,6 %	86,1 %	88,9 %	77 %	92 %	93,1 %	77,4 %

3.8 Untersuchung des G-Nukleotid-Austauschs durch SopE und SopE2 an Rab GTPasen

SopE interagiert neben Cdc42 auch mit verschiedenen anderen Rho GTPasen, wie z. B. Rac1, Rac2, RhoA, RhoB, RhoC und RhoG (Hardt et al., 1998a). Im Gegensatz zu SopE konnte für SopE2 nur eine verminderte Austauschaktivität von Guanin-Nukleotiden an Rac1 gezeigt werden (Friebel et al., 2001), so daß hier ein Unterschied in der Substratspezifität dieser beiden ähnlichen Proteine besteht. Kürzlich wurde für SopE eine Bindung an die rekombinante Rab GTPase GST-Rab5 gezeigt (Mukherjee et al., 2000). Rab5 ist ein Markerprotein für "frühe" Endosomen, das im Vesikeltransport eine Rolle spielt. Phagosomen mit endocytierten *S. typhimurium* halten Rab5 auf den Vesikeln zurück, umgehen dadurch Fusion mit Lysosomen und ermöglichen das Überleben in diesen modifizierten Phagosomen (Hashim et al., 2000). Daher wurde die Fähigkeit von SopE und SopE2 untersucht, an weiteren G-Nukleotid bindenden Proteinen G-Nukleotid-Austausch zu vermitteln.

Für die Bestimmung des G-Nukleotid-Austauschs im Filterbindungsversuch (wie bereits für Cdc42 beschrieben) wurden N-terminale GST-Fusionen der katalytisch aktiven Domänen von SopE2 (SopE2₆₉₋₂₄₀ pM148) und SopE (SopE₇₈₋₂₄₀ pSB1130) verwendet. Um die Rab GTPasen Rab4, Rab5, Rab7 und Rab11 zu testen, wurden diese als GST- bzw. His-Fusionen (siehe Plasmide Tabelle 7, *Material und Methoden*) rekombinant exprimiert und mit

[³H]-GDP beladen. Der Austausch gegen GDP wurde ohne Zusätze oder nach Inkubation mit je 1 µM GST-SopE₂₆₉₋₂₄₀ bzw. GST-SopE₇₈₋₂₄₀ in Anwesenheit eines Überschusses von 1 mM unbeladenem GDP und 5 mM Mg²⁺ im Filterbindungsversuch bestimmt (siehe *Material und Methoden*). Die im Szintillationszähler gemessenen Werte, die die Konzentration der [³H]-GDP gebundenen GTPase widerspiegeln, wurden jeweils zu den beim intrinsischen Guanin-Nukleotid-Austausch gemessenen Werten (100%) in Bezug gesetzt und in % angegeben. Für 6 µM GST-Rab4 und 6 µM GST-Rab5 war mit GST-SopE₂₆₉₋₂₄₀ und GST-SopE₇₈₋₂₄₀ im Verlauf von 60 min verglichen mit dem intrinsischen Austausch ein ca. gleich hoher Meßwert zu verzeichnen, während mit EDTA (im Vergleich zum intrinsischen Austausch) die Konzentration von [³H]-GDP auf 20 % sank (Abb. 25). Weder für GST-SopE₂₆₉₋₂₄₀ noch für GST-SopE₇₈₋₂₄₀ konnte demnach Aktivität als Austauschfaktor für die Rab GTPase GST-Rab4 nachgewiesen werden. Mukherjee *et al.* konnten an GST-Rab5 in Anwesenheit von GST-SopE₇₈₋₂₄₀ nach 30 min Inkubation eine etwas erhöhte Austauschrate von GTP nachweisen (Faktor 2,5) als ohne SopE (Mukherjee *et al.*, 2001). Im Filterbindungsversuch ließ sich dieses Ergebnis allerdings nicht bestätigen. Für die rekombinanten Proteine His-Rab7 und His-Rab11 ließ sich keine eindeutige Aussage bezüglich der Austauschaktivität von SopE und SopE2 treffen, da die Streuung der Meßwerte aus unbekanntem Gründen zu hoch war (Abb. 25)

Unter diesen Bedingungen konnten im Filterbindungsversuch die Ergebnisse von Mukherjee *et al.* bezüglich des SopE-vermittelten G-Nukleotid-Austausches an Rab5 nicht bestätigt werden. Rab4 scheint ebenfalls kein Substrat von SopE oder SopE2 darzustellen.

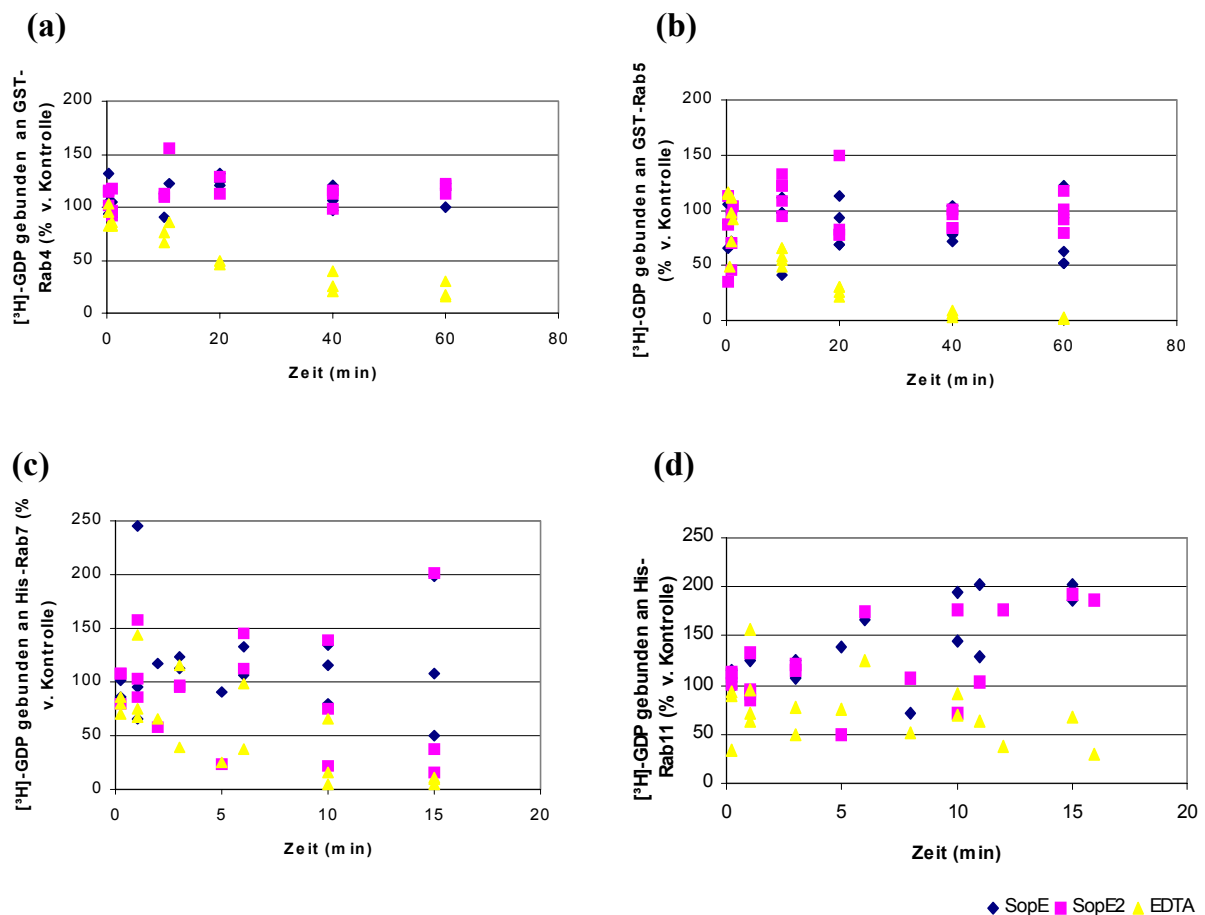


Abb. 25: G-Nukleotid-Austausch von SopE und SopE2 an Rab GTPasen.

GST-Rab4, GST-Rab5, His-Rab7 und His-Rab11 konnten im Filterbindungsversuch nicht als Substrate für SopE und SopE2 identifiziert werden. GST-Rab4 (a), GST-Rab5 (b), His-Rab7 (c) und His-Rab11 (d) wurden mit $[^3\text{H}]\text{-GDP}$ beladen. Nach dem Austausch gegen nicht markiertes GDP wurde die Konzentration von $[^3\text{H}]\text{-GDP}$ in Filterbindungsversuchen gemessen (siehe *Material und Methoden*). Der G-Nukleotid-Austausch wurde in Anwesenheit bestimmt von: 1 μM GST-SopE2₆₉₋₂₄₀, 1 μM GST-SopE₇₈₋₂₄₀; 10 mM EDTA. Die Konzentration von $[^3\text{H}]\text{-GDP}$ nach Stoppen der Austauschreaktion wurde im Verhältnis zur $[^3\text{H}]\text{-GDP}$ Konzentration beim intrinsischen Austausch (Kontrolle = 100%) in Prozent ausgedrückt. Die Daten sind in mindestens drei unabhängigen Versuchen ermittelt worden..

3.9 *S. typhimurium* rekrutiert Arf6-Vesikel

Ebenfalls zu der Familie der kleinen GTPasen gehören die Arf-Proteine (ADP-Ribosylierungsfaktoren). Für Arf6 wurde neben seiner Rolle im Vesikeltransport auch die Fähigkeit zur Neuorganisation des Zytoskeletts nachgewiesen (D'Souza-Schorey et al., 1997, Radhakrishna et al., 1999). Es wird diskutiert, ob diese Restrukturierung des Aktinzytoskeletts in Folge der Aktivierung von Rho GTPasen oder parallel zu deren Aktivierung stattfindet (Al-Awar et al., 2000, Boshans et al., 2000, Takai et al., 2001). Im Folgenden sollte daher eine mögliche Beteiligung von Arf6 an den durch *S. typhimurium* induzierten Aktinumlagerungen untersucht werden.

Die Transfektion von Vektoren, die Wildtyp Arf6 oder eine dominant negative Mutante (Arf6_{T27N}) fusioniert mit dem humanen IgG-Epitop kodierten, diente der Untersuchung der Lokalisation von Arf6-Vesikeln (FITC gefärbt). Die Konstrukte wurde freundlicherweise von Prof. W. Kolanus zur Verfügung gestellt. Cytoplasmatische Ig-Fusionsproteine wurden bereits früher beschrieben (Nagel et al., 1998a, Nagel et al., 1998 b, Kolanus et al., 1996). 40 min nach Infektion mit *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+} mit einer MOI von 10 wurden nicht internalisierte Bakterien mit Cy3 gefärbt. Die DNA von internalisierten und extrazellulären Bakterien und zelluläre DNA wurden mit DAPI gefärbt (siehe *Material und Methoden*). An den Zellen, die mit *S. typhimurium* assoziiert waren, wurden lokal in der Nähe der Bakterien vermehrt Arf6IgG Vesikel detektiert (Abb. 26). Durch Färbung von Aktin (Phalloidin-TRITC) konnte keine Änderung in der Ausbildung von Membranausstülpungen gegenüber nicht transfizierten Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu, waren nach Infektion mit der sekretionsdefizienten *invG* Mutante SB161 keine Membranausstülpungen oder Vesikelrekrutierung in der Nähe assoziierter Bakterien zu sehen.

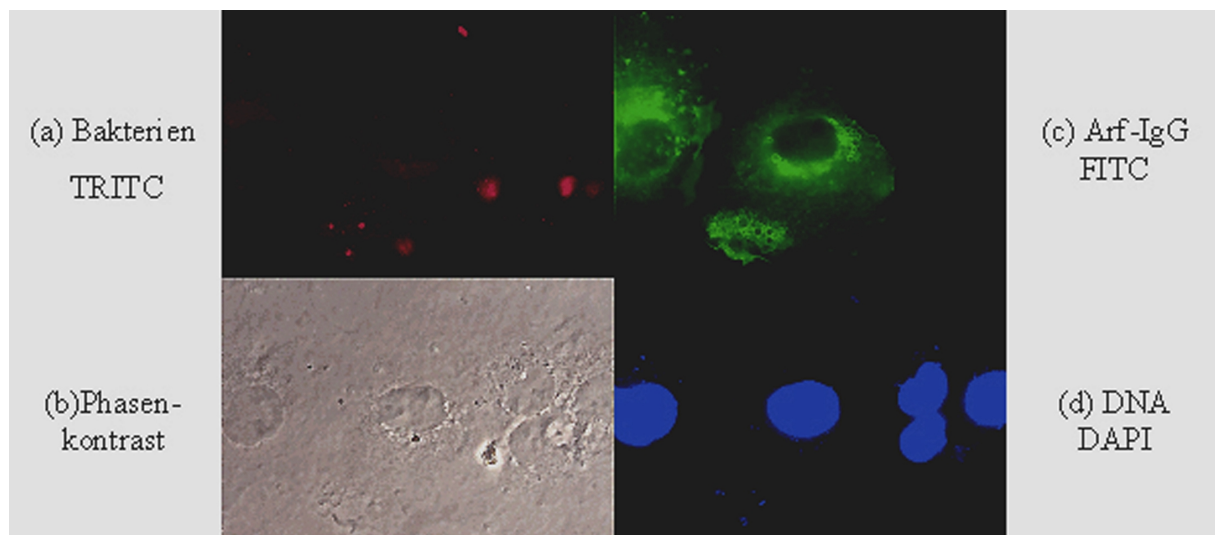


Abb. 26: Ko-Lokalisation von Arf6 markierten Vesikeln und *S. typhimurium* in COS7-Zellen. Transfektion von 0,3 μ M prKArf6IgG und Infektion mit *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+} für 40 min bei einer MOI von 10. Färbung (a) der Bakterien außen (TRITC⁺), (c) der Vesikel (FITC⁺) und (d) der bakteriellen und zellulären DNA (DAPI). (b) Phasenkontrast.

Transfektion mit prKArf6IgG, dem dominant negativen Vektor prKArf6_{T27N} oder dem Kontrollvektor prK5IgG und Infektion von *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+} für 40 min (*Material und Methoden*) ergab keine Änderung der Invasivität, wie die Auswertung nach differenzieller Färbung zeigte (Abb. 27 A). Nach Transfektion mit prKArf6IgG war in ca. 80 % der transfizierten Zellen *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+} mit Arf6-positiven Vesikeln assoziiert, während Vesikel mit transfiziertem Arf6_{T27N} kaum (ca. 15 %) mit den Bakterien ko-lokalisierten. In der Kontrolle waren keine gefärbten Vesikel detektierbar (Abb. 27 B).

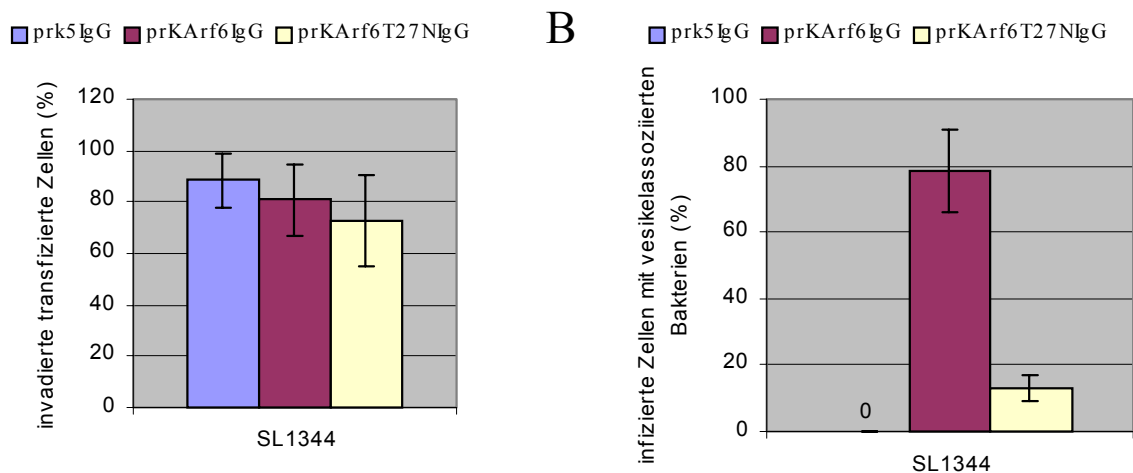


Abb. 27: Einfluß von Arf6 auf Invasivität und Vesikelassoziation von *S. typhimurium* SL1344.

Transfektion von 0,3 μ M prK5IgG (blau) prKArf6IgG (rot) oder prK5Arf6_{T27N}IgG (gelb) und anschließende Infektion mit *S. typhimurium* SL1344^{E+E2+} für 40 min mit einer MOI von 10 (*Material und Methoden*). A. Invasion. Bakterien wurden nach dem differentiellen Färbeprotokoll detektiert: extrazelluläre Bakterien TRITC⁺ und AMCA⁺, intrazelluläre Bakterien AMCA⁺. Zellen mit IgG-FITC gefärbten Vesikeln, die zwei oder mehr Bakterien enthielten, wurden als "inviadiert" angesehen und dargestellt in % Invasion = [Zahl "inviadierter" Zellen] / [Zahl aller IgG-positiven Zellen]. Die Zahlen repräsentieren den Mittelwert nach Bewertung von mindestens je 80 transfizierten Zellen aus 5 unabhängigen Versuchen. B. Vesikelassoziation. Detektion der Lokalisation von Vesikeln in transfizierten Zellen erfolgte durch Färbung mit einem monoklonalen α -IgG-FITC Antikörper. Nachweis der intrazellulären Bakterien mit einem polyklonalen Antikörper (AMCA⁺). Die Zahl der Zellen, in denen intrazelluläre Bakterien (AMCA⁺) mit Vesikeln (FITC⁺) assoziiert waren/Zahl aller IgG-FITC positiven Zellen wurde in % Vesikelssoziation dargestellt.

Bei den Ko-Transfektionsversuchen mit SopE bzw. SopE2 und Arf6 wurde untersucht, inwieweit die Assoziation von Arf6-Vesikeln mit Bakterien von der Anwesenheit eines SopE-Proteins abhängt. 48 h nach der Transfektion wurden die COS7-Zellen für 40 min mit der sekretionsdefizienten *invG* Mutante SB161 infiziert. Anschließend wurden die Vesikel mit einem FITC-gekoppelten α -IgG-Antikörper gefärbt. Die Zahl der passiv internalisierten SB161 Bakterien in den transfizierten Zellen wurde durch differentielle Immunfluoreszenzfärbung bestimmt (siehe *Material und Methoden*). Die SopE/SopE2 vermittelte passive Internalisierung von SB161 war weitgehend unbeeinflusst von der Kotransfektion mit Arf6IgG oder Arf6_{T27N}IgG (Abb. 28 A). Nach Kotransfektion mit SopE bzw. SopE2 war auch eine ähnliche Kolo-kalisation mit Arf6⁺-Vesikeln zu beobachten wie nach der Infektion mit *S. typhimurium* Wildtyp. Nach Ko-Transfektionen von prKArf6IgG entweder mit pM166 (SopE2) oder mit pSB1174 (SopE) zeigten ca. 60 % der transfizierten Zellen eine Kolo-kalisation von Arf6-Vesikeln mit *S. typhimurium* SB161 (Abb. 28 B, rote Säulen). Wurde statt prKArf6IgG der Transfektionsvektor für das dominant negative Allel (Arf6_{T27N}IgG) verwendet, sank der Prozentsatz der Zellen, bei denen Bakterien mit Vesikeln assoziiert

waren, auf ca. 10 % (Abb. 28 B, gelbe Säulen). Bei Transfektion mit dem Kontrollvektor prK5 waren keine Arf6-Vesikel detektierbar. Die Werte bei Ko-Transfektion von prKArf6_{T27N}IgG entweder mit pM166 (SopE2) oder pSB1174 (SopE) sind wegen der geringen Transfektionseffizienz nicht signifikant, es konnten nur ca. 15 Zellen pro Versuch ausgewertet werden, für die anderen Ko-Transfektionen wurden ca. 80 Zellen pro Versuch ausgewertet, die Daten stammen aus mindestens 4 Versuchen.

Zusammengefaßt ergaben diese Versuche, daß Arf6 keinen Einfluß auf die Invasivität von *S. typhimurium* hat, obwohl es in die Nähe invadierender Bakterien rekrutiert wird. SopE- und SopE2-vermittelte passive Internalisierung eines sekretionsdefizienten Stammes führt darüber hinaus ebenfalls zur Rekrutierung von Vesikeln. Inwieweit hierfür die Internalisierung per se oder SopE bzw. SopE2 direkt verantwortlich ist, ist unklar.

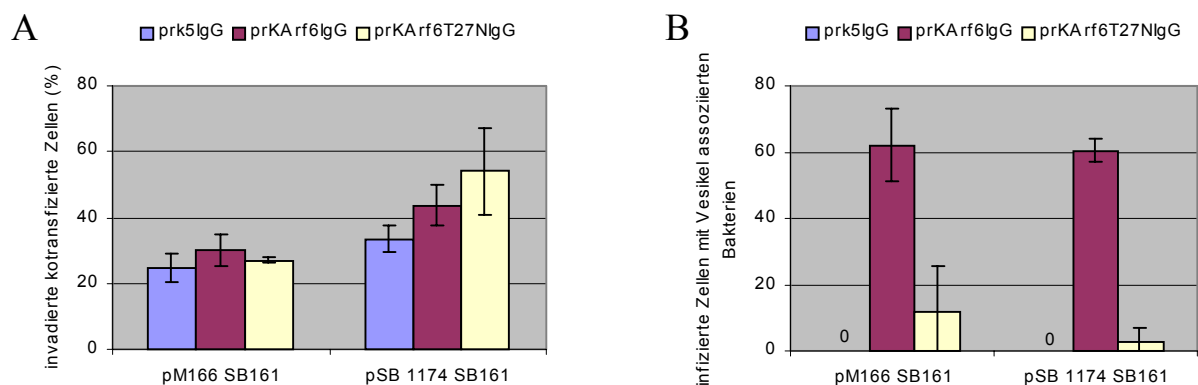


Abb. 28: Einfluß von SopE bzw. SopE2 kotransfiziert mit Arf6 auf die Invasivität und die Vesikelassoziation einer sekretionsdefizienten *S. typhimurium* Mutante.

Ko-Transfektionen wurden wie im Folgenden beschrieben durchgeführt: 0,0375 µg pM166 (SopE2) wurden (a) entweder mit 0,3 µg eines Kontroll-Vektors (prk5IgG, blaue Säulen) oder (b) mit 0,3 µg des Arf6IgG-Vektors oder (c) mit 0,3 µg des dominant negativen Arf6_{T27N}IgG-Vektors kotransfiziert. Analog wurden dieselben Mengen für die Ko-Transfektionen mit 0,0375 µg pM1174 (SopE) verwendet. 48 h nach den Transfektionen wurde für 40 min. mit der $\Delta invG$ *S. typhimurium* Mutante SB161 bei einer MOI von 10 infiziert (*Material und Methoden*). Die Detektion der Lokalisation von Vesikeln in transfizierten Zellen erfolgte durch Färbung mit einem monoklonalen α -IgG-FITC konjugierten Antikörper. Bakterien wurden nach dem differenziellen Färbeprotokoll detektiert: extrazelluläre Bakterien TRITC⁺ und AMCA⁺, intrazelluläre Bakterien AMCA⁺. A. Arf6 hatte keinen Einfluß auf die SopE- oder SopE2-vermittelte passive Internalisierung. Zellen mit IgG-FITC gefärbten Vesikeln, die zwei oder mehr Bakterien enthielten, wurden als "invadiert" angesehen (% Invasion = [Zahl "invadierter" Zellen] / [Zahl aller IgG-positiven Zellen]). Die Zahlen repräsentieren den Mittelwert nach Bewertung von mindestens 80 transfizierten Zellen. B. Arf6-Vesikel ko-lokalisieren teilweise auch mit passiv internalisierten sekretionsdefizienten *Salmonellae*. Detektion der Lokalisation von Vesikeln in transfizierten Zellen erfolgte durch Färbung mit einem monoklonalen α -IgG-FITC-Konjugat. Nachweis der intrazellulären Bakterien erfolgte nach dem differenziellen Färbeprotokoll mit einem polyklonalen Antikörper (extrazelluläre Bakterien TRITC⁺ und AMCA⁺, intrazelluläre Bakterien: AMCA⁺). Die Zahl der Zellen, in denen intrazelluläre Bakterien (AMCA⁺) mit Vesikeln (FITC⁺) assoziiert waren / Zahl aller IgG-FITC positiven Zellen wurde in % Vesikelassoziation dargestellt.

3.10 Isolation und Identifizierung SopE2 bindender Proteine

3.10.1 Aus Rindermilz isolierte Bindungspartner von SopE2

Zur Identifikation von weiteren mit SopE2 interagierenden Proteinen, sollten native Proteine aus Rindermilch extrahiert werden. Für die Membranassoziation und die Aktivierung von Ras, Rho/Rac und Rab GTPasen ist eine postrtranslationale Lipidmodifikation, die Prenylierung notwendig (Marshall, 1993, Mizuno et al., 1991). Bei Rab-Proteinen erfordert die Modifikation mit zwei Geranylgeranylgruppen das Protein REP (Rab escort protein). Solche Modifikationen sind in rekombinanten Proteinen häufig nicht vorhanden. Um potentielle Bindungspartner in ihrer aktiven modifizierten Form identifizieren zu können, sollten diese deshalb aus einem geeigneten Organismus (Rind) gewonnen. Zur Aufreinigung der SopE2 Bindungspartner wurde ein Affinitätschromatographisches Verfahren angewandt. Die unlösliche durch Triton X-100 solubilisierete Fraktion und die lösliche Fraktion eines dialysierten Homogenisats aus Rindermilch wurden in getrennten Versuchen in der Affinitätschromatographie an rekombinant exprimiertes Fusionsprotein GST-SopE2₇₈₋₂₄₀ (pM148) gebunden. Hierbei wird ausgenutzt, daß SopE2 bei Abwesenheit von G-Nukleotiden fest an Rho GTPasen bindet. Nach intensivem Waschen wurde jeweils eine Fraktion isoliert (Waschfraktion). Wegen der G-Nukleotid-Austauschaktivität von SopE2 kann durch Zugabe von 1 mM GDP ein effektiver Zerfall des Komplexes erreicht werden. Daher konnten durch Zugabe von 1 mM GDP in diesem Komplex gebundene Proteine von der Säule eluiert werden, während GST-SopE2 an die Säule gebunden bleibt. Die Proteine beider Fraktionen (Wasch- und Elutionsfraktion) wurden mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Deiwick analysiert. Der Vergleich der Coomassie Blau gefärbten Proteine in beiden Gelen führte zur Identifikation von drei spezifischen Banden in der GDP eluierten unlöslichen Fraktion (Abb. 29 A) und zwanzig Banden in der löslichen Fraktion (Abb. 29 B). Abb. 29 zeigt die silbergefärbten Gele nachdem die in der Coomassiefärbung identifizierten Banden ausgeschnitten worden waren (*Material und Methoden*).

Proteine, die bei der isoelektrischen Fokussierung nicht ins Gel einwanderten wurden nicht erfaßt. Der pI kann nicht für eine Bestimmung der Proteine herangezogen werden, da die Auftrennung in den verwendeten Gelen nicht linear verläuft.

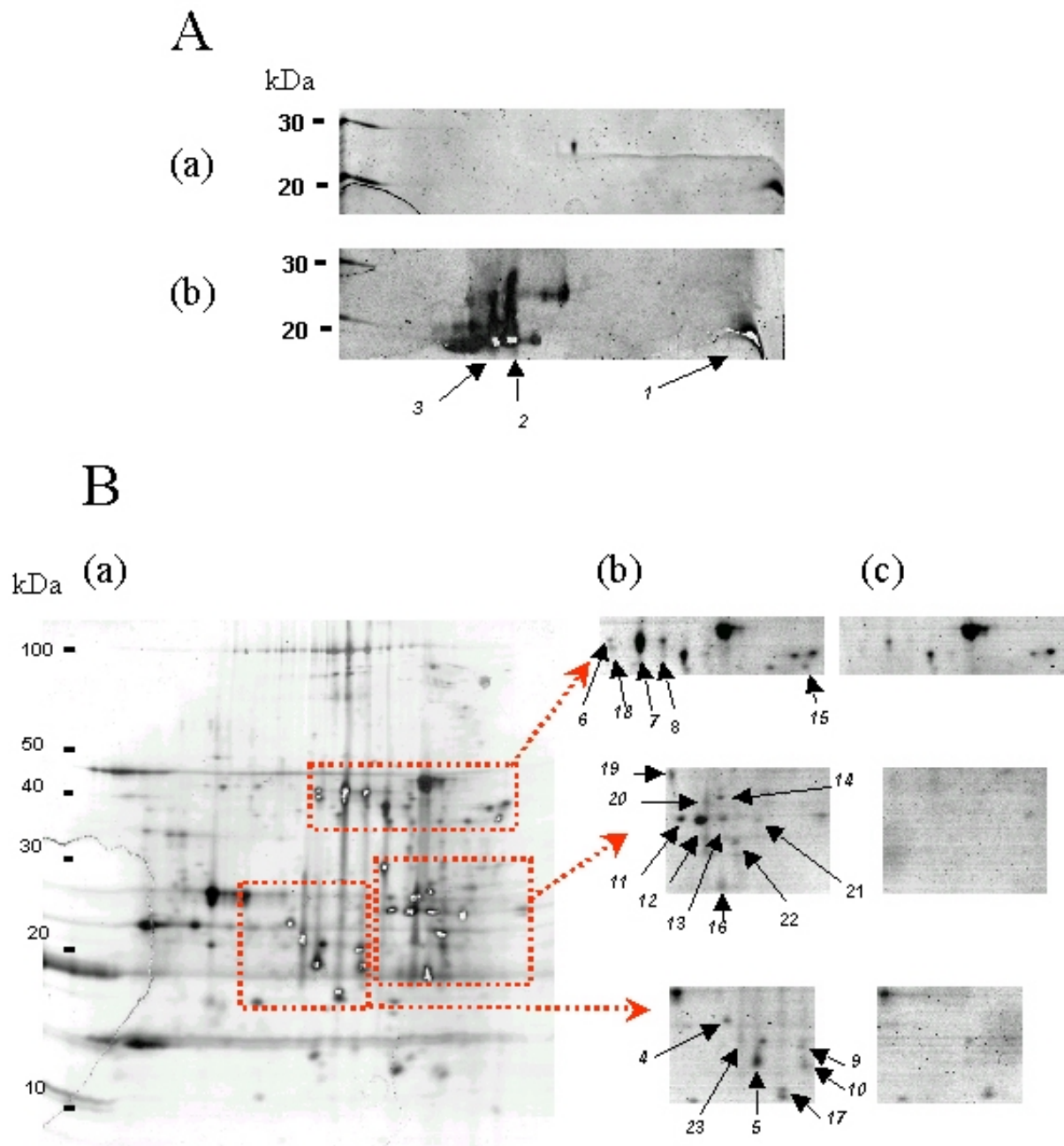


Abb. 29: SopE2 bindende Proteine in zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung

A: SopE2 bindende Proteine der unlöslichen Fraktion. Die unlösliche Fraktion homogenisierter Rindermilch wurde mit Triton X-100 solubilisiert. Nach Bindung an GST-SopE2 in der Affinitätschromatographie wurden gebundene Proteine durch Zugabe von 1 mM GDP eluiert. Fraktionen vor und nach Zugabe von GDP wurden jeweils nach der isoelektrischen Fokussierung im pI 3-10 (nicht linear) im Coomassie bzw. Silber gefärbten 2D-Gel untersucht (Triczin Gel): (a) Waschfraktion; (b) mit GDP eluierte Fraktion und identifizierte spezifische Banden. B: SopE2 bindende Proteine der löslichen Fraktion. Die löslichen Proteine der homogenisierten Rindermilch wurden ohne Triton X-100 Solubilisierung, wie in A beschrieben, behandelt. (a) Vollständiges 2D-Gel der GDP-eluierten Fraktion; Ausschnitte aus (b) der Waschfraktion (c) der mit GDP eluierten Fraktion und identifizierte spezifische Banden.

3.10.2 Identifikation SopE2 bindender Proteine

Um die im 2D-Gel getrennten Proteine näher zu bestimmen, wurden die spezifischen Banden aus den Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die Fragmente massenspektrometrisch analysiert. Die Kalibrierung erfolgte intern anhand folgender Peptidmassen: Matrix 568, 12; Trypsin: 515,33; 841,51; 2211,11. Die Identifikation der Proteine erfolgte durch Analyse der experimentell ermittelten Peptidmassen (siehe Tabelle 19 im *Anhang*) mit den Programmen MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0u/msfit.>) und ProFound (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe) im Vergleich zu den theoretischen Peptidmassen von Proteinen aus der NCBI Nr Datenbank (siehe Tabelle 17). Angegeben wurden Proteine mit der höchsten Übereinstimmung und mindestens drei identifizierten Peptiden mit einer Sequenzabdeckung von mindestens 27 % (siehe *Material und Methoden*).

Tabelle 17: Identifikation der im 2D-Gel isolierten SopE2 bindenden Proteine.

Im 2D-Gel isolierte SopE2 bindende Proteine der unlöslichen Fraktion (1-3) und der löslichen Fraktion (4-23) wurden ausgeschnitten und Trypsin verdaut. In der MALDI Massenspektrometrie wurden Peptidmassen bestimmt und mit den Programmen MSFit (M) oder ProFound (P) analysiert. Die Banden 2, 5, 7 und 12 (mit TL gekennzeichnet) wurden von der Firma Toplab (München) mit Hilfe MSFit analysiert. n = neutraler pl

Bande Nr.	Protein-beschreibung	Spezies	Sequenz-abdeckung (%)	M _r (kDa) / pI theoretisch	M _r (kDa) / pI experimentell (ca.)	NCBI Datenbank Nummer
1	RhoB (P)	Mensch	36	19,2 / 4,8	19 / n	AAA36565.1
2	RhoA TL	Rind	48	22,2 / 5,8	19 / n	TVBO12
5	RhoA TL	Ratte	42	22,2 / 5,8	18 / n	TVBO12
7	β-Actin TL	Maus	37	39,2 / 5,8	40 / n	CAA27396
8	β-Actin*(P)	Maus	16	39,2 / 5,8	40 / n	CAA27396
12	APO-A1* TL	Rind	56	28,4 / 5,6	21 / n	AAB21444.1
14	Rab-15 (P)	Ratte	27	24,3 / 5,4	24 / n	P35289
16	RhoA (M)	Rind	56	22,2 / 5,8	17 / n	TVBO12
17	AIF-1 (P)	Rind	50	16,8 / 6,0	16 / n	AAK30155.1
19	β-Actin*(P)	Maus	27	39,5 / 5,8	29 / n	CAA27396
20	Ccd42-Gdp Komplex (P)	Mensch	37	20,9 / 6,2	22 / n	1AN0A
21	45kDa Protein	Ratte	29	21,3 / 6,7	21 / n	CAA78041.1
23	Cdc42 Komplex (M)	Mensch	33	20,62 / 5,5	19 / n	1E0A

Mit Hilfe der bestimmten Peptidmassen (siehe Tabelle 19) konnten nach dieser Methode die Proteine Cdc42 und RhoA identifiziert werden, für die eine Interaktion mit SopE bereits mit Hilfe rekombinanter Proteine nachgewiesen worden war (Hardt et al., 1998a). RhoA wurde mehrfach bei unterschiedlichem Molekulargewicht und pI identifiziert, was darauf schließen läßt, daß RhoA in unterschiedlichen Modifikationen und/oder in verschiedenen Degradationsprodukten vorliegt. Hierüber könnten Versuche mit ESI-MS (Elektrospray Ionisationsmassenspektrometrie) Aufschluß geben. Neben Aktin und RhoB wurden auch Apolipoprotein (APO-A1) und Allograft inflammatory factor 1 (AIF-1) identifiziert, für die keine Beteiligung am zellulären Prozeß der Zytoskelettlagerung bekannt ist. Interessanterweise wurde auch die Rab GTPase Rab15 identifiziert, die beim Vesikeltransport als Gegenspieler zu Rab5 eine Rolle zu spielen scheint (Zuk und Elferink, 2000). Transfektionsvektoren für Rab15 sind inzwischen von mir konstruiert worden und stehen nun für die weitere Analyse der Funktion von Rab15 bei der *S. typhimurium* Infektion zur Verfügung.

Die NCBI Datenbanken enthält nicht alle Proteine von *Bos taurus*, was ein Grund sein kann, warum nicht alle aus dem 2D-Gel ausgeschnittenen Banden identifiziert werden konnten. Darüber hinaus waren die Proteinmengen bei einigen Banden für eine sinnvolle Messung zu gering.

4 Diskussion

Salmonella spp. verfügen über verschiedene Pathogenitätsfaktoren, die die Infektion und das Überleben im Wirt ermöglichen. Im frühen Stadium der Infektion vermitteln Pili, Flagellen und Fimbrien und eventuell auch LPS zunächst den ersten Kontakt mit der Wirtszelle. Nach der ersten Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle werden über den Typ III Sekretionsapparat, der auf SPI1 kodiert ist, Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle transloziert und führen durch gezielte Manipulation von Signaltransduktionswegen zur Adhäsion und Invasion in die Wirtszelle. Die Modulation der spezifischen zellulären Antwort im Wirt ist durch das Arsenal dieser Effektoren bestimmt. Der weitere Verlauf der Infektion wird von einem zweiten Typ III Sekretionssystem, kodiert auf der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 2 (SPI2), bestimmt. Dieses zweite Sekretionssystem vermittelt die Persistenz und Replikation von *S. typhimurium* während der systemischen Infektion.

4.1 Konservierung der homologen Effektorproteine SopE2 und SopE

Die Gattung *Salmonella* hat sich vor ca. 100 - 160 Millionen Jahren von *E. coli* getrennt (Li et al., 1995, Groisman und Ochman, 1996, Ochman und Groisman, 1996). Vor 50 - 100 Millionen Jahren wurde die *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (SPI1) erworben. Auf dieser Pathogenitätsinsel, kodiert bei Centisom 63, sind neben den Proteinen des Sekretionsapparats auch einige Effektorproteine kodiert (AvrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SptP). Das TSS1 vermittelt allerdings auch die Sekretion von außerhalb von SPI1 kodierten Effektorproteinen wie SopA, SopB, SopD, SopE, SopE2, SlrP und SspH1, SspH2 (zusammengefasst in Ehrbar et al., 2002, Zhou und Galan, 2001, Lostroh und Lee, 2001). Darüber hinaus wurde kürzlich ein Protein mit 41 % Homologie zu SopD identifiziert (Bakshi et al., 2000).

SPI1 (Ausnahme *avrA*) und die Effektoren *sopB* in SPI5 und *sopD* bei Centisom 64 sind hoch konserviert (Mirolid et al., 2001). In dieser Arbeit konnte ein weiteres in *S. enterica* Subspezies I hochkonserviertes Effektorprotein, SopE2, identifiziert und charakterisiert werden. SopE2 ist in allen Isolaten von *S. typhimurium*, die getestet wurden, vorhanden. Es ist außerhalb von SPI1 bei Centisom 40-42 lokalisiert und homolog zu dem Effektorprotein SopE. Der GC-Gehalt von *sopE2* ist mit ca. 42 % (*sopE* 40 %) wesentlich geringer als der des übrigen Chromosoms mit 52 %. In der Umgebung 15 kB stromaufwärts und stromabwärts von *sopE2* sind einige ORFs mit Ähnlichkeit zu anderen bakteriellen Proteinen zu finden. Im Gegensatz zu *sopE* ist *sopE2* allerdings nicht in einem induzierbaren Prophagen kodiert (siehe Tabelle 15 und Abb. 8). Daher kann *sopE2* nicht oder nicht mehr

durch lysogene Konversion transferiert werden. Die Integration der Effektoren SopE2 (sowie SopB und SopD) durch horizontalen Gentransfer hat wahrscheinlich ebenso wie die von SPI1 vor ca. 50 - 100 Millionen Jahren noch vor der Trennung in die Spezies *S. enterica* und *S. bongori* stattgefunden. Es ist unklar, ob diese Effektoren sukzessive oder gleichzeitig mit SPI1 erworben worden sind (Miroid et al., 2001).

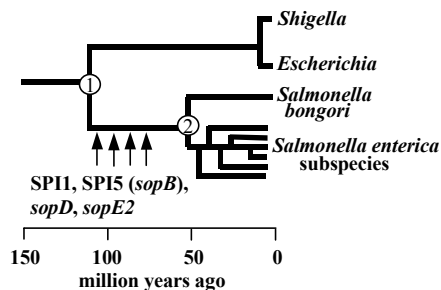


Abb. 30: Evolution von Invasionsfaktoren in *S. typhimurium* (nach Miroid et al., 2001).

Im Gegensatz dazu sind *sopE* und *avrA* nur in einigen *S. typhimurium*-Stämmen kodiert (diese Arbeit, Miroid et al., 2001). Innerhalb des Serovars Typhimurium wurde SopE2 von allen und SopE nur von einem von einundzwanzig Isolaten der SARA Kollektion sekretiert. Der relativ niedrige GC-Gehalt spricht dafür, daß auch *sopE* durch horizontalen Transfer erworben wurde.

In *S. typhimurium* ist das auf dem P2-ähnlichen SopE Φ Phagen kodierte *sopE* zu 70 % identisch mit *sopE2*. *SopE* kann durch lysogene Konversion auch heute noch mit Hilfe dieses Phagen transferiert werden (Miroid et al., 1999). *SopE* und *sopE2* könnten Varianten eines gemeinsamen Vorläuferproteins sein. Die geringe Prävalenz von *sopE* und die Kodierung auf einem lysogenen Phagen sprechen dafür, daß *sopE* durch Genduplizierung und anschließende Mutation aus *sopE2* hervorgegangen ist. Interessanterweise ist das *sopE* Gen mit besonders virulenten Epidemiestämmen wie den Isolaten DT49, DT204 und DT204c sowie einigen Isolaten von DT68 und DT175 assoziiert. Es könnte daher für eine erhöhte Virulenz verantwortlich sein.

Die Untersuchungen dieser Arbeit an der DNS von zwei *S. typhi*-Stämmen haben gezeigt, daß *sopE2* durch eine Deletion in Nukleotid 73 in diesen nicht funktionell war (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_typhi). Allerdings verfügten diese Stämme über ein intaktes *sopE* (Miroid et al., 1999). In *S. typhi* scheint daher *sopE* die Funktion von *sopE2* zu ersetzen. Ob beide Gene *sopE* und *sopE2* oder welches dieser beiden Gene exprimiert wird, könnte die Virulenz und die Zell- bzw. Wirtsspezifität eines Isolats oder Serovars mit bestimmen.

4.2 Invasivität

Wegen der hohen Homologie und der Präsenz von mindestens einem intakten SopE-ähnlichen Protein in *Salmonella* spp. wurde eine Redundanz in der Funktion dieser beiden Proteine vermutet. SopE ist ein G-Nukleotid-Austauschfaktor für Rho GTPasen und induziert Zytoskeletumlagerungen und Invasion von *S. typhimurium* in Epithelzellen (Hardt et al., 1998a). Die Invasionsrate einer *sopE* Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm um den Faktor 2 - 3 erniedrigt, aber im Vergleich zu einer sekretionsdefizienten Apparatsmutante, bei der das *invG* Gen deletiert wurde, noch ca. 500 Mal höher (Hardt et al., 1998a). Die Vermutung lag nahe, daß weitere über dieses Typ III Sekretionssystem translozierte Proteine an der Invasivität von *S. typhimurium* beteiligt sind.

Während die Inaktivierung von *sopE* einen geringen Effekt auf die Invasivität von *S. typhimurium* hat (2 - 3fache Attenuierung) und die Inaktivierung von *sopE2* alleine nahezu keinen Effekt hat, führt eine Doppelmutation in *sopE* und *sopE2* zu einer ca. 5-fach verringerten Invasivität in COS7-Zellen (siehe Abb. 17). Komplementation mit *sopE* oder *sopE2* exprimierenden Vektoren konnte die Invasionseffizienz rekonstituieren. Zum Teil war nach Komplementation die Invasivität sogar höher als bei Expression von chromosomal kodiertem SopE bzw. SopE2. Dies könnte auf die Kopienzahl (5-10/Zelle) des auf dem Komplementationsvektor kodierten SopE bzw. SopE2 zurückzuführen sein. Auch in der Vermittlung passiver Invasion der nicht-invasiven *invG* Mutante ist die *sopEsopE2* Doppelmutante gegenüber *S. typhimurium* SL1344 um das 5-6-fache attenuiert (siehe Abb. 24). Wie Transfektionsexperimente belegten, sind sowohl *sopE* als auch *sopE2* darüber hinaus hinreichend, die Internalisierung einer nicht-invasiven Mutante ($\Delta invG$) zu vermitteln.

SopE2 wird ebenso wie SopE sekretiert und in das Zytosol der Wirtszelle transloziert. Die Verteilung der translozierten SopE/E2 Proteine innerhalb der Wirtszelle ist allerdings unterschiedlich. Nach Infektion mit *S. typhimurium* SL1344 ist SopE2 gleichmäßig im Zytosol verteilt, während SopE lokal an den Stellen, wo Bakterien Kontakt mit der Wirtszelle haben oder bereits invadiert sind, detektiert werden kann. Im Gegensatz zu SopE kann SopE2 auch im Zellkern von COS7-Zellen detektiert werden (siehe Abb. 15). Die Menge translozierten Proteins, Unterschiede im Translokationssignal und/oder die Spezifität für Wirtsproteine können für die Virulenz von Bedeutung sein.

Eine *sopEsopE2* Doppelmutante (M202) ist in COS7-Epithelzellen immer noch ca. 100 Mal invasiver als die sekretionsdefiziente *invG* Mutante. Weitere Effektoren, die für die Translokation ebenfalls einen intakten Typ III Sekretionsapparat benötigen, sind demnach an der Invasivität in Epithelzellen beteiligt. Inzwischen wurde gezeigt, daß die

Inositolphosphatase SopB ebenfalls gemeinsam mit SopE und SopE2 zur Invasivität von *S. typhimurium* beiträgt (Miroid et al., 2001, Zhou et al., 2001). Des weiteren spielt SipA bei der Invasivität von *S. typhimurium* eine Rolle (Jepson et al., 2001). Eine *sipC* Mutante war ebenfalls in ihrer Fähigkeit attenuiert, Invasion und Membranausstülpungen zu induzieren (Kaniga et al., 1995a). SopE_{M45} und SopE2_{M45} werden bei Infektion mit einer *sipC* Mutante nicht transloziert (Hardt, unveröffentlichte Daten). Das liegt darin begründet, daß SipC für die Translokation anderer Effektorproteine des TSS1 notwendig ist (Collazo und Galan, 1997, Fu und Galan, 1998). Es ist daher bisher nicht möglich, in *S. typhimurium* aufzuklären, ob SipC selbst auch als Effektorprotein fungiert. Allerdings scheint eine solche mögliche Effektorfunktion von SipC eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Denn obwohl SipC bei Fehlen von SopE, SopE2 und SopB noch ins Zytosol gelangt, sind keine Membranausstülpungen mehr detektierbar, und die Invasivität ist stark herabgesetzt (Miroid et al., 2001, Zhou et al., 2001).

Wie die elektronenmikroskopischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, sind für die verbleibende Invasivität der *sopE**sopE2* Doppelmutante M202 keine ausgeprägten Membranausstülpungen notwendig. Die *sopE**sopE2* Doppelmutanten sind häufig in kleinen Einstülpungen der Wirtszellmembran lokalisiert und werden von diesen umschlossen. Dies ist bei der *invG* Mutante nicht zu beobachten. Möglicherweise induzieren von SopE und SopE2 verschiedene Effektorproteine (wie SopB, SipA, SipC und eventuell weitere Effektoren), die über das TSS1 sekretiert werden, Invasion über andere Mechanismen, die nicht mit starken Membranausstülpungen assoziiert sind. Mikroskopische Untersuchungen zeigten darüber hinaus häufig eine Lokalisation von *S. typhimurium* SL1344 und Mutanten in Vakuolen unterschiedlicher Größe. Solche Vakuolen ähneln stark den Makropinosomen, durch die extrazelluläre Substanzen und Flüssigkeit in hoher Frequenz unspezifisch oder rezeptorvermittelt z. B. in Enterocyten transportiert werden (Amyere et al., 2002, Swanson und Watts, 1995).

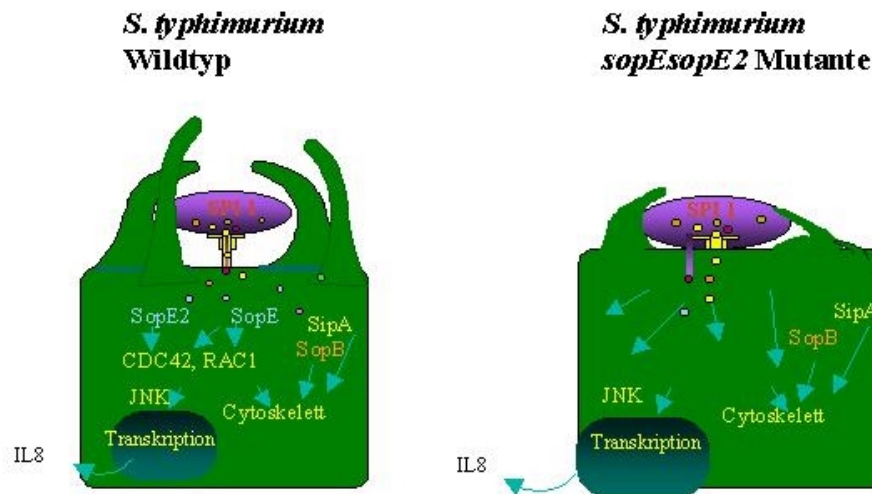


Abb. 31: Morphologische Unterschiede während der Invasion schematisch dargestellt.

Die Adhäsion von *sopEsopE2*-negativen *S. typhimurium* an die Wirtszellmembran ist durch das Fehlen von SopE und SopE2 nicht beeinträchtigt. Für die sekretionsdefiziente *invG* Mutante wurde dagegen gezeigt, daß die Fähigkeit zur Adhäsion gegenüber Wildtyp SL1344 ca. 35fach attenuiert ist (Clark et al., 1996). Andere Typ III sekretierte Effektorproteine tragen daher möglicherweise zur Adhärenz bei. Möglich wäre, daß nach der initialen Kontaktierung der Wirtszelle dieser Kontakt mit Hilfe von Typ III sekretierten Effektoren intensiviert wird. Eine solcher Mechanismus wurde für *E. coli* beschrieben (Finlay et al., 1996). Durch die konzertierte Aktion unterschiedlicher Mechanismen zur Vermittlung von Adhärenz und Invasion könnte *S. typhimurium* eine fein abgestimmte Modulation von Signalwegen z. B. als Anpassung an bestimmte Wirte erreichen.

Um *in vivo* die Relevanz von SopE und SopE2 für die Virulenz zu untersuchen, wurden Balb/c Mäuse mit Mutanten von *S. typhimurium* infiziert. Erste Versuche haben bei der *sopEsopE2* Mutante M202 gegenüber Wildtyp SL1344 eine um das bis zu 10fach erniedrigte Kolonisationsrate in der Milz gezeigt (siehe Abb. 18). Diese Attenuierung in der Infektiosität ist allerdings geringer als bei einer Apparatsmutante ($\Delta invA$). Bei Infektion mit einer solchen Apparatsmutante ist die Kolonisierung der Milz ca. 20 Mal niedriger und die LD_{50} gegenüber der von *S. typhimurium* Wildtyp ca. 50fach erhöht (Galan und Curtiss, 1989). Demnach sind neben SopE und SopE2 auch *in vivo* noch weitere über das TSS1 translozierte Effektorproteine (möglicherweise z. B. SopB und SipA) für die Invasivität von Bedeutung.

Im Gegensatz zur Infektion mit *S. typhimurium*-Stämmen mit einer Mutation in *invG* oder *invA* ist die Fähigkeit zur Besiedlung von Organen in einer oral applizierten Mutante, bei der SPI1 komplett deletiert ist, *in vivo* nicht herabgesetzt (Murray und Lee, 2000). Weitere nicht auf SPI1 kodierte Proteine könnten demzufolge *in vivo* an der Pathogenese beteiligt sein.

Man müßte dann aber postulieren, daß diese Virulenz durch SPI1 kodierte Proteine unterdrückt werden kann. Solche nicht auf SPI1 kodierten Virulenzfaktoren, könnten so die durch Mutationen in *sopE* und *sopE2* verursachte Invasionsdefizienz ausgleichen. Ob diese Theorie zutrifft, muß allerdings erst noch gezeigt werden.

Die Signifikanz des Unterschieds in der Invasivität von *S. typhimurium* Wildtyp und *sopE**sopE2* Mutante in Balb/c Mäusen war gering (siehe Abb. 18). Es ist allgemein schwierig, in Tierversuchen relativ geringe Virulenzunterschiede darzustellen, da die Auswirkungen einer Infektion bei verschiedenen Individuen häufig sehr variabel sind (Bäumler et al., 1997). Eine Erklärung hierfür könnten Unterschiede in der Zusammensetzung der Darmflora sein. Die Infektionsdosis kann durch Antibiotikabehandlung reduziert werden und die Reproduzierbarkeit der Versuche steigt (Murray und Lee, 2000). Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung *in vivo* ist die Untersuchung im *ligated ileal loop* Modell. Hierbei werden die Darmabschnitte gespült und mit einem definierten Bakterieninoculum versetzt. So werden ebenfalls sehr reproduzierbare Ergebnisse erzielt (Bolton et al., 1999). Diese Methode wird häufig an Rindern durchgeführt. Das Rindermodell hat außerdem den Vorteil, daß sich die Infektionen mit *S. typhimurium* in Rind und Mensch sehr ähneln. Möglicherweise könnte die Untersuchung in einem dieser Infektionsmodelle dazu beitragen, den Virulenzdefekt der *sopE**sopE2* Doppelmutante *in vivo* zu belegen.

4.3 Spezifität von SopE und SopE2 bei der Induktion von Signalwegen

Die Internalisierung von *S. typhimurium* kann durch Umlagerungen des Aktinzytoskeletts erreicht werden. Wird die Ausbildung dieser starken Membranausstülpungen beispielsweise durch Applikation des Zellgiftes Cytochalasin D unterbunden, kommt es nicht mehr zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts und Bakterien werden nicht mehr internalisiert. SipA und SipC können *in vitro* direkt an Aktin binden und damit Aktindepolymerisation verhindern, Aktinfilamente stabilisieren bzw. Aktin *de novo* polymerisieren (Hayward und Koronakis, 1999). In einer *sopE**sopE2* Doppelmutante reichen SipA und SipC allerdings nicht aus um deutliche Membranausstülpungen in COS7-Zellen zu induzieren, wie Immunfluoreszenzfärbungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten. Transloziertes oder nach Transfektion synthetisiertes SopE2 und SopE dagegen führen über die Aktivierung der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 zur Induktion von ausgeprägten Filopodien und Lamellipodien (diese Arbeit, Hardt et al., 1998a, Friebel et al., 2001).

Die hohe Sequenzhomologie von SopE2 gegenüber SopE, ließ vermuten, daß es sich bei SopE2 ebenfalls um einen G-Nukleotid-Austauschfaktor für Rho GTPasen handelt. Tatsächlich wurde festgestellt, daß der G-Nukleotid-Austausch an Cdc42 durch SopE2 und SopE *in vitro* gleichermaßen effizient ist (siehe Abb. 16). Diese Austauschaktivität von SopE an Cdc42 ist fast um das 10^5 -fache höher als bei der nicht-katalysierten Reaktion (Rudolph et al., 1999). Während der G-Nukleotid-Austausch an Rac1 durch SopE ähnlich effizient ist wie der an Cdc42, zeigt SopE2 eine sehr viel schwächere Austauschaktivität für Rac1 als für Cdc42 (Friebel et al., 2001).

Welche Relevanz hat diese Spezifität in der Induktion der zellulären Wirtsantwort?

Rac1 und Cdc42 fungieren als Schalter für die Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden, die u.a. zur Aktivierung von Aktinzytoskelettlagerungen führen können (Bishop und Hall, 2000). Eine morphologische Unterscheidung von Cdc42-induzierten Filopodien und Rac1-induzierten Lamellipodien wurde bereits beschrieben. Tatsächlich zeigten sich nach Infektion mit *sopE*- und *sopE2*-Mutanten Unterschiede in der Morphologie von SopE- respektive SopE2-vermittelten Membranasustülpungen in COS7-Zellen. Während SopE eher lokalisierte stark ausgeprägte Ausstülpungen induzierte, waren die durch SopE2 induzierten Umlagerungen diffuser über die Zelle verteilt (siehe Abb. 20). Eine deutliche morphologische Spezifizierung in Filopodien bzw. Lamellipodien war in COS7-Zellen jedoch nicht möglich. Darüber hinaus ließ sich nach Komplementation mit SopE oder SopE2 morphologisch kein Unterschied in der Form der Membranasustülpungen feststellen. Weiterführende Experimente von Andrea Friebel haben jedoch an COS7-Epithelzellen und HUVEC (Humane Nabelschnurzellen) gezeigt, daß Cdc42 durch SopE2 und SopE aktiviert wird, während die effektive Aktivierung von Rac1 nur durch SopE erreicht werden kann (Friebel et al., 2001). Infektionsversuche mit verschiedenen *S. typhimurium* Mutanten in HUVEC und NIH3T3 Zellen haben gezeigt, daß SopE2 im Gegensatz zu SopE fast keine Lamellipodien induziert (Friebel et al., 2001). Die schwache "Rest"-Induktion von Lamellipodien durch SopE2 ist wahrscheinlich auf die indirekte Aktivierung von Rac1 durch aktiviertes Cdc42 zurückzuführen. Eine solche indirekte Aktivierung von Rac1 und Rho durch Aktivierung von Cdc42 konnte zuvor bereits in Swiss 3T3 Zellen gezeigt werden (Nobes und Hall, 1995). Diese indirekte Aktivierung scheint in verschiedenen Gewebetypen unterschiedlich stark ausgeprägt zu sein, da die Induktion von Lamellipodien durch SopE2 in COS7-Zellen stärker ist als z. B. in NIH3T3 Fibroblasten (Friebel et al., 2001). Zelltypabhängige Unterschiede in der Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden wurden auch in anderen Zell-Linien beobachtet (Takai et al., 2001). Eine gewebespezifische Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden durch Cdc42 und Rac1 könnte daher zu einer unterschiedlichen Empfindlichkeit von verschiedenen Wirten und Organen führen.

SopE ist nur in wenigen *S. enterica* Stämmen kodiert. Daher kann die direkte Aktivierung von Rac1 nicht zwingend erforderlich sein. Sie steigert aber die Virulenz. Infektionsstudien mit Einzelmutanten, die nur eines der beiden SopE Proteine exprimierten, zeigten eine höhere Invasivität mit SopE als mit SopE2 (siehe Abb. 17). Grund hierfür mag sein, daß neben Cdc42 zusätzlich Rac1 aktiviert wird. Für die Infektiosität von *S. typhimurium* scheint dennoch Cdc42 eine größere Rolle als Rac1 zu spielen, da die Invasivität durch die dominant negative Mutante von Cdc42 stärker herabgesetzt ist als durch dominant negatives Rac1 (Chen et al., 1996). Neben der Verbreitung von SopE und SopE2 in verschiedenen *S. typhimurium*-Stämmen könnte daher die gewebespezifische Aktivierung von Rho GTPasen und die Substratspezifität von SopE und SopE2 die Virulenz von *S. typhimurium* beeinflussen.

Während SopE und SopE2 Rho GTPasen aktivieren und dadurch Umlagerungen des Aktinzytoskeletts und nukleäre Antworten hervorrufen, können diese Reaktionen durch das Effektorprotein SptP umgekehrt werden (Fu und Galan, 1998, Murli et al., 2001). SptP ist eine Tyrosinphosphatase und wirkt als GTPase aktivierendes Protein (GAP) auf Cdc42 und Rac1 (Kaniga et al., 1996, Stebbins und Galan, 2000). Damit rekonstituiert SptP als Gegenspieler zu den G-Nukleotid-Austauschfaktoren SopE und SopE2 den Ruhezustand der Zelle. Hiermit wird verhindert, daß die SopE- und SopE2-bedingten starken Veränderungen am Zytoskelett zur Zerstörung der Zelle führen. Die durch *S. typhimurium* vermittelte Zytotoxizität ist sowohl in Epithelzellen als auch in Makrophagen beobachtet worden. In Makrophagen vermittelt *S. typhimurium* auf unterschiedlichen Wegen Apoptose bzw. Nekrose (Knodler et al., 2001). Eine Vermutung, daß SopE und SopE2 auch bei der Zytotoxizität in Makrophagen eine Rolle spielen könnten, ließ sich allerdings in Zellkulturversuchen mit der Makrophagen Zell-Linie J774 nicht bestätigen. In diesen Zellen führen *S. typhimurium* Wildtyp und Mutante mit 100% gegenüber 86% fast mit gleicher Effektivität zum Zelltod (siehe Tabelle 16). Inzwischen wurde auch gezeigt, daß eine Mutation von *sopB* die Zytotoxizität von *S. typhimurium* in Makrophagen ebenfalls nicht herabsetzt (Ehrbar et al., 2002).

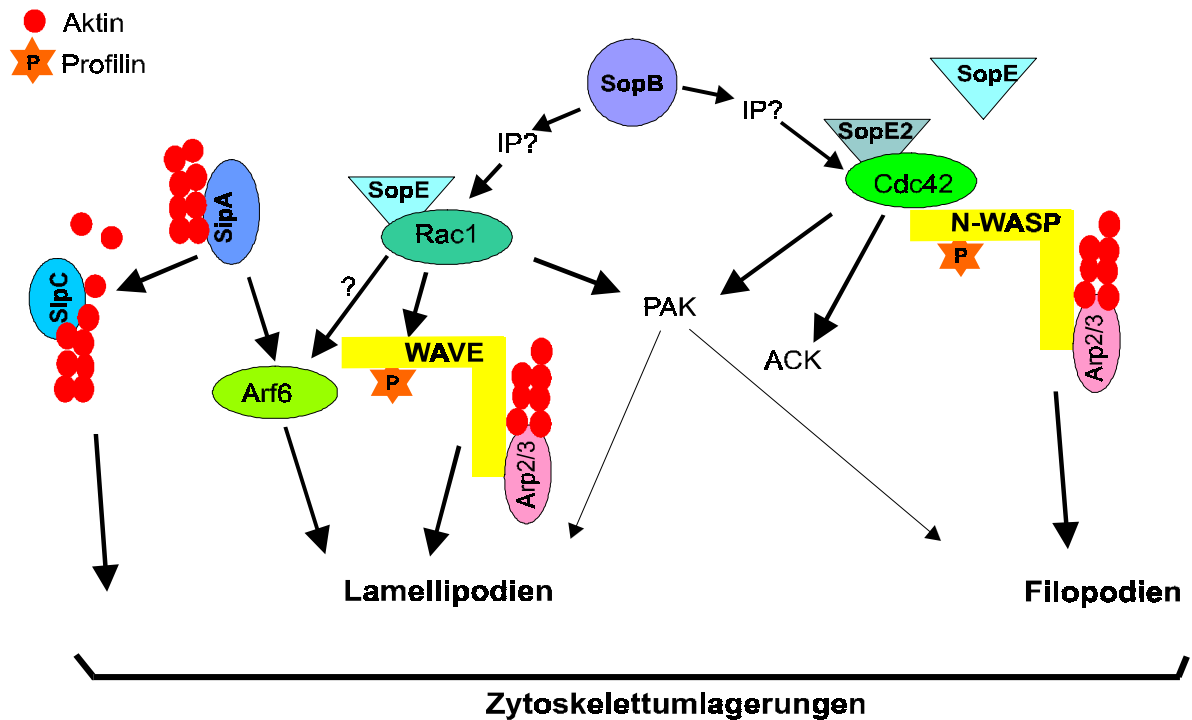


Abb. 32: Modell einiger von *S. typhimurium* induzierter Signaltransduktionswege.

Die unterschiedlichen Effektorproteine, die über das auf SPI1 kodierte Typ III Sekretionssystem in die Zelle transloziert worden sind, induzieren Zytoskelettlagerungen auf verschiedenen Wegen. Neben Zytoskelettlagerungen werden auch weitere Funktionen der Zelle aktiviert (siehe auch Tabelle 18).

Für die Aktivierung des Aktinzytoskeletts ist die Induktion des Aktin polymerisierenden Arp2/3 Komplexes notwendig. Dieser Arp2/3 Komplex kann durch zelluläre Regulatoren wie WASPs und auch durch Cortactin und möglicherweise Myosin I, sowie durch das bakterielle ActA von *L. monocytogenes* induziert werden. WASP und N-WASP haben ein sogenanntes CRIB (*Cdc42/Rac interaktiv binding*) Motiv am N-Terminus, an das aktiviertes Cdc42 bindet. Das aktivierte Cdc42 induziert strukturelle Änderungen am C-Terminus (CA-Region) seines Bindungspartners WASP bzw. N-WASP. In Folge der strukturellen Änderungen bindet die der CA-Region benachbarte V-Region von N-WASP (bzw. W-Region bei WASP) G-Aktin und die CA-Region bindet an die Arc-p21-Untereinheit des Arp2/3 Komplexes. Im Folgenden stimuliert der Arp2/3 Komplex die Polymerisation von Aktin. Die Aktinpolymerisationskinetik wird durch gleichzeitige Bindung von PI(4,5)P₂ stark beschleunigt. Auch für andere Signaltransduktionswege ist beschrieben, daß zusätzliche Faktoren (z. B. Profilin oder Cofilin) für eine optimale Aktivierung der von Cdc42- und Rac1-induzierten Signalwege notwendig sind (Rohatgi et al., 1999, Condeelis, 2001, Higgs und Pollard, 2001).

In Zusammenarbeit mit Dr. S. Linder und Prof. M. Äpfelbacher konnte in dieser Arbeit durch die Detektion der Arp2/3 Komplexe gezeigt werden, daß Arp2/3 ebenso wie Aktin nach Infektion mit SopE oder SopE2 sekretierenden *S. typhimurium* in diese Membranausstülpungen rekrutiert wird und mit Aktin ko-lokalisiert. Diese Rekrutierung von Arp2/3 unterbleibt bei Infektion mit einer *sopEsopE2* Doppelmutante fast vollständig. Auch die Expression von transfiziertem *sopE* oder *sopE2* war hinreichend, um eine solche Rekrutierung zu erreichen. Gleichzeitige Transfektion mit dominant negativem Cdc42 verhinderte ebenfalls die Rekrutierung der Arp2/3 Komplexe. Diese Daten belegen, daß SopE und SopE2 die Rho GTPase Cdc42 aktivieren und auf diesem Weg die Konformationsänderungen von N-WASP induzieren, die zur Rekrutierung der Arp2/3 Komplexe und in Folge zu Aktinpolymerisation führen. Interessanterweise induziert *R. conorii* die Polymerisation von Aktin nicht über N-WASP und Arp2/3, sondern über VASP und α -Actinin (Gouin et al., 1999). Ob ein solcher alternativer Weg für die Restinvasivität einer *sopEsopE2 S. typhimurium* Mutante verantwortlich sein könnte, bleibt noch zu untersuchen.

Cdc42 interagiert nicht nur mit N-WASP, sondern auch mit einer Vielzahl weiterer Proteine. So führt z. B. die Aktivierung von MRCK und PAK4 ebenfalls zur Induktion von Filopodien. Andere durch Cdc42 und Rac1 aktivierte Proteine sind an völlig anderen zellulären Signalwegen beteiligt (Bishop und Hall, 2000, siehe auch Tabelle 18). Durch diese Aktivierung von Signalproteinen könnten SopE und SopE2 potentiell eine Vielzahl von zellulären Antworten induzieren. Für SopE wurde z. B. gezeigt, daß die Aktivierung von PAK durch Cdc42 JNK aktiviert (Chen et al., 1999). Die Aktivierung von ACK, ebenfalls ein Protein mit einer CRIB Domäne, erfolgt auch während der Infektion mit *S. typhimurium* durch ein SPI1-abhängig sekretiertes Protein (Murli et al., 2001). SopE und SopE2 wären vielversprechende Kandidaten für die Aktivierung von ACK über den G-Nukleotid-Austausch an Cdc42. Interessanterweise zeigten die beiden Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 unterschiedliche Bindungsaffinitäten für die CRIB Domänen einiger Proteine, z. B. binden ACK Tyrosinkinase und WASPs mit höherer Affinität an Cdc42, während PAK mit Rac1 und Cdc42 gleich gut interagiert. Es ist insbesondere interessant, inwieweit SopE durch die spezifische Aktivierung von Rac1 Signaltransduktionskaskaden manipuliert. Ein durch Rac1 aktiviertes Protein ist das WASP ähnliche Protein WAVE. Die spezifische Induktion von Lamellipodien durch SopE geschieht daher möglicherweise auch durch Aktivierung von WAVE, das ebenfalls Arp2/3 Komplexe aktiviert.

Tabelle 18: Cdc42 und Rac1 aktivieren unterschiedliche Signale (nach Bishop und Hall, 2000).

Abkürzungen: ACK = *activated Cdc42 associated tyrosine kinase*, CIP-4 *Cdk interactin protein*, DAG = Diacylglycerolkinase, JNK = c-jun Kinase, MEKK = *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*, Mlk = *mixed-lineage kinase*, MRCK = *myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase*, PAK = p21-aktivierte Kinase, PA-Level = *phosphatic acid level*, PIP₂ = Phosphoinositoldiphosphat, PI3K = Phosphatidylinositide-3'-triol, PI-4-P5K = *Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase*, PLC = Phospholipase C, PLD = Phospholipase D, POR = *Partner of Rac*, IP₃ = Inositoltriphosphat, WASP = Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein, WAVE = *WASP-like verprolin-homologous protein*.

Cdc42 und Rac 1		Cdc42		Rac	
Zielprotein	beeinflusster Signalweg:	Zielprotein	beeinflusster Signalweg:	Zielprotein	beeinflusster Signalweg:
PAK 1,2,3	JNK/Aktin	WASP, N-WASP	Aktin Organisation	PI-4-P5K	PIP ₂ -Level
p70 S6 Kinase	Translations-regulation	PAK4	Aktin	DAG	PA-Level
Mlk2,3	JNK	ACK1,2	Unbekannt	WAVE/Scar	Aktin Organisation
MEKK1,4	JNK	MRCKa, b	Aktin	POSH	Unbekannt
PI3K	PIP ₃ -Level	MSE55, BORGs	Unbekannt	POR-1	Aktin Organisation
PLD	PA-Level	CIP-4	Unbekannt	p140Sra-1	Aktin Organisation
PLC-b2	DAG/IP ₃ -Level			p67 ^{phox}	NADPH Oxidase
IQGAP1,2	Aktin/Zell-Zell-Kontakt				

4.4 Weitere identifizierte Bindungspartner von SopE und SopE2

Um zu testen, ob SopE oder SopE2 an weiteren GTPasen G-Nukleotid-Austausch vermitteln oder mit anderen Proteinen interagieren kann, wurden zwei Ansätze verfolgt.

Zunächst wurden rekombinante Rab GTPasen als Substrat für SopE und SopE2 getestet. Rab GTPasen steuern den Vesikeltransport in der Zelle. Die Modifikation von vesikulären Transportwegen ermöglicht das Überleben von *S. typhimurium* in spezifischen Kompartimenten, die durch Rekrutierung von bestimmten Proteinen der degradative Prozessierung entgehen (Gorvel und Meresse, 2001). *S. typhimurium* verhindert die Fusion mit Lysosomen und vermehren sich in diesem modifizierten Kompartiment (Hashim et al.,

2000). Wie diese Vesikelreifung abläuft und ob SopE oder SopE2 hieran beteiligt sind, ist noch weitestgehend unklar. An den rekombinanten Rab GTPasen Rab4 und Rab5 konnte weder mit SopE noch mit SopE2 ein G-Nukleotid-Austausch detektiert werden (siehe Abb. 25). Die Frage, ob SopE oder SopE2 *in vivo* keine G-Nukleotid-Austauschfaktoren für diese Rab GTPasen darstellen, läßt sich allerdings mit diesen Versuchen nicht definitiv beantworten. Dagegen wurde von Mukherjee *et al.* SopE von *S. typhimurium* und *S. dublin* als Bindungspartner und G-Nukleotid-Austauschfaktor für Rab5 beschrieben (Mukherjee *et al.*, 2000, Mukherjee *et al.*, 2001). Eine *sopE* Mutante rekrutiert Rab5 nicht mehr und vermittelt auch keine Fusionen mit Endosomen (Mukherjee *et al.*, 2001). Eine Relevanz der Bindung von SopE an Rab5 für die Virulenz konnte allerdings auch von dieser Arbeitsgruppe bisher nicht dargestellt werden. In den Ergebnissen von Mukherjee und Kollegen ist zwar ein G-Nukleotid-Austausch gezeigt, aber es wurden weder eine Austauschkinetik gezeigt noch wurde die G-Nukleotid-Austauschfrequenz an Rab5 mit der an anderen GTPasen verglichen, so daß die Effizienz des Austausches an verschiedenen GTPasen nicht abschließend beurteilt werden kann. Möglicherweise läßt sich die G-Nukleotid-Austauschrate durch Optimierung der Versuchsbedingungen erhöhen. In *Salmonella* wurde darüber hinaus ein 50 kDa Protein isoliert, das an Rab5 bindet aber noch nicht näher identifiziert ist (Mukherjee *et al.*, 2001). Ob der G-Nukleotid-Austausch durch SopE alleine ausreicht, die Prozessierung des Phagosoms *in vivo* zu verändern, wurde ebenfalls noch nicht untersucht. Die Bindung von SopE an Rab5 allein könnte durch kompetitive Hemmung allerdings auch ausreichen die Signaltransduktion der Wirtszelle zu verändern. Für die Reifung der *Salmonella* enthaltenden Vakuole dürfte dies aber eine eher untergeordnete Rolle spielen. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, daß SPI1 für die Maturation der *Salmonella* enthaltenden Phagosomen keine zentrale Rolle spielt (Rathman *et al.*, 1997).

Für SopE wurde außerdem eine Aktivierung der Rho GTPasen RhoG und in geringem Maße von RhoA, nicht aber von RhoB, RhoC, TC21, Ran und Ha-Ras nachgewiesen (Hardt *et al.*, 1998a). Durch MALDI Massenspektrometrie und durch anschließende Datenbanksuche wurden die in der Affinitätschromatographie an SopE2 gebundenen Proteine RhoA, Rab15, Allograft inflammatory factor 1 (AIF 1), Apolipoprotein A-1 (Apo A-1), Aktin und auch Cdc42 aus *Bos taurus* identifiziert (siehe Tabelle 17). Die Spezifität dieser direkten oder indirekten Interaktionen und mögliche Funktionen sollten detaillierter untersucht werden. Apolipoproteine und Aktin werden häufig bei affinitätschromatographischen Versuchen identifiziert und ob eine Ko-Lokalisation von SopE2 mit diesen Proteine spezifisch ist, muß erst überprüft werden. Im folgenden Abschnitt werden die in der Literatur beschriebenen Funktionen der identifizierten Proteine beschrieben und wenn möglich in Zusammenhang mit einer potentiellen Wirkung in einer bakteriellen Infektion diskutiert.

RhoA und Rab15 sind kleine GTPasen. Interessanterweise wurden verschiedene Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht und pI als RhoA identifiziert. Wahrscheinlich handelt es sich um unterschiedlich modifiziertes RhoA oder um Degradationsprodukte von RhoA. RhoA ist eine Rho GTPase, die die Bildung von Stressfasern (Ridley 1997). Die Rab GTPase Rab15 ist mit frühen Endosomen assoziiert und inhibiert die Endozytose und die frühe homotypische Endosomenfusion, die z. B. durch Rab5 vermittelt wird (Zuk und Elferink, 2000). Erste Versuche deuten auf eine verminderte Replikationsfähigkeit von *S. typhimurium* und ein besseres Überleben der Zellen in rab15 (über-)exprimierenden Zellen hin. Diese Ergebnisse müssen allerdings noch in weiteren Experimenten bestätigt werden.

Apolipoprotein A-1 ist der Hauptbestandteil von *High density lipoprotein (HDL)*, das den zellulären Cholesterin-Efflux vermittelt, Lipide bindet und Lecithin Cholesterin Acyltransferase (LCAT) aktiviert. Gereiftes HDL interagiert mit spezifischen Rezeptoren und Lipid Transferproteinen (Frank und Marcel, 2000). Die Einlagerung von Cholesterin ermöglicht eine Deformierbarkeit der Membran, eine Voraussetzung für Phagozytose und Makropinozytose (Amyere et al., 2002).

Für die Invasion von Mykobakterien, nicht aber für die von *S. typhimurium*, in Makrophagen ist Cholesterin erforderlich (Gatfield und Pieters, 2000). Kürzlich konnte dagegen gezeigt werden, daß in HeLa-Epithelzellen und NIH3T3 Fibroblasten die Invasion, nicht aber die Adhärenz von *S. typhimurium* durch Entzug von Cholesterin verhindert werden kann (Garner et al., 2002). Die Rekrutierung von Cholesterin zu invadierenden *S. typhimurium* wird durch das Typ III Sekretionssystem vermittelt, daß auf SPI1 kodiert ist (Garner et al., 2002). Unter Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium wird Apolipoprotein A1 endozytotisch aufgenommen und anschließend resekretiert (Takahashi und Smith, 1999). Möglicherweise könnte SopE2 demzufolge nicht nur extrazellulär sondern auch intrazellulär mit Apo A-1 in Kontakt treten. Der durch Apo A-1 vermittelte Cholesterin Efflux ist in Zellen, die dominant negatives Cdc42 exprimieren, reduziert und bei Expression von konstitutiv aktivem Cdc42 erhöht (Hirano et al., 2000). Ob und welcher Zusammenhang zwischen der Rekrutierung von Cdc42 durch SopE und SopE2 und dem Cholesterintransfer durch Apo A-1 besteht, muß jedoch noch eingehend untersucht werden. Eine Modifikation (ADP-Ribosylierung) von APO A-1 durch das Protein ExoS wurde bei Infektion mit *P. aeruginosa* detektiert. ExoS wird ebenfalls mit Hilfe eines Typ III Sekretionssystems sekretiert (Knight und Barbieri, 1997).

Allograft inflammatory factor 1(AIF-1)

AIF-1 wurde als hochkonserviertes Kalzium bindendes Protein beschrieben und ist wahrscheinlich identisch mit den Proteinen Iba-1 (*ionized Ca²⁺-binding adapter*), MRF-1 (*microglia response factor*) und Daintain (Deiningner et al., 2002). Ausschüttung von zytosolischem Kalzium spielt in vielen Signalprozessen eine Rolle, insbesondere der Regulation Aktin bindender Proteine und der Aktivierung von Proteinkinasen und Phosphatasen, die zur Ausbildung von Membranaustülpungen führen können (Hartwig und Yin, 1988, Stossel, 1993).

Tatsächlich zieht die Stimulation mit M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) bereits ca. 5 min später eine spezifisch Ko-Lokalisation von Iba1 mit Rac1, nicht aber mit Cdc42 und RhoA, und eine Bindung an F-Aktin in den Membranaustülpungen nach sich (Ohsawa et al., 2000, Sasaki et al., 2001). Die Aktivierung von Rac1 wird hierbei, wenn Iba-1 präsent ist, über einen PLC- γ -abhängigen Signalweg induziert (Kanazawa et al., 2002). Auch die Invasion von *S. typhimurium* geht mit einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration einher, deren Ausschüttung möglicherweise durch Phosphoinositole induziert wird (Bliska und Galan, 1993, Pace et al., 1993, Eckmann et al., 1997).

Es bleibt die Frage, inwieweit und durch welche Effektoren *Salmonella* spp. diesen Signalweg während der Invasion nutzen. Wahrscheinlicher als eine direkte Bindung von SopE2 an AIF-1 ist in diesem Zusammenhang die Bildung eines Komplexes von SopE2 z. B. mit Cdc42, mit dem auch andere Proteine, wie Aktin und Apolipoprotein interagieren können. Die Untersuchung dieser isolierten Proteine sollte Aufschluß über die Manipulation von Signalwegen und deren Verknüpfung geben können.

4.5 *S. typhimurium* induziert die Rekrutierung von Arf6-Vesikeln

Arf6 ist eine kleine GTPase der Arf-Familie, die ähnlich wie Rab GTPasen den Vesikeltransport regulieren. Arf6 ist am Recycling von endosomalen Vesikeln beteiligt und reguliert die rezeptorvermittelte Endozytose. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß Arf6 in polarisierten Epithelzellen apikal und auf frühen Endosomen zu finden ist. Arf6 induziert entweder gemeinsam oder in Folge der Aktivierung von Rac1 Zytoskeletumlagerungen, die zur Ausbildung von Lamellipodien führen (Chavrier und Goud, 1999, Takai et al., 2001). Invadierte *S. typhimurium* SL1344 induzieren in COS7-Epithelzellen die Rekrutierung von Arf6-Vesikeln in Membranausstülpungen bzw. in die Nähe von Bakterien. Dagegen ist die Invasivität von *S. typhimurium* durch Mutationen in Arf6 nicht beeinflusst (siehe Abb. 26 und Abb. 27). Diese Beobachtungen wurden in polarisierten Zellen bestätigt (Criss et al., 2001). Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß invadierte *S. typhimurium* zu einem hohen Prozentsatz mit Arf6-Wildtyp assoziiert sind,

nicht aber mit dominant negativem Arf6. Für die dominant negative Mutante wurde bereits früher beschrieben, daß sie nicht mehr vom tubulären endosomalen Kompartiment zum Periplasma transportiert wird und das Recycling von internalisierter Membran und von Rac1 inhibiert (Radhakrishna et al., 1999).

Inwieweit SopE und SopE2 an der Rekrutierung von Arf6-Vesikeln beteiligt sind, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Inzwischen wurde postuliert, daß SipA (ein TSS1-sekretiertes Protein) indirekt über die Rekrutierung des zellulären G-Nukleotid-Austauschfaktors ARNO, der Arf6 aktivieren kann, die Bildung von Arf6-Vesikeln induziert (Criss et al., 2001). Ein direkter Nachweis für eine solche Bindung liegt allerdings nicht vor. Ein durch die Vermittlung von SopE oder SopE2 passiv internalisierter sekretionsdefizienter Stamm rekrutiert ebenfalls noch Arf6-Vesikel. Demzufolge ist für die Vesikelrekrutierung in diesem Fall nicht SipA verantwortlich. Möglicherweise lösen auch hier verschiedene Virulenzfaktoren eine ähnliche Wirtszellantwort aus.

Die hier dargestellten Untersuchungen zeigen, daß SopE2 ein wichtiger hochkonservierter Virulenzfaktor ist. Dieses sekretierte Effektorprotein induziert die Invasion von *S. typhimurium* in die Wirtszelle über die Restrukturierung des Zytoskeletts durch Aktivierung des Cdc42-Arp2/3-Aktin Signalweges. Darüber hinaus hat SopE2 möglicherweise Bedeutung für die Aktivierung weiterer Signalwege.

5 Zusammenfassung

Die *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (SPI1) kodiert für einen Typ III Sekretionsapparat, über den Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle transloziert werden und dort zentrale Virulenzeigenschaften vermitteln. Einige dieser Effektoren, wie z. B. SopE, ermöglichen in der frühen Infektionsphase die Invasion in nicht-phagozytierende Zellen (Hardt et al., 1998a).

In dieser Arbeit wurde SopE2, ein weiteres TSS1-transloziertes Effektorprotein identifiziert, das zu 70% mit SopE identisch ist. Im Gegensatz zu SopE, das nur in wenigen *Salmonella*-Isolaten kodiert war, konnte SopE2 in allen untersuchten Isolaten nachgewiesen werden. Daher ist anzunehmen, daß es sich bei SopE2 um einen basalen Virulenzfaktor von *Salmonella* spp. handelt, dessen Wirkung durch SopE synergistisch ergänzt werden kann.

SopE2 ist ein G-Nukleotid-Austauschfaktor für die Rho GTPase Cdc42, ein zentraler Regulator zellulärer Signaltransduktionswege. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sowohl die SopE2- als auch die SopE-abhängige Aktivierung von Cdc42 über die Rekrutierung der Arp2/3 Komplexe zu Umlagerungen des Aktinzytoskeletts und damit zur effizienten Formation von Membranausstülpungen und Invasion führt. Aufgrund der zentralen Bedeutung von Cdc42 für eine Vielzahl zellulärer Signalwege läßt sich vermuten, daß *Salmonella* spp. mit Hilfe dieser Virulenzfaktoren neben der Umlagerung des Aktinzytoskeletts auch noch weitere Veränderungen in der Wirtszelle hervorrufen.

Als weitere SopE2-bindende Proteine konnten mittels Affinitätschromatographie, 2D-Gel-Analyse und anschließender massenspektrometrischer Bestimmung die Rho GTPasen Rac1 und RhoA identifiziert werden. Darüber hinaus wurde Rab15 identifiziert, eine den Vesikeltransport steuernde Rab GTPase. Darüber hinaus konnte in Transfektionsexperimenten gezeigt werden, daß invadierte *S. typhimurium* in ihrer Umgebung Arf6-Vesikel akkumulieren. Ob SopE bzw. SopE2 direkt daran beteiligt sind oder ob diese Rekrutierung indirekt in Folge der Invasion zustande kommt, ist noch unklar.

Zusätzlich wurden Proteine identifiziert, bei denen es sich nicht um GTPasen handelt: Das Kalzium bindende Protein Allograft inflammatory factor 1 (AIF), das wahrscheinlich bei der Regulation von Aktin eine Rolle spielt und das Cholesterin bindende Apolipoprotein A-1 (APO-A1). Die Identifikation dieser im Komplex mit SopE2 gebundenen Proteine bietet die Möglichkeit in Zukunft weitere Funktionen von SopE2 zu ermitteln.

6 Anhang

6.1 Peptidmassen aus MALDI-MS

In Tabelle 19 sind die Peptidmassen, die durch MALDI-MS identifiziert wurden, von den in Abb. 29 dargestellten Proteinen aufgelistet.

Tabelle 19: Peptidmassen der durch MALDI Massenspektrometrie analysierte trypsinverdauten Proteine. Die Banden 1-3 stammen aus der Analyse der unlöslichen Fraktion, die Banden 4-23 aus der löslichen Fraktion. Die Banden 2, 5, 7 und 12 wurden von der Firma Toplab (München) analysiert. Die übrigen Banden wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Deiwick untersucht. Geräte wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Jungblut am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Berlin) zur Verfügung gestellt.

Bande 1			Bande 2			Bande 3		
Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	nicht auswertbar		
532,086	0	M	658,464	3608	M			
568,119	7124	M	674,391	5336	M			
946,577	0	M	758,537	25501	M			
956,595	12412	M	796,499	3623	M			
1043,614	6586	M	841,665	16131	M			
1166,783	0	M	963,673	3570	M			
1172,696	9144	M	981,655	50922	M			
1181,697	11176	M	997,629	6758	M			
1192,700	7884	M	1019,616	2140	M			
1215,800	7114	M	1044,739	3466	M			
1253,829	10062	M	1101,759	2426	M			
1266,775	0	M	1178,82	2282	M			
1280,808	6876	M	1275,767	3374	M			
1294,723	0	M	1346,79	16330	M			
1311,754	0	M	1363,221	16470	A			
1344,794	9544	M	1385,236	8886	A			
1350,858	0	M	1426,949	3148	M			
1384,686	0	M	1475,453	12595	A			
1392,88	8648	M	1621,096	4260	M			
1400,909	7628	M	1632,161	1710	M			
1409,845	9052	M	1750,236	876	M			
1427,826	9340	M	1818,785	4367	A			
1451,787	6948	M	1852,163	2180	M			
1480,988	0	M	1991,116	15865	M			
1494,939	8862	M	2008,134	80258	M			
1508,036	0	M	2030	2372	M			
1516,905	15558	M	2044,277	2085	M			
1523,86	8890	M	2210,3	5134	M			
1537,895	12244	M	2225,595	3479	A			
1549,022	0	M	2282,442	3685	M			
1554,904	7618	M	2307,515	375	M			
1564,936	0	M	2540,64	1405	A			

1622,913	10532	M	2772,545	8614	M						
1628,923	7650	M	2809,559	504	M						
1636,878	7124	M	2824,932	304	M						
1677,841	0	M	3088,302	554	A						
1700,891	0	M	3099,057	477	A						
1712,037	9584	M	3324,909	1669	A						
1744,938	9624	M	3337,91	523	M						
1863,911	7906	M	3408,1	337	M						
1872,857	15052	M	3428,298	670	A						
1904,864	0	M	3480,035	6603	A						
2009,926	29354	A	3541,586	156	M						
2107,128	7700	M									
2116,308	26226	A									
2199,293	6626	M									
2812,968	20922	A									
Bande 4			Bande 5			Bande 6			Bande 7		
Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ
524,083	5741	M	659,36958			568,119	1682	M	659,37729		
541,134	0	M	675,26923			623,991	0	M	666,49686		
550,124	0	M	759,37004			662,005	1421	M	675,32824		
568,119	6359	M	842,51			1179,675	1355	M	682,45884		
587,199	0	M	856,45853			1306,68	0	M	720,38071		
624,09	2172	M	864,48689			1475,705	0	M	780,50572		
668,075	0	M	870,55163			1489,619	0	M	795,55269		
891,166	1219	M	880,45365			1515,738	2922	M	800,60001		
1158,386	795	M	982,45582			1790,806	2484	M	817,51374		
1192,7	0	M	998,42623			1837,793	1380	M	833,48861		
1197,945	0	M	1045,5475			1960,865	0	M	842,57938		
1198,858	0	M	1102,5346			1993,964	1745	M	880,48822		
1199,783	0	M	1347,6026			2211,11	0	M	890,6229		
1291,413	0	M	1363,6154			2255,072	0	M	905,50834		
1501,809	2896	M	1385,6181			2264,691	0	M	923,65116		
1515,857	3100	M	1621,8863			2283,149	2183	M	945,65234		
1608,751	745	M	1899,087			2706,268	0	M	967,61484		
1954,133	0	M	1991,9085			3184,911	0	A	983,58676		
1974,963	0	M	2008,9074						998,56637		
1977,046	976	M	2211,105						1014,5586		
2211,11	2511	M	2225,1127						1036,555		
2226,321	3273	A	2283,2163						1052,4925		
2283,144	0	M	2284,159						1130,6616		
2781,157	2410	A	2773,3745						1132,647		
3185,996	2666	A							1161,7184		
3198,198	2975	A							1177,6971		
3214,074	2074	A							1198,8278		
3860,515	1396	A							1215,6583		
5470,1	1659	A							1225,6035		
5560,21	2467	A							1499,8537		
									1501,8853		
									1515,9184		

									1531,938		
									1553,8378		
									1791,0773		
									1828,9958		
									1954,2254		
									1977,0606		
									1992,153		
									2215,2789		
									2231,2877		
									2730,5161		
									3183,9205		
Bande 8			Bande 9			Bande 10			Bande 11		
Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ
568,119	19286	M	550,098	6097	M	568,119	8282	M	nicht auswertbar		
684,026	11884	M	568,119	5542	M	585,171	5694	M			
1198,778	10202	M	612,172	0	M	587,202	5048	M			
1501,792	12604	M	624,153	0	M	612,249	0	M			
1515,771	43668	M	628,096	0	M	624,123	6710	M			
1790,824	31670	M	662,019	0	M	635,25	0	M			
1954,033	10278	M	1179,296	0	M	636,24	0	M			
1960,782	9882	M	1306,424	0	M	733,343	4695	M			
2214,834	17732	M	1475,402	4605	M	1179,984	4620	M			
2383,886	9386	M	1501,291	3395	M	1278,111	6791	M			
3184,958	30092	A	1707,188	3345	M	1476,786	16855	A			
			1850,89	2792	M	1516,219	4340	M			
			1956,351	0	M	1709,298	5309	M			
			2209,877	3480	M	1764,358	5584	M			
			2281,988	2917	M	1791,423	5404	M			
			2382,663	3653	M	1797,529	4588	M			
			2705,553	10389	A	1891,3	5824	M			
			2715,177	3881	M	1994,68	14905	M			
						2009,598	6045	M			
						2150,772	0	M			
						2368,006	6255	M			
						2873,993	6367	M			
						3053,425	4342	M			
Bande 12			Bande 13			Bande 14			Bande 15		
Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ
			568,12	20730	M	524,098	29506	M	524,098	16008	M
			679,459	15460	M	568,12	27476	M	550,098	13884	M
			687,337	0	M	679,441	23218	M	568,119	27500	M
			725,306	0	M	842,509	18090	M	587,107	9652	M
			745,27	0	M	945,519	21272	M	626,165	7848	M
			1017,567	11178	M	998,37	13708	M	1036,581	7952	M
			1026,691	11148	M	1037,575	14608	M	1475,977	6706	M
			1039,511	10506	M	1074,453	14450	M	2211,109	11778	M
			1042,554	0	M	1130,551	0	M	2284,041	5802	M
			1165,626	0	M	1157,693	0	M	2704,882	5786	M
			1260,606	28108	M	1164,568	0	M			

			1288,606	10350	M	1179,562	21642	M			
			1292,643	9372	M	1193,549	14448	M			
			1305,679	13462	M	1198,696	28478	M			
			1320,679	0	M	1235,633	13618	M			
			1336,927	0	M	1300,67	0	M			
			1388,675	0	M	1307,67	12554	M			
			1420,113	0	A	1320,584	16354	M			
			1475,728	0	M	1383,702	0	M			
			1492,695	0	M	1434,67	0	M			
			1503,368	0	A	1475,663	0	M			
			1515,66	0	M	1493,712	0	M			
			1621,439	0	A	1501,721	15544	M			
			1707,654	8132	M	1515,676	17326	M			
			1790,712	0	M	1707,681	15312	M			
			1932,685	6984	M	1790,75	52642	M			
			2008,854	0	M	1953,992	0	M			
			2211,11	0	M	2212,234	28548	A			
						2383,799	14602	M			
						2716,993	0	M			
						3314,163	23448	A			
Bande 16			Bande 17			Bande 18			Bande 19		
Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ
			522,101	23880	M	634,239	0	M	550,096	8554	M
			524,132	18422	M	647,101	0	M	568,12	12562	M
			549,207	0	M	1036,564	14470	M	587,157	0	M
			563,307	0	M	1165,539	11576	M	611,169	0	M
			568,119	22512	M	1179,537	22258	M	624,07	8446	M
			587,138	0	M	1193,527	12056	M	672,241	0	M
			612,225	0	M	1234,609	14268	M	697,225	0	M
			624,088	0	M	1246,333	0	M	705,268	0	M
			679,541	13126	M	1263,59	0	M	1132,583	7342	M
			687,357	12946	M	1277,605	19212	M	1320,69	0	M
			830,458	0	M	1285,677	0	M	1474,854	0	M
			842,51	10966	M	1300,562	15320	M	1475,847	0	M
			1056,573	0	M	1307,655	21212	M	1499,717	7476	M
			1137,64	10684	M	1320,566	21038	M	1515,696	0	M
			1179,579	11152	M	1357,676	0	M	1516,817	8152	M
			1234,66	0	M	1365,607	0	M	1707,812	7134	M
			1251,743	0	M	1383,769	0	M	1716,93	0	M
			1267,742	12050	M	1434,718	0	M	1772,858	13970	M
			1277,67	0	M	1458,844	0	M	1790,798	42112	M
			1283,663	0	M	1475,687	0	M	1804,778	0	M
			1307,716	11858	M	1493,665	0	M	1838,892	0	M
			1320,636	8930	M	1515,61	27752	M	1993,952	6456	M
			1382,783	0	M	1584,733	12100	M	2168,687	9076	M
			1475,803	12586	M	1699,701	12670	M	2211,109	10800	M
			1573,836	10442	M	1707,591	70220	M	2224,94	0	M
			1638,956	0	M	1716,698	21710	M	2231,123	9938	M
			1707,791	10146	M	1741,642	0	M	2383,782	6832	M

			1728,866	9590	M	1791,801	77678	A	2746,241	6226	M
			1759,952	11960	M	1839,17	0	A	3137,952	23106	A
			1790,877	0	M	1890,63	37758	A	3184,409	0	A
			1837,876	0	M	1908,893	40530	A	3200,957	0	A
			1850,931	0	M	1953,718	0	M			
			2211,11	0	M	1960,8	0	M			
			2223,068	6904	M	1994,525	215064	A			
			2283,423	0	M	2212,101	48490	A			
						2286,412	0	A			
						2367,682	74352	A			
						2384,668	182404	A			
						2510,834	44514	A			
						2705,756	82950	A			
						2717,858	98422	A			
						2830,49	9216	M			
						2873,311	71616	A			
						2896,105	0	M			
						2903,159	0	M			
						3053,161	37896	A			
						3097,959	22100	A			
						3224,361	25770	A			
						3265,512	27050	A			
						3313,076	70694	A			
						3732,958	22286	A			
						4973,749	22916	A			
Bande 20			Bande 21			Bande 22			Bande 23		
Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ	Masse	Intensität	Typ
522,108	11598	M	524,087	12106	M	568,12	6450	M	522,108	7604	M
524,091	10024	M	568,119	15944	M	597,221	0	M	524,093	9161	M
568,119	10350	M	591,166	0	M	603,208	0	M	568,119	13746	M
587,1	0	M	603,155	0	M	624,099	0	M	610,194	0	M
590,09	0	M	612,244	0	M	679,586	5210	M	624,074	0	M
612,141	0	M	624,109	9336	M	1130,621	0	M	921,337	3414	M
624,062	0	M	650,052	6638	M	1260,708	4758	M	1417,871	4790	M
650,046	7436	M	656,078	0	M	1455,672	0	M	1430,048	0	M
666,052	6680	M	668,029	7534	M	1473,014	0	M	1454,829	3755	M
679,125	0	M	684,033	7458	M	1501,836	9320	M	1472,986	10835	M
684,042	0	M	791,268	0	M	1515,854	8818	M	1536,907	3381	M
788,181	0	M	873,068	0	M	1700,868	0	M	1852,969	0	M
807,269	0	M	879,105	0	M	1853,844	5240	M	2211,11	0	M
855,041	5792	M	881,275	0	M	1954,117	0	M	2225,155	0	M
877,09	5964	M	893,005	0	M	1960,96	0	M	2284,247	4383	M
891,042	0	M	895,111	6582	M	1974,919	4496	M	2358,353	3248	M
1256,558	0	M	1130,617	5504	M	2211,109	5048	M	2385,015	12013	A
1417,706	0	M	1171,602	0	M	2283,275	0	M	2706,031	0	A
1472,893	0	M	1179,617	0	M				2718,12	0	A
1515,763	5974	M	1260,711	0	M						
1567,74	0	M	1277,803	5250	M						
1700,912	0	M	1346,535	0	M						

1790,83	8574	M	1379,818	0	M						
1852,821	10182	M	1475,769	0	M						
1867,856	0	M	1501,762	8614	M						
1874,769	5348	M	1515,79	11536	M						
2211,11	7254	M	1638,831	0	M						
2283,433	0	M	1706,789	0	M						
2317,122	0	M	1790,829	26172	M						
2358,314	0	M	1803,838	0	M						
2707,277	0	A	1805,843	0	M						
			1831,67	0	M						
			1838,618	0	M						
			1851,785	5690	M						
			1891,712	0	M						
			1954,088	8264	M						
			1960,933	0	M						
			1975,019	0	M						
			1991,95	0	M						
			2211,11	12158	M						
			2225,088	0	M						
			2284,068	6262	M						
			2383,834	0	M						
			2706,007	4994	M						

6.2 *Salmonella* spp. Referenzsammlungen

Trennung verschiedener Stämme der Gattung *Salomonella* in elektrophoretische Typen durch Multi-Lokus-Enzym-Elektrophorese (MLEE). Alle Tabellen (Tabellen 20, 21 und 22) hierzu wurden aus den entsprechenden Veröffentlichungen übernommen.

Tabelle 20: Stämme der *Salmonella reference collection A* (SARA).

Aus der Subspezies I von *S. enterica* sind 5 verschiedene Serovare aus der nahen Verwandtschaft von Typhimurium mit 72 Isolaten in 48 elektrophoretische Typen (ET) unterteilt worden (Tabelle aus Beltran et al., 1991). (a) Einteilung in Serotypen entsprechend der O:H1:H2 Antigenfaktoren: *S. typhimurium*: (1,4,[5],12:i:1,2); *S. saintpaul*: (1,4,[5],12:e,h:1,2); *S. heidelberg* : (1,4,[5],12:r:1,2); *S. paratyphi B* (inklusive *S. java*): (1,4,[5],12:b:[1,2]); *S. muenchen*: (6,8:d:1,2). Genauere Beschreibungen sind in der Veröffentlichung von Le Minor zu finden (Le Minor 1984), *Salmonella* Lignières 1900, 389 in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1, pp.427-458). (b) Abkürzungen: ATCC = *American Type Culture Collection*, Cdc = *Centers for Disease Control* (Atlanta, Georgia, USA); DMS = *University of Dundee Medical School (Ruth Barker collection)*(Dundee, UK); INSP = *Instituto Nacional de Salud Publica* (Cuernavaca, Mexiko); IP = *Institut Pasteur* (Paris, Frankreich); IVB = *Institut für Veterinärmedizin des Bundesgesundheitsamtes* (Berlin, Deutschland); NVSL = *National Veterinary Services Laboratories* (Ames, Iowa, USA); USFW = *United States Fish and Wildlife collection* (Ruth Duncan collection)(Madison, Wisconsin, USA). (c) Genauere Beschreibung in Beltran, P. et al., 1991, J. Gen. Microbiol. 137:601-606.

SARA Nr.	RKS Nr.	SGSC Nr.	Serotyp ^(a)	ET	Original Nummer ^(b)	Wirt	Herkunftsland	Biotyp ^(c)	Jahr
1	284	2181	<i>S. typhimurium</i>	Tm 1	INSP 24	Mensch	Mexiko	1 f	-
2	4939	2182	<i>S. typhimurium</i>	Tm 1	LT2	-	Labor Stamm	-	-
3	145	2183	<i>S. typhimurium</i>	Tm 1	NVSL 7095	Pferd	Rhode Island	11 di	1987
4	183	2184	<i>S. typhimurium</i>	Tm 1	NVSL 5820	Kaninchen	Indiana	25 e	1986
5	810	2185	<i>S. typhimurium</i>	Tm 1	IVB 232	-	Mongolia	9 fi	-
6	345	2186	<i>S. typhimurium</i>	Tm 2	CDC B1213	Mensch	Ohio	17 a	-
7	821	2187	<i>S. typhimurium</i>	Tm 3	IVB 665/81	-	Norwegen	1a	-
8	811	2188	<i>S. typhimurium</i>	Tm 5	IVB 5560	-	Finland	1a	-
9	203	2189	<i>S. typhimurium</i>	Tm 7	NVSL 2816	Papagei	Kalifornien	1a	1987
10	154	2190	<i>S. typhimurium</i>	Tm 9	NVSL 6814	Opposum	Kalifornien	1b	1987
11	829	2191	<i>S. typhimurium</i>	Tm 10	IVB 276/25	-	Thailand	2a	-
12	147	2192	<i>S. typhimurium</i>	Tm 11	NVSL 6993	Pferd	Louisiana	32begi	1987
13	837	2193	<i>S. typhimurium</i>	Tm 12	IVB 1430	-	Frankreich	29 b	-
14	842	2194	<i>S. typhimurium</i>	Tm 13	IVB 75/67	-	Panama	1a	-
15	149	2195	<i>S. typhimurium</i>	Tm 14	NVSL 6968	Hund	Texas	17 a	1987
16	350	2196	<i>S. typhimurium</i>	Tm 15	CDC B1236	Mensch	N. Carolina	3 d	-
17	1164	2197	<i>S. typhimurium</i>	Tm 16	IVB 48/81	-	Jugoslawien	3 d	-

18	151	2198	<i>S. typhimurium</i>	Tm 17	NVSL 6938	Pferd	Iowa	3 d	1987
19	93	2199	<i>S. typhimurium</i>	Tm 21	INSP 85	Mensch	Mexiko	1f	-
20	839	2200	<i>S. typhimurium</i>	Tm 22	IVB 1544	-	Frankreich	1a	-
21	4535	2201	<i>S. typhimurium</i>	Tm 23	USFW 318	Reiher	Oregon	-	-
22	1688	2202	<i>S. saintpaul</i>	Sp 1	CDC B1605	Mensch	Massachusetts	-	-
23	1689	2203	<i>S. saintpaul</i>	Sp 2	CDC B1722	Mensch	Pennsylvania	-	-
24	1690	2204	<i>S. saintpaul</i>	Sp 3	CDC B2076	Mensch	Texas	-	-
25	1380	2205	<i>S. saintpaul</i>	Sp 3	IVB 516	-	Frankreich	-	-
26	3748	2206	<i>S. saintpaul</i>	Sp 3	IP 67/88	Mensch	Frankreich	-	1988
27	3755	2207	<i>S. saintpaul</i>	Sp 3	IP 78/88	Mensch	Frankreich	-	1988
28	3763	2208	<i>S. saintpaul</i>	Sp 3	IP 86/88	Mensch	Frankreich	-	1988
29	1686	2209	<i>S. saintpaul</i>	Sp 4	CDC B1400	Mensch	Florida	-	-
30	539	2210	<i>S. heidelberg</i>	He 1	NVSL 7039	Huhn	Pennsylvania	9 i	1987
31	560	2211	<i>S. heidelberg</i>	He 1	NVSL 5876	Schwein	Maryland	9 i	1987
32	562	2212	<i>S. heidelberg</i>	He 1	NVSL 5145	Hund	Texas	9 i	1986
33	576	2213	<i>S. heidelberg</i>	He 1	INSP 94	Mensch	Mexiko	9 gi	-
34	1364	2214	<i>S. heidelberg</i>	He 1	IVB 7135/1990	-	Israel	9 i	-
35	1389	2215	<i>S. heidelberg</i>	He 2	IVB 126/82	-	Brasilien	9 i	-
36	1391	2216	<i>S. heidelberg</i>	He 3	IVB 588/24	-	Thailand	1a	-
37	543	2217	<i>S. heidelberg</i>	He 4	NVSL 5208	Truthahn	Colorado	9 i	1987
38	540	2218	<i>S. heidelberg</i>	He 5	NVSL 4960	Truthahn	Arizona	9 i	1987
39	646	2219	<i>S. heidelberg</i>	He 7	CDC B2487	Mensch	N. Carolina	9 gi	-
40	1347	2220	<i>S. heidelberg</i>	He 8	IVB 218/82	-	USA	9 gi	-
41	3222	2221	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 1	DMS 155/76	Mensch	Frankreich	3 gh	1976
42	3279	2222	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 1	DMS 724/74	Mensch	Schottland	27 bg	1974
43	3305	2223	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 1	DMS 220/82	Mensch	Afrika	11 ghi	1982
44	3265	2224	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 1	DMS 2434	Mensch	Mittlerer Osten	19 gh	<1965
45	3596	2225	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 1	IP 7/88	Rind	Frankreich	-	1988
46	3294	2226	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 1a	DMS 3254/7/81	Mensch	Europe	11 bgi	1981
47	3249	2227	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 2	DMS 3205/83	Sewage	Schottland	9a	1983
48	3237	2228	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 2a	DMS 843/82	Mensch	Schottland	1 dh	1982
49	3267	2229	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 2b	DMS 2442	Sewage	UK	1 b	<1965
50	3202	2230	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 3	DMS 106/76	Essen	Mittlerer Osten	2a	1976
51	3193	2231	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 3	DMS 53/76	Mensch	Frankreich	-	1976
52	3614	2232	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 3	IP 87/87	Rind	Frankreich	-	1987
53	3605	2233	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 3	IP 16/88	Mensch	Frankreich	-	1988

54	3597	2234	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 3	IP 8/88	Mensch	Frankreich	-	1988
55	3211	2235	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 3a	DMS 47/81	Mensch	Frankreich	2 bg	1981
56	3201	2236	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 4	DMS 83/76	Mensch	Frankreich	13 i	1976
57	3274	2237	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 5	DMS 2471	Wasser	UK	11 i	<1965
58	3218	2238	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 5a	DMS 59/81	Mensch	Frankreich	26i	1981
59	3219	2239	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 5b	DMS 61/81	Mensch	Frankreich	10 i	1981
60	3192	2240	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 5c	DMS 52/76	Essen	Frankreich	9 bi	1976
61	3277	2241	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 6	DMS 203/74	Wasser	Schottland	1a	1974
62	3215	2242	<i>S. paratyphi</i> B	Pb 7	DMS 53/81	Mensch	Afrika	1 g	1981
63	4283	2243	<i>S. muenchen</i>	Mu 1	IP 6/88	Mensch	Frankreich	-	1988
64	4129	2244	<i>S. muenchen</i>	Mu 1	NVSL 519	Rind	Kentucky	-	1986
65	4135	2245	<i>S. muenchen</i>	Mu 1	NVSL 2817	Huhn	Florida	-	1987
66	4277	2246	<i>S. muenchen</i>	Mu 1	CDC B2026	Mensch	Massachusetts	-	-
67	4317	2247	<i>S. muenchen</i>	Mu 1	INSP 46	Mensch	Mexiko	-	-
68	4292	2248	<i>S. muenchen</i>	M u 1a	IP 15/88	Mensch	Frankreich	-	1988
69	4288	2249	<i>S. muenchen</i>	Mu 2	IP 11/88	Mensch	Frankreich	-	1988
70	4300	2250	<i>S. muenchen</i>	Mu 3	IP 25/88	Mensch	Frankreich	-	1988
71	4272	2251	<i>S. muenchen</i>	Mu 4	CDC B1293	Mensch	N. Carolina	-	-
72	4306	2252	<i>S. muenchen</i>	Mu 4a	IP 31/88	Mensch	Frankreich	-	1988

Tabelle 21: Stämme der *Salmonella reference collection B* (SARB).

Von der Subspezies I von *S. enterica* sind 37 Stämme elektrophoretisch charakterisiert worden (Tabelle aus Boyd et al., 1993). (a) Bezeichnungen entsprechen der Einteilung nach O:H1:H2 Antigenfaktoren. (b) Abkürzungen: siehe Legende in Tabelle 20. (c) Genauere Beschreibung in Boyd et al., 1993. (d) Von Le Minor als Synonym von *S. choleraesuis* aufgeführt (Le Minor, L., 1984, Genus III *Salmonella* Lignières 1900, 389, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1, pp.427-458).(e) Serotyp 1,9,12: g.m.p:--. Dieser Stamm wurde als *S. dublin* ausgewiesen, ist aber zu anderen Stämmen dieses Serovars entfernt verwandt (Selander et al., 1992).(f) Von Le Minor als *S. gallinarum-pullorum* eingeordnet (Le Minor,1984). (g) Von Le Minor als *S. gallinarum-pullorum* eingeordnet bzw. von Ewing als Bioserovar Pullorum (Ewing (1986) in Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th edn).

SARB Nr.	RKS Nr.	SGSC Nr.	Spezies ^(a)	ET	Original Nummer ^(b)	Wirt	Herkunftsland	Biotyp ^(c)	Jahr
1	1701	2458	<i>S. agona</i>	Ag 1	IVB 36/79	-	Peru	-	-
2	2403	2459	<i>S. anatum</i>	An 1	CDC B1487	Mensch	Washington	-	-
3	4231	2460	<i>S. brandenberg</i>	Ba 2	DMS 2819	-	Schottland	10i	1988
4	1280	2461	<i>S. choleraesuis</i>	Cs 1	NVSL 6321	Schwein	Minnesota	-	1986
5	1239	2462	<i>S. choleraesuis</i>	Cs 6	IVB 651/79	-	Schweiz	-	-
6	3169	2463	<i>S. choleraesuis</i>	Cs 11	CDC 3327/54	-	Thailand	-	1954
7	4640	2464	<i>S. choleraesuis</i>	Cs 13	IP 6562/88	-	Australien	-	-
8	4647	2465	<i>S. decatur</i> ^(d)	Dt 1	IP 631 K	-	Frankreich	-	-
9	246	2466	<i>S. derby</i>	De 1	NVSL 4111	Avian	Oklahoma	-	1986
10	241	2467	<i>S. derby</i>	De 13	NVSL 5558	Schwein	Minnesota	-	1986
11	243	2468	<i>S. derby</i>	De 31	NVSL 5283	Truthahn	Pennsylvania	-	1986
12	1518	2469	<i>S. dublin</i>	Du 1	NVSL 5618	Rind	Idaho	-	1986
13	4717	2470	<i>S. dublin</i>	Du 3	IP 82/3144	Rind	Frankreich	-	1982
14	1550	2471	<i>S. dublin</i>	Du 2 ^(e)	IVB 3540/24	-	Thailand	-	-
15	4239	2472	<i>S. duisburg</i>	Di 1	DMS 3618	-	Schottland	9i	1988
16	53	2473	<i>S. enteritidis</i>	En 1	CDC SSU7998	-	Rhode Island	-	-
17	761	2474	<i>S. enteritidis</i>	En 2	IVB 176/82	-	Brasilien	-	-
18	69	2475	<i>S. enteritidis</i>	En 3	CDC SSU8074	-	Connecticut	-	-
19	1208	2476	<i>S. enteritidis</i>	En 7	IVB 470/82	-	Schweiz	-	-
20	1216	2477	<i>S. emek</i>	Em 1	IVB 4793/3366	-	Isreal	-	-
21	2962	2478	<i>S. gallinarum</i> ^(f)	Ga 2	CDC 4801/72	Mensch	Connecticut	-	1972
22	4241	2479	<i>S. haifa</i>	Ha 1	DMS 3005	-	Schottland	1a	1988
23	539	2480	<i>S. heidelberg</i>	He 1	NVSL 7039	Huhn	Pennsylvania	9i	1987
24	1391	2481	<i>S. heidelberg</i>	He 3	IVB 588/24	-	Thailand	1a	-
25	4250	2482	<i>S. indiana</i>	Id 1	DMS 3702	-	Schottland	1a	1988
26	1490	2483	<i>S. infantis</i>	In 1	CDC B3460	Mensch	N. Carolina	-	-
27	1452	2484	<i>S. infantis</i>	In 3	IVB 385/72	-	Senegal	-	-
28	2833	2485	<i>S. miami</i>	Mi 1	CDC 4648/53	Mensch	Georgia	-	1953
29	4381	2486	<i>S. miami</i>	Mi 5	IP 2/79	Mensch	French Guiana	-	1979
30	1762	2487	<i>S. montevideo</i>	Mo 1	CDC B2131	Mensch	Georgia	-	-
31	1740	2488	<i>S. montevideo</i>	Mo 6	CDC B2604	Mensch	Florida	-	-

32	3121	2489	<i>S. muenchen</i>	Mu 1	ATCC 8388	-	Labor Stamm	-	-
33	4288	2490	<i>S. muenchen</i>	Mu 2	IP 11/88	Mensch	Frankreich	-	1988
34	4300	2491	<i>S. muenchen</i>	Mu 3	IP 25/88	Mensch	Frankreich	-	1988
35	4272	2492	<i>S. muenchen</i>	Mu 4	CDC B1293	Mensch	N. Carolina	-	-
36	2016	2493	<i>S. newport</i>	Np 8	CDC B3465	Mensch	N. Carolina	-	-
37	1915	2494	<i>S. newport</i>	Np 11	INSP 15	Mensch	Mexiko	-	-
38	1956	2495	<i>S. newport</i>	Np 15	NVSL 3882	Schlange	Massachusetts	-	1987
39	1793	2496	<i>S. panama</i>	Pn 1	IVB Bendia	-	Italien	-	-
40	1796	2497	<i>S. panama</i>	Pn 2	CDC B1171	Mensch	N. Carolina	-	-
41	1779	2498	<i>S. panama</i>	Pn 12	CDC B1433	Mensch	N. Carolina	-	-
42	4993	2499	<i>S. paratyphi A</i>	Pa 1	ATCC 9150	-	Labor Stamm	-	-
43	3222	2500	<i>S. paratyphi B</i>	Pb 1	DMS 155/76	Mensch	Frankreich	3gh	1976
44	3202	2501	<i>S. paratyphi B</i>	Pb 3	DMS 106/76	Essen	Mittlerer Osten	2a	1976
45	3201	2502	<i>S. paratyphi B</i>	Pb 4	DMS 83/76	Mensch	Frankreich	13i	1976
46	3274	2503	<i>S. paratyphi B</i>	Pb 5	DMS 2471	Wasser	UK	11i	<1965
47	3215	2504	<i>S. paratyphi B</i>	Pb 7	DMS 53/81	Mensch	Afrika	1g	1981
48	4587	2505	<i>S. paratyphi C</i>	Pc 1	IP 33 K	-	Frankreich	-	-
49	4594	2506	<i>S. paratyphi C</i>	Pc 2	IP 2/88	Mensch	Frankreich	-	1988
50	4620	2507	<i>S. paratyphi C</i>	Pc 4	IP 4/77	Mensch	Frankreich	-	1977
51	2266	2508	<i>S. pullorum</i> ⁽⁹⁾	Pu 3	IVB 978/87	-	Deutschland	-	-
52	2246	2509	<i>S. pullorum</i>	Pu 4	IVB Italian Standard	-	Deutschland	-	-
53	4256	2510	<i>S. reading</i>	Re 1	DMS 3853	-	Schottland	2j	1988
54	4938	2511	<i>S. rubislaw</i>	Ru 1	ATCC 10717	-	Labor Stamm	-	-
55	1690	2512	<i>S. saintpaul</i>	Sp 3	CDC B2076	Mensch	Texas	-	-
56	1686	2513	<i>S. saintpaul</i>	Sp 4	CDC B1400	Mensch	Florida	-	-
57	4261	2514	<i>S. schwarzengrund</i>	Sw 1	DMS 1253	-	Schottland	10i	1988
58	2866	2515	<i>S. sendai</i>	Se 1	CDC 1035/74	Mensch	Kalifornien	-	1974
59	2358	2516	<i>S. senftenberg</i>	Sf 1	NVSL 6673	Huhn	Maryland	-	1987
60	4264	2517	<i>S. stanley</i>	St 1	DMS 1112	-	Schottland	26bei	1988
61	4267	2518	<i>S. stanleyville</i>	Sv 2	DMS 3705	-	Schottland	9i	1988
62	1767	2519	<i>S. thompson</i>	Th 1	CDC B2637	Mensch	Florida	-	-
63	3333	2520	<i>S. typhi</i>	Tp 1	IP E.88.374	-	Dakar	-	1988
64	3320	2521	<i>S. typhi</i>	Tp 2	IP E.88.353	-	Dakar	-	1988
65	284	2522	<i>S. typhimurium</i>	Tm 1	INSP 24	Mensch	Mexiko	1f	-
66	203	2523	<i>S. typhimurium</i>	Tm 7	NVSL 2816	Papagei	Kalifornien	1a	1987
67	837	2524	<i>S. typhimurium</i>	Tm 12	IVB 1430	-	Frankreich	29b	-
68	4535	2525	<i>S. typhimurium</i>	Tm 23	USFW 318	Reiher	Oregon	-	-
69	3134	2526	<i>S. typhisuis</i>	Ts 1	CDC 277/68	Schwein	Kalifornien	-	1968
70	3133	2527	<i>S. typhisuis</i>	Ts 3	CDC 1426/67	Schwein	Iowa	-	1967
71	4000	2528	<i>S. wien</i>	Wi 1	IP 5/88	Mensch	Frankreich	-	1988
72	3998	2529	<i>S. wien</i>	Wi 2	IP 3/88	Mensch	Frankreich	-	1988

Tabelle 22: Stämme der *Salmonella reference collection C* (SARC).

Verschiedene Isolate der Gattung *Salmonella* aus den 8 Subspezies I-VIII, inklusive Subspezies V (*S. bongori*) wurden elektrophoretisch typisiert (Tabelle aus Boyd et al., 1996). (a) Abkürzungen: CDC = *Centers for Disease Control and Prevention* (Atlanta, Ga.); IP = *Institut Pasteur* (Paris, Frankreich). (b) Bezeichnungen entsprechen der Einteilung nach O:H1:H2 Antigenfaktoren (Le Minor, 1984). Genauere Beschreibungen in Boyd et al., 1996.

SARC Nr.	Group Nr.	RKS Nr.	SGSC Nr.	Original Nummer ^(a)	Spezies	Antigenfaktoren ^(b)	Wirt	Herkunftsland	Jahr
1	I	s4194	3029	S 6623	<i>S. typhimurium</i>	1,4,[5],12:i:1,2	Mensch	England	1958
2	I	s3333	3036	IP E.88.374	<i>S. typhi</i>	9,12,[Vi]:d:[Z66]	-	Dakar	1988
3	II	s2985	3039	CDC 151-85	-	58:d:z6	Mensch	Massachusetts	1985
4	II	s2993	3047	CDC 3472-64	-	42:f:g,t:-	-	-	1964
5	IIIa	s2980	3061	CDC 346-86	<i>S. arizonae</i>	62:z4,z23:-	Corn Schlange	Oregon	1986
6	IIIa	s2983	3063	CDC 409-85	<i>S. arizonae</i>	62:z36:-	Mensch	Kalifornien	1985
7	IIIb	s2978	3068	CDC 156-87	-	501,2,3:k:z	Mensch	Oregon	1987
8	IIIb	s2979	3069	CDC 678-94	-	38[k]:z35:-	Mensch	Kalifornien	1984
9	IV	s3015	3074	CDC 2584-68	-	45a,b:g,z51:-	Tier	Kanal Zone	1968
10	IV	s3027	3086	CDC 287-86	-	16:z4,z32:-	Mensch	Illinois	1986
11	V	s3041	3100	CDC 750-72	<i>S. bongori</i>	66:z41:-	Frosch	-	1972
12	V	s3044	3103	CDC 2703-76	<i>S. bongori</i>	48:z41:-	Parakeet	United States	1976
13	VI	s2995	3116	CDC 1363-65	-	45:a:e,n,x	-	Indien	1965
14	VI	s3057	3118	CDC 347-78	-	11:b:e,n,x	-	-	1978
15	VII	s3013	3120	CDC 2439-64	-	1,40:g,z51:-	-	Tonga-T1	1964
16	VII	s3014	3121	CDC 5039-68	-	40:z4,z24:-	Mensch	Florida	1968

7 Abkürzungen

2D-Gel	hochauflösendes zweidimensionales Gel	HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
AMCA	7-Amino-4-Methyl-cumarin-3-Azetat	HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
Amp	Ampicillin	IEF	Isoelektrische Fokussierung
aphT	Gen der Aminoglycosid-Phosphotransferase	Ig	Immunglobulin
APS	Ammoniumpersulfat	IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	kb	Kilobasen
Bp	Basenpaar(e)	kDa	Kilodalton
BSA	Bovines Serum Albumin	Km	Kanamycin
Cm	Chloramphenicol	LB	Luria Bertani
CRIB	<i>Cdc42/Rac interactiv binding</i>	LD ₅₀	50 % der letalen Dosis
Cs	Centisom	LPS	Lipopolysaccharid
Cy3	Indocarbocyanin	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle - Medium</i>	PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
DMSP	Dimethylsulfoxid	PCR	Polymerasekettenreaktion
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triposhphat	PMSF	Phenylmethansulphonylfluorid
DNS	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
DT	Differenzierungstyp	S.	<i>Salmonella</i>
DTT	Dithiothreitol	SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	SPI	<i>Salmonella</i> - Pathogenitätsinsel
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>	spp.	auf Genus-Ebene typisierte Stämme
EDTA	Ethylen-diamin-bis[β-Aminoethylether]- N,N,N',N'-tetraessigsäure	TCA	Trichloressigsäure
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat	Tet	Tetrazyklin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylendiamin
GDI	G-Nukleotid-Dissoziationsinhibitor	TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-5,6-Isothiocyanat
GEF	G-Nukleotidaustauschfaktor	Tris	Trishydroxymethylendiamin
GFP	grünfluoreszierendes Protein	TSS	Typ III Sekretionssystem
GSH	Glutathion	Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat
GST	Glutathion-S-Transferase	üN	über Nacht

Internationale Standardabkürzungen wurden nach den Empfehlungen der IUBMB verwendet (*Eur J Biochem* (1998) 51, 5-7.)

8 Literatur

- Achtman, M., Morelli, G., and Schwuchow, S. (1978). Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of F pili and fate of mating aggregates. *J Bacteriol* 135, 1053-61.
- Al-Awar, O., Radhakrishna, H., Powell, N.N., and Donaldson, J.G. (2000). Separation of membrane trafficking and actin remodeling functions of ARF6 with an effector domain mutant. *Mol Cell Biol* 20, 5998-6007.
- Amyere, M., Mettlen, M., Van, D., Platek, A., Payraastre, B., Veithen, A., and Courtoy, P.J. (2002). Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis. *Int J Med Microbiol* 291, 487-94.
- Bakshi, C.S., Singh, V.P., Wood, M.W., Jones, P.W., Wallis, T.S., and Galyov, E.E. (2000). Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *J Bacteriol* 182, 2341-4.
- Bäumler, A.J. (1997). The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol.* 5, 318-322.
- Bäumler, A.J., Tsolis, R., Ficht, T.A., and Adams, L.G. (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 66, 4579-4587.
- Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Valentine, P.J., Ficht, T.A., and Heffron, F. (1997). Synergistic effect of mutations in *invA* and *lpfC* on the ability of *Salmonella typhimurium* to cause murine typhoid. *Infect Immun* 65, 2254-2259.
- Beltran, P., Plock, S.A., Smith, N.H., Whittam, T.S., Old, D.C., and Selander, R.K. (1991). Reference collection of strains of the *Salmonella typhimurium* complex from natural populations. *J Gen Microbiol* 137, 601-606.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.
- Bishop, A.L. and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-55.
- Bliska, J.B. and Galan, J.E. (1993). Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 73, 903-920.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.

- Boguski, M.S. and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-54.
- Bolton, A.J., Osborne, M.P., Wallis, T.S., and Stephen, J. (1999). Interaction of *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* with porcine and bovine terminal ileum *in vivo*. *Microbiology* 145, 2431-2441.
- Boshans, R.L., Szanto, S., van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (2000). ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol* 20, 3685-94.
- Bowe, F., Lipps, C.J., Tsolis, R.M., Groisman, E., Heffron, F., and Kusters, J.G. (1998). At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Infect Immun* 66, 3372-3377.
- Boyd, E.F., Wang, F.S., Beltran, P., Plock, S.A., Nelson, K., and Selander, R.K. (1993). *Salmonella* reference collection B (SARB): strains of 37 serovars of subspecies I. *J Gen Microbiol* 139, 1125-1132.
- Boyd, E.F., Wang, F.S., Whittam, T.S., and Selander, R.K. (1996). Molecular genetic relationships of the *Salmonellae*. *Appl Environ Microbiol* 62, 804-808.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., and Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 38, 2465-7.
- Buchmeier, N.A. and Heffron, F. (1991). Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 59, 2232-2238.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short J.M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- Burrows, W. (1959) *Textbook of microbiology* (The W. B. Saunders Co., Philadelphi, PA).
- Chang, A.C. and Cohen, S.N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134, 1141-1156.
- Chavrier, P. and Goud, B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 11, 466-75.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-52.
- Chen, C.A. and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-8.

- Chen, L.M., Bagrodia, S., Cerione, R.A., and Galan, J.E. (1999). Requirement of p21-activated kinase (PAK) for *Salmonella typhimurium*-induced nuclear responses. *J Exp Med* 189, 1479-1488.
- Chen, L.M., Hobbie, S., and Galan, J.E. (1996). Requirement for Cdc42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* 274, 2115-2118.
- Clark, M.A., Jepson, M.A., Simmons, N.L., and Hirst, B.H. (1994). Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* 145, 543-552.
- Clark, M.A., Reed, K.A., Lodge, J., Stephen, J., Hirst, B.H., and Jepson, M.A. (1996). Invasion of murine intestinal M cells by *Salmonella typhimurium inv* mutants severely deficient for invasion of cultured cells. *Infect Immun* 64, 4363-4368.
- Collazo, C.M. and Galan, J.E. (1996). Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64, 3524-3531.
- Collazo, C.M. and Galan, J.E. (1997). The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol Microbiol* 24, 747-756.
- Collazo, C.M., Zierler, M.K., and Galan, J.E. (1995). Functional analysis of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invI* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. *Mol Microbiol* 15, 25-38.
- Condeelis, J. (2001). How is actin polymerization nucleated *in vivo*? *Trends Cell Biol* 11, 288-93.
- Cotter, P.A. and DiRita, V.J. (2000). Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol* 54, 519-65.
- Crespo, P., Schuebel, K.E., Ostrom, A.A., Gutkind, J.S., and Bustelo, X.R. (1997). Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the *vav* proto-oncogene product. *Nature* 385, 169-72.
- Criss, A.K., Silva, M., Casanova, J.E., and McCormick, B.A. (2001). Regulation of *Salmonella*-induced neutrophil transmigration by epithelial ADP-ribosylation factor 6. *J Biol Chem* 276, 48431-9.
- D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L., McDonough, M., Stahl, P.D., and Van Aelst, L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J* 16, 5445-54.
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M.I., and Stahl, P.D. (1995). A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* 267, 1175-8.
- Deininger, M.H., Meyermann, R., and Schluesener, H.J. (2002). The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett* 514, 115-21.

- Dibb-Fuller, M.P., Allen-Vercoe, E., Thorns, C.J., and Woodward, M.J. (1999). Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology* 145 (Pt 5), 1023-31.
- Eckmann, L., Rudolf, M.T., Ptasznik, A., Schultz, C., Jiang, T., Wolfson, N., Tsien, R., Fierer, J., Shears, S.B., Kagnoff, M.F., and Traynor-Kaplan, A.E. (1997). D-myo-Inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in response to *Salmonella* invasion inhibits phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14456-60.
- Ehrbar, K., Miold, S., Friebel, A., Stender, S., and Hardt, W.D. (2002). Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Int J Med Microbiol* 291, 479-85.
- Fauman, E.B. and Saper, M.A. (1996). Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem Sci* 21, 413-7.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Figuroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D., and Bossi, L. (2001). Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* 39, 260-71.
- Finlay, B.B., Ruschkowski, S., Kenny, B., Stein, M., Reinscheid, D.J., Stein, M.A., and Rosenshine, I. (1996). Enteropathogenic *E. coli* exploitation of host epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 797, 26-31.
- Francis, C.L., Ryan, T.A., Jones, B.D., Smith, S.J., Aaronson, W., and Falkow, S. (1993). Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 364 , 639-642.
- Frank, P.G. and Marcel, Y.L. (2000). Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res* 41 , 853-72.
- Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W., and Hardt, W.D. (2001). SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* 276, 34035-40.
- Frost, A.J., Bland, A.P., and Wallis, T.S. (1997). The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Vet Pathol* 34, 369-86.
- Fu, Y. and Galan, J.E. (1998). The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 27, 359-368.

- Fu, Y. and Galan, J.E. (1999). A *Salmonella* protein antagonizes Rac1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401, 293-7.
- Galan, J.E. (1999). Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol* 2, 46-50.
- Galan, J.E. and Curtiss, R. (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6383-6387.
- Galan, J.E., Ginocchio, C., and Costeas, P. (1992). Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *J Bacteriol* 174, 4338-4349.
- Garcia-Ranea, J.A. and Valencia, A. (1998). Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 434, 219-25.
- Garner, M.J., Hayward, R.D., and Koronakis, V. (2002). The *Salmonella* pathogenicity island 1 secretion system directs cellular cholesterol redistribution during mammalian cell entry and intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 4, 153-65.
- Gatfield, J. and Pieters, J. (2000). Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288, 1647-50.
- Geyer, M. and Wittinghofer, A. (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 7, 786-92.
- Ginocchio, C., Pace, J., and Galan, J.E. (1992). Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of *Salmonellae* into cultured epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5976-5980.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-82.
- Gorg, A. (1993). Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: current state. *Biochem Soc Trans* 21, 130-2.
- Gorg, A., Boguth, G., Obermaier, C., and Weiss, W. (1998). Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis* 19, 1516-9.
- Gorvel, J.P. and Meresse, S. (2001). Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes Infect* 3, 1299-303.

- Gouin, E., Gantelet, H., Egile, C., Lasa, I., Ohayon, H., Villiers, V., Gounon, P., Sansonetti, P.J., and Cossart, P. (1999). A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci* 112 (Pt 11), 1697-708.
- Groisman, E.A. and Ochman, H. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87, 791-794.
- Groisman, E.A. and Ochman, H. (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol.* 5, 343-349.
- Guan, K.L. and Dixon, J.E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* 192, 262-7.
- Gunn, J.S., Belden, W.J., and Miller, S.I. (1998). Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Microb Pathog* 25, 77-90.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177, 4121-4130.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., and Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23, 1089-1097.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-14.
- Hansen-Wester, I. and Hensel, M. (2001). *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 3, 549-59.
- Hardt, W.D. and Galan, J.E. (1997). A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9887-9892.
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., and Galan, J.E. (1998a). *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93, 815-826.
- Hardt, W.D., Urlaub, H., and Galan, J.E. (1998b). A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2574-2579.
- Harris, E.L.V. and Angal, S. (1990). Protein purification applications, a practical approach. In Anonymous Chapter 2 and 4.

- Hartwig, J.H. and Yin, H.L. (1988). The organization and regulation of the macrophage actin skeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 10, 117-25.
- Hashim, S., Mukherjee, K., Raje, M., Basu, S.K., and Mukhopadhyay, A. (2000). Live *Salmonella* modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem* 275, 16281-8.
- Hayward, R.D. and Koronakis, V. (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J* 18, 4926-34.
- Hayward, R.D., McGhie, E.J., and Koronakis, V. (2000). Membrane fusion activity of purified SipB, a *Salmonella* surface protein essential for mammalian cell invasion. *Mol Microbiol* 37, 727-39.
- Hersh, D., Monack, D.M., Smith, M.R., Ghori, N., Falkow, S., and Zychlinsky, A. (1999). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2396-2401.
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D. (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* 70, 649-76.
- Hirano, K., Matsuura, F., Tsukamoto, K., Zhang, Z., Matsuyama, A., Takaishi, K., Komuro, R., Suehiro, T., Yamashita, S., Takai, Y., and Matsuzawa, Y. (2000). Decreased expression of a member of the Rho GTPase family, Cdc42Hs, in cells from Tangier disease - the small G protein may play a role in cholesterol efflux. *FEBS Lett* 484, 275-9.
- Hoiseth, S.K. and Stocker, B.A.D. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238-239.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A., and Kanaho, Y. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99, 521-32.
- Hopkins, S.A., Niedergang, F., Corthesy-Theulaz, I.E., and Kraehenbuhl, J.P. (2000). A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol* 2, 59-68.
- Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *MMBR* 62, 379-433.
- Hueck, C.J., Hantman, M.J., Bajaj, V., Johnston, C., Lee, C.A., and Miller, S.I. (1995). *Salmonella typhimurium* secreted invasion determinants are homologous to *Shigella* lpa proteins. *Mol Microbiol* 18, 479-490.

- Jepson, M.A., Kenny, B., and Leard, A.D. (2001). Role of *sipA* in the early stages of *Salmonella typhimurium* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol* 3, 417-26.
- Jesenberger, V., Procyk, K.J., Yuan, J., Reipert, S., and Baccarini, M. (2000). *Salmonella*-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J Exp Med* 192, 1035-46.
- Jones, B.D., Ghori, N., and Falkow, S. (1994). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180, 15-23.
- Jones, M.A., Wood, M.W., Mullan, P.B., Watson, P.R., Wallis, T.S., and Galyov, E.E. (1998). Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infect Immun* 66, 5799-804.
- Kanazawa, H., Ohsawa, K., Sasaki, Y., Kohsaka, S., and Imai, Y. (2002). Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipaseC γ -dependent pathway. *J Biol Chem*
- Kaniga, K., Bossio, J.C., and Galan, J.E. (1994). The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins. *Mol Microbiol* 13, 555-568.
- Kaniga, K., Trollinger, D., and Galan, J.E. (1995a). Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the Shigella IpaD and IpaA proteins. *J Bacteriol* 177, 7078-7085.
- Kaniga, K., Tucker, S., Trollinger, D., and Galan, J.E. (1995b). Homologs of the shigella IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. *J Bacteriol* 177, 3965-3971.
- Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J.B., and Galan, J.E. (1996). A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 21, 633-641.
- Knight, D.A. and Barbieri, J.T. (1997). Ecto-ADP-ribosyltransferase activity of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* 65, 3304-3309.
- Knodler, L.A., Celli, J., and Finlay, B.B. (2001). Pathogenic trickery: deception of host cell processes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 578-88.
- Kohbata, S., Yokoyama, H., and Yabuuchi, E. (1986). Cytopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol Immunol* 30, 1225-37.

- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H. and Seed, B. (1996). Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* 86, 233-242.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, C.A., Silva, M., Siber, A.M., Kelly, A.J., Galyov, E., and McCormick, B.A. (2000). A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12283-8.
- Lenzen, C., Cool, R.H., Prinz, H., Kuhlmann, J., and Wittinghofer, A. (1998). Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry* 37, 7420-30.
- Li, J., Ochman, H., Groisman, E.A., Boyd, E.F., Solomon, F., Nelson, K., and Selander, R.K. (1995). Relationship between evolutionary rate and cellular location among the inv/spa invasion proteins of *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7252-7256.
- Lloyd, S.A., Forsberg, A., Wolf-Watz, H., and Francis, M.S. (2001a). Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol* 9, 367-71.
- Lloyd, S.A., Forsberg, A., Wolf-Watz, H., and Francis, M.S. (2001b). Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol* 9, 367-71.
- Lostroh, C.P. and Lee, C.A. (2001). The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* 3, 1281-91.
- Lyczak, J.B., Zaidi, T.S., Grout, M., Bittner, M., Contreras, I., and Pier, G.B. (2001). Epithelial cell contact-induced alterations in *Salmonella enterica* serovar Typhi lipopolysaccharide are critical for bacterial internalization. *Cell Microbiol* 3, 763-72.
- Machesky, L.M. and Gould, K.L. (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* 11, 117-21.
- Macnab, R.M. (1992). Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Trends Microbiol.* 26, 131-158.
- Manoil, C. and Beckwith, J. (1985). TnpA: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8129-33.
- Marshall, C.J. (1993). Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science* 259, 1865-6.
- Matozaki, T., Nakanishi, H., and Takai, Y. (2000). Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal* 12, 515-24.

- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., and Wilson, R.K. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413, 852-6.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., and Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5, 607-25.
- Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Finlay, B.B., and Gorvel, J.P. (1999). The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J* 18, 4394-403.
- Miao, E.A. and Miller, S.I. (2000). A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7539-7544.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*,
- Miller, V.L. and Mekalanos, J.J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of inversion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* 170, 2575-2583.
- Mirold, S., Ehrbar, K., Weissmuller, A., Prager, R., Tschape, H., Russmann, H., and Hardt, W.D. (2001). *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and *sopE2*. *J Bacteriol* 183, 2348-58.
- Mirold, S., Rabsch, W., Rohde, M., Stender, S., Tschäpe, H., Rüssmann, H., Igwe, E., and Hardt, W.D. (1999). Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9845-9850.
- Mizuno, T., Kaibuchi, K., Yamamoto, T., Kawamura, M., Sakoda, T., Fujioka, H., Matsuura, Y., and Takai, Y. (1991). A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6442-6.
- Mukherjee, K., Parashuraman, S., Raje, M., and Mukhopadhyay, A. (2001). SopE acts as an Rab5-specific nucleotide exchange factor and recruits non-prenylated Rab5 on *Salmonella*-containing phagosomes to promote fusion with early endosomes. *J Biol Chem* 276, 23607-15.

- Mukherjee, K., Siddiqi, S.A., Hashim, S., Raje, M., Basu, S.K., and Mukhopadhyay, A. (2000). Live *Salmonella* recruits N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein on phagosomal membrane and promotes fusion with early endosome. *J Cell Biol* 148, 741-53.
- Murli, S., Watson, R.O., and Galan, J.E. (2001). Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of *Salmonella* with host cells. *Cell Microbiol* 3, 795-810.
- Murray, R.A. and Lee, C.A. (2000). Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that *Salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. *Infect Immun* 68, 5050-5.
- Nagel, W., Schilcher, P., Zeitlmann, L. and Kolanus, W. (1998a). The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function. *M. Biol Cell* 9, 1981-94.
- Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P., Geiger, C., Kolanus, J. and Kolanus, W. (1998b). Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem* 273, 14853-14861.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Norris, F.A., Wilson, M.P., Wallis, T.S., Galyov, E.E., and Majerus, P.W. (1998). SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14057-14059.
- Novick, P. and Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol* 9, 496-504.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-21.
- Ochman, H. and Groisman, E.A. (1996). Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect Immun* 64, 5410-5412.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Kanazawa, H., Sasaki, Y., and Kohsaka, S. (2000). Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 113 (Pt 17), 3073-84.
- Oikkonen, V.M. and Stenmark, H. (1997). Role of Rab GTPases in membrane traffic. *Int Rev Cytol* 176, 1-85.
- Pace, J., Hayman, M.J., and Galan, J.E. (1993). Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. *Cell* 72, 505-14.

- Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B., and Altwegg, M. (1995). Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol.* 3, 253-255.
- Pang, T., Levine, M.M., Ivanoff, B., Wain, J., and Finlay, B.B. (1998). Typhoid fever-important issues still remain. *Trends Microbiol.* 6, 131-133.
- Pegues, D.A., Hantman, M.J., Behlau, I., and Miller, S.I. (1995). PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: Evidence for a role in protein secretion. *Mol Microbiol* 17, 169-181.
- Pelech, S.L. (1996). Kinase connections on the cellular intranet. Signalling pathways. *Curr Biol* 6, 551-4.
- Peters, P.J., Hsu, V.W., Ooi, C.E., Finazzi, D., Teal, S.B., Oorschot, V., Donaldson, J.G., and Klausner, R.D. (1995). Overexpression of Wildtype and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J Cell Biol* 128, 1003-17.
- Popoff, M.Y., Le Minor, L. (1997) *Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars* (Institut Pasteur, Paris) 7th Edition.
- Puck, T.T.M.P.I. (1955). *Proc Natl Acad Sci U S A* 41, 432-437.
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z., and Donaldson, J.G. (1999). ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci* 112 (Pt 6), 855-66.
- Ralph, P., Moore, M.A., and Nilsson, K. (1976). Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* 143, 1528-33.
- Rathman, M., Barker, L.P., and Falkow, S. (1997). The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*- containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect Immun* 65, 1475-1485.
- Ridley, A.J. (1997). The GTP-binding protein Rho. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1225-9.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42- dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221-31.
- Rosqvist, R., Magnusson, K.E., and Wolf Watz, H. (1994). Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* 13, 964-972.
- Rudolph, M.G., Weise, C., Miold, S., Hillenbrand, B., Bader, B., Wittinghofer, A., and Hardt, W.D. (1999). Biochemical analysis of SopE from *Salmonella typhimurium*, a highly efficient guanosine nucleotide exchange factor for Rho GTPases. *J Biol Chem* 274, 30501-9.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Salama, N.R. and Falkow, S. (1999). Genomic clues for defining bacterial pathogenicity. *Microbes Infect* 1, 615-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sasaki, T. and Takai, Y. (1998). The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 641-5.
- Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S., and Imai, Y. (2001). Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 292-7.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1-100 kDa. *Anal Biochem* 266, 368-379.
- Schesser, K., Dukuzumuremyi, J.M., Cilio, C., Borg, S., Wallis, T.S., Pettersson, S., and Galyov, E.E. (2000). The *Salmonella* YopJ-homologue AvrA does not possess YopJ-like activity. *Microb Pathog* 28, 59-70.
- Schimmoller, F., Simon, I., and Pfeffer, S.R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem* 273, 22161-4.
- Selander, R.K., Smith, N.H., Li, J., Beltran, P., Ferris, K.E., Kopecko, D.J., and Rubin, F.A. (1992). Molecular evolutionary genetics of the cattle-adapted serovar *Salmonella dublin*. *J Bacteriol* 174, 3587-3592.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I., and Cornelis, G.R. (1995). Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11998-12002.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-17.
- Stebbins, C.E. and Galan, J.E. (2000). Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the *Salmonella* effector SptP bound to Rac1. *Mol Cell* 6, 1449-60.
- Steele-Mortimer, O., Knodler, L.A., and Finlay, B.B. (2000). Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic* 1, 107-18.

- Steele-Mortimer, O., Méresse, S., Gorvel, J.P., Toh, B.H., and Finlay B.B. (1999). Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1, 33-49.
- Stein, M.A., Leung, K.Y., Zwick, M., Garcia del Portillo, F., and Finlay, B.B. (1996). Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol* 20, 151-164.
- Stender, S., Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Mirolid, S., and Hardt, W.D. (2000). Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* 36, 1206-21.
- Stossel, T.P. (1993). On the crawling of animal cells. *Science* 260, 1086-94.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-30.
- Swanson, J.A. and Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5, 424-428.
- Takahashi, Y. and Smith, J.D. (1999). Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11358-63.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.
- Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P.A., Rittinger, K., Gamblin, S.J., and Smerdon, S.J. (2001). The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* 411, 215-9.
- Tezcan-Merdol, D., Nyman, T., Lindberg, U., Haag, F., Koch-Nolte, F., and Rhen, M. (2001). Actin is ADP-ribosylated by the *Salmonella enterica* virulence-associated protein SpvB. *Mol Microbiol* 39, 606-19.
- Threlfall, E.J., Ward, L.R., and Rowe, B. (1978a). Spread of multiresistant strains of *Salmonella typhimurium* phage types 204 and 193 in Britain. *Br Med J* 2, 997
- Threlfall, E.J., Ward, L.R., and Rowe, B. (1978b). Epidemic spread of a chloramphenicol-resistant strain of *Salmonella typhimurium* phage type 204 in bovine animals in Britain. *Vet Rec* 103, 438-40.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.

- Tsolis, R.M., Townsend, S.M., Miao, E.A., Miller, S.I., Ficht, T.A., Adams, L.G., and Baumler, A.J. (1999). Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype Typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* 67, 6385-93.
- Tucker, S.C. and Galan, J.E. (2000). Complex function for SicA, a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated chaperone. *J Bacteriol* 182, 2262-8.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11, 2295-322.
- Wang, R.F. and Kushner, S.R. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100, 195-199.
- Wattiau, P., Woestyn, S., and Cornelis, G.R. (1996). Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* 20, 255-262.
- Welch, M.D. (1999). The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol* 9, 423-7.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138, 141-3.
- Wood, M.W., Jones, M.A., Watson, P.R., Siber, A.M., McCormick, B.A., Hedges, S., Rosqvist, R., Wallis, T.S., and Galyov, E.E. (2000). The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. *Cell Microbiol* 2, 293-303.
- Wood, M.W., Rosqvist, R., Mullan, P.B., Edwards, M.H., and Galyov, E.E. (1996). SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a sip-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol Microbiol* 22, 327-338.
- Wray, C., McLaren, I.M., and Jones, Y.E. (1998). The epidemiology of *Salmonella typhimurium* in cattle: plasmid profile analysis of definitive phage type (DT) 204c. *J Med Microbiol* 47, 483-7.
- Zhang, Q., Calafat, J., Janssen, H., and Greenberg, S. (1999). ARF6 is required for growth factor- and rac-mediated membrane ruffling in macrophages at a stage distal to Rac membrane targeting. *Mol Cell Biol* 19, 8158-68.
- Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C.C., Donaldson, J.G., and Greenberg, S. (1998). A requirement for ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 273, 19977-81.
- Zhou, D., Chen, L.M., Hernandez, L., Shears, S.B., and Galan, J.E. (2001). A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol* 39, 248-59.

- Zhou, D. and Galan, J. (2001). *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect* 3, 1293-8.
- Zhou, D., Mooseker, M.S., and Galan, J.E. (1999a). Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 283, 2092-2095.
- Zhou, D., Mooseker, M.S., and Galan, J.E. (1999b). An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10176-81.
- Zierler, M.K. and Galan, J.E. (1995). Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella typhimurium* invasion protein InvJ. *Infect Immun* 63, 4024-4028.
- Zuk, P.A. and Elferink, L.A. (2000). Rab15 differentially regulates early endocytic trafficking. *J Biol Chem* 275, 26754-64.

9 Publikationsliste

- Mirolid S, Rabsch W, Rohde M, **Stender S**, Tschape H, Russmann H, Igwe E, Hardt WD (1999) Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain. PNAS 96(17):9845-50.
- Stender S**, Friebel A, Linder S, Rohde M, Mirolid S, Hardt WD (2000) Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. Mol Microbiol 36(6):1206-21.
- Ehrbar K, Mirolid S, Friebel A, **Stender S**, Hardt WD (2002) Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. Int J Med Microbiol 291(6-7):479-85.
- Zhang S, Santos RL, Tsolis RM, **Stender S**, Hardt WD, Baumler AJ, Adams LG (2002) The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. Infect Immun 70 (7):3843-55.
- Deiwick J, Rappl C, **Stender S**, Jungblut P R, Hensel M (2002) Proteomic approaches to *Salmonella* Pathogenicity Island 2-encoded proteins and the SsrAB regulon. Proteomics (akzeptiert).

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

- meinem Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt, von dem ich während der Bearbeitung dieses Themas sehr viel lernen konnte und der meine Arbeit mit Energie und Enthusiasmus förderte.
- meinem Doktorvater Prof. Dr. K. H. Schleifer, für die interessierte Betreuung dieser externen Arbeit.
- dem Leiter des Max von Pettenkofer Instituts Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für sein Interesse an dem Fortgang der Arbeit.
- den vielen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer Instituts, die namentlich zu nennen im einzelnen leider nicht möglich ist, seien es nun die Mitarbeiter der einzelnen Arbeitsgruppen (von Prof. Dr. M. Äpfelbacher, Prof. Dr. R. Haas, Prof. Dr. M. Hensel, Dr. A. Rakin oder Dr. K. Ruckdeschel und Dr. H. Rüssmann -und hoffe ich habe damit niemanden vergessen!!) oder auch die Mitarbeiter der Biotechnologie und der häuslichen Werkstatt. Ihre fachlichen Ratschläge (und auch gewisse "erste Hilfemaßnahmen") haben sehr geholfen. Ich werde mich an gemeinsame Unternehmungen, Feiern, Gespräche gerne erinnern.
- den KollegInnen Susanne, Andrea, Manja, Kristin, Sigi, Cosima und Bärbel in dieser Arbeitsgruppe. Insbesondere danke ich den alten "Geißlein" Susanne, Andrea, Manja und Kristin für fachliche Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Geduld, seelischen Beistand und Verständnis.
- meinem geduldigen Freund, dem Dr. Deiwick, ohne dessen Einarbeitung in die Geheimnisse der 2D-Gele und connections nach Berlin ich ganz schön auf dem "Schlauch gestanden" hätte und der mich in der einsamen Schreiberei fern von der in die Schweiz emigrierten Arbeitsgruppe mit Aufmunterung und konkreter Hilfe auch aus der mediterranen Ferne unterstützt hat.
- meiner Familie nah und fern. Ganz besonders meiner Mutter, meinem Vater.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Silke Stender
Adresse (privat): Balgheimer Str. 84, 41542 Dormagen
Telefon: 0049-2133-70479
e-mail: silkestender@hotmail.com
Geburtsdaten: 23. Januar, 1973 in Neuss, Deutschland
Familienstand: ledig

Ausbildung

1979-1983 *Henry Dunant Grundschule in Dormagen-Delrath*

1983-1992 *Bettina von Arnim Gymnasium in Dormagen*
Allgemeine Hochschulreife

1992-1998 **Studium der Biologie**

1992-1994 *Friedrich Alexander Universität in Erlangen*
Vordiplom

1994-1995 *University of Edinburgh, GB*

1995-1998 *Eberhard Karls Universität in Tübingen*
Diplomprüfung (1997), Diplom (1998)

1997- 1998 *Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg*
externe Diplomarbeit
Thema: Charakterisierung eines Zinkfinger-Proteins von
Onchocerca volvulus (Leuckart, 1893) und eines Thioredoxin-
Proteins von verwandten Filarien.

1998 2002 **Promotion**

Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und Mikrobiologie in München
Bearbeitung der vorliegenden Dissertation im Labor von Prof. Dr. Wolf-Dietrich
Hardt. Betreuung an der TU München durch Prof. Dr. Karl Heinz Schleifer.