

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet für Elektronenmikroskopie

**Charakterisierung von Komponenten des
Typ III Sekretionssystems von
*Yersinia enterocolitica***

Svea Mari Kirsten Dittmann

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. J. A. Lercher

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf
2. Priv.-Doz. Dr. G. Wilharm,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 22.04.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 07.06.2010 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
EINLEITUNG.....	1
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i>	2
1.2 <i>Yersinia enterocolitica</i>	2
1.3 Virulenzfaktoren.....	3
1.4 Das Typ III Sekretionssystem von <i>Yersinia</i>	4
1.5 Zielsetzung.....	12
MATERIAL UND METHODEN.....	13
2. MATERIAL.....	13
2.1 Geräte.....	13
2.2 Chemikalien.....	13
2.3 Weitere Materialien.....	14
2.4 Bakterienstämme.....	14
2.5 Eukaryotische Zelllinien.....	14
2.6 Oligonukleotide.....	15
2.7 Vektoren und Plasmide.....	17
2.8 Nährmedien.....	18
3. METHODEN.....	19
3.1 Kultivierung.....	19
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	20
3.3 Biochemische Methoden.....	23
3.4 Herstellung rekombinanter Proteine.....	28
3.5 Zellbiologische Methoden.....	31
ERGEBNISSE.....	34
4. ERGEBNISSE.....	34
4.1 <i>LcrV</i>	34
4.2 <i>LcrG</i>	38
4.3 <i>SycO</i>	45

4.4	<i>orf91b</i>	48
4.5	<i>YscQ</i>	57
DISKUSSION		62
5.	DISKUSSION	62
5.1	<i>LcrV</i>	62
5.2	<i>LcrG</i>	64
5.3	<i>SycO</i>	66
5.4	<i>orf91b</i>	67
5.5	<i>YscQ</i>	68
ZUSAMMENFASSUNG		70
LITERATURVERZEICHNIS		71
ABKÜRZUNGEN		82
PUBLIKATIONSLISTE		85
DANKSAGUNG		86

EINLEITUNG

1. Einleitung

Infektionen sind die häufigste Ursache für Krankheiten. Diese werden durch Mikroorganismen verursacht, zu denen unter anderem Bakterien, Viren und Pilze zählen. Um diese Pathogene zu bekämpfen, hat der menschliche Körper eine Vielzahl ausgeklügelter Abwehrmechanismen entwickelt in Form des Immunsystems.

Das Immunsystem ist ein teilweise angeborenes und teilweise trainierbares Abwehrsystem, in das unterschiedlichste Mechanismen involviert sind. Die ersten Reaktionen auf eine bakterielle Infektion zum Beispiel sind angeboren und relativ unspezifisch. Unter anderem werden dabei die Bakterien durch Makrophagen aufgenommen und degradiert. Die entstandenen bakteriellen Bestandteile werden anschließend anderen Immunzellen präsentiert. Können letztere die Antigene erkennen und binden, wird die Vermehrung genau dieser Immunzellen veranlasst. Dadurch können die Bakterien fortan gezielt erkannt werden und so den Makrophagen zur Eliminierung präsentiert werden. Diese spezifische Immunantwort entwickelt sich erst mit der Zeit und hängt von den durchlebten Infektionen ab.

Parallel zur Entwicklung des Immunsystems entwickelten jedoch die Erreger Strategien, um genau diesen Abwehrmechanismen zu entgehen. So können zum Beispiel manche Pathogene ihr Oberflächeneigenschaften wechseln, so dass sie nicht mehr spezifisch erkannt werden können. Andere wiederum haben Methoden ausgebildet, um die Phagozytose zu unterbinden.

Besondere Bedeutung kommt deshalb der Untersuchung von bakteriellen Abwehr- und Überlebensmechanismen zu. Mit Hilfe solcher Erkenntnisse können neue Wege und Mittel zur Bekämpfung bakterieller Krankheiten entwickelt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten unterschiedliche Komponenten des Typ III Sekretionssystems von *Yersinia enterocolitica* untersucht werden, um deren Bedeutung und molekulare Funktionsweise aufzuklären. Das Typ III Sekretionssystem ist ein Proteintransportsystem, welches im Falle von Yersinien der Phagozytose-Inhibition dient. Andere pathogene Bakterien nutzen dieses System unter anderem zur erfolgreichen Invasion der Wirtszelle.

Aus diesem Grunde soll nach einem kurzen Überblick über die Gattung *Yersinia* der Erreger *Y. enterocolitica* im Allgemeinen behandelt werden. Im Anschluss daran werden in diesem Kapitel einige Virulenzfaktoren und vor allem das Typ III Sekretionssystem im Detail beschrieben.

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Benannt wurden die gramnegativen stäbchenförmigen Bakterien nach dem Schweizer Bakteriologen Alexandre Yersin. Dieser hatte den wohl bekanntesten Vertreter dieser Gruppe, *Yersinia pestis*, den Erreger der Beulen- und Lungenpest, entdeckt.

Neben dem Pesterreger sind mehr als zehn weitere Arten beschrieben, von denen allerdings nur zwei weitere humanpathogen sind – *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica*. Ersterer führt meist zu einer Lymphadenitis und manchmal, wie bei *Y. enterocolitica* der Fall, zu teilweise schweren Darmentzündungen.

Alle drei humanpathogenen Arten besitzen ein etwa 67 kbp großes Virulenzplasmid (pYV), welches für eine erfolgreiche Infektion notwendig ist (Portnoy & Martinez 1985). Dieses kodiert neben einem Typ III Sekretionssystem auch ein Adhäsion, welches allerdings in *Y. pestis* mutiert ist. Dies ist ein Grund für den abweichenden Infektionsweg im Gegensatz zu den anderen Erregern, denn *Y. pestis* kann nicht über den Darm aufgenommen werden, sondern nur direkt über das Blut (Insektenstich) oder die Lunge.

1.2 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica ist ein fakultativ anaerobes gramnegatives Stäbchenbakterium. Es ist bei Temperaturen unter 30°C begeißelt. Bei Temperaturen darüber wird statt des Flagellensystems das Typ III Sekretionssystem, welches mit ersterem verwandt ist, ausgebildet. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei etwa 27°C, allerdings können sie sich im gesamten Temperaturbereich von 4°C bis 43°C vermehren. Die Fähigkeit, sich auch bei Temperaturen um 4°C noch zu replizieren (Psychotrophie) ist von großer Bedeutung für die Verbreitung des Erregers über kontaminierte Lebensmittel. Unterteilt wird diese Art in sechs Biovarien und diese wiederum in unterschiedliche Serovaren. In Europa sind vor allem die Serotypen O:3 (Biovar 4), O:9 (Biovar 2) und O:5,27 (Biovar 3) von pathogenetischer Bedeutung. Hauptwirt ist neben dem Menschen und Nagetieren das Schwein. Infektionen erfolgen meist durch kontaminierte Nahrungsmittel, aber auch eine Aufnahme durch Trinkwasser oder Milch ist möglich (Black *et al.* 1978).

Die Yersiniose ist in Deutschland meldepflichtig. Pro Jahr werden hierzulande etwa 5000 Fälle gemeldet. Die häufigsten Symptome einer Yersinieninfektion sind klassische Zeichen einer Enteritis mit Durchfall, Übelkeit, Bauchkrämpfen, Erbrechen und Fieber. Bei Personen mit intaktem Immunsystem ist normalerweise keine Therapie notwendig, und nach ein bis drei Wochen folgt die Genesung. Nur in seltenen Fällen kann es zu Komplikationen mit Abszessbildungen in Milz und Leber kommen.

1.3 Virulenzfaktoren

Neben dem Typ III Sekretionssystem, welches am Ende näher behandelt werden soll, besitzen Yersinien weitere wichtige Virulenzfaktoren.

Charakteristisches Merkmal einer Yersiniose ist der wässrige Durchfall (Delor & Cornelis 1992). Dieser wird durch das chromosomal kodierte Enterotoxin Yst induziert (Pai & Mors 1978; Takao *et al.* 1984). Yst ist hitzestabil und aktiviert die Guanylatcyclase, welche dann dieses Symptom hervorruft.

Ein besonders wichtiges Protein stellt das 103 kDa große Inv dar, ein chromosomal kodiertes Invasin (Miller & Falkow 1988). Dieses ist besonders in der frühen Phase der Infektion von Bedeutung. Die Interaktion des Proteins mit β 1-Integrinen (Isberg 1990; Leong *et al.* 1990) der M-Zellen ermöglicht den Yersinien die Invasion der Peyer'schen Plaques (Pepe & Miller 1993), wo sie sich extrazellulär weiter vermehren. Die weitere Ausbreitung erfolgt anschließend meist über das Lymphsystem in Leber, Milz und Lunge.

Nach der Invasion der Peyer'schen Plaques kommt ein weiteres Adhäsion zum Tragen – das YadA (Bolin & Wolf-Watz 1984; Balligand *et al.* 1985). Das *yadA* Gen liegt im Gegensatz zum *inv* Gen auf dem pYV Virulenzplasmid und wird erst bei 37°C aktiviert (Lachica *et al.* 1984; Kapperud & Namork 1987). Das Protein selbst besitzt eine Größe von etwas über 40 kDa, ist in der äußeren Membran verankert und oligomerisiert zu hitzestabilen Trimeren (Hoiczuk *et al.* 2000). Es vermittelt die Adhäsion an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine wie zum Beispiel Kollagen und schützt die Yersinien vor Komplementlyse und Proteinen, welche Lipopolysaccharidstrukturen erkennen (Heesemann *et al.* 1984; Heesemann *et al.* 1987; Emody *et al.* 1989; Flugel *et al.* 1994; Schulze-Koops *et al.* 1995).

Besonders pathogene Yersinien besitzen neben den anderen Virulenzfaktoren eine sogenannte Pathogenitätsinsel HPI (high pathogenicity island) (Carniel *et al.* 1996; Schubert *et al.* 1998; Carniel 1999; Carniel 2001). Auf diesem chromosomal kodierten Gencluster befinden sich die Informationen für die Synthese und den Transport des Siderophors Yersiniabaktin. Yersiniabaktin bindet Eisen mit einer Bindungskonstante von 25×10^{34} und ist damit um mehrere Zehnerpotenzen effektiver als das humane Transferrin mit einer Bindungskonstante von 1×10^{20} . Im Wirt wird das Siderophor aus der Zelle hinaus geschleust, wo es dann den Wirtskomplexen das Eisen entzieht. Über ein spezielles Aufnahmesystem gelangt das beladene Yersiniabaktin ins

Bakterium zurück. Dort werden die Eisenionen abgegeben und das Siderophor anschließend wieder hinausbefördert.

1.4 Das Typ III Sekretionssystem von *Yersinia*

Eine Voraussetzung für die Virulenz von Yersinien ist das Typ III Sekretionssystem (T3SS). Das T3SS ist ein Proteintransportsystem, mit dem Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert werden. Unter pathogenen gramnegativen Bakterien ist dieses Sekretionssystem stark verbreitet. Es bildet einen Aufbau, der beide bakterielle Membranen überspannt und mit einer nadelförmigen Spitze aus dem Bakterium herausragt. Die Proteine, die den Injektionsapparat aufbauen, sind unter den Bakterien konserviert, während die Effektorproteine auf die individuelle Erregerstrategie abgestimmt sind.

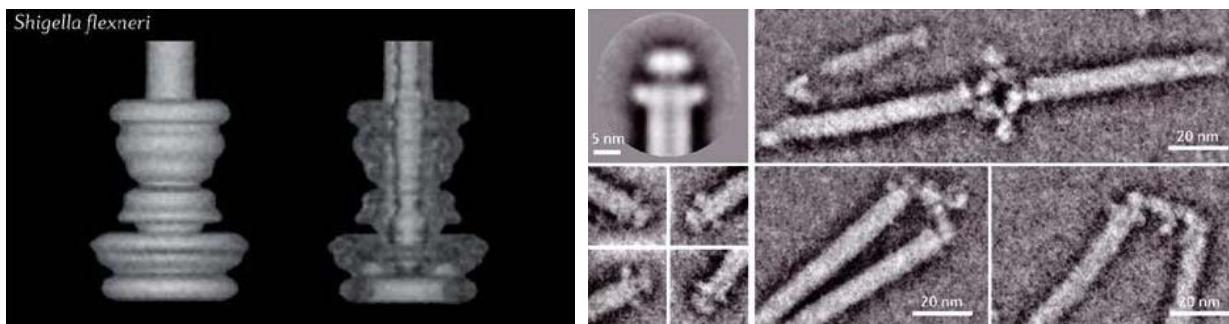


Abb.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Typ III Sekretionssystemen (Cornelis 2006)

links: Cryoelektronenmikroskopische Aufnahme des Basalkörpers von *Shigella flexneri*.

rechts: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Nadelspitze und Nadel von *Yersinia enterocolitica*.

Das Typ III Sekretionssystem ist im Falle der Yersinien auf einem etwa 67 kbp großem Virulenzplasmid (pYV) kodiert (Cornelis 2002; Ramamurthi & Schneewind 2002; Cornelis 2006). Auf diesem Plasmid befinden sich die Informationen für über 40 Proteine des T3SS. Über die Hälfte dieser Proteine bilden den Transportapparat. Diese, sowie einige Regulatoren, sind die Ysc Proteine (*Yersinia* secretion component). Ferner kodiert das pYV Plasmid Effektorproteine, sogenannte Yops (*Yersinia* outer proteins), die in die Wirtszelle transloziert werden, und einige spezifische Effektorchaperone, die Syc Proteine (specific Yop chaperone). Diese binden im Bakterienzytosol an das aminoternale Ende des Effektorproteins und halten letzteres in einem transportkompetenten Zustand.

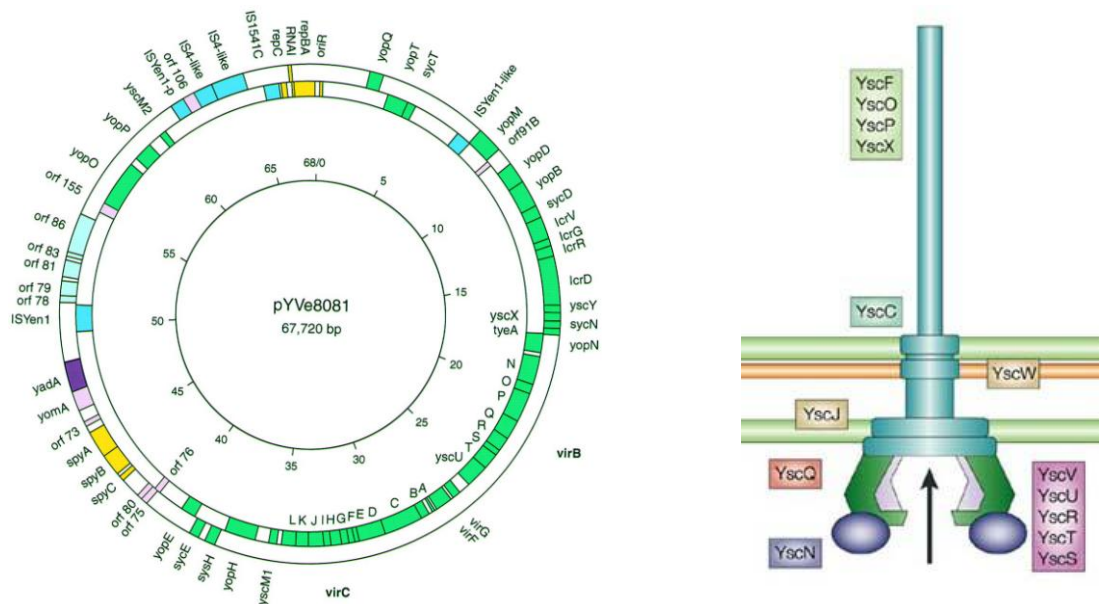


Abb.2: Das Typ III Sekretionssystem

links: Plasmidkarte des pYVe8081, die grün gefärbten Gene sind Bestandteile des Typ III Sekretionssystems. Hinzu kam in 2006 das offene Leseraster *orf155*, welches das Chaperon SycO von YopO kodiert (Snellings *et al.* 2001). rechts: Schematische Darstellung des Sekretionsapparates von *Yersinia enterocolitica* (Cornelis 2002).

In den folgenden Abschnitten werden der Sekretionsapparat, die Effektorproteine, die Chaperone und deren Funktionen näher beschrieben.

1.4.1 Der Typ III Sekretionsapparat

Sobald die Yersinie im menschlichen Körper einen Temperaturanstieg auf 37°C erfährt, werden die Gene des Typ III Sekretionssystems exprimiert und der Injektionsapparat aufgebaut. Dieser besteht aus einem komplexen Basalkörper, der die bakteriellen Membranen und die Peptidoglykanwand überspannt, und aus einer nadelförmigen Struktur auf der Außenseite des Bakteriums.

Den ganzen Apparat durchzieht ein etwa 2 nm breiter Kanal, durch den die Effektorproteine beim Kontakt mit der Wirtszelle transloziert werden. Komponenten des Ringes in der inneren Membran sind YscD, YscQ, YscR, YscS, YscT, YscU und LcrD. An diesen Ring assoziiert sind – wie aus homologen Systemen bekannt ist – die ATPase YscN sowie ihr Regulator YscL. In der äußeren Membran bildet YscC eine Pore aus 13 Untereinheiten (Koster *et al.* 1997; Burghout *et al.* 2004; Goodin *et al.* 2005). Die Nadel selbst ist ein Polymer des 6 kDa großen Proteins YscF (Sun *et al.* 2008), ist etwa 60-80 nm lang und besitzt einen Gesamtdurchmesser von 6-7 nm. YscP bestimmt die Nadellänge und ist vermutlich in der Substraterkennung beteiligt, indem es nach dem Aufbau der Nadel die proteolytische Spaltung von YscU einleitet (Edqvist *et al.* 2003; Journet *et al.* 2003; Agrain *et al.* 2005; Agrain *et al.* 2005; Sorg *et al.* 2007; Wagner *et al.* 2009). Dadurch wird die Substraterkennung so verändert, dass nur noch Effektorproteine und keine

Nadelproteine mehr transportiert werden. Der Mechanismus, der für den Beginn der Translokation in die Wirtszelle von Bedeutung ist, ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

1.4.2 LcrV

Ein Protein, welches entscheidend an der Translokation beteiligt ist, ist das 38 kDa große multifunktionale LcrV. Das *lcrV* Gen ist in einem Operon organisiert, welches auch für die beiden Translokatoren YopB und YopD, deren Chaperon SycD sowie für ein weiteres regulatorisches Protein, LcrG, kodiert (Nilles *et al.* 1997). Seit langem ist bekannt, dass LcrV nicht nur im bakteriellen Cytosol vorliegt, sondern auch in die Wirtszelle transloziert wird und auf der Bakterienoberfläche lokalisiert ist (Debord *et al.* 2001; Marenne *et al.* 2003; Goure *et al.* 2005).

Im bakteriellen Cytoplasma ist es vor allem an der Regulation des Typ III Sekretionssystems beteiligt. Es wird vermutet, dass LcrV durch die Bindung an den negativen Regulator LcrG dessen Wirkung aufhebt und dadurch die Sekretion ermöglicht (Debord *et al.* 2001; Hamad & Nilles 2007). In die Wirtszelle transloziert induziert LcrV die Ausschüttung von Interleukin-10 durch Makrophagen, was entzündungshemmend wirkt (Sing *et al.* 2005; Reithmeier-Rost *et al.* 2007).

Die Tatsache, dass LcrV auf der Bakterienoberfläche vorhanden ist, erklärt die Wirksamkeit als Antigen zur Immunisierung (Goure *et al.* 2005; Overheim *et al.* 2005; Cornelius *et al.* 2007). So ist LcrV eines der Antigene, welches für Impfungen gegen den Pesterreger, *Y. pestis*, eingesetzt wird. Die genaue Lokalisation des Proteins auf der Bakterienoberfläche war jedoch lange unbekannt. Erst vor kurzem konnten Mueller *et al.* (2005) zeigen, dass LcrV einen Komplex an der Spitze des Typ III Sekretionsapparates bildet. Dies erklärt bestens sowohl die Wirksamkeit als protektives Antigen als auch die wichtige Funktion beim Zellkontakt. Bekannt war schon länger, dass die Pore aus YopB und YopD in der Wirtszellmembran nur mit Hilfe von LcrV ausgebildet werden kann (Goure *et al.* 2005). Obwohl gezeigt werden konnte, dass auch LcrV alleine Poren in Membranen bilden kann, konnte LcrV nicht in den Wirtszellmembranen nachgewiesen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass LcrV bei Zellkontakt möglicherweise nur teilweise in die Wirtszellmembran integriert, dadurch erst die Bildung einer Pore durch die Translokatoren YopB und YopD ermöglicht und im weiteren Verlauf als eine Art Brücke zwischen der Nadel und der Pore dient, durch welche die weiteren Effektoren transloziert werden (Rosqvist *et al.* 1995; Sarker *et al.* 1998; Neyt & Cornelis 1999).

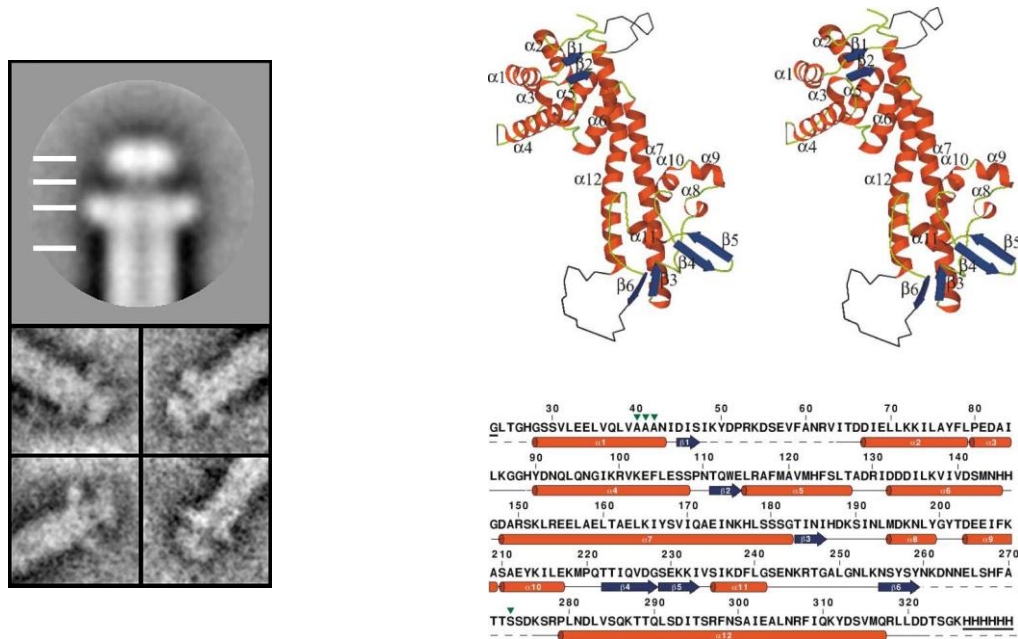


Abb.3: LcrV – das Nadelspitzenprotein
 links: Transmissionselektronische Aufnahme der Nadelspitze von *Yersinia enterocolitica* (Mueller *et al.* 2005).
 rechts: Kristallstruktur von LcrV aus *Yersinia pestis* (Derewenda *et al.* 2004).

1.4.3 Effektorproteine

Erst wenn die Nadel komplett aufgebaut ist und Wirtszellkontakt besteht, werden die Effektorproteine aus dem Bakterium transportiert, wobei vermutlich die Translokatoren YopB und YopD die ersten sind, da sie die Pore in der Wirtszellmembran bilden. Neben diesen beiden Translokatoren gibt es sechs Effektoren, die durch das Typ III Sekretionssystem der Yersinien in die Wirtszelle transloziert werden. Diese sind YopE, YopH, YopM, YopO, YopP und YopT (Winstanley & Hart 2001; Cornelis 2002; Cornelis 2002; Zaharik *et al.* 2002; Mota & Cornelis 2005; Navarro *et al.* 2005). Die meisten dieser Yops spielen eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung der Phagozytose durch Makrophagen, wodurch das Überleben der Yersinie im Wirt erst ermöglicht wird. Die genaue Wirkungsweise ist bisher jedoch nur teilweise aufgeklärt.

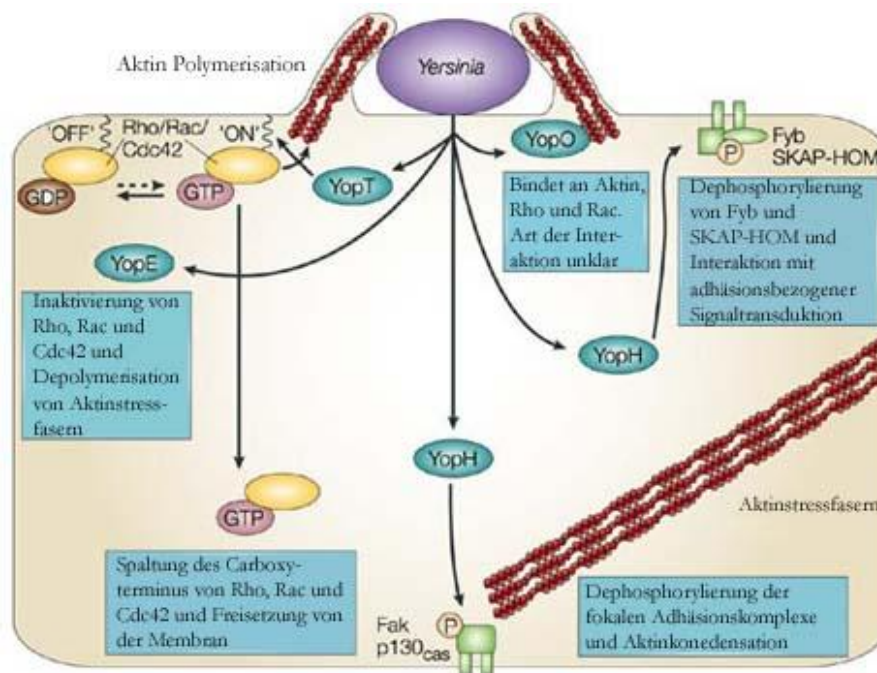


Abb.4: Interaktionen in der Wirtszelle (modifiziert nach Cornelis (2002)).

YopE wirkt als ein GTPase aktivierendes Protein (GAP). Es ist 23 kDa groß und bindet an GTPasen der Rho Familie. Diese werden daraufhin aktiviert und hydrolysieren vermehrt GTP. Dadurch verhindert YopE die Ausbildung von Aktinfilamenten, was zu einer Abrundung der Zelle führt. Zudem wird die Phagozytose auf diesem Wege unterbunden (Black & Bliska 2000; Bartra *et al.* 2001; Aili *et al.* 2002; Evdokimov *et al.* 2002; Schotte *et al.* 2004).

YopH ist ein 50 kDa großes Protein und ist eine der aktivsten bekannten Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPase). Schon wenige Sekunden nachdem es in die Wirtszelle gelangt ist, dephosphoryliert es vor allem Komponenten des fokalen Adhäsionskomplexes und hemmt dadurch die davon abhängigen Signaltransduktionswege. Neben der Phagozytose wird deswegen auch die B- und T-Zell Aktivierung unterdrückt (Green *et al.* 1995; Andersson *et al.* 1996; Persson *et al.* 1997; Hamid *et al.* 1999; Black *et al.* 2000; Smith *et al.* 2001; Sauvonnnet *et al.* 2002; Deleuil *et al.* 2003; Phan *et al.* 2003).

Das Effektorprotein YopM besteht aus einer Vielzahl von Leucin-reichen Wiederholungssequenzen, sogenannte LRRs (leucine rich repeat). Die LRRs ordnen sich in einer charakteristischen Hufeisenform an. YopM weist im Gegensatz zu den anderen Yops einen auffälligen Größenpolymorphismus auf (41-57 kDa), der auf einer unterschiedlichen Anzahl von LRR Motiven beruht. Wechselwirkungen mit zwei Kinasen und die Beobachtung, dass es in den Zellkern wandert, sowie die starke Attenuation der *yopM* Deletionsmutante lassen eine wichtige Rolle in der Infektion vermuten. Die genaue Funktion ist bisher jedoch nicht bekannt (Leung & Straley 1989; Reisner & Straley 1992; Skrzypek & Straley 1996; Boland *et al.* 1998; Skrzypek *et al.* 1998; Evdokimov *et al.* 2001; Benabdillah *et al.* 2004; Kerschen *et al.* 2004; Heusipp *et al.* 2006).

YopO ist ein multifunktionales 80 kDa großes Protein. Im aminoterminalen Bereich besitzt es eine Membranbindedomäne, weswegen es in der Wirtszelle an der Membran lokalisiert ist, gefolgt von einer Serin/Threonin Kinase. Am carboxyterminalen Ende gibt es eine Rho Bindedomäne und einen Aktinbindebereich. YopO phosphoryliert unter anderem Aktin und trägt dadurch ebenfalls zur Unterbindung der Phagozytose bei (Barz *et al.* 2000; Nejedlik *et al.* 2004; Trasadak *et al.* 2007; Groves *et al.* 2010).

Das 33 kDa Protein YopP gehört nicht zu den Effektoren, welche die Phagozytose unterbinden. Es inhibiert stattdessen MAPK- und NF- κ B Signalwege, um eine Immunantwort zu verhindern. Durch das Unterbrechen der Signalwege, kommt es zu einer Suppression der Zytokinproduktion (IL-8 in Epithelzellen und TNF- α in Makrophagen) und zur Apoptose von Makrophagen. YopP verhindert durch Acetylierung bestimmter Serin- und Threoninreste deren für die Signalkaskaden wichtige Phosphorylierung (Boland & Cornelis 1998; Denecker *et al.* 2001; Ruckdeschel *et al.* 2001; Grobner *et al.* 2006; Thiefes *et al.* 2006; Autenrieth *et al.* 2007).

Bei YopT handelt es sich um eine Cysteinprotease. Dieses 35 kDa große Effektorprotein wirkt wie die meisten anderen Yops antiphagozytisch. Es spaltet den Geranyl-Geranyl-Cysteinrest der GTPasen der Rho Familie, welcher für die Verankerung in der Membran essentiell ist. Dadurch können die Zellen ihr Zytoskelett nicht mehr aufrecht erhalten (Iriarte & Cornelis 1998; Zumbühl *et al.* 1999; Sorg *et al.* 2001; Aepfelbacher *et al.* 2003; Shao & Dixon 2003; Aepfelbacher *et al.* 2005).

1.4.4 Chaperone

Jedes Proteintransportsystem besitzt charakteristische Transportsignale. Dies stellt sicher, dass nur spezifische Substrate erkannt und transportiert werden. Dieses Signal kann zum Beispiel als amino- oder carboxyterminales Signalpeptid vorliegen. Im Falle des Typ III Sekretionssystems konnte bisher kein eindeutiges Signal gefunden werden. Neben einem möglichen aminoterminalen Signalpeptid steht auch ein Signal auf RNA-Ebene zur Diskussion, das eine kotranslationale Koppelung des Transportes erfordern würde (Anderson & Schneewind 1997; Cheng *et al.* 1997; Anderson & Schneewind 1999; Aldridge & Hughes 2001; Ramamurthi & Schneewind 2002). Ein weiteres denkbare Transportsignal könnten die spezifischen Typ III Chaperone darstellen (Birtalan *et al.* 2002).

Für die meisten der Effektorproteine sind spezifische Chaperone bekannt, sogenannte Sycs (specific Yop chaperone). Hierzu gehören YopE, YopH, YopO und YopT. Die Chaperone heißen entsprechend SycE, SycH, SycO und SycT und gehören zu den Chaperonen der Klasse I, wobei SycO erst vor kurzem von Letzelter *et al.* (2006) beschrieben wurde (Wattiau *et al.* 1994;

Woestyn *et al.* 1996; Day & Plano 1998; Birtalan & Ghosh 2001; Page & Parsot 2002; Phan *et al.* 2004; Locher *et al.* 2005).

Klasse I Chaperone besitzen besondere charakteristische Eigenschaften. Das sind zum einen ein saurer isoelektrischer Punkt und zum anderen eine Größe von etwa 15 kDa. Sie bilden normalerweise Homodimere und besitzen kaum Sequenzhomologien untereinander. Auffällig ist jedoch, dass sie eine charakteristische Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen, welche man auch in verwandten Typ III Sekretionssystemen wiederfindet. Die Sycs binden im aminoterminalen Bereich der Effektoren. Diese Chaperonbindedomänen der einzelnen Effektoren sind nicht homolog zueinander und bestehen aus etwa 50-60 Aminosäuren. Ebenso wie die Struktur der Chaperone ist der Bindungsmodus konserviert. Die Chaperonbindedomäne des Yops wickelt sich im Komplex um das Chaperondimer herum.

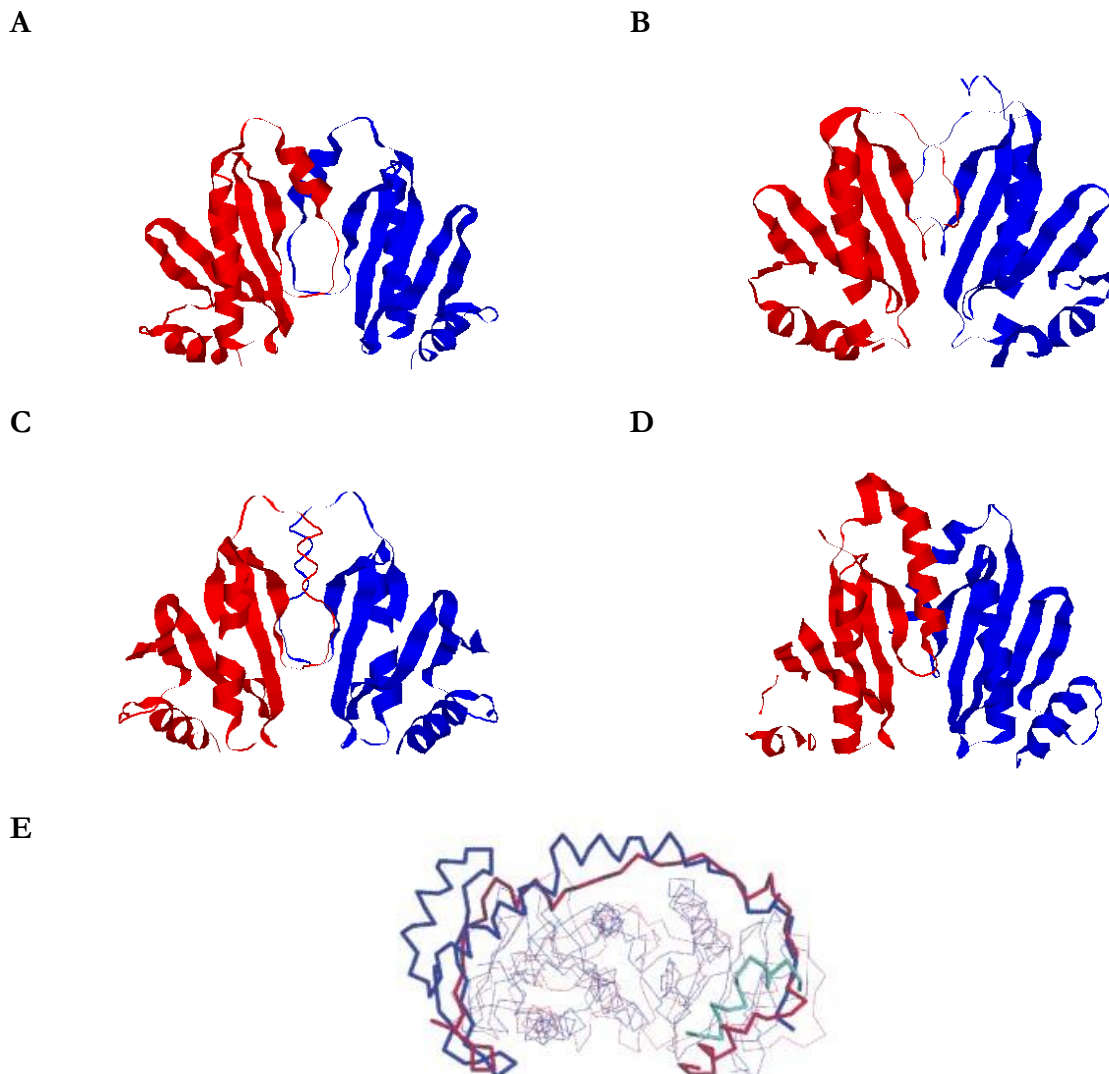


Abb.5: Chaperone des Yersinien Typ III Sekretionssystems

A: Dimermodell von SycH (aus 1TTW)

B: Kristallstruktur des SycT Dimers (2BSH)

C: Kristallstruktur des SycE Dimers (1K6Z)

D: Kristallstruktur des Heterodimers aus SycN (blau) und YscB (rot) (aus 1XKP)

E: Bindungsmodus der Chaperone und Ihrer Effektoren (Birtalan *et al.* 2002)

Aufgrund der konservierten Struktur wurden die Chaperone bereits als dreidimensionales Exportsignal diskutiert, welches zudem eine Hierarchie in die Reihenfolge der Effektortranslokation bringen könnte (Birtalan *et al.* 2002). Vor allem die Beobachtung, dass Effektoren ohne ihr zugehöriges Chaperon oder bei deletierter Chaperonbindedomäne nicht in die Wirtszelle transloziert werden, spricht für eine solche Aufgabe (Wattiau *et al.* 1994; Buttner & Bonas 2002). Bezeichnend ist zudem, dass nur die antiphagozytisch wirkenden Yops ein solches Chaperon der Klasse I besitzen. Offen bleibt dabei jedoch das Transportsignal der Effektoren YopM und YopP, für die bisher kein spezifisches Chaperon bekannt ist.

Außer den oben genannten Effektorchaperonen (Klasse I) gibt es noch weitere Chaperone. SycD ist ein Chaperon der Klasse II, das die Translokatoren YopB und YopD bindet (Neyt & Cornelis 1999). Zwar teilt es einige Eigenschaften mit denen der Klasse I, wie den sauren isoelektrischen Punkt und die Dimerisierung, jedoch gibt es vor allem strukturell große Unterschiede. Büttner *et al.* (2008) gelang es zuletzt die Kristallstruktur von SycD zu lösen.

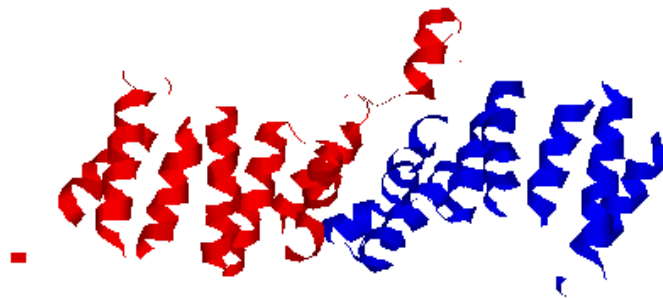


Abb.5: SycD Dimer (2VGX)

Neben einer möglichen Funktion als Transportsignal besitzen die Chaperone des Typ III Sekretionssystems weitere Funktionen. SycD verhindert durch seine Bindung an die Translokatoren deren Oligomerisierung (Neyt & Cornelis 1999). Zudem maskiert es wahrscheinlich die Transmembrandomänen der beiden Proteine, so dass diese in Lösung bleiben. Auch Klasse I Chaperone besitzen eine lösungsvermittelnde und stabilisierende Aufgabe (Parsot *et al.* 2003). Besonders deutlich konnte dies im Falle von SycE gezeigt werden, da YopE in Abwesenheit von SycE deutlich weniger im bakteriellen Cytosol vorliegt (Boyd *et al.* 2000). Daneben scheint SycH, welches noch zwei weitere Proteine des Typ III Sekretionssystems binden kann, eine zusätzliche regulative Rolle zu spielen (Cambronne *et al.* 2004).

1.4.5 ATPase YscN

Für die Translokation der Effektoren in die Wirtszelle ist die ATPase YscN essentiell. Im homologen Flagellensystem wurde jedoch gezeigt, dass zwar die Deletion der ATPase FliI alleine zur Nicht-Ausbildung der Flagellen führte, allerdings konnte der begeißelte Zustand durch die

zusätzliche Deletion des ATPase Regulators FliH wieder hergestellt werden (Minamino & MacNab 2000; Gonzalez-Pedrajo *et al.* 2002; Minamino *et al.* 2003; Minamino & Namba 2008; Paul *et al.* 2008).

YscN ist mit dem cytosolischen Teil des Basalkörpers assoziiert und besitzt keine eigene Membranbindedomäne (Woestyn *et al.* 1994; Jackson & Plano 2000; Blaylock *et al.* 2006). Da der Kanal, welcher durch die Nadelstruktur des Typ III Sekretionssystems führt, nur einen Durchmesser von etwa 2 nm misst, können die Effektoren nicht im gefalteten Zustand transloziert werden. Seit längerem war bekannt, dass die ATPase homologer Typ III Sekretionssysteme Chaperone und Effektoren binden kann. Akeda und Galan (2005) konnten zeigen, dass die ATPase InvC des Salmonellen T3SS Substrate unter ATP Hydrolyse entfalten kann. Zudem konnten sie Interaktionen der ATPase mit Chaperonen, Effektoren und deren Komplexen nachweisen.

1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten unterschiedliche Komponenten des Typ III Sekretionssystems rekombinant hergestellt und charakterisiert werden. Hierzu sollten die beiden bekanntermaßen miteinander wechselwirkenden Proteine LcrV und LcrG sowie zwei zu Beginn dieser Arbeit noch nicht weiter charakterisierte offene Leseraster orf155, später bekannt als SycO, und orf91b untersucht werden. Darüber hinaus sollten mit den rekombinant erhaltenen Proteinen Wechselwirkungsstudien durchgeführt werden. Dies sollte im Hinblick darauf geschehen, dass einige dieser Proteine möglicherweise in das noch nicht ganz verstandene regulatorische Netzwerk des Typ III Sekretionssystems eingebunden sind.

Um weitere Erkenntnisse über die Translokation der Substrate zu gelangen sollte zudem YscQ, genau genommen der cytosolische Teil des Proteins, rekombinant hergestellt werden und auf Interaktionen mit den Substraten und Chaperonen des Typ III Sekretionssystems untersucht werden.

Während die ersten Punkte Beiträge zum Verständnis und Ausmaßes des Regulationsnetzwerks liefern sollten, sollte die Untersuchung von YscQ einen Beitrag zur Aufklärung der noch nicht eindeutig bekannten Substraterkennung des Typ III Sekretionssystems leisten.

MATERIAL UND METHODEN

2. Material

2.1 Geräte

Verwendete Geräte sind nachfolgend aufgelistet.

Gerät	Modell	Firma
Analysenwaage	R160P, Pt 1200	Sartorius, Göttingen
Blot-Apparatur	Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Brutschrank	Typ B20	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät	GenePulser II Pulse Controller II	Bio-Rad, München
French Press	French Pressure Cell 40K	SLM Aminco
Filmentwickler	FPM-100A	Fujifilm, Düsseldorf
Geldokumentation	E.A.S.Y (Enhanced Analysis System)	Herolab, Wiesloch
PCR-Cycler	GeneAmp, PCR System 2400	Perkin Elmer, Rodgau
pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments, Kehl
Photometer	Ultraspec 3000	Amersham Biosciences
Pipetten	Pipetman P10-P1000	Gilson, Bad Camberg
Schüttlinkubator	Certomat BS-1	Braun Biotech
Proteinreinigungssystem	SMART System	Amersham Biosciences
Spannungsquellen	Power Pac 300	Bio-Rad, München
Sterilwerkbank	Herasafe HS 12	Heraeus, Hanau
Waage	Kern KB	Kern & Sohn, Balingen
Zentrifugen	3K30, 1K15 Sorvall RC5C	Sigma, Deisenhofen Kendro, Langensebold

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Antibiotika wurden über die Firmen Amersham, Bio-Rad, Invitrogen, Macherey-Nagel, MBI Fermentas, Merck, Qiagen, Roche Diagnostics, Roth und Sigma bezogen.

Für die Herstellung von Lösungen und Medien wurde entionisiertes oder bidestilliertes Wasser verwendet.

2.3 Weitere Materialien

Verwendete Enzyme stammten von Invitrogen oder MBI Fermentas. Antikörper wurden von Amersham, Becton Dickinson und Sigma erworben und Nährmedien über die Firma Difco. Verbrauchsmaterial aus Plastik wurde von Brand, Eppendorf, Becton Dickinson und Nunc bezogen.

2.4 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Stratagene
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS Cm ^r	Stratagene
<i>Yersinia enterocolitica</i>		
WA-314	Serotyp O:8, Biogruppe 1B mit pYV-Plasmid NaI ^r	Heesemann <i>et al.</i> (1984)
WA-314 Δ <i>yscM1</i>	<i>yscM1</i> -Mutante von WA-314 NaI ^r Km ^r	Konrad Trülsch
WA-314 Δ <i>yscM2</i>	<i>yscM2</i> -Mutante von WA-314 NaI ^r Km ^r	Konrad Trülsch
WA-314 Δ <i>yopO</i>	<i>yopO</i> -Mutante von WA-314 NaI ^r Km ^r	Konrad Trülsch
WA-314 Δ <i>yopP</i>	<i>yopP</i> -Mutante von WA-314 NaI ^r Km ^r	Konrad Trülsch
WA-314 Δ <i>yopOP</i>	<i>yopOP</i> -Mutante von WA-314 NaI ^r Km ^r	Konrad Trülsch
WA-314 Δ <i>orf91b</i>	<i>orf91b</i> -Mutante von WA-314 NaI ^r Km ^r	Konrad Trülsch
WA-C	plasmidloses Derivat von WA-314 NaI ^r	Heesemann <i>et al.</i> (1984)
WA-C pTTSS	WA-C mit plasmidcodiertem Sekretionsapparat Sp ^r	Trülsch <i>et al.</i> (2003)
WA-C pTTSS pACYC184- <i>orf155yopOyopP</i>	WA-C pTTSS mit Effektoren YopO, YopP und Chaperon SycO Sp ^r Cm ^r	Trülsch <i>et al.</i> (2003)
WA-C pTTSS pACYC184-Δ <i>orf155yopOyopP</i>	WA-C pTTSS mit Effektoren YopO, YopP Sp ^r Cm ^r Km ^r	Trülsch <i>et al.</i> (2003)

2.5 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
HeLa	humane Epithelzellen
J774	murine Makrophagen

2.6 Oligonukleotide

Name	Sequenz
<i>Primer für YscN</i>	
YscN_NdeI	GGAATTCCATATGCTCTCACTAGATCAGATACC
YscN_EcoRI	AAAGAATTCATGCTCTCACTAGATCAGATACC
YscN_NdeI_His ₆	CATATGCATCACCACCATCATCACATGCTCTCACTAGATC AGATACC
YscN_EcoRI_93	AAAGAATTCATGCATCAGGTTGGGGTGGG
YscN_NdeI_101	CATATGGAACATCTGCTGGGACAGGTG
YscN_NdeI_131	CATATGCAGGATGCCCCAGCTCCG
YscN_EcoRI_131	AAAGAATTCATGCAGGATGCCCCAGCTCCG
YscN_NdeI_His ₆ _TEV_d11	GGAATTCCATATGCATCACCACCATCATCACGAAAACCT GTACTTCCAAGGCATTGTAGGTAGCCG
YscN_NdeI_His ₆ _TEV_d14	GGAATTCCATATGCATCACCACCATCATCACGAAAACCT GTACTTCCAACGCCTAATCCAAATTAGAGG
YscN_92_His ₆ _SalI	GCCGACGTCGACTCACACTACCACTACCACTACGCTAGG AGATGTCCCTGTCCGGCTAACTTC
YscN_130_SalI	GCCGACGTCGACTCACACTACCACTACCACTACGCTAGG AGAATAAACTGGGTACCAAGCCGC
YscN_350_XhoI	CTCGAGGGCAGGGTAATGATTAGCTGC
YscN_STOP_XhoI	CCGCTCGAGTCATTTGGGTCAGCGTCTCC
YscN_STOP_SalI	GTCGACTTATTGGGTCAGCGTCTCCAATAAG
YscN_His ₆ _SalI	GCCGACGTCGACTCACACTACCACTACCACTACGCTAGG AGATTGGGTCAGCGTCTCCAATAAG
YscN_His ₆ _STOP_SalI	GTCGACTTAGTGATGATGGTGGTGATGTTGGGTCAGCG TCTCCAATAAG
YscN_FactorXa_His ₆ _STOP_XhoI	AAGGCCTCGAGTTAGTGATGATGGTGGTGATGACGACC TTCGATTTGGGTCAGCGTCTCCAATAAG
YscN_FactorXa_Arg ₅ _STOP_XhoI	AAGGCCTCGAGTTAGCGACGGCGACGACGACGACCTTC GATTTGGGTCAGCGTCTCCAATAAG
YscN_FactorXa_Strep_STOP_XhoI	AAGGCCTCGAGTTATTTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAA CGACCTTCGATTTGGGTCAGCGTCTCCAATAAG
YscN_Thrombin_His ₆ _STOP_XhoI	AAGGCCTCGAGTTAGTGATGATGGTGGTGATGGGATCC ACGCGGAACCAGTTGGGTCAGCGTCTCCAATAAG
YscN_Thrombin_Arg ₅ _STOP_XhoI	AAGGCCTCGAGTTAGCGACGGCGACGACGGGATCCACG CGGAACCAGTTGGGTCAGCGTCTCCAATAAG
YscN_Thrombin_Strep_STOP_XhoI	AAGGCCTCGAGTTATTTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA GGATCCACGCGGAACCAGTTGGGTCAGCGTCTCCAATA AG

Name	Sequenz
<i>Primer für SycO</i>	
SycO_NdeI_His ₆ _TEV	AATATT <u>CATATG</u> CATCACCACCATCATCACGAAAACCTG TACTTCCAAATGATTAACCTCAACCTTTACTGAG
SycO_Δ133-143_STOP_XhoI	AAT <u>CTCGAG</u> TTAAGTTTCTGCTGGTAAACTGACC
SycO_Δ135-143_STOP_XhoI	AAT <u>CTCGAG</u> TTAGGGGGCAGTTTCTGCTGG
<i>Primer für LcrG</i>	
LcrG_NdeI	<u>CATATG</u> AAATCTTCTCATTTTGATGAATA
LcrG_NdeI_His ₆ _TEV	AATATT <u>CATATG</u> CATCACCACCATCATCACGAAAACCTG TACTTCCAAATGAAATCTTCTCATTTTGATGAATA
LcrG_XhoI	<u>CTCGAGA</u> AATAATTTGCCCTCGCATCATC
LcrG_STOP_XhoI	AAT <u>CTCGAG</u> TTAAATAATTTGCCCTCGCATC
<i>Primer für YscO</i>	
YscO_NdeI	<u>CATATG</u> ATACGCCGCCTGCACCGG
<i>Primer für YscQ</i>	
YscQ_NdeI_His ₆ _TEV	AATATT <u>CATATG</u> CATCACCACCATCATCACGAAAACCTG TACTTCCAACCCAAACCATTTGACCGATTTG
<i>Primer für LcrD</i>	
LcrD_NdeI	<u>CATATG</u> AATCCCATGATCTTGAGTG
LcrD_NdeI_319	ATCAGT <u>CATATG</u> CTCAGCCGTAAGCAGAG
LcrD_EcoRI_319	AT <u>GAAATTC</u> GATGCTCAGCCGTAAGCAGAG
LcrD_XhoI	<u>CTCGAG</u> TAAGCAAACCTCGTCCAAGTGG
LcrD_STOP_SalI	ATCAG <u>TCGACT</u> CATAAGCAAACCTCGTCCAAGTG
<i>Primer für YopB</i>	
YopB_EcoRI	AT <u>GAAATTC</u> GATGAGTTCGTTGATAACCCATG
YopB_STOP_SalI	ATCAG <u>TCGACT</u> TAAACAGTATGGGGTCTGCC
<i>Primer für LcrR</i>	
LcrR_NdeI	<u>CATATG</u> ATGGAAGACCCTTTAATTCC
LcrR_XhoI	<u>CTCGAG</u> GGCAAAGCCGTTGTTTTGTCCG
<i>Primer für orf91b</i>	
orf91b_HA_BamHI	CGGGATCCTTAAGCGTAATCTGGAACATCATATGGGTA ATGATATTGCCGGTAAGGTTG
orf91b_XbaI_Promotor	CGTCTAGATTATCGTTATTTATCCGAATTTAG

2.7 Vektoren und Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
<i>Expressionsvektoren</i>		
pET21b	Amp ^r	Novagen
pET24b	Km ^r	Novagen
pET28a	Km ^r	Novagen
pGEX-6P3	Amp ^r	Amersham
pMAL-c2e	Amp ^r	New England BioLabs
pMAL-c2x	Amp ^r	New England BioLabs
pCDFDuet	Sm ^r	Novagen
pRSFDuet	Km ^r	Novagen
pWS	Amp ^r	Locher <i>et al.</i> (2005)
<i>Klonierungsvektoren</i>		
pGEM-T	Amp ^r	Promega
pMBL	Amp ^r	Genaxxon
pMOS	Amp ^r	Amersham
pACYC184	Cm ^r Tet ^r	New England BioLabs
<i>weitere Vektoren</i>		
pJL3	Cm ^r	
<i>Plasmide</i>		
pET21b- <i>yscN</i>	YscN-His ₆ Amp ^r	Susanna Richter
pMAL-c2e- <i>yscN</i>	MBP-YscN Amp ^r	Susanna Richter
pET21b- <i>yscN</i> ₉₃₋₄₃₉	YscN ₉₃₋₄₃₉ -His ₆ Amp ^r	diese Arbeit
pET21b- <i>yscN</i> ₁₀₁₋₄₃₉	YscN ₁₀₁₋₄₃₉ -His ₆ Amp ^r	diese Arbeit
pMal-c2x- <i>yscN</i> ₉₃₋₄₃₉	MBP-YscN ₉₃₋₄₃₉ Amp ^r	diese Arbeit
pET21b- <i>yscN-thrombin-his₆</i>	YscN-Thrombin-His ₆ Amp ^r	diese Arbeit
pET21b- <i>yscN-thrombin-arg₅</i>	YscN-Thrombin-Arg ₅ Amp ^r	diese Arbeit
pET21b- <i>yscN-thrombin-strep</i>	YscN-Thrombin-Strep Amp ^r	diese Arbeit
pET28a- <i>yscN-thrombin-strep</i>	His ₆ -Thrombin-YscN-Thrombin-Strep Km ^r	diese Arbeit
pWS- <i>yscN-thrombin-strep</i>	YscN-Thrombin-Strep Amp ^r	diese Arbeit
pET21b- <i>yscN-factorXa-strep</i>	YscN-FactorXa-Strep Amp ^r	diese Arbeit
pET28a- <i>yscN-factorXa-strep</i>	His ₆ -Thrombin-YscN-FactorXa-Strep Km ^r	diese Arbeit
pWS- <i>yscN-factorXa-strep</i>	YscN-FactorXa-Strep Amp ^r	diese Arbeit
pET21b- <i>his₆-tev-yscN</i> ₁₂₋₄₃₉	His ₆ -TEV-YscN ₁₃₋₄₃₉ Amp ^r	diese Arbeit
pET21b- <i>his₆-tev-yscN</i> ₁₅₋₄₃₉	His ₆ -TEV-YscN ₁₅₋₄₃₉ Amp ^r	diese Arbeit
pET24b- <i>yscL</i>	YscL-His ₆ Km ^r	Susanna Richter

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pGEX-6P3- <i>yscL</i>	GST-YscL Amp ^r	Susanna Richter
pCDF- <i>yscQ</i>	YscQ Sm ^r	diese Arbeit
pET24b- <i>yscQ-his₆</i>	YscQ-His ₆ Km ^r	Annika Schmid
pQE30- <i>lcrV</i>	His ₆ -LcrV Amp ^r	Andreas Roggenkamp
pWS- <i>lcrV</i>	LcrV Amp ^r	Susanna Richter
pQE30- <i>lcrG</i>	His ₆ -LcrG Amp ^r	Andreas Roggenkamp
pET21b- <i>lcrG</i>	LcrG-His ₆ Amp ^r	diese Arbeit
pET24b- <i>lcrG</i>	LcrG-His ₆ Km ^r	diese Arbeit
pET21b- <i>lcrGnativ</i>	LcrG Amp ^r	diese Arbeit
pET24b- <i>lcrGnativ</i>	LcrG Km ^r	diese Arbeit
pET21b- <i>syncD</i>	SycD Amp ^r	diese Arbeit
pWS- <i>orf155</i>	SycO Amp ^r	Susanna Richter
pET28a- <i>syncO</i>	His ₆ -Thrombin-SycO Km ^r	diese Arbeit
pET24b- <i>syncO</i>	SycO Km ^r	diese Arbeit
pET24b- <i>his₆-tev-syncO_{Δ133-143}</i>	His ₆ -TEV-SycO _{Δ133-143}	diese Arbeit
pWS- <i>secB</i>	SecB Amp ^r	Susanna Richter
pGEX- <i>orf91b</i>	GST-orf91b Amp ^r	Konrad Trülzsch
pET28a- <i>orf91b</i>	His ₆ -Thrombin-orf91b Km ^r	diese Arbeit
pACYC184- <i>orf91b-ha</i>	orf91b-HA mit nativem Promotor Cm ^r	diese Arbeit
pACYC184- <i>yopM-ha</i>	YopM-HA mit nativem Promotor Cm ^r Km ^r	Katy Niedung

2.8 Nährmedien

Nährmedien wurden bei 121°C 20 Minuten lang autoklaviert. Für feste Nährböden wurde 15 g Agar pro 1 l Medium zugesetzt.

Luria Bertani (LB)-Medium:

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g Natriumchlorid
- ad 1 l Aqua_{dest}
- pH auf 7.4 - 7.6 mit 1 M Natronlauge einstellen

Brain-Heart-Infusion (BHI):	37 g BHI ad 1 l Aqua _{dest}
SOC-Medium:	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0.3 g Natriumchlorid 0.09 g Kaliumchlorid 1.02 g Magnesiumchlorid-hexahydrat 1.23 g Magnesiumsulfat-heptahydrat ad 500 ml Aqua _{dest} 20 mM steril filtrierte Glucose nach Autoklavivorgang

3. Methoden

3.1 Kultivierung

E. coli wurden bei 37°C und *Y. enterocolitica* bei 27°C in Flüssigmedium in einem Schüttelinkubator (160-180 rpm) oder im Brutschrank auf Agarnährboden angezogen.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Stämme in 16 % Glycerin bei -80°C eingefroren.

Verwendete Antibiotika und deren Konzentration im Medium sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Alle wurden vor Verwendung steril filtriert.

Antibiotikum	eingesetzte Konzentration
Ampicillin (Amp) in Aqua _{dest} .	100 µg/ml
Carbenicillin (Cb) in 50 % Ethanol	250 µg/ml
Chloramphenicol (Cm) in 70 % Ethanol	20 µg/ml
Kanamycin (Km) in Aqua _{dest} .	50 µg/ml
Nalidixinsäure (Nal) in 0.5 M Natriumhydroxid-Lösung	60 µg/ml
Spectinomycin (Sp) in Aqua _{dest} .	50 µg/ml
Streptomycin (Sm) in Aqua _{dest} .	100 µg/ml
Tetracyclin (Tet) in 70 % Ethanol	20 µg/ml

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um benötigte DNA in ausreichendem Maße zu erhalten, wurde die Polymerase-Kettenreaktion genutzt. Diese ist eine schnelle und einfache *in vitro*-Methode, welche die Amplifikation aus kleinsten DNA-Mengen ermöglicht. Mittels einer thermostabilen Polymerase und zwei gegensätzlich orientierten Oligonukleotiden kann durch die Denaturierung der ursprünglichen DNA und Hybridisierung mit den Primern in mehreren Zyklen das gewünschte Fragment vervielfacht werden.

Die PCR wurde standardgemäß in einem Gesamtvolumen von 25 µl oder 50 µl durchgeführt. Üblicherweise setzte sich das Reaktionsgemisch wie folgt zusammen:

- 1 µl Templat-DNA
- 2.5 µl Taq-Puffer (10x)
- 2.5 µl dNTP's
- 0.25 µl je Primer
- 0.2 µl Taq-Polymerase
- 18.3 µl Aqua_{dest.}

Die Amplifikation wurde in PCR-Geräten durchgeführt. Dabei wurde für die Hybridisierung eine Temperatur abhängig von der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Elongationszeit wurde von der Größe des gewünschten DNA-Fragments bestimmt.

Ein typisches Protokoll hierfür sah folgendermaßen aus:

- 5 min 94°C (Denaturierung)
- 20 - 40 Zyklen: 30 sec 94°C (Denaturierung)
45 sec 56°C (Hybridisierung)
1 min 72°C (Elongation)
- 7 min 72°C (Elongation)
- 4°C

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und gereinigt.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei lassen sich DNA-Fragmente durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld nach Größe separieren. Als Größenstandard diente die 1 kb plus DNA Ladder von Invitrogen.

Die Agarosekonzentration in den Gelen variierte je nach Größe der zu trennenden DNA von 1 % bis 1.5 %. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE aufgekocht und in die passende Kammer gegossen. Die DNA-Probe wurde mit Auftragspuffer gemischt und bei 80 V mit TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und unter UV-Licht dokumentiert.

Im Falle einer präparativen Elektrophorese wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mittels NucleoSpin Extract II von Macherey-Nagel isoliert.

Elektrophoresepuffer (TAE): 40 mM Tris
 20 mM Essigsäure
 2 mM EDTA
 pH 8.2

Auftragspuffer (10x): 0.25 % Bromphenolblau
 30 % Glycerin
 in TAE

Färbelösung: 1 µg Ethidiumbromid pro 1 ml Aqua_{dest.}

3.2.3 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte Sequenzen einer doppelsträngigen DNA und können diese schneiden. Abhängig vom Enzym entstehen dabei Enden mit einem Überhang, sogenannte klebrige Enden, oder Enden ohne Überhänge, sogenannte glatte Enden.

Die Restriktionsansätze wurden bei der entsprechenden vom Hersteller angegebenen Temperatur, meist 37°C, im Thermoblock durchgeführt. Hierzu wurden normalerweise 5 Units des Enzyms und der jeweilige Puffer eingesetzt.

3.2.4 Dephosphorylierung

Um Religationen zu verhindern, wurden teilweise linearisierte Vektoren und DNA-Fragmente dephosphoryliert. Dazu wurde die DNA mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) von Roche Diagnostics mit dem dazugehörigen Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 65°C inaktiviert.

3.2.5 Ligation

Mithilfe von T4 Ligase lässt sich DNA mit kompatiblen Enden miteinander verknüpfen. Dabei wird die Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxylende und dem 5'-Phosphatende der DNA katalysiert.

Um Inserts möglichst effektiv in einen Vektor zu ligieren, wurden Überschüsse bis zum zwanzigfachen verwendet und mit der Ligase und entsprechendem Puffer über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.2.6 Elektrokompente Zellen

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium mit 4 ml einer Bakterien-Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bei 27°C (*Y. enterocolitica*) beziehungsweise 37°C (*E. coli*) bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0.6$ angezogen und anschließend bei 4°C und 4000 rpm 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 50 ml Aqua_{dest.} und einmal mit 5 ml 10 % Glycerin gewaschen mit jeweiligen Zentrifugationsschritten von 10 min mit 4000 rpm bei 4°C. Abschließend wurde das Bakterienpellet in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in 100 µl Aliquots bei -80°C weggefroren.

3.2.7 Elektroporation

Zur Transformation wurden 50 µl der entsprechenden Bakterien mit 1-2 µl DNA in einer auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvette gemischt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2500 V, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF. Die Zellen wurden im sofortigen Anschluss daran in 1 ml SOC-Medium gegeben und 30 min bei 27°C (*Y. enterocolitica*) beziehungsweise 37°C (*E. coli*) im Thermoblock unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurden sie auf Agarplatten mit geeigneten Antibiotika über Nacht bebrütet.

3.2.8 Isolierung von DNA

Plasmide wurden mittels unterschiedlicher Kits der Firma Macherey-Nagel gereinigt.

Für kleinere Mengen DNA wurden 4 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert. Die Isolierung erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit nach Anweisung des Herstellers. Für größere Mengen aus 200 ml Kulturen wurde NucleoBond PC100 verwendet.

Die gereinigte DNA wurde bei -20°C nach photometrischer Bestimmung der Konzentration eingefroren.

3.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 etwa 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die DNA-Konzentration wurde in einer Quarzküvette ($d = 1 \text{ cm}$) mit einer Verdünnung von 1:50 gegen $\text{Aqua}_{\text{dest.}}$ gemessen. Verunreinigungen durch Proteine konnten mit einer zusätzlichen Messung bei 280 nm abgeschätzt werden.

Ein Quotient OD_{260}/OD_{280} von etwa 1.8 entspricht dabei einer sehr reinen DNA. Je größer die Proteinverunreinigung, umso niedriger wird der Wert. Ist dieser hingegen größer als 2.0, spricht dies für eine Kontamination mit RNA.

3.2.10 Sequenzierung

Um die Sequenz von entsprechend klonierter DNA zu kontrollieren, wurde etwa 1 μg Plasmid-DNA zur Sequenzierung zur Firma Agowa geschickt. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mithilfe vom Chromas und BLASTN analysiert.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) kann zur Analyse von Proteingrößen (denaturierende Gelelektrophorese) und Proteininteraktionen (native Elektrophorese) verwendet werden. Die Trennung der Proteine erfolgt in beiden Fällen im elektrischen Feld mittels eines Polyacrylamidgels.

SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine denaturierende Elektrophorese zur Analyse von Proteingrößen. Natriumdodecylsulfat (SDS) dient hier als Detergens, welches die Proteine aufgrund der Zerstörung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen denaturiert. Zur Spaltung von Disulfidbrücken wird zusätzlich ein Reduktionsmittel wie β -Mercaptoethanol benötigt. Wichtig bei dieser Elektrophorese ist, dass das negativ geladene Dodecylsulfat, welches sich an die Proteine anlagert, im Überschuss vorliegt. Dadurch wird die Eigenladung der Proteine vernachlässigbar und eine konstante Ladungsverteilung erreicht. Diese Tatsache ermöglicht erst eine Auftrennung im elektrischen Feld allein nach Proteingröße. Kleine Proteine können schneller durch das Gel hindurch wandern als große Proteine.

Das verwendete Gelsystem bestand aus der Kombination eines Sammelgels (6 % Acrylamid) und eines Trenngels (11-16 % Acrylamid). Das Sammelgel zu Beginn dient mit seinem pH von 6.8 zur Konzentrierung der Probe, um später eine bessere Trennung zu ermöglichen. Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt, um eine komplette Denaturierung zu gewährleisten. Als Größenstandard wurde der Prestained Protein Ladder von der Firma Invitrogen verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte 40-45 min bei 160-180 V.

Sammelgel	6 % Acrylamid
	0.16 % Bisacrylamid
	100 mM Tris pH 6.8
	0.2 % SDS
	0.4 % TEMED
	0.08 % APS
Trenngel	11 - 16 % Acrylamid
	0.29 - 0.43 % Bisacrylamid
	370 mM Tris pH 8.8
	0.2 % SDS
	0.2 % TEMED
	0.04 % APS
Auftragspuffer	100 mM Tris pH 8.8
	10 % Glycerin
	10 % SDS
	100 mM Magnesiumchlorid
	5 % β -Mercaptoethanol
	0.005 % Bromphenolblau
Laufpuffer	3.02 g Tris
	14.24 g Glycin
	0.1 % SDS
	ad 1 l Aqua _{dest}

Native Gelelektrophorese

Im Gegensatz zur denaturierenden SDS-PAGE gibt es auch native Gelsysteme zum Nachweis von Proteininteraktionen. Um native Bedingungen zu erhalten dürfen die Proben nicht erhitzt und weder SDS noch ein starkes Reduktionsmittel verwendet werden. Dadurch erfolgt eine Trennung nicht nur nach Größe und Form eines Proteins beziehungsweise Komplexes, sondern auch nach der Ladung. Diese Eigenladung ist pH-abhängig, weswegen bei unterschiedlichem pH die Proteine ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen.

Aus diesem Grunde wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet. Als Puffer dienten zum einen HEPES für ein System bei pH 7 und Tris für pH 8.

In beiden Fällen erfolgte die Elektrophorese 2-3 h bei 80-100 V.

Nativgel (HEPES)	6 % Acrylamid 0.16 % Bisacrylamid 25 mM HEPES 5 mM Natriumchlorid 0.2 % TEMED 0.04 % APS
Laufpuffer (HEPES)	25 mM HEPES 5 mM Natriumchlorid
Auftragspuffer (HEPES)	25 mM HEPES 5 mM Natriumchlorid 10 % Glycerin 0.005 % Bromphenolblau
Nativgel (Tris)	8 % Acrylamid 0.21 % Bisacrylamid 400 mM Tris 0.2 % TEMED 0.14 % APS
Laufpuffer (Tris)	5 mM Tris 40 mM Glycin

Auftragspuffer (Tris)	5 mM Tris
	40 mM Glycin
	10 % Glycerin
	0.005 % Bromphenolblau

3.3.2 Proteindetektion

Coomassiefärbung

Zur Detektion der Proteine im Polyacrylamidgel wurden diese 30 min in einer Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel anschließend mit Zellstofftüchern in Wasser über Nacht geschwenkt.

Coomassiefärbelösung:	25 % Isopropanol
	10 % Essigsäure
	0.05 % Coomassie Brilliant Blue R250

Western Blot

Eine sensitivere Methode zur Detektion ist der Western Blot, der jedoch das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen das Protein voraussetzt. Hierzu werden nach einer Gelelektrophorese die Proteine auf eine Membran transferiert, anschließend mit spezifischen Antikörpern gekoppelt und mittels Chemolumineszenz oder kolorimetrisch detektiert.

Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde eine Semi-Dry-Apparatur verwendet. Um unspezifische Wechselwirkungen zu vermeiden, wurde die Membran anschließend für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C blockiert. Nach einem Waschschrift wurde die Membran mit dem Antikörper gegen das Antigen in Blockierlösung 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum gewaschen. Als nächstes wurde ein Sekundäantikörper, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet und meist mit Meerrettichperoxidase gekoppelt war, in Blockierlösung analog wie der erste zur Membran gegeben. Nach einem abschließenden Waschen wurde die Chemolumineszenz mit dem ECL Reagenz der Firma Amersham gestartet und unmittelbar daran mittels Röntgenfilmen detektiert.

Um ein weiteres Protein nachweisen zu können, wurde nach dem Detektionsschritt die Membran 1-2 h bei Raumtemperatur gestrippt. Hierzu wurde eine Stripplösung verwendet, welche durch darin vorhandenes DTT die Disulfidbrücken der Antikörper spaltete und durch SDS denaturiert und ablöst. Anschließend wurde wie oben beschrieben mit dem Antikörper gegen das zweite Protein verfahren.

Blockierlösung:	0.5 % Tween 20 1 % Milchpulver 1 % Bovine Serum Albumin in PBS
Waschlösung:	0.5 % Tween 20 in PBS
Stripplösung:	2 % SDS 50 mM DTT 62.5 mM Tris

Ponceaufärbung

Zur Kontrolle des Proteintransfers auf die Membran wurden die Proteine mittels einer Ponceaulösung reversibel angefärbt. Dazu wurde die Membran 15 min in der Lösung inkubiert und anschließend wieder mit Wasser entfärbt.

Ponceaulösung:	2 % Ponceau 3 % Trichloressigsäure
----------------	---------------------------------------

3.3.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford basiert darauf, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue G 250 durch die Bindung des Farbstoffes an Proteine von 465 nm zu 595 nm verschiebt.

Hierzu wurde eine vorgefertigte Lösung der Firma Bio-Rad verwendet. Zu 800 µl Puffer wurden 200 µl der Lösung sowie 1-5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Als Standard zur Kalibrierung diente BSA.

3.3.4 Nachweis von Proteininteraktionen mittels kovalenter Vernetzung

Um starke bis schwache Proteininteraktionen nachzuweisen, können Proteine chemisch vernetzt werden. Dazu setzt man sogenannte Crosslinker ein. Diese Verbindungen bestehen aus zwei reaktiven Gruppen in einem definierten Abstand zueinander. Bei den reaktiven Gruppen handelt es sich normalerweise um Säurederivate mit einer guten Abgangsgruppe, geeignet für die Reaktion mit zwei frei zugänglichen Lysinen. Da Lysin eine relativ häufig vorkommende

Aminosäure ist, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Lysine von miteinander wechselwirkenden Proteinen in unmittelbarer Nachbarschaft befinden, groß. Der Abstand der reaktiven Gruppen zueinander hingegen ist so klein, dass nur Lysine in einem Protein oder einem Komplex verknüpft werden können.

Hierzu wurden die Proteine mit etwa einem zwanzigfachen Überschuss Crosslinker bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von entsprechender Menge Tris pH 7.5 gestoppt. Als Crosslinker wurden 2,2'-Dithiobis(succinimidyl-propionat) (DSP) beziehungsweise Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat) (EGS) von der Firma Pierce eingesetzt. Da DSP ein durch Reduktionsmittel spaltbarer Crosslinker ist, durfte der Auftragspuffer für SDS-PAGE nur 0.5 % β -Mercaptoethanol beinhalten.

3.4 Herstellung rekombinanter Proteine

3.4.1 Expression

Rekombinante Proteine wurden normalerweise in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Hierzu wurde eine Einzelkolonie in einer 20-100 ml Kultur über Nacht bei 37°C angezogen. Am folgenden Tag wurde damit eine 1 l Kultur im Verhältnis 1:50 beimpft oder 5 l im BIOSTAT B Fermenter der Firma B. Braun Biotech International. Bei einer OD_{600} von 0.6 wurde die Expression durch die Zugabe von IPTG induziert. Die finale Konzentration betrug 0.2-1 mM IPTG. Abhängig vom gewünschten Protein wurde die Kultur bei 20°C, 27°C oder 37°C weiter inkubiert. Nach 6-18 h wurden die Zellen 15 min bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde gleich aufgeschlossen oder bei -20°C eingefroren.

3.4.2 Zellaufschluss

Im Falle von geringen Zellmengen erfolgte die Lyse chemisch durch BugBuster der Firma Novagen nach Anleitung.

Der Aufschluss größerer Mengen hingegen geschah mithilfe einer French Press. Hierzu wurde das Zellpellet in 30 ml geeignetem Puffer suspendiert und dreimal bei einem Druck von 1000 psi physikalisch aufgeschlossen.

Um Zellfragmente und unlösliche Proteine abzutrennen wurde abschließend 30 min bei 4°C mit 20000 g zentrifugiert. War das Protein löslich, wurde der Überstand weiter zur Reinigung verwendet. Anderenfalls wurden die Einschlusskörper gelöst, denaturierend gereinigt und rückgefaltet.

3.4.3 Reinigung von Einschlusskörpern

Die meisten verwendeten Proteine waren löslich und konnten aus dem Überstand des Zellaufschlusses gereinigt werden. Die ATPase YscN hingegen war komplett unlöslich und lag nach der Lyse in Form von Einschlusskörpern vor. Diese wurden danach zweimal mit Waschpuffer A (50 mM Tris, 60 mM EDTA, 1,5 M Natriumchlorid, 6 % Triton X 100) und dreimal mit Waschpuffer B (50 mM Tris, 60 mM EDTA) zur Entfernung von Zellwandresten und anderen Bestandteilen gewaschen. Anschließend wurden sie in 8 M Harnstoff gelöst und mittels IMAC (Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie) wie unten beschrieben unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Die Rückfaltung erfolgte über Nacht im Dialyseschlauch bei 4°C.

3.4.4 Ammoniumsulfatfällung

Bei rekombinanten Proteinen, die in ihrer nativen Form ohne einen Affinitätstag vorlagen, musste nach dem Zellaufschluss und der Zentrifugation das Protein aus dem Überstand gefällt werden. Dies erfolgte durch Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bis zur optimalen Ammoniumsulfatkonzentration, welche zuvor im kleinen Maßstab ermittelt worden war. Alles wurde 2 h bei 4°C langsam gerührt und anschließend bei 20000 g zentrifugiert. Das ausgefallene Protein wurde nochmals mit der geeigneten Ammoniumsulfatlösung gewaschen und danach in einem geeigneten Puffer (normalerweise 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.6) gelöst.

3.4.5 Ionenaustauschchromatographie

Nach einer Ammoniumsulfatfällung wurde ein Ionenaustauschchromatographieschritt auf einer MonoQ-Säule der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Hierzu wurde die Säule zunächst mit Puffer A (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.6) äquilibriert. Nach Durchlauf der aufgetragenen Proteinlösungsmenge wurde mit 10 ml Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte durch 100 ml eines linearen Gradienten von 0-100 % Puffer B (50 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM DTT, pH 7.6). Die Reinigung erfolgte an einer ÄKTA der Firma Amersham Biosciences.

3.4.6 Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Eine preiswerte Methode zur Reinigung rekombinanter Proteine stellt die Affinitätsreinigung mittels Nickelchelate-Nitriloacetatsäure (Ni-NTA) dar. Dabei ist die NTA an Agarose gebunden und somit immobilisiert. Das komplexierte Nickelion kann mit seinen freien Bindungsstellen einen Hexahistidinrest (His-Tag) am Protein selektiv binden. Die Elution findet unter nativen

Bedingungen durch Verdrängen mittels Imidazol statt. Im Falle von denaturierenden Bedingungen kann dies auch durch die Änderung des pH-Wertes erfolgen. Dabei werden durch einen sauren pH die Histidine im His-Tag protoniert, so dass diese nicht mehr ans Nickelion binden können.

Dieser Chromatographieschritt wurde meist auf einer 5 ml HisTrap-Säule der Firma Amersham Biosciences an einer ÄKTA durchgeführt. Häufig verwendete Puffer bestanden meist aus 10-100 mM Tris und 100-1000 mM Natriumchlorid. Es wurden jedoch auch Phosphatpuffer genutzt mit meist 50 mM. Der Zusatz von DTT als Reduktionsmitteln wurde auf höchstens 2 mM begrenzt, da sonst die Nickelionen reduziert wurden.

Nach dem Auftrag wurde die Säule mit dem Auftragspuffer mit Imidazolzusätzen bis 40 mM gewaschen, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten mit dem Auftragspuffer mit 500 mM Imidazol.

3.4.7 Reinigung mittels Glutathion-Sepharose

Manche Proteine wurden nicht mit einem His-Tag sondern als Fusionsprotein mit Glutathion S-Transferase (GST-Tag) hergestellt. GST bindet an ein Tripeptid Glu-Cys-Gly, auch Glutathion (GSH) genannt. Für die Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine gibt es an Sepharose immobilisiertes Glutathion. Diese Methode ist deutlich besser als eine IMAC, da diese selektiver ist, jedoch auch teurer.

Für die Reinigung wurde Glutathion-Sepharose der Firma Amersham Biosciences genutzt. Der lösliche Überstand nach dem Aufschluss wurde mit den Beads 2-18 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit Auftragspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Puffer, der 15 mM Glutathion enthielt.

3.4.8 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie, auch Gelfiltration genannt, trennt Proteine und Proteinkomplexe nach ihrer Größe. Große Proteine durchlaufen die Säule dabei schneller als kleinere. Über die Geschwindigkeit, mit der Proteine bekannter Größe die Säule passieren, kann ebenso die Größe des Proteins oder Proteinkomplexes abgeschätzt werden.

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex 75 oder einer Superdex 200, abhängig von der Größe des zu reinigenden Proteins, an einer ÄKTA durchgeführt. Als Laufpuffer wurde ein beliebiger Puffer verwendet, in welchem das Protein anschließend aufbewahrt werden sollte.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultivierung

J774 Makrophagen und HeLa Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) oder RPMI (Roswell Park Memorial Institute) der Firma Invitrogen mit 10 % FCS (Fötales Kälberserum) und 1 % L-Glutamin kultiviert. Der Brutschrank war auf 37°C mit 5 % Kohlenstoffdioxid und 90 % Luftfeuchtigkeit eingestellt. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen, mit einem Zellschaber von den Flaschen abgelöst und verdünnt.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen zweimal mit kaltem Medium gewaschen und anschließend tropfenweise mit auf Eis vorgekühltem Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) versetzt. Die Zellen wurden daraufhin in vorgekühlte Kryoröhrchen 1 h bei -20°C und hiernach bei -80°C gelagert. Nach einem weiteren Tag konnten sie abschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

3.5.2 Infektion mit Yersinien

Für Infektionsversuche wurden die Zellen einen Tag zuvor in eine 24-well Zellkulturplatte überführt. Sollte die Auswertung mikroskopisch stattfinden, so wurden die Zellen auf Deckgläsern in der Zellkulturplatte ausgesät. In jede Vertiefung wurden 50000 Zellen, die zuvor mit einer Neubauerzählkammer bestimmt worden waren, gegeben und über Nacht bebrütet, so dass sich am Infektionstag etwa 100000 Zellen in jeder Vertiefung befanden. Kurz vor der Infektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium überschichtet.

Eine Übernachtskultur von Yersinien wurde am Tag der Infektion in frischem BHI Medium verdünnt und auf eine OD_{600} von ungefähr 0.1 eingestellt. Die Bakterien wurden daraufhin 2 h bei 37°C inkubiert und soweit mit Zellkulturmedium verdünnt, bis die OD_{600} genau 0.1 betrug. Um eine MOI von 50, also 50 Bakterien auf eine Zelle, zu erreichen mussten 50 µl der Yersiniensuspension pro Vertiefung eingesetzt werden. Nach der Zugabe wurden die Bakterien 5 min bei 800 rpm auf die Zellen zentrifugiert und anschließend 30 min bis 5 h im Brutschrank inkubiert.

3.5.3 Gentamycinassay

Bei einem Gentamycinassay wurden HeLa Zellen 90 min mit Yersinien infiziert.

Um die Anzahl intrazellulärer Bakterien zu bestimmen, wurden die Bakterien 90 min im Brutschrank mit den HeLa Zellen inkubiert. Die extrazellulären Yersinien wurden daraufhin 1 h bei 37°C mit Gentamycin abgetötet und anschließend mit PBS gewaschen. Die HeLa Zellen wurden mit 50 µl einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und nach der Zugabe weiterer 950 µl 0.1 % Triton X 100 in PBS und 15 min bei Raumtemperatur in ein 1.5 ml Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde daraufhin viermal im Verhältnis 1:10 verdünnt. Jeweils 100 µl der unverdünnten Suspension, der zweiten und der letzten Verdünnung wurden ausplattiert und über Nacht bei 27°C inkubiert.

Die Anzahl extrazellulär anhaftender Yersinien wurde auf anderem Wege bestimmt. Hierzu wurden die Bakterien mit den Zellen 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Ablösung der HeLa Zellen und Herstellung der Verdünnungen erfolgte wie oben beschrieben.

Am folgenden Tag wurde die Anzahl der Yersinienkolonien ausgezählt und damit die Anzahl der intrazellulären und extrazellulären Bakterien bestimmt.

3.5.4 Fixierung

Wurden die Zellen auf Deckgläsern bebrütet, um nach der Infektion mikroskopisch untersucht zu werden, so mussten diese vor der Immunfluoreszenzfärbung auf den Gläsern fixiert werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet.

Eine Methode war die Fixierung durch Methanol. Dazu wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit Methanol überschichtet und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde es wieder entfernt und die Deckgläser mit PBS gewaschen.

Eine andere Methode bestand darin, die Zellen 15 min bei Raumtemperatur mit Formaldehyd (4 % in PBS) zu fixieren. Auch in diesem Fall wurde abschließend mit PBS gewaschen.

3.5.5 Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Fixierung mussten für eine Immunfluoreszenzfärbung die Zellen permeabilisiert werden. Dies wurde durch die Einwirkung von PBS mit 0.2 % Triton X 100 (PBS-T) erreicht. Hierzu wurden die Zellen mit PBS-T 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS-T mit 10 % Humanserum blockiert. Nach einer Stunde bei 37°C wurde der erste Antikörper, meist monoklonaler Mausantikörper gegen den HA-Tag (Aminosäurereste 98-106 des Hämagglutinin des humanen Influenzavirus), in PBS-T mit 2.5 % Humanserum zu den Zellen gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurde genauso mit dem zweiten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet war und an einen

Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, verfahren. Nach dieser Färbung wurde normalerweise mit DAPI der Zellkern gefärbt. Dazu wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit DAPI-Färbelösung versetzt und danach gewaschen. Die Deckgläser wurden mit einem Tropfen Moviol umgekehrt auf ein Objektglas gelegt und mindestens eine halbe Stunde im Kühlschrank gekühlt. Hiernach konnten die Deckgläser mit Nagellack fixiert werden.

Die mikroskopischen Untersuchungen fanden an einem Gerät der Firma Olympus statt.

ERGEBNISSE

4. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, verschiedene bislang wenig verstandene Komponenten des Typ III Sekretionssystems von *Yersinia enterocolitica* zu untersuchen. Hierzu sollten zunächst die jeweiligen Gene kloniert und exprimiert werden, um das kodierte Protein rekombinant zu erhalten. Neben dem Nadelspitzenprotein LcrV, welches regulatorische Funktionen besitzt, sollte auch LcrG, ein negativer Regulator des Typ III Sekretionssystems und bekannter Bindungspartner von LcrV, näher untersucht werden. Zudem sollten zwei offene Leseraster, *orf155* und *orf91b*, charakterisiert werden, deren Funktion unbekannt war.

Zur näheren Untersuchung, welche Proteine in der Substraterkennung wichtig sind, wurde außerdem YscQ, genaugenommen der carboxyterminale cytosolische Teil, welches als mögliche erste Bindungsstelle vor der Entfaltung der Transportsubstrate in Frage kam, rekombinant hergestellt.

Durch Bindungsstudien sowie Kristallisationsversuche sollten mögliche Interaktionspartner identifiziert werden und deren Bindungsmodus miteinander herausgefunden werden. Durch diese Arbeit sollte ein Beitrag zur Aufklärung des Transportmechanismus sowie regulatorischen Netzwerks des Typ III Sekretionssystems geleistet werden.

4.1 LcrV

LcrV ist ein multifunktionales Protein. Neben der immunmodulatorischen Funktion war die Tatsache, dass LcrV sezerniert wird und auf der Bakterienoberfläche lokalisiert ist, schon seit langem bekannt (Nilles *et al.* 1997; Nilles *et al.* 1998; Sarker *et al.* 1998; Debord *et al.* 2001; Matson & Nilles 2001; Sing *et al.* 2005). Die genaue Lokalisation des Proteins konnte jedoch erst vor kurzem von der Gruppe von Guy Cornelis anhand elektronenmikroskopischer Bilder gezeigt werden (Mueller *et al.* 2005; Mota 2006). Während bei LcrV aus *Y. pestis* eine Oligomerisierungsgleichgewicht gezeigt werden konnte (Derewenda *et al.* 2004), waren für LcrV aus *Y. enterocolitica* keine genaueren Daten bekannt.

Zur Klärung dieser Frage, sollte zu Beginn dieser Arbeit der Oligomerisierungsgrad von LcrV untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein aminoterminal mit einem Hexahistidintag versehenes LcrV (His-LcrV) genutzt, das für immunologische Untersuchungen in der Gruppe von Andreas Sing am Max von Pettenkofer-Institut verwendet wurde.

Bei der Reinigung eluierte His-LcrV im Gelfiltrationsschritt als ein Peak. Dies war insofern interessant, da LcrV aus *Y. pestis* sowie aus *Y. pseudotuberculosis* stets in mehreren oligomeren Formen vorlag und dadurch in mehreren Peaks eluierte wie bei Derewenda *et al.* (2004) beschrieben. Ob es sich im vorliegenden Fall um ein Monomer oder ein Dimer handelte, konnte infolge der hohen Proteinkonzentration und fehlender Markerproteine nicht eindeutig nachgewiesen werden. Aus diesem Grunde wurde eine analytische Gelfiltration mit Markerproteinen bekannter Größe auf einer Superdex 75 Säule durchgeführt. Hierzu wurden Rinderalbumin (BSA, 66 kDa) und Carboanhydrase (CA, 29 kDa) als Größenstandards verwendet. His-LcrV selbst besitzt eine Größe von 38 kDa, weswegen ein Monomer kurz vor der Carboanhydrase, ein Dimer kurz vor dem Albumin eluieren sollte.

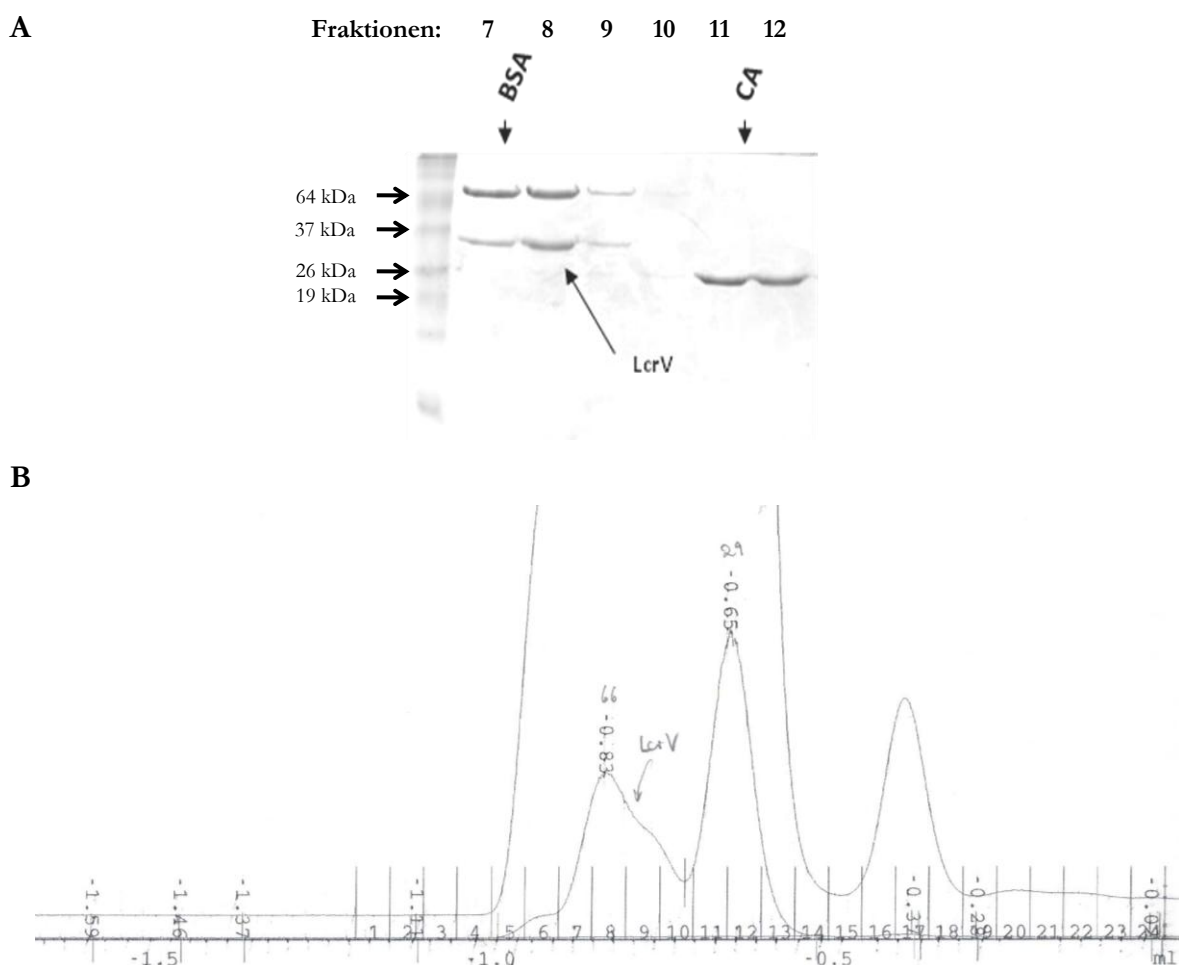


Abb.7: Gelfiltration von LcrV mit Markerproteinen Rinderalbumin (BSA, 66 kDa) und Carboanhydrase (CA, 29 kDa) mit 2 M NaCl und 25 mM Phosphatpuffer bei pH 8

A: SDS-PAGE der Fraktionen 7-12

B: Chromatogramm der analytischen Gelfiltration

LcrV lief, wie in der obigen Abbildung (Abb.7 B) zu sehen, deutlich schneller als ein erwartetes Monomer, aber langsamer als ein mögliches Dimer. Dieses Ergebnis konnte somit nicht eindeutig nachweisen, ob es sich um Monomere oder Dimere handelt. Zur Klärung auf einem anderen Wege sollte das Protein im SDS-PAGE untersucht werden.

Da LcrV einen Cysteinrest besitzt und dadurch die Möglichkeit eines kovalent gebundenen Dimers gegeben ist, wurde es sowohl unter nicht-reduzierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE unterzogen. Dabei konnte gezeigt werden, dass besonders in älteren Proben, welche länger im Kühlschrank lagerten, ein beträchtlicher Teil als oxidiertes Dimer vorliegt (siehe Abb.8 A und B).

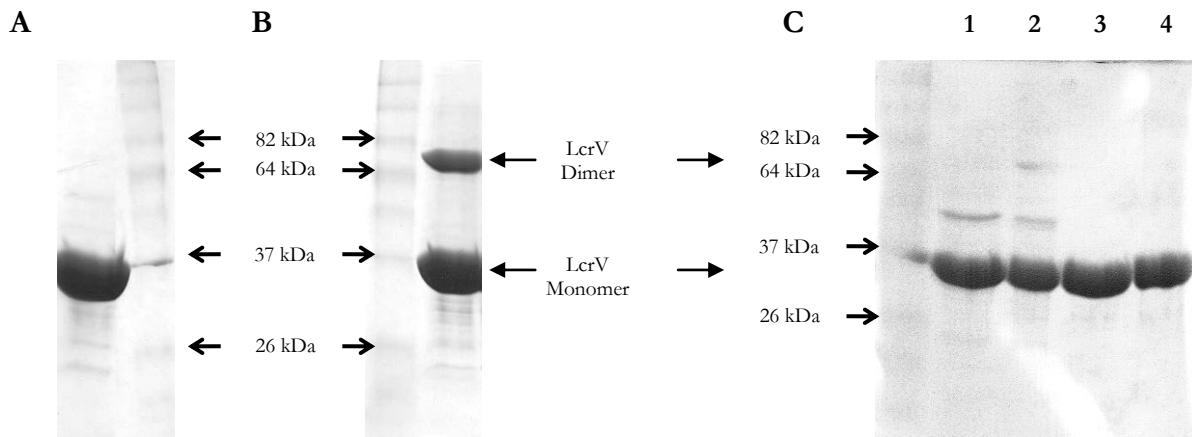


Abb.8:

- A: His-LcrV (mehrere Monate alte Probe) aufgetragen unter reduzierenden Bedingungen
- B: His-LcrV (mehrere Monate alte Probe) aufgetragen unter nicht-reduzierenden Bedingungen
- C: frisch präparierte LcrV-Proben unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen:
 1: natives LcrV (red.), 2: natives LcrV (nicht-red.), 3: His-LcrV (red.), 4: His-LcrV (nicht-red.)

Für weitere Versuche zur Klärung des Oligomerisierungsgrades wurde LcrV in Nativgelsystemen bei pH 8 und pH 7 untersucht und desweiteren mit einem Kupplungsreagenz, einem sogenannten Crosslinker, vernetzt. Zur Kontrolle, ob His-LcrV sich ebenso verhält wie natives nicht getaggetes LcrV, wurde letzteres auf das Nativgel bei pH 8 aufgetragen. Natives LcrV war ohne einen Affinitätstag kloniert worden und wurde durch Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration erhalten.

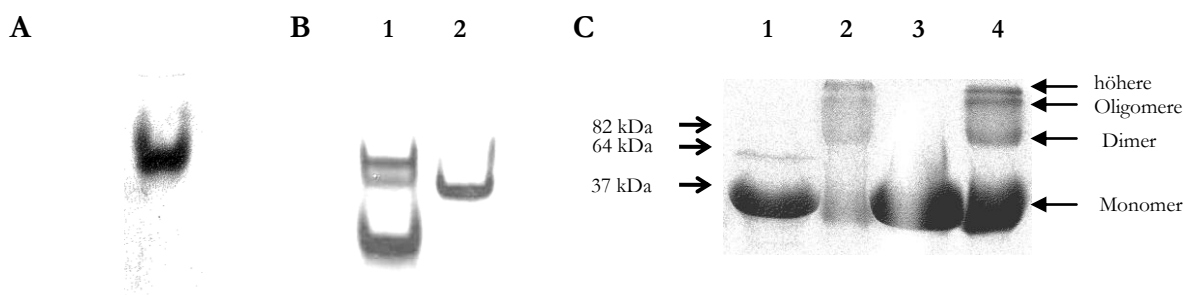


Abb.9:

- A: Nativgel (HEPES, pH 7)
- B: Nativgel (Tris, pH 8)
 1: His-LcrV 2: natives LcrV
- C: Crosslinking mit DSP (SDS-PAGE)
 1: natives LcrV, 2: natives LcrV (mit DSP), 3: His-LcrV, 4: His-LcrV (mit DSP)

Wie in den oben gezeigten Gelen zu sehen ist, läuft His-LcrV unter Nativgelbedingungen bei pH 7 als Einzelbande (Abb.9 A) und liegt somit nur in einer oligomeren Form vor. Bei einem

basischeren pH von 8 hingegen kann man zwei Banden erkennen (Abb.9 B, Spur 1), was jedoch bei nativem LcrV ohne Hexahistidintag nicht zu beobachten ist (Abb.9 B, Spur 2).

Bei Inkubation des Proteins mit dem Crosslinker DSP konnte man in der denaturierenden Gelelektrophorese mehrere unterschiedliche Oligomere nachweisen (siehe Abb.9).

Da in Gelsystemen durch das elektrisch angelegte Feld sehr harsche Bedingungen vorliegen, kann es sein, dass diese nicht immer den Zustand in nativer Umgebung widerspiegeln. Aus diesem Grunde sollte LcrV mit einer weiteren Methode untersucht werden. In Kooperation mit Manfred Rössle bestand die Möglichkeit, am DESY in Hamburg Röntgenkleinwinkelstreuanalysen (small angle X-ray scattering, abgekürzt SAXS) durchzuführen. Hierbei werden die Proteine in Lösung Röntgenstrahlen ausgesetzt. Diese werden an den Proteinen abgelenkt und bilden ein Streumuster. Aus diesen Bildern ist es dann möglich, eine dreidimensionale Raumstruktur zurückzurechnen, die diese Streubilder verursacht.

Für die Messungen wurde neben His-LcrV auch natives LcrV vermessen. Die Umrechnung der Streumuster ergab beide Male die in der unteren Abbildung gezeigte räumliche Form. Aufgrund der Größe konnte dabei ein Monomer ausgeschlossen werden.

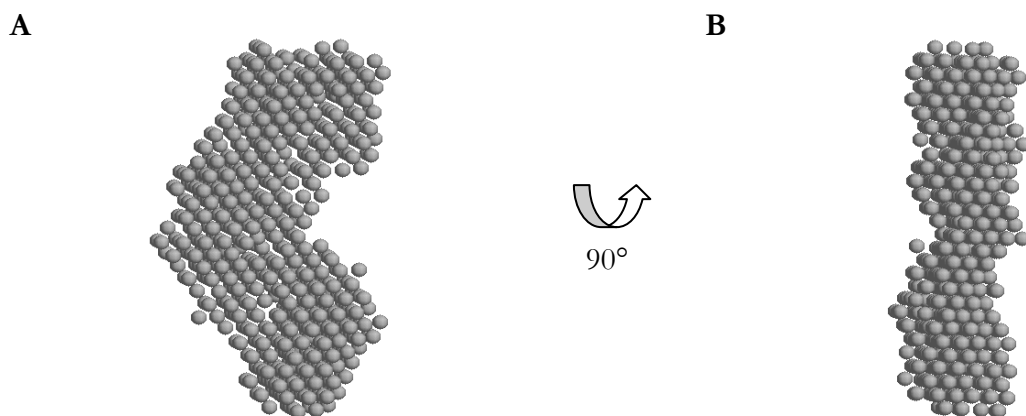


Abb.10:
Dreidimensionale Form des LcrV-Dimers, berechnet aus dem Streumuster aus SAXS-Messungen

Alle Experimente wiesen von Beginn an darauf hin, dass LcrV in Lösung hauptsächlich als Dimer vorliegt. Mittels SAXS Messungen konnte diese Tatsache jedoch endgültig gezeigt werden. Die Kupplungsexperimente zeigten zwar auch das Vorhandensein unterschiedlicher Oligomere, diese scheinen in Lösung jedoch nicht stabil zu sein. Kristallisationsversuche in Kooperation mit der Gruppe von Michael Groll waren zwar erfolgreich (siehe Abb.11), doch konnte keine Auflösung erhalten werden, um eine Strukturaufklärung auf atomarer Ebene durchzuführen.

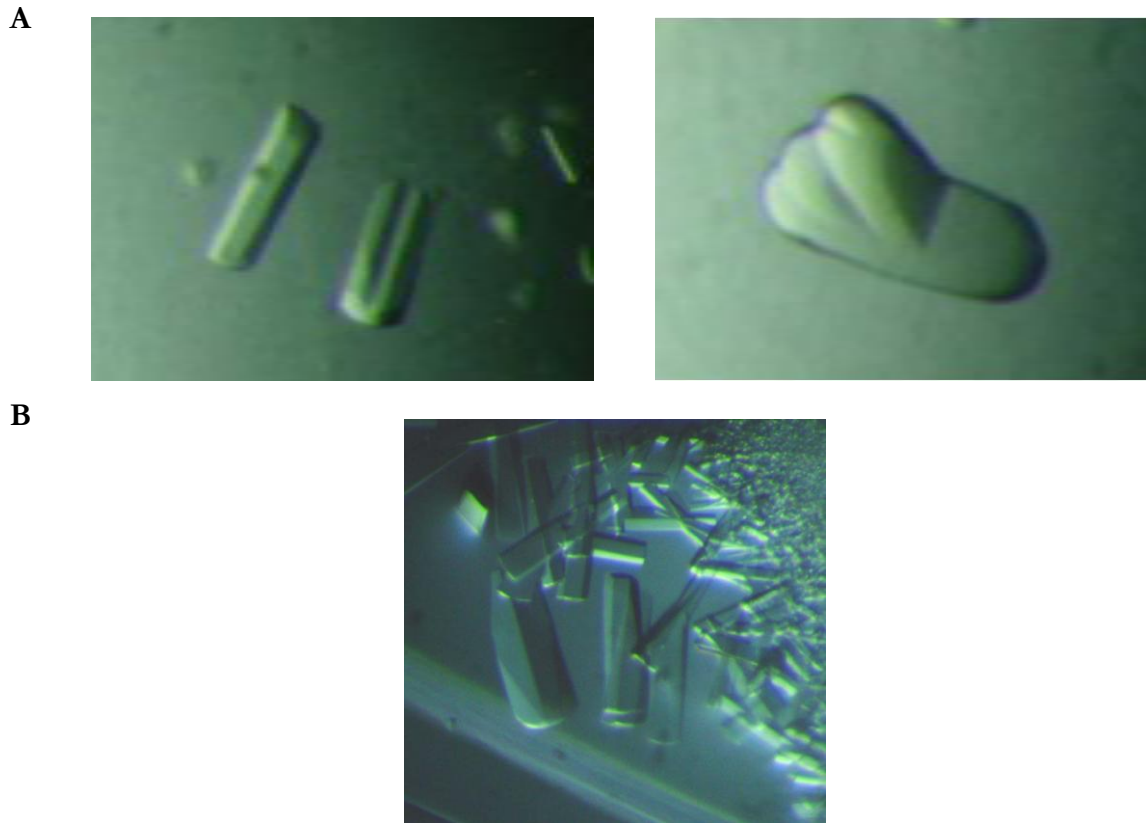


Abb.11: LcrV Kristalle

A: His-LcrV

B: natives LcrV

4.2 LcrG

Ein bereits bekannter und wichtiger Interaktionspartner von LcrV ist der negative Regulator LcrG. Zu Beginn dieser Arbeit war die Interaktion nur aufgrund eines Hefe-2-Hybridsystems charakterisiert worden (Nilles *et al.* 1997). Das Gen *lcrG* liegt auf demselben Operon wie *lcrV*, zusammen mit den beiden Translokatoren YopB und YopD sowie deren Chaperon SycD. Es wird vermutet, dass LcrV durch die Bindung an LcrG dessen repressive Wirkung aufhebt und dadurch die Sekretion ermöglicht (Debord *et al.* 2001; Matson & Nilles 2001). Ob dies durch eine vermehrte Expression von LcrV stattfindet und in welchem Verhältnis die beiden Proteine miteinander wechselwirken war bisher jedoch nicht bekannt.

Aus diesem Grunde sollte die Interaktion weiter untersucht werden. Hierzu wurde zunächst LcrG mit einem aminoterminalen Hexahistidintag rekombinant hergestellt. Daneben wurde parallel LcrG mit einem carboxyterminalen Histidintag und in nativer Form kloniert. Das aminoterminal modifizierte Protein konnte nach der Reinigung auf bis zu 10 mg/ml konzentriert werden.

Zur Klärung, ob das 10 kDa große LcrG selbst oligomerisiert, wurde das Protein mit Kupplungsreagenzien versetzt und anschließend auf SDS-PAGE aufgetragen (Abb.12). Dabei

konnte man sehen, dass LcrG vor allem mit DSP (Abb.12 A Spur 3), welches eine längere Linkerregion besitzt, besser reagiert als mit EGS (Abb.12 A Spur 2).

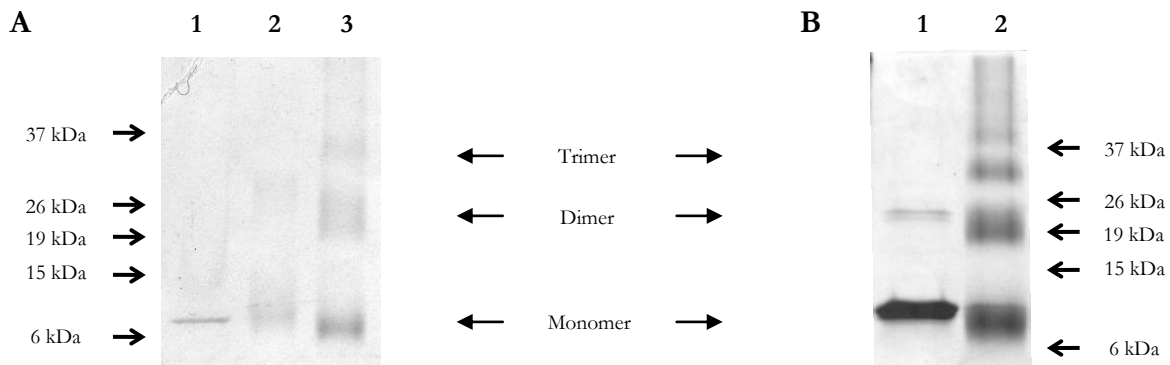


Abb.12: Crosslinking von unterschiedlichen Mengen LcrG-His mit unterschiedlichen Kupplungsreagenzien
 A: 1: LcrG-His, 2: LcrG-His mit EGS, 3: LcrG-His mit DSP
 B: 1: LcrG-His, 2: LcrG-His mit DSP

Neben möglichen höheren Oligomeren ist hier eindeutig ein Dimer zu erkennen. Dies konnte ebenso in der Gelfiltration bei der Reinigung beobachtet werden (nicht gezeigt).

Die Interaktion von LcrG mit LcrV wurde mittels Kupplungsversuchen und Nativgelen untersucht. Dazu wurde von beiden rekombinanten Proteinen dasjenige verwendet, das aminoterminal einen Histidintag besaß (siehe Abb.13).

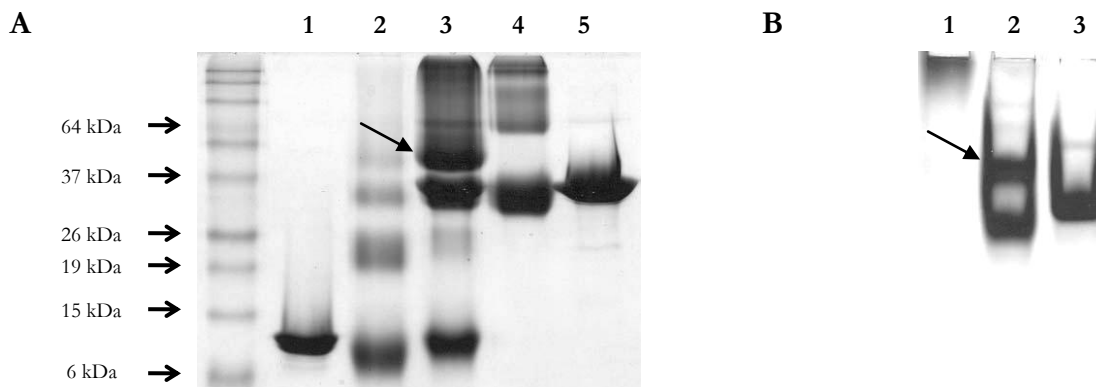


Abb.13: Interaktion von His-LcrG mit His-LcrV
 A: Crosslinking von LcrG mit LcrV (SDS-PAGE)
 1: LcrG, 2: LcrG mit DSP, 3: LcrG mit LcrV und DSP, 4: LcrV mit DSP, 5: LcrV mit DSP
 B: Nativgel (Tris, pH 8), LcrG besitzt einen isoelektrischen Punkt über 8, weswegen es nicht ins Gel läuft
 1: LcrG, 2: LcrV, 3: LcrG mit LcrV

Beide Versuche zeigten eindeutig die Interaktion der beiden Proteine. Im Kupplungsversuch konnte man zudem sehen, dass das Verhältnis beider Partner zueinander 1:1 beträgt, da die Proben denaturiert aufgetragen wurden (Abb.13 A Spur 3, markierte Bande).

Eine Koexpression und anschließende Reinigung des LcrG-His/LcrV Komplexes konnte zusätzlich dieses Ergebnis bekräftigen. In Abbildung 14 B sind aufeinanderfolgende Proben einer analytischen Gelfiltration von LcrG-His/LcrV aufgetragen. Der Komplex eluierte wie erwartet deutlich früher als das Markerprotein Carboanhydrase. Auffällig war, dass die Expression von LcrG mit einem carboxyterminalen Histidintag und LcrV in nativer Form die besten

Komplexausbeuten ergab. Kombinierte man hingegen LcrG in nativer Form mit LcrV mit aminoterminalen Histidintag, so war die Menge des gereinigten Komplexes sehr viel geringer und zum anderen war viel mehr LcrG vorhanden, welches bei der Reinigung in der abschließenden Gelfiltration als weiterer Peak nach dem Komplex eluierte (nicht gezeigt).

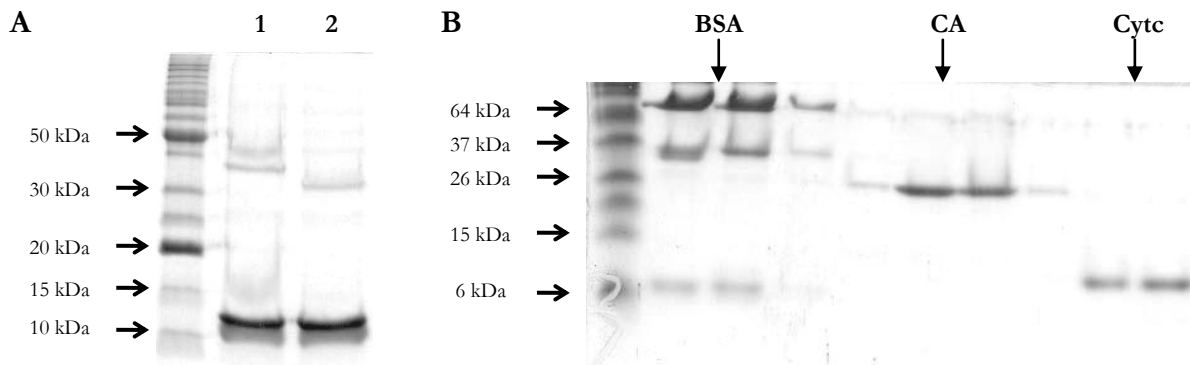


Abb.14:

A: Elution der Koexpression von LcrG-His mit nativem LcrV sowie verkürztem LcrV

1: LcrG-His mit nativem LcrV, 2: LcrG-His mit LcrV Δ 2-27,323

B: Gelfiltration des LcrG/V-Komplexes (10 kDa + 38 kDa) mit Markerproteinen BSA (66 kDa), CA (29 kDa) und Cytc (12 kDa)

Um eine dreidimensionales Bild des LcrG-Dimers als auch des LcrG/LcrV-Komplexes zu erhalten, wurden am DESY in Hamburg SAXS-Messungen durchgeführt. In der unteren Abbildung kann man beide Homodimere sowie den Komplex der beiden Proteine sehen. Dass LcrG als Dimer in Lösung vorliegt, konnte mit diesen Messungen zusätzlich bestätigt werden sowie der 1:1-Komplex mit LcrV. Hinzu kommt, dass aus der dreidimensionalen räumlichen Struktur deutlich wird, dass LcrG vermutlich nur an eine „Seite“ von LcrV bindet. Dies bestätigt vorhandene Ergebnisse in der Literatur, in denen bestimmte Bereiche von LcrV beschrieben wurden, die für die Bindung mit LcrG notwendig sind.

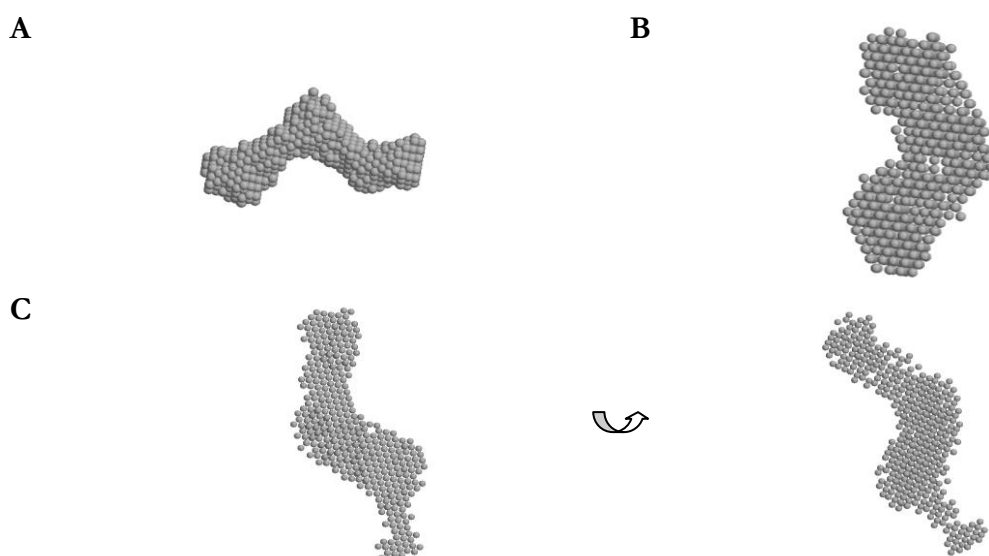


Abb.15: Berechnete räumliche Strukturen aus SAXS-Messungen

A: Räumliche Struktur des LcrG-Dimers

B: Räumliche Struktur des LcrV-Dimers

C: Räumliche Struktur des LcrG/V Komplexes

Neben LcrG, einem negativen Regulator des Typ III Sekretionssystems, gibt es unterschiedliche weitere Proteine mit regulatorischen Funktionen, welche zusammen ein großes Netzwerk bilden (Schmid *et al.* 2006; Wilharm *et al.* 2007). Eines dieser Proteine ist das Chaperon der Translokatoren, das 20 kDa große SycD. Von besonderem Interesse war dieses Protein, da das dazugehörige Gen auf demselben Operon liegt wie *lcrG*.

Eine Interaktion konnte mithilfe eines Kupplungsexperimentes und entsprechenden Immunoblots gezeigt werden (siehe Abb.16). Die im Coomassie gefärbten Gel deutlich zu erkennende zusätzliche Bande (Abb.16 A) konnte in den dazugehörigen Immunoblots mit Antikörpern gegen LcrG (Abb.16 B) beziehungsweise SycD (Abb.16 C) eindeutig identifiziert werden.

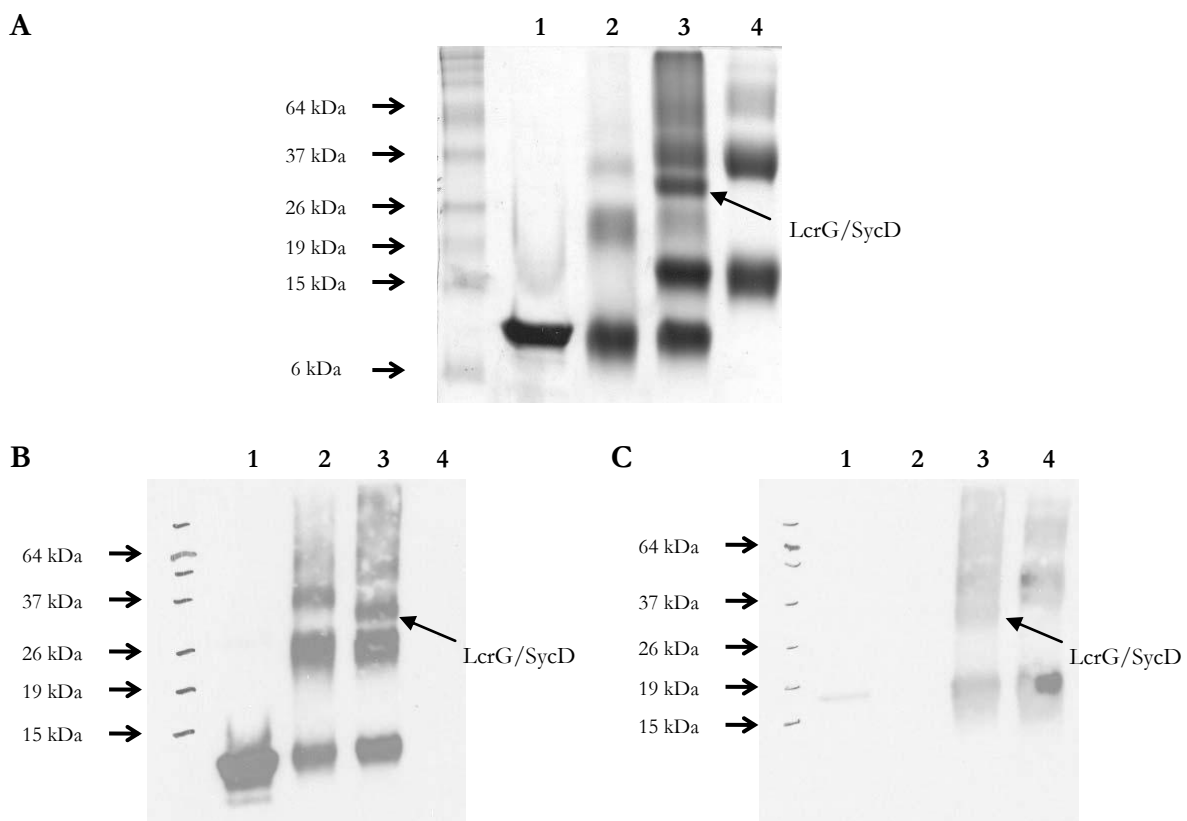


Abb.16: Crosslinking von His-LcrG mit SycD-His

1: LcrG, 2: LcrG mit DSP, 3: LcrG mit SycD und DSP, 4: SycD mit DSP

A: Coomassiefärbung

B: Immunoblot mit α -LcrG

C: Immunoblot mit α -SycD nach Detektion mit α -LcrG und anschließendem Strippen mit DTT

Ein Nachweis der Interaktion in der analytischen Gelfiltration war jedoch nicht möglich, da beide Proteine nahezu gleichzeitig von der Säule eluierten, so dass auf diesem Wege ein Komplex nicht gezeigt werden konnte (nicht abgebildet). Auch eine Koexpression der beiden Proteine, wobei jeweils eines von beiden carboxyterminal mit einem Hexahistidintag versehen worden war, konnte kein eindeutiges Ergebnis liefern, da beide Proteine die Tendenz besaßen, bereits im

nativen Zustand ohne entsprechenden Affinitätstag auf der Nickelchelate-Nitriloacetatsäure-Säule zu adhären.

Dass jedoch der LcrG/SycD-Komplex deutlich weniger stabil ist als der von LcrG mit LcrV, konnte in einem Nativgelsystem gezeigt werden (siehe Abb.17 A). Die Tatsache, dass die Summe der Bandenmuster der Einzelproben dem Bandenmuster der gemeinsam inkubierten Proteine entspricht, weist darauf hin, dass SycD den Komplex nicht aufbrechen kann. Dies konnte auch in der Gelfiltration gezeigt werden (siehe Abb.17 B und C).

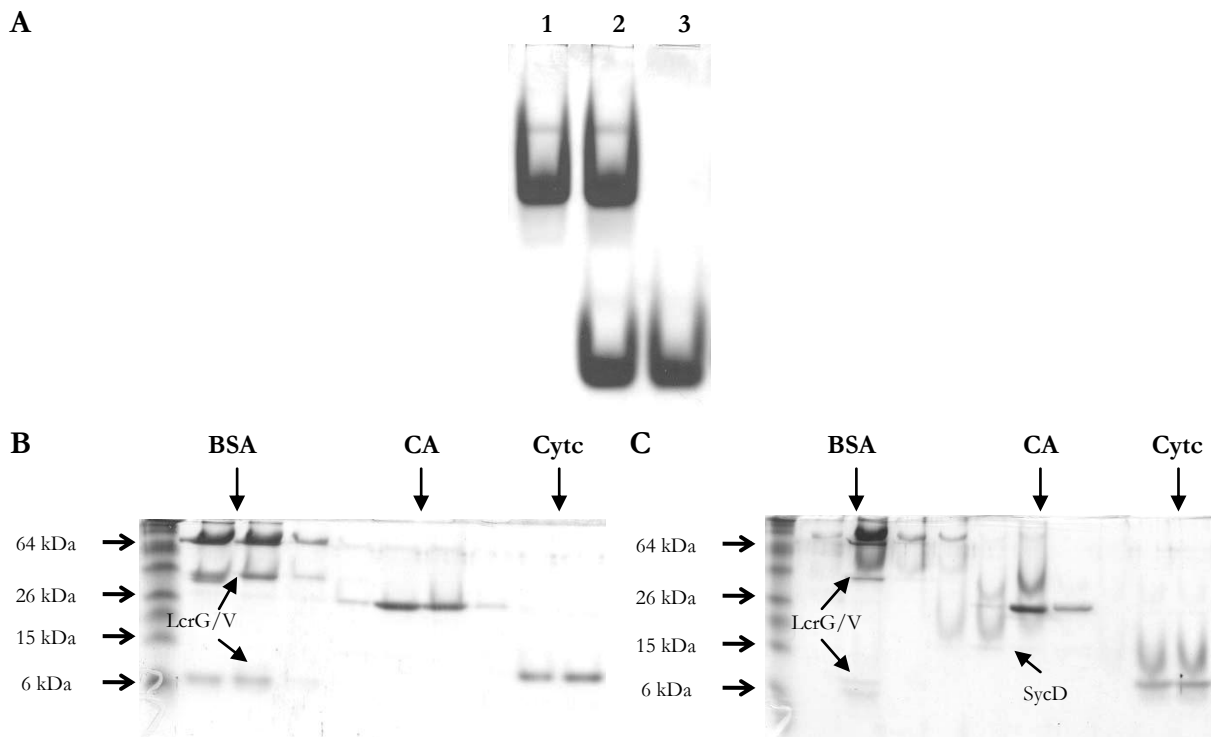


Abb.17:

A: Nativgel des LcrG/V Komplexes und SycD

1: LcrG/V, 2: LcrG/V mit SycD, 3: SycD

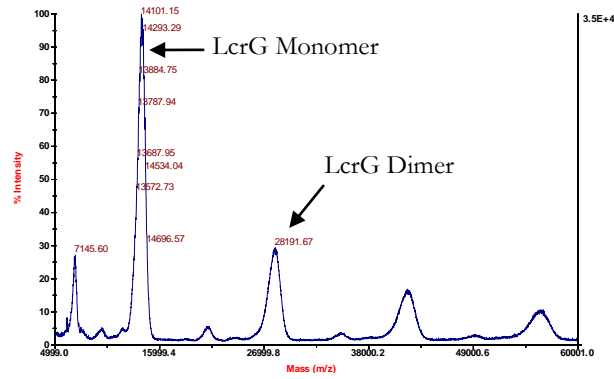
B: Gelfiltration des LcrG/V Komplexes

C: Gelfiltration des LcrG/V Komplexes mit SycD

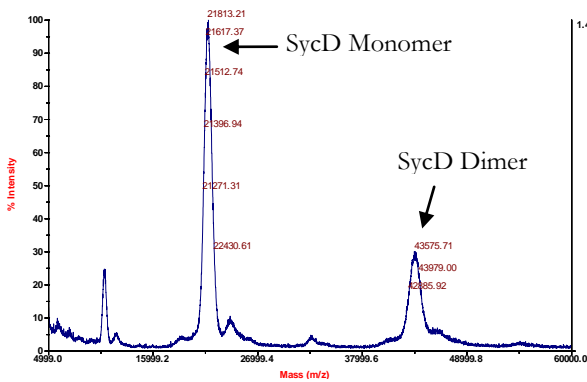
Außer dem Translokatorchaperon SycD sind vermutlich auch die anderen Chaperone in dem regulatorischen Netzwerk miteinander verknüpft. Inwiefern diese auch mit LcrG wechselwirken, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Hierzu wurden die Chaperone SycH, SycO, SycE und SycT verwendet. Die Analyse mittels Nativgel erbrachte keine Hinweise auf eine Interaktion zwischen LcrG und den genannten Chaperonen (nicht gezeigt) und Kupplungsreaktionen konnten aufgrund der ähnlichen Molekulargewichte nicht zu einem eindeutigen Ergebnis führen (nicht gezeigt). Um diese Problematik zu umgehen, wurden stattdessen die miteinander vernetzten Proteine einzeln und in den jeweiligen Kombinationen massenspektrometrisch untersucht. Hierzu wurden diese analog zur Analyse mittels SDS-PAGE mit einem Crosslinker inkubiert. Für die Auswertung wurden die Spektren der einzeln gekoppelten Proteine mit denen der gemischten Proben verglichen. Die daraus resultierenden

Unterschiede ergaben, dass LcrG mit allen Chaperonen wechselwirkt. Nur das Chaperon SycH konnte im gemeinsamen Kupplungsversuch nicht wiedergefunden werden. Für den LcrG/SycD-Komplex ergab sich ein Verhältnis von 1:1. Die anderen Chaperone hingegen scheinen auch im Komplex mit LcrG als Dimer vorzuliegen (siehe Abb.18).

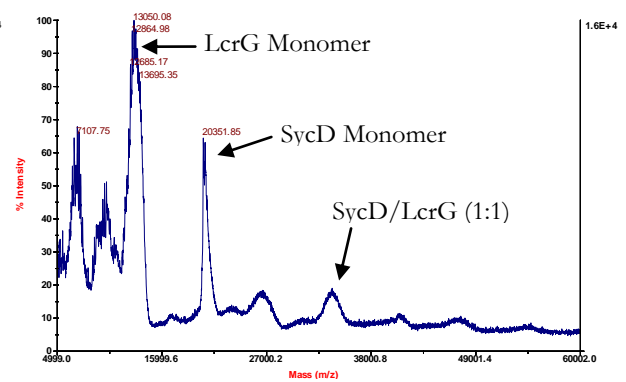
A



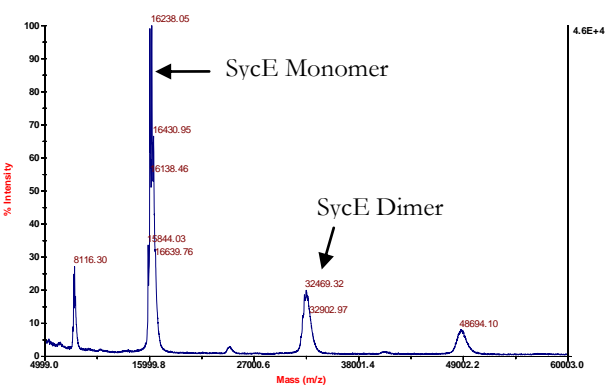
B



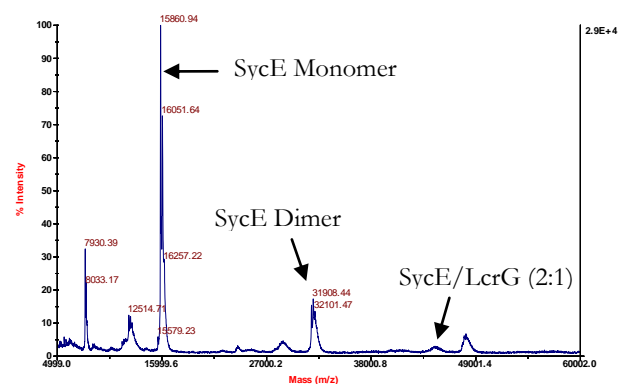
C



D



E



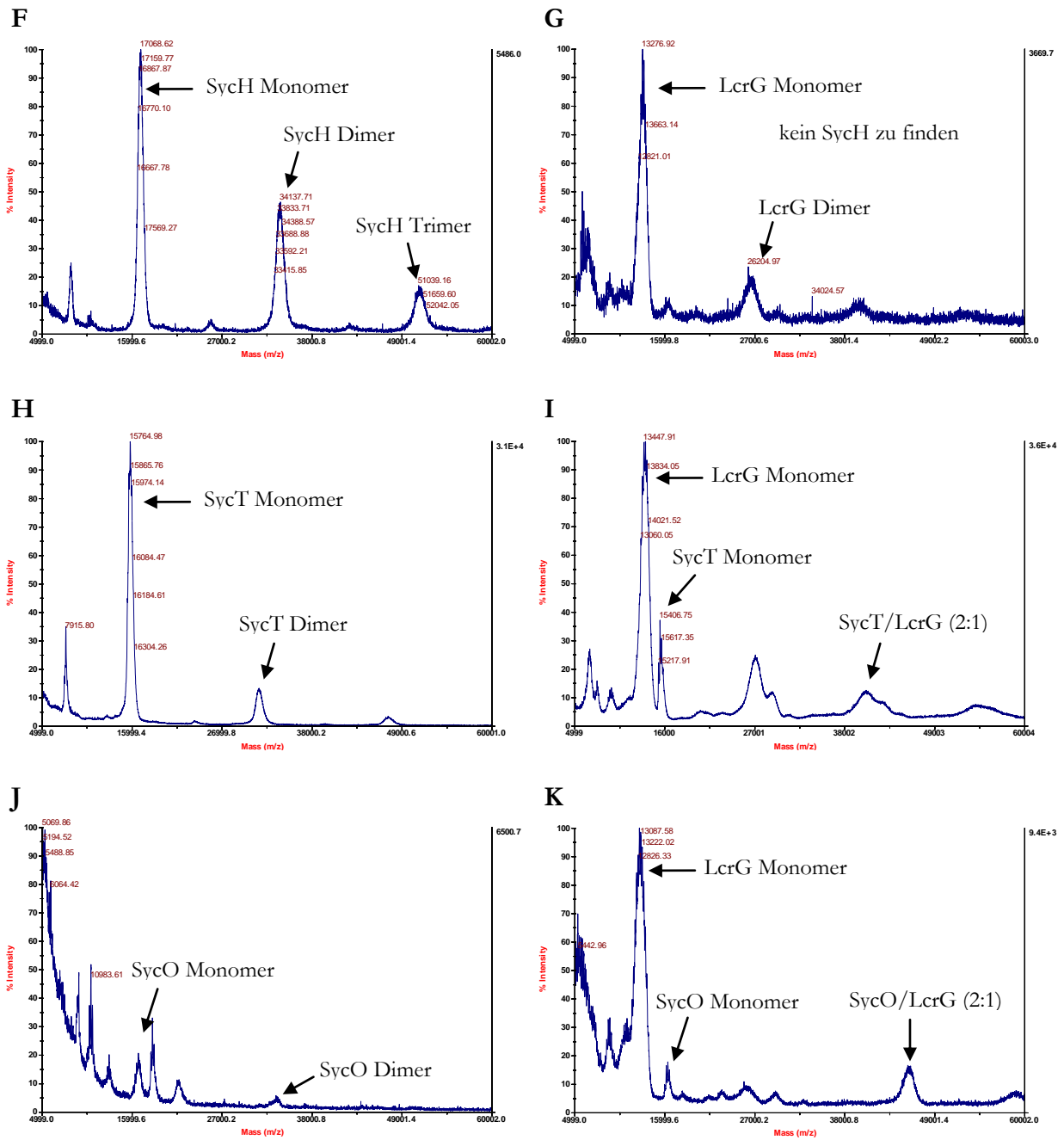


Abb.18:

- A: LcrG (10 kDa) mit DSP
- B: SycD (20 kDa) mit DSP
- C: SycD vorinkubiert mit LcrG und anschließender Kupplung mit DSP
- D: SycE (13 kDa)
- E: SycE vorinkubiert mit LcrG und anschließender Kupplung mit DSP
- F: SycH (14 kDa)
- G: SycH vorinkubiert mit LcrG und anschließender Kupplung mit DSP
- H: SycT (13 kDa)
- I: SycT vorinkubiert mit LcrG und anschließender Kupplung mit DSP
- J: SycO (16 kDa)
- K: SycO vorinkubiert mit LcrG und anschließender Kupplung mit DSP

Es konnte somit eindeutig nachgewiesen werden, dass LcrG Dimere bildete und mit LcrV einen stabilen 1:1 Komplex bildet. Im Gegensatz hierzu waren die Komplexe von LcrG mit den Chaperonen des Typ III Sekretionssystems nur sehr schwach. Mit SycD konnten massenspektrometrisch als auch mittels SDS-PAGE 1:1 Komplexe nachgewiesen werden. Das Verhältnis von LcrG zu den anderen Chaperonen war hingegen 1:2.

4.3 SycO

Zu Beginn dieser Arbeit war das Gen des Chaperons SycO noch als offenes Leseraster *orf155* bekannt. Schon lange war vermutet worden, dass es sich hierbei um ein Chaperon handelt. Dafür sprach vor allem die Tatsache, dass es gemeinsam mit *yopO* und *yopP* in einem Operon organisiert ist und in allen pathogenen Yersinien vorhanden ist. Pallen *et al.* (2005) fanden zudem heraus, dass Typ III Chaperone – trotz fehlender Sequenzhomologie – eine gewisse Aminosäureähnlichkeit bezüglich Polarität und Größe besitzen. Dabei fiel auch die potentielle Sequenz von SycO in dieses Muster.

Für die Charakterisierung des Proteins wurde SycO rekombinant in nativer Form hergestellt. Dies resultierte aus der Tatsache, dass das Protein weder mit einem aminoterminalen noch einem carboxyterminalen Hexahistidinrest löslich war. Die Reinigung erfolgte daher mittels Ammoniumsulfatfällung, Ionenaustauschchromatographie und abschließender Gelfiltration.

Zunächst sollte nachgewiesen werden, dass SycO in Yersinien exprimiert wird. Hierzu wurden unterschiedliche Yersinienkulturen mit und ohne Calcium angezogen. Im Falle einer Calciumzugabe führt die Kultivierung bei 37°C zu einer Ausbildung des Typ III Sekretionssystems, jedoch nicht zur Sekretion und vermehrten Expression der zu sezernierenden Proteine. Der Entzug des Calciums aus dem Nährmedium hingegen bewirkt neben der vermehrten Ausbildung von Typ III Sekretionsapparaten die deutlich erhöhte Expression besonders der Yops und Sekretion dieser Proteine ins Nährmedium.

Zur Untersuchung der Proteine wurden die Yersinien abschließend zentrifugiert, lysiert und das Lysat gelelektrophoretisch aufgetrennt. Danach erfolgte ein Immunoblot mit einem Antiserum gegen das 16 kDa große SycO (siehe Abb.19).

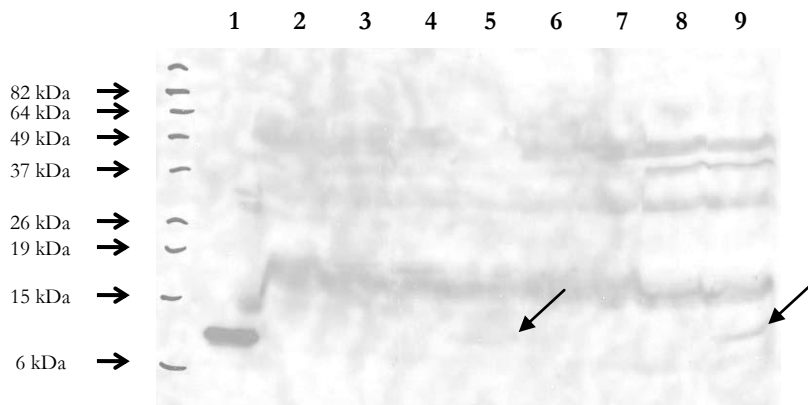


Abb.19: Immunoblot von Yersinienlysaten mit α -SycO Kaninchenserum

1: rekombinantes SycO, 2: WAP unter Ca^{2+} -Bedingungen, 3: WA-C pTTSS unter Ca^{2+} -Bedingungen, 4: WA-C pTTSS pACYC-*yopOyopP* unter Ca^{2+} -Bedingungen, 5: WA-C pTTSS pACYC-*orf155yopOyopP* unter Ca^{2+} -Bedingungen, 6: WAP unter EGTA-Bedingungen, 7: WA-C pTTSS unter EGTA-Bedingungen, 8: WA-C pTTSS pACYC-*yopOyopP* unter EGTA-Bedingungen, 9: WA-C pTTSS pACYC-*orf155yopOyopP* unter EGTA-Bedingungen

Man konnte dabei vor allem beim Stamm WA-C pTTSS pACYC184-*orf155yopOyopP*, welcher nur den Typ III Sekretionsapparat sowie das Operon *syncOyopOyopP* besitzt, SycO detektieren (Trulzsch *et al.* 2003).

Nachdem geklärt war, dass SycO von Yersinien synthetisiert wird, sollte SycO vor allem auf typische Charakteristika von Typ III Chaperonen untersucht werden. Hierzu zählt unter anderem die Dimerisierung. Dies wurde durch analytische Gelfiltration und Kupplungsreaktion untersucht (siehe Abb.20).

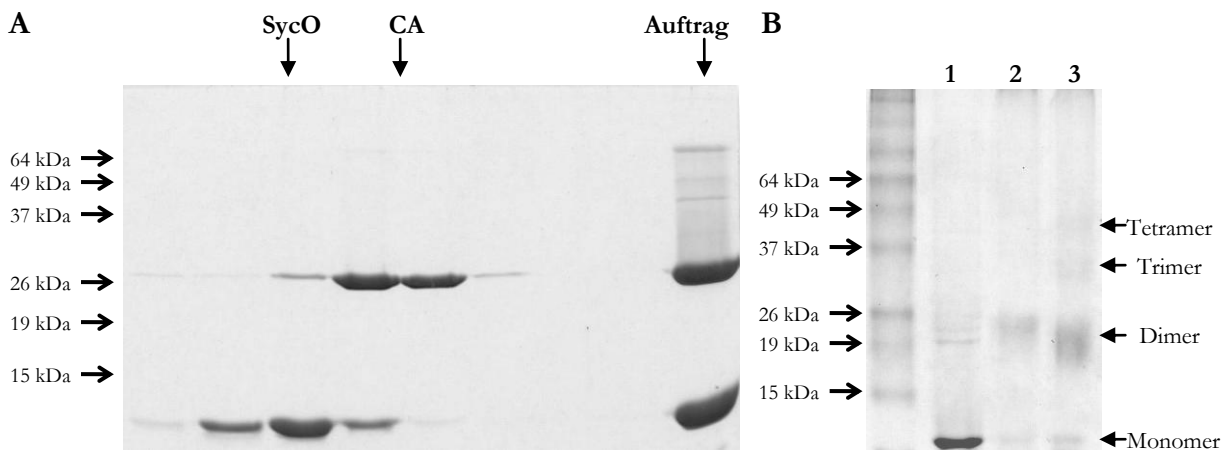


Abb.20:

A: aufeinander folgende Fraktionen einer analytischen Gelfiltration von SycO mit CA (29 kDa) als Markerprotein

B: Kupplungsreaktion von SycO mit zwei unterschiedlichen Crosslinkern

1: SycO, 2: SycO mit EGS, 3: SycO mit DSP

Bei der Gelfiltration eluierte SycO vor der 29 kDa großen Carboanhydrase. Dieses Ergebnis sowie das des Kupplungsexperimentes (siehe Abb.20) zeigen eindeutig, dass SycO dimerisiert.

Ob SycO auch eines der beiden Effektorproteine oder sogar beide bindet, sollte im Folgenden untersucht werden. Hierzu sollten die rekombinant hergestellten Proteine im Nativsystem als auch mittels Kupplungsreaktion untersucht werden. Die Effektoren YopO und YopP waren als

Fusionen mit aminoterminalen GST (Glutathion S-Transferase) vorhanden. GST diente dabei der verbesserten Löslichkeit. Für die weiteren Experimente wurden diese Fusionsproteine eingesetzt.

Versuchte Kupplungsreaktionen konnten nicht richtig ausgewertet werden, da durch die Größe der Proteine und durch das Dimerisierungsverhalten von GST nur schwer eine Trennung im SDS-PAGE möglich war (nicht gezeigt). Dahingegen konnte im Nativgelsystem bei pH 8 eine zusätzliche Bande detektiert werden, wenn GST-YopO (107 kDa) zuvor mit SycO inkubiert wurde (siehe Abb.21 A). Bei GST-YopP hingegen konnte kein Unterschied festgestellt werden (nicht gezeigt).

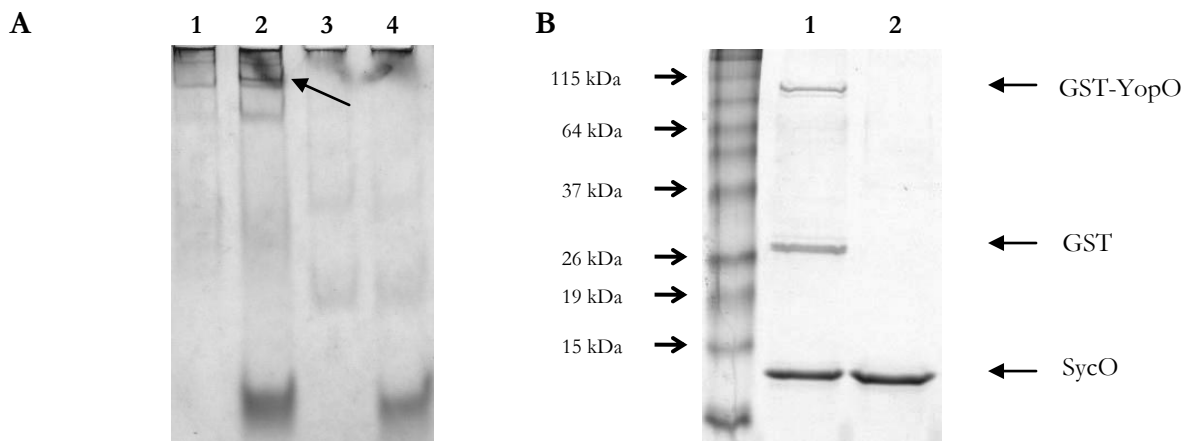


Abb.21: Nachweis der Interaktion zwischen YopO und SycO

A: Nativgel (Tris) mit SycO und GST-YopO

1: GST-YopO, 2: GST-YopO mit SycO, 3: GST, 4: GST mit SycO

B: Pull-down-Versuch mit GST-YopO und SycO, hierzu wurde Glutathionsepharose einmal mit und einmal ohne GST-YopO beladen und anschließend mit SycO inkubiert

1: Elution der Sepharose mit GST-YopO, 2: Elution der Sepharose ohne GST-YopO

Um diese Interaktion auf eine weitere Weise zu zeigen, wurden Affinitätsreinigungsversuche durchgeführt. Hierzu sollte das GST-YopO zunächst an Glutathionsepharose gebunden werden und anschließend mit SycO inkubiert werden. Als Kontrolle sollte die Sepharose ohne GST-YopO dienen. Nach der Elution konnten jedoch etwa gleiche Mengen SycO in der Kontrolle detektiert werden (siehe Abb.21 B).

Um SycO detailliert strukturell zu charakterisieren, wurden SAXS Messungen durchgeführt. Diese waren jedoch nicht erfolgreich, da das Protein teilweise ausgefallen und aggregiert war, was möglicherweise auf ein Einfrieren und Auftauen zurückzuführen war. Aus diesem Grunde sollte es in einer Kooperation kristallisiert werden. Für eine bessere Reinigung sollte hierzu ein aminoterminaler Hexahistidintag an das Protein fusioniert werden. Zwischen dem Affinitätstag und dem Protein sollte zudem eine Proteaseschnittstelle eingeführt werden. Hierfür wurde die Schnittstelle für die TEV Protease ausgewählt, da diese sich komplett entfernen lässt. Für die Klonierung wurden dementsprechende Primer verwendet, die diese Schnittstelle beinhalten. Da

ein aminoterminaler Hexahistidintag beim Volllängenprotein zu einem komplett unlöslichen Konstrukt geführt hatte, wurden einige hydrophobe Aminosäuren am carboxyterminalen Ende deletiert.

Die Expression des Konstruktes führte zu einem löslichen Produkt. Dieses konnte nach einer Affinitätsreinigung und Gelfiltration in großer Reinheit erhalten werden. Dies war vor allem auf die Tatsache zurückzuführen, dass das Protein sehr stark an die Nickelchelate-Nitrilotriacetat-Säule band und erst bei hohen Imidazolkonzentrationen (ab 500 mM Imidazol) eluiert werden konnte. Das Protein konnte nach der Reinigung auf über 10 mg/ml konzentriert werden. Kristallisationsversuche in Kooperation mit der Gruppe von Michael Groll waren jedoch nicht erfolgreich.

Es konnte nachgewiesen werden, dass SycO von Yersinien synthetisiert wird und das Effektorprotein YopO bindet. Zudem konnte gezeigt werden, dass es charakteristisch für Typ III Sekretionssystem Chaperone als Dimer in Lösung vorliegt.

4.4 orf91b

Ein weiteres noch nicht untersuchtes Gen war *orf91b*. Die Tatsache, dass es in allen *Y. enterocolitica* Stämmen mit Typ III Sekretionssystem vorhanden ist, ließ auf eine wichtige Rolle des Gens schließen. Es waren bereits Vorarbeiten von Konrad Trülsch (Max von Pettenkofer-Institut) vorhanden. So waren zum einen eine Mutante und zum anderen ein Expressionskonstrukt von *orf91b* vorhanden. Das Gen *orf91b* war hierbei in den Vektor pGEX kloniert worden, so dass das Protein aminoterminal mit Glutathion S-Transferase fusioniert gewesen wäre. Dieses Konstrukt war jedoch nicht erfolgreich exprimiert worden.

Ein erneuter Versuch, das Gen zu exprimieren, war ebenfalls nicht erfolgreich (nicht gezeigt). Da bereits aus anderen Klonierungen bekannt war, dass für manche Konstrukte nicht alle Vektoren zu einem Produkt führen, wurde *orf91b* in den Vektor pET28a umklontiert. In diesem Vektor ist ein aminoterminaler Hexahistidintag vor der Klonierungsstelle kodiert. Nach Transformation in BL21 und Induktion mit IPTG konnte in diesem Falle die Expression eines 9 kDa großen Proteins beobachtet werden. Diese war jedoch verhältnismäßig schlecht (siehe Abb.22). Zudem konnte das Protein mittels Affinitätsreinigung des löslichen Zellaufschlussüberstandes nicht in löslicher Form und ausreichender Menge erhalten werden.

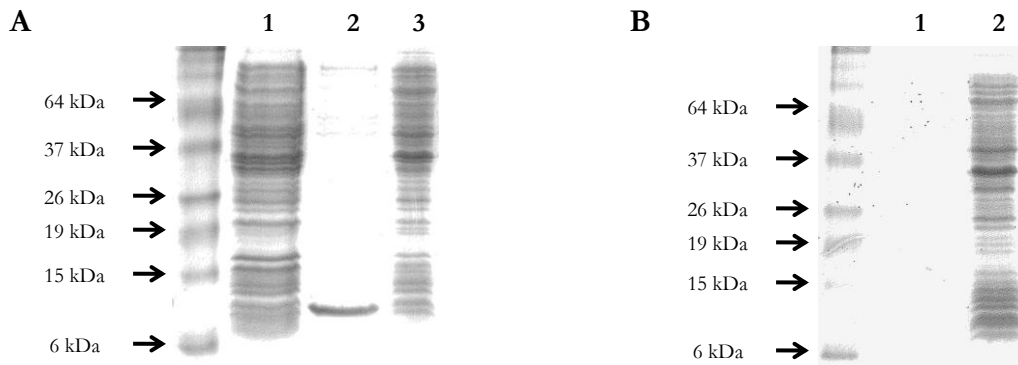


Abb.22: Expression von orf91b

A: Expression von orf91b in *E. coli* bei 37°C

1: nicht induzierte Kontrolle, 2: Pellet nach Zellaufschluss, 3: Überstand nach Zellaufschluss

B: Expression von orf91b in *E. coli* bei 20°C

1: Pellet nach Zellaufschluss, 2: Überstand nach Zellaufschluss

Da aus anderen Expressionsversuchen bekannt war, dass eine Temperaturerniedrigung teilweise zu besseren Ausbeuten führt, wurde die Expression auch bei 20°C durchgeführt. Im Falle von orf91b führte dies jedoch zu keiner Verbesserung (siehe Abb.22 B).

Um herauszufinden, ob orf91b eine Rolle in der Infektion spielt, wie es bei einem Chaperon der Fall wäre, sollte im weiteren Verlauf die *orf91b*-Mutante in Infektionsversuchen untersucht werden. Hierzu wurden Gentamycinassays mit HeLa-Zellen durchgeführt. Dabei werden HeLa-Zellen mit Yersinien infiziert. Nach einer bestimmten Inkubationszeit werden extern anhaftende Bakterien durch die Behandlung mit Gentamycin abgetötet. Nur internalisierte Yersinien überleben diesen Behandlungsschritt. Die Anzahl der dabei von den HeLa-Zellen aufgenommenen Yersinien soll Aufschluss darüber geben, wie infektiös der jeweilige Yersinienstamm ist. Diese Versuche führten jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis. Zwar verhielten sich Wildtyp und Mutante verschieden, doch war dies vom verwendeten Medium, RPMI, DMEM oder F12, abhängig. Während der Wildtyp in RPMI und DMEM invasiver war, war dies im Falle von F12 umgekehrt. Ob dies einem unterschiedlichen Wachstumsverhalten in den Medien zugrunde lag, sollte durch Wachstumsversuche geklärt werden. Hierzu wurden die entsprechenden Stämme über mehrere Stunden in den jeweiligen Medien kultiviert und nach je einer Stunde die optische Dichte bestimmt. Dabei konnten jedoch keine Unterschiede im Wachstumsverhalten festgestellt werden.

Für eine bessere Untersuchung der Mutante wurde ein Konstrukt zur Komplementierung hergestellt. Hierzu wurde ein DNA-Stück amplifiziert, beginnend mit 100 Basenpaaren vor dem möglichen Startcodon von *orf91b*. Zusätzlich wurde carboxyterminal ein HA-Tag codiert. Dieses Amplifikat wurde in den Vektor pACYC184 eingefügt und in die *orf91b* Mutante transformiert.

Sekretionsversuche mit dem Wildtyp, der Mutante sowie der komplementierten Yersinie zeigten, dass in der *orf91b* Mutante YopP in deutlich geringeren Mengen sekretiert wurde als im Wildtyp oder der komplementierten Yersinie (siehe Abb.23).

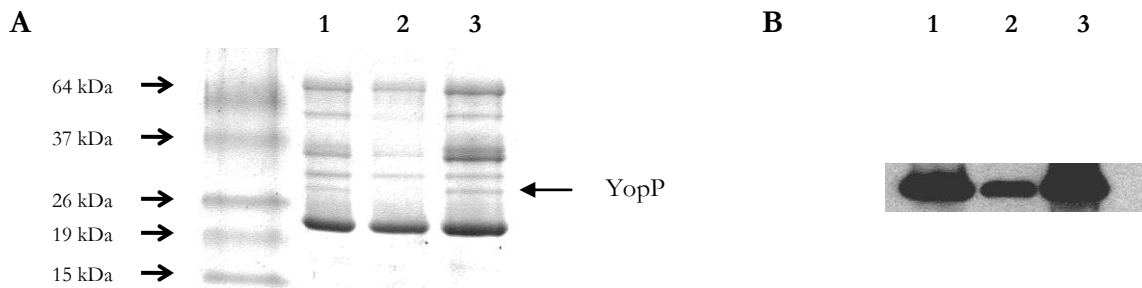


Abb.23: Sekretionsüberstände des Wildtyps, der *orf91b* Deletionsmutante und der komplementierten Mutante

A: Coomassie gefärbtes Gel der Sekretionsüberstände

1: WAP, 2: WAP Δ *orf91b*, 3: WAP Δ *orf91b* mit pACYC-*orf91b*-HA komplementiert

B: zugehöriger Immunoblot mit α -YopP Kaninchenserum

1: WAP, 2: WAP Δ *orf91b*, 3: WAP Δ *orf91b* mit pACYC-*orf91b*-HA komplementiert

Weitere Sekretionsversuche zeigten zudem, dass in der komplementierten Yersinie mehr YopP im Zelllysate zu finden war als in der entsprechenden Mutante und auch im Vergleich zum Wildtyp (nicht gezeigt).

Um dies *in vivo* zu untersuchen, wurden abschließend Infektionsversuche mit J774 Makrophagen durchgeführt. Diese wurden mit dem Yersinienwildtyp beziehungsweise der *orf91b* Deletionsmutante infiziert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch miteinander verglichen. Da es sich bei den unterschiedlichen Yop-Antikörpern um polyklonale Kaninchenantikörper handelte, wurden nicht infizierte J774 Makrophagen ebenfalls mit dem Antikörper behandelt und als Kontrolle verwendet.

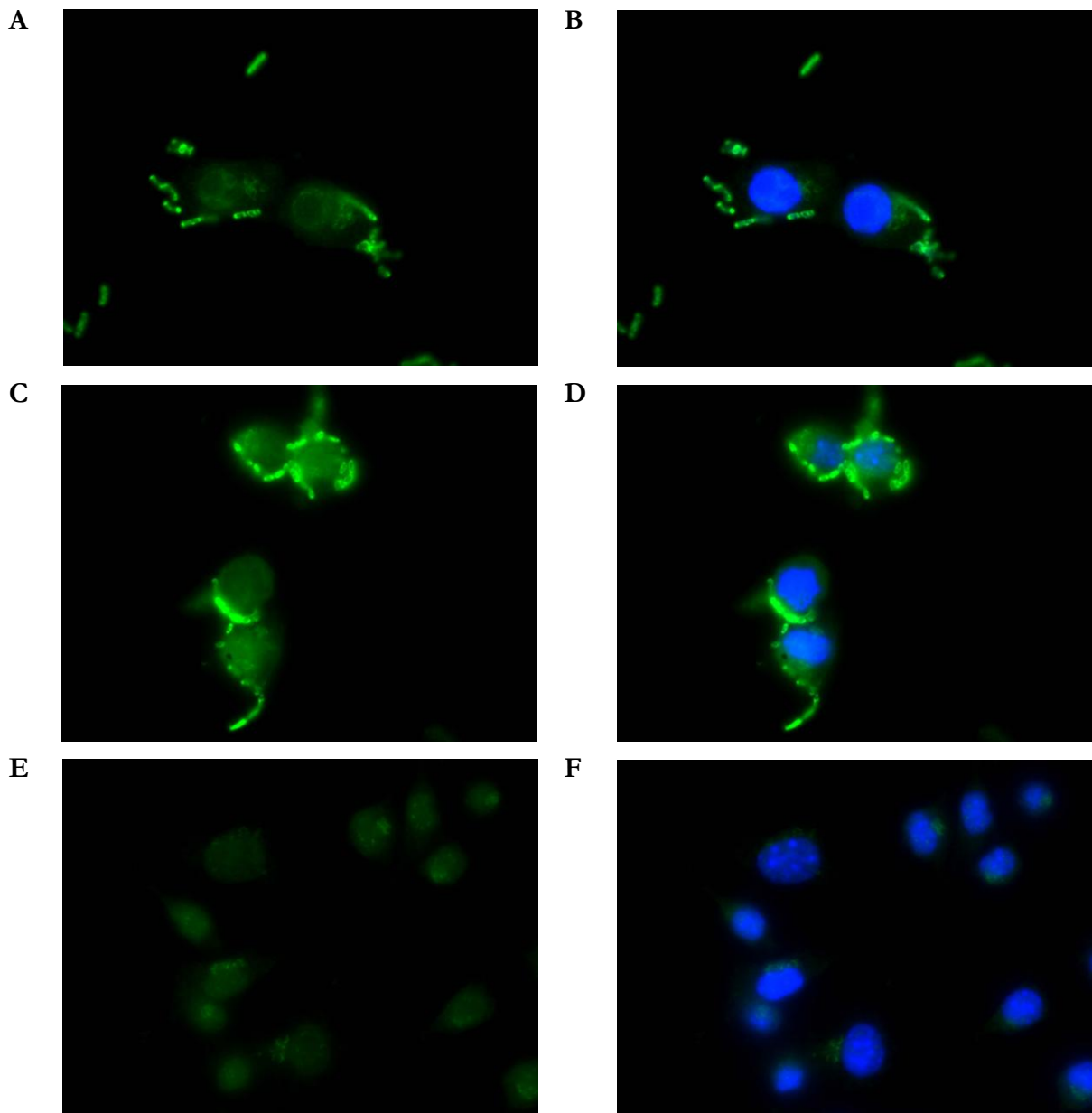


Abb.24: YopP Immunfluoreszenzfärbung

- A: WAP $\Delta orf91b$ auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopP Antikörpern
- B: WAP $\Delta orf91b$ auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopP Antikörpern und DAPI Färbung
- C: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopP Antikörpern
- D: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopP Antikörpern und DAPI Färbung
- E: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopP Antikörpern
- F: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopP Antikörpern und DAPI Färbung

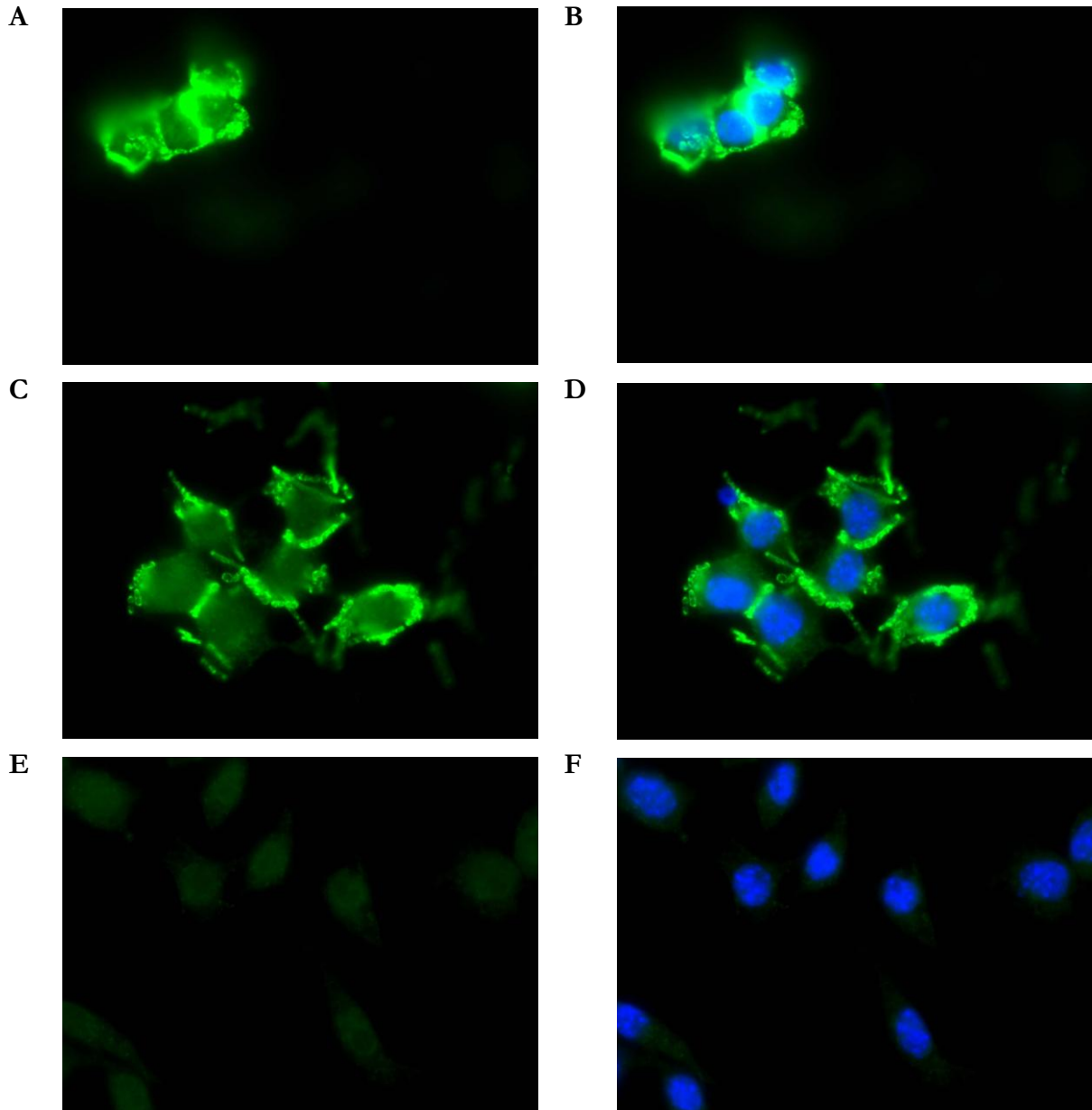


Abb.25: YopE Immunfluoreszenzfärbung

A: WAP Δ orf91b auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopE Antikörpern

B: WAP Δ orf91b auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopE Antikörpern und DAPI Färbung

C: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopE Antikörpern

D: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopE Antikörpern und DAPI Färbung

E: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopE Antikörpern

F: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopE Antikörpern und DAPI Färbung

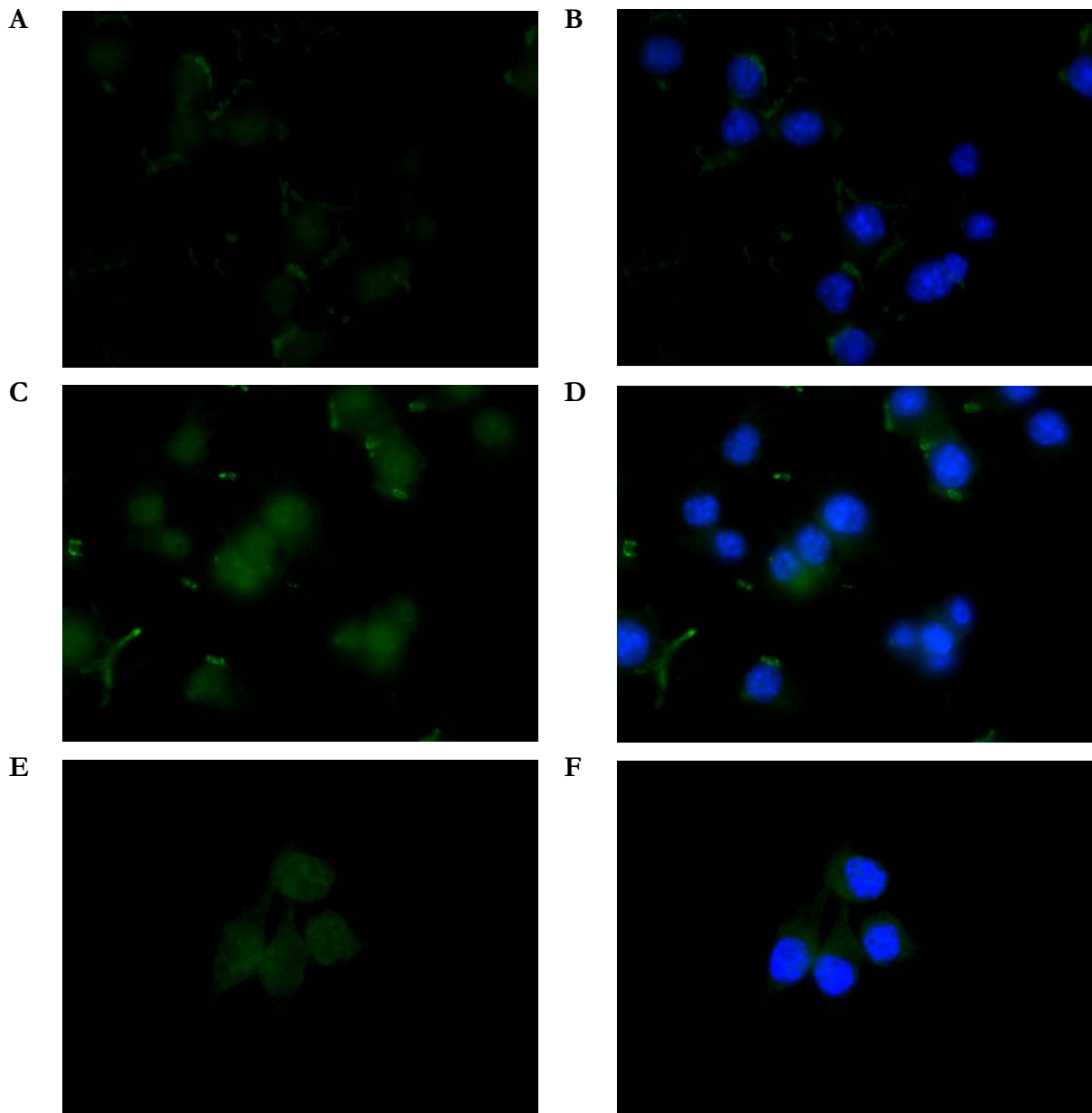


Abb.26: YopH Immunfluoreszenzfärbung

A: WAP Δ orf91b auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopH Antikörpern

B: WAP Δ orf91b auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopH Antikörpern und DAPI Färbung

C: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopH Antikörpern

D: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopH Antikörpern und DAPI Färbung

E: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopH Antikörpern

F: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopH Antikörpern und DAPI Färbung

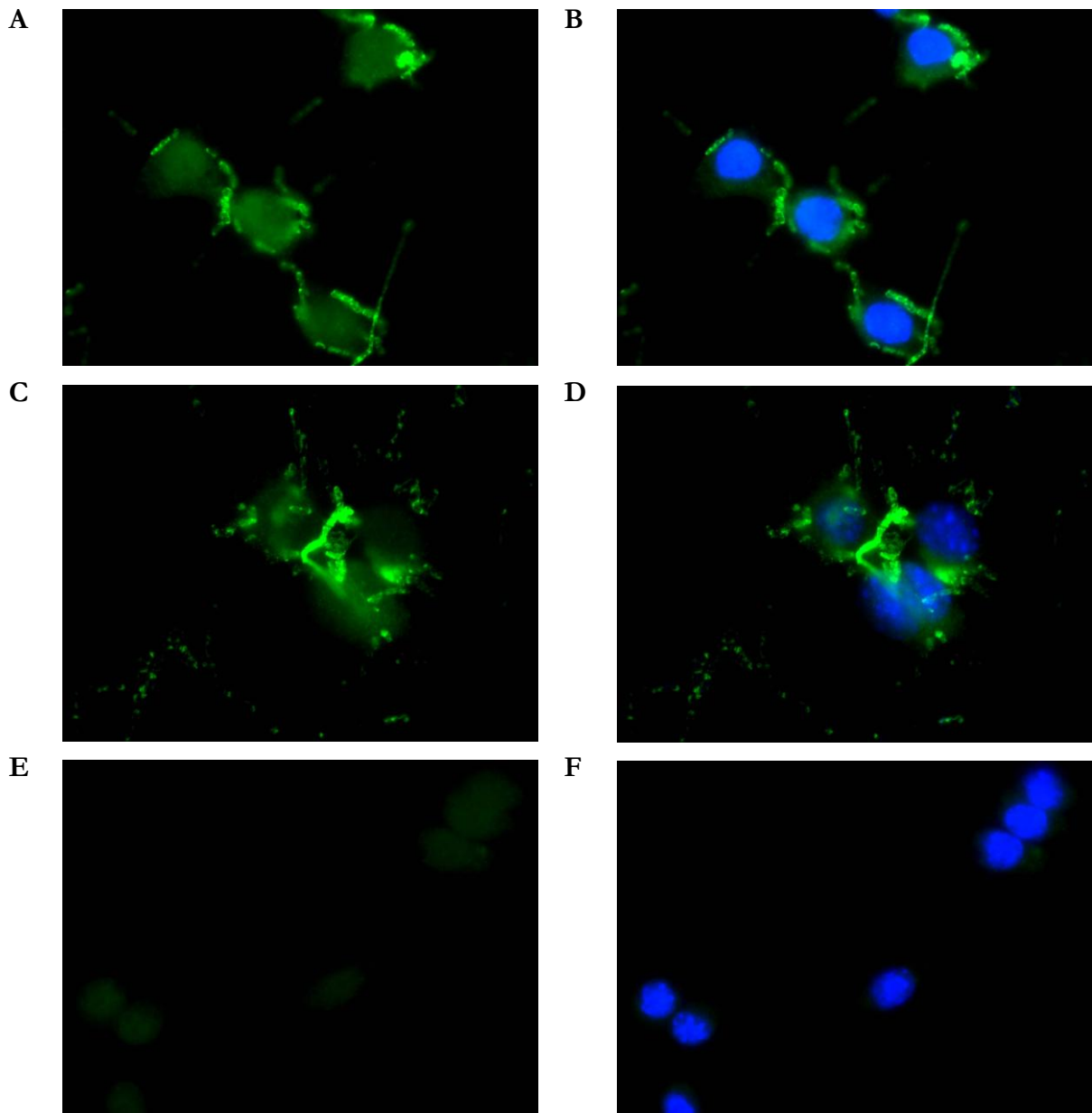


Abb.27: YopM Immunfluoreszenzfärbung

A: WAP Δ orf91b auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopM Antikörpern

B: WAP Δ orf91b auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopM Antikörpern und DAPI Färbung

C: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopM Antikörpern

D: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopM Antikörpern und DAPI Färbung

E: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopM Antikörpern

F: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopM Antikörpern und DAPI Färbung

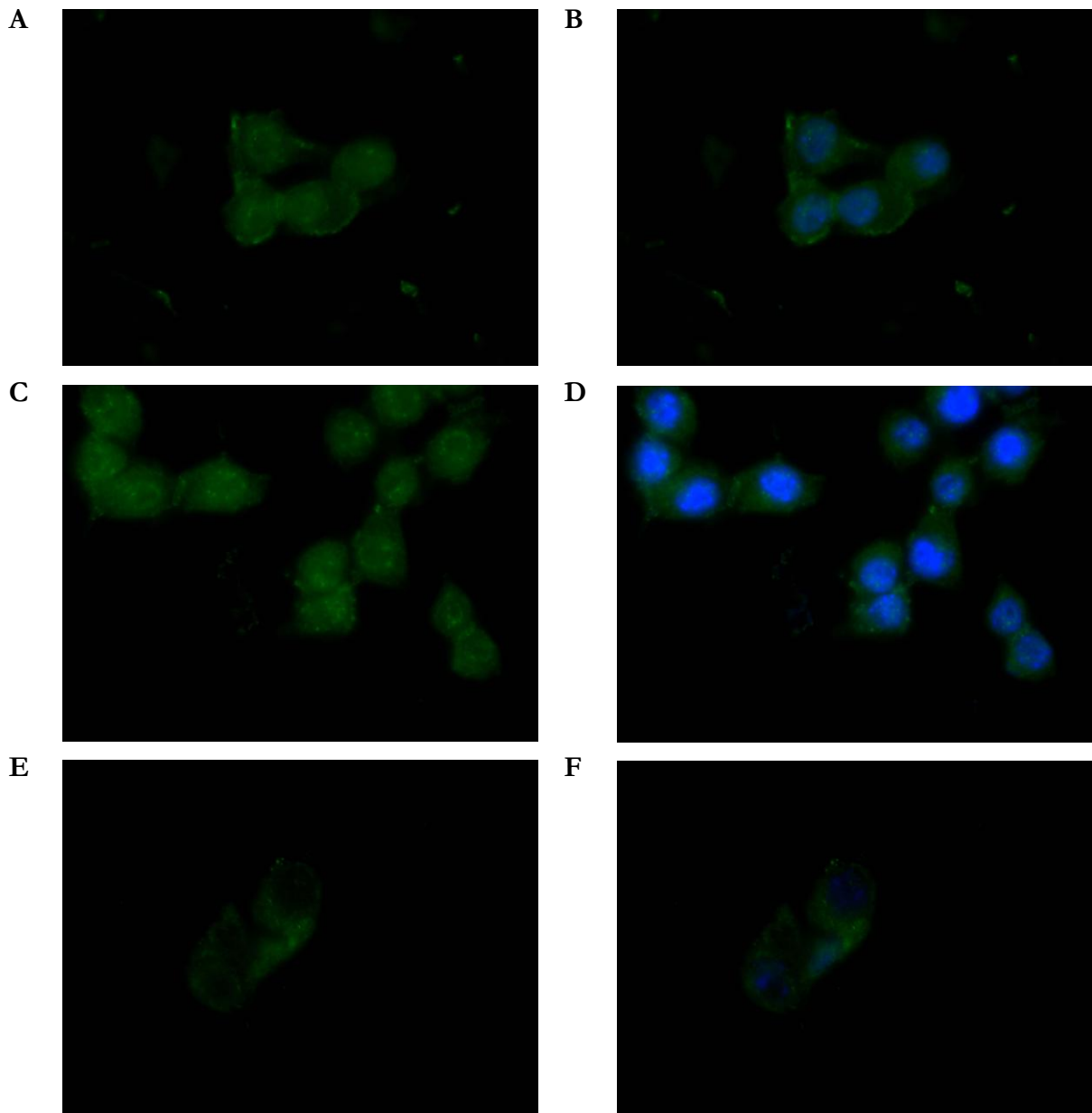


Abb.28: YopO Immunfluoreszenzfärbung

A: WAP Δ orf91b auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopO Antikörpern

B: WAP Δ orf91b auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopO Antikörpern und DAPI Färbung

C: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopO Antikörpern

D: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopO Antikörpern und DAPI Färbung

E: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopO Antikörpern

F: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopO Antikörpern und DAPI Färbung

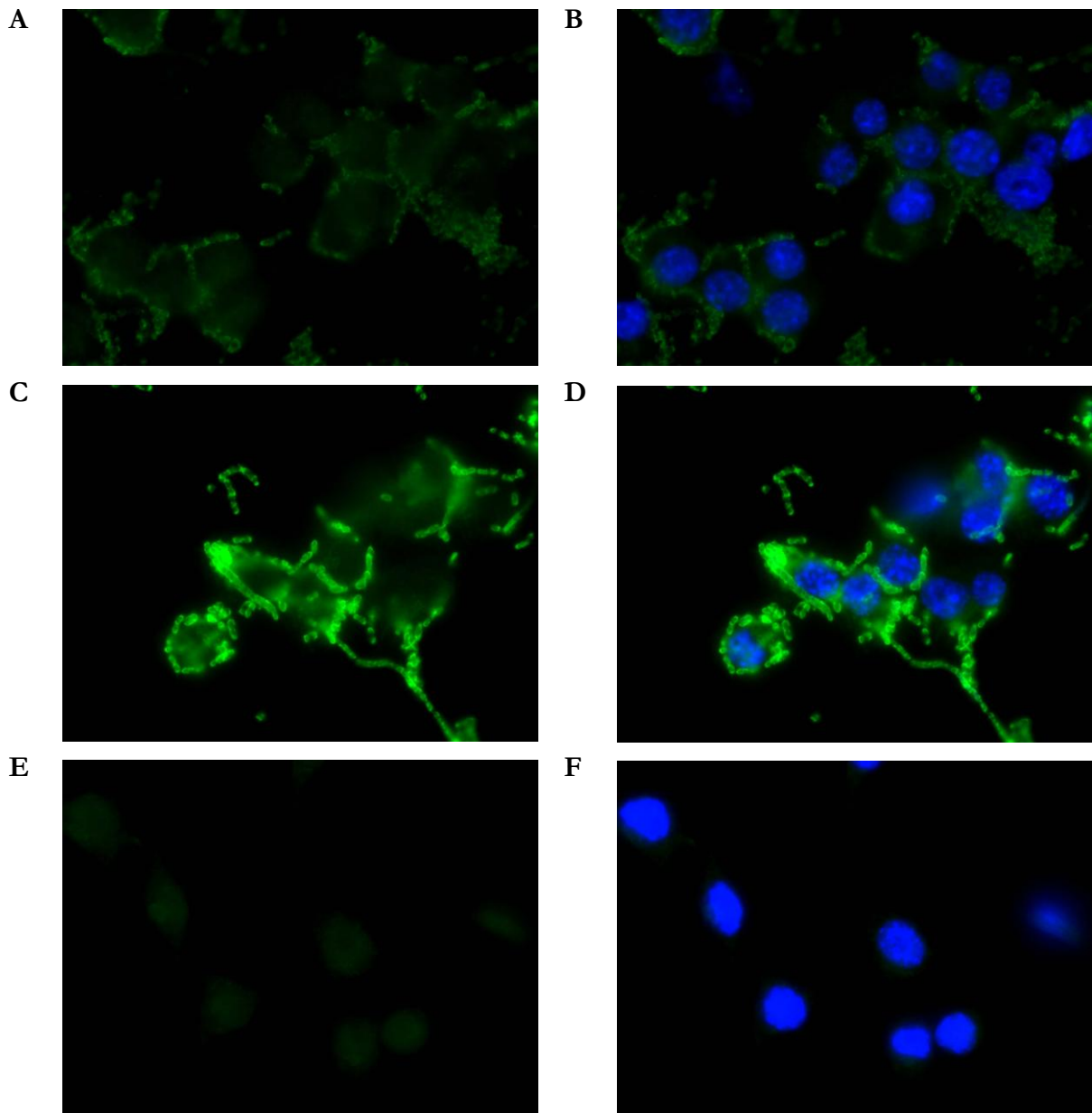


Abb.29: YopT Immunfluoreszenzfärbung

A: WAP $\Delta orf91b$ auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopT Antikörpern

B: WAP $\Delta orf91b$ auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopT Antikörpern und DAPI Färbung

C: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopT Antikörpern

D: WAP auf J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopT Antikörpern und DAPI Färbung

E: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopT Antikörpern

F: J774 Makrophagen, Immunfluoreszenzfärbung mit YopT Antikörpern und DAPI Färbung

Wie in den obigen Bildern zu sehen ist, zeigten sich nur bei einigen Effektorproteinen deutlichere Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Deletionsmutante. Bei der Färbung der Effektorproteine YopH, YopO, YopE und YopM konnten keine großen Differenzen zwischen den beiden Yersinientypen festgestellt werden. Im Falle von YopP hingegen konnte jedoch deutlich eine verminderte Translokation in die Wirtszelle bei der Infektion mit der Deletionsmutante sichtbar gemacht werden. Ebenso konnte bei der Färbung von YopT beobachtet werden, dass dieser Effektor in weitaus geringerem Maße vorhanden war. Diese

Mikroskopieversuche unterstützen somit die zuvor per SDS-PAGE gezeigte verminderte Sekretion von YopP in WAP $\Delta orf91b$.

Die Versuche mit der *orf91b* Deletionsmutante konnten zeigen, dass diese sich eindeutig anders verhält als der Wildtyp. Dies war bereits zuvor von Konrad Trülsch im Mausinfektionsmodell gezeigt worden (mündliche Kommunikation). In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Unterschiede möglicherweise durch eine veränderte Expression der Effektoren YopP und YopT zustande kommt. Wie der genaue Mechanismus jedoch ist, müsste in weiteren Versuchen abgeklärt werden.

4.5 YscQ

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist nicht genau bekannt, wie die Substraterkennung im Typ III Sekretionssystem funktioniert. Bekannt ist nur, dass zwischen dem Transport der Nadelproteine und der Translokation der Yops die enzymatische Spaltung eines Proteins des inneren Ringes, YscU, stattfindet, welches erst die Translokation ermöglicht (Allaoui *et al.* 1994; Sorg *et al.* 2007).

YscQ bildet mit mehreren Proteinen den C-Ring in der inneren Membran der Bakterienhülle (Jackson & Plano 2000; Pallen *et al.* 2005). Außerdem bindet das homologe FliN des Flagellensystems an FliH und dieses wiederum an FliI, der ATPase des Flagellensystems (McMurry *et al.* 2006). YscQ besitzt mehrere Transmembrandomänen und einen carboxyterminalen cytosolischen Teil. Dieser ragt beim homologen Protein FliN in das bakterielle Cytosol und ist in die Substraterkennung involviert. Aus diesem Grund sollte diese Domäne kloniert und rekombinant hergestellt werden. Da es bereits eine Kristallstruktur von FliN gab, wurde nach Homologievergleichen ein entsprechendes Stück von YscQ gewählt (Brown *et al.* 2005).

Die Reinigung des besonders gut löslichen carboxyterminalen Teils des Proteins YscQ_C (10 kDa) erfolgte mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration. Bereits nach der Affinitätsreinigung lag das Protein in über 95% Reinheit vor (siehe Abb.30).

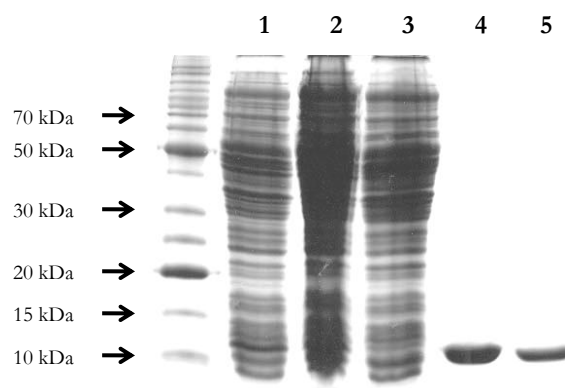


Abb.30: Reinigung von YscQ_C

1: Zellysate, 2: Überstand, 3: Durchlauf der Ni-Säule, 4: Pool nach Affinitätsreinigung, 5: Pool nach Gelfiltration

Schon bei der Gelfiltration fiel auf, dass YscQ_C etwa in der Größe eines Tetramers eluierte. Diese Oligomerisierung konnte auch mittels Kupplungsexperimenten nachgewiesen werden (siehe Abb.31 B Spur 3).

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Michael Groll wurden auch in diesem Fall Kristallisationsversuche unternommen, die jedoch erfolglos blieben.

Zur Untersuchung von möglichen Interaktionen wurden Kupplungsversuche unternommen und die Proteine in Nativgelen untersucht. Zunächst sollten mögliche Wechselwirkungen mit den Chaperonen im Nativgelsystem untersucht werden. Diese zeigten, dass YscQ_C mit SycH, SycO, SycE und SycT keine Interaktionen eingeht (siehe Abb.31 A). Eine Interaktion mit LcrG konnte in einem Kupplungsexperiment ebenfalls nicht nachgewiesen werden (siehe Abb.31 B).

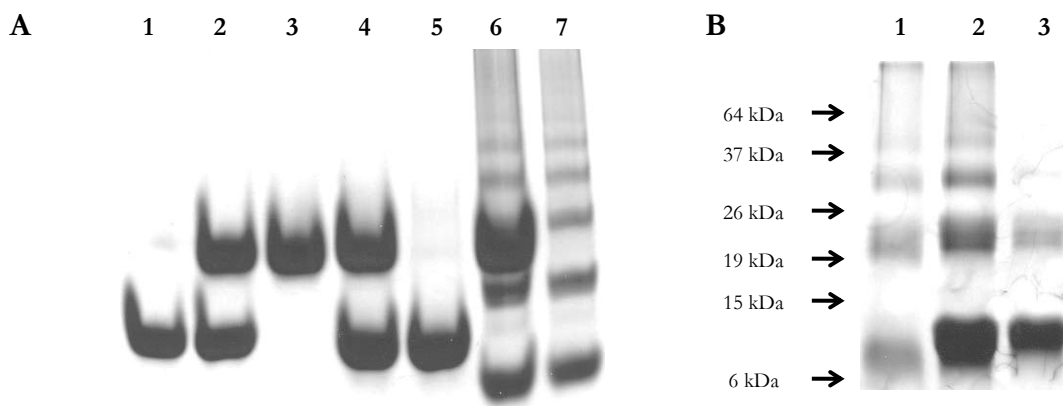


Abb.31:

A: Nativgel (Tris) mit YscQ_C und verschiedenen Sycs

1: SycE, 2: SycE + YscQ_C, 3: YscQ_C, 4: SycH + YscQ_C, 5: SycH, 6: SycO + YscQ_C, 7: SycO

B: SDS-PAGE nach Kupplungsreaktion von YscQ_C mit LcrG

1: LcrG mit DSP, 2: YscQ_C mit LcrG und DSP, 3: YscQ_C mit DSP

Mit den Effektorproteinen hingegen, die aus der Bakterienzelle hinaus geschleust werden, konnten schwache Interaktionen festgestellt werden. Gezeigt werden konnten Interaktionen mit YopH (47 kDa), YopE (22 kDa), YopM (53 kDa), YopQ (18 kDa) (siehe Abb.33) und LcrV (38 kDa) (siehe Abb.32 D). Bei weiteren Studien stellte sich heraus, dass zudem die Bindung von YscQ_C an den Effektor nicht über das aminoternale Ende des letzteren stattfindet, da ein um 17 Aminosäuren verkürztes YopH ebenfalls mit YscQ_C interagiert (siehe Abb.32 C).

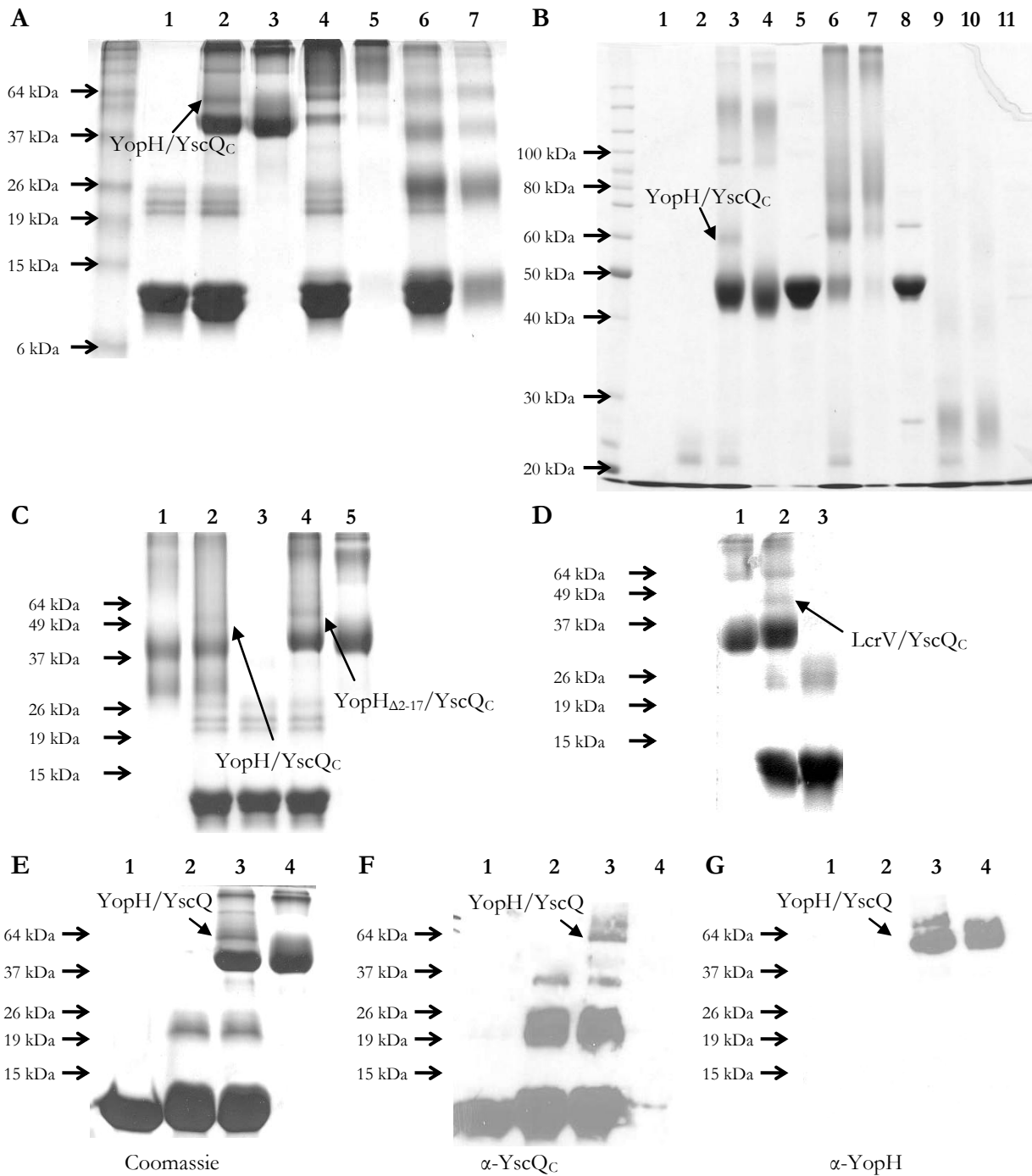


Abb.32:

A: Kupplungsversuch mit DSP von YscQC mit YopH, YopH/SycH sowie SycH

1: YscQC, 2: YscQC mit YopH, 3: YopH, 4: YscQC mit YopH/SycH, 5: YopH/SycH, 6: YscQC mit SycH, 7: SycH

B: Kupplungsversuch mit DSP von YscQC mit YopH, YopH/SycH sowie SycH im großen Gelsystem

1: YscQC ohne DSP, 2: YscQC, 3: YscQC mit YopH, 4: YopH, 5: YopH ohne DSP, 6: YscQC mit YopH/SycH, 7: YopH/SycH, 8: YopH/SycH ohne DSP, 9: YscQC mit SycH, 10: SycH, 11: SycH ohne DSP

C: Kupplungsversuch mit DSP von YscQC mit YopH sowie YopH Δ 2-17

1: YopH Δ 2-17, 2: YscQC mit YopH Δ 2-17, 3: YscQC, 4: YscQC mit YopH, 5: YopH

D: SDS-PAGE eines Kupplungsversuches mit DSP von LcrV mit YscQC

1: LcrV, 2: LcrV mit YscQC, 3: YscQC

E: SDS-PAGE Coomassiefärbung des Kupplungsversuches von YscQC mit YopH

F: zu E gehöriger Immunoblot mit α -YscQC Kaninchenserum

G: zu E gehöriger Immunoblot mit α -YopH Kaninchenserum

zu E, F, G:

1: YscQC, 2: YscQC mit DSP, 3: YscQC mit YopH und DSP, 4: YopH mit DSP

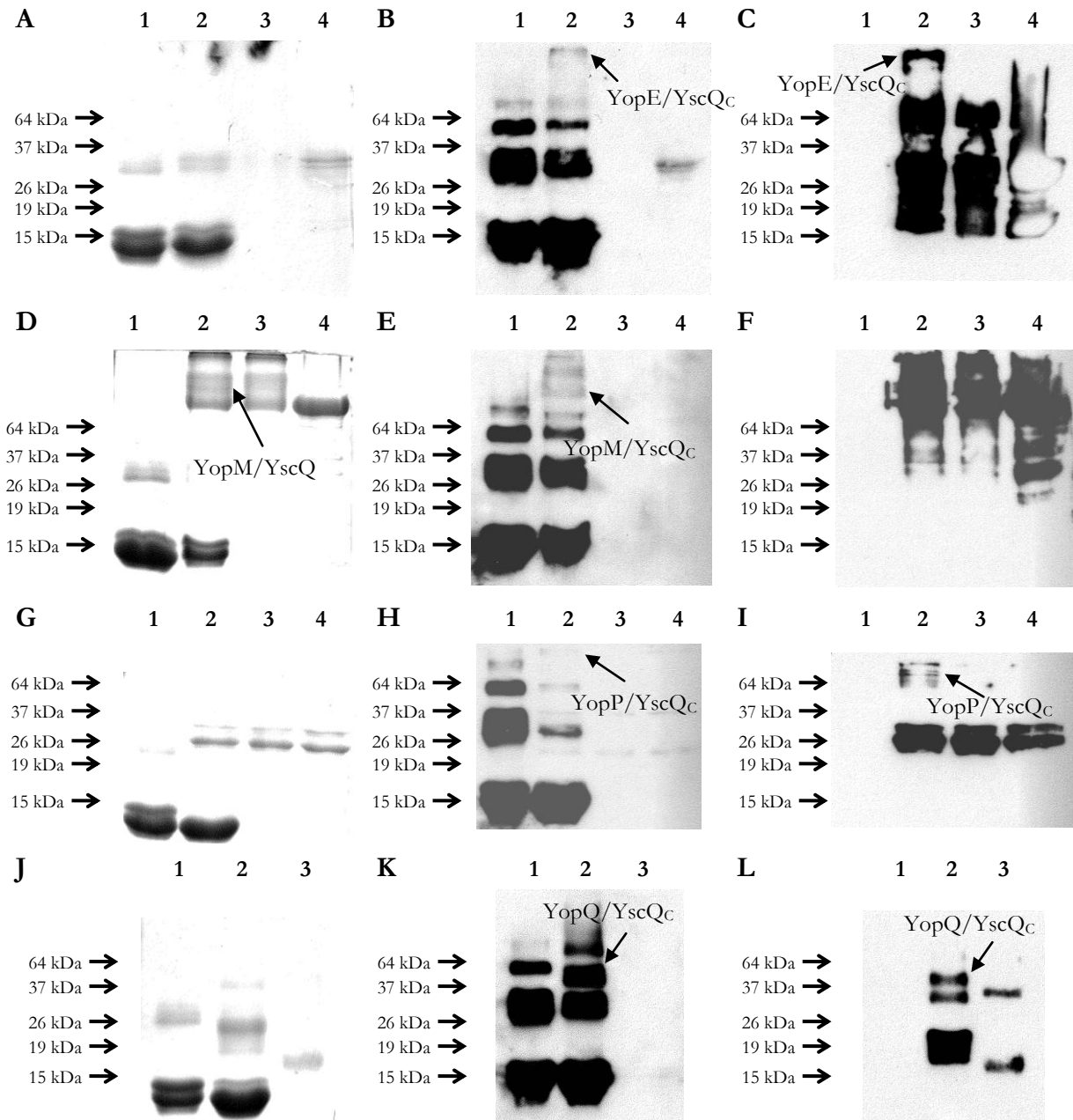


Abb.33: Kupplungsversuche von YscQC mit YopE, YopM, YopP und YopQ

A: Crosslinking von YscQC mit YopE, Coomassiefärbung

B: zu A gehöriger Blot mit α -YscQC Kaninchenserum

C: zu A gehöriger Blot mit α -YopE Kaninchenserum

zu A, B, C: 1: YscQC mit DSP, 2: YscQC mit YopE und DSP, 3: YopE mit DSP, 4: YopE

D: Crosslinking von YscQC mit YopM, Coomassiefärbung

E: zu D gehöriger Blot mit α -YscQC Kaninchenserum

F: zu D gehöriger Blot mit α -YopM Kaninchenserum

zu D, E, F: 1: YscQC mit DSP, 2: YscQC mit YopM und DSP, 3: YopM mit DSP, 4: YopM

G: Crosslinking von YscQC mit YopP, Coomassiefärbung

H: zu G gehöriger Blot mit α -YscQC Kaninchenserum

I: zu G gehöriger Blot mit α -YopP Kaninchenserum

zu G, H, I: 1: YscQC mit DSP, 2: YscQC mit YopP und DSP, 3: YopP mit DSP, 4: YopP

J: Crosslinking von YscQC mit YopQ, Coomassiefärbung

K: zu J gehöriger Blot mit α -YscQC Kaninchenserum

L: zu J gehöriger Blot mit α -YopQ Kaninchenserum

zu J, K, L: 1: YscQC mit DSP, 2: YscQC mit YopQ und DSP, 3: YopQ mit DSP

Der Versuch, die Komplexe auch in einer analytischen Gelfiltration nachzuweisen, schlug fehl (nicht gezeigt). Dies zeigte wiederum, dass es sich bei diesen Interaktionen um schwache Wechselwirkungen handelt.

Inwiefern YscQ_C auch weitere Substrate des Typ III Sekretionssystems erkennt, müsste in weiteren Untersuchungen gezeigt werden. Zudem müssten weitere Substrate rekombinant in einer löslichen Form hergestellt werden. Um herauszufinden wo eine mögliche Erkennungsstelle der Substrate ist, müssten unterschiedliche Deletionskonstrukte hergestellt werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass YscQ_C tetramerisiert wie auch das homologe FliN. Weitere Versuche zeigten, dass YscQ_C nicht mit den Chaperonen jedoch mit den Effektoren des Typ III Sekretionssystems schwach interagiert. Zudem bindet YscQ_C nicht an den aminoterminalen Bereich, der vermutlich an die ATPase bindet. Dies konnte am Beispiel von YopH gezeigt werden, da YopH_{Δ2-17} ebenso an YscQ_C bindet wie das Vollängen YopH.

DISKUSSION

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Komponenten des Typ III Sekretionssystems von *Yersinia enterocolitica* untersucht. Diese wurden jeweils rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt und chromatographisch gereinigt. Mehrere Proteine konnten so im Milligramm Maßstab gewonnen werden, so dass sie für kristallographische Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden konnten. Mittels Kupplungsreaktionen und Gelfiltration wurde deren Oligomerisierungsverhalten studiert und anschließend Wechselwirkungsstudien der Proteine miteinander durchgeführt. Teilweise wurden zudem Deletionsmutanten untersucht und mit entsprechenden Konstrukten komplementiert. Dabei wurde die Auswirkung auf die Infektion im Zellkulturmodell gezeigt.

5.1 LcrV

Das Protein LcrV bildet unter anderem die Nadelspitze des Typ III Sekretionsapparates (Mueller *et al.* 2005; Broz *et al.* 2007). Mittels Elektronenmikroskopie konnte abgeschätzt werden, dass es dort als Pentamer vorliegt. Bereits bei LcrV von *Yersinia pestis* Stämmen war Oligomerisation beobachtet worden (Derewenda *et al.* 2004). LcrV aus *Y. enterocolitica* hingegen war diesbezüglich noch nicht genau untersucht worden.

Mittels Kupplungsexperimenten konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass auch LcrV aus *Y. enterocolitica* Oligomere bildet. In analytischen Gelfiltrationen konnte jedoch gezeigt werden, dass LcrV in Lösung nur als Dimer vorliegt. Höhere Oligomere scheinen daher in Lösung nicht stabil zu sein und schnell wieder zu zerfallen. Diese Beobachtung gilt sowohl für das native Protein als auch ein Konstrukt mit aminoterminalen Hexahistidintag.

Durch SAXS Messungen konnte diese Beobachtung bestätigt werden und zudem eine räumliche Struktur des Dimers ausgemacht werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Dimer eine längliche statt globuläre Form einnimmt, was das Laufverhalten in der analytischen Gelfiltration erklärt. Durch dieses räumliche Aussehen eluiert das LcrV Dimer früher als ein entsprechendes globuläres Protein der gleichen Größe. In der Literatur war Anfang 2004 von Derewenda *et al.* (2004) eine Kristallstruktur von LcrV aus *Y. pestis* publiziert worden. Um überhaupt Kristalle zu erhalten waren jedoch vier Aminosäuren ausgetauscht worden, um die Oligomerisation zu unterbinden. Hierzu wurden neben dem Cysteinrest auch weitere drei Aminosäuren im aminoterminalen Bereich durch Alanin ersetzt. Die Kristallstruktur zeigte LcrV als Monomer.

Vergleicht man jedoch diese Kristallstruktur mit der funktionell homologer Proteine wie IpaD und BipD, so legt dies die Vermutung nahe, dass durch den Aminosäureaustausch möglicherweise eine α -Helix unterbrochen wurde. IpaD selbst liegt in Lösung als Dimer vor. In kristallisierter Form konnten Monomere und Dimere erhalten werden. Bei Abspaltung des Aminoterminus von IpaD konnten sogar höhere Oligomere in Lösung (Tetramer oder Pentamer) erhalten werden (Johnson *et al.* 2007).

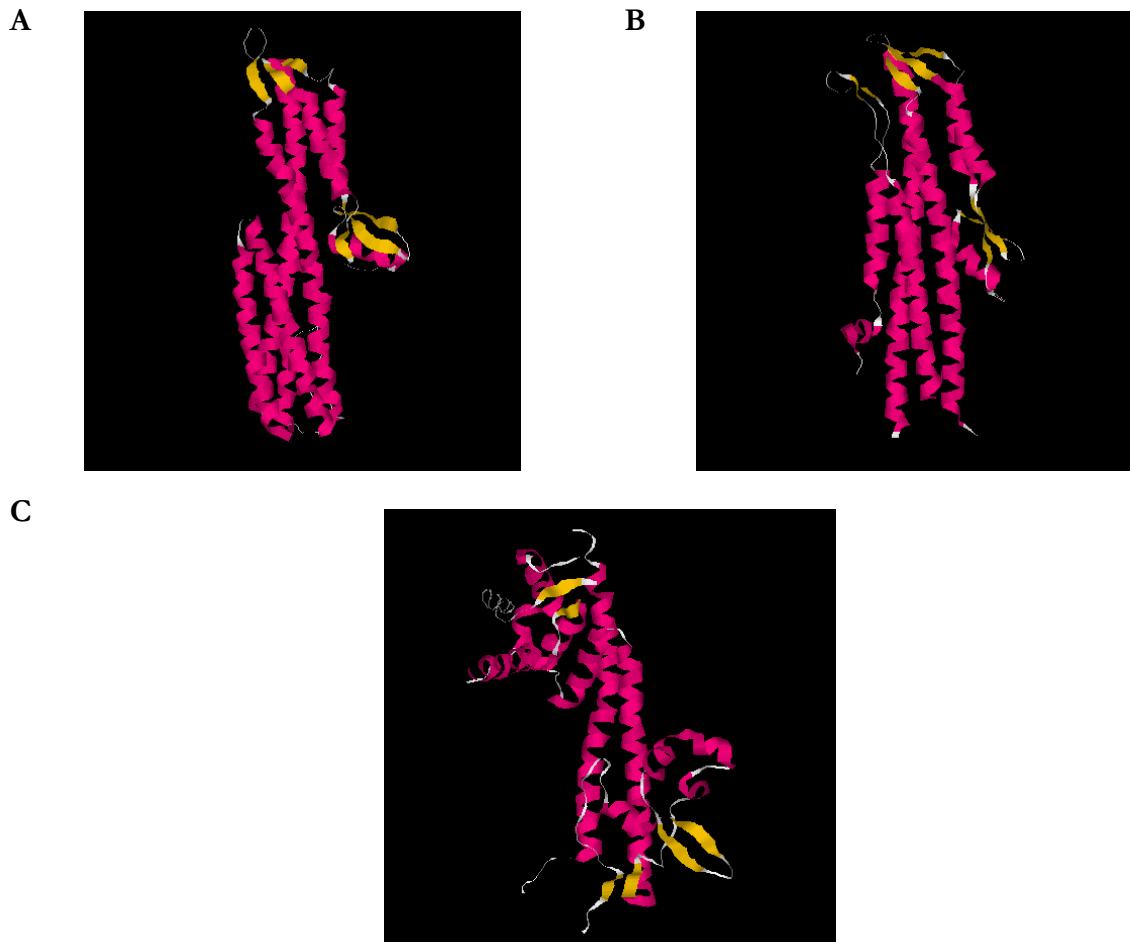


Abb.33: Kristallstrukturen der Nadelspitzenproteine IpaD, BipD und LcrV

A: IpaD (2J0O)

B: BipD (2IXR)

C: LcrV (1R6F)

Eine weitere Publikation, die für eine strukturelle Veränderung durch die Mutationen spricht, zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nadelspitze. Diese Arbeit von Mueller *et al.* (2005) zeigt die Form der LcrV Nadelspitze. Hier würde eine Struktur von LcrV, die der von IpaD und BipD ähnelt, deutlich besser in die Aufnahme hineinpassen.

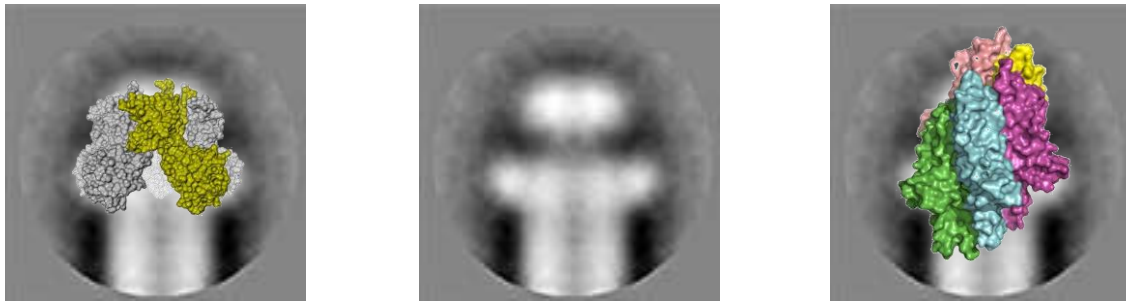


Abb.34: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Nadelspitze von *Yersinia enterocolitica*
 links: Modelliertes Pentamer der LcrV Kristallstruktur 1R6F (Broz *et al.* 2007)
 rechts: Modelliertes Pentamer von IpaD unter Verwendung des kristallisierten Dimers 2J00 (Johnson *et al.* 2006)

Um herauszufinden, ob das Dimer allein über den Cysteinrest zusammengehalten wird oder andere Wechselwirkungen eine Rolle spielen, wurde LcrV mit Reduktionsmitteln versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei zeigte sich, dass nur ein kleiner Anteil LcrV durch den Cysteinrest verbrückt ist. Diese Tatsache änderte sich jedoch in Proteinproben, die bereits älter waren und durch mehrmaliges Auftauen oder lange Lagerung im Kühlschrank eine erhöhte Möglichkeit zur Oxidation hatten.

Bei Untersuchungen in Nativgelsystemen bei unterschiedlichen pH Werten konnte zudem eine pH-Abhängigkeit der Oligomerisation festgestellt werden. Dies galt jedoch nur für LcrV mit einem aminoterminalen Hexahistidintag. Dies lässt vermuten, dass sich eine wichtige Bindungsregion im aminoterminalen Bereich befindet und durch den Affinitätstag teilweise gestört wird.

5.2 LcrG

Neben LcrV wurde auch LcrG, ein Bindungspartner von LcrV, untersucht. Von LcrG war bekannt, dass es sich um einen negativen Regulator des Typ III Sekretionssystems handelt (Sarker *et al.* 1998; Debord *et al.* 2001; Matson & Nilles 2001). Beide Proteine sind auf dem *lcr* Operon lokalisiert, was für low calcium response steht. Dieser Name rührt daher, dass Yersinien unter Calciummangelbedingungen die Effektoren ins Medium sezernieren und die Gene auf diesem Operon vermehrt exprimiert werden. LcrV ist als positiver Regulator des Typ III Sekretionssystems bekannt. In welcher Form ein niedriger Calciumspiegel im Medium die Sekretion stimuliert war unbekannt. Da LcrV an der Nadelspitze sowie im bakteriellen Cytoplasma lokalisiert ist, lag die Vermutung nahe, dass es eine Rolle in der Signalübertragung spielt. Um herauszufinden, ob diese Regulation durch eine verstärkte Komplexierung von LcrG durch LcrV unter Calciummangelbedingungen vonstattengeht, sollte das Verhalten der beiden Proteine in der Gelfiltration mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen untersucht werden.

Zudem sollte untersucht werden, ob LcrG durch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen des Typ III Sekretionssystems seine regulatorische Funktion entfaltet.

Bereits im Gelfiltrationsschritt der Reinigung des rekombinanten Proteins zeigte sich, dass LcrG Dimere bildet. Dies konnte durch Kupplungsreaktionen im SDS-PAGE bestätigt werden.

Die Untersuchung des Komplexes mit LcrV fand durch Größenausschlusschromatographie und Kupplungsexperimente statt. Dabei zeigte sich, dass es sich um ein Heterodimer handelt. In Koexpressionsversuchen zeigte sich, dass natives LcrV mit LcrG mit aminoterminalen Hexahistidintag die besten Ausbeuten ergaben. Auch hier scheint eine wichtige Bindungsregion im aminoterminalen Bereich von LcrV zu liegen. Vermutlich bindet LcrG dabei die Stelle, die wichtig für die Dimerisierung/Oligomerisation von LcrV ist (Lawton *et al.* 2002; Matson & Nilles 2002).

Für ein dreidimensionales Bild des Komplexes wurden neben Kristallisationsversuchen SAXS-Messungen durchgeführt. Auch das erhaltene räumliche Bild des LcrG/LcrV-Komplexes zeigt eindeutig einen 1:1-Komplex.

Ob die künstliche Sezernierung der Yops ins Medium unter Calciummangelbedingungen an der Stabilität des Komplexes bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen liegt, sollte durch analytische Gelfiltration herausgefunden werden. Es zeigte sich jedoch, dass der Komplex in Anwesenheit und Abwesenheit von Calcium gleichermaßen stabil ist. Das Sekretionssignal mittels Calciumdepletion erfolgt daher ganz oder mithilfe weiterer Proteine. Ein Protein, welches eine Rolle in diesem Prozess spielen könnte, ist das Nadelprotein YscF (Davis & Meccas 2007). Das Nadelprotein wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Für die weitere Untersuchung des regulatorischen Netzwerks des Typ III Sekretionssystems wurde in dieser Arbeit auch die Interaktion von LcrG mit den Chaperonen untersucht. Diese besitzen ebenfalls regulatorische Funktionen, die sich nicht nur auf die Expression und Sekretion des entsprechenden Yops beschränken (Wilharm *et al.* 2007). Hierzu wurden die rekombinant erhaltenen Chaperone und LcrG sowohl in Nativgelsystemen als auch Kupplungsexperimenten untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass schwache Interaktionen zwischen diesen Proteinen bestehen. Aufgrund ähnlicher Größe konnte eine analytische Gelfiltration und SDS-PAGE keine eindeutige Aussage liefern. Aus diesem Grund wurden die Proteine zunächst mit einem Crosslinker inkubiert und anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert. Es zeigte sich dabei, dass LcrG mit SycD einen 1:1 Komplex bildet, wohingegen die anderen Chaperone 1:2 Komplexe bildeten. Naheliegend für das andere Verhalten von SycD ist, dass es sich hierbei um eine andere Klasse von Chaperon handelt, welches die beiden Translokatoren YopB und YopD bindet. SycD hat zudem eine andere dreidimensionale Struktur als die Chaperone der anderen Effektoren (Evdokimov *et al.* 2002; Phan *et al.* 2004; Locher *et al.* 2005; Buttner *et al.* 2008). Die

Effektorchaperone regulieren die Expression des jeweiligen Yops positiv (Francis *et al.* 2001; Cambronne *et al.* 2004). Durch die Bildung der Komplexe mit LcrG kann die Transkription der Yops nicht in dem Maße stattfinden, wie es ohne LcrG der Fall wäre. Dies wäre eine Erklärung für die indirekte negative regulatorische Funktion von LcrG.

5.3 SycO

Zu Beginn dieser Arbeit waren noch keine Informationen über ein mögliches Chaperon von YopO bekannt. Es war schon lange vermutet worden, dass es sich bei dem offenen Leseraster *orf155*, welches zusammen mit *yopO* und *yopP* auf einem Operon lokalisiert ist, um ein Chaperon handeln könnte (Pallen *et al.* 2005). Allerdings konnte bei dem homologen Leseraster *orf1* in *Yersinia pseudotuberculosis* unter *in vitro* Bedingungen nicht gezeigt werden, dass das Protein für die Sekretion notwendig war. Aus diesem Grunde war von dem Gedanken, es könne sich um ein spezifisches Yop Chaperon handeln, Abstand genommen worden (Galyov *et al.* 1994; Perry *et al.* 1998).

In dieser Arbeit war das Chaperon SycO in rekombinanter nativer Form hergestellt worden. Die Reinigung des Proteins fand zunächst in seiner nativen Form statt, da die Einführung eines Hexahistidintags am aminoterminalen sowie am carboxyterminalen Ende zu einem unlöslichen Produkt führte. Nachdem Antikörper gegen SycO hergestellt worden waren, wurde gezeigt, dass das Protein SycO in Yersinien hergestellt wird. Hierzu wurden Yersinienlysate mittels Immunoblot analysiert.

Um herauszufinden, ob SycO die typische Chaperoneigenschaft besitzt zu dimerisieren, wurden analytische Gelfiltrationen und Kupplungsexperimente durchgeführt. Diese zeigten allesamt auf, dass es sich bei SycO vorherrschend um ein Dimer handelt, welches darüber hinaus höhere allerdings in Lösung nicht stabile Oligomere bildet. Die Interaktion mit YopO konnte im Nativgelsystem gezeigt werden. Pull-Down-Versuche mit GST-getagtem YopO scheiterten, da SycO auch alleine an die Sepharose band.

Da Kristallisationsversuche mit nativem SycO nicht erfolgreich waren, wurden die letzten hydrophoben Aminosäuren am carboxyterminalen Ende entfernt. Zur vereinfachten Reinigung wurde zudem ein aminoterminaler Hexahistidintag mit darauffolgender TEV Proteaseschnittstelle eingeführt. Die Kristallisationsversuche mit diesem Konstrukt, die in Kooperation mit der Gruppe von Michael Groll gemacht wurden, schlugen jedoch fehl.

Während der Durchführung dieser Arbeit wurde von Letzelter *et al.* (2006) publiziert, dass es sich dabei um das spezifische Chaperon von YopO handelt. Der Nachweis, dass es sich dabei um ein essentielles Protein für die Translokation handelt, war durch Zellkulturexperimente gezeigt worden. Dabei waren J774 Makrophagen mit *yopO* Deletionsmutanten sowie komplementierten

Mutanten infiziert worden. Für den Nachweis der Translokation von YopO war ein Konstrukt verwendet worden, welches aus den ersten 143 Aminosäuren von YopO fusioniert mit einer Adenylatcyclase bestand. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei einer Infektion mit der *yocO* Mutante im Gegensatz zum Wildtyp keine Akkumulation von cAMP stattfand, was rückschließen ließ, dass SycO essentiell für die Translokation von YopO ist.

5.4 orf91b

Ein weiteres noch nicht charakterisiertes offenes Leseraster war das Gen *orf91b*. Dieses Leseraster ist nicht in allen *Yersinia* Spezies vorhanden, jedoch in allen *Yersinia enterocolitica* Stämmen. Zur Untersuchung war bereits eine Deletionsmutante vorhanden. Ein Expressionskonstrukt im pGEX-Vektor lieferte jedoch kein Produkt in *E. coli*. Nachdem dieses jedoch in einen pET-Vektor umklont worden war, konnte das Protein rekombinant hergestellt werden. Da es sich um ein unlösliches Protein handelte, wurde es auf proteinchemischer Basis nicht weiter untersucht. Auffällig war, dass eine Expression bei 37°C, nicht jedoch bei 20°C, erfolgreich war. Um die Rolle von *orf91b* *in vivo* zu untersuchen, wurden Infektionsversuche durchgeführt. Neben Invasionsassays mit Gentamycin, welche keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, wurden Infektionsversuche mit J774 Makrophagen gemacht und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierzu war zum einen das Gen *orf91b* mit der potentiellen Promotorregion in einen Vektor kloniert worden und carboxyterminal ein HA-Tag angefügt worden. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen lieferten jedoch keine eindeutigen Hinweise darauf, wo und in welcher Weise *orf91b* eine Rolle in der Infektion spielen könnte. Die Infektionsversuche, bei denen die Effektorproteine mittels Antikörper gefärbt worden waren, zeigten einige Auffälligkeiten, welche jedoch aufgrund der fehlenden Wiederholungen des Versuches nicht eindeutig charakterisiert werden konnten. So konnte zum Beispiel bei der Färbung mit dem YopP Antikörper eine verminderte Translokation in die Wirtszelle in der Mutante festgestellt werden. Dasselbe galt in deutlich verringertem Maße für YopT, wohingegen die Translokation von YopM in der Mutante vermehrt zu sein schien. Ein weiterer Versuch mit einem YopM-HA-Konstrukt in einer *orf91b*- und einer *yopM* Deletionsmutante konnte dies ebenso zeigen. Der Vorteil war hierbei, dass mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen den HA-Tag gefärbt werden konnte.

Sekretionsversuche mit der Deletionsmutante sowie dem komplementierten Stamm zeigten außerdem, dass YopP in der Mutante in geringeren Mengen sekretiert wurde. Zudem konnten in der komplementierten Yersinie größere Mengen YopP im Zellpellet nachgewiesen werden. Der offensichtliche Einfluss von *orf91b* auf YopP, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden. Möglicherweise erlaubt die Koexpression von *orf91b* zusammen mit YopP die Gewinnung

löslicher Komplexe. Daneben müssten weitere Versuche möglicherweise auf DNA-Ebene, zum Beispiel Deletionsexperimente, unternommen werden, um den Einfluss von *orf91b* auf die Expression nachzuweisen.

5.5 YscQ

Bis heute ist die Substraterkennung im Typ III Sekretionssystem nicht geklärt. Zwar wurden unterschiedlichste Arbeiten verschiedener Gruppen publiziert, doch gibt es bisher kein eindeutiges Ergebnis. Neben Arbeiten, die auf ein mögliches Sekretionssignal auf RNA Ebene deuten, gibt es ebenso Arbeiten, die eher ein Sekretionssignal auf Proteinebene vermuten lassen (Woestyn *et al.* 1996; Anderson & Schneewind 1997; Cheng *et al.* 1997; Aldridge & Hughes 2001; Birtalan *et al.* 2002; Ramamurthi & Schneewind 2003). Gegen die Theorie des Signals auf RNA Ebene spricht vor allem, dass die Translokation der Proteine in das Wirtszellmedium bereits nach wenigen Sekunden erfolgt und eine Synthese der Effektoren in der kurzen Zeit nicht möglich ist. Eine aminoterminal Signalsequenz konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden. Einen Hinweis liefern jedoch die Chaperone des Typ III Sekretionssystems. Diese besitzen trotz fehlender Sequenzhomologie eine strukturelle Ähnlichkeit und wurden deswegen als mögliches dreidimensionales Sekretionssignal angesehen. Hiergegen spricht jedoch, dass nicht jedes Effektorprotein ein spezifisches Chaperon besitzt. So ist für YopP und YopM noch kein Chaperon bekannt. Für die Translokation ist bekannt, dass etwa 20 Aminosäuren am Aminoterminus eine entscheidende Rolle spielen.

Wegen der Ähnlichkeit des cytosolischen Teils homologer Proteine von YscQ sollte in dieser Arbeit der carboxyterminale Teil des Proteins, welcher ins bakterielle Cytosol ragt, näher untersucht werden.

Für eine wichtige Rolle in der Substraterkennung sprach zudem, dass vermutlich die ATPase des Typ III Sekretionssystems über YscL an YscQ bindet (Plano & Jackson 2000). Da YscQ mehrere Transmembrandomänen besitzt und von dem homologen Flagellenprotein FliN bereits bekannt war, dass es einen cytosolischen carboxyterminalen Teil besitzt, wurde nur das carboxyterminale Ende von YscQ rekombinant hergestellt.

Das hergestellte Protein YscQ_C wurde zunächst auf eine mögliche Oligomerisierung untersucht. Dies geschah mittels Gelfiltration und Kupplungsexperimenten. Dabei zeigte sich, dass es sich bei dem Protein analog zum FliN um ein Tetramer handelte.

Weitere Kupplungsexperimente mit Substraten und Chaperonen des Typ III Sekretionssystems konnten zeigen, dass YscQ_C mit verschiedenen Transportsubstraten, jedoch nicht mit den Sycs interagiert. Die Interaktion war in allen Fällen schwach und konnte mit YopH nicht in der analytischen Gelfiltration nachgewiesen werden. Dies ist jedoch plausibel, da es sich hierbei um

transiente Wechselwirkungen handelt. Wären diese zu stark, würden sie den Transportprozess unterbinden.

Die Bindung von YscQ_C an YopH konnte zudem auch mit einem verkürzten YopH-Konstrukt nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die Bindungsstelle zumindest im Falle von YopH nicht am aminoterminalen Ende lokalisiert ist. Dies wurde auch dadurch bestätigt, dass YscQ_C den Effektor/Chaperon-Komplex YopH/SycH bindet. Die Tatsache, dass die Bindung nicht am Aminoterminus stattfindet, erscheint sehr plausibel, da dieser Teil an die ATPase YscN bindet und den Ansatzpunkt für die Entfaltung bildet. Dieses war im Laufe dieser Arbeit von der Gruppe um Olaf Schneewind gezeigt worden (Blaylock *et al.* 2006; Sorg *et al.* 2006).

Zwar konnten auch in dieser Arbeit Wechselwirkungen der Substrate mit der ATPase gezeigt werden, jedoch war es nicht möglich gewesen, die ATPase so rückzufalten, dass ATP Hydrolyse nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Inwiefern YscQ_C und YscN zusammen interagieren und möglicherweise zusammen die Substraterkennung koordinieren konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden. Eine Koexpression der Proteine YscQ_C, YscN und YscL, dem potentiellen Regulator der ATPase, führte zu keinem löslichen Komplex.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Typ III Sekretionssystem ist ein Proteintransportsystem, welches von vielen pathogenen gramnegativen Bakterien verwendet wird, um im Wirtszellorganismus zu überleben. Es besteht aus einem membranüberspannenden Aufbau, der nadelförmig aus dem Bakterium herausragt. Während die Proteine, die dieses Konstrukt bilden, konserviert sind, sind die Effektoren, die durch die Nadel in den Wirt geschleust werden, unterschiedlich und abgestimmt auf die jeweilige Erregerstrategie.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Komponenten des Typ III Sekretionssystems von *Yersinia enterocolitica* untersucht. Hierzu gehörte LcrV, welches die Nadelspitze bildet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Protein pH-abhängig Oligomere bildet. Bei physiologischem pH liegen in Lösung vor allem längliche Dimere vor. Ebenso liegt LcrG, ein Bindungspartner von LcrV, als Dimer vor und der Komplex beider Proteine als Heterodimer. Die räumliche Struktur aller drei Komplexe konnte durch SAXS Messungen gezeigt werden.

Weiterführende Interaktionsstudien zeigten, dass LcrG mit Chaperonen des Typ III Sekretionssystems wechselwirkt. Eines der Chaperone war das zu Beginn der Arbeit noch unbekanntes SycO. Dieses konnte in nativer Form rekombinant hergestellt und in Yersinienlysaten nachgewiesen werden. Weitere Experimente zeigten, dass SycO als Homodimer in Lösung vorliegt und das dazugehörige Effektorprotein YopO bindet. Das offene Leseraster *orf91b* wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zellkulturexperimenten untersucht. Diese deuteten darauf hin, dass das Protein einen Einfluss auf die Translokation der Effektorproteine haben könnte. Dieses müsste jedoch durch weitere Versuche bestätigt werden.

Zur Aufklärung des Transportmechanismus wurde der cytosolische Teil von YscQ untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Erkennung der Effektoren eine wichtige Rolle spielen kann, da es sowohl Effektoren als auch Effektor/Chaperon-Komplexe, jedoch nicht Chaperone alleine bindet. Inwiefern dies vor allem in der Interaktion mit der ATPase YscN eine Rolle spielt, müsste in weiteren Experimenten und Arbeiten untersucht werden.

Durch diese Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das regulatorische Netzwerk des Typ III Sekretionssystems um die Wechselwirkung von LcrG mit den Chaperonen erweitert werden muss. Zudem wurde mit den Untersuchungen des cytosolischen Teils von YscQ ein wichtiger Ansatzpunkt zur Aufklärung der Substraterkennung geliefert.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aepfelbacher, M., C. Trasak, G. Wilharm, A. Wiedemann, K. Trulzsch, K. Krauss, P. Gierschik and J. Heesemann (2003). Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J.Biol.Chem.* **278**(35), 33217-33223.
- Aepfelbacher, M., R. Zumbihl and J. Heesemann (2005). Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by YopT of *Yersinia*. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **291**, 167-175.
- Agrain, C., I. Callebaut, L. Journet, I. Sorg, C. Paroz, L. J. Mota and G. R. Cornelis (2005). Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol.Microbiol.* **56**(1), 54-67.
- Agrain, C., I. Sorg, C. Paroz and G. R. Cornelis (2005). Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. *Mol.Microbiol.* **57**(5), 1415-1427.
- Aili, M., B. Hallberg, H. Wolf-Watz and R. Rosqvist (2002). GAP activity of *Yersinia* YopE. *Methods Enzymol.* **358**, 359-370.
- Akeda, Y. and J. E. Galan (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**(7060), 911-915.
- Aldridge, P. and K. T. Hughes (2001). How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol.* **9**(5), 209-214.
- Allaoui, A., S. Woestyn, C. Sluiter and G. R. Cornelis (1994). YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J.Bacteriol.* **176**(15), 4534-4542.
- Anderson, D. M. and O. Schneewind (1997). A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**(5340), 1140-1143.
- Anderson, D. M. and O. Schneewind (1999). *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Mol.Microbiol.* **31**(4), 1139-1148.
- Andersson, K., N. Carballeira, K. E. Magnusson, C. Persson, O. Stendahl, H. Wolf-Watz and M. Fallman (1996). YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol.Microbiol.* **20**(5), 1057-1069.
- Autenrieth, S. E., I. Soldanova, R. Rosemann, D. Gunst, N. Zahir, M. Kracht, K. Ruckdeschel, H. Wagner, S. Borgmann and I. B. Autenrieth (2007). *Yersinia enterocolitica* YopP inhibits MAP kinase-mediated antigen uptake in dendritic cells. *Cell Microbiol.* **9**(2), 425-437.
- Balligand, G., Y. Laroche and G. Cornelis (1985). Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect.Immun.* **48**(3), 782-786.

- Bartra, S., P. Cherepanov, A. Forsberg and K. Schesser (2001). The Yersinia YopE and YopH type III effector proteins enhance bacterial proliferation following contact with eukaryotic cells. *BMC Microbiol.* **1**, 22.
- Barz, C., T. N. Abahji, K. Trulzsch and J. Heesemann (2000). The Yersinia Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* **482**(1-2), 139-143.
- Benabdillah, R., L. J. Mota, S. Lutzelschwab, E. Demoinet and G. R. Cornelis (2004). Identification of a nuclear targeting signal in YopM from Yersinia spp. *Microb.Pathog.* **36**(5), 247-261.
- Birtalan, S. and P. Ghosh (2001). Structure of the Yersinia type III secretory system chaperone SycE. *Nat.Struct.Biol.* **8**(11), 974-978.
- Birtalan, S. C., R. M. Phillips and P. Ghosh (2002). Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol.Cell* **9**(5), 971-980.
- Black, D. S. and J. B. Bliska (2000). The RhoGAP activity of the Yersinia pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol.Microbiol.* **37**(3), 515-527.
- Black, D. S., A. Marie-Cardine, B. Schraven and J. B. Bliska (2000). The Yersinia tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages. *Cell Microbiol.* **2**(5), 401-414.
- Black, R. E., R. J. Jackson, T. Tsai, M. Medvesky, M. Shayegani, J. C. Feeley, K. I. MacLeod and A. M. Wakelee (1978). Epidemic Yersinia enterocolitica infection due to contaminated chocolate milk. *N.Engl.J.Med.* **298**(2), 76-79.
- Blaylock, B., K. E. Riordan, D. M. Missiakas and O. Schneewind (2006). Characterization of the Yersinia enterocolitica type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J.Bacteriol.* **188**(10), 3525-3534.
- Boland, A. and G. R. Cornelis (1998). Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect.Immun.* **66**(5), 1878-1884.
- Boland, A., S. Havaux and G. R. Cornelis (1998). Heterogeneity of the Yersinia YopM protein. *Microb.Pathog.* **25**(6), 343-348.
- Bolin, I. and H. Wolf-Watz (1984). Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of Yersinia pseudotuberculosis. *Infect.Immun.* **43**(1), 72-78.
- Boyd, A. P., I. Lambermont and G. R. Cornelis (2000). Competition between the Yops of Yersinia enterocolitica for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J.Bacteriol.* **182**(17), 4811-4821.
- Brown, P. N., M. A. Mathews, L. A. Joss, C. P. Hill and D. F. Blair (2005). Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from Thermotoga maritima. *J.Bacteriol.* **187**(8), 2890-2902.

- Broz, P., C. A. Mueller, S. A. Muller, A. Philippsen, I. Sorg, A. Engel and G. R. Cornelis (2007). Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Mol.Microbiol.* **65**(5), 1311-1320.
- Burghout, P., R. van Boxtel, P. Van Gelder, P. Ringler, S. A. Muller, J. Tommassen and M. Koster (2004). Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.* **186**(14), 4645-4654.
- Buttner, C. R., I. Sorg, G. R. Cornelis, D. W. Heinz and H. H. Niemann (2008). Structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion translocator chaperone SycD. *J.Mol.Biol.* **375**(4), 997-1012.
- Buttner, D. and U. Bonas (2002). Port of entry--the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* **10**(4), 186-192.
- Cambronne, E. D., J. A. Sorg and O. Schneewind (2004). Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector yop expression in *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.* **186**(3), 829-841.
- Carniel, E. (1999). The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int.Microbiol.* **2**(3), 161-167.
- Carniel, E. (2001). The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect.* **3**(7), 561-569.
- Carniel, E., I. Guilvout and M. Prentice (1996). Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.* **178**(23), 6743-6751.
- Cheng, L. W., D. M. Anderson and O. Schneewind (1997). Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. *Mol.Microbiol.* **24**(4), 757-765.
- Cornelis, G. R. (2002). *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J.Cell Biol.* **158**(3), 401-408.
- Cornelis, G. R. (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**(10), 742-752.
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat.Rev.Microbiol.* **4**(11), 811-825.
- Cornelius, C., L. Quenee, D. Anderson and O. Schneewind (2007). Protective immunity against plague. *Adv.Exp.Med.Biol.* **603**, 415-424.
- Davis, A. J. and J. Meccas (2007). Mutations in the *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion system needle protein, YscF, that specifically abrogate effector translocation into host cells. *J.Bacteriol.* **189**(1), 83-97.
- Day, J. B. and G. V. Plano (1998). A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. *Mol.Microbiol.* **30**(4), 777-788.
- Debord, K. L., V. T. Lee and O. Schneewind (2001). Roles of LcrG and LcrV during type III targeting of effector Yops by *Yersinia enterocolitica*. *J.Bacteriol.* **183**(15), 4588-4598.

- Deleuil, F., L. Mogemark, M. S. Francis, H. Wolf-Watz and M. Fallman (2003). Interaction between the Yersinia protein tyrosine phosphatase YopH and eukaryotic Cas/Fyb is an important virulence mechanism. *Cell Microbiol.* **5**(1), 53-64.
- Delor, I. and G. R. Cornelis (1992). Role of Yersinia enterocolitica Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect.Immun.* **60**(10), 4269-4277.
- Denecker, G., W. Declercq, C. A. Geuijen, A. Boland, R. Benabdillah, M. van Gurp, M. P. Sory, P. Vandenabeele and G. R. Cornelis (2001). Yersinia enterocolitica YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J.Biol.Chem.* **276**(23), 19706-19714.
- Derewenda, U., A. Mateja, Y. Devedjiev, K. M. Routzahn, A. G. Evdokimov, Z. S. Derewenda and D. S. Waugh (2004). The structure of Yersinia pestis V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. *Structure.* **12**(2), 301-306.
- Edqvist, P. J., J. Olsson, M. Lavander, L. Sundberg, A. Forsberg, H. Wolf-Watz and S. A. Lloyd (2003). YscP and YscU regulate substrate specificity of the Yersinia type III secretion system. *J.Bacteriol.* **185**(7), 2259-2266.
- Emody, L., J. Heesemann, H. Wolf-Watz, M. Skurnik, G. Kapperud, P. O'Toole and T. Wadstrom (1989). Binding to collagen by Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J.Bacteriol.* **171**(12), 6674-6679.
- Evdokimov, A. G., D. E. Anderson, K. M. Routzahn and D. S. Waugh (2001). Unusual molecular architecture of the Yersinia pestis cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J.Mol.Biol.* **312**(4), 807-821.
- Evdokimov, A. G., J. E. Tropea, K. M. Routzahn and D. S. Waugh (2002). Crystal structure of the Yersinia pestis GTPase activator YopE. *Protein Sci.* **11**(2), 401-408.
- Evdokimov, A. G., J. E. Tropea, K. M. Routzahn and D. S. Waugh (2002). Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from Yersinia pestis. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* **58**(Pt 3), 398-406.
- Flugel, A., H. Schulze-Koops, J. Heesemann, K. Kuhn, L. Sorokin, H. Burkhardt, K. von der Mark and F. Emmrich (1994). Interaction of enteropathogenic Yersinia enterocolitica with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J.Biol.Chem.* **269**(47), 29732-29738.
- Francis, M. S., S. A. Lloyd and H. Wolf-Watz (2001). The type III secretion chaperone LcrH cooperates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in Yersinia pseudotuberculosis. *Mol.Microbiol.* **42**(4), 1075-1093.
- Galyov, E. E., S. Hakansson and H. Wolf-Watz (1994). Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of Yersinia pseudotuberculosis. *J.Bacteriol.* **176**(15), 4543-4548.
- Gonzalez-Pedrajo, B., G. M. Fraser, T. Minamino and R. M. Macnab (2002). Molecular dissection of Salmonella FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway. *Mol.Microbiol.* **45**(4), 967-982.

- Goodin, J. L., R. W. Raab, R. L. McKown, G. L. Coffman, B. S. Powell, J. T. Enama, J. A. Ligon and G. P. Andrews (2005). Yersinia pestis outer membrane type III secretion protein YscC: expression, purification, characterization, and induction of specific antiserum. *Protein Expr.Purif.* **40**(1), 152-163.
- Goure, J., P. Broz, O. Attree, G. R. Cornelis and I. Attree (2005). Protective anti-V antibodies inhibit Pseudomonas and Yersinia translocon assembly within host membranes. *J.Infect.Dis.* **192**(2), 218-225.
- Green, S. P., E. L. Hartland, R. M. Robins-Browne and W. A. Phillips (1995). Role of YopH in the suppression of tyrosine phosphorylation and respiratory burst activity in murine macrophages infected with Yersinia enterocolitica. *J.Leukoc.Biol.* **57**(6), 972-977.
- Grobner, S., S. E. Autenrieth, I. Soldanova, D. S. Gunst, M. Schaller, E. Bohn, S. Muller, M. Leverkus, S. Wesselborg, I. B. Autenrieth and S. Borgmann (2006). Yersinia YopP-induced apoptotic cell death in murine dendritic cells is partially independent from action of caspases and exhibits necrosis-like features. *Apoptosis* **11**(11), 1959-1968.
- Groves, E., K. Rittinger, M. Amstutz, S. Berry, D. W. Holden, G. R. Cornelis and E. Caron (2010). Sequestering of Rac by the Yersinia effector YopO blocks Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *J.Biol.Chem.* **285**(6), 4087-4098.
- Hamad, M. A. and M. L. Nilles (2007). Roles of YopN, LcrG and LcrV in controlling Yops secretion by Yersinia pestis. *Adv.Exp.Med.Biol.* **603**, 225-234.
- Hamid, N., A. Gustavsson, K. Andersson, K. McGee, C. Persson, C. E. Rudd and M. Fallman (1999). YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb.Pathog.* **27**(4), 231-242.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**(4), 557-580.
- Heesemann, J., B. Algermissen and R. Laufs (1984). Genetically manipulated virulence of Yersinia enterocolitica. *Infect.Immun.* **46**(1), 105-110.
- Heesemann, J., U. Gross and L. Gruter (1987). Genetic manipulation of virulence of Yersinia enterocolitica. *Contrib.Microbiol.Immunol.* **9**, 312-316.
- Heusipp, G., K. Spekker, S. Brast, S. Falker and M. A. Schmidt (2006). YopM of Yersinia enterocolitica specifically interacts with alpha1-antitrypsin without affecting the anti-protease activity. *Microbiology* **152**(Pt 5), 1327-1335.
- Hoiczky, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas and J. Heesemann (2000). Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* **19**(22), 5989-5999.
- Iriarte, M. and G. R. Cornelis (1998). YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol.Microbiol.* **29**(3), 915-929.
- Isberg, R. R. (1990). Pathways for the penetration of enteroinvasive Yersinia into mammalian cells. *Mol.Biol.Med.* **7**(1), 73-82.

- Jackson, M. W. and G. V. Plano (2000). Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol.Lett.* **186**(1), 85-90.
- Johnson, S., P. Roversi, M. Espina, J. E. Deane, S. Birket, W. D. Picking, A. Blocker, W. L. Picking and S. M. Lea (2006). Expression, limited proteolysis and preliminary crystallographic analysis of IpaD, a component of the *Shigella flexneri* type III secretion system. *Acta Crystallogr.Sect.F.Struct.Biol.Cryst.Commun.* **62**(Pt 9), 865-868.
- Johnson, S., P. Roversi, M. Espina, A. Olive, J. E. Deane, S. Birket, T. Field, W. D. Picking, A. J. Blocker, E. E. Galyov, W. L. Picking and S. M. Lea (2007). Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *J.Biol.Chem.* **282**(6), 4035-4044.
- Journet, L., C. Agrain, P. Broz and G. R. Cornelis (2003). The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**(5651), 1757-1760.
- Kapperud, G. and E. Namork (1987). Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. Correlation with outer membrane protein YOP1, autoagglutination, and hemagglutination. *Contrib.Microbiol.Immunol.* **9**, 165-172.
- Kerschen, E. J., D. A. Cohen, A. M. Kaplan and S. C. Straley (2004). The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect.Immun.* **72**(8), 4589-4602.
- Koster, M., W. Bitter, H. de Cock, A. Allaoui, G. R. Cornelis and J. Tommassen (1997). The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol.Microbiol.* **26**(4), 789-797.
- Lachica, R. V., D. L. Zink and W. R. Ferris (1984). Association of fibril structure formation with cell surface properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **46**(1), 272-275.
- Lawton, D. G., C. Longstaff, B. A. Wallace, J. Hill, S. E. Leary, R. W. Titball and K. A. Brown (2002). Interactions of the type III secretion pathway proteins LcrV and LcrG from *Yersinia pestis* are mediated by coiled-coil domains. *J.Biol.Chem.* **277**(41), 38714-38722.
- Leong, J. M., R. S. Fournier and R. R. Isberg (1990). Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J.* **9**(6), 1979-1989.
- Letzelter, M., I. Sorg, L. J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, M. Feldman, M. Kuhn, I. Callebaut and G. R. Cornelis (2006). The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J.* **25**(13), 3223-3233.
- Leung, K. Y. and S. C. Straley (1989). The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J.Bacteriol.* **171**(9), 4623-4632.
- Locher, M., B. Lehnert, K. Krauss, J. Heesemann, M. Groll and G. Wilharm (2005). Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *J.Biol.Chem.* **280**(35), 31149-31155.

- Marenne, M. N., L. Journet, L. J. Mota and G. R. Cornelis (2003). Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb.Pathog.* **35**(6), 243-258.
- Matson, J. S. and M. L. Nilles (2001). LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.* **183**(17), 5082-5091.
- Matson, J. S. and M. L. Nilles (2002). Interaction of the *Yersinia pestis* type III regulatory proteins LcrG and LcrV occurs at a hydrophobic interface. *BMC Microbiol.* **2**, 16.
- McMurry, J. L., J. W. Murphy and B. Gonzalez-Pedrajo (2006). The FliN-FliH interaction mediates localization of flagellar export ATPase FliI to the C ring complex. *Biochemistry* **45**(39), 11790-11798.
- Miller, V. L. and S. Falkow (1988). Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect.Immun.* **56**(5), 1242-1248.
- Minamino, T., B. Gonzalez-Pedrajo, M. Kihara, K. Namba and R. M. Macnab (2003). The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH. *J.Bacteriol.* **185**(13), 3983-3988.
- Minamino, T. and R. M. MacNab (2000). FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol.Microbiol.* **37**(6), 1494-1503.
- Minamino, T. and K. Namba (2008). Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**(7177), 485-488.
- Mota, L. J. (2006). Type III secretion gets an LcrV tip. *Trends Microbiol.* **14**(5), 197-200.
- Mota, L. J. and G. R. Cornelis (2005). The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann.Med.* **37**(4), 234-249.
- Mueller, C. A., P. Broz, S. A. Muller, P. Ringler, F. Erne-Brand, I. Sorg, M. Kuhn, A. Engel and G. R. Cornelis (2005). The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* **310**(5748), 674-676.
- Navarro, L., N. M. Alto and J. E. Dixon (2005). Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. *Curr.Opin.Microbiol.* **8**(1), 21-27.
- Nejedlik, L., T. Pierfelice and J. R. Geiser (2004). Actin distribution is disrupted upon expression of *Yersinia* YopO/YpkA in yeast. *Yeast* **21**(9), 759-768.
- Neyt, C. and G. R. Cornelis (1999). Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol.Microbiol.* **33**(5), 971-981.
- Neyt, C. and G. R. Cornelis (1999). Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol.Microbiol.* **31**(1), 143-156.

- Nilles, M. L., K. A. Fields and S. C. Straley (1998). The V antigen of *Yersinia pestis* regulates Yop vectorial targeting as well as Yop secretion through effects on YopB and LcrG. *J.Bacteriol.* **180**(13), 3410-3420.
- Nilles, M. L., A. W. Williams, E. Skrzypek and S. C. Straley (1997). *Yersinia pestis* LcrV forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low-Ca²⁺ response. *J.Bacteriol.* **179**(4), 1307-1316.
- Overheim, K. A., R. W. Depaolo, K. L. Debord, E. M. Morrin, D. M. Anderson, N. M. Green, R. R. Brubaker, B. Jabri and O. Schneewind (2005). LcrV plague vaccine with altered immunomodulatory properties. *Infect.Immun.* **73**(8), 5152-5159.
- Page, A. L. and C. Parsot (2002). Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol.Microbiol.* **46**(1), 1-11.
- Pai, C. H. and V. Mors (1978). Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **19**(3), 908-911.
- Pallen, M. J., S. A. Beatson and C. M. Bailey (2005). Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol.* **5**, 9.
- Parsot, C., C. Hamiaux and A. L. Page (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr.Opin.Microbiol.* **6**(1), 7-14.
- Paul, K., M. Erhardt, T. Hirano, D. F. Blair and K. T. Hughes (2008). Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* **451**(7177), 489-492.
- Pepe, J. C. and V. L. Miller (1993). *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**(14), 6473-6477.
- Perry, R. D., S. C. Straley, J. D. Fetherston, D. J. Rose, J. Gregor and F. R. Blattner (1998). DNA sequencing and analysis of the low-Ca²⁺-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5. *Infect.Immun.* **66**(10), 4611-4623.
- Persson, C., N. Carballeira, H. Wolf-Watz and M. Fallman (1997). The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J.* **16**(9), 2307-2318.
- Phan, J., K. Lee, S. Cherry, J. E. Tropea, T. R. Burke, Jr. and D. S. Waugh (2003). High-resolution structure of the *Yersinia pestis* protein tyrosine phosphatase YopH in complex with a phosphotyrosyl mimetic-containing hexapeptide. *Biochemistry* **42**(45), 13113-13121.
- Phan, J., J. E. Tropea and D. S. Waugh (2004). Structure of the *Yersinia pestis* type III secretion chaperone SycH in complex with a stable fragment of YscM2. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* **60**(Pt 9), 1591-1599.
- Plano, G. V. and M. W. Jackson (2000). Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two hybrid system. *FEMS Microbiol.Lett.* **186**(1), 85-90.
- Portnoy, D. A. and R. J. Martinez (1985). Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **118**, 29-51.

- Ramamurthi, K. S. and O. Schneewind (2002). Type iii protein secretion in yersinia species. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **18**, 107-133.
- Ramamurthi, K. S. and O. Schneewind (2003). Substrate recognition by the Yersinia type III protein secretion machinery. *Mol.Microbiol.* **50**(4), 1095-1102.
- Reisner, B. S. and S. C. Straley (1992). Yersinia pestis YopM: thrombin binding and overexpression. *Infect.Immun.* **60**(12), 5242-5252.
- Reithmeier-Rost, D., J. Hill, S. J. Elvin, D. Williamson, S. Dittmann, A. Schmid, G. Wilharm and A. Sing (2007). The weak interaction of LcrV and TLR2 does not contribute to the virulence of Yersinia pestis. *Microbes.Infect.* **9**(8), 997-1002.
- Rosqvist, R., C. Persson, S. Hakansson, R. Nordfeldt and H. Wolf-Watz (1995). Translocation of the Yersinia YopE and YopH virulence proteins into target cells is mediated by YopB and YopD. *Contrib.Microbiol.Immunol.* **13**, 230-234.
- Ruckdeschel, K., K. Richter, O. Mannel and J. Heesemann (2001). Arginine-143 of Yersinia enterocolitica YopP crucially determines isotype-related NF-kappaB suppression and apoptosis induction in macrophages. *Infect.Immun.* **69**(12), 7652-7662.
- Sarker, M. R., C. Neyt, I. Stainier and G. R. Cornelis (1998). The Yersinia Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J.Bacteriol.* **180**(5), 1207-1214.
- Sarker, M. R., M. P. Sory, A. P. Boyd, M. Iriarte and G. R. Cornelis (1998). LcrG is required for efficient translocation of Yersinia Yop effector proteins into eukaryotic cells. *Infect.Immun.* **66**(6), 2976-2979.
- Sauvonnet, N., I. Lambermont, P. van der Bruggen and G. R. Cornelis (2002). YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol.Microbiol.* **45**(3), 805-815.
- Schmid, A., S. Dittmann, V. Grimminger, S. Walter, J. Heesemann and G. Wilharm (2006). Yersinia enterocolitica type III secretion chaperone SycD: recombinant expression, purification and characterization of a homodimer. *Protein Expr.Purif.* **49**(2), 176-182.
- Schotte, P., G. Denecker, B. A. Van Den, P. Vandenabeele, G. R. Cornelis and R. Beyaert (2004). Targeting Rac1 by the Yersinia effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J.Biol.Chem.* **279**(24), 25134-25142.
- Schubert, S., A. Rakin, H. Karch, E. Carniel and J. Heesemann (1998). Prevalence of the "high-pathogenicity island" of Yersinia species among Escherichia coli strains that are pathogenic to humans. *Infect.Immun.* **66**(2), 480-485.
- Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, K. von der Mark and F. Emmrich (1995). Characterization of the binding region for the Yersinia enterocolitica adhesin YadA on types I and II collagen. *Arthritis Rheum.* **38**(9), 1283-1289.
- Shao, F. and J. E. Dixon (2003). YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. *Adv.Exp.Med.Biol.* **529**, 79-84.

- Sing, A., D. Reithmeier-Rost, K. Granfors, J. Hill, A. Roggenkamp and J. Heesemann (2005). A hypervariable N-terminal region of *Yersinia* LcrV determines Toll-like receptor 2-mediated IL-10 induction and mouse virulence. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **102**(44), 16049-16054.
- Skrzypek, E., C. Cowan and S. C. Straley (1998). Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol.Microbiol.* **30**(5), 1051-1065.
- Skrzypek, E. and S. C. Straley (1996). Interaction between *Yersinia pestis* YopM protein and human alpha-thrombin. *Thromb.Res.* **84**(1), 33-43.
- Smith, C. L., P. Khandelwal, K. Keliikuli, E. R. Zuiderweg and M. A. Saper (2001). Structure of the type III secretion and substrate-binding domain of *Yersinia* YopH phosphatase. *Mol.Microbiol.* **42**(4), 967-979.
- Snellings, N. J., M. Popek and L. E. Lindler (2001). Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon. *Infect.Immun.* **69**(7), 4627-4638.
- Sorg, I., U. M. Goehring, K. Aktories and G. Schmidt (2001). Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infect.Immun.* **69**(12), 7535-7543.
- Sorg, I., S. Wagner, M. Amstutz, S. A. Muller, P. Broz, Y. Lussi, A. Engel and G. R. Cornelis (2007). YscU recognizes translocators as export substrates of the *Yersinia* injectisome. *EMBO J.* **26**(12), 3015-3024.
- Sorg, J. A., B. Blaylock and O. Schneewind (2006). Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **103**(44), 16490-16595.
- Sun, P., J. E. Tropea, B. P. Austin, S. Cherry and D. S. Waugh (2008). Structural characterization of the *Yersinia pestis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. *J.Mol.Biol.* **377**(3), 819-830.
- Takao, T., N. Tominaga, Y. Shimonishi, S. Hara, T. Inoue and A. Miyama (1984). Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **125**(3), 845-851.
- Thiefes, A., A. Wolf, A. Doerrie, G. A. Grassl, K. Matsumoto, I. Autenrieth, E. Bohn, H. Sakurai, R. Niedenthal, K. Resch and M. Kracht (2006). The *Yersinia enterocolitica* effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway. *EMBO Rep.* **7**(8), 838-844.
- Trasak, C., G. Zenner, A. Vogel, G. Yuksekdog, R. Rost, I. Haase, M. Fischer, L. Israel, A. Imhof, S. Linder, M. Schleicher and M. Aepfelbacher (2007). *Yersinia* protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process. *J.Biol.Chem.* **282**(4), 2268-2277.
- Trulzsch, K., A. Roggenkamp, M. Aepfelbacher, G. Wilharm, K. Ruckdeschel and J. Heesemann (2003). Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int.J.Med.Microbiol.* **293**(2-3), 167-177.

- Wagner, S., I. Sorg, M. Degiacomi, L. Journet, P. M. Dal and G. R. Cornelis (2009). The helical content of the YscP molecular ruler determines the length of the Yersinia injectisome. *Mol.Microbiol.* **71**(3), 692-701.
- Wattiau, P., B. Bernier, P. Deslee, T. Michiels and G. R. Cornelis (1994). Individual chaperones required for Yop secretion by Yersinia. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**(22), 10493-10497.
- Wilharm, G., S. Dittmann, A. Schmid and J. Heesemann (2007). On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int.J.Med.Microbiol.* **297**(1), 27-36.
- Winstanley, C. and C. A. Hart (2001). Type III secretion systems and pathogenicity islands. *J.Med.Microbiol.* **50**(2), 116-126.
- Woestyn, S., A. Allaoui, P. Wattiau and G. R. Cornelis (1994). YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery. *J.Bacteriol.* **176**(6), 1561-1569.
- Woestyn, S., M. P. Sory, A. Boland, O. Lequenne and G. R. Cornelis (1996). The cytosolic SycE and SycH chaperones of Yersinia protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol.Microbiol.* **20**(6), 1261-1271.
- Zaharik, M. L., S. Gruenheid, A. J. Perrin and B. B. Finlay (2002). Delivery of dangerous goods: type III secretion in enteric pathogens. *Int.J.Med.Microbiol.* **291**(8), 593-603.
- Zumbihl, R., M. Aepfelbacher, A. Andor, C. A. Jacobi, K. Ruckdeschel, B. Rouot and J. Heesemann (1999). The cytotoxin YopT of Yersinia enterocolitica induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J.Biol.Chem.* **274**(41), 29289-29293.

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin, Ampere
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua _{dest.}	bidestilliertes oder entionisiertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Cm	Chloramphenicol
Cb	Carbenicillin
d	Tag
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DSP	2,2'-Dithiobis(succinimidyl-propionat)
DTT	1,4-Dithiothreit
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGS	Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat)
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alteri: und andere
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde
HA	Hypoxanthin/Azaserin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HRPO	Meerrettichperoxidase
HS	Humanserum
Inv	Invasin
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
Km	Kanamycin
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucinreiche Wiederholungssequenz
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
Nal	Nalidixin
NMR	nuclear magnetic resonance
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
orf	open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAXS	Kleinwinkelstreuung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Sm	Streptomycin
Sp	Spectinomycin
Syc	specific Yop chaperone

T	Thymin
T3SS	Typ III Sekretionssystem
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEV	tobacco etch virus
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
U	Uracil
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
Ysc	Yop secretion component

PUBLIKATIONSLISTE

Dittmann, S., A. Schmid, S. Richter, K. Trülzsch, J. Heesemann and G. Wilharm (2007). The *Yersinia enterocolitica* type three secretion chaperone SycO is integrated into the Yop regulatory network and binds the Yop secretion protein YscM1. *BMC Microbiol.* **5**, 67.

Reithmeier-Rost, D., J. Hill, S.-J. Elvin, D. Williamson, S. Dittmann, A. Schmid, G. Wilharm and A. Sing (2007). The weak interaction of LcrV and TLR2 does not contribute to the virulence of *Yersinia pestis*. *Microbes Infect.* **9**(8), 997-1002.

Schmid, A., S. Dittmann, V. Grimminger, S. Walter, J. Heesemann and G. Wilharm (2006). *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycD: recombinant expression, purification and characterization of a homodimer. *Protein Expr.Purif.* **49**(2), 176-182.

Wilharm, G., S. Dittmann, A. Schmid and J. Heesemann (2007). On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int.J.Med.Microbiol.* **297**(1), 27-36.

DANKSAGUNG

Ich danke ganz herzlich Frau Prof. Dr. Sevil Weinkauf für die Übernahme des Erstgutachtens und für die Bereitschaft, meine Arbeit an der Fakultät für Chemie der TU München zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Max von Pettenkofer-Institut durchzuführen.

Herrn PD Dr. Gottfried Wilharm möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und besonders für die Betreuung zu Beginn und die damit verbundene zeitaufwändige Einführung in die Welt der Mikrobiologie danken.

Dr. Manfred Rössle (EMBL, Hamburg) möchte ich für die Unterstützung bei der Auswertung der SAXS-Daten und Prof. Dr. Axel Imhof und Dr. Lars Israel für die Durchführung der Massenspektrometrie und deren Hilfe bei der Auswertung danken. Bei Prof. Dr. Michael Groll und Dr. Patrick Schreiner möchte ich mich für die Kristallisationsversuche bedanken.

Herzlichst möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kollegen Annika, Susanna, Katy, Robert, Konrad, Bettina und Sandra bedanken.

Besonders Annika möchte ich hervorheben, die mich in der Zeit durch die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen sehr unterstützt hat.

Mein Dank gilt auch den jetzigen Kollegen Tobi, Sandra, Kareen, Lars, Rike und Christine, die mich immer wieder motiviert haben, diese Arbeit endlich abzuschließen.

Ein großer Dank geht an Sabine, bei der ich den meisten Teil dieser Arbeit geschrieben habe. Caro möchte ich für die Unterstützung über die ganze Zeit und darüber hinaus herzlichst danken.

Von Herzen danke ich Rainer, Gerhard und Inge, die mich in einer schwierigen Zeit sehr unterstützt haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei Aina, Arvid, Dieter und Fumiyo bedanken für alles, was sie für mich getan haben.